



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLÁN

DESARROLLO DE DOS RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES CON
ANTIMICROBIANOS NATURALES PARA CARNE NO PROCESADA.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

DIANA KAREN HERRERA TREJO

ASESORES:

I.Q. Guadalupe Franco Rodríguez

Dra. Clara Inés Álvarez Manrique



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. I. S. P. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la **Tesis**:

Desarrollo de dos recubrimientos comestibles con antimicrobianos naturales para carne no
procesada

Que presenta la pasante: Diana Karen Herrera Trejo

Con número de cuenta: 407001141 para obtener el Título de: Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcallí, Méx. a 27 de junio de 2011.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Juan Manuel Aceves Hernández	
VOCAL	I.Q. Guadalupe Franco Rodríguez	
SECRETARIO	I.A. Ana Ma. Sabina de la Cruz Javier	
1er SUPLENTE	Dra. Ma. Eugenia Ramírez Ortíz	
2do SUPLENTE	M.C. Ma. Guadalupe Amaya León	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

AGRADECIMIENTOS

- **A Dios:** Gracias Dios por no darme todo, sino solo lo que necesito, por todo lo que me rodea, por contar tus bendiciones y por permitirme cumplir uno de mis sueños.
- **A Mamá:** Gracias porque eres mi amiga, ríes conmigo, lloras conmigo y me perdonas los defectos, por tus sinceras frases reconfortantes que llegan justo cuando las necesito, por animarme a intentarlo de nuevo sin caer vencida ante el fracaso, porque me enseñaste que la satisfacción se encuentra en mis propios progresos, porque cuando me miras se te iluminan los ojos, por estar orgullosa de mi; pero sobre todo por darme todo lo que soy y lo que tengo ya que sin tu ayuda hoy no habiéramos logrado juntas este sueño.
- **A Papá:** Por tu cariño, comprensión y apoyo sin condiciones ni medida, gracias por guiarme sobre el camino de la educación. Gracias porque casi de sol a sol trabajaste, con el único afán de sacarnos adelante, por eso hoy también este logro es tuyo.
- **A Jessica:** ...mi hermana, mi amiga y mi guía, con quien he sonreído toda mi vida, quien siempre ha estado cuidándome y guiándome en cada paso, quien a confiado siempre en todo lo que soy y hago; eres una fuente de inspiración para seguir adelante cada día y saber que todo lo que soñamos lo podemos lograr, que no hay imposibles. Eres la mejor hermana mayor que pudo haber elegido Dios para mí.
- **A Juan Manuel y Familia:** Definitivamente eres de las personas más influyentes en mi vida, gracias a ti hoy se que lo más importante es persistir y no rendirse a pesar de las dificultades, que lo más importante siempre es la familia y así como siempre nos haz apoyado y cuidado, así yo te cuidaré y apoyaré y ten por seguro que también lo haré por los 5 y por Martha.
- **A mis abuelitos:** No pudieron tener este sueño en sus manos, pero estoy segura que desde el cielo lo están disfrutando como yo, sé que están orgullosos de mi, porque siempre creyeron que haría todo lo que me propusiera... Los extraño.

- **A Adrián:** Por quererme completa, aceptarme, cuidarme y motivarme, por todo tu amor, por creer en mí, por tu apoyo incondicional en cada paso que he dado, por estar conmigo en todo momento, porque en momentos en los que las esperanzas se desaparecían de mi mente tu siempre las regresaste e hiciste que estuviera completamente segura de mi misma, y obviamente por compartir tu vida, sueños, logros y tu familia conmigo.
- **A Oli, Ivette y David:** Definitivamente hay personas que llegan a nuestras vidas, nos dejan una huella y se marchan, pero hay otras que se quedan con nosotros eternamente y esas personas son ustedes, les agradezco el apoyo incondicional, por animarme en momentos de flaqueza, por todas las risas, llantos, estrés y emociones que vivimos juntos, fue un placer ser equipo de ustedes en todas las materias, pero es aún mejor ser los mejores amigos. Estoy muy feliz que desde el primer día de este sueño me encontré con uno de ustedes y poco a poco fuimos uniéndonos para continuar así toda la vida, estoy muy orgullosa de tener amigos como ustedes.
- **A Marcos y Sra. Felipa:** Ustedes son como mi segunda familia, gracias porque han estado pendiente de mi y de Jessica, por compartir sueños y negocios con mi hermana, por apoyarnos todo el tiempo en momentos difíciles y en los de grandeza y porque hemos compartido más que un departamento un pequeño hogar, y eso se los agradezco con todo el corazón... Gracias
- **A la Dra. Maru:** En mi vida escolar ha marcado una pauta muy importante, me ha impulsado a crecer profesionalmente, agradezco que haya creído y haya visto un gran potencial en nosotros, pero agradezco todavía más que después de tener la fortuna de que fuera mi maestra poco a poco se convirtiera en mi amiga, confidente, colega y manager del cuarteto de Liverpool; agradezco profundamente que la haya encontrado y ahora sea parte de mi vida.
- **A mis Amigos:** Gracias por compartir la aventura que fue estudiar Ingeniería en Alimentos, por todas las emociones compartidas, por cada goya que gritamos juntos, por todas las fiestas, por cada anécdota de la cual hoy nos reímos juntos y por todas las que vendrán y por estar orgullosos de ser I. A 31. También a todos mis amigos que me

conocieron desde la infancia, los de la prepa y que hasta el día de hoy vivimos esa amistad como si todo el tiempo estuviéramos juntos y que sin importar donde estemos físicamente siempre estamos unidos.

- **A la UNAM:** Agradecimiento a la UNAM porque durante 5 años me ha brindado grandes oportunidades, porque recibí la mejor educación, por la oportunidad de vivir grandes experiencias en las aulas, en los laboratorios, en la biblioteca, en cada pasillo de esta gran institución, pero sobre todo, gracias por el espíritu universitario que como a muchos otros también a mí me regaló, ya que cada GOYA sale del alma y el corazón y por decir con mucho orgullo son PUMA!!!.
- **A los Profesores:** Porque me compartieron conocimiento, experiencias, formaron parte de lo que hoy soy como profesionista, por hacerme sentir orgullosa de pertenecer a la UNAM, por brindarme todas las oportunidades de crecimiento que cualquier alumno anhela, también por todo el estrés, por todo el tiempo que pasábamos en la escuela haciendo un proyecto, por las experiencias en LEM, porque hoy son anécdotas para recordar toda la vida.
- **A mi asesora la Dra. Clara:** Le agradezco haya confiado en mí y en mi proyecto, por contagiarme su pasión por la ciencia, por que hoy gracias a usted sé que la investigación es parte esencial en mi vida. Gracias por estar aquí al final del camino
- **A mi asesora la Maestra Lupita:** Por compartir conmigo un poco de su indudable conocimiento, por motivarme a seguir adelante, pero sobre todo por su tiempo, apoyo y guía en este proyecto. Gracias por estar aquí al final del camino.
- **A mis Sinodales:** Les agradezco el tiempo invertido, interés, dedicación, sugerencias y comentarios para mejorar mi trabajo de tesis.
- Lo mejor del mundo, lo más profundo, cuando estas vos, brillan más las estrellas, el fuego no quema, se frena la ciencia, es lo que me dice, es lo que me sale, cuando estoy con vos... Gracias por cada aventura, por cada momento especial.

"Por mi raza hablará el espíritu" (José Vasconcelos)

ÍNDICE

<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
----------------------------------	---

CAPÍTULO 1

1 MARCO TEÓRICO	3
1.1 RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES	3
1.1.1 ANTECEDENTES.....	3
1.2 CONCEPTOS GENERALES	4
1.1.3 PROPIEDADES PRINCIPALES	4
1.2 COMPONENTES DE PELÍCULAS.....	8
1.3 PELÍCULAS A BASE DE PROTEÍNAS	11
1.3.1 GRENETINA.....	12
1.4 PELÍCULAS ANTIMICROBIANAS	15
1.4.1 AGENTES ANTIMICROBIANOS	17
1.4.2 AGENTES ANTIMICROBIANOS NATURALES.....	19
1.4.3 MECANISMO DE PELÍCULAS ANTIMICROBIANAS	27
1.4.4 USO DE PELÍCULAS ANTIMICROBIANAS EN CARNE.....	29
1.5 CARNE.....	30
1.5.1 PROTEÍNAS DE LA CARNE	31
1.6 RETENCIÓN DE HUMEDAD	33
1.6.1 CONTAMINACIÓN MICROBIANA	34
1.6.2 ASEPSIA	36
1.7 MICROORGANISMO: <i>Salmonella spp</i> como patógeno más común en carne..	37

CAPÍTULO 2

2	DESARROLLO DE METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	40
2.1.1	Actividad Preliminar 1	42
2.1.2	Actividad Preliminar 2	44
2.1.3	Actividad Preliminar 3	45
2.1.4	Actividad Preliminar 4	49
2.1.5	Actividad Preliminar 5	52

CAPÍTULO 3

3	RESULTADOS Y ANÁLISIS	64
3.1	Selección de la concentración matriz	64
3.2	Selección de las concentraciones mínimas inhibitorias del aceite esencial de orégano y de té verde (emulsiones)	65
3.3	Selección de la concentración mínima inhibitoria de <i>Salmonella spp</i> en las películas	67
3.4	Caracterización fisicoquímica	71
3.4.1	Microscopía Óptica	71
3.4.2	Análisis Termogravimétrico (TGA) y Análisis Térmico Diferencial (DTA) ..	74
3.4.3	Permeabilidad al agua	78
3.4.4	Textura	80
3.5	Caracterización Microbiológica	83
3.5.1	Determinación de la dosis de <i>Salmonella spp</i> que permita observar el efecto de inhibición	83
3.5.2	Aplicación del recubrimiento en la carne	85
3.5.3	Porcentaje de inhibición	86

<u>CONCLUSIÓN</u>	92
<u>RECOMENDACIONES</u>	94
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	95
<u>ANEXOS</u>	
Anexo 1.....	100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Algunas aplicaciones de los componentes antimicrobianos	19
Tabla 2. Aceites esenciales contra microorganismos	21
Tabla 3. Microorganismos aislados con frecuencia en las carnes	35
Tabla 4. Ángulos obtenidos para cada concentración.....	64
Tabla 5. Muestra las micrografías de las películas de orégano y té verde.....	71
Tabla 6. Ángulos de contacto.....	78
Tabla 7. Muestra una de las repeticiones para determinar el porcentaje de inhibición. .	87
Tabla 8. Conteo de UFC's en carne (C).	100
Tabla 9. Conteo de UFC's en carne con 20µ L de <i>Salmonella spp</i> (CS).....	100
Tabla 10. Conteo de UFC's en carne con 20µ L de <i>Salmonella spp</i> y 100 µ L de recubrimiento con aceite esencial de orégano (CSRO).	101
Tabla 11. Conteo de UFC's en carne con 20µ L de <i>Salmonella spp</i> y 100 µ L de recubrimiento con aceite esencial de té verde (CSRT).....	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fenómeno de permeabilidad al recubrir un alimento	6
Figura 2. Estructura de la grenetina	12
Figura 3. Comparación de un sistema de empaque normal y uno antimicrobiano.	17
Figura 4. Estructura química de los principales componentes en orégano	23
Figura 5. Estructura química de los principios flavonoides en orégano.....	23
Figura 6. Estructura química de los polifenoles del té verde. a) catequina ,	26
Figura 7. Empaque antimicrobiano y recubrimiento	27
Figura 8. Cinética de crecimiento de microorganismos.....	29
Figura 9. Localización aproximada del agua en la carne	33
Figura 10. Cuadro metodológico	40
Figura 11. Partes y secciones del secador.....	42
Figura 12. Orificios.	43
Figura 13. Dimensiones del secador	43
Figura 14. Películas con base a las cuales se eligieron las concentraciones.....	45

Figura 15. Moldes.....	46
Figura 16. Partes del ángulometro.	47
Figura 17. Ejemplifica el corte de las películas completas, para cada concentración	48
Figura 18. Zonas evaluadas por tiras de cada película.	48
Figura 19. Muestra la gota de agua que caerá sobre la película.....	49
Figura 20. Ejemplifica como se observa la gota de agua sobre la pantalla	49
Figura 21. Ejemplifica los trozos de películas de orégano o té verde, sobre el medio de cultivo con <i>Salmonella spp</i>	51
Figura 22. Ejemplifica la división del medio de cultivo.....	53
Figura 23. Calorímetro TA- INSTRUMENTS, modelo STD 2960	55
Figura 24. Esquema sobre la manipulación de muestra para situarla en el interior del calorímetro.....	55
Figura 25. Muestra las gráficas obtenidas en el calorímetro TA- INSTRUMENTS STD 296.....	56
Figura 26. Ejemplifica el corte de las películas completas, para cada aceite esencial...	57
Figura 27. Zonas evaluadas por tiras de cada película.	58
Figura 28. Texturómetro TA. X. T plus modelo.....	59
Figura 29. Muestra la gráfica obtenida en el Texturómetro TA. X. T plus.	59
Figura 30. Muestra como se colocaron los trozos de carne (T_1 y T_2), con los dos diferentes controles,.....	60
Figura 31. Distribución de las gotas de cada dilución en el medio de cultivo.....	62
Figura 32. Inhibición de <i>Salmonella spp</i> por aceite esencial de orégano.....	65
Figura 33. Inhibición de <i>Salmonella spp</i> por aceite esencial de té verde.	66
Figura 34. Muestra la inhibición de las películas adicionadas con té verde a una concentración de 3%.	68
Figura 35. Muestra las películas con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano, sin poder inhibitorio.....	68
Figura 36. Muestra la inhibición de las películas adicionadas con orégano a una concentración de 5%.	69
Figura 37. Muestra los diferentes fenómenos en el ángulo de contacto que pueden presentarse en la superficie de una película.....	79

Figura 38. Muestra las colonias que se obtuvieron a las tres diferentes concentraciones (C_1 , C_2 y C_3), al adicionar <i>Salmonella spp</i> a la carne (CS), así como las diluciones realizadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}).....	83
Figura 39. Muestra la inhibición de <i>Salmonella spp</i> con recubrimiento a base del aceite esencial de orégano en la carne.	85
Figura 40. Muestra la inhibición de <i>Salmonella spp</i> con recubrimiento a base del aceite esencial de té verde en la carne.....	85
Figura 41. Mecanismo de acción de los aceites esenciales y sus componentes en la célula bacteriana.....	90

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Análisis Termogravimétrico.....	74
Gráfica 2. Análisis Térmico Diferencial.....	75
Gráfica 3. Comparación del parámetro de fragilidad de las películas antimicrobianas. .	80
Gráfica 4. Comparación del parámetro de dureza de las películas antimicrobianas. 81	
Gráfica 5. Presenta las Unidades formadoras de colonias (UFC).	84
Gráfica 6. Promedio de las Unidades Formadoras de Colonias.....	88
Gráfica 7. Porcentaje de inhibición de los recubrimientos en UFC 's.....	88
Gráfica 8. Muestra la disminución de ciclos logarítmicos de la bacteria.....	89

NOMENCLATURA

Arg = Arginina

Asp = Ácido aspártico

Aw = Actividad de agua

C = Carne sin *Salmonella spp*

°C = grados Celsius

C+= control positivo

C-= control negativo

C_n = diferentes concentraciones evaluadas

cm = centímetros

cm² = centímetros cuadrados

CO₂ = Dióxido de carbono

CS = Carne + *Salmonella spp*

CSRO = Carne + *Salmonella spp* + recubrimiento de orégano

CSRT = Carne + *Salmonella spp* + recubrimiento de té verde

Cys = Cisteína

Da = Dalton

DTA = Análisis térmico diferencial

g = gramos

g_n = representan las gotas.

Glu = Ácido glutámico

h= hora

His =Histidina

kg_f= kilogramos fuerza

Lys =Lisina

m/m = relación de la concentración masa/ masa

min = minutos

mg = miligramos

ml = mililitros

UFC/ ml= bacterias inhibidas por mililitro

μL = micro litros

O₂ = Oxígeno

PM= Peso molecular

P_n = representan los trozos de película

SO₂=Dióxido de azufre

T_n= trozos de carne

TGA = Análisis termogravimétrico

Tir= Tirosina

UFC = Unidades formadoras de colonias

v/v = relación de la concentración volumen/ volumen

INTRODUCCIÓN

Las nuevas tendencias de comercialización y distribución de los alimentos han propiciado el desarrollo de empaques y recubrimientos que presenten características especiales, esto se debe al incremento en la demanda de alimentos mínimamente procesados.

Una de las alternativas que se proponen son películas comestibles y transparentes (elaborada con polisacáridos, proteínas, lípidos y/o combinaciones de los mismos), que envuelve al alimento y actúan de barrera frente a humedad y oxígeno principalmente (Rojas Grau y col., 2007), además pueden ser utilizados como soporte de aditivos, antimicrobianos, conservadores, acidificantes, sales o antioxidantes que permitan mejorar su conservación y apariencia (Coma, 2007).

Es por esto que la aplicación de películas y recubrimientos antimicrobianas adicionados con aceites esenciales ha tenido un desarrollo importante recientemente, ya que es un apoyo a la inocuidad alimentaria (Caro y col., 2007), debido a que los microorganismos patógenos en alimentos, generalmente son eliminados por tratamientos térmicos durante su procesamiento, sin embargo, la contaminación después de ser procesados tiene un riesgo alto causado por otros alimentos, operarios, equipos, medio ambiente, entre otros.

En el presente trabajo se plantea el desarrollo de dos recubrimientos comestibles y antimicrobianos a base de aceites esenciales (orégano y té verde) para carne no procesada, que permita inhibir el crecimiento de *Salmonella spp.* Se presentan una serie de pruebas fisicoquímicas y microbiológicas para caracterizar a la película y finalmente utilizar el recubrimiento en la carne para obtener un porcentaje de inhibición contra el crecimiento de dicha bacteria.

Una vez realizada la caracterización tanto de la película antimicrobiana como del recubrimiento, se compararon ambas formulaciones, realizando un análisis y discusión de los resultados obtenidos; para seleccionar el mejor recubrimiento antibacteriano en carne no procesada, utilizando aceites esenciales como agentes antimicrobianos.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1 MARCO TEÓRICO

1.1 RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES

1.1.1 ANTECEDENTES

En el siglo XIX, la sacarosa era aplicada como una cubierta comestible protectora sobre, nueces, almendras y avellanas para prevenir la oxidación y rancidez durante su almacenamiento. La aplicación más importante de las películas comestibles hasta ahora y particularmente desde 1930, concierne al uso de una emulsión hecha con cera y aceites en agua que se esparce sobre las frutas para mejorar su apariencia (brillo, color, textura), servir de vehículo de fungicidas, proporcionar un mejor control de su maduración y retardar la pérdida del agua (Rojas Grau y col., 2007)

A partir de 1950 hay reportes en la literatura de películas hechas a base de polisacáridos, proteínas, lípidos y mezclas, las más exitosas fueron las películas hechas a base de lípidos (monoglicéridos acetilados, ceras y surfactantes) y se usaron para bloquear la transferencia de humedad, reducir la abrasión superficial durante el manipuleo y controlar el escaldado en manzanas (Tawil Bouchez, 2003).

Recientemente una de las aplicaciones comerciales más exitosas le constituye la familia de productos a base de calcio, vitaminas, minerales y carboximetilcelulosa que ofrece una serie de presentaciones comerciales para la extensión de vida útil de un gran número de frutas y hortalizas, retardando significativamente las reacciones de oscurecimiento. Actualmente tanto las películas comestibles como los recubrimientos comestibles deben cumplir ciertas características como son las siguientes:

- Ser estables bajo condiciones de alta humedad relativa.
- Ser buena barrera al vapor de agua.
- Ser buena barrera al oxígeno.
- Ser buena barrera al dióxido de carbono.
- Presentar buenas propiedades mecánicas.

- Presentar buenas propiedades de adhesión.
- Sensorialmente aceptable.
- Estabilidad fisicoquímica.
- Estabilidad microbiológica.
- Costo razonable (Rojas Grau y col., 2007).

1.1.2 CONCEPTOS GENERALES

- **RECUBRIMIENTO COMESTIBLE:** Es definido como una capa delgada de un material biopolímero (proteína o polisacárido), que es aplicada sobre la superficie de un alimento en adición o reemplazo de la corteza natural, y que se comporta principalmente como barrera que reduce la difusión de gases (O_2 , CO_2 y vapor de agua), permitiendo extender la vida útil del alimento (Rojas Grau y col., 2007).
- **PELÍCULAS COMESTIBLES:** Son preformadas como láminas sólidas, las cuales son posteriormente aplicadas en forma de recubrimiento sobre el alimento que proveen una barrera al transporte de masa en o a través del alimento fresco o manufacturado y pueden ser digeridas por el consumidor (Rojas Grau y col., 2007).

1.1.3 PROPIEDADES PRINCIPALES

Para la elaboración de películas o recubrimientos comestibles es de suma importancia considerar las propiedades que se explican a continuación.

1.1.3.1 BARRERA A LA HUMEDAD

Los cambios fisicoquímicos y bioquímicos que ocurren en los alimentos durante el almacenamiento, se deben principalmente a la migración de agua entre constituyentes alimenticios o entre el medio ambiente (pérdida o ganancia de humedad). Para prevenir tales transferencias, algunos procesos tales como cubiertas a base de lípidos o polisacáridos se aplican a frutas y carnes.

Una película puede extender la vida de anaquel y elevar la calidad de alimentos por limitación de la migración de humedad que puede acelerar las reacciones

deteriorativas (Garnica Martínez, 2001). Siendo la permeabilidad o barrera al agua, la propiedad que puede ser considerada como la transferencia de materia existente a través de la pared que constituye el material de embalaje (Bureau, 1995).

La resistencia al agua es una propiedad importante de las películas comestibles, como protección de alimentos donde la actividad de agua (A_w) es alta, o cuando la película está en contacto con el agua durante el proceso de cubierta, por consiguiente la propiedad clave de interés de los recubrimientos comestibles es la resistencia a la migración de humedad (Garnica Martínez, 2001).

La naturaleza de la película empleada desempeña un papel muy importante: a mayor hidrofobicidad de los materiales usados, mayor permeabilidad al vapor de agua. Las películas elaboradas a partir de polímeros naturales tales como los polisacáridos (almidón, derivados de celulosa, alginatos, pectinas, gelano, carragenano, etc), así como aquellos a base de proteínas, muestran una baja resistencia al agua y poseen pobres propiedades de barrera como consecuencia de su naturaleza hidrofílica.

La transmisión de vapor de agua juega un papel muy importante como ya se ha mencionado anteriormente, sobre todo en las reacciones de deterioro de los alimentos; por lo tanto, es la propiedad más estudiada de las películas. La permeabilidad de vapor de agua se asume que es independiente del gradiente de presión de vapor ejercido en las películas. Sin embargo, los materiales hidrofílicos, como películas de polisacáridos, no cumplen con este comportamiento ideal ya que interaccionan con los grupos polares de la estructura de la película y permean las moléculas de agua (Rao y col., 2010).

Para mejorar las propiedades de barrera al vapor de agua de este tipo de recubrimientos se pueden incorporar lípidos, que emulsificados en la solución formadora de coberturas o formando una doble capa sobre el producto, puede ayudar a prevenir reacciones degradativas del tejido como consecuencia de la pérdida de humedad (Rojas Grau y col., 2007).

Con la finalidad de ejemplificar el fenómeno de la permeabilidad al agua se muestra la Figura 1.

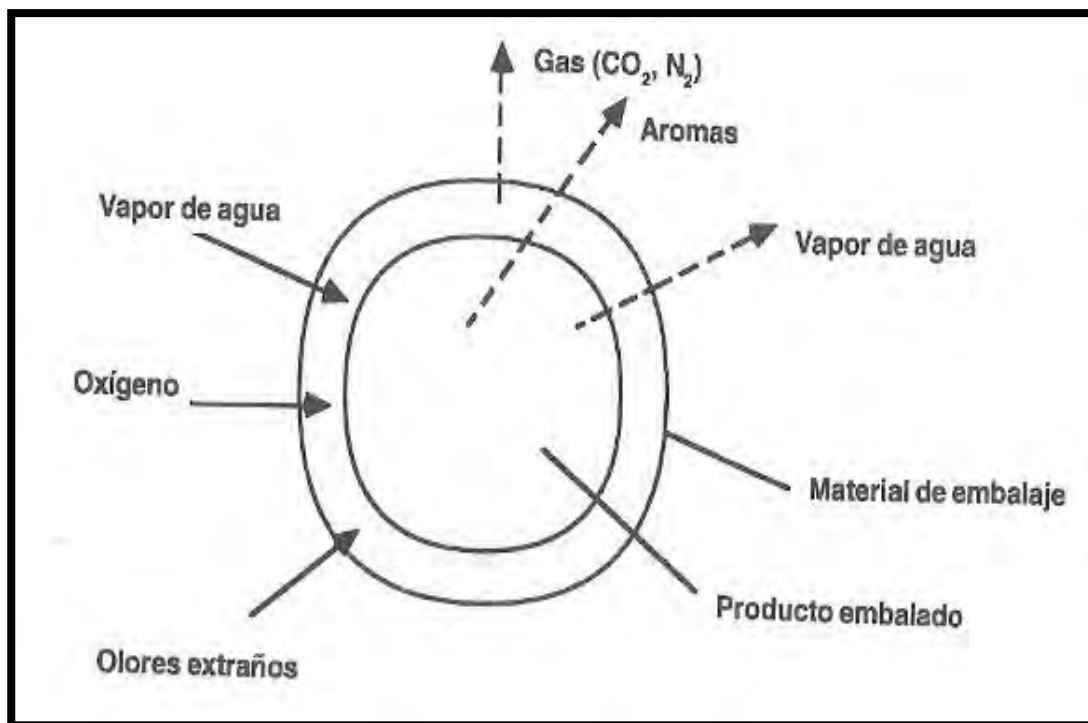


Figura 1. Fenómeno de permeabilidad al recubrir un alimento (Bureau, 1995).

Algunos de los factores que influyen en la permeabilidad se explican a continuación:

TEMPERATURA: la difusión, la solubilidad y en consecuencia la permeabilidad varían con la temperatura. La permeabilidad disminuye al disminuir la temperatura, y aumenta al incrementar la concentración del producto que se difunde.

PRESIÓN: para los gases sencillos (oxígeno, anhídrido carbónico, nitrógeno), la transferencia a través de la membrana es directamente proporcional a la diferencia de presión existente entre las dos fases (Bureau, 1995).

ESTRUCTURA QUÍMICA: los diferentes grupos constituyentes pueden tener grandes efectos sobre la variabilidad de la permeabilidad por influenciar dos principales factores: la firmeza de las cadenas y el volumen libre existente entre las cadenas.

DENSIDAD DE ENERGÍA COHESIVA: es una medida de la polaridad y de la energía de enlace entre las cadenas. En general, las altas densidades de energía

cohesiva, hacen más difícil que las cadenas poliméricas de abran y permitan el paso de un permeante (Garnica Martínez, 2001).

VOLUMEN LIBRE: explica la movilidad o difusión de las interacciones entre las moléculas del polímero.

CRISTALINIDAD: es una medida del grado de orden de las moléculas. Las propiedades de un polímero que afectan la cristalinidad incluyen la regularidad estructural de la cadena polimérica, la movilidad de la cadena, que permite varias conformaciones; la repetida presencia de cadenas laterales, que presiona que haya enlaces intermoleculares, y la ausencia de voluminosas cadenas laterales, que interfieren con la formación cristalina. A la fase cristalina se le considera normalmente impermeable.

ORIENTACIÓN: se refiere a la alineación de las cadenas poliméricas. Se reporta un decremento en el volumen libre fraccional de la región amorfa con el consecuente descenso de los coeficientes de permeabilidad, solubilidad y difusividad (Garnica Martínez, 2001).

1.1.3.2 PROPIEDADES MECÁNICAS

Las propiedades mecánicas dependen en gran medida del tipo de material empleado en su elaboración y especialmente de su grado de cohesión, es decir, la habilidad del polímero para formar puentes moleculares numerosos y estables entre cadenas poliméricas, los cuales impiden su separación.

Por lo tanto, la elección de las sustancias a emplear y/o aditivos activos a añadir están totalmente relacionados con la función para la cual se desea utilizar la película, la naturaleza del alimento y método de aplicación (Rojas Grau, 2007).

1.1.3.3 TRANSPORTE DE ADITIVOS

Un uso potencial de las películas y recubrimientos comestibles constituye la retención y el transporte de aditivos tales como antioxidantes, antimicrobianos, estabilizantes de textura, colorantes, saborizantes, compuestos bioactivos o funcionales, entre otros, que podrían conferir un beneficio añadido al recubrimiento.

Por ejemplo el enriquecimiento con aditivos funcionales permite mejorar aspectos de calidad, tanto nutricionales como estéticos, sin destruir la integridad del alimento.

El pardeamiento enzimático constituye una de las principales causas de deterioro en alimentos, pudiendo ser evitado mediante la incorporación de antioxidantes en la formulación. Entre los antioxidantes normalmente utilizados se encuentra el ácido ascórbico, sus sales y algunos aminoácidos. Dichos compuestos se pueden utilizar en combinación con otros aditivos tales como antimicrobianos y agentes reafirmantes de textura, con el fin de aumentar la vida de anaquel (Caro y col., 2007).

La incorporación de agentes antimicrobianos constituye una técnica innovadora en el mantenimiento de la inocuidad y vida útil de almacenamiento. El crecimiento de microorganismos en la superficie de productos cortados es una de las principales causas de su deterioro, pudiendo ser evitado mediante el uso de agentes microbianos. Entre los principales agentes antimicrobianos incorporados en recubrimientos se encuentran, sorbatos, ácidos orgánicos y sus sales (ácido sórbico, propiónico y benzoico), sulfitos, nitritos, bacteriocinas (nisina y pediocinas), enzima (lisozima) y más recientemente aceites esenciales (extractos de canela, vainilla, clavo, orégano, cebolla, ajos, mostaza, semillas de toronja).

