



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Extracción de aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) y desarrollo de películas comestibles antimicrobianas para control de *Listeria monocytogenes*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A

JARAMILLO SUÁREZ MELISSA SARAHÍ

ASESORAS:

IQ. GUADALUPE FRANCO RODRÍGUEZ.

QFB. BRÍGIDA DEL CARMEN CAMACHO ENRÍQUEZ.

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

U. N. A. 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 Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Extracción de aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) y desarrollo de películas comestibles antimicrobianas para control de *Listeria Monocytogenes*

Que presenta la pasante: Melissa Sarahí Jaramillo Suárez
Con número de cuenta: 408070351 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 Izcalli, Méx. a 27 de septiembre de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	IQ. Guadalupe Franco Rodríguez	
VOCAL	M. en C. María Guadalupe Amaya León	
SECRETARIO	IA. Ana María Sabina de la Cruz Javier	
1er. SUPLENTE	IQ. Guillermo Martínez Morua	
2do. SUPLENTE	Dr. Omar Reyes Martínez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

DEDICATORIAS

Con cariño, admiración y respeto, dedico la culminación de ésta tesis, a las personas más importantes de mi vida.

- **A mi mamá:** Por el inmenso amor que me demuestras día con día, eres mi fortaleza y orgullo, agradezco tu compañía en los momentos más importantes de mi vida, por tu apoyo incondicional, por la paciencia, cuidado y tiempo que has dedicado en hacer de mi una persona íntegra, por los sabios consejos que me has brindado, por las palabras y abrazos reconfortantes en los tiempos difíciles, por enseñarme que los deseos se convierten en realidad mediante esfuerzo, perseverancia y dedicación, hemos tenido grandes logros caminando juntas y este trabajo es el símbolo de nuestro éxito, sin tu ayuda no lo hubiera logrado, mami gracias por tener siempre la confianza en mi.
- **A mi hermano:** Por que eres un ejemplo para mi, de ti he aprendido diferentes actitudes ante cada situación, me impresiona la forma en que vez la vida, gracias por escucharme y ofrecerme tu apoyo cuando he perdido la esperanza, por tu tolerancia a mi carácter, por ser mi amigo, mi cómplice y mi compañero, hiciste de mi infancia la mejor etapa de mi vida, soy afortunada por tenerte a mi lado y hacerme sonreír en todo momento, te quiero hermanito.
- **A mi papá:** Te agradezco la compañía y apoyo que me has brindado durante este proceso, por el esfuerzo realizado para el término de mis estudios, ha sido un trayecto largo y complicado, tus enseñanzas son una gran lección para mi, este logro también es tuyo.
- **A mi abuelita:** Mantengo presente su recuerdo, sigo recibiendo sus bendiciones, se que estaría orgullosa de éste logro, el triunfo es de las tres, estoy segura que desde el cielo lo celebra junto a mi, la extraño mucho.

A ustedes por siempre mi corazón y profundo agradecimiento
Melissa

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me apoyaron en el desarrollo de éste trabajo.

- **A Dios:** Por guiarme y permitirme concluir mi formación universitaria de manera satisfactoria, gracias por elegir a personas valiosas para que me acompañaran en este camino.
- **A la UNAM:** Por la oportunidad de recibir la mejor educación en las instalaciones de la FES-C, por las grandes experiencias que viví en cada espacio de la Facultad y sembrar con orgullo el espíritu universitario.
- **A mi asesora Guadalupe Franco Rodríguez:** Por el apoyo brindado durante mi estancia en el laboratorio de Físicoquímica, por enseñarme que un no, es una oportunidad nunca una limitante, por el conocimiento que compartió conmigo, por su paciencia y tiempo que me ha dedicado, gracias por acompañarme y guiarme hasta el término del proyecto.
- **A mi asesora Brígida del Carmen Camacho Enríquez:** Por la confianza en mi proyecto, por el espacio que me brindó en el laboratorio de Productos Naturales y Farmacognosia, por cada vivencia de la que fui participe junto con su equipo, por cada consejo que me ha dado, me llevo una gran experiencia de haber convivido con una gran profesionista como usted, es una excelente persona, gracias su tiempo dedicado en asesorarme y apoyarme a concluir éste trabajo.
- **A los profesores:** Por compartir su conocimiento, experiencias y por ayudar a mi formación académica, principalmente agradezco a los profesores: Mario Arturo Morales Delgado, Clara Inés Álvarez Marique, Manuel Paz, Eduardo Arias y Francisco Javier López Martínez, por su valiosa tutoría durante el desarrollo de mi tesis.
- **A la Universidad Iberoamericana:** Por las facilidades que me brindó al experimentar en sus instalaciones.
- **Al herbario de FES-I:** Gracias a las responsables del herbario M. en C. Ma. Edith López Villafranco y Biól. María del Carmen Aguilar Orduña, por su accesibilidad, tiempo y colaboración brindada para el desarrollo de mi proyecto.

- **A mis sinodales:** Por el tiempo invertido en la revisión de mi tesis, gracias por sus comentarios, observaciones, sugerencias y minuciosa atención para mejorar mi trabajo.
- **A mis amigos:** Rosa Martínez y Maricela de la Cruz por cada experiencia compartida, por el apoyo que me han brindado, por animarme en situaciones complicadas, por cada emoción vivida; Juan Guerrero por acompañarme en cada momento, por cada palabra de aliento, por estar presente siempre; Raúl Ríos por tu grata compañía y afecto durante todo este tiempo; Guillermo Vargas y Arturo Matencio por su valioso apoyo y las atenciones que han tenido conmigo; a todos ustedes les agradezco el brindarme su confianza, cariño y amistad incondicional, los quiero mucho.
- **Al equipo de Productos Naturales y Farmacognosia:** Alejandra Sánchez, Isboset Núñez, Miguel Ángel Trejo, Lidia Martínez, Ana Luisa Silva, Janinne Pérez, Imelda Jaramillo, Sandra Cortes, porque hicieron amena mi estancia, por la cálida compañía que caracteriza a su equipo de trabajo, gracias.

“Por mi raza, hablará el espíritu”
(José Vasconcelos)

INDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN I

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO 2

1.1 ACEITES ESENCIALES 2

 1.1.1 Definición 2

 1.1.2 Generalidades 2

 1.1.3 Localización 2

 1.1.4 Composición química 3

 1.1.4.1 Terpenos 3

 1.1.4.2 Compuestos aromáticos 3

 1.1.5 Métodos de obtención 3

 1.1.5.1 Por arrastre de vapor de agua 3

 1.1.5.1.1 Inyección de vapor de agua 3

 1.1.5.1.2 Hidrodestilación 4

 1.1.5.2 Enflorado (enfleurage) 4

 1.1.5.3 Extracción con gases licuados 5

 1.1.5.4 Otros procedimientos 5

 1.1.6 Ensayos de calidad 5

1.2 ORÉGANO MEXICANO 5

 1.2.1 Nombre científico 6

 1.2.2 Sinonimia popular 6

 1.2.3 Descripción Botánica 6

 1.2.4 Taxonomía 7

 1.2.5 Distribución geográfica 8

 1.2.6 Hábitat 8

 1.2.7 Comercialización 8

 1.2.8 Usos 9

 1.2.8.1 Comestible 9

 1.2.8.2 Medicinal 9

 1.2.8.3 Cosmético 9

 1.2.8.4 Industrial 10

 1.2.9 Compuestos con actividad antimicrobiana en orégano 10

 1.2.9.1 Carvacrol 11

 1.2.9.2 Timol 11

1.3 EMULSIONES 12

 1.3.1 Definición 12

 1.3.2 Partes que constituyen una emulsión 12

 1.3.3 Mecanismos de inestabilidad 13

 1.3.4 Agente emulsificante 14

 1.3.5. Agente estabilizante 14

 1.3.6 Factores principales que afectan la estabilidad de emulsiones aceite - agua 14

1.4 PELÍCULAS Y RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES 15

 1.4.1 Definición 15

 1.4.2 Características 15

1.4.3 Función	16
1.4.4 Composición	16
1.4.4.1 Hidrocoloides	16
1.4.4.1.1 Polisacáridos	17
1.4.4.1.2 Proteínas.....	17
1.4.4.2 Lípidos.....	17
1.4.4.3 Compuestos	17
1.4.4.3.1 Laminados	18
1.4.4.3.2 Emulsiones	18
1.4.5 Aditivos	18
1.4.5.1 Tecnológicos	18
1.4.5.1.1 Plastificante	18
1.4.5.1.2 Surfactantes o tensoactivo.....	19
1.4.5.2 Funcionales	19
1.4.5.2.1 Acidificantes y Antioxidantes.....	19
1.4.5.2.2 Antimicrobianos.....	19
1.4.6 Métodos para formación y aplicación de películas comestibles	19
1.4.6.1 Inmersión.....	20
1.4.6.2 Spray	20
1.4.6.3 Casting.....	20
1.4.7 Películas antimicrobianas	20
1.4.8 Componentes empleados para elaboración de la película comestible antimicrobiana. ...	21
1.4.8.1 Polisacárido (Alginato de sodio).....	21
1.4.8.2 Proteína (WPC)	22
1.4.8.3 Antimicrobiano (Aceite esencial de orégano).....	22
1.4.8.4 Surfactante (Tween 80).....	22
1.4.8.5 Plastificantes (Glicerol y Sorbitol)	23
1.5 <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	23
1.5.1 Especies de <i>Listeria monocytogenes</i>	24
1.5.2 Características	24
1.5.3 Epidemiología.....	25
1.5.4 Sintomatología	25
1.5.5 Aspectos Clínicos	25
1.5.6 Tratamiento.....	25
1.5.7 Profilaxis.....	26
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	28
2.1 OBJETIVO PARTICULAR 1.	29
2.1.1 Obtención de material vegetal empleado para extracción de aceite esencial (Orégano seco).	29
2.1.2 Identificación botánica de la especie de orégano empleado.....	29
2.1.3 Control de calidad de la materia vegetal.	29
2.1.3.1 Determinación de materia extraña.....	29
2.1.3.2 Determinación de humedad.....	30
2.1.4 Extracción del aceite esencial de orégano (<i>Lippia graveolens</i> Kunth).	30
2.1.5 Tratamiento para el aceite esencial	31

2.1.5.1 Decantación	31
2.1.5.2 Envasado y almacenado	32
2.1.6 Control de calidad del aceite esencial	32
2.1.6.1 Pruebas Físicas	32
2.1.6.1.1 Índice de refracción	32
2.1.6.1.2 Densidad	33
2.1.6.2 Prueba espectroscópica	34
2.1.6.2.1 IR	34
2.1.6.3 Prueba organoléptica	35
2.2 OBJETIVO PARTICULAR 2	35
2.2.1 Elaboración de bastidores para preformado de películas	36
2.2.2 Desarrollo de emulsiones y elaboración de la película comestible	36
2.2.3 Evaluación de la estabilidad de la emulsión	38
2.2.4 Elaboración y selección de película comestible	39
2.2.5 Medición de espesor de la película comestible	39
2.3 OBJETIVO PARTICULAR 3	39
2.3.1 Propiedades de barrera	39
2.3.1.1 Permeabilidad al oxígeno	39
2.3.1.2 Permeabilidad al vapor de agua	41
2.3.1.3 Ángulo de contacto	43
2.3.2 Propiedades mecánicas	44
2.3.2.1 Textura	44
2.3.3 Propiedades térmicas	45
2.3.3.1 DSC (Diferential Scanning Calorimetry)	45
2.3.4 Propiedades ópticas	47
2.3.4.1 Colorimetría	47
2.3.4.2 Microscopía	49
2.4 OBJETIVO PARTICULAR 4	50
2.4.1 Esterilizar el material a utilizar	50
2.4.2 Preparar medio de cultivo en caja petri	50
2.4.3 Determinación de la concentración de <i>Listeria monocytogenes</i> para realizar pruebas <i>in vitro</i>	51
2.4.3.1 Preparación del inóculo	51
2.4.3.2 Inoculación de las placas	52
2.4.3.3 Incubación	52
2.4.4 Analizar el efecto antimicrobiano	52
2.4.4.1 Prueba <i>in vitro</i> (sensibilidad antimicrobiana)	52
2.4.4.1.1 Inoculación de las placas	52
2.4.4.1.2 Aplicación de la película	52
2.4.4.1.3 Incubación	53
2.4.4.1.4 Sensibilidad antimicrobiana	53
2.4.2.1.5 Lectura de las placas	53
2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	54
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
3.1 RESULTADOS OBJETIVO PARTICULAR 1	57

3.1.1 Obtención de material vegetal empleado para la extracción de aceite esencial (Orégano seco)	57
3.1.2 Identificación botánica de la especie de orégano empleado.....	57
3.1.3 Descripción del material vegetal.....	58
3.1.4 Control de calidad de materia prima (Hojas de orégano seco).....	58
3.1.4.1 Determinación de materia extraña.....	58
3.1.4.2 Determinación de la humedad en hojas de orégano seco.....	59
3.1.5 Extracción del aceite esencial de orégano (<i>Lippia graveolens</i> Kunth).....	60
3.1.6 Parámetros de calidad del aceite esencial.....	61
3.1.6.1 Físicos.....	61
3.1.6.1.1 Índice de refracción	61
3.1.6.1.2 Densidad.....	63
3.1.6.2 Espectrofotométricas.....	64
3.1.6.2.1 IR.....	64
3.1.6.3 Organolépticos.....	66
3.2 RESULTADOS OBJETIVO PARTICULAR 2.....	67
3.2.1 Evaluación de la estabilidad de la emulsión.....	67
3.2.2 Selección de la película comestible.....	68
3.2.3 Medición de espesor de la película comestible seleccionada.....	69
3.3 RESULTADOS OBJETIVO PARTICULAR 3.....	70
3.3.1 Propiedades de barrera.....	70
3.3.1.1 Permeabilidad al oxígeno.....	70
3.3.1.2 Permeabilidad al vapor de agua	71
3.3.1.3 Ángulo de contacto.....	73
3.3.2 Propiedad mecánica.....	75
3.3.2.1 Textura.....	75
3.3.3 Propiedades térmicas.....	76
3.3.3.1 DSC (Diferential Scanning Calorimetry)	76
3.3.4 Propiedades ópticas.....	79
3.3.4.1 Colorimetría.....	79
3.3.4.2 Microscopía.....	80
3.4 RESULTADOS OBJETIVO PARTICULAR 4.....	82
3.4.1 Determinación de la concentración de <i>Listeria monocytogenes</i> para realizar pruebas <i>in vitro</i>	82
3.4.2 Analizar el efecto antimicrobiano.....	83
3.4.2.1 Prueba <i>in vitro</i> (sensibilidad antimicrobiana).....	83
CONCLUSIONES.....	86
PROSPECTIVAS.....	89
BIBLIOGRAFÍA	91
ANEXOS	100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades de los aceites esenciales. 2

Tabla 2. Determinaciones realizadas en aceites esenciales. 5

Tabla 3. Clasificación taxonómica del orégano mexicano. 7

Tabla 4. Componentes de aceite esencial de orégano que presentan propiedades antimicrobianas. 10

Tabla 5. Estructuras de componentes antimicrobianos presentes en el orégano. 11

Tabla 6. Características de la película apropiada en base a su aplicación. 16

Tabla 7. Datos generales del glicerol y sorbitol. 23

Tabla 8. Puntas empleadas en el espectrómetro IR. 34

Tabla 9. Formulación de la película comestible antimicrobiana. 36

Tabla 10. Ecuaciones para determinación de parámetros del color Sistema CIELCH. 48

Tabla 11. Escalas para el análisis de parámetros de color. 48

Tabla 12. Ecuaciones para tratamiento estadístico. 54

Tabla 13. Resumen de las determinaciones realizadas. 55

Tabla 14. Identificación taxonómica del material biológico empleado. 57

Tabla 15. Materia extraña en cada lote de orégano adquirido. 58

Tabla 16. Porcentaje comparativo de humedad en lotes de orégano adquiridos. 59

Tabla 17. Comparativo de promedios obtenidos de Índice de refracción ($20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). 62

Tabla 18. Comparativo de promedios obtenidos de densidad (g/mL , $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). 63

Tabla 19. Frecuencias identificadas en espectrofotometría IR. 65

Tabla 20. Atributos sensoriales del aceite esencial de orégano. 66

Tabla 21. Comparativo del parámetro de color en AEO. 67

Tabla 22. Porcentaje de separación de fases en la emulsión. 67

Tabla 23. Espesor de la película determinado en diferentes secciones de la PCA. 70

Tabla 24. Resultados de permeabilidad al vapor de agua de películas comestibles antimicrobianas. 72

Tabla 25. Ángulo de contacto evaluado en diferentes zonas de PCA. 74

Tabla 26. Comparativo fuerza de ruptura y % de elongación de PCA. 75

Tabla 27. Comparativo de parámetros obtenidos en DSC. 78

Tabla 28. Parámetros de color de la película comestible. 80

Tabla 29. Comparativo de micrografías de la PCA. 81

Tabla 30. Diámetros de las gotas de aceite encontradas en la estructura de la película. . 81

Tabla 31. Comparativo de actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano. 83

Tabla 32. Comparativo de zonas de inhibición en las películas comestibles con aceite esencial de orégano. 84

Tabla 33. Valores para calcular la permeabilidad al oxígeno de las películas comestibles. 105

Tabla 34. Valores para calcular la permeabilidad al vapor de agua de las películas comestibles. 105

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Dispositivo de hidrodestilación con trampa colectora para aceite esencial. 4

Figura 2. Orégano mexicano, *Lippia graveolens* Kunth..... 7

Figura 3. Distribución geográfica del orégano (*Lippia* spp.)..... 8

Figura 4. Mecanismos físicos de inestabilidad de una emulsión..... 13

Figura 5. Estructura molecular del alginato de sodio..... 21

Figura 6. *Listeria monocytogenes*..... 24

Figura 7. Cuadro metodológico..... 28

Figura 8. Termobalanza digital OHAUS MB-45. 30

Figura 9. Sistemas de hidrodestilación para obtención de aceite esencial. 30

Figura 10. Montaje de un sistema de hidrodestilación. 31

Figura 11. Decantación del aceite esencial. 32

Figura 12. Refractómetro ABBE, Modelo 315RS Digital. 33

Figura 13. Espectro IR, Modelo Nicolet iS10 FT..... 34

Figura 14. Acomodo de las muestras para la evaluación sensorial. 35

Figura 15. Bastidor elaborado para el preformado de películas comestibles..... 36

Figura 16. Representación de cada formulación realizada. 37

Figura 17. Dimensiones de la película elaborada. 37

Figura 18. Centrífuga clínica Modelo IEC..... 38

Figura 19. (A) Puntos seleccionados en la película para medir el espesor, (B) Micrómetro Mitutoyo Digital Systems..... 39

Figura 20. Esquema del dispositivo para medir Permeabilidad al Oxígeno. 40

Figura 21. Celda de transporte de gas para la medición de permeabilidad al oxígeno..... 40

Figura 22. (A) Esquema de ensamble y dimensiones de la celda utilizada, (B) Ensamble completo de la celda para medir permeabilidad al vapor de agua. 41

Figura 23. Cabina empleada para determinación de PVA..... 42

Figura 24. (A) Equipo TANTEC Contact Angle Meter, (B) Tensiones interfaciales en equilibrio..... 44

Figura 25. (A) Corte de películas para determinar ángulo de contacto, (B) Zonas establecidas para medición de ángulo de contacto. 44

Figura 26. Texturómetro TA XT Plus, Texture Analyser..... 45

Figura 27. Calorímetro TA- INSTRUMENTS..... 45

Figura 28. (A) Sección interna del calorímetro, (B) Representación de la ubicación de la cápsula en la sección interna. 46

Figura 29. Esquema del principio de la técnica DSC..... 46

Figura 30. Representación gráfica de un análisis DSC..... 47

Figura 31. Colorímetro Minolta CR 400. 47

Figura 32. Espacio de color del Sistema CIELCH. 48

Figura 33. Microscopio ZEIGEN con cámara MOTICAM 1000 (1.3 MP Live Resolution).. 49

Figura 34. (A) Dimensiones de la película comestible, (B) Zonas evaluadas para prueba de Microscopía. 49

Figura 35. (A) Cubo de papel empleado para esterilización, (B) Tubos de ensaye e hisopos esterilizados.....	50
Figura 36. Medio de cultivo agar Casoy.....	51
Figura 37. División del medio de cultivo y ubicación de las películas comestibles.....	53
Figura 38. Ejemplar integrado a la colección botánica.....	57
Figura 39. Vista macroscópica de la especie <i>Lippia graveolens</i> Kunth, (A) Haz de la hoja, (B) Envés de la hoja, (C) Inflorescencia.....	58
Figura 40. Rendimiento de aceite esencial de orégano obtenido en cada destilación.....	60
Figura 41. Comparativo de aceites esenciales, (A) Extraído, (B) Almacenado.....	63
Figura 42. Espectro IR de aceite esencial de orégano.....	64
Figura 43. Regiones del espectro IR.....	65
Figura 44. Película comestible antimicrobiana seleccionada.....	69
Figura 45. Termograma de la película comestible antimicrobiana.....	77
Figura 46. Termograma comparativo de PCA sin WPC (PS) y PCA con WPC (PA).	78
Figura 47. Diagrama de proceso para extracción de aceite esencial de orégano.....	100
Figura 48. Prueba de evaluación sensorial de aceite de orégano.....	101
Figura 49. Diagrama de proceso para elaboración de películas comestibles.....	102
Figura 50. Certificado de identificación taxonómica de orégano.....	103
Figura 51. Espectro infrarrojo de Carvacrol.....	104
Figura 52. Espectro infrarrojo de Timol.....	104
Figura 53. Termograma de la película comestible antimicrobiana.....	105
Figura 54. Termograma del concentrado de proteína.....	106
Figura 55. Termograma del aceite esencial de orégano.....	106

ABREVIATURAS

A	Área
AE	Aceite Esencial
AEO	Aceite Esencial de Orégano
ar	Aromático
as	Asimétrico
atm	Atmósfera
°C	Celsius
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros cuadrados
cm ³	Centímetros cúbicos
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
comb	Combinación
Cp	Capacidad calorífica
cte	Constante
d	Espesor (PVA)
D	Difusividad
DSC	Differential Scanning Calorimetry
g	Gramos
h	Horas
J	Joule (DSC)
<i>J</i>	Pendiente (PVA)
K	Kelvin
<i>L</i>	Espesor (PO ₂ , PVA)
L	Litro

lbs	Libras
m	Masa (PO_2)
m	Metro
m^2	Metros cuadrados
M	Muestra
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mta	Muestra
N	Newton
ip	En el plano de vibración
IR	Infrarrojo
P	Peso de la muestra
Pa	Pascal
PA	Película Antimicrobiana
PC	Película Comestible
PCA	Película Comestible Antimicrobiana
PO_2	Permeabilidad al oxígeno
PS	Película sin WPC
P_t	Presión total
PVA	Permeabilidad al vapor de agua
Pw_1	Presión parcial (interna)
Pw_2	Presión parcial (externa)
oop	Fuera del plano de vibración

R	Constante universal de los gases
RC	Recubrimiento comestible
rpm	Revoluciones Por Minuto
sy	Simétrico
st	Vibración de estiramiento
t	Tiempo
T	Temperatura
TSA	Trypticase de Soya Agar
$\tilde{\nu}$	Número de onda
vel	Velocidad
VTVA	Velocidad de Transmisión de Vapor de Agua
WPC	Whey Protein Concentrate

LETRAS GRIEGAS

γ	Vibración del esqueleto
δ	Densidad relativa
δ'	Vibración de deformación (IR)
ΔH	Diferencia de entalpía
ΔP	Diferencia de presión
η_D	Índice de refracción
μl	Micro litros
μm	Micrómetros
ρ	Densidad del alimento

INTRODUCCIÓN

En la actualidad los consumidores demandan alimentos naturales y procesados de apariencia natural y con un valor nutricional semejante al de los productos frescos, sin aditivos químicos, microbiológicamente seguros y de una elevada calidad y que, al mismo tiempo, estén listos para su consumo de forma inmediata.

Enfocado a lo anterior, la aplicación más innovadora para satisfacer esta necesidad es la elaboración de películas comestibles; son matrices de origen natural, comestibles, biodegradables, protegen al alimento de acciones físicas, químicas, microbiológicas y bioquímicas, capaces de aumentar la seguridad, vida comercial y calidad de los alimentos.

Por este motivo, en los últimos años se han llevado a cabo numerosos trabajos acerca del desarrollo y utilización de películas o recubrimientos comestibles para mejorar la conservación y calidad de diversos alimentos frescos, transformados o congelados.

Supone un importante desafío elaborar películas comestibles que cubran una gran parte de los grupos de alimentos, se tiene un sinfín de posibilidades ya que existe una gran variedad de materiales naturales que pueden ser utilizadas potencialmente en la formulación de películas.

Las películas antimicrobianas son una forma prometedora de envasado activo, el empleo de partículas que contienen agentes antimicrobianos podría ser más eficiente, por la migración lenta de los agentes de material de envasado a la superficie del producto.

Esto ayuda a mantenerse a altas concentraciones donde son necesarios. Si un antimicrobiano puede ser liberado del envasado durante un largo periodo, la actividad también puede ser ampliada en el transporte y es prolongada la fase de almacenaje de distribución de alimentos.

La efectividad de este tipo de películas reside en el control de la migración de sus agentes activos hacia la superficie de los productos sobre los que se disponen.

Además de extender la vida de anaquel de una gran variedad de alimentos, debido a que inhiben o limitan el crecimiento microbiano en la superficie, al mismo tiempo ayudan a preservar las propiedades sensoriales y nutricionales de los mismos.

Los antecedentes mencionados, motivan al grupo de investigación del Taller de Físicoquímica de Alimentos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán a desarrollar el proyecto: “Extracción de aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) y desarrollo de películas comestibles antimicrobianas para control de *Listeria monocytogenes*”.

El objetivo de este trabajo es desarrollar una película antimicrobiana para controlar el desarrollo de *Listeria monocytogenes*, iniciando desde la extracción del aceite esencial de orégano por medio de la técnica de hidrodestilación mismo que fue empleado como agente antimicrobiano natural, como matriz estructural se decidió emplear una mezcla de un polisacárido y una proteína para mejorar las propiedades de barrera, la mezcla de plastificantes empleada mejoró las propiedades texturales de la película finalmente se empleó un tensoactivo para mejorar la estabilidad de la emulsión elaborada para el desarrollo de las películas.



CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1 ACEITES ESENCIALES

1.1.1 Definición

Los aceites esenciales son productos volátiles de naturaleza compleja, elaborados por ciertos vegetales a los que le confieren un aroma agradable. Se denominan así a los productos que se pueden obtener por arrastre con corriente de vapor de agua o por expresión del pericarpio de ciertos frutos (Kuklinski, 2000).

Bajo la denominación de aceites esenciales se agrupan las sustancias volátiles obtenidas mediante procesos químicos y físicos a partir de especies vegetales aromáticas, caracterizados por una composición compleja en la que predominan derivados terpénicos (mono- y sesquiterpenos) y fenilproánicos (Villar del Fresno, 1999).

En la actualidad los aceites esenciales tienen una gran variedad de aplicaciones, las industrias que los emplean son la industria alimentaria, la farmacéutica, la industria en cosméticos, son utilizados en desodorantes industriales, en insecticidas, entre otras.

1.1.2 Generalidades

Las principales características de los aceites esenciales se esquematizan en la Tabla 1.

Tabla 1. Propiedades de los aceites esenciales.

PROPIEDADES GENERALES DE LOS ACEITES ESENCIALES	
Líquidos a temperatura ambiente	Lipófilos
Volátiles	Solubles en disolventes orgánicos apolares
Incoloros o amarillentos (manzanilla: azul)	Solubles en alcoholes de alta graduación
Menos densos que el agua (canela y clavo: más densos que el agua)	Índice de refracción elevado
Insolubles en agua	Poder rotatorio (quirales)

FUENTE: (Kuklinski, 2000).