Además de compuestos antimicrobianos y antioxidantes, también se pueden incorporar agentes estabilizantes de textura, imprescindibles para el mantenimiento de la calidad. También pueden emplearse para transporte de ingredientes activos, pudiendo ser un excelente vehículo para mejorar el valor nutricional (Rojas Grau, 2007).

1.2 COMPONENTES DE PELÍCULAS

Para la formación de películas se necesita en primer lugar de una solución que pueda construir una matriz estructural con suficiente cohesión. Cuando se combinan lípidos, proteínas y polisacáridos que pueden interactuar física o químicamente, y así obtener películas con mejores propiedades. Sin embargo, la compatibilidad de los componentes es un punto importante a considerar cuando se trata de una mezcla de

biopolímeros, ya que se pueden alterar drásticamente el funcionamiento de los compuestos de recubrimiento.

Con el fin de mejorar el intercambio de gases, la adherencia y las propiedades de permeabilidad a la humedad, generalmente se combinan dos o más materiales. Dichas mezclas suelen realizarse mediante emulsión de uno de los componentes, generalmente un lípido, en el resto de los componentes, o mediante un recubrimiento multicapa (Rao y col., 2010).

Además del componente de naturaleza polimérica y de alto peso molecular, otro componente importante son los plastificantes. Estos son moléculas pequeñas de bajo peso molecular, de baja volatilidad y con una naturaleza química similar a la de polímeros. Se usan para mejorar la flexibilidad y la funcionalidad de las películas. El plastificante es un factor muy importante en la formulación, ya que afectan las propiedades mecánicas y la permeabilidad de las películas, debido a que alteran la estructura de las películas, la movilidad de la cadena y los coeficientes de difusión de gas o agua. Dentro de los agentes plastificados utilizados frecuentemente se encuentran: glicerol, polietilglicol, sorbitol, aceites, ácidos grasos, ceras, entre otros (Rojas Grau, 2007).

Los componentes para elaborar películas comestibles se pueden dividir en tres categorías:

1. **Hidrocoloides:** incluyen proteínas y polisacáridos. Los polisacáridos brindan una buena barrera contra aceites y grasas, no son tóxicos y son ampliamente disponibles, poseen una permeabilidad selectiva a oxígeno y dióxido de carbono, y por lo tanto, retardan la respiración y maduración de frutas y vegetales limitando la biodisponibilidad de oxígeno, presentan buena cohesividad y adhesividad pero son deficientes contra la humedad, mientras que las proteínas son apta para cubiertas de frutas y vegetales, proveen de una barrera de dióxido de carbono y oxígeno pero no de agua. A continuación se explican algunas de las propiedades de los hidrocoloides:

- **Polisacáridos:** Las películas de polisacáridos tienen buenas propiedades de barrera a los gases y pueden adherirse a superficies de frutas y vegetales seccionados. No son buena barrera para la humedad, como ya se mencionó anteriormente. Se han elaborado películas a partir de celulosa, pectina, almidón, alginatos, quitosano, carragenina, gomas y mezclas.

Las películas de pectina, generalmente, están hechas de pectina de bajo metoxilo, cloruro de calcio, un plastificante y en algunos casos ácidos orgánicos. Las pectinas son un grupo complejo de polisacáridos estructurales que están presentes en la mayoría de las plantas. Estas películas son de alta transmisión en comparación con las de cera y aceite, bajo condiciones similares (Tawil Bouchez, 2003).

- **Proteínas:** Son susceptibles al cambio de pH, pueden proporcionar un valor nutricional agregado al producto, son buenas formadoras de películas y se adhieren a superficies hidrofílicas. Las fuentes más comunes son caseína, zeína, soya, albúmina de huevo, lactoalbúmina, suero de leche, gluten de trigo y colágeno (Tawil Bouchez, 2003).

2. **Compuestos lipídicos:** incluyen ceras, acilgliceroles y ácidos grasos, son usados por su eficiencia como barrera al vapor de agua, para darle brillo a productos de confitería o para retardar la respiración y la pérdida de humedad; la estructura, el grado de saturación, longitud de cadenas, estado físico, tamaño y dimensión del cristal o arreglo cristalino y distribución de lípidos dentro de la película afectan las propiedades funcionales.
3. **Combinación de hidrocoloides y lípidos:** al elaborar una película comestible se usa sólo un tipo de material, pero por la misma razón pueden poseer buena barrera o buenas propiedades mecánicas, pero no ambas, ejemplo de ello, las películas basadas en proteínas o polisacáridos son muy eficientes como barreras al oxígeno, pero su resistencia es limitada para la

naturaleza hidrofílica de las proteínas y polisacáridos, lo que ha abierto un panorama más amplio para la combinación de materiales (Bureau, 1995).

En general la mayor cohesión se obtiene con polímeros polares ordenados, de cadena larga, que precipitan en forma cristalina. La formación de películas a base de hidrocoloides implica uno de los siguientes mecanismos:

- La coacervación simple, en la que un hidrocoloide en dispersión acuosa precipita o experimenta un cambio de fase por evaporación del solvente, adición de un no electrolito hidrosoluble en el cual el hidrocoloide es insoluble (ejemplo: etanol), provoca la formación de puentes de hidrógeno o modificación de pH.
- La coacervación compleja, en la que dos soluciones de hidrocoloides con cargas opuestas se combinan, provocando la interacción y la precipitación del complejo de polímeros.
- La gelificación o coagulación térmica, mediante el cual el calentamiento de la macromolécula implica su desnaturalización seguida de gelificación.

La insolubilidad, cuando es deseada y las propiedades de la barrera y de retención de solutos pueden incrementarse a veces por la incorporación de agentes que provocan la formación de puentes, iones di y trivalentes o mediante el empleo de condiciones desnaturalizantes como calor e irradiación (Bureau, 1995).

1.3 PELÍCULAS A BASE DE PROTEÍNAS

En el caso de las películas proteicas, se obtiene una mejora más o menos significativa, en función del agente formador de puentes utilizado y de las propiedades como barrera, aunque en detrimento de las propiedades mecánicas (flexibilidad) y ópticas (transparencia). Debe controlarse la concentración a la cual se utilizan estos agentes, así como el modo de aplicación para evitar el desarrollo de resabios amargos, ácidos o saldados.

Las películas a base de proteínas también se utilizan para retener aditivos en la superficie de alimentos (Bureau, 1995).

1.3.1 GRENETINA

La grenetina es una mezcla coloidal (sustancia semisólida), incolora, translúcida, quebradiza y casi insípida que se obtiene por hidrólisis parcial irreversible del colágeno, procedente del tejido conectivo de despojos animales hervidos con agua.

En el colágeno, la unidad básica está formada por tres cadenas de polipéptidos, enrolladas en forma de hélice y estabilizadas por uniones intramoleculares. La grenetina es una proteína compleja, es decir, un polímero compuesto por aminoácidos, contiene 20 diferentes aminoácidos en sus cadenas de polipéptidos (Ver Figura 2). Las propiedades físicas y estructurales son principalmente influenciadas por la distribución del peso molecular y composición de aminoácidos, lo que juega un papel importante en las propiedades reológicas y de barrera de las películas resultantes. La grenetina con bajo peso molecular causado por hidrólisis, reduce las propiedades térmicas y mecánicas (Sazedul Hoque y Benjakul, 2010).

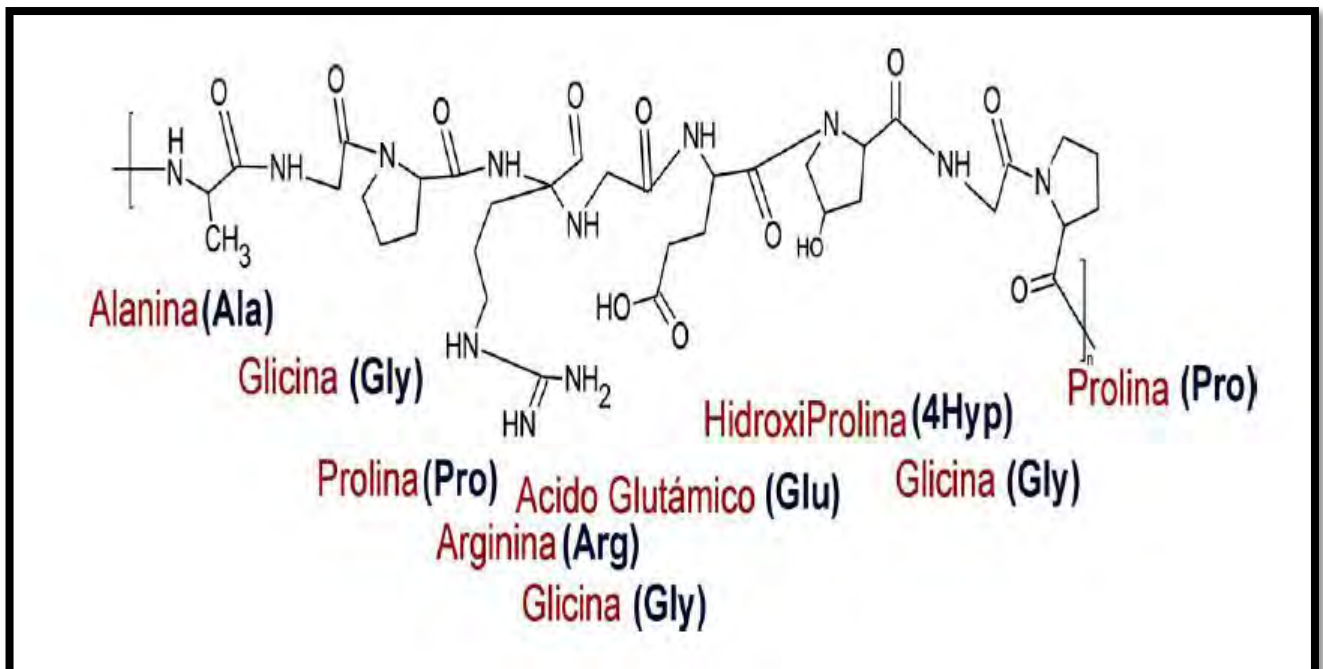


Figura 2. Estructura de la grenetina (Chávez García y Mendoza Martínez, 2010).

Puede ser utilizada como una película exterior, para proteger contra la deshidratación, luz y oxígeno. Tiene la propiedad de formar un gel reversible en frío, debido a la parcial renaturalización de las cadenas de colágeno individuales en triples estructuras helicoidales, que una vez calentado, se funde de hélice a transición de la bobina (Chiou y Avena Bustillos, 2009).

La grenetina de forma general, debe pasar por primera etapa de hidratación en agua fría, donde no se solubiliza, pero se hincha. En esta etapa de hidratación llega a tomar de 5 a 10 veces su peso. Posteriormente a la hidratación, para que llegue a solubilizarse, se ha de calentar hasta alcanzar una temperatura de 60°C. En caliente las soluciones de grenetina son poco viscosas, pero al llegar al punto de gelificación, durante el enfriamiento, aumenta de forma muy rápida.

En el punto de gelificación, se forma un gel transparente, termorreversible, elástico, con buena resistencia a los ciclos de congelación - descongelación y al tratamiento mecánico. No produce sinéresis y los productos almacenados no experimentan modificaciones a temperatura del medio ambiente. Las características del gel se ven modificadas cuando se alcanza el punto isoeléctrico de la gelatina (pH en el que la carga eléctrica de la solución de la gelatina es cero, no hay cargas ni positivas ni negativas). Presenta mayor turbidez, menor hinchamiento, menor viscosidad, los enlaces son más fuertes y la sinéresis es mayor.

Existen factores que condicionan el proceso de gelificación:

- Origen del colágeno del cual se ha obtenido dicha proteína.
- Peso molecular; a mayor peso molecular mayor viscosidad, con lo que aumenta la temperatura de fusión de la grenetina, aumentando también el tiempo de gelificación y fuerza del gel obtenido.
- Concentración en disolución.
- El pH afecta el punto isoeléctrico de la grenetina, y por tanto a características finales.
- Tiempo y temperatura (Cubero y Monferrer, 2002).

Ha sido uno de los primeros materiales usados como matriz de los componentes bioactivos, y sigue siendo un biopolímero de interés debido a su abundancia, precio relativamente bajo y excelentes propiedades funcionales (Chiou y Avena Bustillos, 2009).

Las interacciones y uniones implicadas en una estructura proteica y, por tanto, ocurren en la gernetina son las siguientes:

- Restricciones estéricas: los enlaces peptídicos, a consecuencia de su estructura, tiene una libertad de rotación de 180° , sin embargo, a causa de los aminoácidos no son posibles ciertas torsiones con las cadenas laterales más o menos voluminosas.
- Interacciones de Van der Waals: estas fuerzas son débiles. La naturaleza de la interacción, atractiva o repulsiva, se encuentra relacionada con la distancia entre los átomos; a grandes distancias, no se establece este tipo de interacción, a medida que la distancia disminuye, se desarrolla una fuerza atractiva y cuando es pequeña es repulsiva.
- Interacciones electrostáticas: las proteínas pueden considerarse polielectrólitos, puesto que el equilibrio ácido-base participan los grupos ionizables de las cadenas laterales de algunos aminoácidos (Asp, Glu, Tir, Lys, His, Arg, Cys).
- Enlaces de hidrógeno: un puente de hidrógeno enlaza un átomo electronegativo a un átomo de hidrógeno covalentemente unido a otro átomo electronegativo. En las proteínas, se forman puentes de hidrogeno entre el oxígeno del grupo carboxilo de un enlace peptídico y el hidrogeno del grupo NH de otro enlace peptídico.
- Interacciones hidrofóbicas: se debe a su estructura química apolar; así las cadenas laterales de este tipo no interaccionan con moléculas polares y repelen el agua y tienden, por tanto, a asociarse en regiones hidrofóbas en la proteína.

- Puentes disulfuro: el establecimiento de enlaces cruzados covalentes entre restos de cisteína limita el número de estructuras proteicas posibles y contribuyen a la estabilización de las que se formen (Fennema, 1993).

1.4 PELÍCULAS ANTIMICROBIANAS

La alteración de alimentos y su contaminación con sustancias peligrosas de origen microbiano constituyen un problema que no está totalmente solucionado, a pesar del gran número de técnicas de conservación que hay disponibles. Los fabricantes de alimentos buscan cada vez más técnicas de conservación más sencillas para cumplir la demanda de alimentos con una apariencia más natural. Los consumidores cada vez rechazan más los alimentos preparados con conservadores químicos.

Los conservadores químicos han sido usados durante mucho tiempo como factores de conservación de confianza para controlar una serie de peligros microbiológicos. Sin embargo, tales compuestos no satisfacen el concepto de alimento “natural” que los consumidores demandan y que la industria alimentaria, por tanto, debe elaborar. Está claro que las alternativas naturales no son siempre tan potentes como las sustancias químicas existentes, y que el uso inteligente de procesos combinados puede ser un prerrequisito para una funcionalidad óptima. También es evidente que el uso de alternativas naturales tendrá que superar el escrutinio legislativo (Caro y col., 2007).

Las películas antimicrobianas son un sistema que es capaz de inhibir o matar a microorganismos patógenos que contaminan alimentos (Ahvenainen, 2003). El principal potencial de las películas antimicrobianas es el uso en alimentos que incluyen la carne, pescado, pan, queso, frituras, verduras y bebidas. Hoy en día el empaque antimicrobiano de un alimento está basado en lo siguiente:

1. El paquete es diseñado para modificar las condiciones ambientales que inhiben el crecimiento microbiano.
2. Los purificadores de oxígeno o emisores de CO₂ cambian la composición atmosférica y reduce la cinética de crecimiento de microorganismos aeróbicos.
3. Propiedades físicas de los materiales de empaque.

Como la contaminación microbiana de la mayor parte de productos de alimentación ocurre principalmente en la superficie, las tentativas han sido hechas para mejorar la seguridad y el desperdicio, usando rocíos antibacterianos. Sin embargo, el uso directo de sustancias antimicrobianas ha limitado ventajas porque las sustancias activas son neutralizadas o difusas rápidamente de la superficie en la masa de alimentos.

La actividad acuosa es fundamental para la actividad microbiana, estas películas pueden resistir la migración de la humedad en el exterior de los alimentos durante el almacenamiento. Las películas comestibles pueden formularse para reducir la pérdida por goteo de la carne, al tiempo que se retrasa el crecimiento microbiano por la reducción de actividad de agua (A_w) (Coma, 2007).

1.4.1 AGENTES ANTIMICROBIANOS

Todos los agentes antimicrobianos tienen diferentes actividades las cuales afectan de diferente manera a los microorganismos, los antimicrobianos trabajan con eficacia contra el deterioro de alimentos, esto es debido a las características y mecanismos antimicrobianos de éste y del microorganismo a atacar.

Para la selección de un agente antimicrobiano se deben tener en cuenta las características del microorganismo, las cuales consisten en: requerimiento de oxígeno (aerobios y anaerobios), composición de la pared celular (Gram + o Gram -), etapa de crecimiento (espora o una célula vegetativa), crecimiento de acuerdo a la temperatura (mesofílica, termofílica o psicotrópica) y la resistencia a pH

Algunos agentes antimicrobianos inhiben el metabolismo y otros alteran la estructura de la membrana celular del microorganismo. Las funciones antibacterianas adicionadas a un empaque de materiales poliméricos, generalmente tiene tres modos: absorción, inmovilización y evitar la migración (Ver Figura 3) (Ahvenainen, 2003).

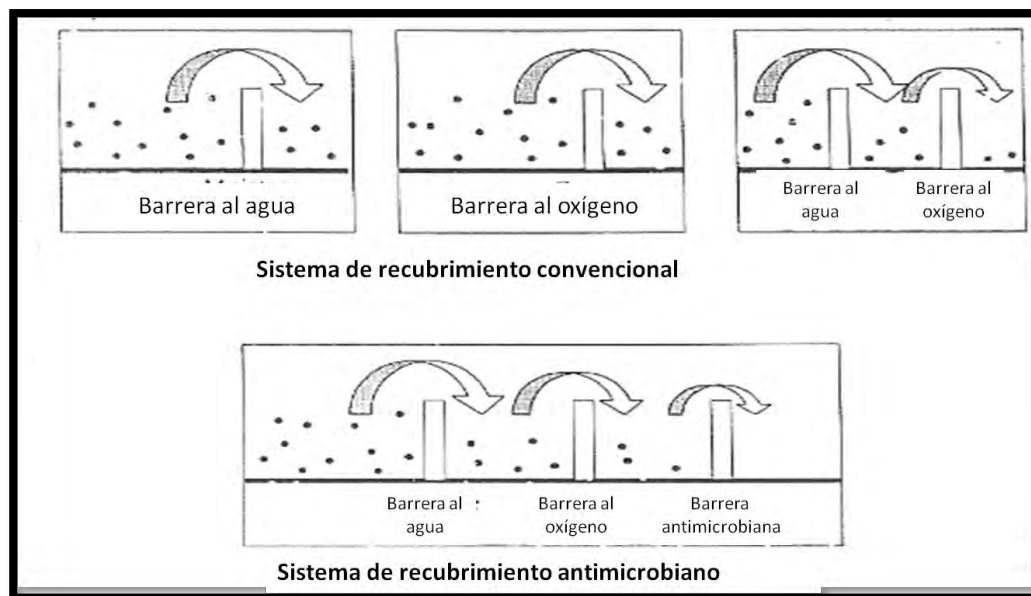


Figura 3. Comparación de un sistema de empaque normal y uno antimicrobiano.

(Ahvenainen, 2003)

Existen compuestos que tienen potencial para ser incorporados en polímeros como las enzimas antimicrobianas, lactoperoxidasa y la lactoferrina, péptidos antimicrobianos como magaininas, cecropinas, defensinas, fenoles naturales como hidroquinonas y catequinas, ésteres de ácidos grasos, antioxidantes fenólicos, antibióticos y metales como cobre.

La incorporación de agentes antimicrobianos en películas, presenta el problema de que no se distribuye homogéneamente, por lo que la investigación en relación a diferentes materiales y agentes es amplia.

Dentro de los factores que se deben tomar en cuenta para la incorporación de bactericidas en materiales de empaque, películas y/o recubrimientos se encuentran:

- Naturaleza del antimicrobiano.
- Interacción entre agentes microbianos.
- Material de la película.
- Alimento al que se desea aplicar.

Asimismo, son importantes las condiciones de proceso de elaboración, las interacciones de los agentes antimicrobianos y las sustancias e ingredientes formadoras de la película, la temperatura de almacenamiento, coeficientes de transferencia de masa, propiedades químicas y físicas; así como el costo e inocuidad de los agentes antibacterianos.

Las sustancias antimicrobianas incorporadas dentro de los materiales de empaque pueden controlar la contaminación microbiana reduciendo el rango de crecimiento y extendiendo el período de la fase estacionaria de crecimiento.

Es importante mencionar que ciertos agentes activos no toleran temperaturas que se usan en el procesamiento de polímeros sintéticos: por esa razón, se ha ampliado la utilización de películas y recubrimientos comestibles conteniendo un agente antimicrobiano (Ahvenainen, 2003).

A continuación se muestra una tabla (Ver Tabla 1) en la que se muestran algunas aplicaciones de las películas antimicrobianas en alimentos.

Tabla 1. Algunas aplicaciones de los componentes antimicrobianos (Coma, 2007).

AGENTE	MICROORGANISMO	COMPONENTES	APLICACIÓN
Ácido sórbico	<i>Staphylococcus aureus</i>	Película de zeína, carragenina-agar	Alimento de humedad media
Ácido acético	<i>Listeria monocytogenes</i>	Recubrimiento de alginato de calcio	Superficie de carne magra
Ácido láctico	<i>Listeria monocytogenes</i>	Recubrimiento de alginato de calcio	Superficie de carne magra
Ácido acético con láurico	<i>Enterobacterias y ácido lácticas</i>	Quitósán	Cárnicos tratados por calor
Ácido propiónico con láurico	<i>Enterobacterias y ácido lácticas</i>	Quitósán	Cárnicos tratados por calor
Quitósán	<i>moho</i>	Quitósán	Fruta fresca

1.4.2 AGENTES ANTIMICROBIANOS NATURALES

La presencia de antimicrobianos resistentes a bacterias en los productos cárnicos puede tener importantes consecuencias para la salud pública, especialmente en los países en desarrollo, donde se ha generalizado el uso incontrolado de antibióticos, ya que los seres humanos pueden crear resistencia a algunas bacterias.

Las especias son ricas en compuestos fenólicos, como flavonoides y ácidos fenólicos, que exhiben una amplia gama de la diversidad biológica efectos, incluyendo antioxidantes y propiedades antimicrobianas. La incorporación directa de los aceites esenciales a los alimentos tales como en los productos cárnicos se traducirá en la reducción inmediata de la población bacteriana, pero puede alterar las características sensoriales de alimento añadido.

Todos los organismos vivos sintetizan compuestos orgánicos denominados metabolitos primarios para el mantenimiento de la vida, como los azúcares,

aminoácidos, ácidos grasos, nucleótidos y polímeros derivados (polisacáridos, lípidos y proteínas). Como subproductos de las rutas metabólicas primarias se derivan otros compuestos llamados metabolitos secundarios, los cuales presentan una característica fundamental de la especialización, es decir que el compuesto resultante, puede no ser importante para la célula pero si para el organismo como un todo. Su ocurrencia depende de condiciones externas tales como ataques de patógenos, depredadores, cambios térmicos, o lumínicos, deficiencias nutricionales o presencia de otros organismos intra o interespecíficos (Coma, 2007).

En las plantas se han encontrado principalmente las siguientes clases de metabolitos secundarios: compuestos fenólicos (fenoles simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonoides, taninos y cumarias), terpenoides (monoterpenos, diterpenos), alcaloides, polipéptidos y poliácetilenos. Siendo estos compuestos los utilizados para cubrir las necesidades del hombre.

Esta incorporación de aceites esenciales comestibles a las películas pueden ser especialmente interesantes y se ha demostrado que el aceite esencial de orégano, de ajo y té verde, a partir de películas de proteínas en específico de suero de leche, protegen contra *S. aureus*, *S. enteritidis* y *L. monocytogenes*, *E. coli* y *Lactobacillus plantarum*.

La aplicación de recubrimientos de película que contienen polvos de especias, interviene en el crecimiento microbiano en la contaminación de carne. Películas entrelazadas sobre la base de proteínas de caseinato y suero de leche aislado se combinaron con tomillo, romero, salvia y especias y redujeron el crecimiento de bacterias aerobias y coliformes en carne molida cubierta en películas y almacenada 18 días a 3°C (Coma, 2007).

A continuación se presenta una tabla, en la que se muestran dos extractos naturales y los microorganismos a los que ataca.

Tabla 2. Aceites esenciales contra microorganismos (Raybaudi-Massilia, 2003).

Aceite esencial	Especie bacteriana	Concentración mínima inhibitoria (UFC/ml)
Romero	Escherichia coli	4.5 - > 10
	Salmonella typhimurium	> 20
	Bacillus cereus	0.2
	Staphylococcus aureus	0.4 - 10
	Listeria Monocytogenes	0.2
Orégano	E. coli	0.5 – 1.2
	S. typhimurium	1.2
	S. aureus	0.6

Los sitios de acción de los agentes antimicrobianos en la célula microbiana, incluye membrana celular, pared celular, enzimas metabólicas, síntesis de proteínas y el sistema genético, todos ellos estratégicos para la supervivencia de los microorganismos y cualquier acción sobre los que puede inactivar a la célula microbiana. Los compuestos utilizados como antimicrobianos tienen varios sitios de ataque dentro de la célula microbiana.

La actividad antimicrobiana, se basa en el deterioro de varios sistemas enzimáticos, incluidos aquellos involucrados en la producción de energía y en la síntesis de componentes estructurales. Una vez que el compuesto fenólico cruza la membrana celular, puede interactuar con las enzimas y proteínas causando un flujo contrario de protones a través de ella y afectando así la actividad celular (Raybaudi-Massilia, 2003).

1.4.2.1 ORÉGANO

El orégano comprende varias especies de plantas que son utilizadas con fines culinarios, siendo las más comunes el *Origanum vulgare*, nativo de Europa, y el *Lippia graveolens*, originario de México.

Entre las especies de *Origanum* se encuentran como componentes principales el limoneno, el β -cariofileno, el r-cimeno, el canfor, el linalol, el α -pineno, el carvacrol y el timol. Su contenido depende de la especie, el clima, la altitud, la época de recolección y el estado de crecimiento.

Algunas propiedades de los extractos del orégano han sido estudiadas debido al creciente interés por sustituir los aditivos sintéticos en los alimentos. El orégano tiene una buena capacidad antioxidante y antimicrobiana contra microorganismos patógenos como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* entre otros. Estas características son muy importantes para la industria alimentaria ya que pueden favorecer la inocuidad y estabilidad de los alimentos como también protegerlos contra alteraciones lipídicas.

Los aceites esenciales de especies de orégano contienen limoneno, β -cariofileno, r-cimeno, canfor, linalol, α -pineno y timol, los cuáles pueden variar de acuerdo al quimiotipo. También contiene flavonoides como naringenina y pinocembrina, lapachenol e icterogenina. Las siguientes figuras (Ver Figura 4 y Figura 5) presentan las estructuras químicas de algunos de los compuestos principales presentes en el orégano (Arcila Lozano y col., 2004).

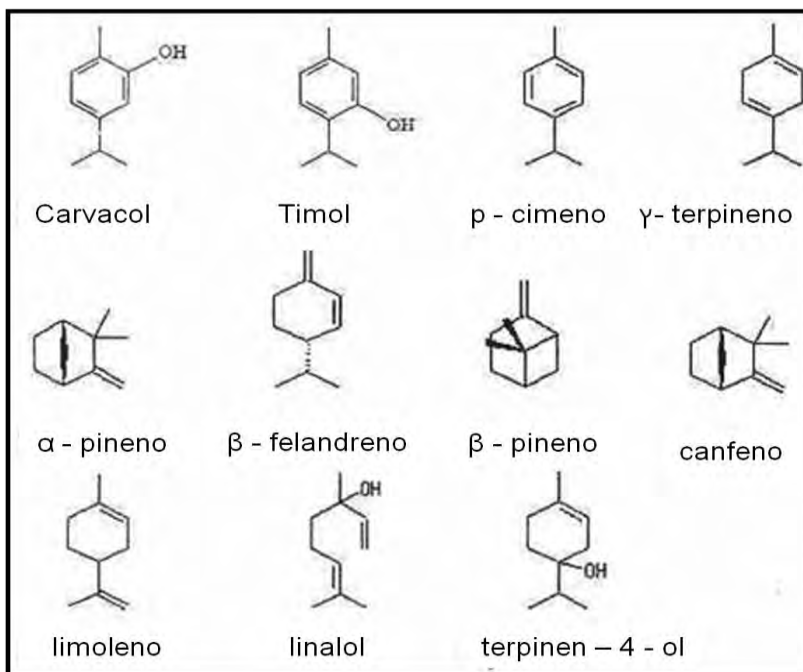


Figura 4. Estructura química de los principales componentes en orégano (Arcila Lozano y col., 2004).

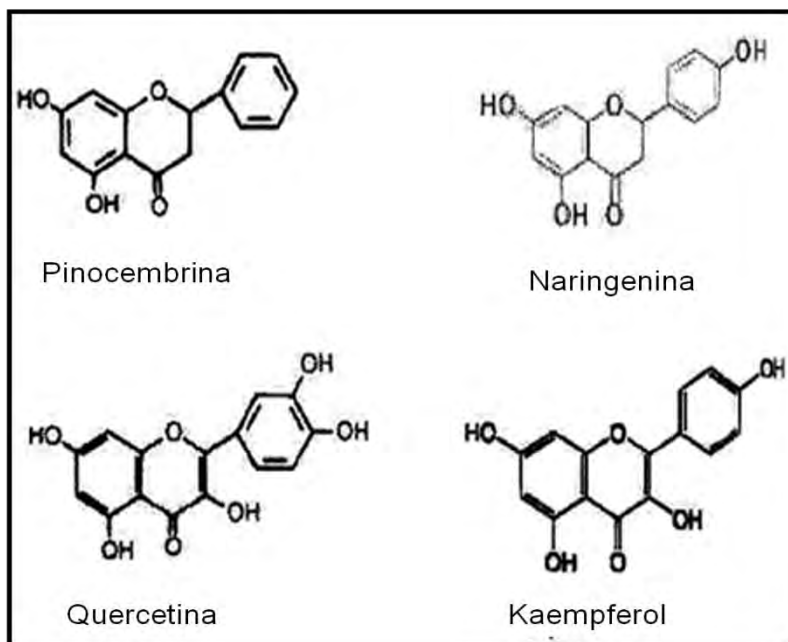


Figura 5. Estructura química de los principios flavonoides en orégano (Arcila Lozano y col., 2004).

- **Potencial Antimicrobiano:**

Existen múltiples estudios sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de diferentes tipos de orégano. Se ha encontrado que los aceites esenciales de las especies del género *Origanum* presentan actividad contra bacterias gram negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae*; y las gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis*. Tienen además capacidad antifúngica contra *Cándida albicans*, *C.tropicalis*, *Torulopsis glabrata*, *Aspergillus níger*, *Geotrichum* y *Rhodotorula*; pero no contra *Pseudomona aeruginosa*. Se ha evaluado la actividad antimicrobiana de los componentes aislados, así como el del aceite esencial. Los fenoles carvacol y timol poseen los niveles más altos de actividad contra microorganismos gram negativos, excepto para *P. aeruginosa*, siendo el timol más activo (Alonso, 2007).

- **Efectos adversos y/o tóxicos:**

Altas dosis del aceite esencial pueden provocar somnolencia marcada, también se han detectado en caso de alergia en la piel.

En cuanto a las contraindicaciones se recomienda no suministrar el aceite esencial durante el embarazo y la lactancia. Algunas especies de orégano han demostrado interrumpir el embarazo (Alonso, 2007).

Se han reportado investigaciones, en las que por causa del amplio uso de la planta en la población y por su posible utilización a largo plazo en las afecciones convulsivas y del tracto respiratorio se planteó el estudio toxicológico subcrónico del extracto de orégano francés. En las que el estudio no demostró efectos tóxicos que pudieran asociarse a su administración, porque el comportamiento de los animales (utilizados en la experimentación) y los indicadores evaluados no resultaron afectados, y las alteraciones microscópicas observadas fueron esporádicas con muy baja incidencia en casi todos los tratamientos (Tillán Capó y col., 2008).

1.4.2.2 TÉ VERDE

Se trata de un arbusto o un árbol pequeño muy ramificado, perteneciente a la familia de las Teáceas, caracterizado por presentar una altura entre 1 y 2 metros (en las plantaciones), flores blanquecinas, provistas de 5 pétalos blancos con numerosos estambres amarillos.

En té es originario del sudeste asiático, China e India, siendo muy cultivado en países con clima cálido y húmedo. En Sudamérica es cultivado en el sur de Brasil y Argentina. Para lograr una buena cosecha, las plantas no deben explotarse hasta tanto tengan entre 5 y 10 años de edad. Se conocen dos tipos principales de té: el negro y el té verde. Conviene aclarar que no se trata de dos especies distintas, si no de diferentes procesos de elaboración del producto final, realizados en la misma especie (*Camellia sinensis*) (Alonso, 2007).

La composición química del té verde contiene polifenoles, que incluyen los flavonoides, y ácidos fenólicos, estos compuestos pueden representar hasta el 30% del peso seco. La mayoría de los polifenoles del té verde son los flavonoides, comúnmente conocida como catequinas. Algunos catequinas del té verde son importantes; además, existen ácidos fenólicos como los ácidos gálico y aminoácidos como la teanina.

Estos flavonoides y quinonas pueden funcionar como aceptadores de hidrógeno o de los donantes de hidrógeno. Además, los polifenoles interactúan eficazmente con las especies reactivas de oxígeno. Los polifenoles del té verde (Ver Figura 6) también tienen afinidad con complejos como metales, alcaloides, y macromoléculas biológicas como lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos (Senji y Makoto, 2000).

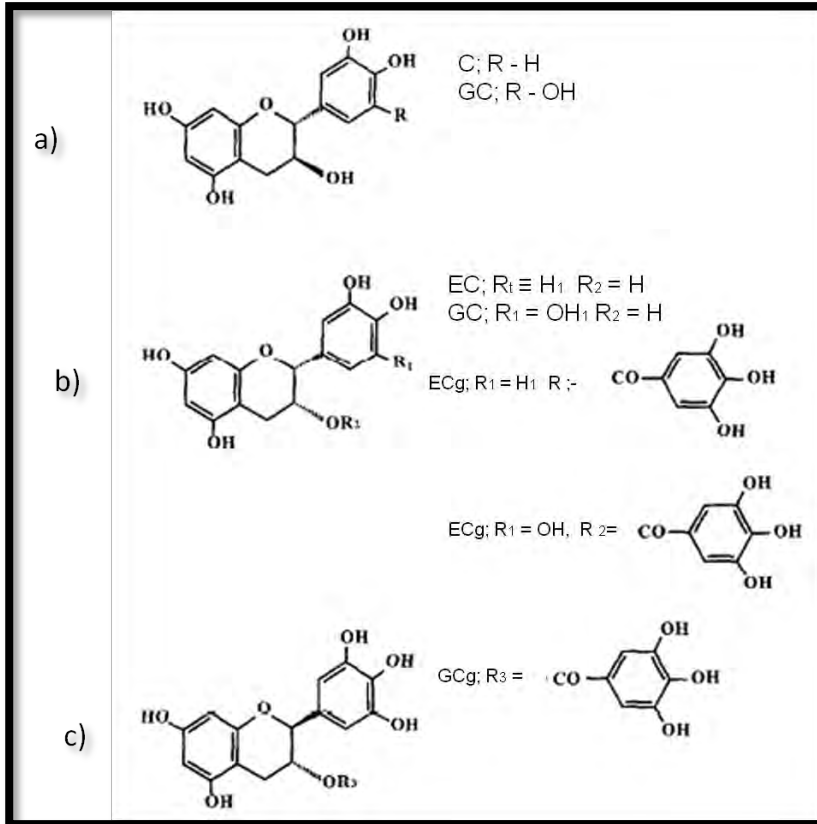


Figura 6. Estructura química de los polifenoles del té verde. a) catequina , b) epicatequina, c) galactocatequina (Senji y Makoto, 2000).

▪ **Efectos adversos y/o tóxicos:**

En dosis normales no se presentan, salvo algunos casos de estreñimiento observado en consumidores habituales. Las tomas nocturnas pueden generar insomnio debido a la presencia de cafeína. Los efectos indeseables de la cafeína no son tan notorios como los observados en el café, debido a su menor concentración y al hecho que suele estar más diluida por el agregado del agua.

En altas cantidades, puede incrementar la secreción ácida gástrica debido a la presencia de cafeína, lo cual ocasiona gastritis.

Altas cantidades de té verde no deben ser administradas durante el embarazo y lactancia debido a que la cafeína puede atravesar la barrera placentaria, encontrándose además en pequeñas cantidades en leche materna. Pacientes hipertensos, con úlceras gástricas, insomnio y diabetes deberán tomar medicamento antes de ingerir excesivas dosis de té verde (Alonso, 2007).

1.4.3 MECANISMO DE PELÍCULAS ANTIMICROBIANAS

El diseño de empaques con un sistema antibacteriano requiere del control de tecnología y de la cinética de crecimiento microbiana.

Cuando la velocidad de migración del agente antimicrobiano es más rápida que la del microorganismo, el agente antimicrobiano sería insuficiente antes del periodo de almacenamiento y perdería la actividad antimicrobiana. Por consiguiente los microorganismos crecerían después del agotamiento del agente.

Por otro lado cuando la velocidad de difusión es más lenta, el control de microorganismos es mejor y crecerían antes de que el antimicrobiano se libere; por lo que la velocidad del agente antimicrobiano debe ser controlada de acuerdo a la cinética de crecimiento de los microorganismos. La Figura 7 muestra la importancia de la transferencia de masa en el crecimiento de microorganismos, en el sistema de revestimiento (Ahvenainen, 2003).

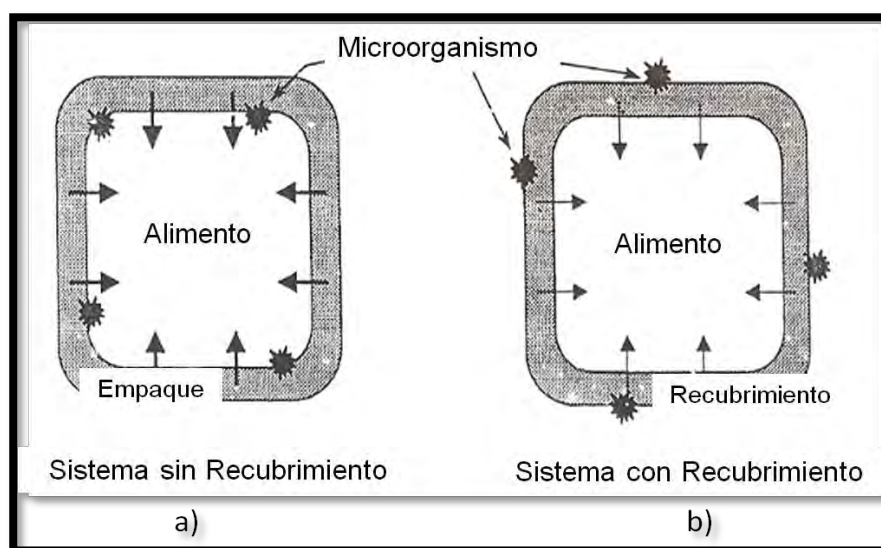


Figura 7. Empaque antimicrobiano y recubrimiento (Ahvenainen, 2003).

Donde (a) es un sistema de empaque y el microorganismo puede contaminar al alimento y (b) es un sistema de revestimiento, el cual está cubierto de un agente antimicrobiano en la superficie del producto y evita la contaminación.

La migración del agente antimicrobiano en el alimento es un fenómeno esencial para inhibir el crecimiento de microorganismos en la superficie del alimento; mientras la concentración del agente antimicrobiano se mantenga por arriba de las concentraciones mínimas inhibitorias en la superficie del alimento, el sistema presenta efectividad; sin embargo se debe tomar en cuenta que al agregar un antimicrobiano a la película, la concentración disminuirá, por lo tanto la migración del agente disminuirá dentro de la película, por otro lado evitar la migración es beneficioso en los sistemas de recubrimiento.

La compatibilidad del agente antimicrobiano con el material formador de la película es un factor importante, ya que puede cambiar la actividad de acuerdo al pH, por lo que se debe considerar la composición química del alimento, las propiedades de la película con la naturaleza química.

Para prevenir el crecimiento microbiano se debe tener en cuenta las condiciones de temperatura – tiempo de almacenamiento, por lo tanto la cinética de crecimiento de los microorganismos (Ver Figura 8), así como su comportamiento frente a las temperaturas (Ahvenainen, 2003).

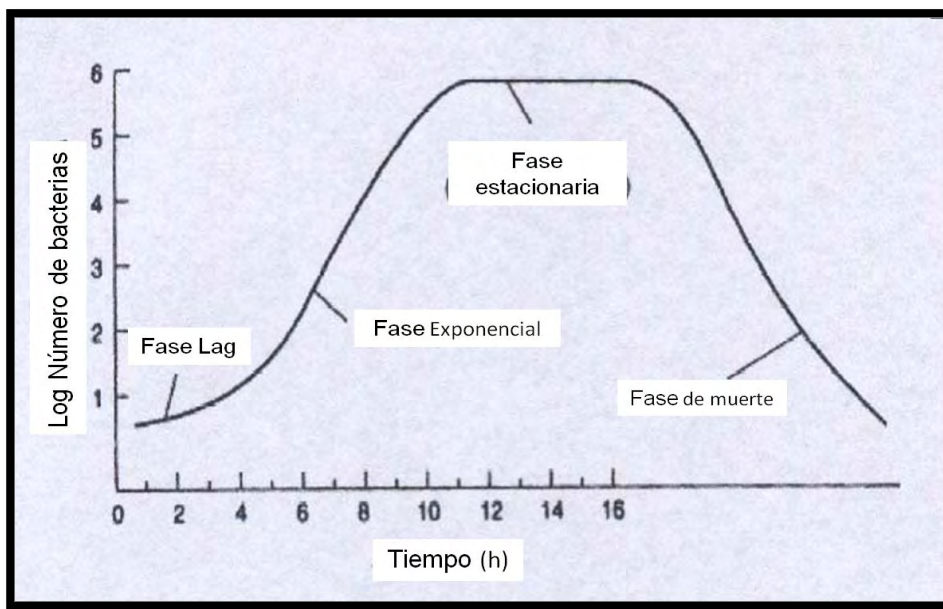


Figura 8. Cinética de crecimiento de microorganismos (Frazier, 1993).

Las propiedades físicas y químicas son afectadas al incorporar un agente antimicrobiano. Si el agente antimicrobiano es compatible con los materiales entonces no interfiere en las interacciones, ya que una buena cantidad se introducirá dentro de la película, sin embargo se modificaran las propiedades antes mencionadas.

Si la concentración del agente antimicrobiano es alta y se mezcla con los materiales que forman a la película, el espacio previsto por la región amorfa sería saturada y comenzaría a intervenir en las interacciones polímero - polímero en la región cristalina (Ahvenainen, 2003).

1.4.4 USO DE PELÍCULAS ANTIMICROBIANAS EN CARNE

Existen diferentes posibilidades y enfoques que se le pueden dar a las películas antimicrobianas en la superficie de las carnes, el agente antimicrobiano se puede adicionar de diferente manera de las que se pueden mencionar:

- Aplicación directa en la superficie de la carne.
- Aplicación en la película.
- Incorporación en la carne.

Existen varios antimicrobianos disponibles para la aplicación en la carne (Ahvenainen, 2003). Se han reportado películas de quitosán con esencia de orégano, en los que los resultados mostraron una barrera a lípidos y humedad, lo cual sustenta el uso de las películas de quitosán-orégano en carne, lo que ha desarrollado una película antimicrobiana conteniendo componentes naturales. Estas películas muestran una inhibición importante de *E. coli* y *Listeria monocytogenes* (Chiellini, 2008).

1.5 CARNE

La carne al igual que la mayoría de los alimentos, debe poseer una serie de características que la hagan apetecible al consumidor, por lo que deberá reunir una serie de requisitos enmarcados dentro del concepto de calidad. En el caso de la carne, el término de calidad está estrechamente ligado a la conservación de su vida útil. Habitualmente se considera que la vida útil es el tiempo durante el cual el producto permanece en un estado aceptable.

Con el fin de incrementar en lo posible el tiempo de conservación de diversos alimentos, o incluso con el propósito de mejorar sus características sensoriales (Brandly, 1977), se han venido proponiendo algunos métodos, como es el caso de las películas antibacterianas.

La presencia de oxígeno, unida a los propios procesos bioquímicos endógenos y a los provocados por la contaminación microbiana, da lugar al deterioro de la calidad sensorial más rápido de lo deseable. En el caso de los productos elaborados, este deterioro se ve acelerado, puesto que la mayor manipulación a que se ven sometidos incrementa notablemente su población microbiana.

Entre los procesos deteriorativos asociados a la conservación de la carne fresca, merecen citarse:

1. La transformación lenta del color rojo brillante de la carne fresca en un color pardo no deseable, a causa de mecanismos oxidativos.
2. El incremento del aroma de la carne, que se transforma paulatinamente en olor cada vez más desagradable, debido por una parte a la acción de enzimas, tanto endógenos como procedentes de microorganismos, y por otra a los procesos de oxidación de lípidos.
3. La formación de limo superficial, solo en fases avanzadas de conservación, debido al crecimiento microbiano.
4. Por otra parte, también es conocido el efecto catalizador de los procesos oxidativos que ejerce la luz (Brandly, 1977).

A continuación se mencionan algunas de las características más importantes de la carne.

1.5.1 PROTEÍNAS DE LA CARNE

Representa el componente más abundante de la materia seca del músculo y desempeña un papel fundamental en las funciones fisiológicas in vivo en los cambios que se originan después de la muerte del animal y de las propiedades de la carne para su consumo, tanto fresco como industrializado.

Se clasifican en tres grupos: proteínas miofibrilares, proteínas sarcoplámicas y proteínas de estroma.

Las proteínas miofibrilares más importantes son la actina y la miosina, son las responsables de la estructura muscular y de la transformación de la energía química en energía mecánica durante los fenómenos de contracción y relajación muscular. Representan aproximadamente la mitad de las proteínas del músculo y sus componentes más importantes, la miosina y la actina, que constituyen a su vez el 50% y el 25% del total de éstas.

Las proteínas sarcoplasmáticas están constituidas en su mayoría por los sistemas enzimáticos del metabolismo celular. De importancia dentro de este grupo es el pigmento respiratorio mioglobina, responsable del color de la carne.

Las proteínas del estroma están constituidas en su mayoría por proteínas del tejido conjuntivo y se distribuye ampliamente por todo el organismo animal, formando parte del esqueleto y de la estructura de órganos, tendones y nervios (Amerling, 2000).

PROPIEDADES FUNCIONALES: Las proteínas de la carne también tienen propiedades funcionales, las cuales se deben generalmente a las proteínas miofibrilares (actina y miosina) y tienen mucha importancia, tanto en la elaboración de productos cárnicos como en su calidad final.

Entre sus propiedades destacan:

- Capacidad de gelificación.
- Capacidad de emulsión.
- Capacidad de formación de espuma.
- Capacidad de retención de agua.
- Viscosidad.

No existe ninguna proteína cárnica que reúna todas estas propiedades en la medida adecuada que requiere un producto cárnico elaborado, por lo que se mejoran o introducen estas propiedades, deseables mediante tratamientos físicos, químicos o enzimáticos. Así por ejemplo, se añade a los productos cárnicos proteínas vegetales y muy particularmente las de soya, que, además de alto valor biológico y mejorar sus propiedades funcionales, abarata el costo de estos productos (Carballo y López de la Torre, 1991).

CAPACIDAD EMULGENTE: En una emulsión cárnica las gotas de grasa están recubiertas de proteína que le dan estabilidad a la emulsión, ya que, se une a los dipolos del agua formando en la interfase.

El fenómeno de las proteínas actuando como emulgente es porque forman un gel alrededor de la gota de grasa que retiene el agua. Tres fenómenos físico-químicos ocurren en la formación de las emulsiones cárnicas.

- Interacción agua-proteína.
- Interacción proteína-grasa.
- Agregación proteína – proteína, que son las responsables de la capacidad de retención de agua, formación de emulsión gelificación.

Dentro de las proteínas cárnicas son las miofibrilares (actina y miosina) las que tienen mayor capacidad de emulsión. La miosina es una proteína muy grande y quizá por su gran tamaño (PM = 500 Da) es más fácil que envuelva la gota de grasa (Carballo y López de la Torre, 1991).

1.6 RETENCIÓN DE HUMEDAD

La capacidad para retener el agua es esencialmente una propiedad de la carne magra, modificada por el agua y las sales que se pueden añadir durante la elaboración de los productos cárnicos. Es importante conocer que la carne tiene la capacidad de retención de agua, sobre todo la presente en su estructura, además de la capacidad de unión de agua, la cual es añadida a la carne.

En los tejidos grasos contiene aproximadamente el 10% del agua, localizada en el tejido conectivo de las paredes celulares, lo que se muestra en la Figura 9 (Ranken, 2000).

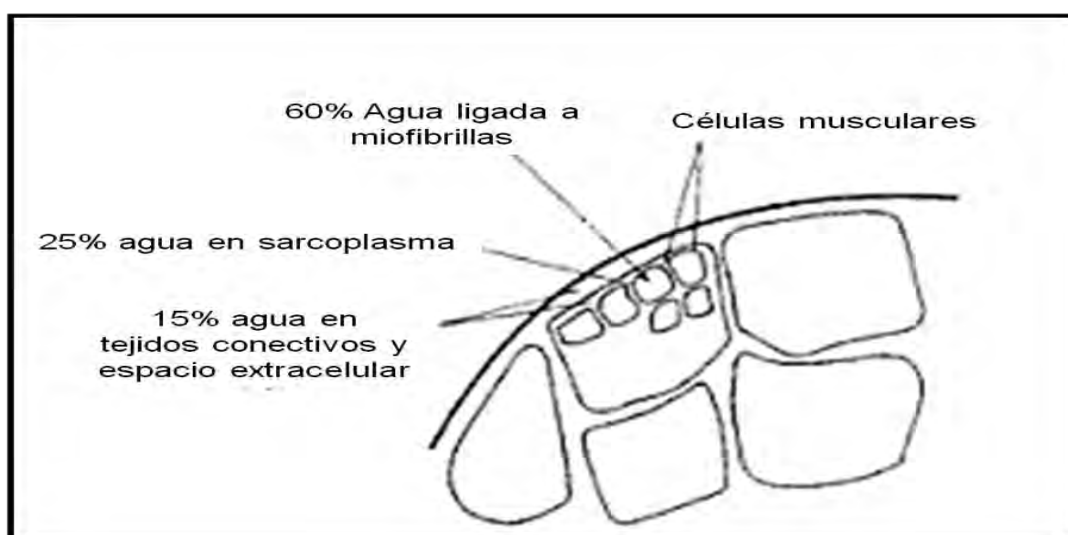


Figura 9. Localización aproximada del agua en la carne (Ranken, 2000).

1.6.1 CONTAMINACIÓN MICROBIANA

Se ha indicado que la masa muscular interna de las carnes contiene pocos microorganismos o no los contiene en absoluto, aunque se han encontrado en los ganglios linfáticos, en la médula ósea, e incluso en la propia masa muscular. En los ganglios linfáticos de los animales de carne roja se han aislado estafilococos, estreptococos, y especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Clostridium* y *Salmonella*.

Durante la sangría, desuello y durante la formación de la canal, los microorganismos proceden principalmente del exterior del animal (piel, pezuña y pelo) y del tubo intestinal de éste. La superficie externa del animal contiene una gran cantidad y varias especies de microorganismos procedentes del suelo, agua, estiércol, así como su propia flora superficial, mientras que el contenido intestinal se encuentra los microorganismos propios de la flora intestinal (Frazier, 1993).

Los cuchillos, paños, el aire así como las manos y la ropa de los operarios pueden actuar como fuentes intermedias de contaminación. Durante las operaciones posteriores de manipulación de carne, la contaminación puede tener su origen en las carretillas, en las cajas y en otros recipientes para transporte de carne.

Como consecuencia de las distintas procedencias de los microorganismos, son muchas las especies microbianas que es probable que contaminen la carne (Frazier, 1993), por mencionar las más importantes se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Microorganismos aislados con frecuencia en las carnes (Frazier, 1993).

PRODUCTO	MICROORGANISMOS AISLADOS
Carne fresca y refrigerada	Bacterias: <i>Acinetobacter</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Salmonella</i> y <i>Micrococcus</i>
	Mohos: <i>Cladosporium</i> , <i>Geotrichum</i> , <i>Sporotrichum</i> , <i>Mucor</i> y <i>Thamnidium</i>
	Levaduras: <i>Candida</i> , <i>Torulopsis</i> , <i>Debaryomyces</i> y <i>Rhodotorula</i>
Carnes tratadas y curadas	Bacterias: <i>Lactobacillus</i> , bacterias lácticas, <i>Acinetobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Serratia</i> y <i>Staphylococcus</i>
	Mohos: <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Rhizopus</i> y <i>Thamnidium</i>
	Levaduras: <i>Debaryomyces</i> , <i>Torula</i> , <i>Torulopsis</i> , <i>Trichosporon</i> y <i>Candida</i> .

Tras la muerte del animal, tiene lugar la invasión de los tejidos por microorganismos contaminantes. Los factores que intervienen en la contaminación son los siguientes:

1. Carga microbiana existente en el intestino del animal.
2. Estado fisiológico del animal inmediatamente antes de su sacrificio: si el animal está excitado, fatigado, es más probable que las bacterias penetren en los tejidos, la sangría suele ser incompleta favoreciendo la diseminación bacteriana, ya que se favorece por el pH tan elevado.
3. Procedimiento de sacrificio y forma de realizar la sangría.
4. Velocidad de enfriamiento de la canal.

En la carne, los microorganismos se diseminan a través de los vasos sanguíneos y linfáticos y a través de los intersticios de tejido conectivo.

Para muchos microorganismos, la carne es un medio de cultivo ideal ya que su porcentaje de humedad es elevado, contiene gran cantidad de nutrientes

nitrogenados de diversos grados de complejidad y esta provista de abundantes sales minerales y factores accesorios de crecimiento, además de un pH apropiado para que se multiplique los microorganismos.

Los factores que influyen en la multiplicación de microorganismos y que determinan por consiguiente, el tipo de alteración de la carne son los siguientes:

1. Tipo y número de microorganismos contaminantes y diseminación de los mismos en la carne.
 2. Propiedades físicas de la carne (área superficial).
 3. Propiedades químicas de la carne: su pH puede variar de 5.7-7.2, esto depende de la cantidad de glucógeno existente en el tejido muscular del animal al momento de ser sacrificado; un valor más alto de pH favorece el crecimiento microbiano.
 4. Disponibilidad de oxígeno.
 5. Temperatura de almacenamiento.
- (Frazier, 1993)

1.6.2 ASEPSIA

La asepsia empieza por evitar en cuanto sea posible, la contaminación desde fuera del animal. Se ha recomendado la ducha del animal antes de proceder a su sacrificio con el fin de eliminar la mayor cantidad posible de suciedad. El cuchillo que se emplea para degollar a los animales tras su sacrificio, puede aportar microorganismos a la corriente sanguínea que todavía está circulando y también puede añadir microorganismos a la carne al atravesar la piel. Durante el desuello, la contaminación no sólo procede de la piel, si no que también puede tener su origen tanto en los cuchillos como en el vestuario de los manipuladores. Durante la evisceración, la contaminación puede tener su origen en el intestino del animal; en el agua que se emplea para lavar y aclarar la canal, en los paños y cepillos que se emplean sobre la canal.

Es posible que algunos microorganismos procedan de las paredes con las cuales ha contactado la canal o las salpicaduras o de la humedad existente en el suelo de la nave de sacrificio (Brandly, 1977).

El hecho de que los microorganismos añadidos a la carne a partir de las procedencias señaladas incluyen normalmente a todos los microorganismos que intervienen en la producción de sus alteraciones.

Una vez que la carne se ha contaminado con microorganismos, su eliminación es difícil. Las películas que se emplean para envolver las carnes evitan que lleguen a las mismas bacterias e influyen en el crecimiento de las que ya se encontraban en ella antes de envolverlas. Estas películas difieren considerablemente en cuanto a la permeabilidad del agua, oxígeno y dióxido de carbono.

Las carnes frescas conservan mejor su color rojo si se envuelven empleando una película permeable al oxígeno sin emplear vacío. Si se emplea una película envolvente permeable al oxígeno, se retiene mayor cantidad de dióxido de carbono procedente del metabolismo de las bacterias, consiguiéndose con ello un color menos intenso en la carne (Brandly, 1977).

1.7 MICROORGANISMO: *Salmonella* como patógeno más común en carne

Debido a que el microorganismo de estudio es *Salmonella spp*, se presentan las características generales. Son bacilos gram negativos, aerobios, no esporulados, que fermentan la glucosa casi siempre con formación de gas, pero no la lactosa ni la sacarosa. Como ocurre con otras bacterias, son capaces de crecer dentro de un margen más amplio de temperaturas, pH y A_w , cuando el medio de cultivo es bueno que cuando es pobre.

La temperatura máxima de crecimiento es de alrededor de 45.6°C. Crece bien a temperatura ambiente, pero la óptima es de 37°C. Se desarrolla a pH comprendidos entre 4.1-9, aunque crece mejor en alimentos poco ácidos. La actividad de agua (A_w) mínima para su crecimiento varía con el tipo de alimento, pero es aproximadamente de 0.93 a 0.95.

Las *Salmonellas* pueden hallarse en número extraordinario sin alterar apreciablemente el olor o gusto de los alimentos. Cuanto mayor sea el número de microorganismos participantes, tanto mayor serán las probabilidades de que el

consumidor sufra la infección y tanto más corto el período de incubación (Frazier, 1993).

Los brotes de infección de salmonelosis se pueden producir como consecuencia de la ingestión de una gran variedad de alimentos. Las diferentes clases de carnes, aves y productos derivados, especialmente si se han mantenido sin refrigeración durante bastante tiempo. Las carnes frescas con *Salmonella* se han contaminado a través de los operarios del matadero o como consecuencia de animales enfermos.

Al igual que ocurre con otras infecciones, la susceptibilidad individual frente a la *Salmonella* es muy variable, depende de la carga bacteriana, de la especie de cepas y de la susceptibilidad del hombre.

El periodo de incubación es de 12 a 36 horas, los síntomas principales de una infección gastrointestinal por *Salmonella* son: náuseas, vómito, dolor abdominal y diarrea, que suelen ser de aparición repentina. A veces estos síntomas van precedidos de cefaleas y escalofríos. La gravedad de la enfermedad no sólo varía con la cantidad de alimento ingerido y, por tanto, con el número y tipo de *Salmonella*, sino también con la sensibilidad individual. La intensidad oscila entre ligero malestar y diarrea hasta la muerte al cabo de 2-6 días. En general, los síntomas persisten durante 2 ó 3 días, presentándose a continuación una recuperación sin complicaciones, siempre y cuando se haya llevado un tratamiento adecuado, aunque a veces los trastornos duran semanas e incluso meses (Frazier, 1993).

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2 DESARROLLO DE METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La Figura 10 muestra de manera ordenada y gráfica, el desarrollo metodológico que se llevó a cabo durante la experimentación.