1.1.3 Localización

Los aceites esenciales se encuentran localizados en diferentes órganos vegetales, se almacenan en órganos vegetales: flores, hojas y aunque menos habitual en cortezas, leños, raíces rizomas, frutos y semillas. Aunque todos los órganos de

una especie pueden contener aceite esencial, la composición de éste puede variar según su localización (Harborne, 1998).

1.1.4 Composición química

Los aceites esenciales son mezclas complejas de varias sustancias (a veces más de 200) que a su vez puede tener estructuras muy diversas. Los compuestos son pertenecientes de manera casi exclusiva a dos grupos: terpenos y fenilpropanoides.

1.1.4.1 Terpenos

En los aceites esenciales se encontrarán únicamente los terpenos más volátiles, es decir, aquellos cuya masa molecular no es muy elevada: mono- y sesquiterpenos.

- Monoterpenos. Estos pueden ser: alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres, peróxidos, y fenoles.
- Sesquiterpenos. Siendo los más frecuentes hidrocarburos, alcoholes y cetonas.

1.1.4.2 Compuestos aromáticos

Los derivados del fenilpropano (C_6-C_3) son menos frecuentes como el eugenol, estragol, anetol, etc. (Bruneton, 1991).

La composición química depende de varios factores como:

- Origen botánico (la especie y raza química de la que proceden).
- El ciclo del vegetal (la composición y proporción varían según la fase del ciclo vegetativo).
- Las condiciones ambientales.
- Características de cultivo (Suelo, riego, abono).
- Procedimiento de obtención, ya que durante el mismo, se puede alterar la composición del aceite esencial respecto al vegetal (Kuklinski, 2000).

1.1.5 Métodos de obtención

1.1.5.1 Por arrastre de vapor de agua

1.1.5.1.1 Inyección de vapor de agua

En éste método, que es el más utilizado, el material vegetal y el agua no están inicialmente en contacto. La droga se coloca sobre unas rejillas a través de las cuales se hace pasar una corriente de vapor de agua que arrastra los aceites esenciales. A continuación, se condensa el vapor de agua que se recoge en un

recipiente. Posteriormente, se pueden separar los aceites esenciales del agua ya que presentan diferente densidad y forman dos fases.

1.1.5.1.2 Hidrodestilación

En éste método se sumerge directamente el material vegetal en un matraz lleno de agua acoplado a una trampa tipo Clevenger (Figura 1) que a continuación se somete a ebullición. Los vapores obtenidos de la ebullición arrastran las sustancias volátiles propias de la planta, los vapores heterogéneos se condensan por medio del refrigerante, obteniendo un líquido formado por dos fases inmiscibles: fase orgánica (aceite esencial) y fase acuosa, el líquido es recolectado en el tubo graduado de la trampa y es separado por diferencia de densidad (Kuklinski, 2000).

Es un procedimiento ampliamente utilizado, debido a la sencillez del equipo, versatilidad para aplicarlo a materiales vegetales diferentes, así como al alto rendimiento y a la pureza del aceite obtenido. Su principal inconveniente es la alta temperatura del proceso, que de no ser controlada correctamente lo hace inapropiado para aceites esenciales con componentes termo sensibles (Günther, 1984).

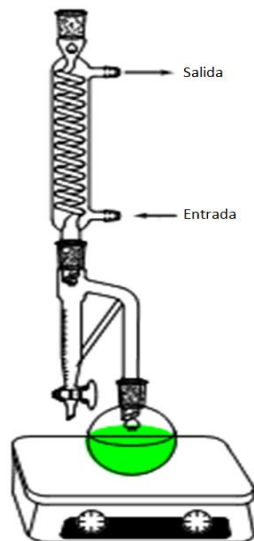


Figura 1. Dispositivo de hidrodestilación con trampa colectora para aceite esencial.

1.1.5.2 Enflorado (enfleurage)

Se aplica para la extracción de esencias, sobretodo de los pétalos de las flores y consiste en colocar una película de grasa sobre una placa de vidrio, encima de ella pétalos de flor, sobre éstos otra película de grasa y así sucesivamente. Se dispone de grasa y pétalos en capas y se realiza una presión de forma que la esencia se transfiere del pétalo a la grasa debido a su solubilidad. Con la misma grasa se hacen varias extracciones renovando los pétalos.

1.1.5.3 Extracción con gases licuados

Se trabaja con gases (butano, propano, dióxido de carbono) a elevada presión y muy baja temperatura para que estén en estado líquido. La extracción en estas condiciones es muy selectiva y no es agresiva para la droga vegetal. El gas utilizado para la extracción es fácil de eliminar y se puede recuperar para realizar otras extracciones. El método resulta muy caro, si bien, para la obtención de ciertas esencias las ventajas superan su elevado costo.

1.1.5.4 Otros procedimientos

La hidrodestilación por microondas a vacío, es un procedimiento donde la planta se calienta selectivamente por una radiación de microondas en un recinto cuya presión se reduce de forma secuencial: el aceite esencial es arrastrado en la mezcla azeotrópica formada con el vapor de agua propio de la planta tratada (sin añadir agua para los productos en fresco).

Es un proceso muy rápido y consume poca energía, proporciona un producto que, generalmente, es de calidad superior a la del producto de hidrodestilación tradicional (el tiempo de trabajo se reduce entre 5 y 10 veces y temperatura más baja).

1.1.6 Ensayos de calidad

Para controlar las esencias deben determinarse diferentes parámetros que se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Determinaciones realizadas en aceites esenciales.

FÍSICAS	QUÍMICAS	ESPECTROS-CÓPICAS	ORGANOLÉPTICAS
Densidad a 20°C	Índice de acidez	Espectro UV- visible	Color
Índice de refracción	Índice de ésteres	Espectro Ir	Olor
Poder rotatorio	Índice de saponificación	Espectro RMN	Sabor
Punto de congelación	índice de acetilo		Apariencia
Solubilidad en alcohol de diferente graduación	Índice de fenoles		

FUENTE: (Kuklinski, 2000).

1.2 ORÉGANO MEXICANO

El nombre de orégano proviene del griego “oros” (montaña) y “ganos” (ornamento) la decoración o la belleza de las montañas, también conocido como oro verde, es una de las riquezas florísticas con las que cuenta el país. Es uno de los

productos forestales no maderables de mayor importancia económica para México, el cual se explota en mayor medida en su forma silvestre.

En la República Mexicana, la planta de orégano se distribuye ampliamente, en zonas tropicales, templadas áridas y semiáridas. Se encuentran en estado silvestre en al menos 24 estados del país y se tienen identificadas alrededor de 40 especies de plantas popularmente conocidas como “orégano”, pertenecientes a cuatro familias botánicas: *Asteraceae* (*Compositae*), *Lamiaceae* (*Labiatae*), *Fabaceae* (*Leguminoseae*) y *Verbenaceae* (Huerta, 1997)

La familia *Verbenaceae* se considera de mayor importancia de acuerdo a su distribución y a sus características aromáticas. A ella pertenece el género *Lippia*, con las especies; *Lippia palmeri*, y *Lippia graveolens* Kunth (Sinonimia: *L. berlandieri* Schauer) (Villavicencio G. , 2007).

La característica que distingue a la mayoría de estas especies es su poder saborizante, fácil de percibir cuando se añaden sus hojas frescas o secas, procesados y envasados. El aroma y sabor que los diversos tipos de orégano proporcionan a los alimentos los hacen agradables al olfato, al paladar y favorecen su digestión. También poseen notables propiedades medicinales, que se explican por la compleja composición química que tienen estas plantas.

1.2.1 Nombre científico

Lippia graveolens Kunth.

1.2.2 Sinonimia popular

Ahuiyac-xihuitl, ananté, Hierba dulce, epazote, epazotl, orégano de castilla, orégano cimarrón, orégano silvestre, oreganillo loco, romerillo de monte, sacmumutz, salve dulce, salvia, salvia de castillo, salve real, salvilla mexicana, mejorana, xaak-il-ché, xak'il-ché (SEMARNAT, 2007).

1.2.3 Descripción Botánica

Las hojas presentan color verde grisáceo, de 1 a 3 cm de largo y de 0.5 a 1.5 de ancho, son opuestas, alternas de forma ovalada con bordes dentados con el haz denso, textura rugosa y con ligeras vellosidades (Huerta, 1997).

El envés glandular y densamente tomentoso a piloso, el margen finamente crenado, el ápice generalmente obtuso o redondeado, raramente agudo, la base redondeada a subcordada; pecíolos de 5-10mm de largo; el envés con pequeñas vellosidades (Villavicencio, Cano, & García, 2010).

Inflorescencias en forma de cabezuelas o espigas breves, contraídas, solitarias o numerosas constituidas por muchas flores que son pequeñas, sésiles y que nacen de brácteas conspicuas imbricadas, con 2-6 pedúnculos en las axilas de las hojas, de 4-12 mm de largo, las espigas primero subglobosas a menudo cambiando a oblongas de 4-12 mm de largo; brácteas comúnmente en 4 hileras, ovaladas a lanceoladas, glandulares y agudas.

Cáliz 1-2 mm de largo, glandular y vellosa; corola blanca, con el tubo estriguloso, de alrededor de 3 mm de largo (SEMARNAT, 2007).



Figura 2. Orégano mexicano, *Lippia graveolens* Kunth.

FUENTE: (Villavicencio G. , 2007).

1.2.4 Taxonomía

En la Tabla 3, se muestra la clasificación del orégano según la Comisión Nacional Forestal.

Tabla 3. Clasificación taxonómica del orégano mexicano.

Reino	<i>Plantae</i>
Clase	<i>Magnoliophyta</i>
Subclase	<i>Magnoliopsidae</i>
Orden	<i>Lamiales</i>
Familia	<i>Verbenaceae</i>
Género	<i>Lippia</i>

FUENTE: (CONAFOR, 2005).

1.2.5 Distribución geográfica

La figura 3, muestra la distribución geográfica del orégano mexicano, la especie *Lippia graveolens* se encuentra principalmente en los estados de Chihuahua, Durango, Tamaulipas y Coahuila, donde se concentran el 50% de los permisos de aprovechamiento; le siguen, en orden de importancia, Jalisco, Zacatecas, Querétaro, Hidalgo y Baja California (Villavicencio G. , 2007).



Figura 3. Distribución geográfica del orégano (*Lippia* spp.)

FUENTE: (SEMARNAT, 2007).

1.2.6 Hábitat

La especie *Lippia graveolens* se adapta a condiciones muy variadas de clima, que se clasifica del tipo seco y semiseco, con temperaturas que varían de 20 a 24 °C y una precipitación que va de 182 a 267 mm. Su hábitat se localiza en mesetas, planicies, cerros, lomeríos, laderas, arroyos y cañadas poco accesibles de suelos alcalinos, con pH de 7.3 a 8.5, en general pedregosos, de textura franco-arenosa dentro de un intervalo altitudinal que va desde 400 hasta 2,000 msnm, su mayor abundancia se presenta entre 1,000 y 1,800 msnm. También se desarrollan poblaciones en suelos con textura ligera migajón-arenoso con pH: 5.8 – 6.5 y de 3.0 a 4.5% de materia orgánica (Huerta, 1997).

1.2.7 Comercialización

En el mercado internacional, México ocupa el segundo lugar en exportaciones de orégano. Esta planta recientemente ha adquirido importancia económica debido a que 90% de la producción de su materia seca útil es exportada a Estados Unidos de Norteamérica y en menor grado a Italia y a Japón. Se estima

que en 2002, las exportaciones de orégano seco no manufacturado con destino a los Estados Unidos fueron de 6´648,313 kilogramos; México participó con una cantidad de 2´143,377, sólo por debajo de Turquía (CONAFOR, 2005).

La mayor producción de orégano para fines comerciales es la del género *Lippia*, cuyas especies más abundantes en México son *Lippia berlandieri* Schauer o *Lippia graveolens* H.B.K, especie que más se comercializa debido a su abundancia y distribución. Esta producción se concentra en los estados de Durango, Guanajuato, Jalisco, Querétaro, San Luis Potosí y Zacatecas.

1.2.8 Usos

1.2.8.1 Comestible

Conservador natural y potenciador del sabor en alimentos, conservador en diversos alimentos frescos y procesados, en alimentos procesados se emplea como antioxidante para la elaboración de embutidos y en conservas como: salmón, atún y sardinas.

En la industria refresquera y licorera el orégano se utiliza como fijador y saborizante. Estudios recientes realizados en la planta de orégano tanto en su composición química como biológica, han revelado propiedades, tales como un poderoso antioxidante, antimicrobiano, antiparasitario, insecticida y antígeno tóxico.

1.2.8.2 Medicinal

Tiene propiedades antiasmáticas, antiespasmódicas expectorantes, antiinflamatorias, antisépticas, analgésicas y cicatrizantes analgésico, antipirético, sedante, antidiarréico, tratamiento de infecciones cutáneas, diurético, remedio de desórdenes menstruales, repelente, antiespasmódico, tratamiento de enfermedades respiratorias.

Se utiliza en la industria farmacéutica como componente de medicamentos para el control de enfermedades de las vías respiratorias y del aparato digestivo en humanos y animales.

El aceite de orégano tiene actividad biológica como: antibacterial, antiviral, larvicida, moluscida y fungicida.

1.2.8.3 Cosmético

El extracto de aceite de orégano se usa como esencia y fijador de olor en perfumes de marcas comerciales reconocidas; así como, en la manufactura de jabones y productos de aromaterapia.

1.2.8.4 Industrial

Fabricación de aceite para aeronáutica, limpieza de piezas automotrices y en la elaboración de veladoras.

1.2.9 Compuestos con actividad antimicrobiana en orégano

Una de las principales funciones del orégano en la tecnología alimentaria es como antimicrobiano, debido a que en su composición presenta componentes que poseen la capacidad de inhibir el crecimiento de un gran número de bacterias patógenas.

Se reconoce que los compuestos activos de plantas, hierbas y especias son compuestos fenólicos, éstos compuestos son los componentes antimicrobianos mayoritarios presentes en los aceites esenciales.

El mayor componente puede constituir el 85% del aceite esencial, mientras que otros componentes pueden estar presentes sólo en trazas. Los componentes del aceite esencial de orégano con propiedad antimicrobiana son presentados en la Tabla 4.

Tabla 4. Componentes de aceite esencial de orégano que presentan propiedades antimicrobianas.

NOMBRE COMÚN	COMPONENTE	% MÁXIMO PRESENTE EN ACEITE ESENCIAL
Orégano	Carvacrol	80
	Timol	64
	Cymeno	52

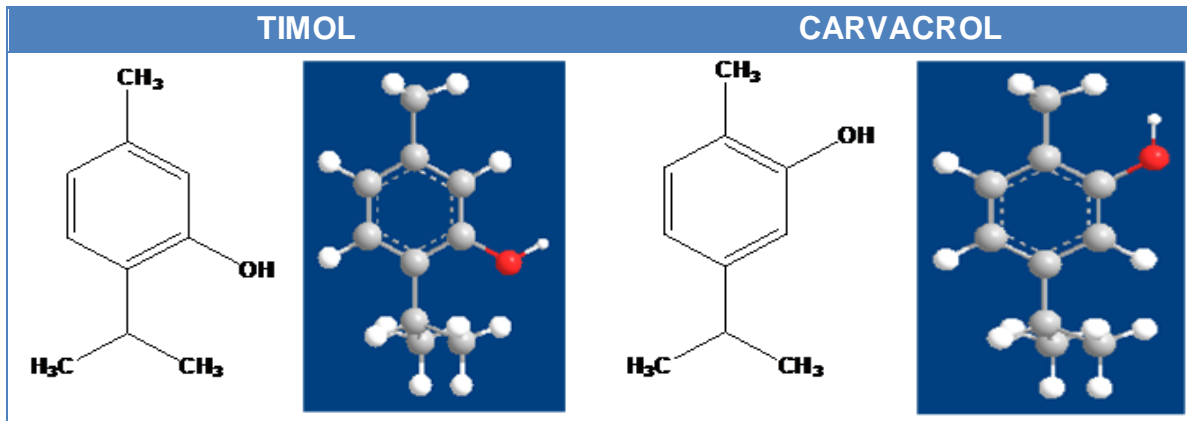
FUENTE: (García & Palou, 2008).

La actividad antimicrobiana depende de la composición química del aceite esencial, la cual está relacionada con la especie de orégano, condiciones geográficas, periodos de cosecha y métodos de extracción.

El orégano y sus derivados han sido estudiados por sus efectos antimicrobianos, en particular esta efectividad se atribuye a dos compuestos presentes en su aceite esencial, carvacrol y timol, los cuales inhiben microorganismos patógenos (Aligiannis, Kalpoutzakis, Mitaku, & Chinou, 2001).

En el género *Lippia* pueden encontrarse un gran número de compuestos, siendo el timol y el carvacrol los componentes mayoritarios y en menor proporción el cymeno. La Tabla 5, muestra la estructura de los componentes presentes con mayor porcentaje en la planta de orégano.

Tabla 5. Estructuras de componentes antimicrobianos presentes en el orégano.



1.2.9.1 Carvacrol

El carvacrol o 2-metil-5-1-metil-etil fenol, está presente en los aceites esenciales de orégano (entre 60-70%) y tomillo (45%) (Ultee, Bennink, & Moezelaar, 2002). Su estructura está representada por un grupo fenólico, con un alto poder hidrófobo. Es capaz de desintegrar la membrana externa de bacterias gram negativas, permitiendo la salida de polisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática (Lambert, Skandamis, & Coote, 2001).

En general se pueden distinguir tres fases físicas de las membranas celulares: una bicapa en fase gel (cadena de lípidos ordenada), una bicapa en fase líquida cristalina (cadena de lípidos desordenada) y una estructura hexagonal. Para una funcionalidad biológica óptima la membrana debe mantenerse en estado fluido líquido cristalino y la temperatura de transición constituye la principal influencia sobre la flexibilidad y estabilidad de la membrana. Por lo que la actividad antimicrobiana del carvacrol probablemente tiene efectos sobre dichas propiedades. Es importante mencionar que cuando la concentración de carvacrol aumenta, mayor cantidad de este componente es acumulado en la membrana y por consiguiente el daño en la membrana es mayor (Ultee, Gorris, & Smid, 1998). Este mecanismo no es válido para todos los microorganismos, ya que el daño ocasionado depende del agente antimicrobiano y del tipo de célula microbiana.

1.2.9.2 Timol

El timol o isopropilmetacresol, o 2-isopropil-5-metilfenol, ha sido reportado como uno de los agentes antimicrobianos más activo de los constituyentes de los aceites esenciales. Se encuentra presente en el aceite esencial de tomillo (arriba del 50%), en el aceite esencial del orégano y en otras fuentes naturales. Su estructura química es similar a la del carvacrol cambiando la posición del grupo hidroxilo.

El mecanismo de acción de timol es semejante al de carvacrol, ya que su estructura química es similar. El timol es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias gram negativas, permitiendo la salida de lipopolisácaridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática (Helander & Alakomi, 1998).

El timol cambia la permeabilidad de la membrana de las células microbianas dejando que se filtren los constituyentes químicos que son esenciales para el metabolismo, tales como iones ATP, ácidos nucleicos y aminoácidos. Estos efectos causan un incremento de la fase log provocando una disminución en la carga total. Es importante señalar que la acción antimicrobiana y la sensibilidad al timol es dependiente de ciertos factores como el tipo de microorganismo, pH del medio y temperatura de incubación (Falcone & Mastromatteo, 2007).

1.3 EMULSIONES

1.3.1 Definición

Es una dispersión de por lo menos dos fases líquidas inmiscibles (usualmente agua y aceite), una de las cuales es la fase continua mientras que la otra es la fase dispersa. Los diámetros de las gotas de la fase dispersa están en el intervalo de 0.1 a 100µm. Las emulsiones pueden clasificarse de acuerdo a la distribución de las fases acuosa y oleosa; si la fase dispersa es la acuosa el sistema es conocido como emulsión agua en aceite (W/O), si el sistema consiste en la dispersión de gotas de aceite en una fase acuosa se conoce como emulsión aceite en agua (O/W).

1.3.2 Partes que constituyen una emulsión

Una emulsión está constituida por tres regiones, las cuales presentan propiedades fisicoquímicas diferentes: la fase dispersa, la fase continua y la interfase. Todas las moléculas o ingredientes de la emulsión se distribuyen según su concentración y polaridad a lo largo de las regiones mencionadas anteriormente. Las moléculas polares tienden a localizarse en la fase acuosa, las moléculas no polares tienen afinidad por la fase oleosa, y las moléculas anfifílicas se localizan en la interfase.

Las moléculas en una emulsión tienden a moverse de una región a otra, alterando de esta forma las condiciones físicas y químicas de la misma. Este movimiento, así como la concentración e interacciones de sus constituyentes tienen una influencia significativa en las propiedades fisicoquímicas, textura y aplicación de estos sistemas dispersos (McClements, 1999).

1.3.3 Mecanismos de inestabilidad

Algunos mecanismos fisicoquímicos responsables de las alteraciones en las propiedades de una emulsión se esquematizan en la Figura 4.

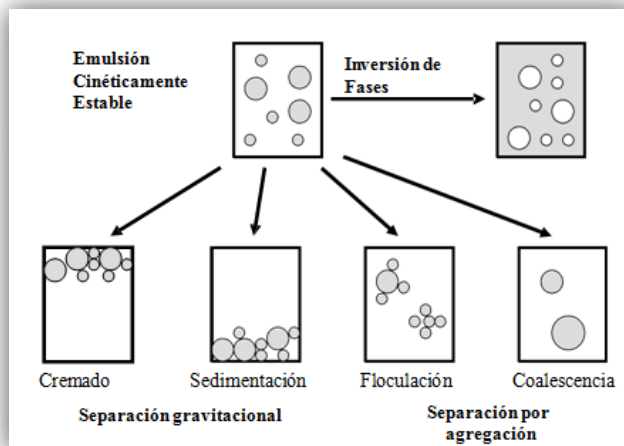


Figura 4. Mecanismos físicos de inestabilidad de una emulsión.

FUENTE: (McClements, 1999).

- La sedimentación y el cremado son dos formas de separación gravitacional. El cremado describe la migración de las gotas hacia la parte superior del sistema debido a la diferencia de densidades en las fases. En la sedimentación ocurre un proceso inverso.
- La floculación y coalescencia son dos tipos de agregación de las gotas. La inestabilidad por floculación ocurre cuando dos o más gotas se agregan, debido a las colisiones provocadas por el movimiento Browniano, conservando su individualidad. Mientras que en la coalescencia, la colisión de dos o más gotas forma una sola.
- Inversión de fases es el proceso mediante el cual una emulsión agua en aceite se convierte en una emulsión aceite en agua, o viceversa.

Una emulsión estable es una que no muestra un cambio discernible en la distribución de tamaño de gotas, o en su estado de agregación, o en su arreglo espacial en el recipiente, en una escala de tiempo de observación. Las emulsiones aceite-agua son coloides en donde el mecanismo principal de estabilidad puede ocurrir en el seno de la fase acuosa o en la superficie de las gotas, dependiendo de la naturaleza química de los ingredientes particulares involucrados. Los hidrocoloides alimenticios actúan confiriendo estabilidad a las dispersiones y emulsiones a través de su acción interfacial (Dickinson, 1993).

1.3.4 Agente emulsificante

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables debido a que el contacto entre las moléculas de agua y aceite no es favorable energéticamente, sin embargo, es posible formar emulsiones que son cinéticamente estables por un periodo razonable de tiempo mediante la incorporación de sustancias conocidas como agentes emulsificantes y/o estabilizantes (Sherman, 1968).

Los emulsificantes son moléculas superficialmente activas que se adsorben en la superficie de las gotas, formando una membrana protectora que retarda la aproximación de las gotas y su agregación, fomenta la formación de la emulsión y estabilización a corto plazo por acción interfacial. Existen dos grupos de emulsificantes:

- Surfactantes de bajo peso molecular: lecitina, ésteres de sacarosa, polisorbatos, monoglicéridos.
- Emulsificantes macromoleculares: proteínas de huevo y leche.

Los surfactantes de bajo peso molecular son moléculas anfifílicas, es decir, presentan una parte polar con comportamiento hidrofílico (afinidad por la fase acuosa) y una parte no polar con comportamiento lipofílico (afinidad por la fase oleosa).

1.3.5. Agente estabilizante

Un agente estabilizante es un compuesto químico (o mezcla) que confiere estabilidad a la emulsión a largo plazo, posiblemente por un mecanismo de adsorción, pero no necesariamente. Los estabilizantes son generalmente biopolímeros (proteínas y polisacáridos). El mecanismo por el que estabilizan los polisacáridos es vía modificación de las propiedades reológicas del medio de dispersión (viscosidad o gelación de la fase acuosa continua), mientras que en el caso de las proteínas, la estabilización se debe a que tienen una fuerte tendencia a adsorberse en las interfases aceite-agua y formando capas estabilizadoras alrededor de las gotas de aceite, de tal manera que actúan como emulsificantes y estabilizantes (Dickinson, 1993).

1.3.6 Factores principales que afectan la estabilidad de emulsiones aceite - agua.

Los factores que influyen en la estabilidad son:

- Distribución y tamaño de las gotas: Determinada por el tipo y tiempo de homogenización, concentración de emulsificante, tipo de emulsificante, relación aceite/agua y otros factores (pH, viscosidad, temperatura).

- Naturaleza de la capa interfacial adsorbida: Determinada por la concentración y tipo de emulsificante, interacción entre especies adsorbidas y competencia entre especies adsorbidas.
- Naturaleza de la fase continua: Determinada por sus propiedades reológicas, calidad del disolvente, polímeros y compuestos anfílicos no adsorbidos.
- Naturaleza de la fase oleosa dispersa. Depende del contenido de sólidos/líquido y solubilidad en la fase continua.

1.4 PELÍCULAS Y RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES

1.4.1 Definición

Los términos Recubrimientos Comestibles y Películas Comestibles se utilizan indistintamente para referirse a la aplicación de matrices transparentes y comestibles sobre las superficies de los alimentos, con el fin de servir de empaque y de preservar su calidad. Sin embargo ambos se distinguen por el modo en que son obtenidos y aplicados sobre el producto.

Un recubrimiento comestible es definido como una capa delgada de material comestible formado como un revestimiento sobre el alimento mientras una película comestible es una estructura preformada y delgada elaborada con material comestible y la cual una vez elaborada puede ser colocada sobre el alimento o entre los componentes del mismo (Krochta, Baldwin, & Nisperos-Carriedo, 1994).

Las películas comestibles se han empleado desde épocas muy antiguas, actualmente se les presta mayor atención debido a un creciente interés por los recursos renovables y las mejoras de la conservación de la calidad de los alimentos (Krochta, et al., 1994).

1.4.2 Características

A continuación se hace un listado de las principales características que deben presentar las películas y recubrimientos comestibles:

- 1) Poseer propiedades nutricionales y organolépticas que sean compatibles con el alimento.
- 2) Presentar propiedades mecánicas y protectoras adecuadas para evitar pérdidas por roturas o quiebre del material.
- 3) Ser estables frente a las distintas condiciones de almacenamiento.
- 4) Poder adherirse fácilmente a la superficie de los alimentos a tratar.
- 5) Responder a la reglamentación vigente (aditivos alimentarios).
- 6) Requerir de tecnologías sencillas y de bajo costo para su

- fabricación y posterior aplicación.
- 7) Solubilidad y dispersabilidad en su preparación y posterior consumo.
 - 8) Buena adhesión a la superficie del alimento.
 - 9) Requerimientos sencillos de tecnología.
 - 10) Cumplimiento de la reglamentación alimentaria.