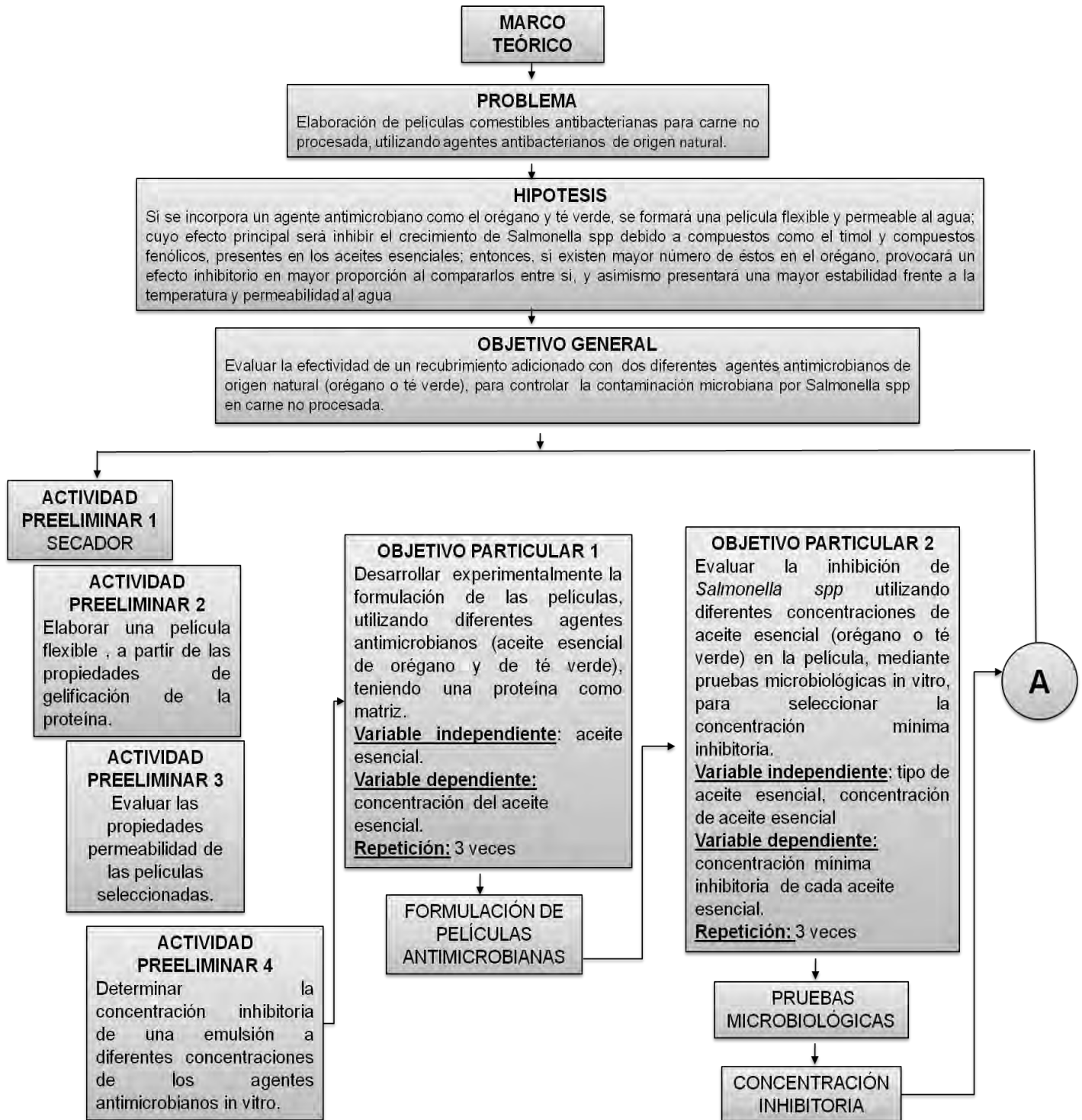


Figura 10. Cuadro metodológico (Parte 1)

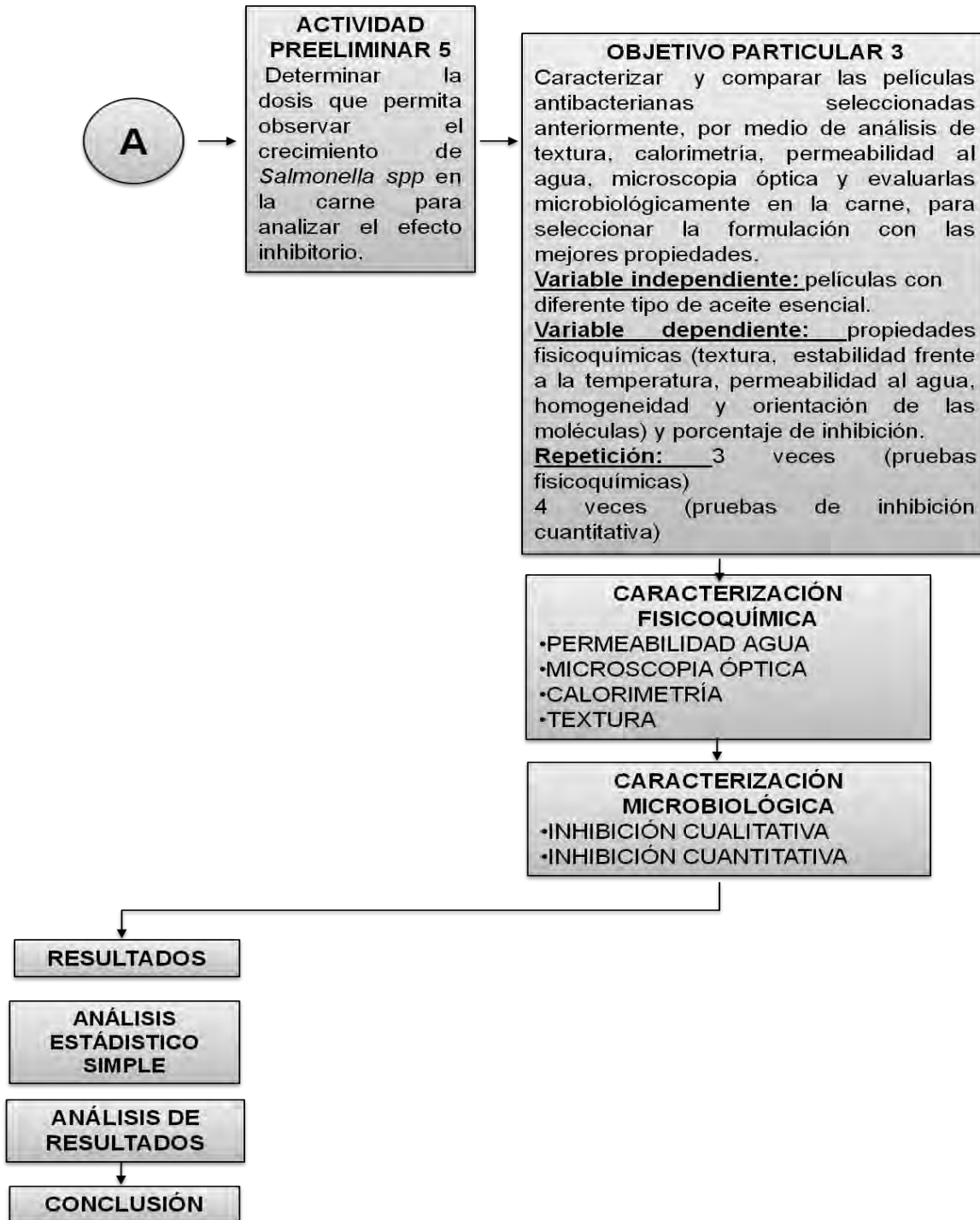


Figura 10. Cuadro metodológico (Parte 2)

2.1.1 Actividad Preliminar 1

- Elaboración de un secador de películas.

A continuación se muestra la descripción del secador, el cual se elaboró con la finalidad de incrementar la velocidad de secado de las películas (Ver Figura 11).

- **EQUIPO:** Secador
- **MATERIAL:** Acrílico

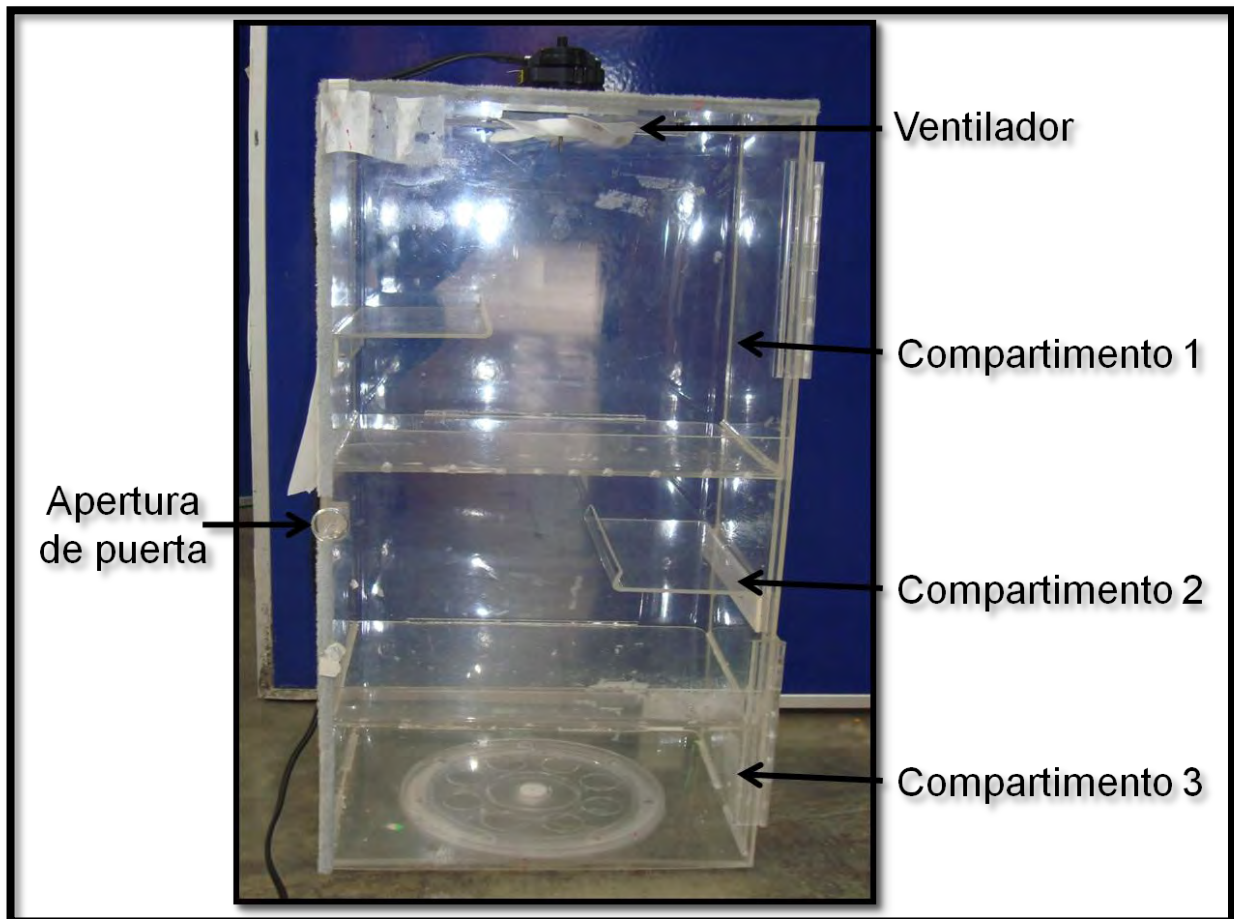


Figura 11. Partes y secciones del secador.

Para que el aire pasara por todos los compartimentos, se hicieron orificios a lo largo de cada base, lo cual se muestra en la Figura 12, además de las dimensiones del equipo en la Figura 13.

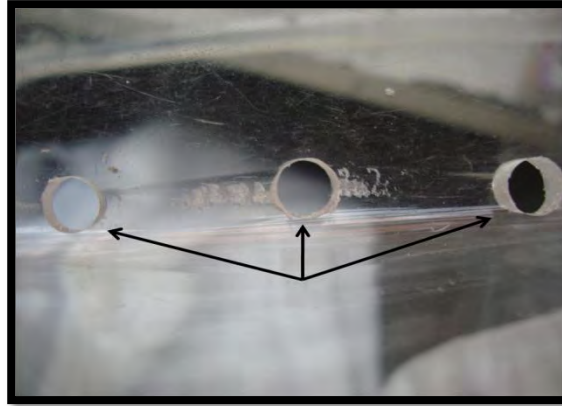


Figura 12. Orificios.

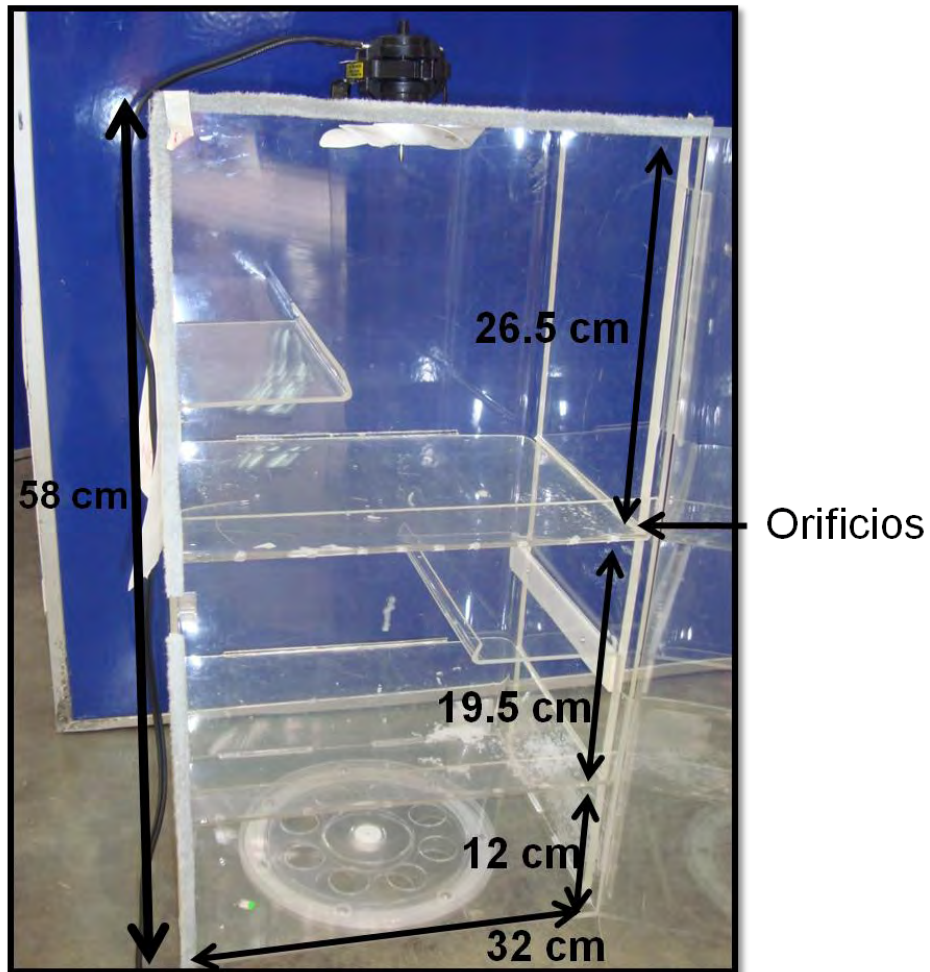


Figura 13. Dimensiones del secador

2.1.2 Actividad Preliminar 2

- Elaboración de una película flexible de grenetina, a partir de las propiedades de gelificación de dicha proteína.

Procedimiento:

Se eligieron 5 concentraciones de grenetina (280 Bloom, Marca Progel) del 1% al 3.5% (m/m), de acuerdo a lo recomendado por Gómez Estaca y Montero (2007).

Se realizaron los cálculos necesarios para preparar 250 ml de solución para las diferentes concentraciones. Una vez pesados los gramos necesarios de grenetina a las 5 diferentes concentraciones (1, 1.5, 2.5, 3 y 3.5%), se dispersó cada una en una termoparrilla a 60°C (temperatura de gelificación de la grenetina, reportada por Chiou y Avena Bustillos, 2009); una vez que en la dispersión no se observaban grumos, se tomaron 15 ml y 20 ml de solución, para verter cada volumen en una caja petri (con una base de acetato, para facilitar el desprendimiento de las películas), y por último se sometieron a secado.

Cabe mencionar que se vertieron dos diferentes volúmenes en las cajas petri, ya que el espesor de la película es un factor importante en las características que presente, sin embargo las películas con las concentraciones de 1%, 1.5% y 2.5%, no se secaron con un volumen de 20 ml, después de 72 h, por lo que se decidió elegir las concentraciones con las películas secas. La siguiente imagen muestran las películas secas:

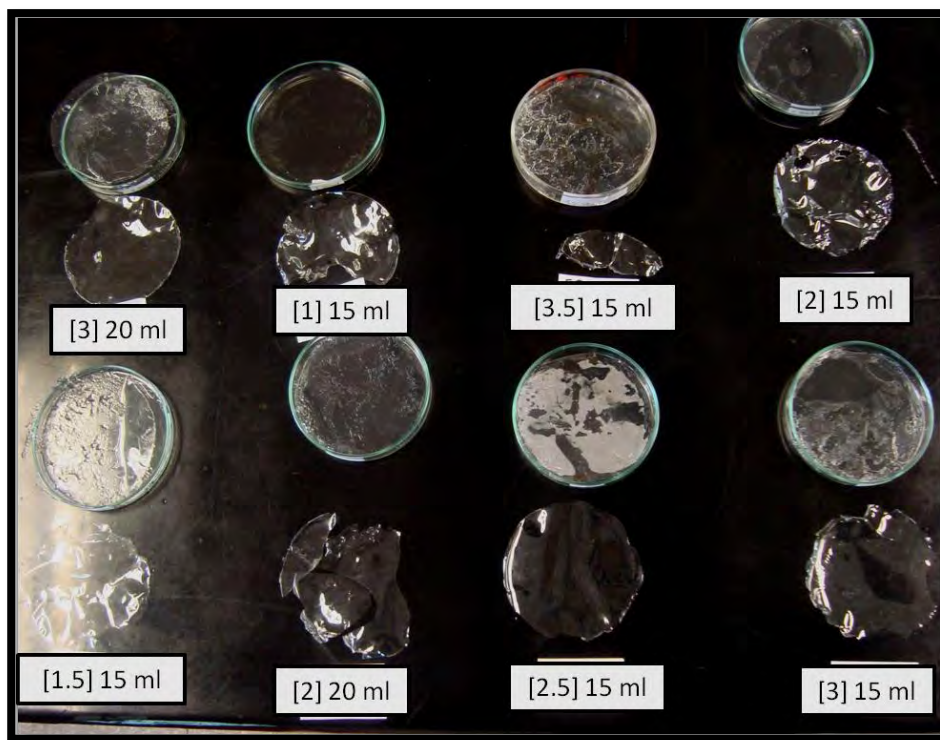


Figura 14. Películas con base en las cuales se eligieron las concentraciones.

Como se puede observar en la Figura 14, algunas de las películas no se formaron por completo, por ejemplo; al verter la concentración de 3.5% con un volumen de 15 ml, la solución se distribuyó por debajo de la base de acetato que se encontraba en la caja petrí (posición indeseable), en otros casos con un volumen de 20 ml, las películas no se secaron después de 72 h, por lo que fue descartado dicho volumen. Finalmente, las concentraciones elegidas fueron 2.5, 3 y 3.5% a un volumen de 15 ml; con base en su apariencia visual, facilidad de manejo y tiempo de secado.

2.1.3 Actividad Preliminar 3

- Evaluar la permeabilidad al agua de las películas de grenetina a diferentes concentraciones, utilizando la prueba de ángulo de contacto, esto para la selección de la concentración de proteína a utilizar como base para el recubrimiento de carne.

Procedimiento:

Las concentraciones seleccionadas en la actividad preliminar 2 (2.5, 3 y 3.5%) se elaboraron siguiendo la misma metodología mencionada anteriormente, la cual consiste en preparar una solución de grenetina en un volumen de 50 ml, una vez que en la dispersión no se observaban grumos, se tomaron 15 ml, para verter en el molde (Ver Figura 15) de 100 cm² de área superficial, donde se formó una película cuadrada de 81 cm², transparente y además se desprendía con facilidad.

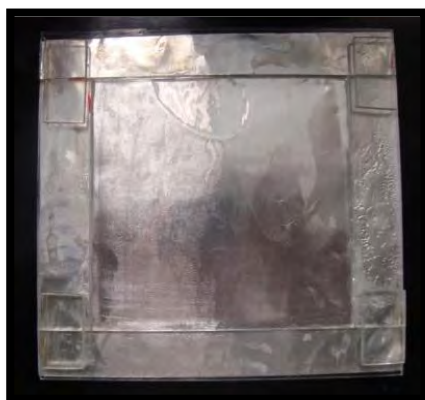


Figura 15. Moldes

Para seleccionar la concentración de la película matriz, se llevó a cabo una prueba de permeabilidad al agua, utilizando un ángulometro (CAMP PLUS) el cual se muestra en la Figura 16.

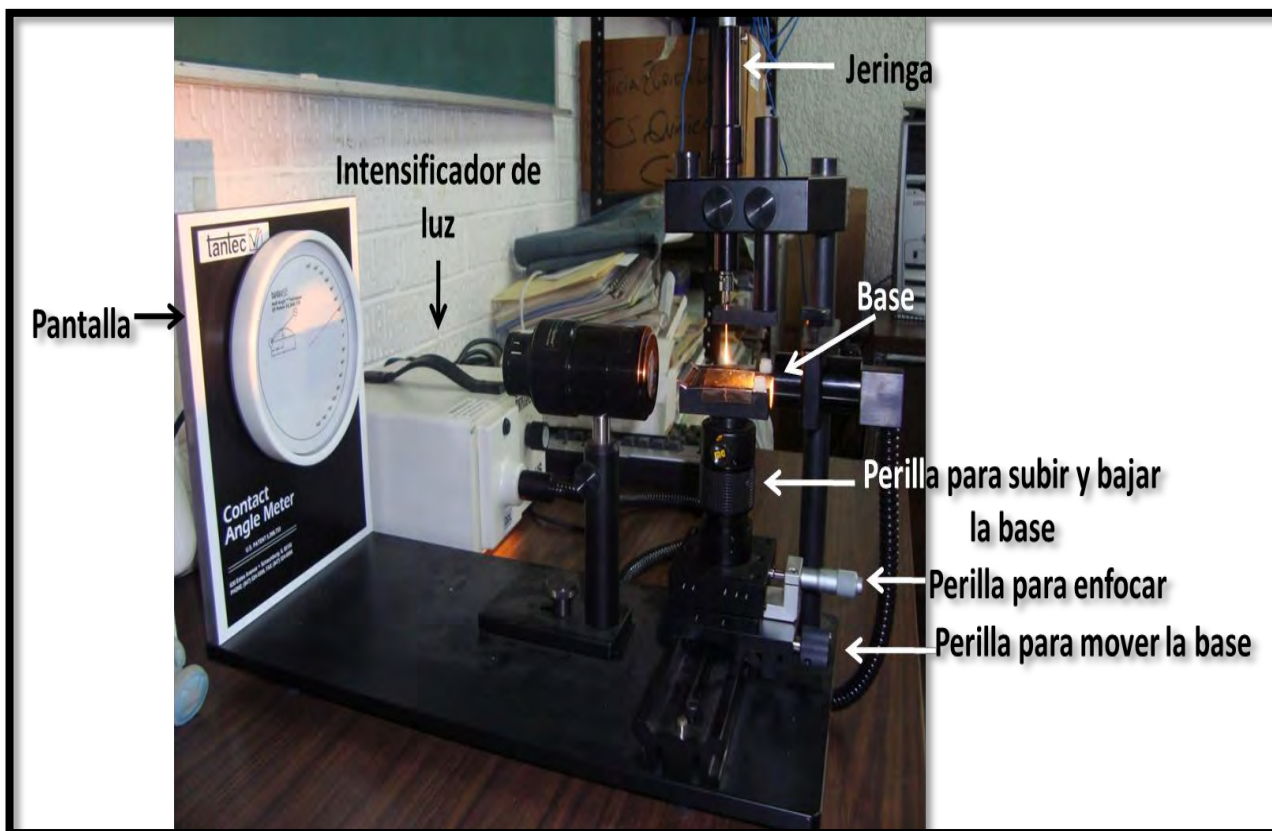


Figura 16. Partes del ángulómetro.

Para llevar a cabo la prueba se dividió cada película en tres partes (Ver Figura 17), esto a las tres diferentes concentraciones, formando tiras de 8.8 cm de largo y 2.5 cm de ancho, estas tiras se evaluaron en tres diferentes zonas, como se puede observar en la Figura 18. Las películas se colocaron sobre la base y se dejó caer gota de 1ml de agua destilada sobre ésta (Ver Figura 19), observándose el ángulo de contacto en la pantalla (Ver Figura 20).

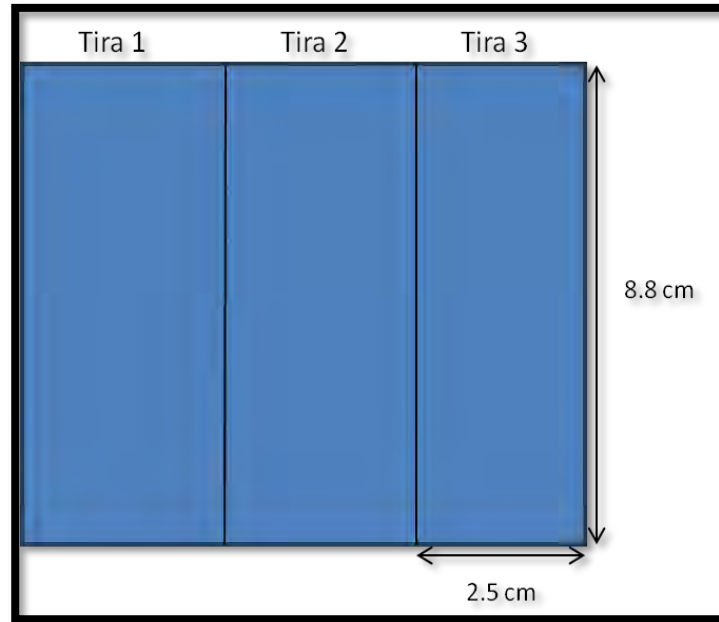


Figura 17. Ejemplifica el corte de las películas completas, para cada concentración

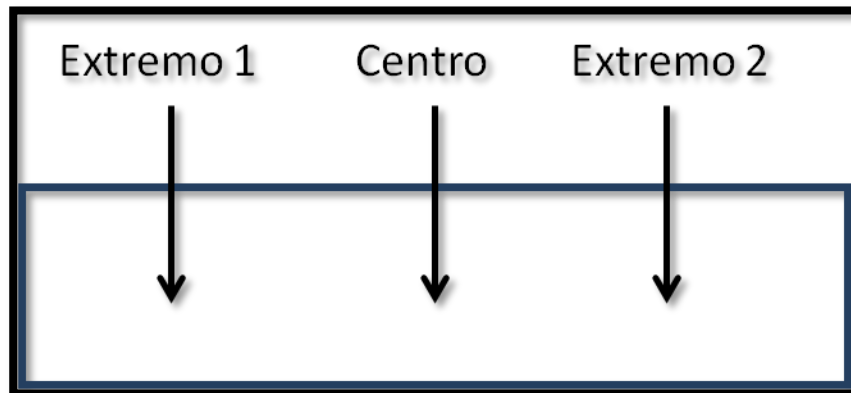


Figura 18. Zonas evaluadas por tiras de cada película.

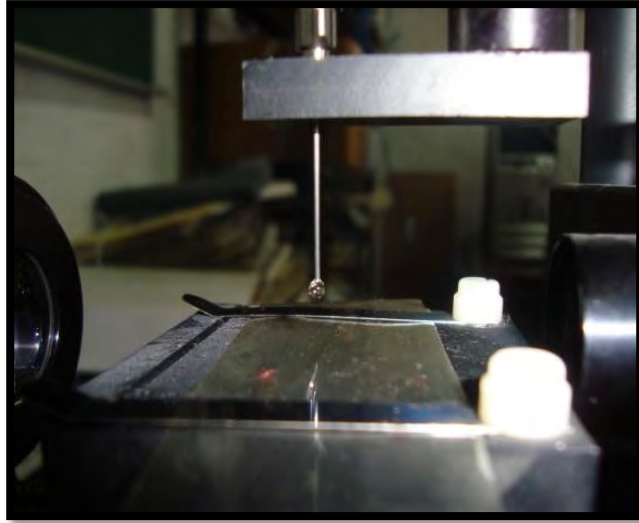


Figura 19. Gota de agua que caerá sobre la película

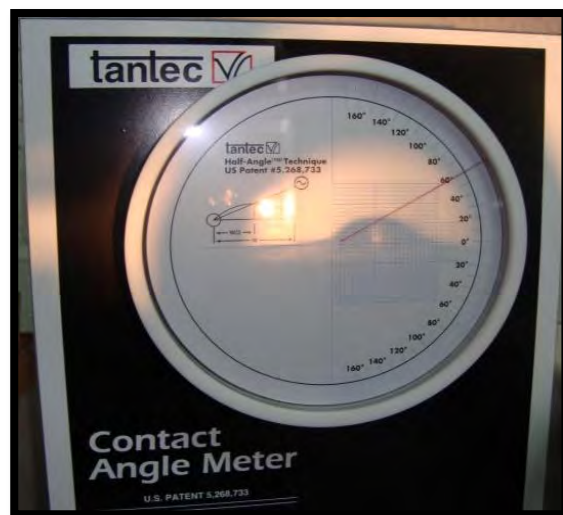


Figura 20. Ejemplifica como se observa la gota de agua sobre la pantalla

2.1.4 Actividad Preliminar 4

Determinar la concentración inhibitoria de una emulsión a diferentes concentraciones de los agentes antimicrobianos in vitro, para adicionarse a las películas.

Procedimiento:

Se elaboró un caldo de cultivo utilizando agar extracto glucosa y triptocaseina y extracto de levadura, para sembrar masivamente *Salmonella spp.*

Se prepararon emulsiones de aceite de orégano (Aceites y esencias S. A) y té verde (Droguería Cosmopolita) a concentraciones del 1% al 3% (v/v), con el objetivo de obtener un rango de concentraciones inhibitorias y así elegir la concentración que se adicionaría a las películas. Debido a que el aceite esencial de orégano inhibió a todas las concentraciones inicialmente propuestas, se decidió realizar concentraciones menores siendo estas 0.8, 0.6, 0.4, 0.3 y 0.1%.

Se dividió la caja petrí en 5 partes para realizar 5 repeticiones dentro de la misma, colocándose 20 µL de cada concentración de emulsión (para ambos aceites esenciales) y, se observó su efecto de inhibición sobre *Salmonella spp.*, después de 24 h a temperatura ambiente. Cabe señalar que se llevó a cabo en un medio estéril y con material previamente esterilizado.

Las concentraciones inhibitorias de las emulsiones de aceite esencial de orégano y de té verde, se utilizaron para el desarrollo de las formulaciones, así como también para ser evaluadas en la inhibición de la bacteria, aplicadas en las películas.

2.1.4.1 Objetivo Particular 1: Desarrollar experimentalmente la formulación de las películas, utilizando diferentes agentes antimicrobianos (aceite esencial de orégano y de té verde), teniendo una proteína como matriz.

Las películas se formaron a partir de las concentraciones de ambos aceites esenciales establecidas en la actividad preliminar anterior y teniendo como emulsificante lecitina de soya. La dispersión se realizó a una temperatura de 60°C, después se vertieron 15 ml de cada dispersión, en los moldes.

Una vez secas las películas estas fueron desprendidas del molde con ayuda de una navaja cortando el perímetro de la superficie proyectada.

Es importante mencionar que el orden de adición de los ingredientes fue un paso determinante en la formación de las películas, ya que se formaba una bicapa al secarse la película.

2.1.4.2 Objetivo Particular 2: Evaluar la inhibición de *Salmonella spp* utilizando diferentes concentraciones de aceite esencial (orégano o té verde) en la película, mediante pruebas microbiológicas in vitro, para seleccionar la concentración mínima inhibitoria.

Procedimiento:

La elaboración de las películas se realizó siguiendo la misma metodología previamente desarrollada. En cuanto a las pruebas microbiológicas, se sembró masivamente *Salmonella spp*, utilizando un hisopo, en un medio enriquecido de agar extracto glucosa y tripticaseina y extracto de levadura, siempre manteniendo un ambiente estéril. De cada formulación, se cortaron trozos de película de aproximadamente 1 cm², colocando cada trozo sobre el medio de cultivo (Ver Figura 21); para así observar el efecto inhibitorio después de 24 h y a temperatura ambiente. Teniendo como resultado la formulación con la concentración mínima inhibitoria para cada aceite esencial (orégano y té verde).

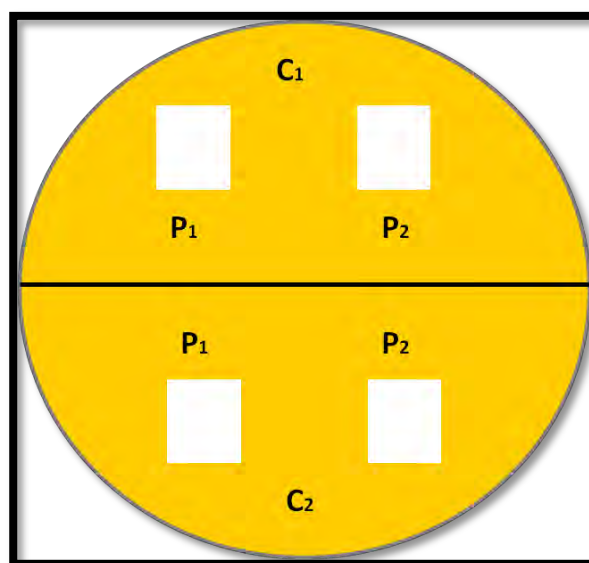


Figura 21. Ejemplifica los trozos de películas de orégano o té verde, sobre el medio de cultivo con *Salmonella spp*. En el que P₁ y P₂ representan los trozos de película y C₁ y C₂ las diferentes concentraciones evaluadas en ambos aceites esenciales.

2.1.5 Actividad Preliminar 5

Determinar la dosis que permita observar el crecimiento de *Salmonella spp* en la carne para analizar el efecto inhibitorio.

- **Procedimiento:**

Se estandarizaron tres concentraciones, la primera con tres colonias de *Salmonella spp*, la segunda con una colonia y media y la tercera una dilución de la segunda concentración. Las colonias fueron tomadas de cepas patrón (proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología de la UNAM – FESC 1) previamente cultivadas en un medio de tripticaseína con extracto de levadura e inoculadas a 37°C por 24h.

Para cada concentración de la bacteria se realizó lo siguiente: se sembró intencionalmente 20 µL del microorganismo en 2 g de carne, después de 15 min de acción de la bacteria en el alimento, se colocó la carne en un mortero donde se trituró por unos segundos para después verter 20 ml de solución salina al 0.85%. Una vez que la carne se encontraba en su mayoría triturada se tomaron 20 µL de esa solución, utilizando una micropipeta, para depositarlos en un eppendorf que contenían 180 µL de solución salina, después se agitaron en un Vortex (mezclador de vórtice para tubos de ensaye o frascos pequeños) durante 10 s, esto para que la *Salmonella spp* se distribuyera por toda la solución.

A partir de la primera concentración (3 colonias) se realizaron cinco diluciones más; mientras que para la segunda y tercera concentración fueron tres. Es decir, de la dilución 10^{-1} se tomaron 20 µL, para ser vertidas en el segundo eppendorf y así tener la dilución 10^{-2} , agitando antes de cada toma y así sucesivamente hasta llegar a las diluciones deseadas para cada concentración de *Salmonella spp*.

De cada concentración y dilución, se colocó una gota de 20 µL en un medio de cultivo Mc Conckey, que se incubó durante 24 h a temperatura ambiente, después de este tiempo se llevo a cabo el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC). Cabe resaltar que todo el material ocupado, así como la solución salina se esterilizó previamente.

A continuación se muestra como se dividieron las cajas petrí para colocar las gotas de cada dilución, esto para el caso de 2 diluciones o 3 diluciones, en el que los círculos representan las gotas del microorganismo

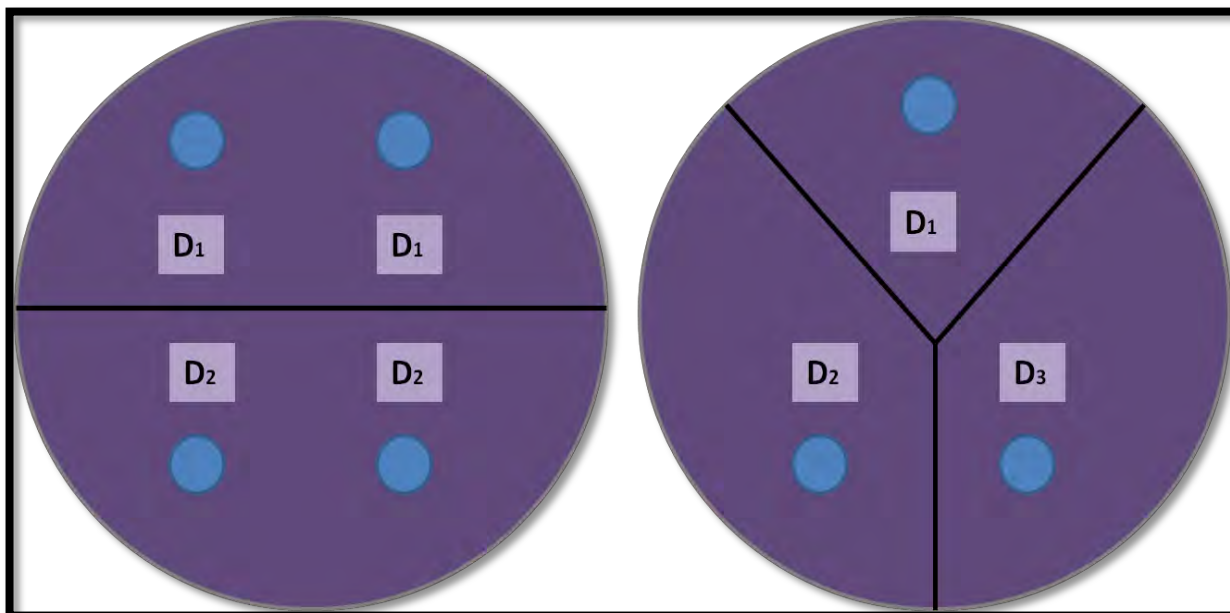


Figura 22. Ejemplifica la división del medio de cultivo, donde D representa las diluciones de *Salmonella spp.*

Cabe mencionar que el resultado de esta actividad preliminar fue la obtención de la concentración de *Salmonella spp.*, con la que se aseguró el crecimiento de la bacteria en la carne, así como la selección del número de diluciones a utilizar en la caracterización microbiológica de ambos recubrimientos.

2.1.5.1 Objetivo Particular 3: Caracterización de las películas antimicrobianas

A continuación se desarrolla la metodología de las diferentes pruebas que se llevaron a cabo a las películas adicionadas con la concentración inhibitoria de *Salmonella spp.*, utilizando orégano o té verde como agentes antimicrobianos.

2.1.5.1.1 Caracterización Fisicoquímica

2.1.5.1.1.1 Microscopía Óptica

Se utilizó un microscopio óptico ZEIGEN, con una cámara marca MOTICAM 1000 (1.3 MP Live Resolution) y un software Motic Images Plus 2.0; lo que permitió enviar las imágenes del microscopio a la computadora.

Para realizar dicha prueba se cortaron cuadros de ambas películas (té verde y orégano) de 1 cm², poniendo cada cuadro sobre un portaobjetos y cubriéndola con un cubreobjetos, esto para ser observadas en el microscopio.

Cabe mencionar que para cada película se utilizó un objetivo de 10X, por otra parte se analizaron diferentes zonas de las películas; esto con la finalidad de observar la homogeneidad de la muestra y la orientación de las moléculas.

2.1.5.1.1.2 Análisis Termogravimétrico (TGA) y Análisis Térmico Diferencial (DTA)

Para la evaluación de estabilidad de las películas frente a la temperatura, así como para conocer los cambios de energía, se realizó una prueba de Análisis Termogravimétrico (TGA) y una de análisis térmico diferencial (DTA), utilizando un calorímetro (marca TA- INSTRUMENTS, modelo STD 2960) (Ver Figura 23).

La temperatura varía de 35 °C a 200 °C (prueba dinámica), en un intervalo de 10 °C. La preparación de la muestra no conlleva dificultades ya que se adicionan 3 mg de muestra en una cápsula de aluminio y esta se suspende mediante un soporte, de un alambre en forma de gancho quedando finalmente en el interior del horno, para comenzar la prueba (Ver Figura 24). Es importante mencionar que al software del equipo se le introducen las condiciones de la prueba y al finalizar proporciona las gráficas (Ver Figura 25), así como los datos para poder graficar, los cuales se utilizaron para elaborar una gráfica y así analizar los resultados.



Figura 23. Calorímetro TA- INSTRUMENTS, modelo STD 2960

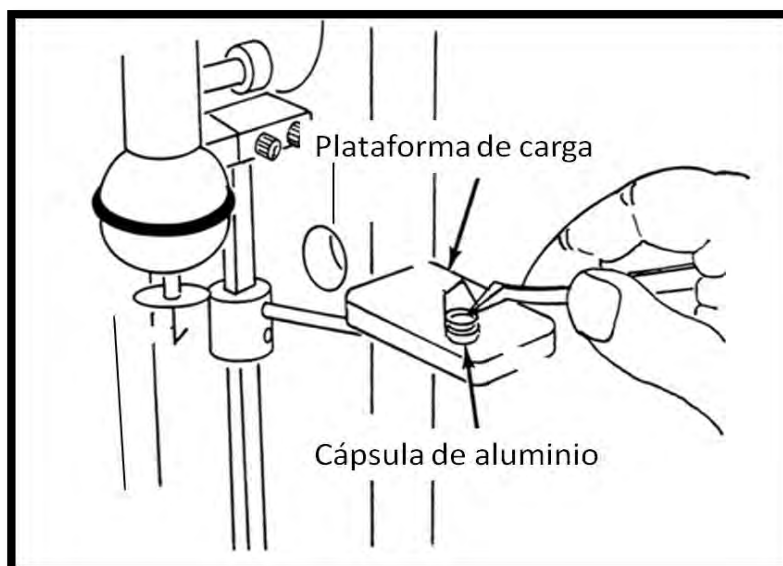


Figura 24. Esquema sobre la manipulación de muestra para situarla en el interior del calorímetro.

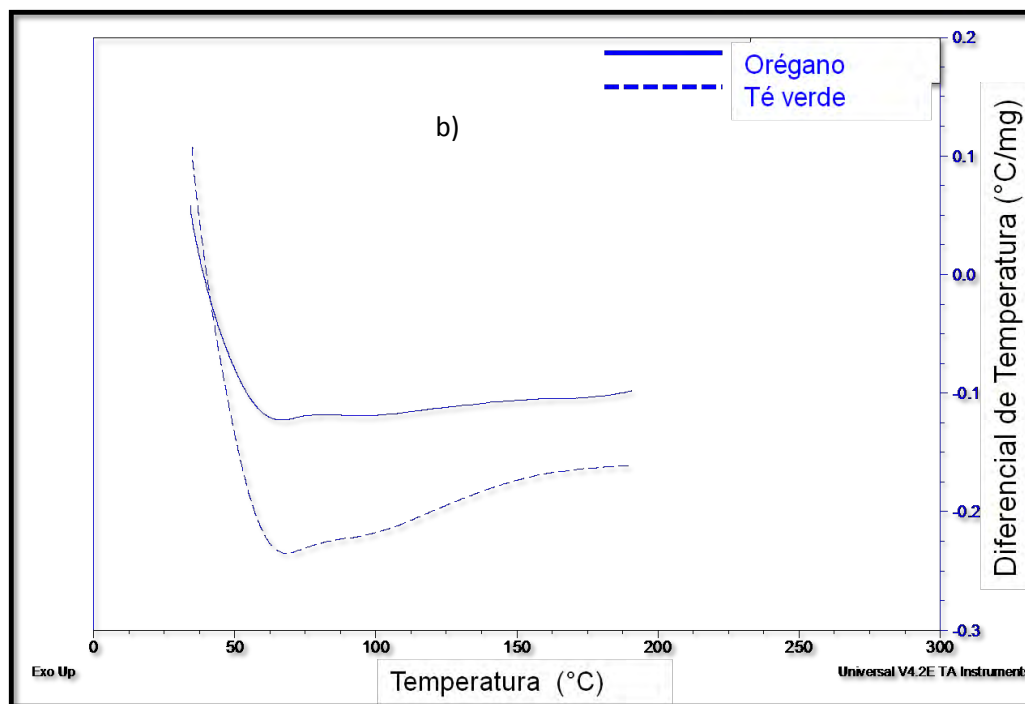
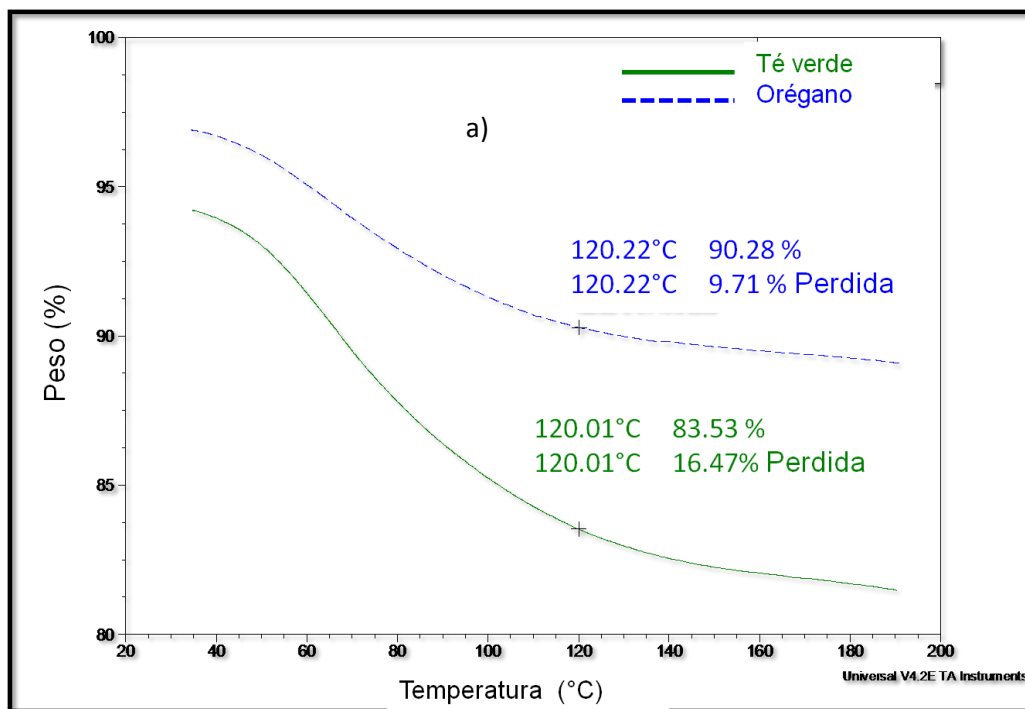


Figura 25. Gráficas obtenidas en el calorímetro TA- INSTRUMENTS STD 2960. a) Gráfica de Análisis Termogravimétrico y b) Gráfica de Análisis Térmico Diferencial.

2.1.5.1.1.3 Permeabilidad al agua

La permeabilidad al agua de las películas con agente antimicrobiano, se evaluó utilizando ángulo de contacto, de acuerdo a la metodología descrita por Karbowski (2005), en la que se utilizó un ángulometro y se dividió cada película en tres partes (Ver Figura 26), formando tiras de 8.8 cm de largo y 2.5 cm de ancho, para ser evaluadas en tres diferentes zonas (Ver Figura 27). Las películas se colocaron sobre la base y se dejó caer 1 ml de agua destilada sobre ésta, por medio de una jeringa (Ver Figura 19), observándose el ángulo de contacto en la pantalla; en el que para ser medido el ángulo la aguja se debe hacer pasar por el centro de la imagen de la gota y así tomar el dato (Ver Figura 20).

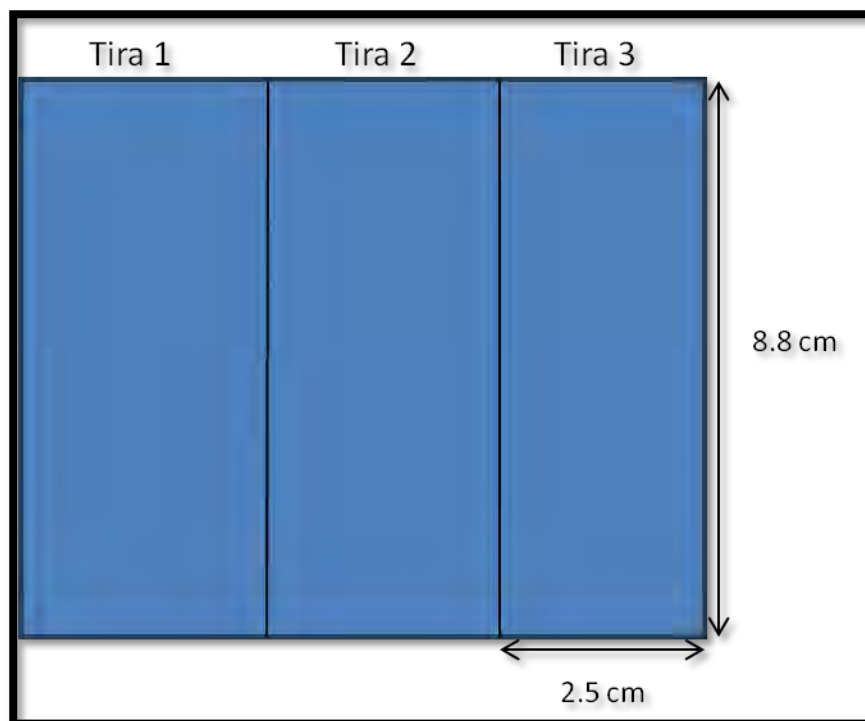


Figura 26. Ejemplifica el corte de las películas completas, para cada aceite esencial

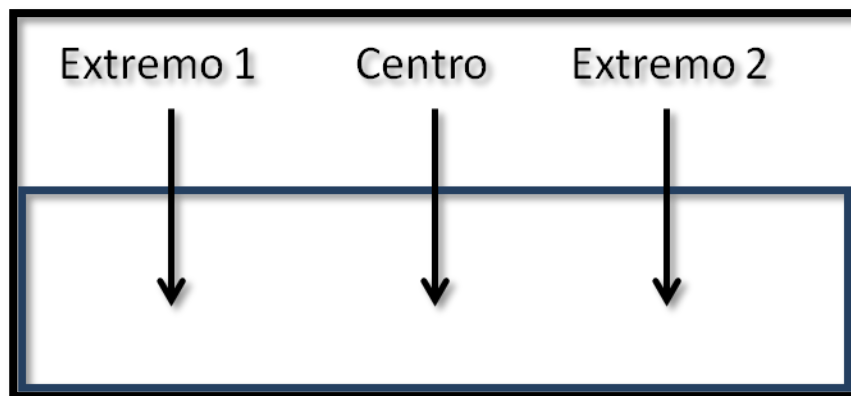


Figura 27. Zonas evaluadas por tiras de cada película.

2.1.5.1.1.4 Textura

Las pruebas de textura se llevaron a cabo en un texturómetro TA. X. T plus (Texture Analyser) (Ver Figura 28), que se encuentra en la Universidad Iberoamericana, realizando una prueba de tensión.

Para llevar a cabo la prueba se cortaron las películas en trozos de aproximadamente 8 cm de largo por 5 cm de ancho, después se colocaron en el dispositivo, en el cual la película es sujeta por el extremo inferior y superior.

Una vez que la película es sujeta de ambos extremos, se le indica al equipo que comience la prueba, en el que el dispositivo jala la película hasta provocar su fractura y baja hasta regresar a su posición original. El equipo proporciona una gráfica, por cada repetición, así como también los datos para poder graficar. Cabe mencionar que se realizaron cuatro repeticiones por aceite esencial.

Los datos obtenidos se utilizaron para graficar los resultados; sin embargo se muestra en la Figura 29, la gráfica proporcionada por el texturómetro TA. X. T plus.



Figura 28. Texturómetro TA. X. T plus modelo

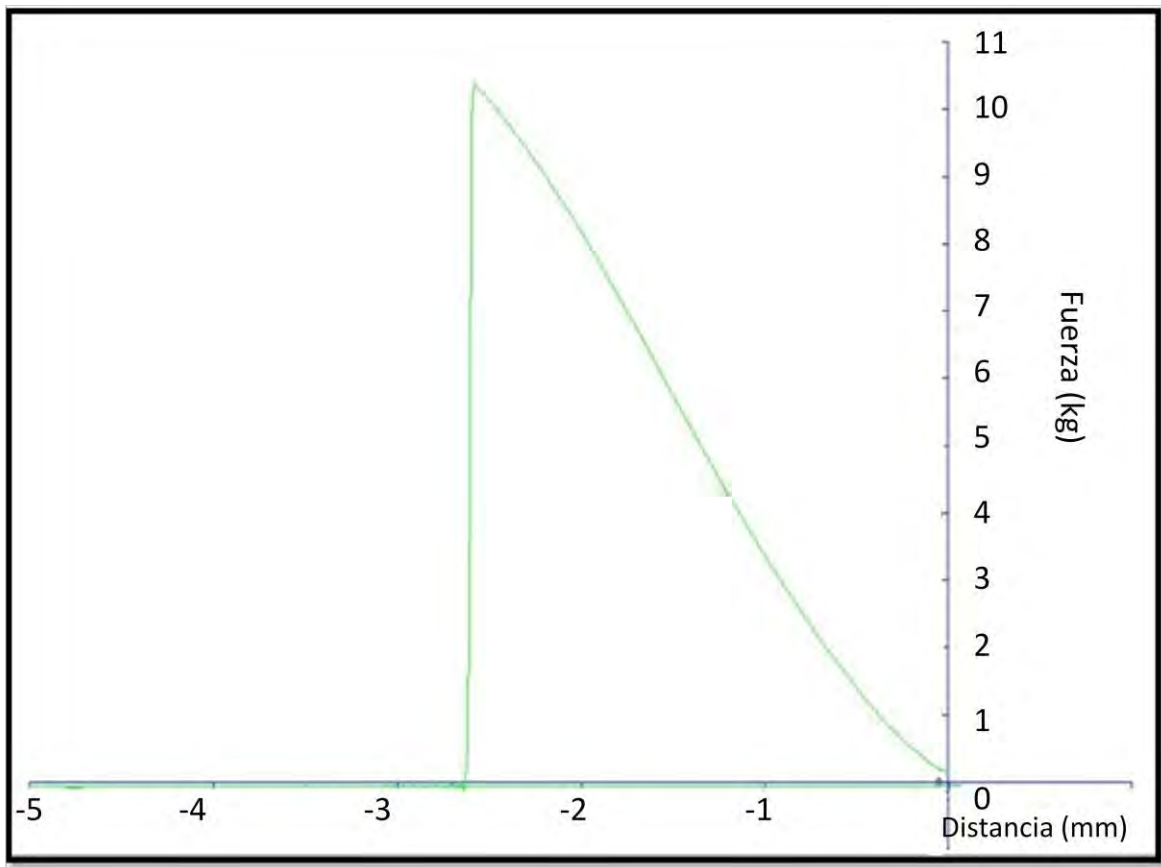


Figura 29. Gráfica obtenida en el Texturómetro TA. X. T plus.

2.1.5.1.2 Caracterización Microbiológica.

2.1.5.1.2.1 Inhibición de *Salmonella spp.* en la carne con recubrimiento

Se preparó un medio de cultivo de agar tripticaseína con extracto de levadura, en el que al igual que las actividades anteriormente descritas se sembró masivamente *Salmonella spp.*

En cuanto a la preparación de la muestra; se utilizó bistec de res, la carne se cortó en cuadros de 1 cm² aproximadamente, una vez cortada la carne, se llevó a cabo el recubrimiento por inmersión, esto en ambas soluciones de té verde y orégano.

Es importante mencionar que se utilizaron dos controles uno negativo (C-) y uno positivo (C+), el primero refiriéndose a la carne sin recubrimiento y el segundo a carne con recubrimiento. Dichos controles se colocaron sobre el medio de cultivo (Ver Figura 30), incubándose durante 24 h a temperatura ambiente, todo esto en un medio estéril.

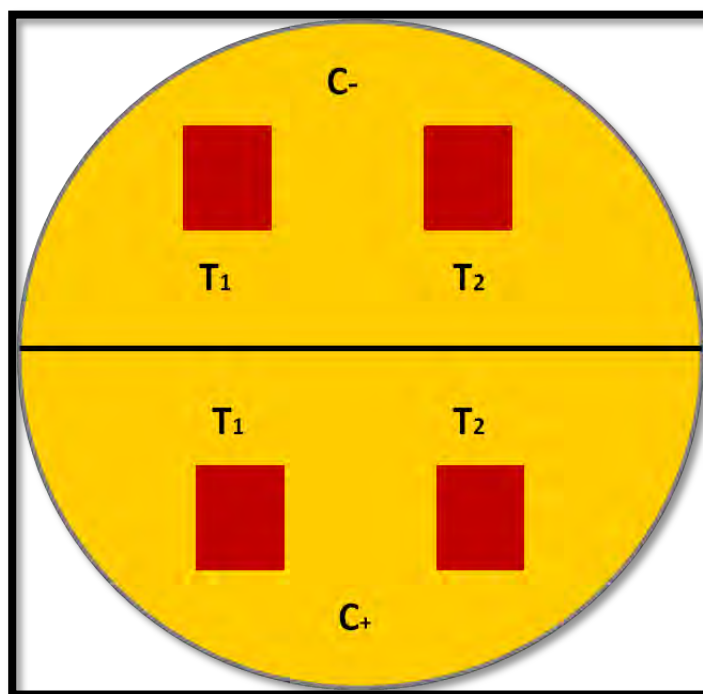


Figura 30. Ejemplifica como se colocaron los trozos de carne (T_1 y T_2), con los dos diferentes controles, siendo el control positivo (C+) la carne con recubrimiento y el control negativo (C-) la carne sin recubrimiento.

2.1.5.1.2.2 Cuantificación de *Salmonella spp*

Con la finalidad de obtener un porcentaje de inhibición de ambos recubrimientos a base de aceites esenciales de té verde y orégano, se realizó un conteo de las unidades formadoras de colonia de *Salmonella spp*.

▪ **Procedimiento:**

Se preparó el medio de cultivo Mc Conckey, después se esterilizó todo el material necesario, el cual incluía: tubos de ensaye con rosca (los cuales contenían 4.5 ml de solución salina), frascos (con 20 ml de solución salina), puntas para micropipetas, pipetas de 1 ml, pipetas de 10 ml, 4 morteros con pistilo y cajas petrí. La metodología que a continuación se desarrolla se realizó para cada uno de los controles y por triplicado.

Para realizar esto se tuvieron cuatro controles, siendo estos los siguientes:

1. Carne (C)
2. Carne + *Salmonella spp* (CS)
3. Carne + *Salmonella spp*+ recubrimiento de orégano (CSRO)
4. Carne + *Salmonela spp* + recubrimiento de té verde (CSRT)

Se cortaron trozos de carne de 2 g; para el caso de los controles en los que se inoculó *Salmonella spp*, se colocaron 20 μ L *Salmonella spp* de sobre el trozo, dejando actuar durante 15 min. En el caso de los trozos de carne a los cuales además se les agregó el recubrimiento antibacteriano (100 μ L), este se colocaba después de 1 min de haber colocado el microorganismo.