1.4.3 Función

Las películas y recubrimientos comestibles desempeñan una doble función; de embalaje y como constituyentes del alimento considerados aditivos alimenticios, es necesario que posean determinadas propiedades de barrera para la preservación de los productos. Las películas y recubrimientos comestibles tienen diferentes funciones entre las cuales pueden retardar la migración de humedad, controlar el transporte de gases (O₂, CO₂ y etileno), retener componentes volátiles, servir de vehículo de aditivos, mejorar las propiedades mecánicas y el manejo del alimento, además de impartir una mayor integridad a la estructura del mismo, manteniendo las buenas propiedades mecánicas y organolépticas de los alimentos. Las películas comestibles y recubrimientos cumplen diferentes funciones de acuerdo con su composición (Tabla 6).

Tabla 6. Características de la película apropiada en base a su aplicación.

FUNCIÓN	TIPO DE FILM
Retardar la migración de la humedad	Lípidos y compuestos
Retener los compuestos volátiles responsables de sabor.	Compuestos
Retardar la migración de los gases. Mejorar la estabilidad estructural o las propiedades de mantenimiento.	Hidrocoloides, lípidos o compuestos
Retardar la migración de aceites y grasas. Retardas la migración de solutos. Transportar aditivos alimenticios.	Hidrocoloides

FUENTE: (Kester & Fennema, 1986).

1.4.4 Composición

Los films y coatings, se pueden elaborar a partir de diferentes materias primas, se clasifican de acuerdo a la materia prima utilizada para su fabricación. Estos componentes que forman parte de la formulación de los films se clasifican en tres categorías:

1.4.4.1 Hidrocoloides

Son polímeros hidrofílicos (contienen grupos oxhidrilos -OH) de origen vegetal, animal o microbiano. Producen un elevado aumento de la viscosidad y en

algunos casos tienen efectos gelificantes ya que se disuelven y dispersan fácilmente en agua. Durante los últimos años se expandió el desarrollo de películas biodegradables utilizando hidrocoloides como materia prima, porque presentan excelentes propiedades mecánicas así como de barrera frente al O₂, CO₂ y lípidos. La desventaja es que por ser hidrofílicos permiten el transporte de humedad.

1.4.4.1.1 Polisacáridos

Las películas elaboradas a partir de hidrocoloides pueden ser usadas en aquellas aplicaciones donde el control de la migración de agua no es el objetivo. Sin embargo, presentan buenas propiedades de barrera frente al oxígeno, dióxido de carbono y los lípidos. La mayoría también poseen propiedades mecánicas deseables, útiles para mejorar la integridad estructural de productos frágiles; entre los polisacáridos más utilizados se encuentran los almidones, pectinas, quitina y quitosano, carragenanos, derivados de celulosa y alginatos. (Kester & Fennema, 1986).

1.4.4.1.2 Proteínas

Las películas o recubrimientos elaborados con proteínas son flexibles, transparentes y presentan excelentes propiedades de barrera a los gases, sin embargo, la resistencia que presenta al vapor de agua es pobre debido a su naturaleza hidrofílica, mediante la combinación de proteínas con materiales hidrofóbicos, estas películas compuestas ofrecen una mayor expectativa de aplicación, dentro de éste grupo se encuentran la caseína, colágeno, zeína y proteínas del suero lácteo (Gennadios, Mc Hugh, Séller, & Krochta, 1994).

1.4.4.2 Lípidos

Contrariamente a los hidrocoloides, los lípidos se caracterizan por ser hidrofóbicos y no poliméricos, presentando excelentes propiedades de barrera frente a la humedad. Dentro del grupo se pueden mencionar las ceras, resinas, ácidos grasos, monoglicéridos y diglicéridos. La característica negativa de estas sustancias es su escasa capacidad para formar films, es decir no poseen suficiente integridad estructural ni durabilidad, se emplean como barrera entre los distintos compuestos de un alimento heterogéneo, como soporte de aditivos liposolubles y para dar brillo a productos de confitería.

1.4.4.3 Compuestos

Como su nombre lo indica las películas compuestas son formuladas mediante la combinación de hidrocoloides y lípidos permitiendo aprovechar las ventajas funcionales que presenta cada uno, reduciendo las características desfavorables. Según la ubicación en el espacio de los lípidos respecto a

los hidrocoloides, los recubrimientos y películas compuestas pueden ser de dos tipos, laminados y por medio de emulsiones.

1.4.4.3.1 Laminados

Se configuran mediante la superposición de una capa lipídica sobre una de hidrocoloides, formando una bicapa. De esta manera se logra una distribución homogénea de los lípidos controlando de manera satisfactoria la transferencia de agua.

1.4.4.3.2 Emulsiones

Se trata de mezclas heterogéneas de lípidos dentro de una matriz de hidrocoloides, obtenidas por emulsión o microemulsión. Este tipo de películas son menos eficientes respecto a la transferencia de humedad ya que no se logra una distribución homogénea de los lípidos.

1.4.5 Aditivos

Son componentes de las películas y de los recubrimientos que pueden generar diferentes acciones dentro de los mismos, éstos pueden ser tecnológicos o funcionales. Los primeros son los que le otorgan al recubrimiento una propiedad mecánica, mientras que los funcionales le proporcionan determinado comportamiento a la película.

1.4.5.1 Tecnológicos

1.4.5.1.1 Plastificante

Sustancia no volátil con un alto punto de ebullición, cuando se añade a un polímero modifica las propiedades fisicoquímicas y mecánicas del mismo actuando debilitando las fuerzas intermoleculares entre las cadenas poliméricas adyacentes de los diferentes biopolímeros, lo que hace que las películas sean más flexibles y con menor fuerza de tensión, ésta reducción en las uniones internas implica a su vez una menor cohesión del conjunto y una malla estructural más espaciada, que facilita la difusión de los gases y el vapor de agua a través de la película (Krochta, et al., 1994).

El plastificante más efectivo es aquel que más se asemeja químicamente al polímero que plastifica. También es muy importante que el polímero y el plastificante tengan solubilidades similares con respecto al solvente utilizado para la obtención de la película (Guilbert, 1986).

También es de relevada importancia que el plastificante permanezca en la matriz del recubrimiento, pues influye en la estabilidad física y mecánica de éste. Los plastificantes más utilizados en recubrimientos y películas comestibles son

polioles (glicerol, sorbitol y polietilenglicol), oligosacáridos (sacarosa, glucosa y fructosa) y lípidos (ácidos grasos y monoglicéridos). El agua también actúa como plastificante en las películas hidrofílicas y su contenido se ve afectado por la humedad relativa ambiental (Anker, 1996).

1.4.5.1.2 Surfactantes o tensoactivo

Es aquella sustancia o producto que reduce la tensión interfacial entre dos superficies en contacto. Existen tres grupos de surfactantes en función de su estructura molecular: aniónicos, iónicos y catiónicos.

Su presencia confiere estabilidad a las emulsiones y mejora la adhesión del recubrimiento sobre el producto que sea aplicado. Se comportan como agentes activos. Su adición implica una disminución en la tensión superficial, por lo tanto un aumento en la mojabilidad, que mejora el recubrimiento de la solución sobre el alimento. La mayor parte de los surfactantes también imparten flexibilidad, pues debilitan las fuerzas intermoleculares.

1.4.5.2 Funcionales

1.4.5.2.1 Acidificantes y Antioxidantes

Los agentes acidificantes son aquellos compuestos que poseen la propiedad de comunicar sus cualidades ácidas a los demás cuerpos; los antioxidantes se añaden para incrementar la estabilidad y mantener el valor nutricional y color de los productos alimenticios protegiendo frente al enranciamiento, la degradación, la decoloración oxidativa y valor nutricional del alimento

1.4.5.2.2 Antimicrobianos

Son agentes añadidos con la intención de retardar el crecimiento de levaduras, mohos y bacterias. Usualmente existen límites a la cantidad que se puede añadir. Los antimicrobianos agregados al alimento, a las concentraciones autorizadas, no matan en general a los microorganismos, sino que solamente evitan su proliferación. Por lo tanto, solo son útiles con materias primas de buena calidad. La contaminación microbiana es la forma de deterioro de los alimentos más importante.

1.4.6 Métodos para formación y aplicación de películas comestibles

Actualmente se desarrollaron varios métodos para la correcta aplicación de las matrices comestibles sobre los alimentos, los Recubrimientos Comestibles (RC) se diferencian de las Películas Comestibles (PC), por el modo en que son aplicados. Las técnicas de Inmersión y Spray se utilizan para RC y el Casting para PC.

1.4.6.1 Inmersión

Consiste en la aplicación de las matrices comestibles sumergiendo el alimento en la solución preparada. Se utiliza especialmente en aquellos alimentos cuya forma es irregular que requieren de una cobertura uniforme y gruesa. Es importante que el producto a tratar esté previamente lavado y secado, y que una vez retirado de la solución se deje drenar el excedente de solución para lograr un recubrimiento uniforme.

1.4.6.2 Spray

Esta técnica se basa en la aplicación de la solución presurizada. Permite obtener RC más finos y uniformes. Se usa en alimentos de superficie lisa o para la separación de componentes de distinta humedad de un alimento compuesto, por ejemplo en platos preparados como pizzas u otros.

1.4.6.3 Casting

Mediante esta técnica se obtienen películas pre moldeadas. Consiste básicamente en la obtención de una dispersión uniforme compuesta por biomoléculas (proteínas, polisacáridos, lípidos), plastificante y agua. Luego se vierte sobre una placa de material inocuo (acero inoxidable) donde se deja secar para formar un objeto rígido que reproduce la cavidad del molde, teniendo así una película. La velocidad de secado junto con la temperatura y humedad son condiciones determinantes para la calidad de la película (transparencia, consistencia, propiedades mecánicas), por lo tanto deben ser controladas correctamente. Una vez finalizado el secado se tiene una película de gran tamaño, el cual es fraccionado para ser aplicado sobre los alimentos a tratar (Krochta, et al., 1994).

1.4.7 Películas antimicrobianas

La contaminación microbiana reduce la vida útil de productos de alimentación y aumenta el riesgo de enfermedades alimentarias. Los métodos tradicionales para conservar los alimentos del efecto de crecimiento microbiano incluyen: proceso térmico, secado, congelación, refrigeración, irradiación, envasado en atmosfera modificada y adición de agentes antimicrobianos o sales. La desventaja que se presenta es que algunas de estas técnicas no se pueden aplicar a todos los productos de alimentación. El envasado antimicrobiano es una forma prometedora de envasado activo.

El empleo de películas que contienen agentes antimicrobianos podría ser más eficiente, por la migración lenta de los agentes de material de envasado a la superficie del producto. Si un antimicrobiano puede ser liberado del envasado

durante un periodo ampliado, la actividad también puede ser prolongada en el transporte y la fase de almacenaje de distribución de alimentos.

Las sustancias antimicrobianas incorporadas pueden controlar la contaminación microbiana reduciendo la tasa de crecimiento, inhiben o detienen el crecimiento de microorganismos; pueden ser de origen natural (animal, vegetal y microbiano) o sintético (ácidos orgánicos y ésteres).

1.4.8 Componentes empleados para elaboración de la película comestible antimicrobiana.

1.4.8.1 Polisacárido (Alginato de sodio)

Es un polisacárido lineal poliiónico e hidrofílico proveniente de algas marinas, está conformado por dos monómeros en su estructura (Figura 5), el ácido α -L-gulurónico (G) y el ácido β -D-manurónico (M), se distribuyen en secciones constituyendo homopolímeros tipo G-bloques (-GGG-), M-bloques (-MMM-) o copolímeros donde los bloques M y G se alternan (-MGMG-).

Si en su estructura polimérica se tiene mayor cantidad de G-bloques, generalmente el gel es fuerte y frágil, mientras que con la presencia de mayor proporción de M-bloques el gel formado se presenta suave y elástico (Draget, 2000).

El alginato de sodio es uno de los empleados con mayor frecuencia debido a su alta solubilidad en agua fría y característica transición sol-gel, presenta un sistema irreversible ante la presencia de iones calcio (Funami, 2009).

En contraste con la mayoría de los polisacáridos, el alginato forma geles independientes de la temperatura, sin embargo, la exposición prolongada a tratamientos de calor y variaciones extremas de pH degrada al polímero, presentado como consecuencia pérdidas en las propiedades del gel.

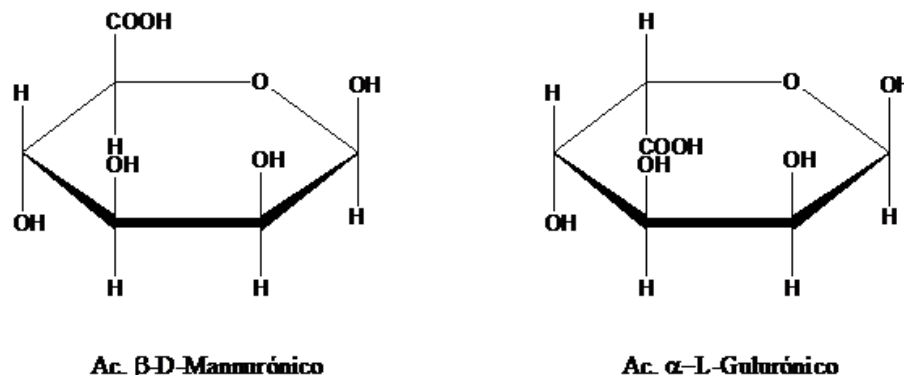


Figura 5. Estructura molecular del alginato de sodio.

1.4.8.2 Proteína (WPC)

Concentrado de Proteínas de Suero (WPC por sus siglas en inglés), es uno de los principales productos que se obtienen durante el proceso industrial del queso y la caseína. La leche tiene un 6.25% de proteínas de las cuales el 20% corresponden al suero y el 80% al caseinato; contiene lactosa, minerales, vitaminas y proteínas principalmente beta-lactoglobulina (65%), la alfa-lactoalbumina (25%). Mediante la ultrafiltración del suero se obtiene un concentrado de proteína (WPC), son buenas formadoras de películas, transparentes, flexibles, presentan buena barrera al oxígeno debido a su estructura firme y compacta de puentes de hidrógeno, pero baja permeabilidad al vapor de agua por su característica hidrofílica (Krochta J. M., 2002).

1.4.8.3 Antimicrobiano (Aceite esencial de orégano)

El aceite esencial de orégano, es un producto volátil obtenido de las hojas secas de orégano de la especie *Lippia graveolens* mediante la extracción de sus componentes volátiles provenientes de la hoja de orégano mediante la técnica de hidrodestilación. Está compuesto por mezclas de ésteres, aldehídos, cetonas, terpenos, hidrocarburos cíclicos y alcoholes. Es soluble en alcohol, poco solubles en agua, posee aroma intenso y es termosensible.

Una característica importante es su hidrofobicidad, característica que les permite unirse a los lípidos de la membrana celular desestabilizando su estructura y aumentando su permeabilidad, generando la salida de iones, metabolitos y demás moléculas que pueden conllevar a la muerte, es el principal mecanismo atribuido a la acción antimicrobiana de los aceites esenciales (Aligiannis, et al., 2001).

La mayoría de las propiedades antibacterianas frente a microorganismos patógenos por parte de los aceites esenciales se debe en un alto porcentaje a los compuestos fenólicos como el timol, el carvacrol y el eugenol presentes en estos.

1.4.8.4 Surfactante (Tween 80)

Los tween o polisorbatos son ésteres del polioxietileno sorbitano parcialmente esterificados con ácidos grasos superiores. Es un líquido oleoso límpido o ligeramente opalescente incoloro o amarillo pardusco, dispersable en agua o en etanol.

Es un surfactante no iónico, hidrofílico, es un agente emulgente y suspensor que origina emulsiones de fase externa acuosa (O/W) estables y de textura fina, poco afectables por pH. Poseen un carácter anfifílico, es decir, presentan una parte hidrofílica o polar y otra lipofílica o apolar. Al agregar surfactantes a una emulsión

la fracción hidrofílica presentará afinidad por disolventes polares y la fracción lipofílica presentará tendencia por los disolventes apolares (Trezza & Krochta, 2000).

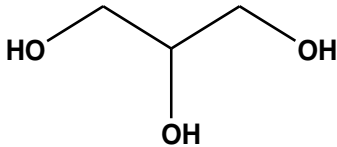
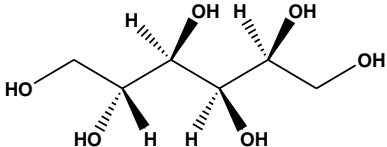
1.4.8.5 Plastificantes (Glicerol y Sorbitol)

El efecto del plastificante en la formación de películas comestibles confiere la capacidad de formar puentes de hidrógeno con el polisacárido (Mustafizur & Brazel, 2004). La función principal es mejorar la flexibilidad y la procesabilidad de los polímeros disminuyendo la temperatura de transición vítrea, T_g (Krauskopf, 1993).

Reducen los enlaces secundarios entre las cadenas del polímero y producen una mayor movilidad de las macromoléculas, lo cual resulta, en un material más fácilmente deformable. Por lo tanto, el proceso de plastificación requiere de la existencia de interacción molecular entre el polímero y el plastificante (compatibilidad) para que se pueda producir una composición homogénea y estable con una baja tendencia a la exudación del plastificante (Sears & Darby, 1982). Al incrementar la concentración de ambos plastificantes resulta en un decremento significativo de la fuerza tensil e incrementa la elongación de las películas (Mc Hugh & Krochta, 1994).

En la Tabla 7, se muestran aspectos generales de los plastificantes empleados en la elaboración de la película comestible.

Tabla 7. Datos generales del glicerol y sorbitol.

	GLICEROL	SORBITOL
NOMBRE	1,2,3-triol propano	1,2,3,4,5,6-hexanol
FÓRMULA	$C_3H_8O_3$	$C_6H_{14}O_6$
PESO	92.09 g/mol	182.17 g/mol
CLASIFICACIÓN	Alcohol	Alcohol
PROPIEDADES	Alta WPA Alta permeabilidad al O_2	Baja WVP Alta permeabilidad al O_2
ESTRUCTURA		

1.5 LISTERIA MONOCYTOGENES

Los alimentos son la fuente principal de exposición a agentes patógenos, tanto químicos como biológicos (virus, parásitos y bacterias), a los cuales nadie es inmune. Cuando los alimentos se contaminan en niveles inadmisibles de agentes patógenos y contaminantes químicos, o con otras características peligrosas,

conlleven riesgos sustanciales para la salud de los consumidores representando grandes cargas económicas para las diversas comunidades y naciones.

Pueden ser contaminados por bacterias, virus, hongos parásitos, que en el intestino pueden multiplicarse o invadir la pared intestinal, desde allí pueden alcanzar otros aparatos o sistemas. Los alimentos son alterados por diferentes géneros bacteriano y a su vez, pueden servir como vehículo de patógenos o sus toxinas (Downes & Ito, 2001).

Listeria monocytogenes, es una de las bacterias que afecta a los alimentos constituye un problema de salud pública, la contaminación de los alimentos ocasionada por esta bacteria, puede producirse en cualquier etapa del proceso que va de la producción al consumo de alimentos.

1.5.1 Especies de *Listeria monocytogenes*

El género *Listeria* comprende las siguientes especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. grayi*, y *L. dentrificans*. *L. monocytogenes* es considerada la única especie patógena, a pesar de haber sido reconocidos casos raros de listeriosis humana causados por *L. seeligeri*, *L. welshimeri* y *L. ivanovii*.

1.5.2 Características

Bacilo, Gram-positivo, redondo, corto, mide de 0.4 a 0.5 μm por 0.5 a 2 μm , no esporulado, anaerobio, pertenece a la familia *Listeriaceae*, es móvil por medio de flagelos, crece en medios con agar triptosa y sangre, puede proliferar en un amplio rango de temperatura que oscila entre $-0.4-45^{\circ}\text{C}$, la temperatura óptima de crecimiento es $30 - 37^{\circ}$, sobrevive a temperaturas de refrigeración (3°C o menos), crece a pH 4.4-9.6, con pH inferior la bacteria no puede multiplicarse (O Cliver & Riemann, 2002), (Figura 6).



Figura 6. *Listeria monocytogenes*.

Tres de las siete especies citadas, producen beta hemólisis en agar sangre: *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*. Para diferenciar las distintas especies se prueba la fermentación de azúcares (manitol, xylosa, rhamnosa).

1.5.3 Epidemiología

A diferencia de otras infecciones transmitidas por alimentos tiene una alta tasa de mortalidad de alrededor del 23%. La enfermedad que provoca es denominada listeriosis, es relativamente poco común, pero grave, con tasas de letalidad altas (20-30%), comparadas con las de otros microorganismos patógenos transmitidos por alimentos, como *Salmonella entérica*.

L. monocytogenes está ampliamente extendida en el ambiente y en los alimentos. Se considera que el hábitat primario de *L. monocytogenes* es el suelo y los vegetales en descomposición en los que se puede desarrollar en forma saprófita. Debido a que el microorganismo tiene tan amplia distribución, contamina frecuentemente los alimentos durante su producción o procesamiento (Schwartz, Hexter, & Broome, 1989).

1.5.4 Sintomatología

Los síntomas son fiebre, dolores musculares y a veces náuseas y diarrea, sin embargo, las bacterias pueden llegar a penetrar el sistema nervioso central cuyo resultado es muy grave, presentándose dolores de cabeza, confusión, pérdida de equilibrio y en casos graves convulsiones (Altekruse, Hyman, & Klontz, 1994).

1.5.5 Aspectos Clínicos

El período de incubación de la listeriosis es en promedio de 3 a 4 semanas, con extremos de 3 a 90 días.

La listeriosis, es una grave enfermedad que resulta fatal en niños, personas con bajas defensas, es particularmente peligrosa en mujeres embarazadas, ya que puede ocasionar abortos o malformaciones congénitas (Schlech, Lavigne, & Bortolussi, 1985).

1.5.6 Tratamiento

Estudios “in vitro” han demostrado que la bacteria es resistente a penicilina y ampicilina, siendo sensible a tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol, vancomicina y cefalotina. Los resultados experimentales de laboratorio muestran sinergismo entre ampicilina y aminoglucósidos (Vazquez-Boland, Kuhn, & Berche, 2001).

1.5.7 Profilaxis

Las siguientes estrategias pueden ayudar a prevenir o reducir el riesgo de listeriosis transmitida por alimentos:

- Adquirir comidas refrigeradas que se encuentren congeladas en estado sólido.
- Comprar productos cuyos envases no se encuentren ni rotos, ni deformados.
- Colocar las carnes crudas separadas en recipientes plásticos para prevenir la contaminación.
- Respetar la fecha de vencimiento indicada en los envases.
- Verificar que la cáscara de los huevos esté en perfectas condiciones.
- No dejar comida en vehículos expuestos a altas temperaturas o directamente a la luz solar.
- Los refrigeradores deben mantenerse a una temperatura de 4° C y los congeladores a menos de 0° C.
- Permitir la correcta circulación de aire en el refrigerador estableciendo espacios entre los alimentos.
- Rotular y fechar los alimentos cocidos almacenados.
- Las carnes descongeladas en el microondas deben cocinarse inmediatamente, las que se descongelaron naturalmente deben cocinarse en menos de 24 horas.

La inocuidad de un alimento es la garantía de que no causará daño al consumidor, cuando sea preparado o ingerido y de acuerdo con el uso a que se destine. La inocuidad es uno de los cuatro grupos básicos de características que junto con las nutricionales, organolépticas y comerciales componen la calidad de los alimentos.

El interés del consumidor por adquirir alimentos que sean nutritivos, que beneficien a la salud y sobretodo que sean seguros han dirigido los esfuerzos de la investigación de las películas comestibles como una alternativa para cubrir estas necesidades.



CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

EXPERIMENTAL

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La Figura 7 muestra la metodología que se realizó durante la experimentación.

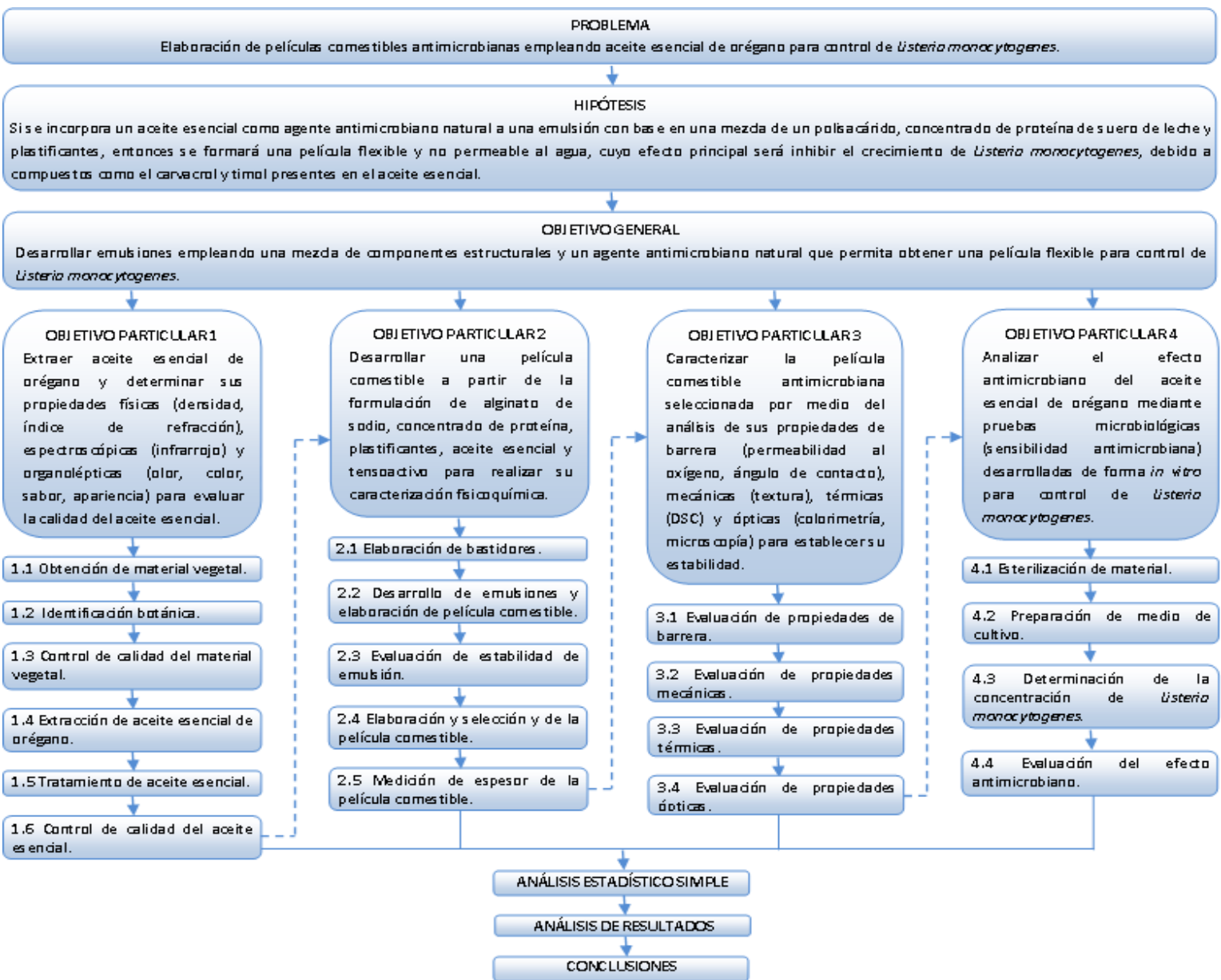


Figura 7. Cuadro metodológico.

2.1 OBJETIVO PARTICULAR 1.

Extraer aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) mediante la técnica de hidrodestilación y determinar sus propiedades físicas (densidad, índice de refracción), espectroscópicas (infrarrojo) y organolépticas (olor, color, sabor, apariencia) para evaluar la calidad del aceite esencial.