Una vez pasados los 15 min de acción la carne se trituraba en el mortero con ayuda del pistilo, después se vertieron 20 ml de solución salina esterilizada y se tomaron 0.5 ml del sobrenadante, para realizar diluciones adicionales (10^{-2} y 10^{-3}). La dilución 10^{-2} , se obtuvo diluyendo 0.5 ml la dilución 10^{-1} en 4.5 ml de solución salina esterilizada, y la tercera dilución a partir de la segunda, tomado 0.5 ml y vertiéndolos de igual manera en 4.5 ml de solución salina esterilizada.

De cada dilución y cada control (C, CS, CSRO y CSRT) se colocaron cuatro gotas de solución en el medio de cultivo (Ver Figura 31), incubando 24 h a temperatura ambiente. Es importante mencionar que después de cada prueba se inactivaba todo el material utilizado, se lavaba y se esterilizaba de nuevo.

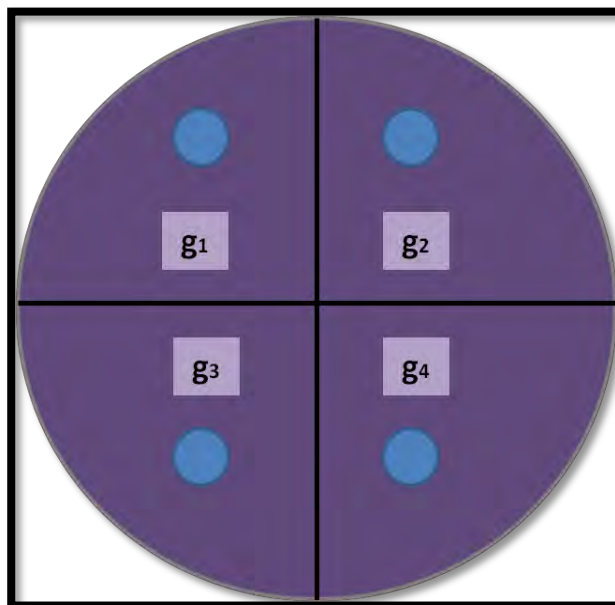


Figura 31. Distribución de las gotas de cada dilución en el medio de cultivo. Donde g_1 , g_2 , g_3 y g_4 representan las gotas.

El conteo de las unidades formadoras de colonias se realizó a las 24 h de haber sembrado la bacteria.

Los datos obtenidos se muestran en el Anexo 1, mientras que los resultados y análisis en el siguiente capítulo.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

Y

ANÁLISIS

3 RESULTADOS Y ANÁLISIS.

El tercer capítulo, muestra los resultados obtenidos durante la experimentación, así como los análisis de cada uno de ellos.

3.1 Selección de la concentración matriz

La Tabla 4 muestra los ángulos de contacto obtenidos para cada concentración de grenetina, en sus diferentes zonas.

Tabla 4. Ángulos obtenidos para cada concentración.

[2.5]			
ZONA	TIRA 1	TIRA 2	TIRA 3
Extremo 1	70°	62°	40°
Centro	50°	62°	74°
Extremo 2	85°	62°	58°
[3]			
Extremo 1	59°	63°	57°
Centro	58°	60°	57°
Extremo 2	58°	68°	57°
[3.5]			
Extremo 1	36°	70°	32°
Centro	64°	64°	60°
Extremo 2	36°	68°	60°

▪ **ANÁLISIS:**

La Tabla 4 muestra los resultados de los ángulos obtenidos a las diferentes concentraciones de grenetina, y en la que se puede observar que los valores más altos los presenta la concentración de 2.5%, seguido del 3 y 3.5%, esto se le atribuye a que las películas a base de una proteína se caracterizan por no ser buenas

barreras a la humedad (Garnica Martínez, 2001), ya que sus valores son intermedios si se considera que el valor más alto de un ángulo de contacto es 90° .

Por lo que la permeabilidad esta directamente relacionada con las interacciones de las moléculas dentro de la película, principalmente los enlaces polares, ya que estos enlaces son los que ocurren con el agua. Por lo anteriormente descrito se eligió la concentración de 3%, para ser la concentración matriz, ya que era la que presentaba valores intermedios entre las concentraciones de 2.5% y 3.5%.

3.2 Selección de las concentraciones mínimas inhibitorias del aceite esencial de orégano y de té verde (emulsiones).

A continuación se muestran las cajas petri de cada aceite esencial, para observar su efecto inhibitorio a las diferentes concentraciones de emulsiones.

▪ ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO

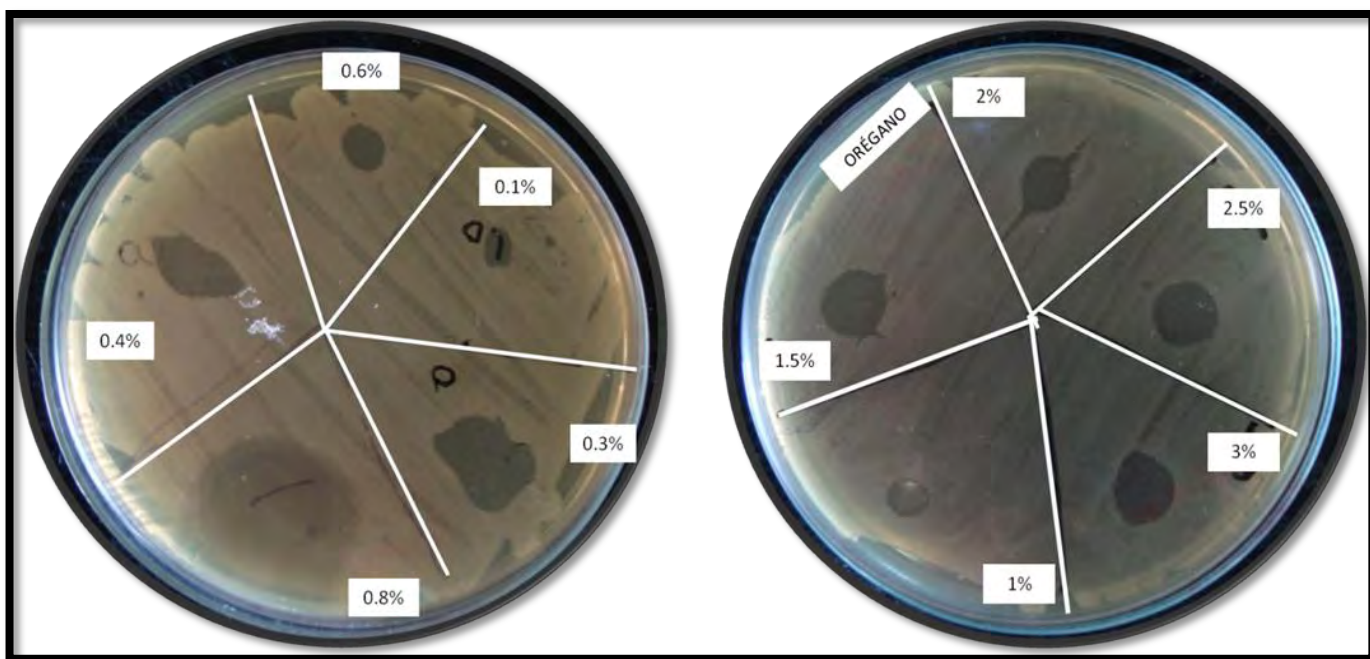


Figura 32. Inhibición de *Salmonella* spp por aceite esencial de orégano.

- **ACEITE ESENCIAL DE TÉ VERDE**

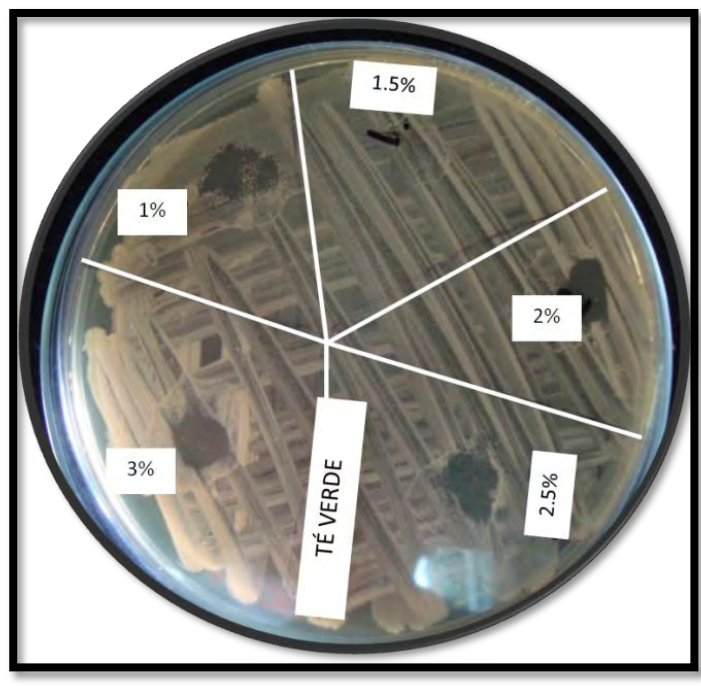


Figura 33. Inhibición de *Salmonella spp* por aceite esencial de té verde.

- **ANÁLISIS:**

Como se puede observar en la Figura 32 la emulsión de aceite esencial de orégano inhibió en un rango de concentraciones de 0.8% - 3%, a diferencia del té verde que fue en un rango menor de 2% - 3% (Ver Figura 33).

La inhibición de *Salmonella spp* se explica ya que los aceites esenciales poseen actividad antibacteriana, debido a que contienen compuestos que son sintetizados por las plantas (metabolitos secundarios) como mecanismo de defensa contra algunos microorganismos, por lo tanto su mecanismo de acción se asocia con la capacidad de interactuar con el citoplasma de la membrana de los microorganismos patógenos, por ejemplo *E. coli*, *Listeria monocitogenes*.

Existe una relación entre las estructuras químicas y el tipo de compuesto más abundante en los aceites esenciales utilizados y el efecto antimicrobiano. El grado de inhibición de los aceites puede atribuirse a la presencia de un núcleo aromático que contiene un grupo funcional polar; también están involucrados otros factores como el

balance hidrofílico/ lipofílico; por ejemplo, los grupos fenólicos-OH que son muy reactivos y pueden fácilmente formar enlaces de hidrógeno con los sitios activos de las enzimas (Ronquillo, 2007).

La inhibición de *Salmonella spp* depende directamente de los compuestos de los aceites esenciales, siendo en este caso el de orégano el que presenta un mayor poder de inhibición en comparación al té verde; ya que los compuestos de éste contienen un poder antimicrobiano mayor a los del té verde, sus compuestos son el carvacol (diminución de microorganismos en fase log (Raybaudi-Massilia, 2003)), terpenos y timol (inhibe bacterias, mohos y levaduras (Raybaudi-Massilia, 2003)), teniendo éste último el nivel más alto de actividad antimicrobiana, seguido del carvacol (Afroditi y Papanikolaou, 1996); a diferencia del té verde que contiene polifenoles y catequinas, siendo las catequinas las del mayor poder antimicrobiano (Gupta, Saha y Giri, 2002).

Por lo dicho anteriormente, las concentraciones de aceite esencial para ser adicionadas a las películas fueron las mínimas inhibitorias, siendo éstas las siguientes:

- Concentraciones de orégano: 1% y 2%
- Concentraciones de té verde: 2% y 3%

Cabe mencionar que las demás concentraciones de té verde presentaron crecimiento de *Salmonella spp*, dentro de la superficie en la que se colocó la gota, por lo que se descartaron; sin embargo en el caso de las concentraciones de orégano, las cuales inhibieron a todas las concentraciones se optó por elegir las intermedias.

3.3 Selección de la concentración mínima inhibitoria de *Salmonella spp* en las películas.

En la Figura 34, Figura 35 y Figura 36 se puede observar el efecto de inhibición de las películas antibacterianas, así como las formulaciones a base de aceite esencial de orégano que no inhibieron.

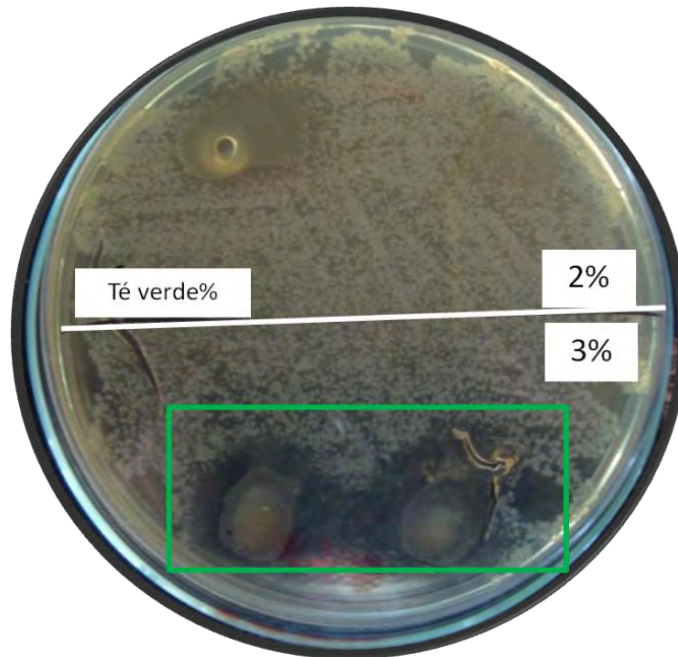


Figura 34. Inhibición de las películas adicionadas con té verde a una concentración de 3%.

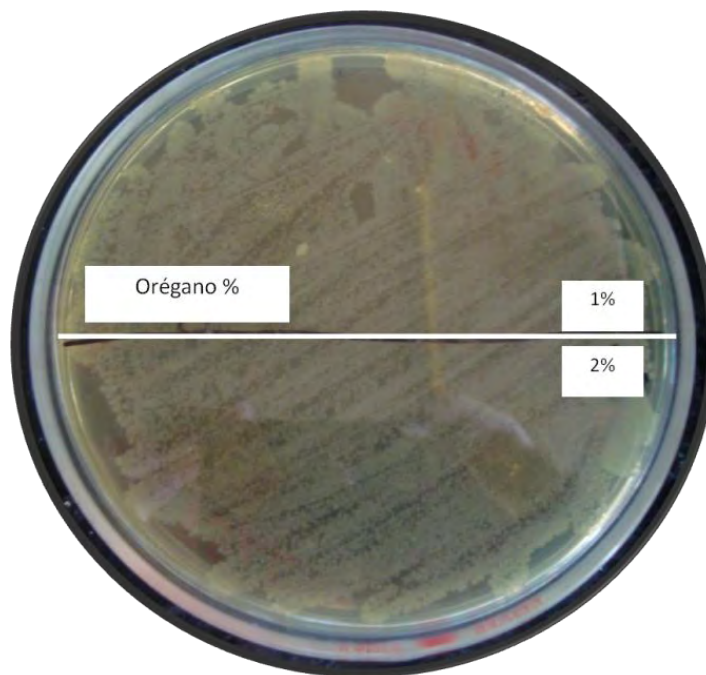


Figura 35. Películas con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano, sin poder inhibitorio

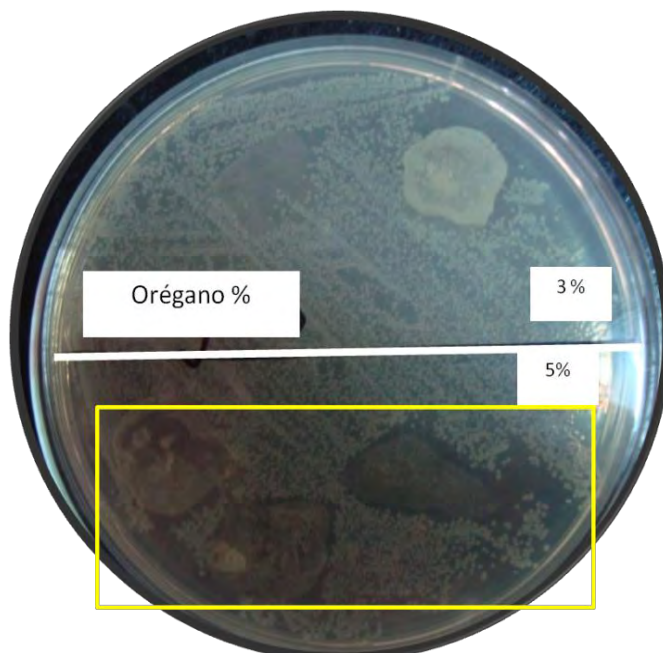


Figura 36. Inhibición de las películas adicionadas con orégano a una concentración de 5%.

- **Análisis:**

La Figura 34 muestra el efecto inhibitorio de las películas adicionadas con té verde a una concentración de 3% y un efecto nulo a una concentración de 2%, siendo en la primera concentración mencionada en la que se observa un halo de inhibición superior al presentado por las películas de orégano, ya que éstas solo inhiben sobre la superficie de contacto y en las que además la inhibición de *Salmonella spp* se logró a una concentración del 5% como se puede observar en la Figura 35 y Figura 36.

La diferencia en la inhibición del microorganismo entre las películas de té verde y orégano puede explicarse por la diferencia entre los compuestos químicos, y además el efecto inhibitorio depende directamente de la dispersión de aceite en el gel; entre mayor sea la distribución del aceite esencial en la solución que forma el gel, mayor es la posibilidad de interacciones entre el aceite esencial y la pared celular del microorganismo. Esto de acuerdo a lo reportado por Skandamis y col. (1999), ya que mencionan, que al adicionar un antimicrobiano natural a un gel, éste debe ser

compatible con la estructura formadora del gel, y de esto dependerá la difusión del aceite esencial hacia los microorganismos; por lo que la acción antimicrobiana tiene diferentes efectos para la misma bacteria al actuar diferentes aceites esenciales, sin embargo ambos aceites esenciales (orégano y té verde) tienen un efecto bacteriostático, ya que impiden el crecimiento de *Salmonella spp* y bactericida al eliminarla (Chiu y Lai, 2010). Otro factor importante a considerar es el tamaño de las gotas de aceite esencial, ya que las gotas de aceite de té verde eran más pequeñas en comparación a las de la emulsión de orégano, por lo que la superficie de contacto aumenta entre agente antimicrobiano y *Salmonella spp*; por lo tanto la inhibición se lleva a cabo a una concentración menor.

Algunas de las alternativas para que las gotas de aceite esencial de orégano sean más uniformes pueden ser: utilizar un emulsificante diferente a la lecitina de soya o este mismo de forma líquida, una proteína diferente como matriz del gel como la proteína de soya o aumentar el tiempo y velocidad de agitación para disminuir el tamaño del glóbulo de aceite.

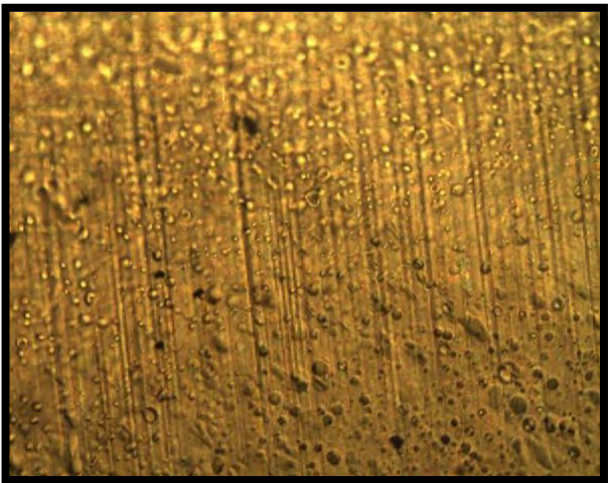
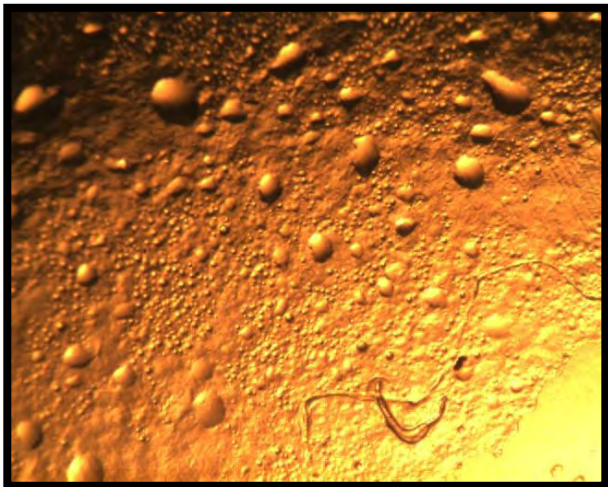
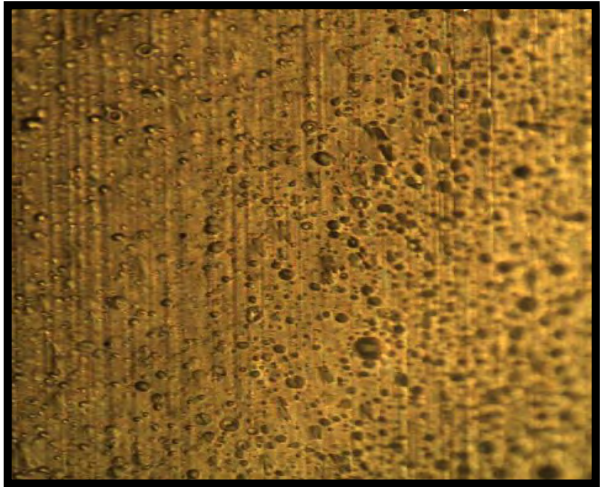
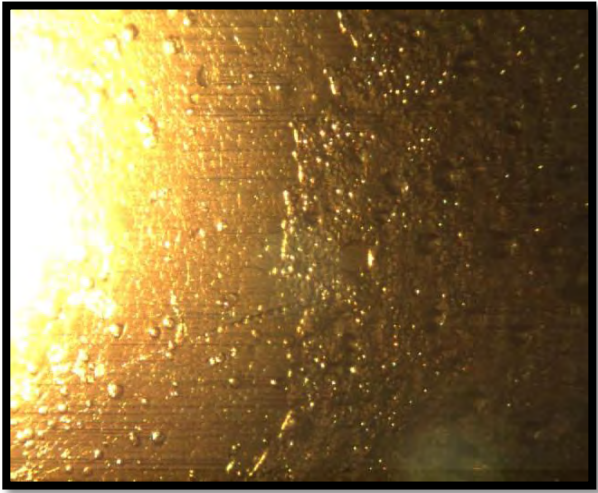
Las concentraciones que no inhibieron son: 2% de té verde, 1%, 2%, y 3% en el caso del orégano. Dichas concentraciones fueron insuficientes para actuar sobre la membrana celular, atribuyendo esto a que, la *Salmonella spp* es una bacteria Gram negativa, por lo que tiene una membrana externa compuesta por liposacáridos, los cuales actúan como una barrera eficiente contra agentes antimicrobianos.

3.4 Caracterización fisicoquímica.

3.4.1 Microscopía Óptica

La siguiente tabla muestra las imágenes obtenidas en el microscopio óptico (ZEIGEN), de 2 diferentes zonas evaluadas para cada película; cabe mencionar que se utilizó un objetivo de 10X.

Tabla 5. Micrografías de las películas de orégano y té verde.

ZONA	PELICULAS DE TÉ VERDE	PELICULAS DE ORÉGANO
1		
2		

- **Análisis:**

En la Tabla 5, se puede observar que los aceites esenciales se difundieron de diferente manera (a pesar de que la matriz principal era la misma), si bien las películas de té verde mostraron una estructura más homogénea y ordenada, observándose sólo diferencia en el tamaño de la gota; las micrografías de las películas de orégano muestran una distribución menos homogénea en cuanto a tamaño y distribución del aceite, además en algunos casos el aceite esencial con mayor tendencia al extremo derecho de la película (Ver Tabla 5 , zona 2); atribuyéndose a que la matriz principal (proteína-agua) se comporta diferente, esto dependiendo de la emulsión y de la agitación.

La diferencia en la dispersión de los glóbulos de aceite esencial depende de factores como el biopolímero con el cual se esta formando la matriz de la película, la densidad y peso molecular de los aceites. El biopolímero es el responsable de proporcionar una matriz macromolecular con la resistencia cohesiva la que a su vez depende de la estructura química del polímero, masa molecular, geometría y distribución espacial de sus grupos funcionales; así como también, la emulsión formada por el antimicrobiano y el agua, la cual depende del tiempo de agitación, concentración de emulsificante y tipo de aceite.

El aceite esencial influye de acuerdo a su concentración, estructura química, densidad, homogeneización del sistema; todo esto siendo un factor determinante en el tamaño de los glóbulos y su distribución en la emulsión, y por lo tanto, en la microestructura.

Los aceites esenciales son de baja densidad, lo cual facilita la formación de una emulsión más estable y homogénea, a partir de esto, se puede decir que el aceite esencial de orégano es de densidad mayor en comparación con la película de té verde, lo cual también explica la heterogeneidad de los glóbulos de aceite en la película.

Las investigaciones de Fabra y col. (2009), mencionan que la evaporación durante el secado de la película induce a cambios en la estructura de la emulsión a causa de fenómenos de desestabilización, como floculación y coalescencia de las gotas de lípidos. La intensidad de estos fenómenos depende de la concentración de los lípidos, el tamaño de las partículas en la emulsión inicial, la viscosidad de la fase continua y las propiedades de la superficie interfacial de las gotas, esto ocurre en mayor medida cuando la fase acuosa es poco viscosa.

La formación de gotas de lípidos durante el secado de la película supone la interrupción de los enlaces de la proteína, el aumento de la heterogeneidad interna y la rugosidad de la superficie de la película.

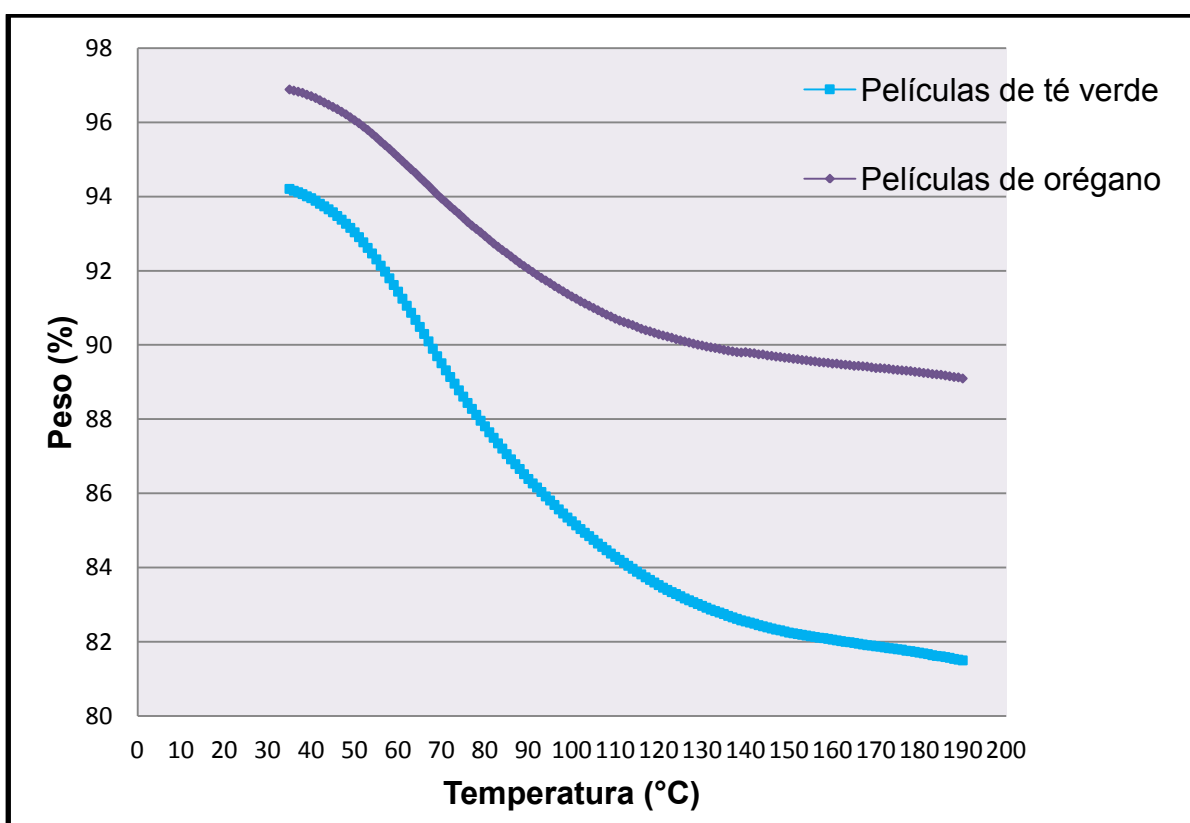
De acuerdo con esto, se puede observar (Ver Tabla 5) que las interacciones entre el orégano y la matriz de las películas es mayor en algunas zonas, ya que se presentan agregados, por lo que cuanto mayor sea el tamaño de las gotas en la dispersión, mayores son los agregados de lípidos observados en la película, haciendo de estas películas heterogéneas.