2.1.1 Obtención de material vegetal empleado para extracción de aceite esencial (Orégano seco).

El material biológico, se adquirió como orégano seco en el local de materias primas "Atlamica", ubicado en Av. Paseos de las haciendas Lote #2 Colonia San Juan Atlamica, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, C.P. 54729.

2.1.2 Identificación botánica de la especie de orégano empleado.

Para la identificación botánica de la especie vegetal, se llevó una muestra en un frasco sellado y etiquetado, al Herbario IZTA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM ubicado en la siguiente dirección Av. De los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, Estado de México, C.P. 54090.

2.1.3 Control de calidad de la materia vegetal.

2.1.3.1 Determinación de materia extraña.

La técnica se basa en la separación de material físico o biológico que se presenta en el producto por contaminación (WHO, 1998).

Pesar 50 gramos de una muestra de hojas de orégano seco (± 0.05 g), separar y clasificar manualmente con la ayuda de una pinza y/o espátula los tipos de material ajenos al producto que son identificables a simple vista. Pesar el vidrio de reloj con la muestra extraída, identificada como materia extraña. Calcular el contenido expresado en porcentaje de materia extraña total en la muestra mediante la Ecuación 1:

$$ME_T = \frac{m_0 - m_2}{m_0} * 100$$

Ecuación 1.

Donde:

ME_T: Contenido de materia extraña total en la muestra (%).

m₀: Masa total de la muestra (g).

m₁: Masa extraída como material extraño (g).

m₂: Masa de la muestra original menos la materia extraída (g).

2.1.3.2 Determinación de humedad.

El contenido de humedad se determinó por medio de la termobalanza digital (Figura 8). Se fijaron las condiciones de prueba en el equipo (100°C), se colocan 2g de muestra, la técnica consiste en un método de secado por calor basado en evaporar de manera continua la humedad de la materia orgánica por medio de radiación y el registro de la pérdida de peso de la muestra hasta alcanzar peso constante expresándose el resultado como porcentaje (Kirk, Sawye, & Egan, 1996).



Figura 8. Termobalanza digital OHAUS MB-45.

Nota: Foto tomada en Laboratorio de Biopolímeros, Universidad Iberoamericana.

2.1.4 Extracción del aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* Kunth).

Se realizó una reducción de tamaño de la muestra vegetal por medio de una trituración mecánica, empleando para este proceso un molino para especias.

La obtención del aceite esencial de orégano, se realizó mediante la técnica de hidrodestilación (Figura 9), que consiste en el uso de vapor para el arrastre de sustancias volátiles contenidas en la muestra, mismas que son condensadas, el aceite esencial se separa por diferencia de densidad (Günther, 1984).

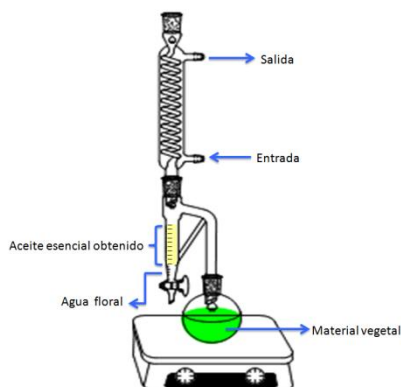


Figura 9. Sistemas de hidrodestilación para obtención de aceite esencial.

Se colocan 100 g de orégano y 1600 mL de agua destilada en el matraz, se sitúa sobre una parrilla con agitación y calentamiento constante; se coloca la trampa colectora Clevenger unida a un refrigerante y se conecta una bomba de agua para así terminar el montaje del sistema, como se muestra en la Figura 10.

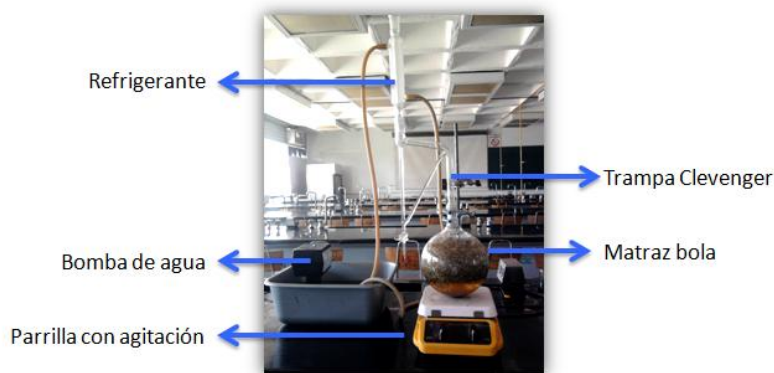


Figura 10. Montaje de un sistema de hidrodestilación.

Nota: Foto tomada en L-324, FESC-UNAM.

Se llevó a ebullición la suspensión acuosa del vegetal, el aceite esencial es arrastrado por el vapor generado en el matraz y se depositan en la trampa colectora. Por diferencia de densidad se observan dos fases, teniendo en el fondo de la trampa el agua floral y en la parte superior el volumen obtenido de aceite esencial de orégano. Se toma la lectura y se calcula el porcentaje obtenido del aceite esencial en el proceso de hidrodestilación, en el que este valor no deberá ser menor a 0.35% (FHEUM, 2001). Se emplea la Ecuación 2, para la cuantificación del rendimiento del aceite esencial.

$$R = \frac{v * \rho}{P_M} * 100$$

Ecuación 2.

Donde:

R: Rendimiento del aceite esencial obtenido (%).

v: Volumen de aceite esencial obtenido en la trampa Clevenger (mL).

P: Densidad del aceite esencial obtenido (g/mL).

P_M: Peso de la muestra vegetal colocada en el proceso de destilación (g).

2.1.5 Tratamiento para el aceite esencial

2.1.5.1 Decantación

Con el aceite esencial obtenido de la hidrodestilación queda una pequeña cantidad de agua floral que debe eliminarse, de lo contrario, si permanece en contacto con

el aceite durante el almacenamiento puede afectar la calidad del producto, el procedimiento empleado para retirarla fue la decantación.

Se colocó en un embudo de separación el producto obtenido de la hidrodestilación, se dejó en un intervalo de tiempo de 15 minutos, por efecto de la densidad se observa una separación de fases, en la parte inferior del embudo se presenta la fase más densa en este caso es el agua floral y en la parte superior el aceite esencial. Se elimina el agua residual y el aceite esencial es almacenado en un tubo de ensaye con tapa (Figura 11).

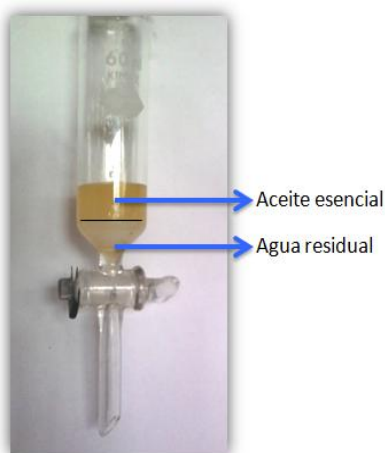


Figura 11. Decantación del aceite esencial.

NOTA: Foto tomada en L-324, FESC-UNAM.

2.1.5.2 Envasado y almacenado

El aceite esencial es colocado en tubos de ensaye con tapa, se cierra se resguardan de la luz solar para evitar el paso de la luz, rotular cada muestra obtenida y almacenarlos en refrigeración a una temperatura de 6°C para sus posteriores determinaciones.¹

2.1.6 Control de calidad del aceite esencial

2.1.6.1 Pruebas Físicas

2.1.6.1.1 Índice de refracción

El índice de refracción fue evaluado de acuerdo a la (NMX-F-074-SCFI, 2011), el método se basa en la medida directa del ángulo de refracción, la determinación se realizó mediante un refractómetro digital (Figura 12), el valor es obtenido de manera directa del equipo indicado con la simbología n_D en la pantalla.

¹ Diagrama de proceso de extracción de aceite esencial de orégano (Figura 47, Anexo I).

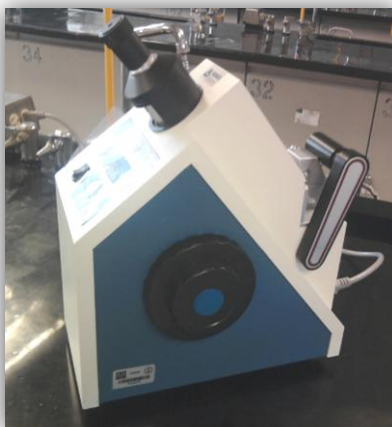


Figura 12. Refractómetro ABBE, Modelo 315RS Digital.

NOTA: Foto tomada en L-414, FESC-UNAM.

2.1.6.1.2 Densidad

La densidad se determinó mediante la técnica picnométrica de acuerdo con la (NMX-F-075-SCFI, 2012), que consiste en realizar una serie de determinaciones de masa; para obtener los resultados se efectúan los cálculos siguientes:

$$\delta = \frac{G_1}{G_2}$$

Ecuación 3.

$$G_1 = M_1 - M$$

Ecuación 4.

$$G_2 = M_2 - M$$

Ecuación 5.

Donde:

δ: Densidad relativa del aceite (adimensional)

M1: Masa picnómetro con muestra (g)

M2: Masa picnómetro con agua (g)

M: Masa picnómetro vacío (g)

G1: Masa neta del aceite (g)

G2: Masa neta del agua (g)

Para obtener la densidad del alimento se emplea la Ecuación 6:

$$\rho_{ALIM} = \delta * \rho_{REF}$$

Ecuación 6.

Donde:

ρ_{Alim} : Densidad del alimento (g/ml)

δ : Densidad relativa (adimensional)

ρ_{Ref} : Densidad del agua 20°C (g/ml)

2.1.6.2 Prueba espectroscópica

2.1.6.2.1 IR

La técnica empleada fue la espectroscopia de absorción, mediante espectrómetro infrarrojo (Figura 13), se mide la transmisión de radiación infrarroja electromagnética incidente en una muestra en función de la longitud de onda (Osborne, Fearn, & Hindle, 1993).

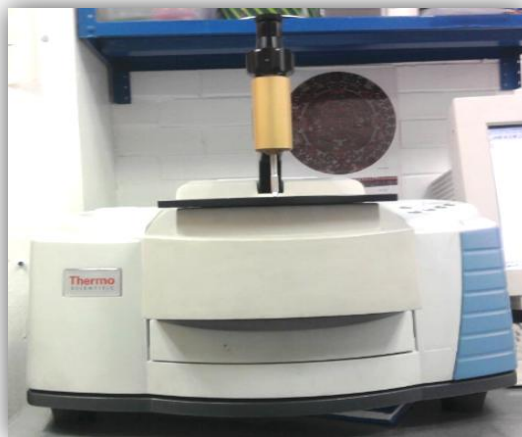

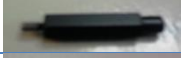



Figura 13. Espectro IR, Modelo Nicolet iS10 FT.

NOTA: Foto tomada en Laboratorio de Química Medicinal, FESC-UNAM.

Para el aceite esencial se empleó la punta especificada para líquidos (Tabla 8), se coloca una gota de aceite esencial en la celda, se obtiene como resultado un gráfico que representa el espectro infrarrojo teniendo en el eje de las ordenadas la transmitancia (%) y en el eje de las abscisas la radiación infrarroja absorbida por las uniones químicas en términos de número de onda (cm^{-1}).

Tabla 8. Puntas empleadas en el espectrómetro IR.

IMAGEN	DESCRIPCIÓN	APLICACIÓN
	Punta cóncava	Líquidos
	Punta plana	Sólidos
	Punta cónica	Granulados

NOTA: Foto tomada en Laboratorio de Química Medicinal, FESC-UNAM.

2.1.6.3 Prueba organoléptica

El análisis organoléptico se realizó mediante pruebas sensoriales del aceite esencial extraído (Vásquez, Alva, & Marreos, 2001).

Se efectuó mediante una prueba hedónica descriptiva, con un panel de 30 jueces no entrenados que evaluaron el aspecto, color, olor y sabor del aceite esencial. (Anzaldúa-Morales, 1994).

La prueba consistió en evaluar por cada juez, los cuatro parámetros establecidos en el test ² (olor, color, apariencia y sabor), mediante una secuencia de preguntas que permitirían obtener resultados acerca de las características de la muestra.

Para realizar la prueba de sabor se necesitó emplear un vehículo, ya que el aceite esencial no puede ser probado directamente (Anzaldúa-Morales, 1994). Para preparar la muestra se empleó como vehículo crema neutra (200 g) y se disolvió el aceite esencial (100 µl).

Se ordenaron las muestras (Figura 14), se llevó de manera individual a cada juez a la cabina, se evaluó el aceite esencial en sus diferentes parámetros de acuerdo a lo establecido en el test, para finalizar se hizo un estudio de los resultados obtenidos por cada uno de los jueces y se establecieron los atributos organolépticos del aceite esencial analizado.



Figura 14. Acomodo de las muestras para la evaluación sensorial.

NOTA: Foto tomada en L-324, FESC-UNAM.

2.2 OBJETIVO PARTICULAR 2

Desarrollar una película comestible a partir de la formulación de alginato de sodio, concentrado de proteína de suero de leche, mezcla de plastificantes, aceite esencial y tensoactivo para realizar su caracterización fisicoquímica.

² Prueba de Evaluación Sensorial (Figura 48, Anexo II).

2.2.1 Elaboración de bastidores para preformado de películas

Se elaboraron los bastidores para el preformado de las películas antimicrobianas, empleando una lámina de poliestireno, material seleccionado por ser rígido y presentar una superficie que facilitó el desprendimiento íntegro de las películas elaboradas. Las dimensiones de los bastidores se muestran en la Figura 15, teniendo 2mm de grosor y 1mm de profundidad.

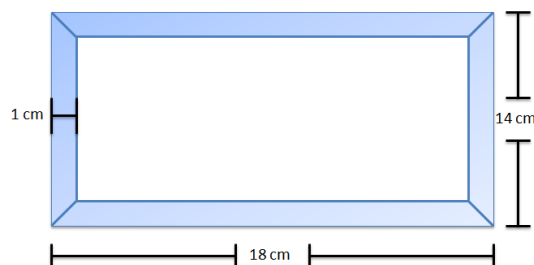


Figura 15. Bastidor elaborado para el preformado de películas comestibles.

La estructura elaborada permitió la formación de películas comestibles con un área de 192 cm².

2.2.2 Desarrollo de emulsiones y elaboración de la película comestible

Los componentes de la formulación empleada para la obtención de la película comestible se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Formulación de la película comestible antimicrobiana.

FUNCIÓN	COMPONENTE	PROVEEDOR
Material estructural	Alginato de Sodio	Droguería Cosmopolita
	WPC 80%	Cytecsa
Plastificante	Sorbitol	Droguería Cosmopolita
	Glicerol	Droguería Cosmopolita
Tensoactivo	Tween 60	Millikan
Antimicrobiano natural	Aceite esencial de orégano	---

Se desarrollaron diferentes emulsiones, variando la concentración de los componentes empleados en la formulación. Cada emulsión obtenida fue envasada en un frasco de vidrio con tapa hermética y se dejó en reposo durante 24 h para eliminar el aire incorporado por los procesos de homogenización y agitación.

A partir de que se obtuvo la emulsión continúan las operaciones que permiten la obtención de la película comestible (Preformado, Secado, Desmoldado, Almacenado).

En el preformado de las películas, se emplearon los bastidores previamente elaborados, utilizando un bastidor para cada formulación desarrollada, se

colocaron 20 ml de la emulsión en cada uno de ellos, lo anterior se ilustra en la Figura 16. Los bastidores se colocan sobre anaqueles con superficies niveladas, para obtener grosores homogéneos en las películas, cuidando que estén limpios y aislados para evitar contaminación ocasionada por corrientes de aire.



Figura 16. Representación de cada formulación realizada.

NOTA: Foto tomada en L-414, FESC, UNAM.

Para el desmoldado se emplearon láminas de acetato de celulosa con las mismas medidas del bastidor, para evitar el contacto directo con las manos y evitar afectar resultados en sus posteriores evaluaciones.

El tiempo de secado junto con la temperatura y humedad son condiciones determinantes para la calidad del film, por lo tanto deben ser controladas correctamente.

Finalizado el secado se tiene una película de tamaño correspondiente con las dimensiones internas del bastidor elaborado (Figura 17).

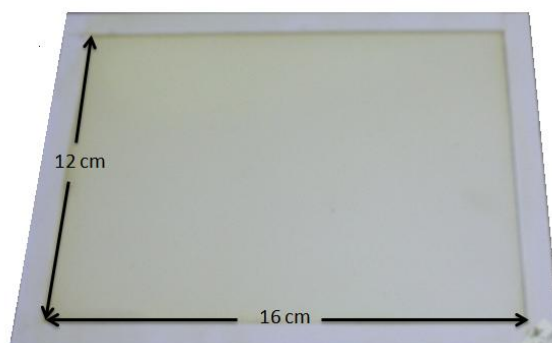


Figura 17. Dimensiones de la película elaborada.

NOTA: Foto tomada en I-414, FESC, UNAM.

Se finalizó colocando las películas en bolsas herméticas resellables, se rotularon y fueron almacenadas dentro de una cabina en bolsas herméticas, en condiciones ambientales.

La información anterior se sintetiza en el diagrama de proceso, se especifican condiciones y tiempos de proceso llevadas a cabo en cada operación.³

2.2.3 Evaluación de la estabilidad de la emulsión

Se determinó la estabilidad de la emulsión, mediante un proceso de centrifugación diferencial, proceso de separación que utiliza la acción de la fuerza centrífuga para promover la aceleración de partículas (Ford T.C., 1991).

Se colocan 10 mL de emulsión en 4 tubos cónicos de 15 mL para centrifuga, se fijan los tubos dentro de la centrifuga (Figura18), se indican las rpm, transcurrido el tiempo establecido se extraen los tubos, se observa si existe separación de fases en la emulsión, si existe separación, reportarla en ml separados de cada fase existente. Obtener el porcentaje de separación de cada fase mediante la Ecuación 7.

$$\%F_S = \frac{F_S}{M} * 100$$

Ecuación 7.

Donde:

% FS: Porcentaje separado obtenido después de la centrifugación (%).

FS: Fase separada de la emulsión original (mL).

M: Cantidad inicial colocada de emulsión (mL).



Figura 18. Centrifuga clínica Modelo IEC.

NOTA: Foto tomada en L-414, FESC-UNAM.

³ Diagrama de proceso para elaboración de películas comestibles antimicrobianas (Figura 49, Anexo III).

2.2.4 Elaboración y selección de película comestible

En la actividad 2.2.2 se obtuvieron películas comestibles elaboradas con diferentes formulaciones de las cuales se seleccionó la película c que presentara las mejores características evaluadas por medio de un análisis visual.

Una vez seleccionada la película óptima, se elaboraron réplicas, mismas que serían utilizadas para evaluar los diferentes parámetros que comprenden la caracterización de la película comestible.

2.2.5 Medición de espesor de la película comestible

El espesor de la película comestible, se midió mediante un micrómetro digital, también llamado tornillo de Palmer (Figura 19-B). Se tomaron las mediciones en 5 puntos diferentes de la superficie de la película (Figura 19-A). Haciendo 3 réplicas de cada medición en cada punto elegido.

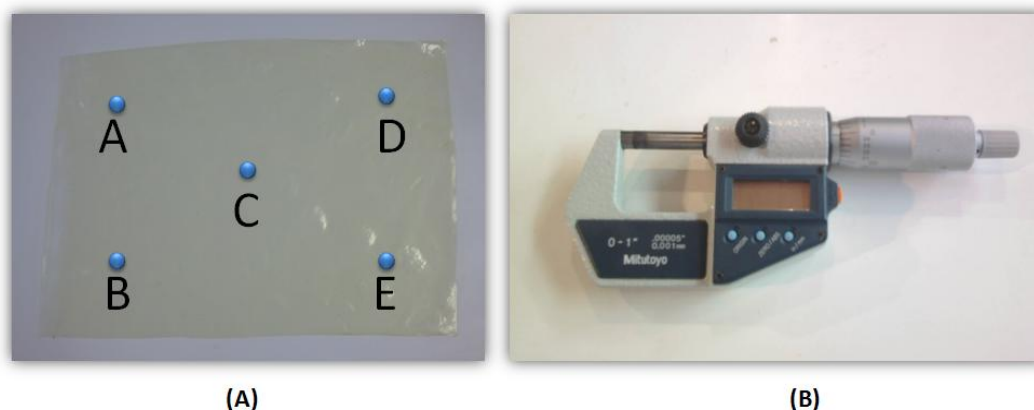


Figura 19. (A) Puntos seleccionados en la película para medir el espesor, (B) Micrómetro Mitutoyo Digital Systems.

NOTA: Foto tomada en Laboratorio de Biopolímeros, Universidad Iberoamericana.

2.3 OBJETIVO PARTICULAR 3

Caracterizar la película comestible antimicrobiana seleccionada por medio del análisis de sus propiedades de barrera (permeabilidad al oxígeno, ángulo de contacto), mecánicas (textura), térmicas (DSC) y ópticas (colorimetría, microscopía) para establecer su estabilidad.

2.3.1 Propiedades de barrera

2.3.1.1 Permeabilidad al oxígeno

La permeabilidad al oxígeno se determinó empleando el método ASTM D1434-82 (método manométrico) con algunas modificaciones. El método se basa en la medición de la resistencia al flujo de un penetrante a través de un recubrimiento. (D1434-82, 2009). El montaje del dispositivo se muestra en la Figura 20.

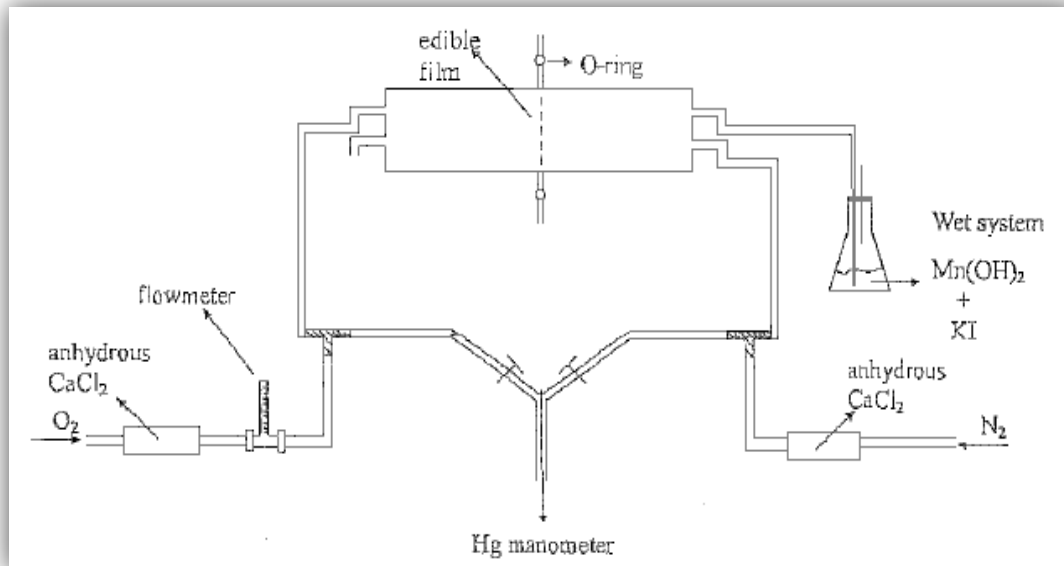


Figura 20. Esquema del dispositivo para medir Permeabilidad al Oxígeno.

FUENTE: (Erol & Sibel, 2003).

Se cortó la película en forma circular con un diámetro de 4.5cm, la película fue sellada entre dos cámaras especialmente diseñadas, cada una teniendo un diámetro de 4cm y profundidad de 5cm. La medición se llevó a cabo en una celda de transmisión de gases (Figura 21), en una de las cámaras se almacena el gas permeante (oxígeno) y en la otra nitrógeno quien recibe el gas que se difunde a través de la muestra.



Figura 21. Celda de transporte de gas para la medición de permeabilidad al oxígeno.

NOTA: Foto tomada en Laboratorio de Biopolímeros, Universidad Iberoamericana.

La mezcla de nitrógeno y oxígeno permeado fue pasado al sistema húmedo por un periodo conocido de tiempo. Se realizan las titulaciones respectivas para conocer los gramos de oxígeno disueltos. Se determina la permeabilidad al oxígeno mediante la Ecuación 8.

$$PO_2 = \frac{m * d}{A * t * \Delta P}$$

Ecuación 8.

Donde:

PO₂: Permeabilidad al Oxígeno (g m⁻¹ día⁻¹ atm⁻¹).

m: Masa de O₂ permeado en gramos a través de la película (g).

d: Espesor de la película (m).

A: Área de la película empleada en el dispositivo (m²).

t: Intervalo de tiempo (días).

ΔP: Diferencia de presión de O₂ entre los dos lados de la película (atm).

2.3.1.2 Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua se midió usando el método ASTM E96 (método gravimétrico) con algunas modificaciones, se mide la cantidad de vapor que pasa por unidad de superficie (ASTM E96, 1995). Se cortó la película en forma circular haciendo muescas en cuatro puntos, la película fue colocada entre la base y el empaque de la celda de acrílico de 8 cm de diámetro (Figura 22-A), en el interior de la celda se colocó agua destilada, el ensamble final se muestra en la (Figura 22-B) donde se unieron todas las piezas junto con la película correctamente selladas.

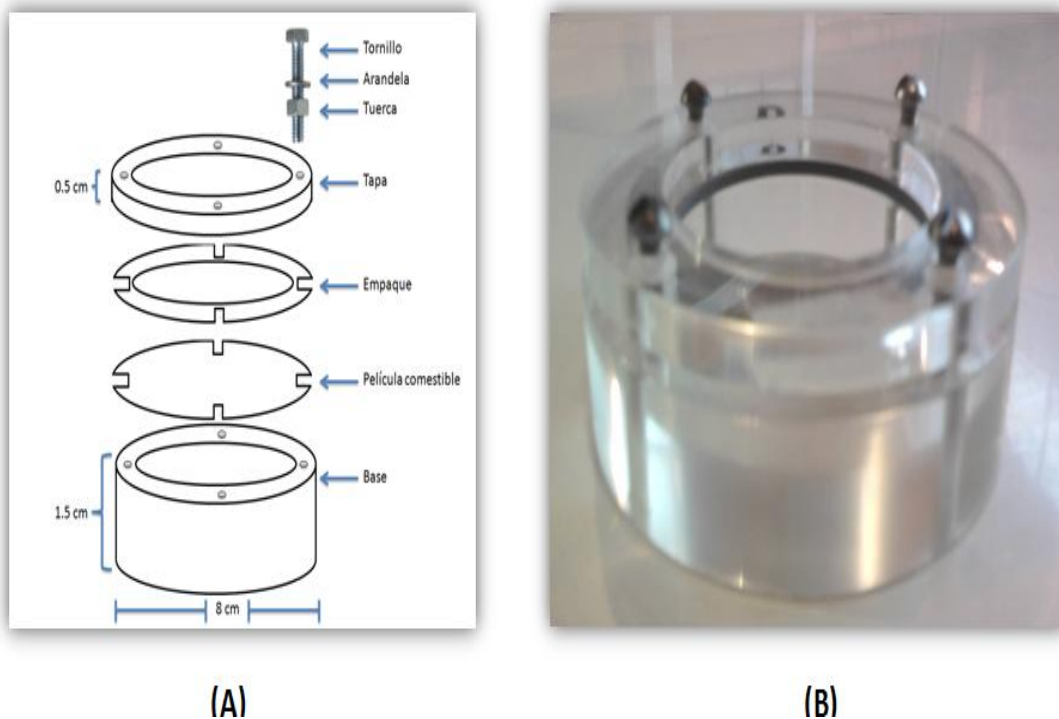


Figura 22. (A) Esquema de ensamble y dimensiones de la celda utilizada, (B) Ensamble completo de la celda para medir permeabilidad al vapor de agua.

NOTA: Foto tomada en Laboratorio de Biopolímeros, Universidad Iberoamericana.

Las celdas se pesaron y se ubicaron, en una cámara de temperatura y humedad controlada con adecuada circulación de aire, para eliminar el vapor de agua que atraviesa la película (Figura 23).



Figura 23. Cabina empleada para determinación de PVA.

NOTA: Foto tomada en Laboratorio de Biopolímeros, Universidad Iberoamericana.

La ganancia o pérdida de pesos de las celdas fue monitoreada en función del tiempo. Los cambios de peso se registraron mediante una balanza analítica con precisión de 0.0001g. Las medidas de la velocidad de transmisión de vapor de agua (VTVA) se realizaron pesando la celda en intervalo de 1 hora durante un periodo total de 7 horas.

La pendiente de la curva peso vs tiempo (J), fue determinada para calcular la velocidad de transmisión de vapor de agua (Ecuación 9), con ello se puede determinar la permeabilidad al vapor de agua de las películas (Ecuación 10) (Rodríguez, Sánchez, González, Cháfer, & Vargas, 2011).

$$VTVA = \frac{\frac{dm}{dt}}{A} = \frac{J}{A}$$

Ecuación 9.

$$PVA = \frac{VTVA}{P_{W1} - P_{W2}} L$$

Ecuación 10.

Donde:

VTVA: Velocidad De transmisión de vapor de agua ($\text{g h}^{-1} \text{m}^{-2}$)

J: Pendiente de la curva de pérdida de peso en el tramo lineal (g h^{-1})

A: Área efectiva para la transmisión de vapor de agua (m^2)

PVA: Permeabilidad al Vapor de Agua ($\text{g Pa}^{-1} \text{h}^{-1} \text{m}^{-1}$)

P_{W1} : Presión parcial de vapor de agua en la superficie del film en la cara interior de la celda (Pa)

P_{w2} : Presión parcial de vapor de agua en la superficie del film en la cara exterior de la celda (Pa)

L : Espesor del film (m)

En films hidrofílicos para considerar el efecto de la capa estanca de aire en las medidas de PVA, los valores de P_{w1} contemplan las correcciones para películas hidrofílicas aplicando las siguientes ecuaciones (Gennadios, Weller, & Gooding, 1994).

$$P_{w1} = P_t - (P_t - P_{w0}) * e^{-\frac{N_w h_i}{CD}}$$

Ecuación 11.

$$N_w = (6.43E^{-11})VTVA$$

Ecuación 12.

$$c = \frac{P_t}{R * T}$$

Ecuación 13.

$$D = 0.26 \left(\frac{T}{298}\right)^{1.8}$$

Ecuación 14.

Donde:

P_t : Presión total del sistema (Pa)

P_{w0} : Presión de vapor saturado del agua a la temperatura de trabajo (Pa) interior de la copa se colocó agua destilada para conseguir una humedad relativa del 100% (P_{w0})

N_w : Flujo de agua en el film ($g \text{ mol cm}^2 \text{ s}^{-1}$)

h_i : Distancia entre el agua destilada y el film (m)

C : Concentración molar total del aire y vapor de agua (mol cm^{-3})

D : Difusividad del vapor de agua en el aire ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$)

T : Temperatura de trabajo en (K)

R : Constante Universal de los Gases ($\text{Pa cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

2.3.1.3 Ángulo de contacto

La permeabilidad al agua de la película, se evaluó por medio del ángulo de contacto, el equipo TANTEC Contact Angle Meter (Figura 24-A). La técnica empleada para medir el ángulo de contacto es el de la gota sésil mide la mojabilidad de la superficie sólida por un líquido. Se mide el ángulo formado por el plano tangente de la interfase líquido-gas y el plano formado por el sólido en un contacto trifásico sólido-líquido-gas (Figura 24-B), (Gea Jódar, 2006).

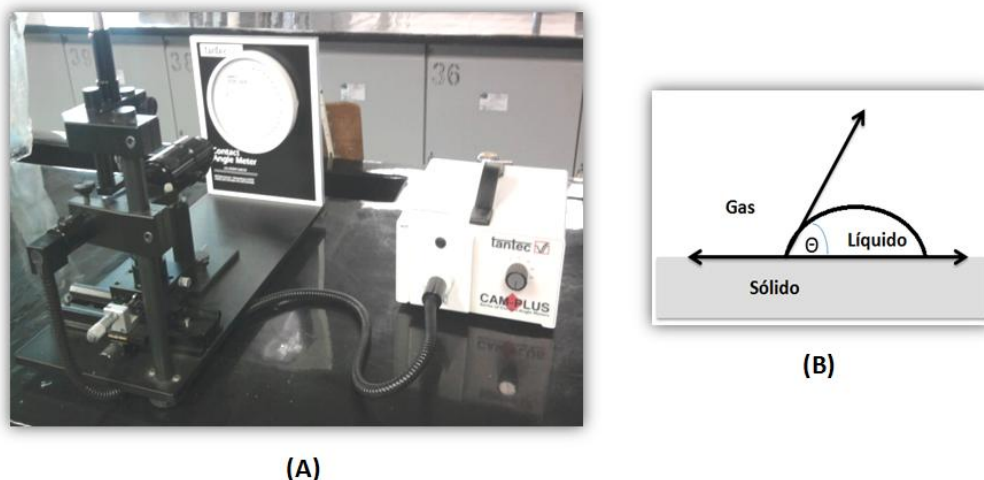


Figura 24. (A) Equipo TANTEC Contact Angle Meter, (B) Tensiones interfaciales en equilibrio.

NOTA: Foto tomada en L-414, FESC-UNAM.

Se dividió cada película en 8 partes (Figura 25-A), se formaron tiras de 8cm de largo por 3 cm de ancho, se realizaron cortes uniformes, procurando un área constante de 24 cm² para ser evaluadas en tres diferentes zonas (Figura 25-B).

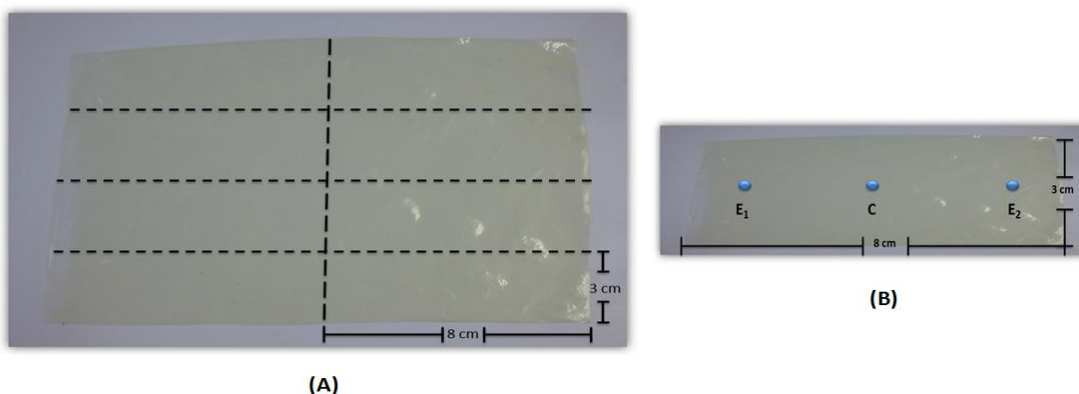


Figura 25. (A) Corte de películas para determinar ángulo de contacto, (B) Zonas establecidas para medición de ángulo de contacto.

NOTA: Foto tomada en L-414, FESC-UNAM.

3.2 Propiedades mecánicas

2.3.2.1 Textura

Los ensayos de tracción se efectuaron mediante un Texturómetro TA-XT plus Texture Analyser (Figura 26). La prueba consiste en un ensayo mecánico de tensión-deformación, de una muestra hasta su ruptura (ASTM D638, 2010). Se empleó una celda de carga de 50 N y pinzas de tensión (A/TG), dejando una separación entre las pinzas de 80 mm y se aplicó una velocidad de 50 mm/min (ISO 527-3, 1995).

Se cortaron de 8cm de largo por 5cm de ancho, se colocaron en el dispositivo dentro de las mordazas tensoras, el ensayo dura varios minutos y es destructivo, la muestra de ensayo es deformada permanentemente y a menudo rota. De los ensayos de tracción realizados se obtienen los datos para fuerza de ruptura y % de elongación.



Figura 26. Texturómetro TA XT Plus, Texture Analyser.

NOTA: Foto tomada en Laboratorio de Biopolímeros, Universidad Iberoamericana.

2.3.3 Propiedades térmicas

2.3.3.1 DSC (Diferential Scanning Calorimetry)

Se emplea la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido (DCS), utilizando un Calorímetro TA-INSTRUMENTS (Figura 27). Es una técnica dinámica que mide variaciones energéticas asociadas a los cambios químicos, proporcionando flujo de calor (Brown, 2001).



Figura 27. Calorímetro TA- INSTRUMENTS.

NOTA: Foto tomada en Nave 3000, FESC-UNAM.

Se programa en el equipo el intervalo de temperatura al que se efectuará la prueba, las muestras se calentaron de 10°C a 120°C, con una velocidad de calentamiento de de 10°C/min. Se dispone de dos cápsulas, en una de ellas se adicionan 3-5 mg en de muestra, la otra cápsula que es la de referencia permanece vacía (Figura 28).

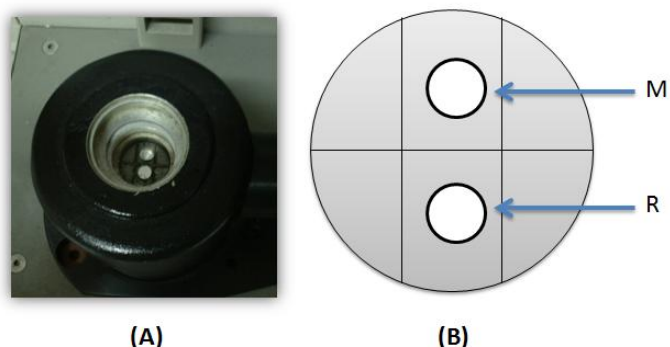


Figura 28. (A) Sección interna del calorímetro, (B) Representación de la ubicación de la cápsula en la sección interna.

NOTA: Foto tomada en Nave 3000, FESC-UNAM.

Inicialmente la celda de referencia y la muestra se encuentran equilibradas a la temperatura inicial después se someten a calentamiento por medio de calefactores que se encuentran de forma independiente (Figura 29), los calefactores se encuentran controlados por un programa conectado directamente con el equipo que comprueba si se producen diferencias de temperatura entre la muestra y la de referencia.

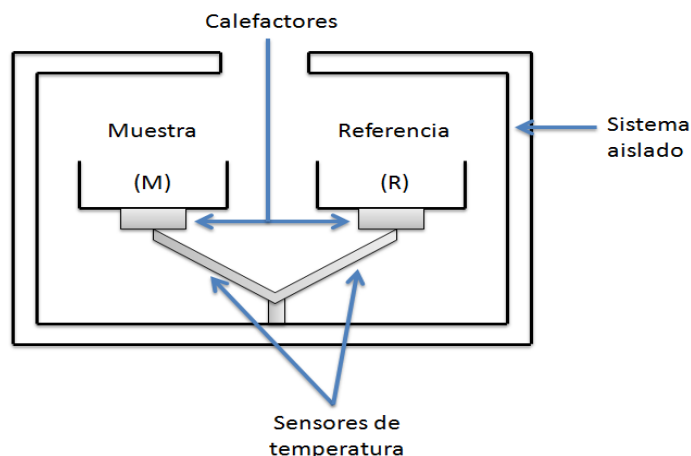


Figura 29. Esquema del principio de la técnica DSC.

Así, los datos se obtienen en forma de diferenciales de calor en función de la temperatura (dH/dt), del ensayo se obtiene un termograma resultante (Figura 30).

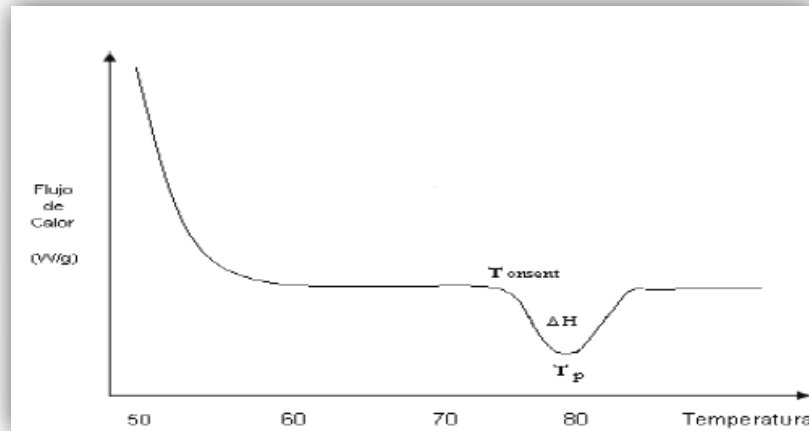


Figura 30. Representación gráfica de un análisis DSC.

2.3.4 Propiedades ópticas

2.3.4.1 Colorimetría

El color de la película comestible se determinó mediante un colorímetro Minolta, es un colorímetro triestímulo, mide el color a través de tres filtros de banda ancha correspondientes a las curvas espectrales de sensibilidad (Figura 31).



Figura 31. Colorímetro Minolta CR 400.

NOTA: Foto tomada en Laboratorio de Biopolímeros, Universidad Iberoamericana.

Se usó el modelo CIELCH (CIE $L^*C^*h^\circ$), modelo derivado del sistema CIELAB, la localización de cualquier color en el espacio de color se determina mediante sus coordenadas de color: L^* representa la diferencia entre blanco y oscuro, las componentes a^* y b^* representan coordenadas de color (Sahin & Sumnu, 2009).

De los datos obtenidos se calculó la coordenada cromática C^* y el ángulo de tono h^* (Rodríguez, Sánchez, González, Cháfer, & Vargas, 2011). Se realizaron los

cálculos de acuerdo a las ecuaciones establecidas en el sistema CIELCH (Tabla 10) y se valoraron de acuerdo al círculo cromático (Figura 32) y las escalas establecidas (Tabla 11), para concluir el análisis colorimétrico.

Tabla 10. Ecuaciones para determinación de parámetros del color Sistema CIELCH.

PARÁMETRO	ECUACIÓN
Croma	$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{\frac{1}{2}}$
Tono	$h^\circ = \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right)$ cuando $a^* > 0$ y $b^* \geq 0$ $h^\circ = 180 + \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right)$ cuando $a^* < 0$

Tabla 11. Escalas para el análisis de parámetros de color.

PARÁMETRO	ESCALA
a^*	(+) rojo / (-) verde
b^*	(+) azul / (-) amarillo
Luminosidad (L^*)	0 (oscuro) a 100 (blanco)
Croma (C^*)	0 a 100
Tono (h°)	0° a 360°

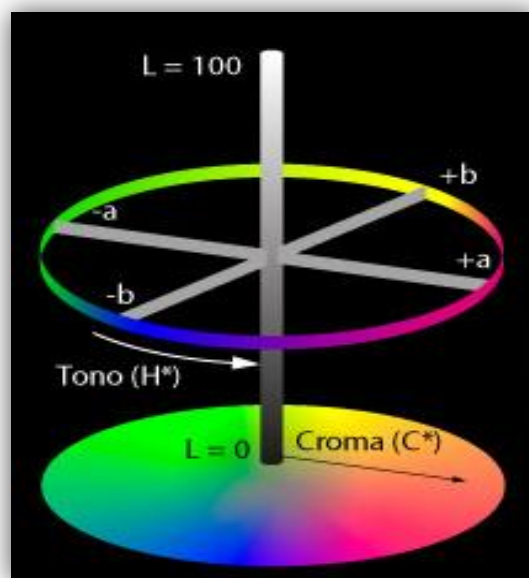


Figura 32. Espacio de color del Sistema CIELCH.

2.3.4.2 Microscopía

La caracterización microestructural de la película comestible se determinó por medio de un microscopio óptico ZEIGEN (Figura 33), integrado con una cámara marca MOTICAM y un software Motic Images Plus 2.0, lo que permitió enviar las imágenes del microscopio a la computadora.



Figura 33. Microscopio ZEIGEN con cámara MOTICAM 1000 (1.3 MP Live Resolution).

NOTA: Foto tomada en cubículo de Físicoquímica, FESC-UNAM.

Para realizar la prueba, se cortó la película comestible de acuerdo a una geometría cuadrangular de área igual a 1cm^2 (Figura 34-A), evaluando tres zonas de la película los extremos y centro (Figura 34-B), se coloca la película sobre un portaobjetos y colocando sobre la misma un cubreobjetos, para ser observadas en el microscopio.

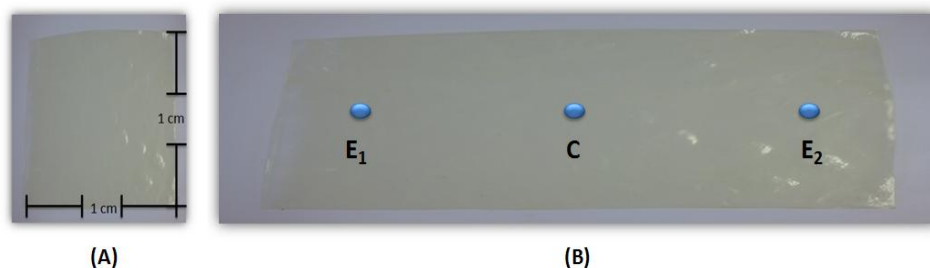


Figura 34. (A) Dimensiones de la película comestible, (B) Zonas evaluadas para prueba de Microscopía.

NOTA: Foto tomada en L-414, FESC-UNAM.

Se empleó el objetivo de 10X, se analizaron diferentes zonas de las películas con la finalidad de observar la homogeneidad de la muestra y la morfología de la película. Se hace la captura de la imagen, se observa la estructura de la película mediante el programa de software del equipo y se mide el diámetro de las gotas de aceite encontradas en la estructura de la película.

2.4 OBJETIVO PARTICULAR 4

Analizar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de orégano mediante pruebas microbiológicas (sensibilidad antimicrobiana) desarrolladas de forma *in vitro* para control de *Listeria monocytogenes*.

2.4.1 Esterilizar el material a utilizar

Se esterilizaron tubos de ensaye para colocar las diluciones de la bacteria e hisopos para emplearlos en la siembra de la bacteria en el medio de cultivo Casoy.

Para la esterilización de los hisopos se colocaron dentro de tubos de ensaye cuidando dejar el tapón semiabierto, de igual forma para los tubos de ensaye se colocan las tapas semiabiertas para evitar que estallen por la presión al meterlos en la autoclave, no se colocaron en gradilla debido al espacio reducido de la autoclave por lo que se metieron en un envase cilíndrico de metal. Para evitar que se muevan los tubos de ensaye, se colocan en un cubo de papel que es elaborado como lo muestra la Figura 35-A, mismo que es acoplado en el envase metálico (Figura 35-B).

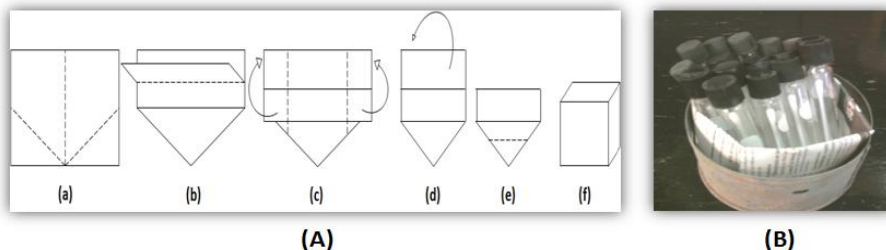


Figura 35. (A) Cubo de papel empleado para esterilización, (B) Tubos de ensaye e hisopos esterilizados.

NOTA: Foto tomada en Laboratorio de Bacteriología, FESC-UNAM.

Se colocan dentro del esterilizador por 15 minutos manteniendo constante la temperatura a 121°C (15 lbs. de presión). Sacar los tubos de ensaye y cerrar bien la tapa para generar vacío y conservar la esterilización para su posterior empleo.

2.4.2 Preparar medio de cultivo en caja petri

Para el desarrollo del medio de cultivo se empleó el agar Casoy o Tripticasa de Soya Agar (TSA).

Preparación:

Teniendo la relación 40.1g de agar – 1L de agua, se preparan 250 ml de medio de cultivo, aproximando obtener 12 cajas de petri con medio de cultivo.

$$0.250 L \left(\frac{40.1 g \text{ agar}}{1 L \text{ agua destilada}} \right) = 10.025g \text{ agar}$$

Se rehidratan 10.025g de agar colocando agua destilada en un matraz Erlenmeyer, disolver por medio de agitación manual durante 5 minutos, se mide el pH debe ser igual a 7.0, colocar una tapa de aluminio para evitar cualquier tipo de contaminación, después calentar en el mechero, se mantiene agitación constante hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo, esterilizar en la autoclave a 121°C (15 lbs. de presión) durante 15 minutos. Dejar enfriar aproximadamente a 45°C. Verter 20 mL de cultivo en cada una de las cajas de Petri estériles, se deja enfriar el agar para que solidifique, obteniendo este resultado se mete en la estufa por 24h, transcurrido este tiempo, revisar que los medios de cultivo no presenten crecimiento de colonias de lo contrario desecharlo, después de esto se conserva en refrigeración de 2° a 8°C para su posterior uso (Figura 36). Es importante que el medio alcance un grosor uniforme de 4mm (± 0.5 mm), si es más fino dará una falsa sensibilidad y si es más grueso dará una falsa resistencia.



Figura 36. Medio de cultivo agar Casoy.

NOTA: Foto tomada en Laboratorio de Bacteriología, FESC-UNAM.

2.4.3 Determinación de la concentración de *Listeria monocytogenes* para realizar pruebas *in vitro*

Para realizar las pruebas de sensibilidad antimicrobiana se determinó la dosis efectiva de *L. monocytogenes*, por medio del método directo de inoculación a partir de colonias aisladas (Sacsquispe & Velásquez, 2002)

2.4.3.1 Preparación del inóculo

Emplear una cepa de *Listeria monocytogenes* e inocularla en agar Casoy, llevar a incubación durante 24h a 37°C.

Verter en los tubos de ensaye solución salina estéril, preparar la disolución de la bacteria empleada, ajustando a la escala 0.5 McFarland.

Agitar en un vórtex mecánico la disolución de bacterias en solución salina para comparar visualmente con el patrón, teniendo luz adecuada se compara la

turbidez de la suspensión bacteriana con la turbidez del patrón sosteniendo los tubos contra un fondo oscuro (McFarland, 1907).

Realizar la siembra de las diferentes concentraciones de bacteria elaboradas, dentro de los 15 minutos siguientes del ajuste de la turbidez del inóculo.

2.4.3.2 Inoculación de las placas

Sumergir un hisopo estéril en la suspensión bacteriana, rotarlo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo.

Inocular la superficie seca de la placa de agar Casoy, estriando con el hisopo y sembrar de manera masiva.

2.4.3.3 Incubación

Se llevan las placas a una estufa de incubación, se colocan en posición invertida durante 24h a 37°C.

2.4.4 Analizar el efecto antimicrobiano

2.4.4.1 Prueba *in vitro* (sensibilidad antimicrobiana)

Para determinar la efectividad del antimicrobiano utilizado (aceite esencial de orégano) en las películas comestibles se realizaron pruebas *in vitro* con tres concentraciones (0.5, 1.0 y 1.5%) de aceite esencial contenido en la película, empleando el método de difusión en agar, este método permite determinar el grado de inhibición del crecimiento de los microorganismos (Guiza & Rincón, 2007).

2.4.4.1.1 Inoculación de las placas

Se empleó la concentración de *Listeria monocytogenes* previamente determinada, concentración que permitió observar el crecimiento de la bacteria en el medio de cultivo, se realizó la siembra de la bacteria empleando un hisopo.

2.4.4.1.2 Aplicación de la película

Colocar la película sobre la superficie de la placa de agar Casoy, con la ayuda de una pinza estéril o la punta de una aguja presionando suavemente sobre cada película, para asegurar un contacto completo con la superficie del agar.

Distribuir la película uniformemente de modo que estén a una distancia mínima de 25mm una de la otra, se debe evitar la superposición de las zonas de inhibición; la película no puede ser removida una vez que tomó contacto con la superficie del agar debido a que los componentes pueden difundirse rápidamente.

2.4.4.1.3 Incubación

Se incuban las placas en posición invertida dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de las películas, durante 24h a una temperatura constante de 37 °C. Después del tiempo de incubación, examinar cada placa y medir los halos de inhibición que presenta la película comestible.

2.4.4.1.4 Sensibilidad antimicrobiana

Para observar la efectividad del antimicrobiano (aceite esencial de orégano) ante la inhibición del crecimiento de la bacteria, se realizaron películas sin aceite esencial y películas con aceite esencial con tres diferentes concentraciones (0.5, 1.0 y 1.5%) (Paredes, Gastélum, & Silva, 2007); se cortaron las películas con geometría cuadrangular de 1cm² colocándolos en el medio de cultivo como indica la Figura 37 para observar si la película presenta o no inhibición.

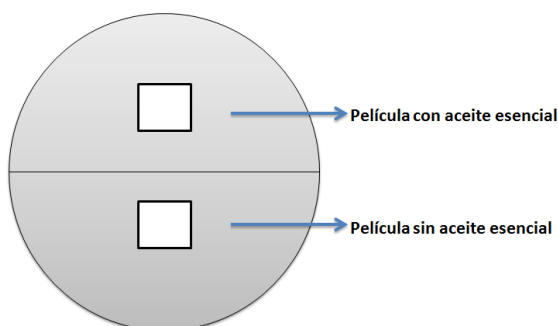


Figura 37. División del medio de cultivo y ubicación de las películas comestibles.

El efecto antimicrobiano de la película se determinó observando la formación de halos de inhibición en el área de contacto así como alrededor de la película. (Romero, Zamudio, & Bello, 2011).

2.4.2.1.5 Lectura de las placas

Medir las zonas de inhibición completa (incluyendo la película) usando una regla o calibrador. Se debe mantener iluminada la parte posterior de la caja petri con una luz reflejada localizada a unos cuantos centímetros sobre un fondo negro.

Tener la precaución de observar la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por efecto del paralelismo.

Medir la inhibición del crecimiento visible que puede ser detectado mediante observación visual, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona.

2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se estableció aplicar un análisis estadístico simple para el tratamiento de los datos obtenidos en cada prueba realizada.

El análisis consiste en obtener la media aritmética (medida de tendencia central), desviación estándar (medida útil para saber cuánto difieren entre sí los datos) y el coeficiente de variación mediante las ecuaciones que se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Ecuaciones para tratamiento estadístico.

MEDIDA DE TENDENCIA	FÓRMULA
Media aritmética	$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n}$
Desviación estándar	$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$
Coeficiente de variación	$C.V = \frac{\sigma}{\bar{x}} * 100$
DONDE:	$x_i =$ número de datos $n =$ tamaño de la muestra

Se realizó diferente tratamiento para cada evaluación, debido a que la cantidad de muestras y repeticiones realizadas fue variable en cada prueba, de modo que no fue posible generalizarlo en un solo diseño estadístico.

De acuerdo al número de muestras utilizadas en cada ensayo y el número de réplicas realizadas, se analizó de manera particular en cada determinación.

En la Tabla 13, se muestra de manera concreta el número de pruebas, muestras y réplicas, que se efectuaron en cada determinación para el análisis estadístico de los datos, obteniendo siempre en cada prueba el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

Las tablas que se reportan en el capítulo de resultados, corresponden al promedio obtenido en cada determinación realizada, únicamente se emplean los valores de desviación estándar y coeficiente de variación cuando se presenta una dispersión significativa en los datos.