Otro factor a considerar en la distribución de las gotas de aceite esencial, es el emulsificante, ya que las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables y los emulsificantes aumentan la estabilidad de éstas por adsorberse en la interfase agua-aceite formando estructuras más o menos ordenadas. Cuando un emulsificante se adiciona a una emulsión reorienta sus moléculas desde un estado amorfo hasta estructuras de dobles capas, sin embargo coexiste un considerable desorden a escala molecular; las moléculas son libres para moverse sobre la superficie de las capas y pueden girar. B. Rigo y Herrera (1988), explican este fenómeno, ya que en el estado gel, como es el caso de las películas, las dobles capas de lípidos están separadas por capas de agua en la fase laminar, pero las cadenas hidrocarbonadas están ahora solidificadas como formas cristalinas, formando un empaquetamiento hexagonal, y están además inclinadas en relación con la capa de agua. Como consecuencia de haberse perdido el movimiento de rotación en torno a su eje de las cadenas hidrocarbonadas, éstas ocupan menos espacios en la fase gel, que en la

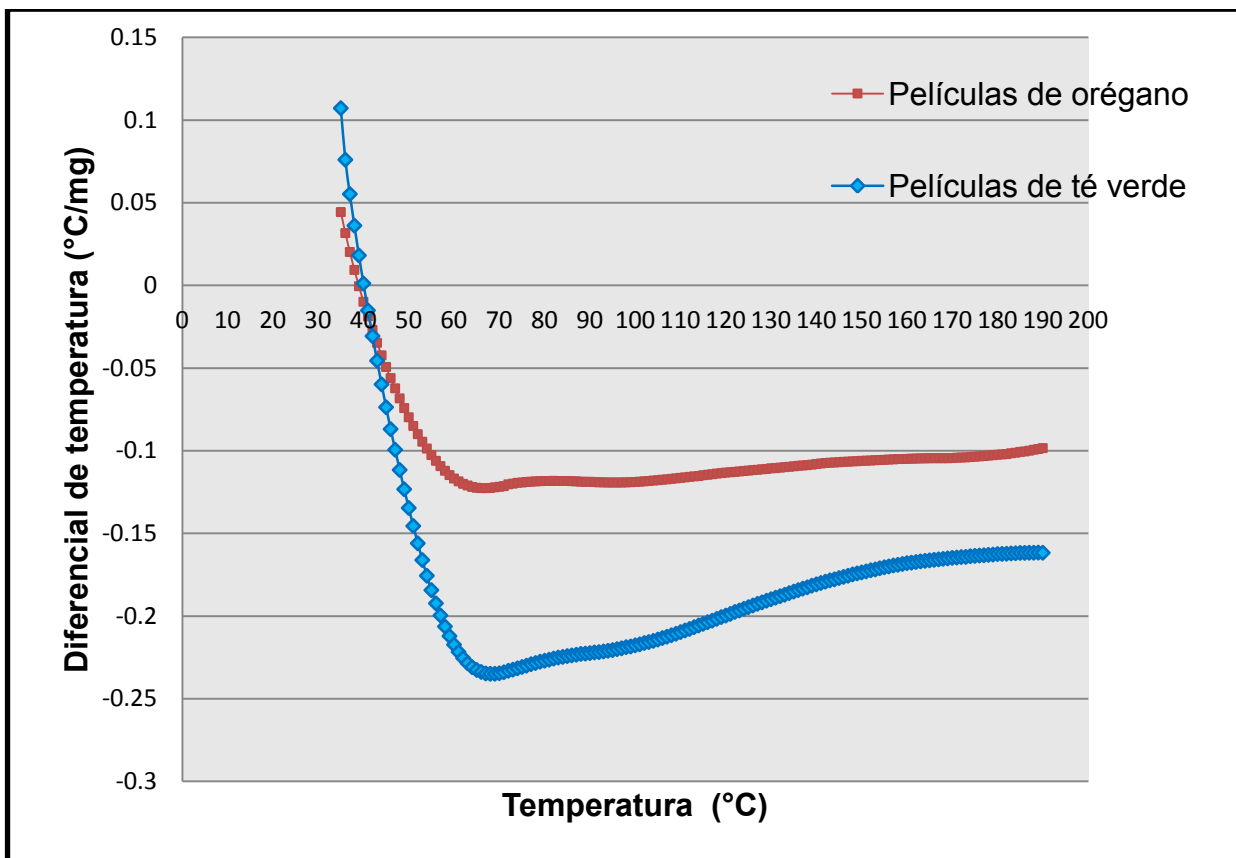
fase laminar, con lo que se puede explicar la diferencia en la distribución de las gotas de ambos aceites esenciales, ya que al no ser el mismo tamaño de gotas de té verde y orégano, los espacios intermoleculares son diferentes y menos ordenados.

3.4.2 Análisis Termogravimétrico (TGA) y Análisis Térmico Diferencial (DTA)

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la prueba de calorimetría (Ver Gráfica 1 y 2).



Gráfica 1. Análisis Termogravimétrico.



Gráfica 2. Análisis Térmico Diferencial

▪ **Análisis:**

La Gráfica 1 se basa en la medida de la variación de la masa de las películas con respecto a los cambios de temperatura, ya que los efectos del calor sobre los materiales pueden producir cambios en muchas de sus propiedades (energía cinética, entropía, entalpía).

El termograma es de tipo dinámico ya que la temperatura va aumentando de manera controlada y con lo que se obtiene la curva de descomposición térmica; en la que se puede observar (Ver Gráfica 1) que para ambas películas la pérdida de peso comienza desde los 35°C y presenta una estabilidad a partir de los 121°C, a demás siguen la misma tendencia en cuanto a la pérdida de peso; esto se le atribuye a que por efecto de la presión de vapor hay pérdida de peso debida al agua, ya que éste es el componente mayoritario en la formulación, sin embargo a dicha temperatura la película de té verde presenta una disminución del 16.47% de su peso inicial a

diferencia de las de orégano con un porcentaje de pérdida de 9.71%, lo que nos habla de mayor estabilidad frente a la temperatura, para esta última. Cabe mencionar que hasta los 100°C se considera que la disminución en peso se debe a la deshidratación de moléculas de agua atrapadas dentro de las cadenas de la matriz del polímero ya sea que el agua esté libre o ligada a grupos hidrófilos a lo largo de las cadenas de la matriz del polímero (Chávez García y Mendoza Martínez, 2010) y después de esta temperatura se le puede atribuir a los compuestos volátiles de los aceites esenciales.

Hettiarachchy y Ziegler (1994), explican lo anterior debido a que los enlaces puentes de hidrógeno son los primeros en disminuir, lo que provoca que la entropía del sistema aumente y la entalpía disminuya, esto causado por el orden y estructura de las moléculas y probablemente asociado con la exposición de los aminoácidos (parte hidrófoba de la proteína) y la ruptura de los enlaces puentes de hidrógeno. Además la gretina con aditivos altera su gelificación, añadiendo enlaces covalentes en las triples hélices, o que estén mediadas por algún compuesto que merme la interacción de la triple hélice, estos aditivos permiten alterar el mecanismo y la fuerza de la gelificación (Piñeiro Redondo, 2000), con lo que se puede decir que existe un mayor número de enlaces entre el agua y la gretina en las películas de té verde y por lo tanto menos enlaces con el aceite esencial, por lo que la pérdida de peso ocurre con mayor velocidad a causa de la temperatura.

Al adicionarle té verde a las películas la degradación térmica es más fácil que las obtenidas con el aceite esencial de orégano, esto se le atribuye a factores como el tipo de aceite esencial y la concentración ya que tenía una diferencia del 2%, siendo el aceite esencial de orégano el que se encuentra en un 5% en la emulsión inicial, lo que provoca que exista un mayor número de enlaces con la parte apolar de la proteína.

En cuanto a la Gráfica 2, permite el estudio de aquellos procesos en los que se produce una variación entálpica. En dicha gráfica se observa que la tendencia de ambas películas es similar, sin embargo, el té verde presenta un pico más pronunciado y una mayor sensibilidad a la temperatura, esto se le atribuye a la diferencia en las estructuras formadas en la película al ser adicionadas con un aceite esencial diferente, ya que las fuerzas intermoleculares, que son las responsables de la agregación molecular y pueden expresarse como la energía cohesiva, son menores en las películas de té verde, por lo tanto se requiere mayor energía para desestabilizar las películas adicionadas con aceite esencial de orégano, obteniendo así una mayor entalpía (área bajo la curva) (Hettiarachchy y Ziegler, 1994).

También se puede observar que el pico en la gráfica de las películas de orégano se presenta a una temperatura de 59°C y la del té verde a 60°C aproximadamente, lo que nos habla del inicio de la descomposición del gel, siendo las películas de orégano las que se descomponen más rápido frente a la temperatura, esto se le atribuye a que la emulsión interviene en las interacciones de la red del gel, formando un gel más o menos estable frente al cambio de temperatura, cabe mencionar que a más temperatura la energía cinética de las partículas aumenta y se requiere menos entalpía, es decir, menos energía para romper los enlaces, lo que explica que los enlaces de las películas de orégano utilizan menos energía para romperse, sin embargo son más estables frente a los cambios de temperatura. Lo que probablemente se deba a que los enlaces puentes de hidrogeno sean los primeros en disminuir, sin embargo existe un mayor número de enlaces Van der Waals, por lo que la estabilidad es mayor en comparación a las películas de té verde (R. Whitaker y R. Tannenbaum, 1997).

3.4.3 Permeabilidad al agua

La Tabla 6 muestra los ángulos obtenidos para cada película adicionada con un agente antimicrobiano de origen natural.

Tabla 6. Ángulos de contacto.

TÉ VERDE			
ZONA	TIRA 1	TIRA 2	TIRA 3
Extremo 1	44°	60°	60°
Centro	38°	49°	46°
Extremo 2	45°	60°	65°
ORÉGANO			
Extremo 1	40°	38°	60°
Centro	54°	30°	52°
Extremo 2	44°	40°	180°

- **Análisis:**

El ángulo de contacto se refiere al ángulo entre la superficie sólida y una tangente dibujada sobre la superficie de la gota que pasa a través del punto triple atmosfera-liquido-solido (Karbowski y Debeaufort, 2005).

La Figura 37 muestra el tipo de gotas que presentaron las películas adicionadas con té verde y las películas adicionadas con orégano, de acuerdo a la clasificación realizada por Karbowski y Debeaufort (2005); con lo que se puede observar que las películas de té verde son más permeables al agua, sin embargo ambas películas presentan un fenómeno de absorción, esto debido a que el hidrocoloide base, es altamente hidrofílico.

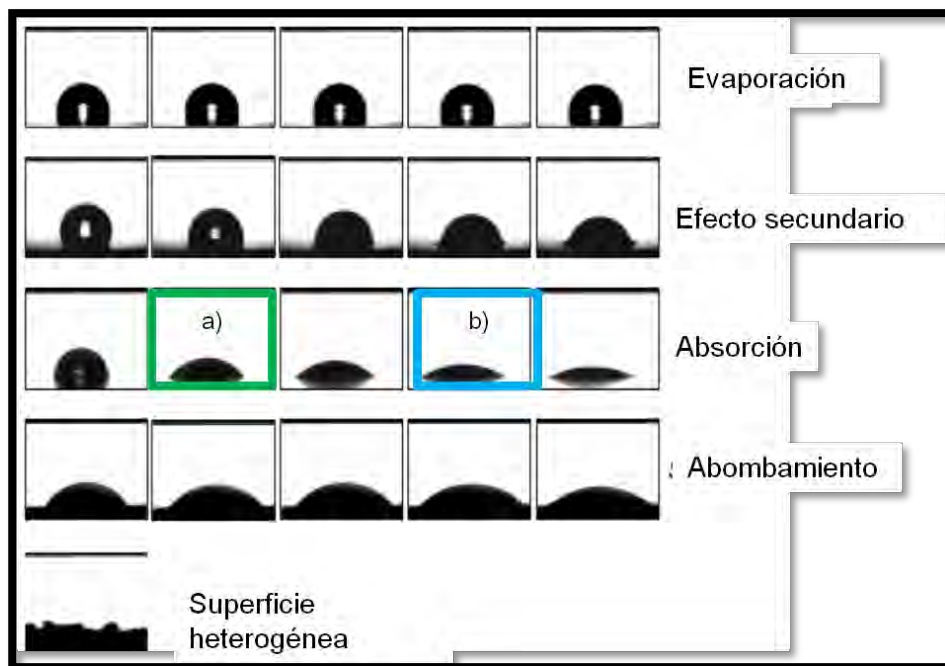


Figura 37. Diferentes fenómenos en el ángulo de contacto que pueden presentarse en la superficie de una película. a) Películas de té verde, b) películas de orégano (Karbowiak y Debeaufort, 2005).

Al comparar ambas películas adicionadas con diferentes agentes antimicrobianos (orégano y té verde) (Ver Tabla 6), la tira 1 presenta una similitud en sus ángulos de contacto, no siendo así en la tira 2 y 3. En general se puede decir que la película adicionada con té verde, tienen mayor permeabilidad al agua ya que los ángulos de contacto son mayores en comparación a la adicionada con orégano.

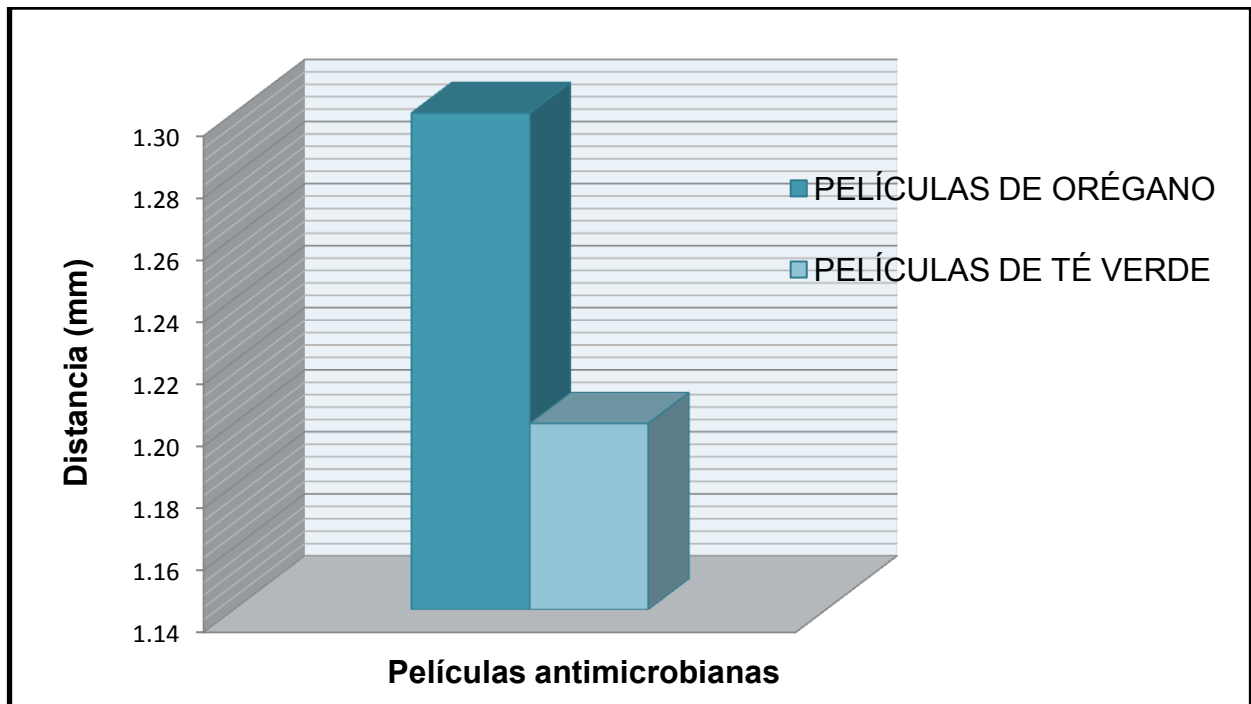
De acuerdo a Fabra y col. (2009), la permeabilidad al agua depende de factores como la zona de la película, lípido, componentes de la matriz y del polimorfismo, así como de distribución del aceite esencial en la película y el tamaño de los glóbulos de aceite; lo que explica el comportamiento diferente de las películas de té verde con respecto a las de orégano, ya que éstas últimas, se puede decir que tienen menos afinidad con la matriz de la película (grenetina) y por lo tanto la difusión del aceite esencial en el área de la película es menor, provocando así una menor barrera al agua, en comparación a las de té verde.

La importancia de esta propiedad radica en que los cambios fisicoquímicos y bioquímicos que ocurren en los alimentos durante el almacenamiento, se deben principalmente a la migración de agua entre constituyentes alimenticios o entre el medio ambiente (pérdida o ganancia de humedad), por lo que puede extender la vida de anaquel y elevar la calidad de alimentos por limitación de la migración de humedad que puede acelerar las reacciones deteriorativas.

Como ya se ha mencionado, la naturaleza hidrofóbica de los aceites esenciales, puede ser aprovechada para reducir o mejorar las propiedades de barrera a la humedad de ciertos alimentos, ya que los recubrimientos reducen eficientemente la deshidratación, lo que disminuye la pérdida de peso y por lo tanto pérdidas económicas, además de reflejarse directamente en la calidad, esto de acuerdo a lo reportado por Ramos García y col (2009).

3.4.4 Textura

Las graficas que se muestran a continuación presentan los parámetros de fragilidad (Gráfica 3) y dureza (Gráfica 4).



Gráfica 3. Comparación del parámetro de fragilidad de las películas antimicrobianas.



Gráfica 4. Comparación del parámetro de dureza de las películas antimicrobianas.

▪ **Análisis:**

En la Gráfica 3 se analiza la fragilidad, refiriéndose a la distancia en la que se fractura la película, por lo que a mayor distancia mayor flexibilidad. Con lo dicho anteriormente se observa que las películas de orégano son más flexibles que las de té verde, atribuyendo esto a los tipos de enlaces que ocurren en los geles a base de proteínas, ya que por su naturaleza pueden interactuar con grupos polares y no polares, es decir, tienen en su cadena partes hidrofílicas e hidrófobas.

Por lo que al existir mayor concentración de orégano en las películas, este interacciona y disminuyen los enlaces puentes de hidrogeno (en los que el oxígeno del grupo carboxilo de un enlace peptídico y el hidrogeno del grupo NH de otro enlace peptídico se unen para formar la red tridimensional), de un gel débil (R. Whitaker y R. Tannenbaum, 1997); de acuerdo a lo escrito por Fennema (1993), las interacciones que se llevan a cabo con los aceites esenciales son hidrofóbicas, en el que su estructura química apolar, así como las cadenas laterales de este tipo no

interaccionan con moléculas polares y repelen el agua, por tanto tienden, a asociarse en regiones hidrofóbas de la proteína, formando enlaces de Van der Waals.

Por otra parte al formarse un gel débil se cierran los espacios de los enlaces en más orden y forma una estructura más rígida y ordenada, debido a esto en (Ver Gráfica 4), la película de té verde muestra un valor más alto de dureza (9.2 kg_f), que es la fuerza requerida para romper la película, esto se puede explicar ya que las interacciones hidrofóbas son menores en el té verde (debido a su concentración menor en comparación al aceite esencial de orégano) y los enlaces puentes de hidrogeno se forman con mayor facilidad formando un gel con redes tridimensionales con mayor dureza.

El objetivo de emplear un biopolímero para la elaboración de películas comestibles, es para mejorar las propiedades y características del alimento. Una de las propiedades que se buscan mejorar son las propiedades mecánicas, las cuales dependen del tipo de material utilizado y especialmente de su cohesión estructural. La cohesión es el resultado de la habilidad del polímero para formar fuertes y/o numerosos enlaces moleculares entre cadenas poliméricas, dificultando así su separación.

Cabe mencionar que en el caso de los recubrimientos, existen dos condiciones relevantes: cohesión entre las moléculas del alimento y adhesión entre el recubrimiento y estructura soporte. El grado de cohesión influye en las propiedades de barrera al oxígeno y mecánicas de las películas, de forma que una cohesión estructural elevada se traduce en una reducción de la flexibilidad. La cohesión depende de la estructura química del biopolímero, del proceso de elaboración, parámetros empleados (temperatura, técnica de aplicación) y presencia del aceite esencial. La cohesión entre los componentes de las películas es favorecida por la presencia de polímeros ordenados de cadena larga.

La adhesividad de la película sobre la superficie del alimento depende principalmente de su naturaleza y del número de interacciones o enlaces entre el recubrimiento y el soporte. Por lo tanto, el uso de sustancias tensoactivas tales como emulsificantes,

hacen posible la adherencia de una película hidrófoba sobre un producto alimenticio muy hidrofílico (Aguilar Mendez, 2005). Con lo dicho anteriormente se explica la importancia de las propiedades mecánicas de la película, ya que influyen de manera directa en las propiedades del alimento.

3.5 Caracterización Microbiológica

3.5.1 Determinación de la dosis de *Salmonella spp* que permita observar el efecto de inhibición.

La Figura 38 y Gráfica 5 muestran los resultados obtenidos para las tres diferentes concentraciones (3 colonias, 1.5 colonias y la tercera concentración una dilución de la segunda); cabe mencionar que estos resultados corresponden a la actividad preliminar 5.

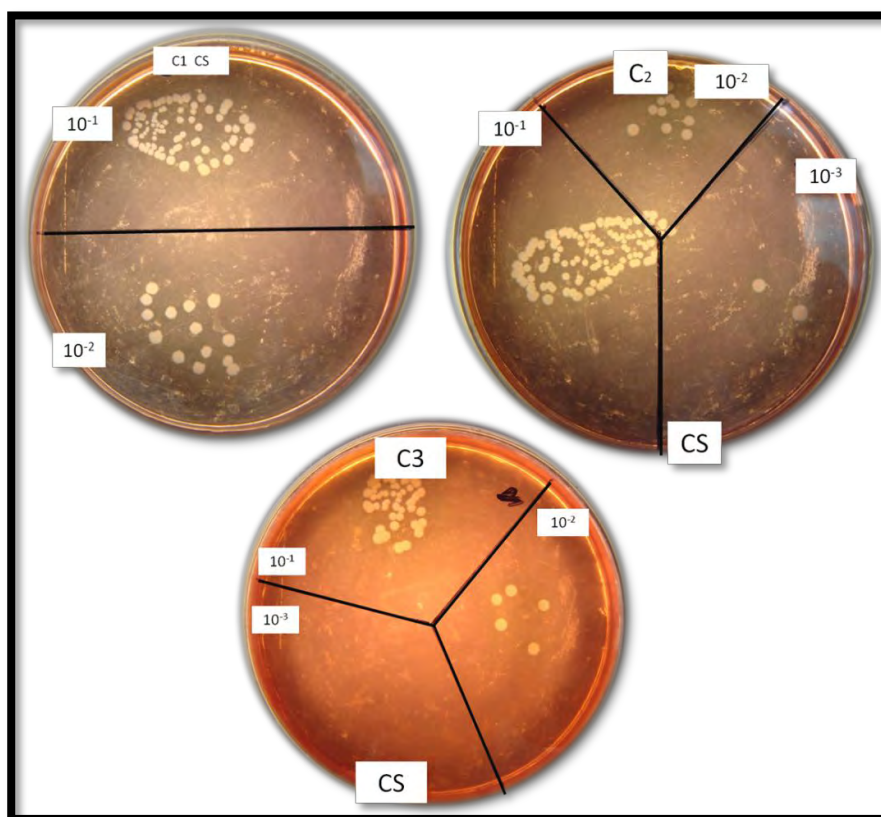
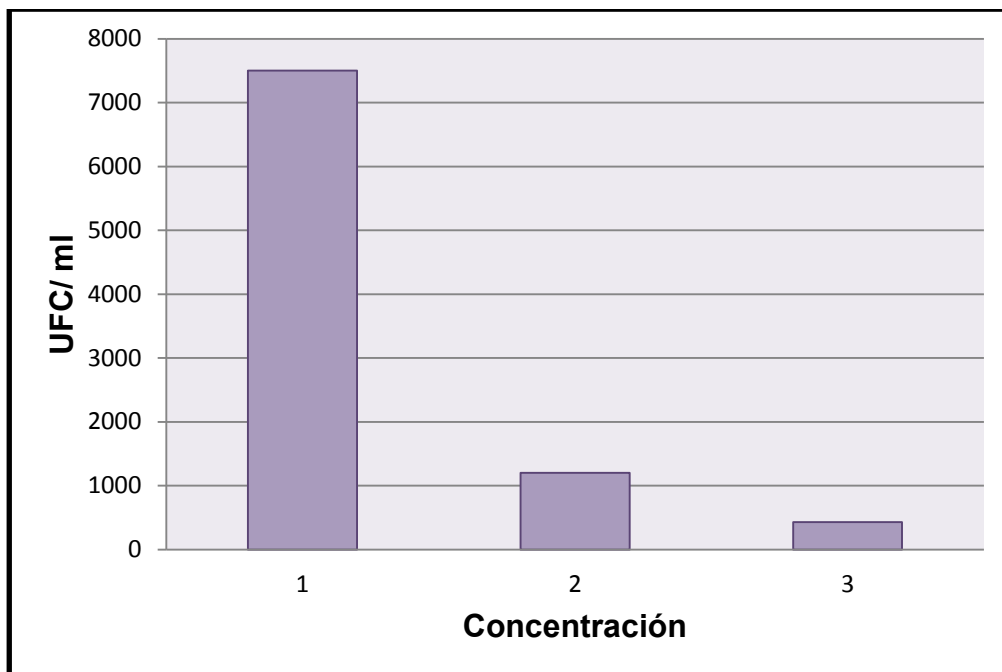


Figura 38. Colonias que se obtuvieron a las tres diferentes concentraciones (C_1 , C_2 y C_3), al adicionar *Salmonella spp* a la carne (CS), así como las diluciones realizadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}).



Gráfica 5. Presenta las Unidades formadoras de colonias (UFC).

▪ **Análisis:**

La *Salmonella spp* es un género de bacterias gram negativas, anaerobias facultativas que sobrevive largos periodos de tiempo en el ambiente, soportando bien la congelación y en gran medida la deshidratación. En determinadas condiciones, es capaz de multiplicarse en un ambiente exterior y en agua (Frazier, 1993), además los alimentos crudos como la carne cuentan con las características óptimas para el crecimiento de *Salmonella spp*.

La multiplicación bacteriana se produce en el tejido de la carne, y como se puede observar en la Gráfica 5, depende directamente del número de colonias, es decir del grado de contaminación; por lo que a mayor concentración del microorganismo mayor es la difusión en el alimento, lo que provoca que las UFC disminuyan al disminuir las colonias y más aún al ser diluidas, por lo que la concentración utilizada fue la primera (3 colonias), ya que con ésta concentración se obtuvo el mayor número de UFC, asegurando así la detección de *Salmonella spp* en la carne, lo que permitió analizar el efecto inhibitorio al ser recubierta con aceites esenciales.

3.5.2 Aplicación del recubrimiento en la carne

Las siguientes figuras (Ver Figura 39 y Figura 40) muestran la aplicación del recubrimiento en la carne, el cual se llevó a cabo por inmersión durante 30 s.

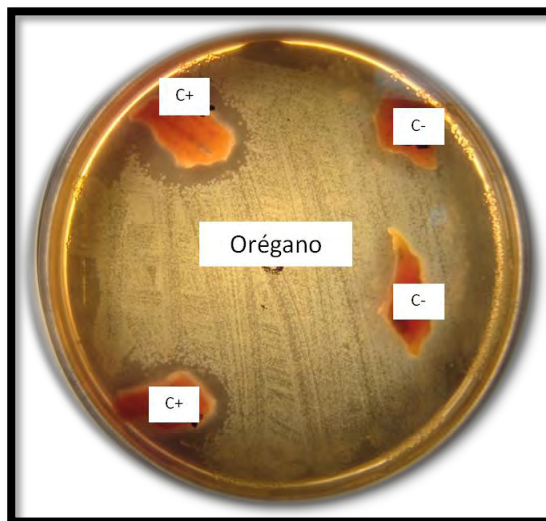


Figura 39. Inhibición de *Salmonella spp* con recubrimiento a base del aceite esencial de orégano en la carne. C+ indica la carne con recubrimiento y C- indica carne sin recubrimiento.

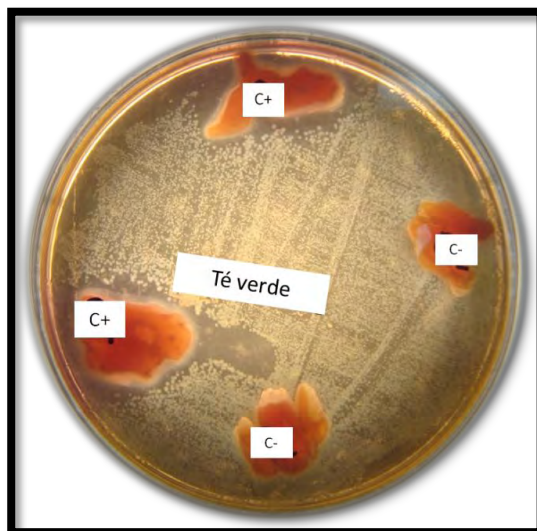


Figura 40. Inhibición de *Salmonella spp* con recubrimiento a base del aceite esencial de té verde en la carne. C+ indica la carne con recubrimiento y C- indica carne sin recubrimiento.

- **Análisis:**

Como se puede observar en la Figura 39 y Figura 40, ambos recubrimientos presentan un halo de inhibición a la *Salmonella spp* en los controles positivos, esto se le atribuye a que la incorporación directa de la solución antimicrobiana en la carne reduce de forma inmediata la población bacteriana; siendo los compuestos responsables de la inhibición los polifenoles y catequinas en el caso del té verde, a diferencia del aceite de orégano que son los terpenos y el timol principalmente, siendo éstos los que atacan la pared y membrana celular del microorganismo.