Tabla 13. Resumen de las determinaciones realizadas.

DETERMINACIÓN	No. DATOS	#No. REPETICIONES
OBJETIVO PARTICULAR 1		
Materia extraña	4 lotes	3
% Humedad	4 lotes	3
Rendimiento- Extracción	1 muestra	38
Índice de Refracción	38 a.e.o	3
Densidad	1 muestra	3
Organoléptico	2 mtas.- 4 pruebas	30
OBJETIVO PARTICULAR 2		
Estabilidad	2 mtas.-3 tiempos	3
Espesor	5 zonas	3
OBJETIVO PARTICULAR 3		
Permeabilidad al O ₂	1 muestra	3
Permeabilidad al vap. H ₂ O	1 muestra	3
Ángulo de contacto	3 mtas.- 3 zonas	5
Textura	3 muestras	3
Color	1 muestra	3
Microscopía	3 mtas.- 3 zonas	3
OBJETIVO PARTICULAR 4		
Halo de inhibición	3 concentraciones	3



CAPÍTULO III

RESULTADOS

Y

DISCUSIÓN

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 RESULTADOS OBJETIVO PARTICULAR 1

3.1.1 Obtención de material vegetal empleado para la extracción de aceite esencial (Orégano seco).

Las hojas de orégano seco, se obtuvieron en la Colonia San Juan Atlamica, donde se investigó que la matriz distribuidora tiene la siguiente ubicación: Mexiquense s/n nave 2, Bodega 2 Interior B, Ex hacienda los Portales, Tultitlán Estado de México, C.P. 54900. Se compraron 4 lotes de hojas de orégano seco (en los que también estaban presentes inflorescencias) de 1 kg cada lote, el material vegetal se obtuvo de marzo a octubre de 2012.

3.1.2 Identificación botánica de la especie de orégano empleado.

La identificación taxonómica del material botánico fue realizada por la M. en C. Ma. Edith López Villafranco ⁴, el ejemplar de referencia se integró en la colección botánica del Herbario IZTA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM (Figura 38) y registrado con los datos que se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Identificación taxonómica del material biológico empleado.

NOMBRE CIENTÍFICO	FAMILIA	NOMBRE POPULAR	No. DE REGISTRO
<i>Lippia graveolens</i> Kunth	VERBENACEAE	“Orégano”	2187 IZTA



Figura 38. Ejemplar integrado a la colección botánica.

NOTA: Foto tomada en Herbario, FESI-UNAM.

⁴ Certificado de identificación taxonómica de orégano mexicano (Figura 50, Anexo IV).

3.1.3 Descripción del material vegetal.

La especie *Lippia graveolens* Kunth. presenta las siguientes características: Se observa que en los lotes de muestra vegetal solo se tiene la parte aérea de la planta (hojas, pequeños tallos y algunas inflorescencias).

Las hojas son de color verde grisáceo, entre 1 y 2.5 cm de largo y de 0.5 a 1.0 cm de ancho, de forma ovalada con bordes dentados con el haz denso y con ligeras vellosidades (Figura 39-A). El envés tomentoso, el margen finamente crenado, el ápice redondeado, pecíolos de 5 a 10 mm de largo (Figura 39-B). Las inflorescencias en forma de espigas oblongas, constituidas por pequeñas flores, sésiles y de 4-10 mm de largo, ovaladas a lanceoladas (Figura 39-C).

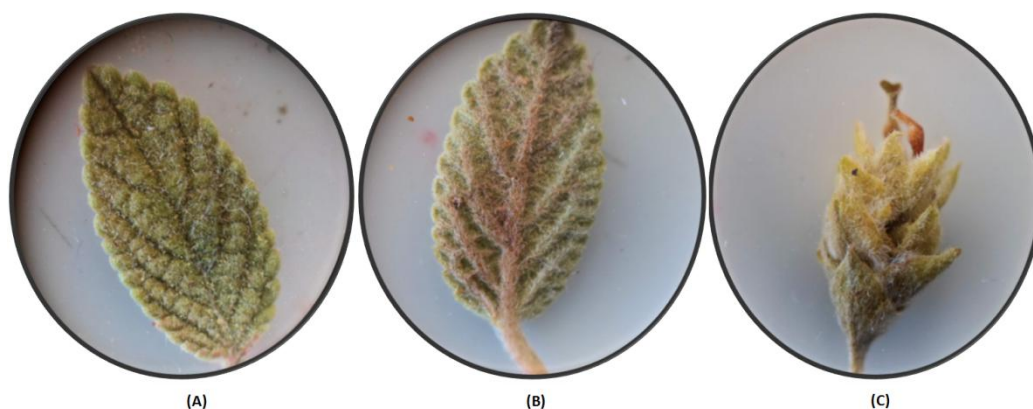


Figura 39. Vista macroscópica de la especie *Lippia graveolens* Kunth, (A) Haz de la hoja, (B) Envés de la hoja, (C) Inflorescencia.

NOTA: Foto tomada en L-324, FESC-UNAM.

3.1.4 Control de calidad de materia prima (Hojas de orégano seco)

3.1.4.1 Determinación de materia extraña

La Tabla 15 muestra el porcentaje y naturaleza de la materia extraña de la muestra orégano.

Tabla 15. Materia extraña en cada lote de orégano adquirido.

NÚM. DE LOTE Y MES DE ADQUISICIÓN	MATERIA EXTRAÑA (%)	OBSERVACIONES
Lote 1. Marzo 2012	0.96	Trozos de madera, pequeñas basuras.
Lote 2. Abril 2012	0.74	Cambios de coloración en hojas.
Lote 3. Mayo 2012	0.80	Mezcla con otras especies vegetales.
Lote 4. Octubre 2012	0.78	Trazas de materiales de empaque.

Además del almacenaje que depende de la variabilidad de estas cifras, también el transporte del mismo, se deben tener en cuenta estos criterios, para mantener en condiciones que protejan contra la contaminación y reduzcan al mínimo los daños de la materia prima almacenadas, prolongando su vida útil y manteniendo alta calidad del material (CAC/RCP 42, 1995).

Los valores obtenidos permanecen dentro de los límites permisibles establecidos, los valores son aceptables excepto en el lote 1, en que las cifras están cercanas al límite máximo que es del 1% (NMX-F-429, 1983).

De acuerdo con (WHO, 1998), el porcentaje máximo permitido es del 2%, se concluye que la muestra de orégano adquirida se encuentra dentro de las especificaciones establecidas.

3.1.4.2 Determinación de la humedad en hojas de orégano seco

Se muestra en la Tabla 16 el porcentaje de humedad obtenido en cada lote de orégano que se adquirió para realizar la extracción del aceite esencial.

Tabla 16. Porcentaje comparativo de humedad en lotes de orégano adquiridos.

NÚM. DE LOTE Y MES DE ADQUISICIÓN	HUMEDAD (%)
Lote 1. Marzo 2012	6.72
Lote 2. Abril 2012	6.23
Lote 3. Mayo 2012	6.57
Lote 4. Octubre 2012	6.80

El contenido de humedad en los alimentos es un factor de calidad en el alimento, se debe establecer un control sobre esta propiedad para asegurar estabilidad y conservación teniendo prolongada vida útil.

El límite máximo permitido para el orégano seco es de 10% (NMX-F-429, 1983), los valores obtenidos en las determinaciones se encuentran por debajo del intervalo establecido por la norma, por lo que se indica que el material adquirido fue secado mediante un proceso controlado, obteniendo un producto de alta calidad comercial (CAC/RCP 42, 1995).

Con los datos obtenidos, es posible afirmar que el producto se mantendrá estable durante largos periodos de almacenamiento, impidiendo el desarrollo de microorganismos, no genera reacciones de deterioro, es decir la muestra se mantiene en condiciones óptimas para su posterior utilización.

3.1.5 Extracción del aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* Kunth).

Para obtener el aceite esencial de orégano, se destiló en 38 ocasiones, colocando siempre la misma cantidad de agua destilada y muestra de orégano, en cada destilación.

El proceso se realizó empleando 100g de muestra vegetal y 1600 mL de agua destilada, se mantuvo a una temperatura de ebullición, durante un tiempo de 180 minutos, tiempo suficiente para extraer todo el aceite esencial del material, destilando a razón de 1ml/h, controlando que la recirculación del agua estuviera a temperatura constante de 10 °C, con ello se aseguraba una adecuada condensación de los compuestos volátiles.

Se observó que el volumen de agua colocada en el dispositivo de destilación requería 30 minutos para iniciar la generación de vapor, después de ese tiempo se generaba la primera gota de aceite esencial.

La Figura 40, representa el rendimiento de aceite esencial obtenido en cada extracción.

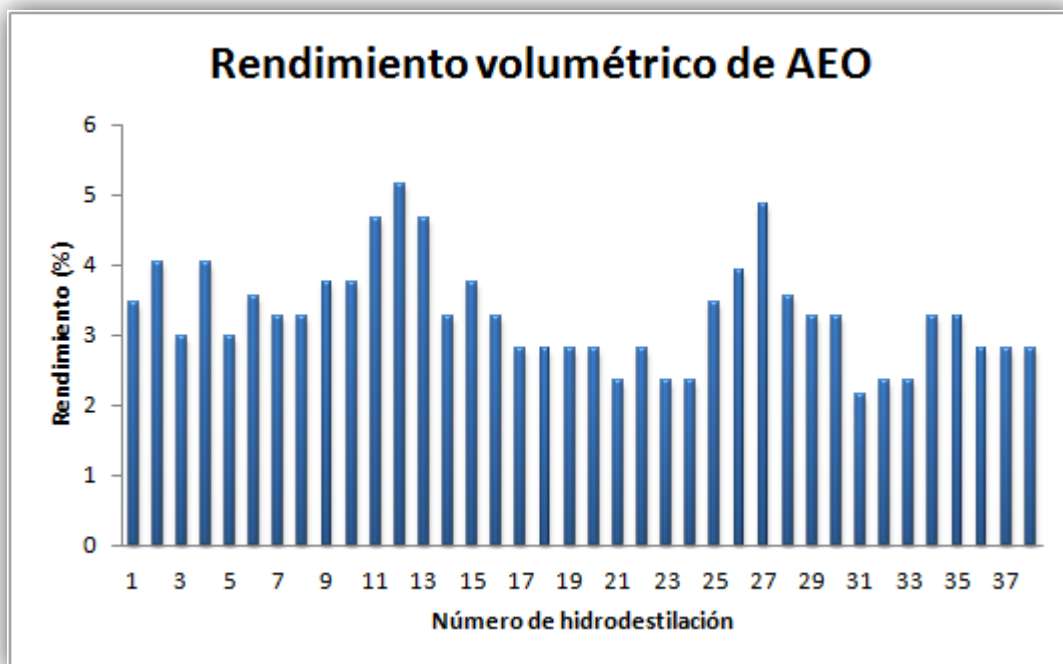


Figura 40. Rendimiento de aceite esencial de orégano obtenido en cada destilación.

Se obtuvo el promedio del rendimiento de las extracciones realizadas, siendo 3.2894% el valor calculado, de manera general se obtuvo un alto rendimiento

comparado con datos reportados sobre la misma especie (Flores, Hernández, & López, 2011), justificando así que el método de extracción mediante hidrodestilación y la selección del material vegetal empleado fueron las adecuadas para la obtención de aceite esencial de orégano.

En la Figura 40, se muestra que los datos no mantienen una misma tendencia, la variación de los resultados se debe a varios factores pudiéndose mencionar los siguientes: el flujo de vapor, control de la temperatura del sistema y flujo de agua de enfriamiento, temperatura del espacio donde se realizó la destilación, el tiempo que había estado almacenado el material, diseño de la trampa Clevenger, características de la muestra vegetal (variación estacional).

En las barras con mayor valor de rendimiento, da este resultado porque en la muestra vegetal suministrada a la destilación, había mayor cantidad de inflorescencias, la bibliografía indica que es en esta parte de la planta donde se concentra la mayor cantidad de aceite esencial.

De modo contrario, también se muestran barras que están por debajo del promedio de rendimiento, por ejemplo en el número de hidrodestilación 31, se tiene un porcentaje bajo, se considera que el factor relevante que influyó es el sistema de enfriamiento no adecuado, el proceso se realiza a temperaturas muy altas y la volatilización de los componentes del aceite se hace mucho más fácil, deduciendo que un sistema de condensación inadecuado provoca la pérdida de los componentes volátiles, llevando así a obtener menor rendimiento en la destilación.

Se estableció colocar 100 g de muestra y 1.6 L de agua debido a que esta relación permitió obtener alto rendimiento de aceite esencial y el volumen de agua fue suficiente para finalizar el proceso sin tener que pausar el sistema para suministrar más cantidad.

Se debe tener control estricto de la temperatura ya que el material vegetal está inmerso en el agua en ebullición durante todo el tiempo de la extracción, los productos volátiles pueden descomponerse parcial o totalmente modificando así su composición química, calidad o el rendimiento del producto.

3.1.6 Parámetros de calidad del aceite esencial

3.1.6.1 Físicos

3.1.6.1.1 Índice de refracción

Se midió el índice de refracción al aceite esencial de orégano obtenido de cada destilación, obteniendo los datos que se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Comparativo de promedios obtenidos de Índice de refracción (20°C ± 1°C).

η_D REFERENCIA	η_D EXTRAÍDO	η_D ALMACENADO
1.5020 a 1.5080	1.5026	1.5079

REFERENCIA: (FCC, 1996).

El índice de refracción, es utilizado como una prueba para control de impurezas y calidad en aceites puros, tanto a nivel laboratorio como nivel industrial.

Los aceites esenciales poseen un índice de refracción elevado, el promedio del índice obtenido para el aceite de orégano a 20°C fue de 1.5026, encontrándose en el intervalo reportado como referencia en la Tabla 17, teniendo los intervalos de refracción similares entre cada destilado, se puede hacer una mezcla de todos los aceites obtenidos, de lo contrario no se pueden combinar, ya que afectaría las propiedades generales del aceite homogenizado final.

Se separó una fracción de esta mezcla resultante, para almacenarlo y comprobar esta propiedad después de un periodo de almacenamiento. Los datos que se muestran en la Tabla 17, hacen el comparativo entre el valor del índice de refracción del aceite esencial recientemente obtenido de la hidrodestilación y otro almacenado durante un periodo de ocho meses.

Ambos valores se encuentran en el intervalo de los parámetros establecidos en la norma, teniendo como observación que el índice almacenado presenta un valor próximo al límite permitido, mientras mayor sea el valor del índice de refracción, más lentamente viajará la luz a través de él, en este caso, se ve directamente la diferencia con la coloración que presenta cada uno.

Se realizó la comparación en esta determinación, para observar si el método de almacenamiento había sido el adecuado, corroborándose con el índice que después del tiempo almacenado, el aceite presentaba un índice que está dentro del rango permisible, sin embargo, no se puede constatar que la efectividad de sus componentes continúe siendo la misma.

En la Figura 41, el aspecto de cada aceite muestra un mínimo cambio en el color entre cada uno, en el producto almacenado se ve un tono amarillo más intenso, con la coloración que presenta, se intuye que hay oxidación de algunos componentes del producto.

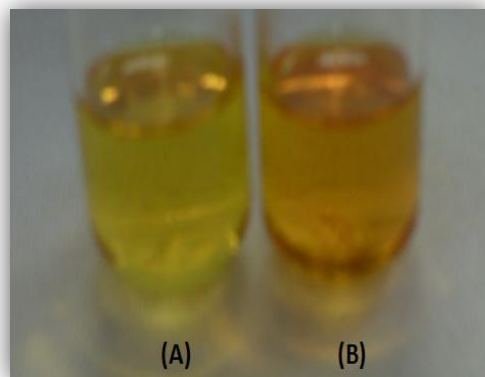


Figura 41. Comparativo de aceites esenciales, (A) Extraído, (B) Almacenado.

NOTA: Foto tomada en L-324, FESC-UNAM.

El proyecto está enfocado en la efectividad del aceite como antimicrobiano por lo que con lo indicado anteriormente se establece que para obtener resultados adecuados durante la experimentación, se emplee el aceite con un periodo corto de almacenamiento, asegurando efectivos resultados en determinaciones posteriores.

3.1.6.1.2 Densidad

En la Tabla 18, se muestran los valores comparativos de densidad, entre el aceite obtenido de manera experimental y uno reportado en literatura.

Tabla 18. Comparativo de promedios obtenidos de densidad (g/mL, 20°C ± 1°C).

ρ REFERENCIA	ρ EXPERIMENTAL
0.935 a 0.960	0.9349

REFERENCIA: (FCC, 1996).

El promedio obtenido en el aceite de estudio a 20°C fue de 0.9349 g/mL, valor que se aproxima estrechamente al límite inferior reportado de 0.9350 g/mL, la diferencia es mínima entre el valor resultante y el de la literatura, probablemente se deba a diferencias en el origen de la planta puesto que la densidad de los aceites varía dependiendo de la especie y del lugar de origen de la muestra vegetal.

Se observa que la densidad del aceite esencial es menor a la densidad del agua (0.9983 g/mL 20°C), característica que era de esperarse, ya que es la responsable de hacer posible la separación de fases entre el aceite y el agua durante el proceso de destilación.

3.1.6.2 Espectrofotométricas

3.1.6.2.1 IR

El género *Lippia* presenta variación en la concentración de su composición química teniendo como principales constituyentes químicos los compuestos fenólicos: timol y carvacrol.

En la Figura 42, se muestra el espectro infrarrojo del aceite esencial de orégano, señalando los valores de cada banda espectral para ser analizado en conjunto con los componentes químicos mayoritarios presentes en el producto obtenido.

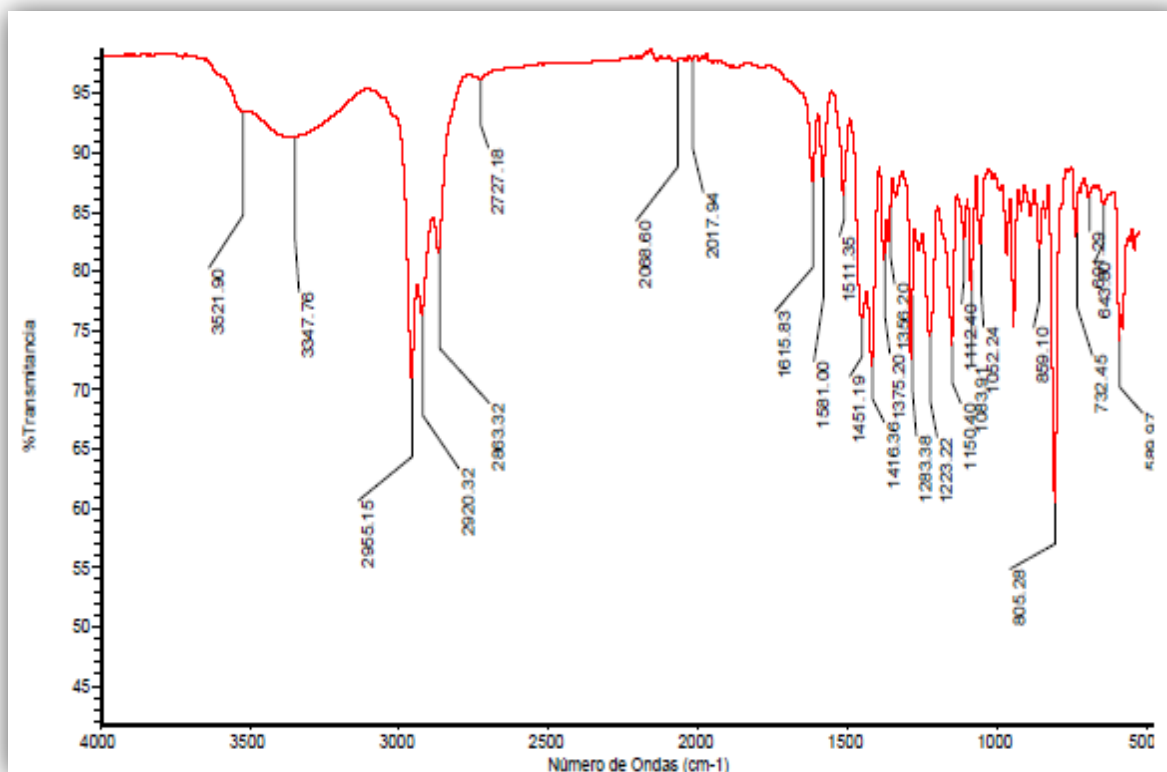


Figura 42. Espectro IR de aceite esencial de orégano.

Los espectros de absorción IR del aceite esencial de orégano y los compuestos fenólicos, se compararon con los intervalos reportados en tablas de cada grupo funcional (Pretsch, 2009), para encontrar los grupos funcionales presentes.

La Tabla 19, representa un comparativo entre las principales frecuencias identificadas en el espectro infrarrojo del aceite esencial de orégano y los espectros de sus componentes identificados como mayoritarios: timol y carvacrol.⁵

⁵ Espectros Infrarrojo: Carvacrol y Timol (Figuras 51-52, Anexo V)

Tabla 19. Frecuencias identificadas en espectrofotometría IR.

GRUPO FUNCIONAL	REPORTADO $\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)	CARVACROL $\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)	TIMOL $\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)	AEO $\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)
ALCANOS				
C-H _{ST}	3000-2840	2900	2890	2863.32
CH ₂ δ'	1475-1450	---	1450	1451.19
CH ₃ δ' _{sv}	1395-1365	1370	1380	1356.20
CH ₃ γ	1250-800	800	800	805.28
CH ₂ γ	770-720	750	750	732.45
C-D _{ST}	220-2080	---	---	2088.60
ALQUENOS				
=CH _{ST}	3040-3010	3010	3020	---
=CH δ' _{ip}	1420-1290	1300	1300	1416.36
=CH δ' _{oop}	1005-675	700	---	691.29
AROMATICOS				
ar C-H _{ST}	3080-3030	---	3050	---
ar C-C	1625-1575	1600	1580	1581.00
Comb	2000-1650	1650	---	----
ar C-H δ' _{ip}	1250-950	960	980	1052.24
ar C-H δ' _{oop}	900-650	---	---	859.10
ALCOHOLES				
O-H _{ST}	3650-3200	3350-3200	3600-3400	3550-3200
C-H _{ST}	3080-3030	---	---	3030
O-H _{oop}	1450-1200	1400	1400	1416.36
C-O _{ST}	1260-970	1240	1240	1223.22

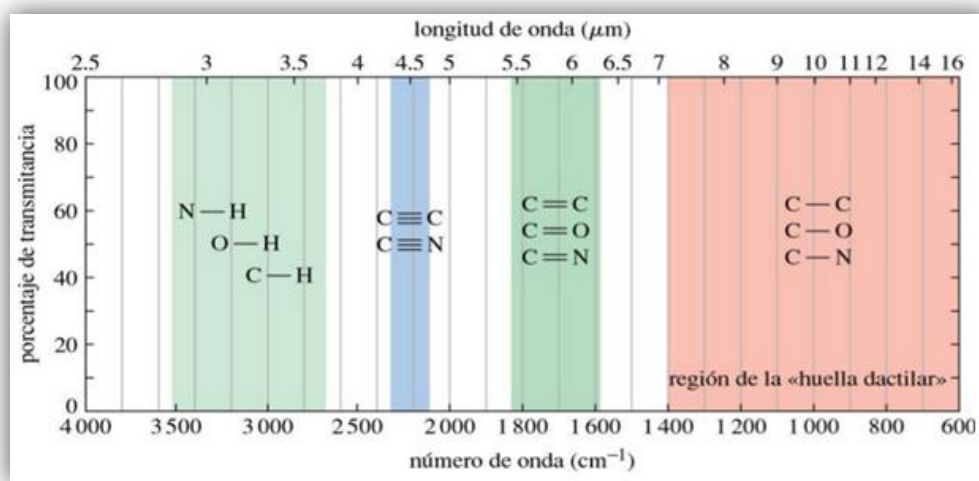


Figura 43. Regiones del espectro IR.

Cada grupo funcional absorbe radiación (genera una banda IR) en un intervalo concreto de frecuencias, se analizaron las cuatro regiones espectrales: Región de vibración de extensión X-H, Región del triple enlace, Región del doble enlace, Región de huella dactilar. Ésta última región tiene relevante importancia debido a que se puede establecer la correspondencia de dos espectros, en esta región constituye la prueba de identidad de la muestra evaluada (Skoog, Holler, & Crouch, 2008), en la Figura 43, se muestran las regiones que se evalúan en los espectros infrarrojo, mostrando que tipo de grupo funcional se presenta en cada región.

De las bandas espectrales del carvacrol y timol, se realizó el comparativo con el aceite esencial de orégano, para identificar la presencia de los de los grupos funcionales, en el análisis se muestra que existe similitud entre las frecuencias identificadas en el espectro característico de cada componente, concluyendo que están presentes los compuestos fenólicos mayoritarios en el aceite esencial obtenido mediante hidrodestilación.

3.1.6.3 Organolépticos

A partir de la prueba de evaluación sensorial se generalizan los atributos del aceite esencial de orégano determinado por el panel de jueces (Tabla 20).

Tabla 20. Atributos sensoriales del aceite esencial de orégano.

PARÁMETRO	DESCRIPTOR
Sabor	Especiado agradable
Color	Amarillo
Apariencia	Líquido
Olor	Característico

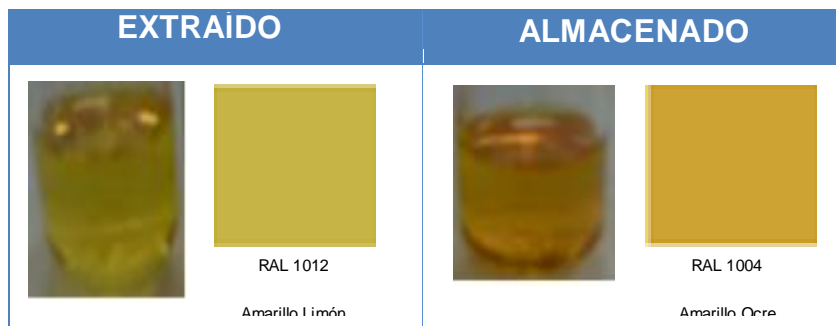
En la prueba se evaluaron cuatro parámetros en dos muestras diferentes indicadas como A (aceite extraído) y B (aceite extraído almacenado).

En los resultados se estableció que el aceite esencial de orégano se presenta en forma de líquido traslúcido, no viscoso, sin precipitados, de color amarillo, presenta olor concentrado de orégano descrito como característico de la materia prima empleada (*sui generis*), el sabor se identificó como especiado causando aceptación al degustarlo.

No existió diferencia entre los resultados de los parámetros correspondientes al olor, sabor y apariencia conservando iguales atributos después de un prolongado tiempo; respecto al color, se ve afectado el resultado por efecto del tiempo de almacenamiento (8 meses), teniendo una coloración amarilla evaluada con un tono en mayor intensidad.

En la Tabla 21 se representan las muestras que fueron valoradas y el color asignado por los jueces mediante la carta de color.

Tabla 21. Comparativo del parámetro de color en AEO.



3.2 RESULTADOS OBJETIVO PARTICULAR 2

3.2.1 Evaluación de la estabilidad de la emulsión.

Se determinó la estabilidad de la emulsión en diferentes condiciones de almacenamiento: tiempo y temperatura.

Tabla 22. Porcentaje de separación de fases en la emulsión.

% Separación	t ₁	t ₂	t ₃
T ₁	---	---	4.33
T ₂	---	---	1.33

NOTA: Tiempo (t₁=1 día; t₂=1 semana; t₃=1 mes) / Temperatura (T₁=20 °C; T₂= 6°C).