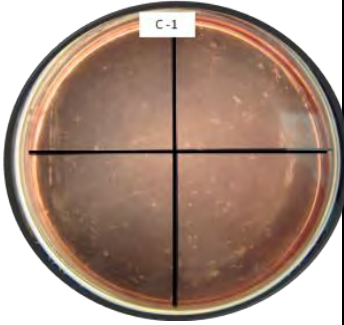
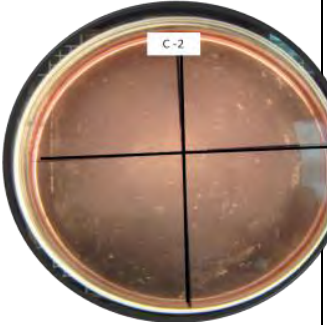
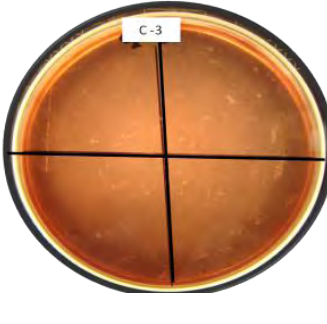
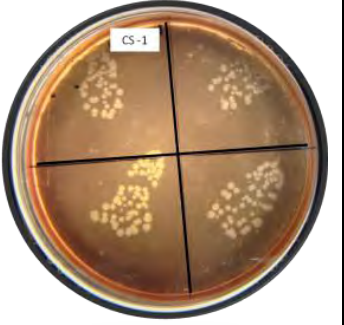
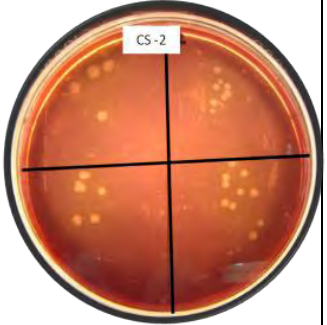
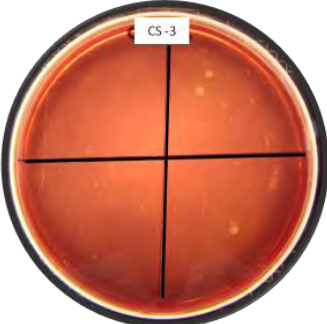
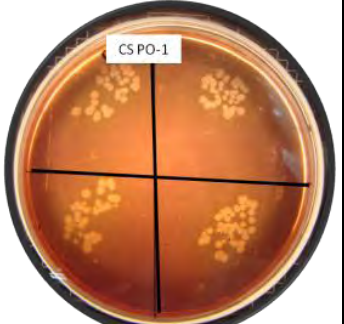
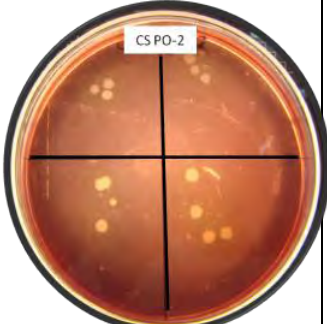

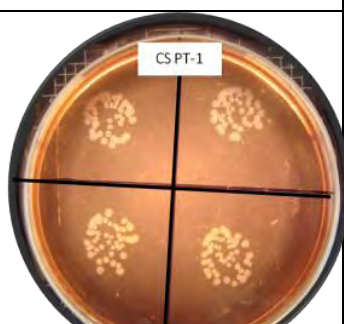
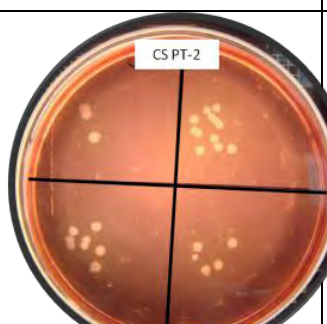
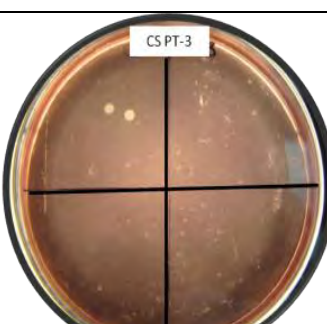
Coma, (2007), propone que para los agentes bioactivos, la bioactividad del recubrimiento, se basa en la difusión de los biocidas, es decir, de los agentes antimicrobianos en la carne, ya que los recubrimientos, permiten una liberación de los compuestos fenólicos, lo cual provoca la inhibición.

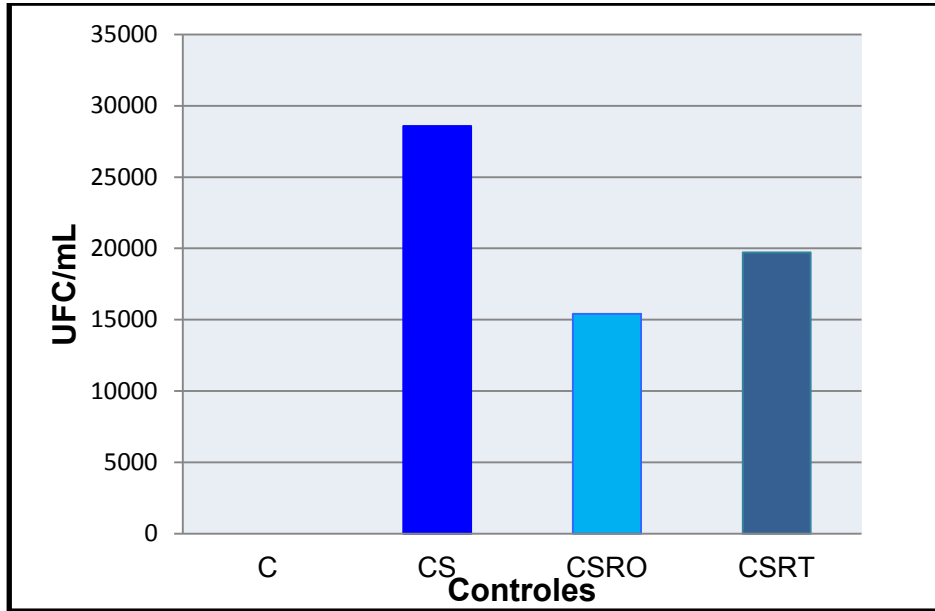
Otro factor importante que interviene en la inhibición del microorganismo en la carne, es la compatibilidad de los diferentes componentes del recubrimiento con los compuestos de la carne, ya que si no existiese, la difusividad del antimicrobiano no existiría o se dificultaría, por lo que proteínas de la carne principalmente las miofibrilares (actina y miosina), que son las proteínas con propiedades funcionales interaccionaron con los componentes principales de la película (agua, aceite esencial y gretina), permitiendo así la difusividad y por lo tanto la inhibición de *Salmonella spp*.

3.5.3 Porcentaje de inhibición

Una vez que se analizó la inhibición de forma cualitativa, se cuantificó y se obtuvo el porcentaje de inhibición (Ver Gráfica 6, Gráfica 7 y Gráfica 8). A continuación se muestra la Tabla 7, en la que se ejemplifica una de las repeticiones de la experimentación con lo que se determinó el porcentaje de inhibición de *Salmonella spp*.

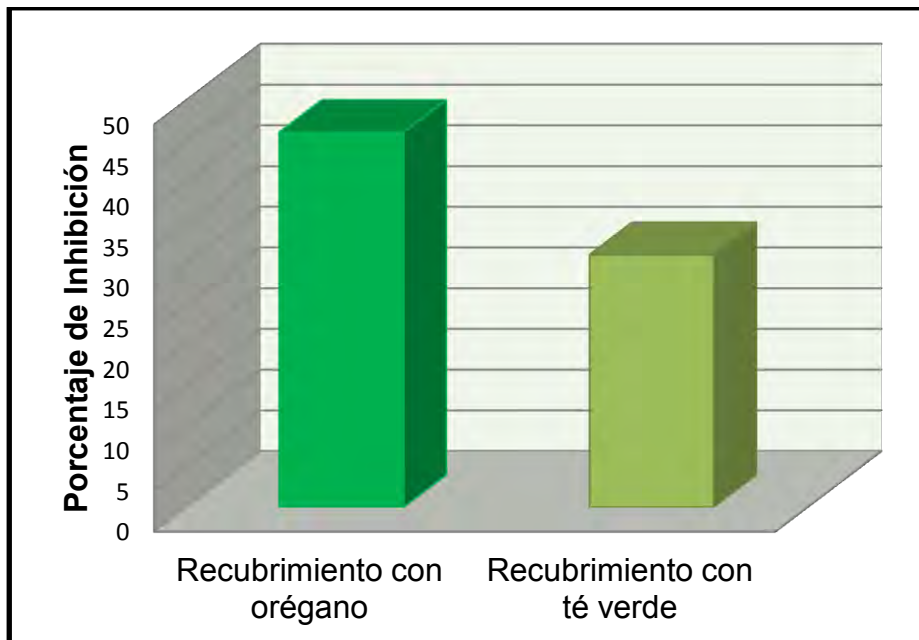
Tabla 7. Muestra una de las repeticiones para determinar el porcentaje de inhibición.

CONTROL	DILUCIÓN		
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
Carne (C)			
Carne + <i>Salmonella</i> spp (CS)			
Carne + <i>Salmonella</i> spp+ recubrimiento de orégano (CSRO)			
Carne + <i>Salmonella</i> spp+ recubrimiento de té verde (CSRT)			

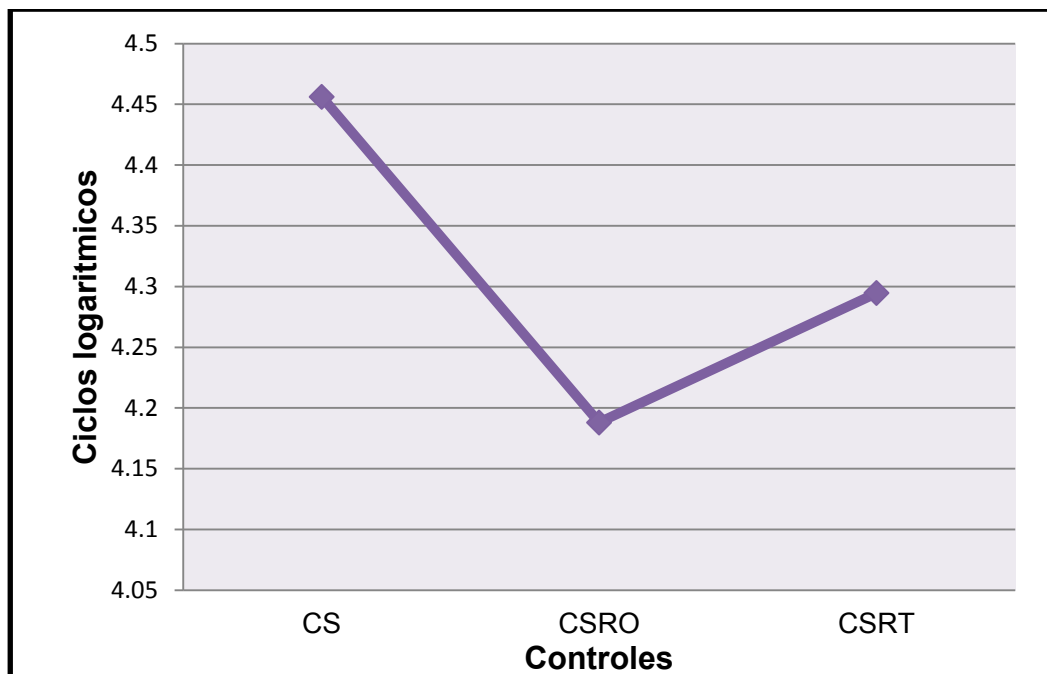


Gráfica 6. Promedio de las Unidades Formadoras de Colonias.

C= carne, CS= carne+ *Salmonella spp*, CSRO= carne+ *Salmonella spp* +Recubrimiento de orégano, CSRT= carne+ *Salmonella spp* + Recubrimiento de té verde.



Gráfica 7. Porcentaje de inhibición de los recubrimientos en UFC ´s.



Gráfica 8. Disminución de ciclos logarítmicos de la bacteria.

CS= carne+ *Salmonella spp*, CSRO= carne+ *Salmonella spp* +Recubrimiento de orégano, CSRT= carne+ *Salmonella spp* + Recubrimiento de té verde

▪ **Análisis:**

La Gráfica 6 muestra el número de bacterias que se inhibieron en la carne al recubrirla con la solución a base de aceite esencial de orégano o de té verde; siendo el promedio de bacterias inhibidas por mililitro de 13166.66 UFC para el recubrimiento de orégano y para el té verde de 8875 UFC/ ml, lo que equivale al 46.06% de inhibición y 31.09% respectivamente (Ver Gráfica 7). Sin embargo al graficar (Ver Gráfica 8) la inhibición de *Salmonella spp* en forma logarítmica, la disminución del microorganismo es mínima, pero cabe resaltar que son ciclos logarítmicos.

El comportamiento bactericida de ambos aceites esenciales, se debe al mecanismo de acción que explica Raybaudi-Massilia (2003), en el que se consideran los diferentes compuestos químicos presentes; su actividad antibacteriana no se le atribuye a un mecanismo en específico, si no a varios mecanismos de acción sobre

la célula del microorganismo, en el que ocurren daños en la pared celular, en la membrana citoplasmática, en las proteínas de las membranas, fugas del contenido de la célula, coagulación del citoplasma y disminución del movimiento de protones (Ver Figura 41).

El autor propone que el mecanismo de acción, no trabaja solo, si no es una cadena de mecanismos de acción, también indica que depende de la concentración de los aceites esenciales, ya que a bajas concentraciones inhibe enzimas relacionadas con la producción de energía del microorganismo, mientras que a concentraciones altas precipita las proteínas de la célula de la bacteria, a demás señala que los efectos antimicrobianos dependen de la hidrofobicidad y de la migración del aceite esencial en el citoplasma de la célula.

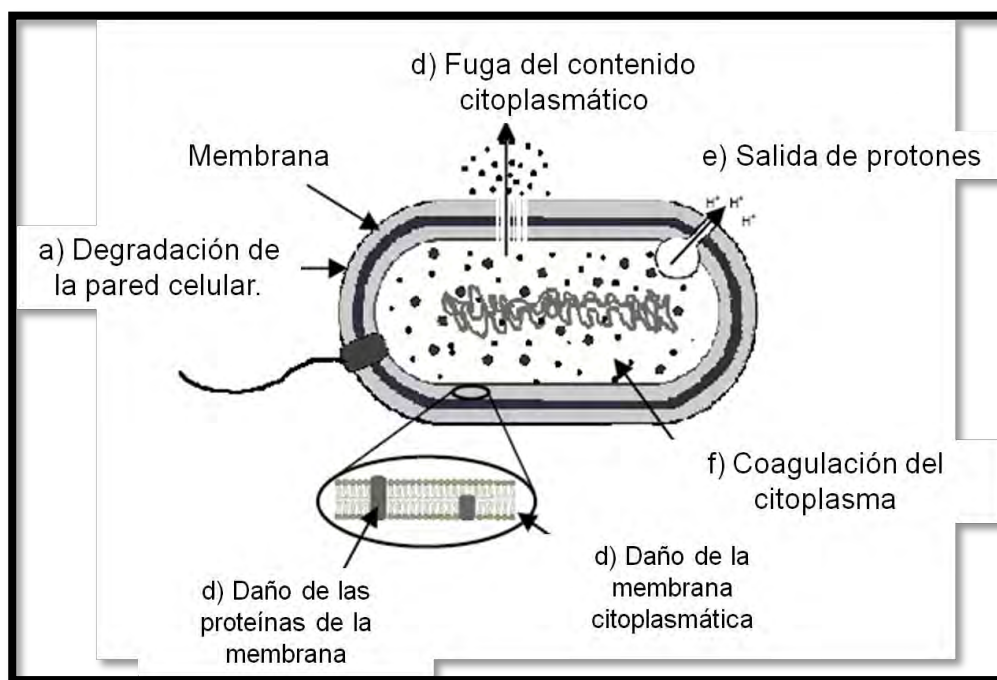


Figura 41. Mecanismo de acción de los aceites esenciales y sus componentes en la célula bacteriana (a-f). La ampliación ilustra el modo de acción en el interior de la membrana (Raybaudi-Massilia, 2003).

Con lo anteriormente dicho se puede decir que, un factor por el cual el recubrimiento con aceite esencial de orégano tiene un mayor porcentaje de inhibición es la concentración, causando un mayor daño en la célula de la *Salmonella spp.*

Otro punto importante a analizar es la interacción que existe entre los polifenoles de los agentes antimicrobianos y las proteínas, en el que, estas interacciones son generalmente un fenómeno reversible, y en el que las principales fuerzas que intervienen son efectos hidrofóbicos reforzados por el establecimiento de algunos enlaces hidrógeno entre grupos fenólicos, dadores de protones, y grupos carbonilo de las proteínas, aceptores; entre menor hidrofílicos sean se podrán difundir más fácilmente a través de las membranas biológicas. La fuerza de la interacción depende tanto de la naturaleza de la proteína como de la de la molécula del polifenol. La existencia de restos carbohidrato en las proteínas puede aumentar la afinidad y especificidad de la interacción (Santos Buelga, 2010). Lo cual nos habla de la probable afinidad entre el recubrimiento de orégano y té verde con las proteínas de la carne, y se puede deducir que el recubrimiento de orégano tiene mayor hidrofobicidad y por lo tanto interacciona con más facilidad que el té verde, observándose esto en la diferencia de los porcentajes de inhibición, así como en los ciclos logarítmicos del recubrimiento con aceite esencial de orégano (Ver Gráfica 8).

CONCLUSIÓN

De los resultados obtenidos y de su interpretación se concluye lo siguiente:

En general los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que el uso de aceites esenciales como agentes antimicrobianos, pueden resultar una buena alternativa para mejorar la inocuidad en carne no procesada y por lo tanto se comprueba la efectividad de los aceites esenciales como antimicrobianos.

En cuanto al desarrollo experimental de la formulación de las películas adicionadas con un aceite esencial, se puede concluir que un factor determinante es el orden de adición de los ingredientes, debido a que facilita las interacciones entre los componentes y así se obtienen sistemas más estables.

Los aceites esenciales de orégano y té verde, así como sus compuestos activos fueron efectivos para inhibir el crecimiento y reducir las poblaciones de *Salmonella ssp.* Observándose dicho efecto desde las emulsiones de ambos aceites esenciales, en las que el orégano presentó un mayor rango de concentraciones inhibitorias, sin embargo una mayor concentración fue necesario para lograr la inhibición, al ser adicionado a la película, no ocurriendo así con las películas de té verde, atribuyéndose esto principalmente a la difusión del aceite esencial en el gel.

El análisis fisicoquímico muestra la estabilidad de las películas, así como algunas de sus propiedades; con lo que se puede concluir que las películas de orégano presentan mayor estabilidad frente a la pérdida de peso, así como menor sensibilidad al cambio de temperatura, en cuanto a los parámetros texturales es la película más flexible, sin embargo cabe mencionar que es menos homogénea en comparación a las películas de té verde, como se pudo observar en las micrografías. Analizando las películas de té verde, éstas presentaron una mayor barrera al agua, menor estabilidad, son más sensibles a la variación de temperatura, mayor dureza y por lo tanto menor flexibilidad, y una mayor homogeneidad en la estructura molecular.

Ambos aceites esenciales (orégano y té verde) al ser incorporados en el recubrimiento comestible a base de gnetina, mostraron un efecto inhibitorio hacia la bacteria patógena, comprobándose esto al realizar el conteo de las unidades formadoras de colonias, y en las que se observó una disminución de 0.27 ciclos logarítmicos con el recubrimiento de orégano y 0.16 con el recubrimiento de té verde, equivalente a 13167.33 UFC/mL y 8875 UFC/mL respectivamente, posiblemente debido a su mayor interacción y difusión en la carne del recubrimiento con orégano como agente antimicrobiano, lo que probablemente causó más alteraciones en la célula del microorganismo provocando así un mayor porcentaje de inhibición.

Finalmente la hipótesis propuesta se acepta, ya que la disminución de *Salmonella spp*, en carne no procesada fue lograda con el uso de recubrimientos comestibles con agentes antimicrobianos de aceite esenciales de té verde y de orégano, que como resultado de la acción bactericida de estas sustancias sobre la membrana de la bacteria provocaron la disminución de la carga microbiana; sin embargo algunas de las características fisicoquímicas de las películas muestran que las películas que utilizan el aceite de orégano, tienen propiedades más estables, por lo que sería el recubrimiento seleccionado, sin embargo cabe mencionar que se deberá mejorar la distribución del aceite esencial en la película.

RECOMENDACIONES

- Las concentraciones mínimas inhibitorias de aceites esenciales de orégano y té verde contra *Salmonella spp*, encontradas en el presente trabajo podrían contribuir a futuros estudios de investigación donde se apliquen tratamientos en otros alimentos y con otras bacterias y/o hongos.
- Se sugieren futuros estudios que consideren la incorporación de otros aceites esenciales (canela, tomillo, ajo, té negro, entre otros) como agentes antimicrobianos, así como también experimentar un sinergismo entre aceites esenciales.
- Debido a las propiedades antioxidantes que ofrecen los aceites esenciales, se puede evaluar dicho efecto en varios alimentos.
- Para analizar el efecto de los recubrimientos antimicrobianos se proponen estudios para determinar la vida de anaquel del alimento con el recubrimiento, así como el cambio en propiedades texturales, organolépticas y sensoriales; también determinar el tiempo de acción de los recubrimientos en el alimento.
- Realizar un estudio a los aceites esenciales, desde su extracción, para poder determinar las interacciones que están llevándose a cabo y determinar con precisión que compuestos están interaccionando con el alimento, así como el que interviene en mayor proporción en la inhibición del microorganismo.
- Con la finalidad de mejorar las propiedades fisicoquímicas de las películas elaboradas en esta investigación se puede reformular usando plastificantes u otra proteína o polisacárido como matriz del recubrimiento.
- El estudio fisicoquímico se puede complementar con un análisis de la emulsión, en el que se puede investigar el tamaño de partícula, estabilidad, a demás de utilizar diversos emulsificantes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Afroditi, S., y Papanikolaou, E. (1996). Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Origanum Essential Oils. *Journal Agricultural Food Chemistry* , 20, 1202-1205.
2. Aguilar Mendez, M. A. (2005). *Propiedades físicas y mecánicas de películas biodegradables y su empleo en el recubrimiento de frutos de aguacate*. Tesis de maestría en Tecnología Avanzada. CICATA-Instituto Politecnico Nacional.
3. Ahvenainen, R. (2003). *Novel Food packaging techniques*. CRS Press. England.
4. Alonso, J. (2007). *Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos*. Corpus. Argentina.
5. Amerling, C. (2000). *Tecnología de la carne*. Universidad Estatal a Distancia. España.
6. Arcila Lozano, C., Loarca Piña, G., y Lecona Uribe, S. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Fitotécnia* , Vol.54, No.1, 100-111.
7. B. Rigo, M., y Gómez Herrera, C. (1988). Química-Física Interfacial de emulsificantes alimentarios. *Instituto de las Grasas y sus Derivados* , (39), 4, 44-51.
8. Brandly, P. J. (1977). *Higiene de la carne*. Continental. México.
9. Bureau, G. (1995). *Embalaje de los alimentos de gran consumo*. Acribia. España.
10. Carballo, B., y López de la Torre, G. (1991). *Manual de Bioquímica y Tecnología de la Carne*. Madrid Vicente. Madrid, España.
11. Caro, M., Torres, M., San Martín, E., y Navarro, L. (2007). Seguridad Microbiológica en carne de pollo. *Alimentaria* , 384, 56-59.

12. Chávez García, R., y Mendoza Martínez, A. M. (2010). Estudio de las propiedades morfológicas y reológicas de una red híbrida de polímeros sintetizada a partir de tres biopolímeros: gelatina, quitosán, dextran. *Revista Iberoamericana de polímeros* , Vol. 11, 88-109.
13. Chiellini, E. (2008). *Environmentally compatible food packaging*. CRC Press. England.
14. Chiou, B.-S., y Avena Bustillos, R. (2009). Effects of drying temperature on barrier and mechanical properties of cold-water fish gelatin films. *Journal of Food Engineering* , 95, 327-331.
15. Chiu, P.-E., y Lai, L.-S. (2010). Antimicrobial activities of tapioca starch/decolorized hsian-tsao leaf gum coatings containing green tea extracts in fruit-based salads, romaine hearts and pork slices. *International Journal of Food Microbiology* , 139, 23-30.
16. Coma, V. (2007). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products, *Meat Science*, 78, 90-103.
17. Cubero, N., y Monferrer, A. (2002). *Aditivos alimentarios*. Mundi-Prensa. España.
18. Fabra, M. J., Talens, P. T., y Chiralt, A. (2009). Influence of calcium on tensile, optical and water vapour permeability properties of sodium caseinate edible films. *Journal of Food Engineering* , 96, 356–364.
19. Fennema, O. R. (1993). *Química de los alimentos*. Acribia. España.
20. Frazier, W. (1993). *Microbiología de los alimentos*. 4° ed. Acribia. España.
21. Garnica Martínez, O. E. (2001). *Permeabilidad al vapor de agua y propiedades mecánicas de películas modificadas de quitosán*. Tesis de licenciatura de Ingeniería en Alimentos. FESC-Universidad Nacional Autónoma de México.

22. Gómez Estaca, J., y Montero, P. (2007). *Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (Sardina pilchardus)*. *Food Chemistry* , 511-520.
23. Gupta, S., Saha, B., y Giri, A. (2002). Comparative antimutagenic and anticlastogenic effects of green tea and black tea: a review. *Reviews in Mutation Research* ,512, 37-65.
24. Hettiarachchy, S., y R. Ziegler, G. (1994). *Protein Functionality in Food Systems*. Marcel Dekker, Inc. U.S.A.
25. Karbowiak, T., y Debeaufort, F. (2005). Wetting properties at the surface of iota-carrageenan-based edible films. *Colloid and Interface Science* , 294, 400-410.
26. Piñeiro Redondo, Y. (2000). *Simulación de Monte Carlo de sistemas complejos de red*. Chile: Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. Disponible en http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UdL/AVAILABLE-0406107181316//Trgmj1de4.pdf.
27. R. Whitaker, J., y R. Tannenbaum, S. (1997). *Food Proteins*. AVI Publishing Company Inc. U.S.A.
28. Ramos García, M., Bautista Baños, S., y Barrera Necha, L. (2009,). *Compuestos Antimicrobianos Adicionados en Recubrimientos Comestibles para Uso en Productos Hortofrutícolas*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, Vol.28,44-57.
29. Ranken, M. (2000). *Manual de industrias de la carne*. AMV. Madrid, España:.
30. Rao, M., Kanatt, S., Chawla, S., y Sharma, A. (2010). Chitosan and guar gum composite films:Preparation,physical,mechanical and antimicrobial properties. *Carbohydrate Polimers* 85, 1-5.
31. Raybaudi-Massilia, R. M. (2003). *Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas frescas y cortadas*. *Desarrollo de tecnologías para la conservación de vegetales frescos cortados* , 01, 15-21.

32. Rojas Grau, M. A., Soledad Tapia, M., y Martín Beloso, O. (2007). Empleo de recubrimientos comestibles en frutas frescas cortadas: Nuevo enfoque de conservación y desarrollo de productos. *Alimentaria*, 381, 105-115.
33. Ronquillo, E. (2007). *Evaluación del potencial antimicrobiano de películas comestibles de aceites esenciales in vitro e in situ*. México: Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana.
34. Santos Buelga, C. (2010). Implicaciones en la salud de los polifenoles en la dieta. *Alimentación, Nutrición y Dietética*, 1, 20-26. Disponible en http://www.nutricion.org/publicaciones/revista_marzo_02/VCongreso_publicaciones/Conferencias/Santos.pdf
35. Sazedul Hoque, M., y Benjakul, S. (2010). Effects of partial hydrolysis and plasticizer content on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. *Food Hydrocolloids*, 25, 82-90.
36. Senji, S., y Makoto, T. (2000). Antimicrobial Effects of Green Tea Polyphenols on Thermophilic Spore-Forming Bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol 90, 1, 81-85.
37. Tawil Bouchez, M. E. (2003). *Efecto de cubiertas de quitosano con características hidrofóbicas en la vida de anaquel de zanahorias mínimamente procesadas*. Tesis de licenciatura de Ingeniería en Alimentos. Universidad de las Américas. Disponible en http://www.tdr.cesca.es/TDX/TDX_UdL/TESIS/AVAILABLE/TDX020310815433//Trmrm1de1.pdf
38. Tillán Capo, J., Bueno Pavón, V., y Ménéndez Castillo, R. (2008). Toxicología subcrónica del extracto acuoso de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, (3), 1, 10-15.

ANEXOS

▪ **Anexo 1**

Se presentan los datos obtenidos de los conteos de *Salmonella spp*, en los diferentes controles llevados a cabo durante la experimentación, para obtener el porcentaje de inhibición.

Tabla 8. Conteo de UFC's en carne (C).

C	gota 1	gota 2	gota 3	gota 4
Diución 10⁻¹	0	0	0	0
	0	0	0	0
	0	0	0	0
Diución 10⁻²	0	0	0	0
	0	0	0	0
	0	0	0	0
Diución 10⁻³	0	0	0	0
	0	0	0	0
	0	0	0	0

Tabla 9. Conteo de UFC's en carne con 20µ L de *Salmonella spp* (CS).

CS	gota 1	gota 2	gota 3	gota 4	Promedio	Promedio Total	DS	CV
Diución 10⁻¹	55	50	42	64	52.75	57.16	5.10	0.089
	68	62	60	61	62.75			
	51	62	60	51	56			
Diución 10⁻²	6	5	8	5	6	6.33	1.52	0.24
	6	8	10	8	8			
	6	5	2	7	5			
Diución 10⁻³	1	0	0	3	1	0.66	0.38	0.57
	0	2	1	0	0.75			
	0	1	0	0	0.25			

Tabla 10. Conteo de UFC's en carne con 20µ L de *Salmonella spp* y 100 µ L de recubrimiento con aceite esencial de orégano (CSRO).

CSRO	gota 1	gota 2	gota 3	gota 4	Promedio	Promedio Total	DS	CV
Diución 10 ⁻¹	37	27	32	22	29.5	30.83	3.92	0.12
	31	38	38	34	35.25			
	35	25	27	24	27.75			
Diución 10 ⁻²	4	5	2	6	4.25	4.25	0.75	0.17
	3	3	4	4	3.5			
	6	5	2	7	5			
Diución 10 ⁻³	1	1	0	0	0.5	0.41	0.14	0.34
	0	1	0	1	0.5			
	0	1	0	0	0.25			

Tabla 11. Conteo de UFC's en carne con 20µ L de *Salmonella spp* y 100 µ L de recubrimiento con aceite esencial de té verde (CSRT).

CSRT	gota 1	gota 2	gota 3	gota 4	Promedio	Promedio Total	DS	CV
Diución 10 ⁻¹	50	49	41	47	46.75	39.41	6.39	0.16
	39	32	33	42	36.5			
	34	43	31	32	35			
Diución 10 ⁻²	3	12	5	8	7	5.41	1.42	0.26
	5	5	2	5	4.25			
	4	5	6	5	5			
Diución 10 ⁻³	2	0	0	0	0.5	0.58	0.14	0.24
	1	2	0	0	0.75			
	2	0	0	0	0.5			