La Tabla 22, muestra los valores obtenidos en la determinación de la estabilidad, se identifica que no existe separación de fases en el tiempo 1 y 2.

La ausencia de separación entre la fase acuosa y la fase oleosa, se debe principalmente a la interacción que ejerce el emulsificante empleado.

Cuando se forma el sistema disperso, el tensoactivo se absorbe en la interfase entre el agua y el aceite, con su cadena hidrófoba orientada hacia el aceite y el grupo hidrófilo orientado hacia el agua.

El tensoactivo presenta un carácter anfífilico, es decir, tiene afinidad con la fase dispersa y el medio dispersante permitiendo de esta manera que el sistema sea estable en el que los glóbulos de aceite conservan su carácter inicial y permanecen distribuidas uniformemente en la fase continua durante prolongados periodos de tiempo.

La separación de fases, se presenta hasta el tiempo 3, equivalente a un mes del almacenamiento de la emulsión, se observa que los factores principales que alteran la estabilidad de este sistema son la diferencia de densidad y las temperaturas que se manejaron, siendo la temperatura 1 quien presenta mayor porcentaje de separación comparado con la emulsión conservada en temperatura de refrigeración, aunque también se ve afectada por el tamaño y la distribución de de las partículas, regidos por la cantidad y la eficacia del emulsificante, el orden de la mezcladura y la clase de agitación que se haga.

Para el tiempo 3 en ambas temperaturas la emulsión ya no es estable, debido a la presencia del fenómeno conocido como creaming que ocurre cuando se deja en reposo la emulsión, la separación se presenta por diferencia de densidades en el que la fase dispersa se concentra en la parte superior del sistema.

El fenómeno denominado creaming es reversible sometiendo la emulsión a una operación mecánica de agitación, se logran incorporar de nuevo las fases en un sistema homogéneo, debe considerarse la efectividad que tendrán los componentes incorporados en la formulación después de este periodo de almacenamiento.

El tensoactivo estabiliza a la emulsión básicamente por dos efectos: uno, por medio de una barrera electrostática, generando un potencial de repulsión que evita la floculación de las gotas de la fase dispersa; y el segundo, por una barrera mecánica, que proporciona un carácter elástico adecuado, el cual evita la ruptura y coalescencia de las gotas de la emulsión.

La potencial interacción entre los componentes de la formulación en el seno de la solución y en la interfase, además de la adición del tensoactivo fue lo que permitió que la emulsión elaborada se mantuviera estable por un tiempo prolongado de tiempo.

3.2.2 Selección de la película comestible.

La película se seleccionó mediante un análisis visual que consistió en la inspección detallada de las siguientes características:

- Transparente
- Flexible
- Ausencia de poros, rugosidad superficial o grietas,
- Al desmoldarla no presentará rompimiento en su estructura.

La Figura 44, muestra la apariencia física de la película seleccionada como óptima bajo los criterios antes mencionados.



Figura 44. Película comestible antimicrobiana seleccionada.

NOTA: Foto tomada en L-414, FESC-UNAM.

Dentro de las operaciones realizadas para la elaboración de la película, el preformado es una de las etapas importantes, dependiendo de la manipulación con la que se efectúe este proceso, se verá reflejado en las características finales de la película.

El espesor fue controlado vertiendo la misma cantidad de emulsión en el molde (20 mL) cubriendo en su totalidad la superficie del bastidor, asegurando de esta manera que el espesor de la película será uniforme en toda el área superficial.

Controlando el tiempo de secado (20 h) y la temperatura ($20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) se consigue obtener una película comestible de calidad frente a las características de transparencia, consistencia y propiedades mecánicas, finalizado el secado se tiene una película con un área de 192 cm^2 , el emplear un acetato durante el desmoldado permitió evitar el contacto directo con la película además de facilitar la manipulación del film.

3.2.3 Medición de espesor de la película comestible seleccionada.

De acuerdo con al Tabla 23, se indica que los espesores medidos son homogéneos en toda la película excepto en la sección A que presenta una variación de 0.001 respecto a la media.

Tabla 23. Espesor de la película determinado en diferentes secciones de la PCA.

	A	B	C	D	E
ESPESOR (mm)	0.066	0.065	0.065	0.065	0.065

Se controló la cantidad de emulsión vertida en el bastidor de manera que este factor no fue el que modificó el espesor, sin embargo, se revisó que el anaquel donde fueron colocados los bastidores para el proceso de secado no se encuentra adecuadamente nivelado, afectando directamente el espesor, afectando la uniformidad de la película comestible.

El rango en que varía el espesor de la sección A con respecto a las demás secciones, no presenta diferencia significativa entre los datos, por lo que se considera despreciable, generalizando de esta manera que el espesor de la película es de 0.065mm, a medida que el espesor aumenta se incrementa la resistencia a la transferencia de masa a través de ella.

3.3 RESULTADOS OBJETIVO PARTICULAR 3

3.3.1 Propiedades de barrera

3.3.1.1 Permeabilidad al oxígeno

La mayoría de las investigaciones sobre películas comestibles incluyen la determinación de permeabilidades a los gases, especialmente oxígeno y dióxido de carbono, ya que estas propiedades están relacionadas con las velocidades de oxidación y respiración de los alimentos en los que se aplican. Sin embargo es muy difícil comparar los resultados obtenidos de una investigación a otra por la diferencia en las condiciones experimentales como temperatura, espesor de las películas, composición de la película y la humedad relativa (Kester & Fennema, 1986).

Es por ello que no se muestra un comparativo, solo se expone el dato resultante de la determinación, el valor obtenido en la permeabilidad al oxígeno para las películas comestibles antimicrobianas es de $1.0476 \text{ E-5 gm}^{-1}\text{día}^{-1}\text{atm}^{-1}$ ⁶.

La permeabilidad a los gases puede ser vista como un factor negativo o positivo dependiendo de la aplicación y la naturaleza del gas permeante. Si se requiere liberar los gases producidos por reacciones metabólicas del alimento es deseable una alta permeabilidad del material del envase. Un ejemplo de esto, es la difusión de los productos de respiración de los alimentos como el etileno y dióxido de carbono, al exterior de la película (Mc Hugh & Krochta, 1994).

⁶ Valores para determinar PO_2 (Tabla 33, Anexo VI).

Las películas con micro-poros permiten mayor intercambio de gases y son capaces de mantener una atmósfera modificada adecuada para minimizar las reacciones fisiológicas de los alimentos. En ocasiones se requiere una alta permeabilidad del material para que ingrese el oxígeno, debido a que este gas permite mantener distintas características del alimento.

Por otra parte, si se requiere que el alimento no sufra alteraciones por la entrada de gases, es deseable una baja permeabilidad así el control de los intercambios gaseosos permite la atenuación de los procesos de oxidación que se dan en determinados alimentos. Para productos que se ven afectados por la presencia de este gas, la reducción o la destitución total, junto con la prevención de su entrada al interior puede llegar a minimizar los efectos oxidativos y por consecuencia, prolongar la vida útil del alimento manteniendo su calidad.

El gas de mayor importancia en alimentos envasados es el oxígeno dado que la vida útil de muchos productos perecederos es afectada por la presencia o ausencia de este gas. El oxígeno juega un papel crucial en la vida útil de los alimentos ya que participa en el desarrollo de microorganismos, cambios de color en carne fresca y curada, oxidación de lípidos y en la respiración de frutas y vegetales. Estos cambios o su combinación provocan alteraciones en el color, olor, sabor y deterioro global de la calidad del alimento. Otros gases importantes de acuerdo a la aplicación de que se trate, son el dióxido de carbono, etileno, alcoholes y nitrógeno (Sothornvit & Krochta, 2000) es por esta razón que siendo el gas de mayor relevancia se determinó esta prueba empleando oxígeno como gas permeante.

Los plastificantes son utilizados para disminuir las atracciones intermoleculares entre cadenas de polímeros adyacentes, lo que a su vez facilita la penetración de las moléculas de gas a través de la estructura de la película comestible (Bosquez, Vernon, & Guerrero, 2003) siendo el aceite esencial y la matriz de polisacárido - proteína quienes forman una red que presenta una excelente barrera al transporte de gases.

Las películas de alta barrera al oxígeno se emplean para alimentos de larga vida útil o muy sensibles a deterioro por parte de los gases. La presencia de oxígeno puede acelerar la pérdida de la calidad nutritiva y sensorial de los alimentos, la barrera evita el egreso de aromas característicos como ingreso de olores indeseables del ambiente.

3.3.1.2 Permeabilidad al vapor de agua

Una de las propiedades más importantes de una película comestible es su permeabilidad al vapor de agua.

En la Tabla 24, se muestran los valores para velocidad de transferencia de vapor de agua (VTVA) y permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas evaluadas.⁷

Tabla 24. Resultados de permeabilidad al vapor de agua de películas comestibles antimicrobianas.

	VTVA (gh ⁻¹ m ⁻²)	PVA (gh ⁻¹ m ⁻¹ Pa ⁻¹)
REFERENCIA	31.755	8.530 E-7
EXPERIMENTAL	16.4592	7.4661 E-7

Se muestra un resultado de referencia, (Carballo & Martínez, 2010) con el cual se realiza un comparativo de los valores obtenidos de velocidad de transmisión de vapor de agua y permeabilidad al vapor de agua.

Respecto a los valores de PVA no existe diferencia significativa entre el valor de referencia y el experimental, mientras que en el valor de VTVA se denota lo contrario, esto se puede explicar debido a la función que cumplen los componentes de la formulación realizada, teniendo que los materiales empleados forman una estructura con interacción entre sus componentes que provocan se reduzca la velocidad de transmisión teniendo una estructura menos permeable. Los recubrimientos y películas comestibles elaboradas a partir de polímeros naturales, tales como polisacáridos (almidón y derivados de la 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.

Los polisacáridos y proteínas son conocidos por su capacidad para formar películas, a pesar de que pueden actuar como barreras efectivas al transporte de gases (O₂ y CO₂), presentan permeabilidad al vapor de agua elevada, las películas comestibles son normalmente preparados usando éstos materiales y algunos aditivos como plastificantes y agentes de entrecruzamiento requeridos en algunos casos, en general los polisacáridos generan películas que no son buena barrera al vapor de agua, debido a su naturaleza hidrofílica (Krochta J. , 1992).

Los polímeros ideales no exhiben efecto del espesor sobre la permeabilidad al vapor de agua, el efecto se da directamente por la interacción que ejercen los componentes de la película comestible, cuando la película no está actuando como una barrera simple, se presenta un transporte difusional podría atribuirse a asociaciones entre las moléculas de agua y los grupos funcionales. Estas

⁷ Valores para determinar PVA (Tabla 34, Anexo VII).

asociaciones entre el agua y la película provocan hinchamiento y cambios de estructura que facilitan la difusión de gases y vapores (Krochta J. , 1992).

Tanto las proteínas como los polisacáridos son materiales hidrofílicos que interactúan con el agua afectando sus propiedades mecánicas y de barrera. Las interacciones generalmente tienen un efecto plastificante que ocasiona un incremento en la permeabilidad.

La incorporación del plastificante modifica la organización molecular, haciendo la estructura menos densa y como consecuencia más permeable. El incremento de la permeabilidad con el contenido de plastificante puede estar relacionado a hidrofobicidad de la molécula de plastificante (Cuq, Gontard, & Guilbert, 1997), al introducir un plastificante hidrofílico que favorece la adsorción y desorción de moléculas de agua se mejora la permeabilidad al vapor de agua de películas basadas en hidrocoloides (Chinnan & Park, 1995).

El aumento de permeabilidad permite el movimiento del vapor de agua a través de la película, previniendo la condensación de agua, que puede ser una fuente potencial para el deterioro microbiano en el alimento. Si las películas se elaboran a base de polisacáridos puros, sin la adición de plastificantes, tienden a presentar velocidades de transferencia al vapor de agua más bajos que la mayoría de las películas hechas a base de proteína. La adición de lípidos en las formulaciones de las películas hechas a base de polisacáridos las hace excelentes barreras al vapor de agua. Lo anterior se observa en los valores bajos de VTVA de la película elaborada comparada con la de referencia.

Las películas con mayor flexibilidad tienen una mayor permeabilidad al vapor de agua, el aceite esencial incorporado contrarrestó el aumento de permeabilidad ocasionado por el plastificante debido a que el aceite esencial es poco hidrofílico.

Por lo anterior se deduce que la estructura elaborada con polisacárido (alginato de sodio), proteína (concentrado de proteína), plastificante (mezcla de glicerol-sorbitol) y aceite esencial de orégano forma una película comestible que presenta buena propiedad de barrera a la humedad.

3.3.1.3 Ángulo de contacto

Los resultados obtenidos en esta prueba de barrera a la humedad, se muestran en la Tabla 25, especificando el valor de ángulo de contacto evaluado en cada superficie seleccionada.

Tabla 25. Ángulo de contacto evaluado en diferentes zonas de PCA.

ZONA	EXTREMO 1	CENTRO	EXTREMO 2
ÁNGULO (°)	77.0	76.2	76.4

El contacto entre una gota de líquido y una superficie sólida depende de la relación entre las fuerzas adhesivas que son las responsables de la disposición de gotas sobre superficie y las fuerzas cohesivas del líquido que hacen contraer la gota, según se favorece o no la adhesión de una de las fases sobre las otras existe mayor o menor mojabilidad siendo el ángulo de contacto como la traducción cuantitativa de este concepto (Salager, 1987).

Es una propiedad superficial de los sólidos que cuantifica la tendencia hidrofílica o hidrófoba como parámetro para analizar los mecanismos de interacción entre las fases sólida y líquida, se basa en la medida del ángulo formado entre una gota o burbuja adyacente a una superficie plana y lisa.

De acuerdo con la composición de la película, puede ser de comportamiento hidrofílico o hidrofóbico, determinado por el valor de humectación de la película, ésta medida varía entre 0° donde hay un mojado completo debido a que la energía superficial del sólido es mayor que la del líquido y 180° donde el líquido toca toda la superficie sólida justo en un punto.

Respecto a lo anterior mencionado, la película comestible antimicrobiana muestra una tendencia hidrófoba, ya que no existe afinidad entre la fase líquida y sólida, se presentan fuerzas cohesivas ya que la gota no interacciona con la superficie de la película, ocasionando que la película no absorba el líquido depositado, las interacciones de las moléculas dentro de la película, principalmente con los enlaces polares, mismos que ocurren con el agua, son mínimos, teniendo como resultado baja permeabilidad de la película.

Las regiones de estudio presentan una mínima variación entre los datos obtenidos, dispersión originada por la cantidad de grupos hidrófobos presentes en la zona de medición, el alcance para el ángulo de contacto no presenta una variación definida con respecto a las áreas de estudio denominadas como exterior 1,2 y centro.

La permeabilidad también depende de factores como la zona de la película, componentes de la matriz, así como de la distribución del aceite esencial y el tamaño de los glóbulos de aceite, estos elementos representan en conjunto un factor clave en un sistema de humectación.

La naturaleza hifrofóbica de los aceites esenciales mejora las propiedades de barrera, el resultado finaliza con la obtención de películas resistentes y de limitada carga de grupos hidrofílicos libres, expresan mayor concentración de grupos hidrófobos en la superficie de la película comestible, limitando la migración de humedad.

Se puede generalizar que el ángulo de contacto tiene una relación directamente proporcional con la naturaleza física (rugosidad) y la naturaleza química (grupos hidrófobos) de la superficie.

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 se puede extender la vida de anaquel y elevar la calidad de los alimentos por limitación de la migración de humedad que puede acelerar las reacciones deteriorativas (Karbowski & Debeaufort, 2005).

3.3.2 Propiedad mecánica

3.3.2.1 Textura

Las propiedades mecánicas que más son medidas son la fuerza y el porcentaje de elongación. En la Tabla 26, se muestran los resultados de éstas propiedades obtenidas en la película comestible antimicrobiana.

Tabla 26. Comparativo fuerza de ruptura y % de elongación de PCA.

	MUESTRA 1	MUESTRA 2	MUESTRA 3
FUERZA DE RUPTURA (gf)	129.37	129.33	129.23
ELONGACIÓN (%)	62.09	62.08	62.09

Los datos que se obtuvieron no presentan diferencia significativa debido a que se mantuvo control en el espesor y condiciones de almacenamiento de las películas, la fuerza tensil de la muestra 1, expresa el estrés máximo desarrollado en la película al someterse a la prueba de tensión, mientras que el valor de elongación de la muestra 1 y 3 representan el porcentaje máximo al que puede estirarse la película hasta que se produzca una deformación en su estructura.

Las propiedades mecánicas de las películas, dependen en gran medida de la formulación empleada en su elaboración, las interacciones entre el material de la película con otras sustancias como agua, plastificantes lípidos y otros aditivos dispersos en la matriz influyen notablemente en su comportamiento mecánico.

El principal componente que le confiere estas características de baja fuerza de ruptura y porcentaje alto de elongación es el plastificante incorporado, siendo la mezcla empleada de sorbitol y glicerol que favorece las propiedades mecánicas de la película antimicrobiana obtenida.

El plastificante es un factor muy importante en la formulación, provee excelentes propiedades mecánicas a las películas elaborados, la inclusión de éste elemento afecta las interacciones en la matriz de la película, favoreciendo su movilidad, permitiendo aumentar la elongación de la película y mejorando así su flexibilidad, y provoca un efecto negativo en las propiedades de barrera de las películas debido a que alteran la estructura, la movilidad de la cadena y los coeficientes de difusión de gas o agua (Butler, Vergano, & Testin, 1996), el contenido que presenta la película en su formulación afecta de forma proporcional, un aumento en la concentración de plastificante conduce a una menor fuerza de tensión y una mayor elongación (Chiou & Avena, 2009).

Las películas antimicrobianas elaboradas pueden interactuar con grupos polares y no polares, es decir tienen en su cadena partes hidrofílicas e hidrófobas, formando mejores enlaces a través de interacciones hidrofóbicas entre aceite glicerol sorbitol, la elasticidad generada se debe a la cadena de carbono larga presente en los plastificantes (Mc Hugh & Krochta, 1994).

Es muy importante que la película presente buenas propiedades mecánicas, importante para conservar integridad durante el manejo, el embalaje y el transporte, se consideran buenas propiedades cuando se obtiene un equilibrio en la estructura química, para lo cual los factores importantes son la tensión máxima y el porcentaje de elongación, se generaliza que a mayor concentración de plastificante la película será más flexible y requerirá menor fuerza para romper su estructura (Aguilar, 2005).

3.3.3 Propiedades térmicas

3.3.3.1 DSC (Differential Scanning Calorimetry)

El análisis calorimétrico DSC generó datos térmicos y termodinámicos, a partir de la medición de la energía suministrada a la muestra y al material de referencia, en función de la temperatura (Flujo de calor).

La técnica detecta cambios endotérmicos ($+\Delta H$) y exotérmicos ($-\Delta H$), que ocurren durante el proceso, la representación gráfica de la técnica es llamado termograma, en donde se muestra el flujo de calor en función de la temperatura. A continuación se presenta la curva obtenida en la técnica de calorimetría (Figura 45).

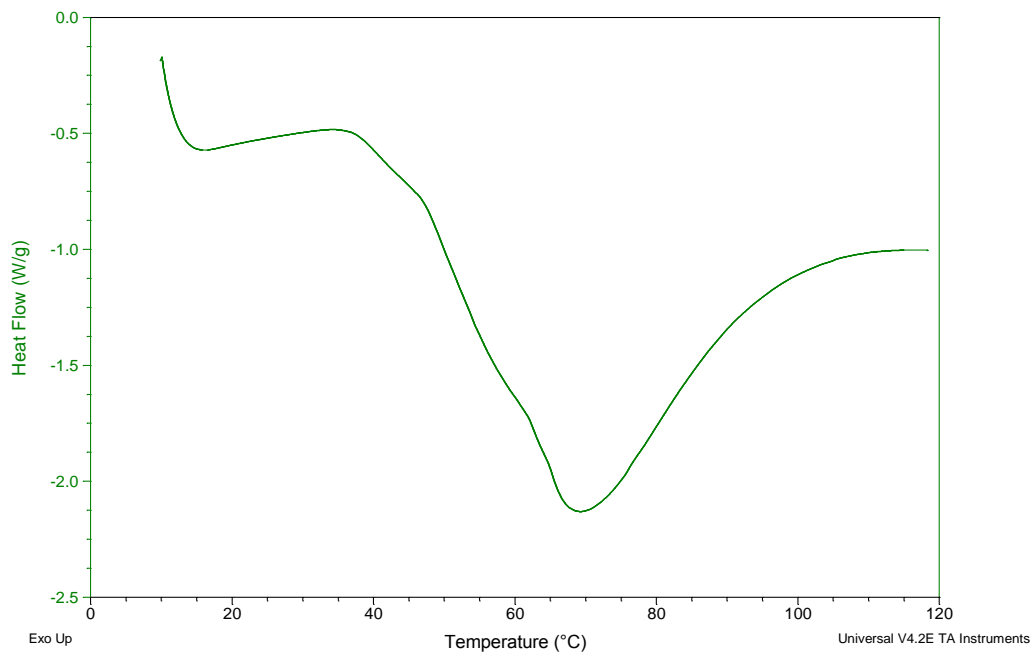


Figura 45. Termograma de la película comestible antimicrobiana.

En el termograma de la película comestible se presenta un efecto endotérmico, que se debe a cambios físicos que presentan los materiales contenidos en la formulación.

Se estudiaron los materiales potenciales que se verían afectados en el tratamiento térmico seleccionado el WPC y el aceite esencial en los que la temperatura les provocaría un cambio mayor en comparación de los demás componentes, por lo que se realizó el termograma por separado de estos elementos.⁸

El aceite esencial se desintegró con mayor facilidad debido a que los componentes que lo constituyen son altamente volátiles, por lo que no se pudo demostrar un efecto a ser evaluado por la pérdida en su composición.

En cambio en el WPC muestra un cambio importante, se identificó que a la temperatura de 77.08 °C se presenta un proceso de desplegamiento o desnaturalización térmica, comportamiento que presentan las proteínas por acción térmica. Se realizó un comparativo entre la película antimicrobiana y una película en la que no se adicionó WPC, obteniendo la Figura 46.

⁸ Termogramas: Película Comestible, WPC y Aceite esencial de Orégano (Figuras: 53, 54 y 55, Anexo VIII).

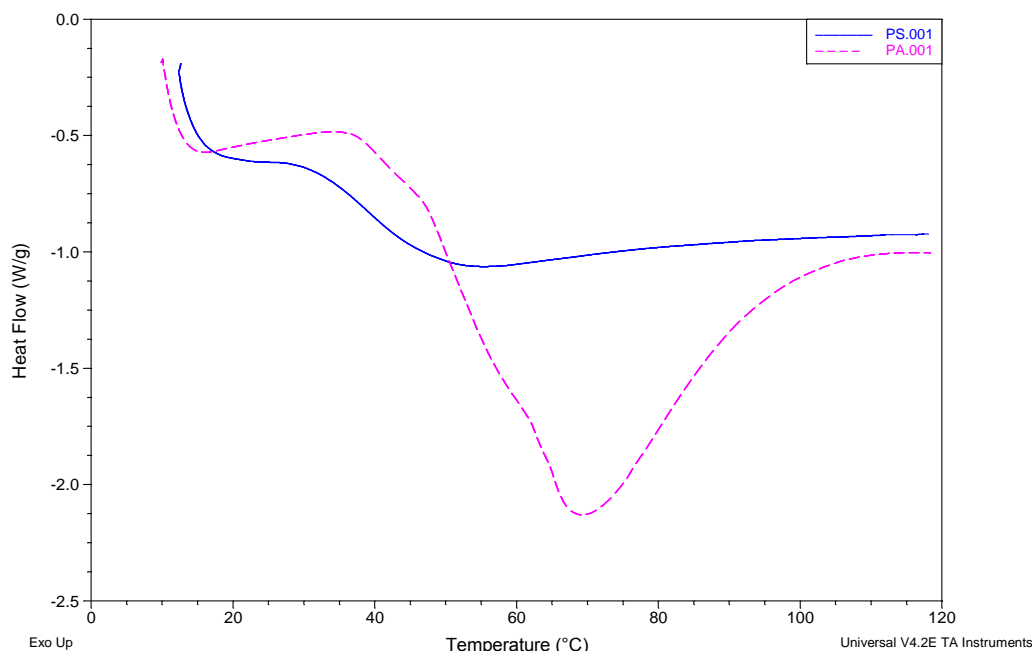


Figura 46. Termograma comparativo de PCA sin WPC (PS) y PCA con WPC (PA).

En efecto se muestra que la transición térmica observada en el termograma de la película comestible antimicrobiana corresponde a la desnaturalización térmica de las proteínas que se detecta en el termograma en forma de una curva endotérmica, comportamiento que presenta el WPC evaluado de forma individual, el valor en el que se registró la temperatura de desnaturalización fue a 69.85 °C.

El cambio de entalpía total se calculó midiendo el área bajo el pico de la endoterma de desnaturalización usando una línea de base entre las temperaturas de comienzo y final de la transición térmica, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 27.

Tabla 27. Comparativo de parámetros obtenidos en DSC.

	$T_{\text{ONSENT}} (^{\circ}\text{C})$	$T_{\text{PEAK}} (^{\circ}\text{C})$	$\Delta H (\text{J/g})$
PA	58.13	69.85	109.4
PS	---	---	---
WPC	72.47	77.08	186.6
AEO	---	---	---

Las temperaturas registradas son T_{ONSENT} (temperatura a la cual se deriva la transición, en este punto se inicia la modificación en la estructura del sistema por efecto de la temperatura) y T_{PEAK} (temperatura de pico en la cual se obtiene una desnaturalización total) y ΔH (representa la energía total a lo largo del tratamiento).

En la tabla no se muestran los valores para la película sin WPC (PS), ya que no presenta el pico de desnaturalización, por consiguiente no es posible calcular los parámetros, de la misma forma el aceite esencial, presenta una descomposición en su estructura, limitando a tener una curva sin efecto que evaluar.

Existe una diferencia entre los valores de la película antimicrobiana y el WPC, debido a que el concentrado se evaluó de manera individual y la película presenta otros componentes, la interacción entre ellos es lo que ocasiona la variación entre los resultados obtenidos.

Si bien las proteínas se encuentran inicialmente en un estado plegado, llamado estado nativo, cuando éstas son sometidas a cambios inducidos por medio de un tratamiento térmico, la mayoría de las proteínas se desnaturalizan, originando cambios detectables en su estructura.

La endoterma de desnaturalización identificada pertenece a la beta-lactoglobulina principal proteína contenida en el WPC con el 65 % (Krochta J. M., 2002), considerada como representativa en el contenido proteico, el cambio térmico se presenta en el rango de 69-79 °C, la transición que se muestra hace referencia a la temperatura de apertura (despliegue) de las estructura globular de la proteína, ésta se da cuando los enlaces de hidrógeno son rotos por medio de una reacción que requiere energía calorífica (Antuña, Celeguin, & Rubiolo, 2009).

La variación de entalpía debido al desplegamiento de la proteína es un parámetro termodinámico registrado, resultado de la combinación de las reacciones endotérmicas producidas por la ruptura de los enlaces intermoleculares de la proteína.

La proteína predominante posee una capacidad calorífica (C_p) definida, así como una cantidad de calor que es necesaria para la transición del estado nativo al desnaturalizado, el cual se ve reflejado en el área del pico y este a su vez está representado por el ΔH de transición (Hatakeyama & Quinn, 2000).

La proteína es la responsable de las transiciones que aparecen, es importante considerar el número y la variedad de proteínas existentes en un sistema complejo como los recubrimientos compuestos a base de alginato de sodio y WPC, por lo que se puede decir que no es un cambio sino es todo un proceso simultáneo.

3.3.4 Propiedades ópticas

3.3.4.1 Colorimetría

La Tabla 28, muestra los valores de los parámetros obtenidos en colorimetría triestímulo, L^* , a^* , b^* , croma (C^*) y tono (h°) de la película comestible.

Tabla 28. Parámetros de color de la película comestible.

Parámetro	L*	a*	b*	C*	h°
Valor	55.49	-0.58	0.99	1.15	178.96

El estímulo cromático permite obtener una medición objetiva de color por medio de atributos la tonalidad de la película comestible.

Los ejes a^* y b^* son coordenadas y representan variación entre rojo (+) o verde (-) y amarillo (+) o azul (-) respectivamente; el valor obtenido al evaluar estas componentes en la película comestible presenta una coordenada negativa de a^* indicando que el color se inclina hacia el tono verde, el valor de b^* tiende al color amarillo (Sahin & Sumnu, 2009).

La luminosidad o brillo presenta una escala de grises que va desde el blanco (máxima luminosidad 100) hasta el negro (mínima luminosidad) haciendo un elemento más claro u oscuro, representa la cantidad de luz emitida o reflejada por la muestra, la película comestible presenta luminosidad intermedia dentro de la escala de grises de acuerdo con el valor igual a 55.49, obtenido de la medición.

La cromaticidad describe el grado o la intensidad con la que un color se separa del gris y se acerca a un color puro del espectro; el valor de C^* representa la saturación del color predominante dentro del cuadrante teniendo una saturación de color muy baja.

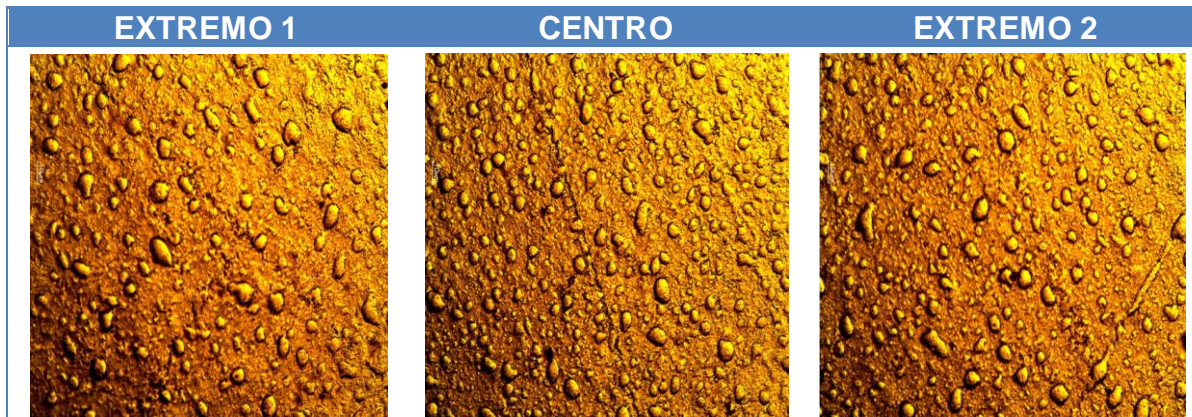
El tono es el atributo cuantitativo de color y está relacionado con las diferencias de absorbancia/transmitancia de la energía de diferentes longitudes de onda, el valor de h° representa la longitud de onda dominante del color, el cual el valor calculado corresponde a un tono amarillo.

El color de la película se ubican en el cuadrante verde-amarillo o bien entre el valor negativo de a^* y valor positivo de b^* del espacio de color tridimensional, presentando baja luminosidad y cromaticidad, el ángulo de tono corresponde al color amarillo, color conferido principalmente por la adición de aceite esencial incorporado en la formulación.

3.3.4.2 Microscopía

Como se muestra en la Tabla 29, las zonas evaluadas en la película comestible presentan una distribución homogénea en la que se observa claramente la forma de las gotas de aceite esencial incorporado en la formulación.

Tabla 29. Comparativo de micrografías de la PCA.



En la Tabla 30, se expresan los resultados del diámetro obtenido en cada zona evaluada, los datos están en similar rango, indicando de manera general que el valor del glóbulos de aceite esencial en la película es de 1097.90 μm .

Tabla 30. Diámetros de las gotas de aceite encontradas en la estructura de la película.

ZONA	EXTREMO 1	CENTRO	EXTREMO 2
Diámetro (μm)	1099.14	1097.26	1097.29

La diferencia en la dispersión de los glóbulos de aceite depende de varios factores como el biopolímero con el cual se esta formando la matriz o estructura de la película, la densidad y el peso molecular del aceite esencial. 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 también, la emulsión formada por el antimicrobiano y el agua. La cual depende del tiempo de agitación , concentración de emulsificante y cantidad de aceite.

El aceite esencial influye de acuerdo a su concentración , estructura química, densidad, homogenización del sistema, todo esto siendo determinante en el tamaño de los glóbulos y su distribución en la emulsión y por lo tanto en la microestructura de la película, los aceites esenciales son de baja densidad, lo cual facilita la formación de una emulsión más estable y homogénea

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 fenomenos 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 (Fabra, Talens, & Chiralt, 2009).

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 observa que las interacciones entre el orégano y la matriz es homogénea; entre mayor sea el tamaño de las gotas en la dispersión, mayores son los agregados de lípidos observados en la película, haciendo estas películas heterogéneas.

Otro factor a considerar en la distribución de las gotas de aceite esenciales la cantidad de emulsificante agregado, ya que las emulsiones son 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 agrega a una emulsión se reorientan 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.

Después de lo anterior descrito se establece que con la obtención de películas lisas, sin rugosidades y una emulsión libre de fenómenos de floculación o coalescencia, la cantidad de emulsificante agregado fue la cantidad necesaria para poder mantener el sistema estable con la formulación seleccionada y por consecuente como resultado se obtiene una película con microestructura homogénea.

3.4 RESULTADOS OBJETIVO PARTICULAR 4

3.4.1 Determinación de la concentración de *Listeria monocytogenes* para realizar pruebas *in vitro*.

Se empleó una cepa de *Listeria monocytogenes* (4) criopreservada, se obtuvo de la colección de cultivos del Departamento de Bacteriología de la UNAM, FESC-1, se tomó una parte del cultivo, se inoculó en agar Casoy, se llevó a incubación durante 24h a 37°C.

En los tubos de ensaye se vertió solución salina estéril, la densidad del inóculo fue estandarizada por turbidimetría con el tubo No. 5 de la escala de Mc Farland y se realizó la siembra masiva de la bacteria en el medio de cultivo Casoy.

Se llevaron los medios de cultivo con la siembra de la bacteria a una estufa de incubación durante 24h a 37°C. Por medio de la escala de McFarland, se comprobó que la disolución tiene la cantidad de 1.5×10^8 u.f.c., de *L.*

monocytogenes, concentración que se emplea para realizar las pruebas de sensibilidad antimicrobiana.

3.4.2 Analizar el efecto antimicrobiano

3.4.2.1 Prueba *in vitro* (sensibilidad antimicrobiana)

El objetivo de la prueba de sensibilidad antimicrobiana, fué la evaluación cualitativa *in vitro* de la propiedad antimicrobiana del aceite esencial de orégano, empleando tres concentraciones de aceite esencial incorporado en la película comestible (0.5, 1.0 y 1.5%).

La geometría de la película fue cuadrangular por que de esta manera se tenía una figura más homogénea en el momento de cortarla, teniendo 10mm por cada lado.

La susceptibilidad de la cepa bacteriana será reportada como sensible (S), Intermedio (I) o Resistente (R).

En relación con la Tabla 31, se observa que en la concentración de 0.5% de aceite esencial de orégano, la bacteria presenta resistencia a esta cantidad incorporada, no se puede medir el halo ya que no se presentó el efecto de inhibición permitiendo que se desarrollara la bacteria en la zona valorada; en comparación con las concentraciones de 1 y 1.5% que presentan similar efecto antimicrobiano, teniendo una cantidad de 12mm y 13mm respectivamente de superficie inhibida.

Tabla 31. Comparativo de actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano.

Concentración de AEO	HALO DE INHIBICIÓN (mm)		
	S	I	R
C ₁ (0.5%)	-	-	*
C ₂ (1.0%)	* 12	-	-
C ₃ (1.5 %)	* 13	-	-

NOTA: Sensible (S), Intermedio (I), Resistente (R), Concentración (C).

Se muestran las imágenes comparativas de los resultados de las pruebas *in vitro* en la Tabla 32, se muestra una referencia de como se ubicaron las películas en esta prueba, en la parte superior de la caja petri se colocó la película con la concentración de aceite esencial a evaluar, en la parte inferior una película control sin adición de antimicrobiano, misma que permitiría ver el contraste respecto al crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

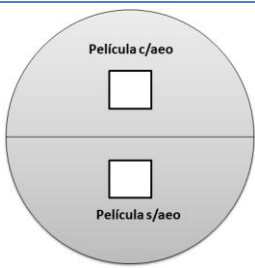
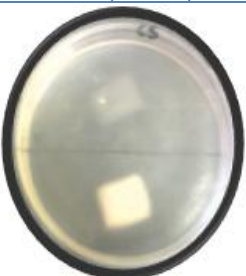


Los resultados obtenidos de la actividad antimicrobiana de cada una de las películas evaluadas considerando los halos de inhibición generados, mostraron

que las películas control, no exhibieron zonas de inhibición contra la cepa probada, se percibió inhibición en la parte donde fueron colocadas las películas con el aceite esencial, mostrando que el potencial antimicrobiano no se difunde a través del agar, sólo inhibe microorganismos en contacto directo con los sitios activos del aceite esencial.

En la concentración igual a 0.5% hubo crecimiento de la bacteria dentro de la superficie de la película colocada, por lo que se descartó ésta concentración valorándola como nula frente al efecto inhibitor en la bacteria seleccionada.

En las dos siguientes concentraciones se aprecia la manera en que disminuyó el crecimiento del microorganismo con el incremento en la concentración de aceite esencial, en la concentración de 1.5%, se pueden observar los mayores diámetros de halos de inhibición sin embargo a la película le confiere un aroma con mayor intensidad, por lo que se estableció a la concentración igual a 1.0% como CMI frente a la bacteria empleada, esta concentración fue seleccionada para el desarrollo del proyecto que presentó control antimicrobiano de *Listeria monocytogenes*.

Tabla 32. Comparativo de zonas de inhibición en las películas comestibles con aceite esencial de orégano.

HALO DE INHIBICIÓN			
Referencia	C1 (0.5%)	C2 (1.0%)	C3 (1.5%)
			

NOTA: Foto tomada en Laboratorio de Bacteriología, FESC-UNAM.

EL género *origanum* presenta actividad contra bacterias gram negativas y gram positivas. Los valores de CMI para los aceites esenciales se ha establecido entre 0.28-1.27 mg/mL para bacterias y de 0.65-1.27 mg/mL para hongos (Aligiannis, et al., 2001).

La inhibición de *L. monocytogenes* 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 principal mecanismo de acción se asocia con la capacidad de interactuar con la membrana de los

microorganismos patógenos, su hidrofobicidad, es la característica que les permite unirse a los lípidos de la membrana celular desestabilizando su estructura y aumentando su permeabilidad, generando la salida de iones, metabolitos y otras moléculas que pueden provocar la muerte.

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se relaciona con la composición química de los mismos, la configuración estructural de los compuestos que los constituyen, sus grupos funcionales además de las posibles interacciones sinérgicas entre los compuestos (Dorman & Deans, 2000).

La inhibición depende directamente de los compuestos de los aceites esenciales, los compuestos identificados en el espectro infrarrojo del aceite esencial de orégano son el carvacrol (disminución de microorganismos en fase log), terpenos y timol (inhibe bacterias, mohos y levaduras), (Raybaudi-Massilia, 2003) teniendo este último compuesto el nivel más alto de actividad antimicrobiana, seguido del carvacrol.

En el caso de las bacterias Gram negativas, así como las Gram positivas, los aceites esenciales se introducen a través de los lípidos de la membrana celular, alterando su estructura haciéndolas más permeables. Como consecuencia tiene lugar una fuga de iones y de otros contenidos celulares, de forma más o menos intensa, que puede llevar a la muerte celular.

Las bacterias Gram positivas (*L. monocytogenes*) son más sensibles que las Gram negativas a los compuestos antimicrobianos de aceites esenciales de especias, como los compuestos fenólicos, aldehídos, cetonas y terpenos (Nychas, 1995).

La diferencia consiste en que las Gram negativas contiene una membrana externa con un alto porcentaje de lípidos (García, Pinotti, Martino, & Zaritzky, 2004). La presencia de esta segunda membrana protege a la pared celular considerando que la pared celular es esencial para mantener la integridad de la célula (Benson, 1997).

CONCLUSIONES

Con base en el trabajo experimental realizado se concluyó lo siguiente:

- La hipótesis planteada queda validada de acuerdo con los resultados obtenidos, teniendo una película flexible elaborada con alginato de sodio, concentrado de proteína de suero, una mezcla de plastificantes y tensoactivo; presenta barrera al vapor de agua y al transporte de gases; el agente antimicrobiano adicionado, permitió inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* debido a los compuestos presentes en el aceite esencial.
- Los objetivos particulares establecidos, se cumplieron en su totalidad: 1) Se realizó la extracción del aceite esencial de orégano y se evaluaron sus parámetros de calidad mediante pruebas físicas, espectroscópicas y organolépticas; 2) Se desarrollo la película comestible a partir de una formulación multicomponente; 3) Se caracterizó la película evaluando sus propiedades de barrera, mecánicas, térmicas y ópticas y 4) Se comprobó el efecto de inhibición del aceite esencial de orégano integrado en la formulación de la película comestible, frente a la bacteria *Listeria monocytogenes*.
- De las múltiples tecnologías para obtención de aceites esenciales, la técnica seleccionada de hidrodestilación es la adecuada para el objetivo de éste proyecto, obteniendo alto rendimiento en la extracción de aceite esencial de orégano y presentar buena calidad del producto obtenido.
- Las condiciones para optimizar la obtención de aceite esencial son:
 - Muestra vegetal: 100g
 - Agua: 1600 ml.
 - Temperatura: De ebullición.
 - Temperatura del refrigerante: 10°C.
 - Tiempo total de extracción: 180 min.
- El aceite esencial obtenido presenta las siguientes características: líquido translúcido de coloración amarillo claro, sabor especiado y aroma característico a la materia prima, $n_D=1.5026$, $\rho=0.9349$ g/ml, en su composición presenta los agentes antimicrobianos carvacrol y timol.

- Se demostró que la combinación de polisacárido y proteína juegan un papel importante en la estabilización de emulsiones aceite-agua (O/W), ambos tipos de moléculas contribuyen a la estructura, textura y estabilidad debido a sus propiedades espesantes, además de presentar una buena matriz estructural pueden actuar como barreras efectivas al la PWA y PO₂.
- La incorporación de tween a la formulación, permitió estabilizar la emulsión absorbiéndose en la interfase entre el agua y el aceite, con su cadena hidrófoba orientada hacia el aceite y el grupo hidrófilo orientado hacia el agua, permitiendo de esta manera que el sistema sea estable en el que los glóbulos de aceite conservan su carácter inicial y permanecen distribuidas uniformemente en la fase continua durante prolongados períodos de tiempo.
- El sorbitol y glicerol proveen excelentes propiedades mecánicas a las películas elaboradas, la inclusión de los plastificantes disminuyen las interacciones en la matriz de la película, favoreciendo su movilidad, permitiendo aumentar la elongación de la película y mejorando así su flexibilidad. Por su carácter hidrófilo, ocasiona tener mayor permeabilidad en la película, contrarrestado por la hidrofobicidad del aceite incorporado.
- Por efecto de la temperatura en el WPC se mostró un cambio importante, se presenta un proceso de desplegamiento o desnaturalización térmica, se identificó éste efecto térmico a la temperatura de 77.08 °C.
- Aceite esencial presentó un efecto antimicrobiano evaluado en prueba in vitro frente a la bacteria patógena *Listeria monocytogenes*. Además se observó que presenta una barrera efectiva frente al transporte de gases, ayuda a disminuir la permeabilidad al oxígeno debido a la interacción que presenta con los componentes presentes en la formulación de la película comestible y a su carácter hidrofóbico.
- La película comestible obtenida presentó las siguientes características: espesor de 0.65mm, de color amarillo claro, no presenta poros ni grietas en su superficie, tamaño de glóbulo de aceite es de 1097.90 μm, presenta tendencia hidrófoba, barrera frente al vapor de agua y a gases, presenta inhibición frente a *Listeria monocytogenes* con la concentración de 1.0 % de aceite esencial de orégano.

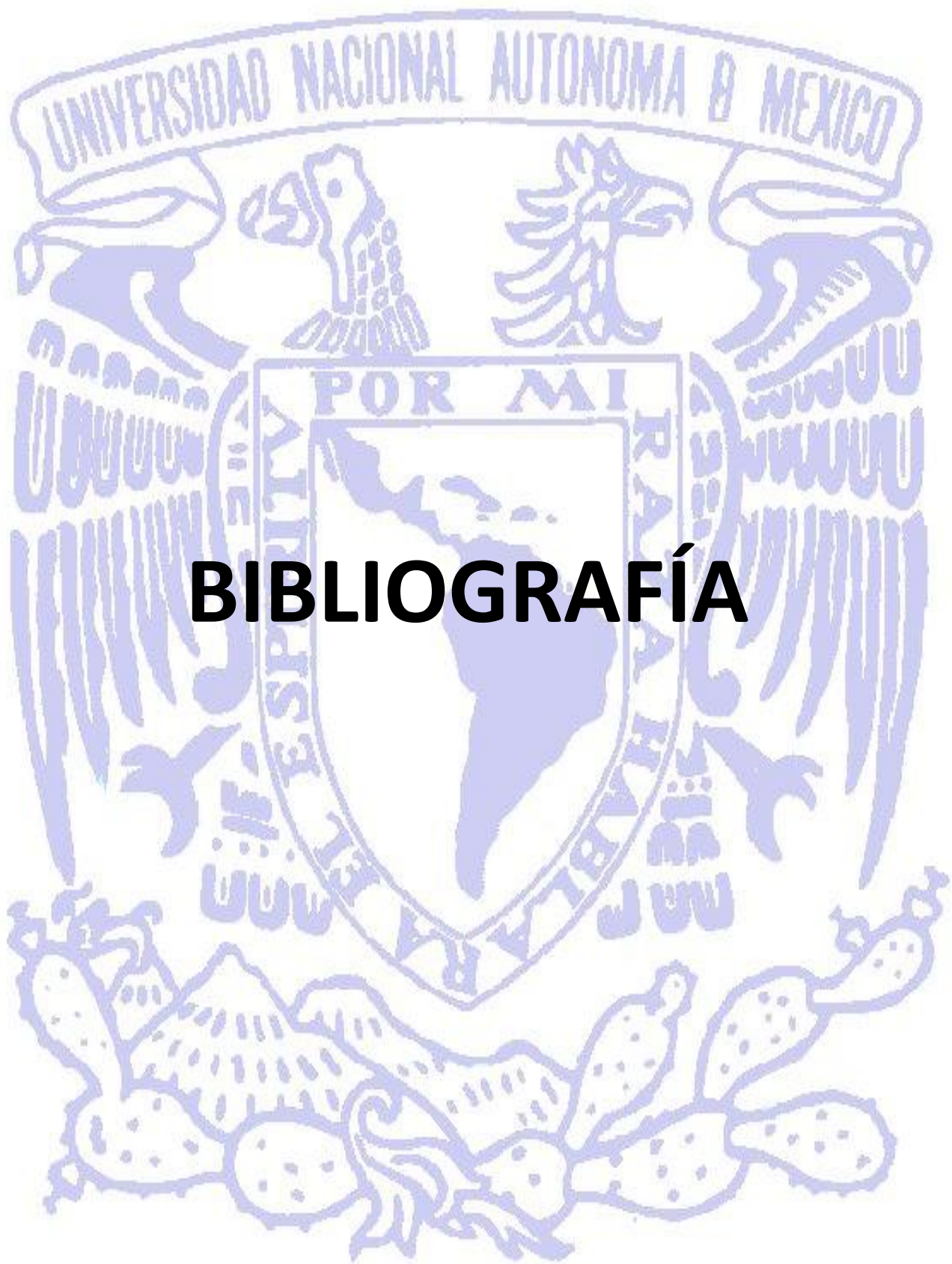


PROSPECTIVAS

PROSPECTIVAS

Para lograr tener información que complemente este trabajo de investigación, se propone lo siguiente:

- Evaluar los niveles de concentración tóxicos en los que el aceite esencial para establecer los límite máximo utilizado en la elaboración de películas comestibles.
- Sólo se identificaron los componentes mayoritarios presentes en el aceite esencial, sería recomendable llevar a cabo la identificación y caracterización del resto de los componentes existentes en el aceite esencial de orégano.
- Llevar a cabo el estudio cromatográfico del aceite esencial de orégano para cuantificar otros componentes con poder antimicrobiano.
- Realizar determinaciones al aceite esencial que permitan tener un sustento mayor en cuanto a control de calidad se refiere, enunciadas a continuación:
 - Poder rotatorio
 - Índice de acidez
 - Índice de fenoles
 - Índice de oxidación
 - UV visible
 - Metales pesados
- Evaluar los efectos ocasionados en la película comestible por almacenamiento y vida útil.
- Realizar la aplicación de la película a un alimento, haciendo la transformación de film a coating.
- Determinar *in vivo* la inhibición de *listeria monocytogenes* en un alimento con recubrimiento antimicrobiano.



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, M. M. (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 Politécnico Nacional.
- Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., & Chinou, I. (2001). *Composition and antimicrobial activity of essential oils in two Origanum species*. J. Agric. Food Chem. 49:4168-4170.
- Altekruse, S., Hyman, E., & Klontz, K. (1994). *Foodborne bacterial infections in individual with the human immunodeficiency virus*. South Med. 160-169.
- Anker, M. (1996). *Edible and biodegradable films and coatings for food packaging*. Londres: Publication Sik Rapport.
- Antuña, S., Celeghin, A., & Rubiolo, A. (2009). *Estudio de la desnaturalización térmica y agregación de las proteínas de suero por calorimetría diferencial de barrido*. FABICIB. 13:89-95.
- Anzaldúa-Morales, A. (1994). *La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica*. Zaragoza, España: Acribia.
- ASTM D638. (2010). Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics. Philadelphia: Annual book of ASTM, American Society for Testing and Materials.
- ASTM E96. (1995). Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. Annual book of ASTM, American Society for Testing and Materials.
- Benson, S. (1997). *Ultrastructure of bacteria, Principles of medical biology: microbiology*. London, England: Elsevier Applied Science Publisher.
- Bosquez, M. E., Vernon, C. E., & Guerrero, L. I. (2003). *Moisture barrier properties and morphology of mesquite gum-candelilla wax based edible emulsion coatings*. Food Research International. 36:885-893.
- Brown, M. E. (2001). *Introduction to thermal analysis, techniques and applications* (2nd ed.). NJ, USA: Kluwer Academy.
- Bruneton, J. (1991). *Elementos de fitoquímica y farmacognosia*. Zaragoza: Acribia.
- Burt, S. (2004). *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review*. International Journal of Food Microbiology. 94:223-253.
- Burt, S., & Reinders, R. (2003). *Antibacterial activity of selected plant essential oils against Escherichia coli O157:H7*. Lett Applied Microbiol. 36:162-167.

- Butler, V., Vergano, P., & Testin, R. W. (1996). *Mechanical and barrier properties of edible chitosan films as affected by composition and storage*. Journal of Food Science. 61 (5):953-955.
- CAC/RCP 42. (1995). Código de practicas de higiene para especies y plantas aromáticas desecadas. Codex Alimentarius.
- Carballo, M. E., & Martínez, B. E. (2010). *Determinación de la permeabilidad al vapor de agua por el método ASTM E96/E 96M-05 en películas de quitosano*. El salvador: Universidad de El Salvador. Tesis de licenciatura.
- Castillo, Q. D. (1991). *Distribución y ecología del orégano en el municipio de General Cepeda, Coahuila*. Dgo. México: Universidad Autónoma de Chapingo.
- Cervera, F. E. (2011). *Manual de espectros de Infrarrojo*. México: UNAM.
- Chinnan, M., & Park, H. (1995). *Effect of plasticizer level and temperature on water vapor transmission of cellulose-based edible films*. Journal Food Process Engineering.
- Chiou, B. S., & Avena, B. R. (2009). *Effects of drying temperature on barrier and mechanical properties of gelatin films*. Journal of Food Engineering. 95:327-331.
- CONAFOR. (2005). *Orégano mexicano, oro verde del desierto*. Comisión Nacional Forestal.
- Cuq, B., Gontard, N., & Guilbert, S. (1997). *Select functional properties of fish myofibrillar protein based films as affected by hydrophilic plasticizers*. J. Agric. Food Chem. 45:622-626.
- D1434-82, A. (2009). Standard test method for determining gas permeability characteristic of plastic film and sheeting.
- Dickinson, E. (1993). *Protein-polysaccharide interactions in food colloids. Food Colloids and Polymers Stability and Mechanical Properties*. Inglaterra: Elsevier Science LTD. 77-83.
- Domínguez, S. E., & Ferrer, R. J. (2011). *Mecanizado básico*. Madrid: Editex.
- Dorman, H., & Deans, S. (2000). *Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils*. Journal of applied microbiology. 88.
- Downes, F., & Ito, K. (2001). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. (4th. ed.). Washington: APHA.
- Draget, K. (2000). *Alginates: Handbook of hydrocolloids*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited - Boca Raton, FL, USA: CRC Press LLC.
- Ellis, B. (1961). *A guide book for sensory testing*. Chicago: Continental Can .

- Erol, A., & Sibel, T. (2003). *A method for the measurement of the oxygen permeability and the development of edible films to reduce the rate of oxidative reactions in fresh foods*. Food chemistry. 80:423-431.
- Fabra, M., Talens, P., & 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.
- Falcone, P., & Mastromatteo, M. (2007). *Evaluating in vitro antimicrobial activity of thymol toward hygiene-indicating and pathogenic bacteria*. Journal of Food Protection. 70 (2):425-431.
- FCC. (1996). Food Chemical Codex. 4th. Washington, DC.: National Academic Press. 482-483.
- Fennema, O. (1993). *Química de los Alimentos*. España: Acribia.
- FHEUM. (2001). *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos*. Distrito Federal: Secretaría de Salud Pública.
- Flores, H. A., Hernández, H. J., & López, M. J. (2011). *Producción y Extracción de aceite de orégano (lippia graveolens Kunth) bajo cultivo en la comarca lagunera*. México: Revista Mexicana de Ciencia Forestal. 2 (3):98-102.
- Ford T.C., G. J. (1991). *An Introduction to Centrifugation*. Inglaterra: BIOS, Scientific Publishers.
- Funami, T. (2009). *Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures*. Food Hydrocolloids. 23(7):1746-1756.
- García, G. R., & Palou, G. E. (2008). *Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismo de interés en alimentos*. Temas Selectos de Ingeniería en alimentos. 2(2):41-51.
- García, M., Pinotti, A., Martino, M., & Zaritzky, N. (2004). *Characterization of composite hydrocolloid films*. Carbohydrate Polymers (Vol. 56). Journal of Food Engineering.
- Gea Jódar, P. M. (2006). *Mojado en condiciones de no-equilibrio sobre superficies reales*. España, Universidad de Granada. Tesis Doctoral.
- Gennadios, A., Mc Hugh, T., Séller, C., & Krochta, J. (1994). *Edible coatings and films based on proteins*. En "Edible coatings and films to improve food quality". Estados Unidos: Technomic Publishing Co.
- Gennadios, A., Weller, C. L., & Gooding, C. H. (1994). *Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films*. Journal of Food Engineering. 21(4):395-409.

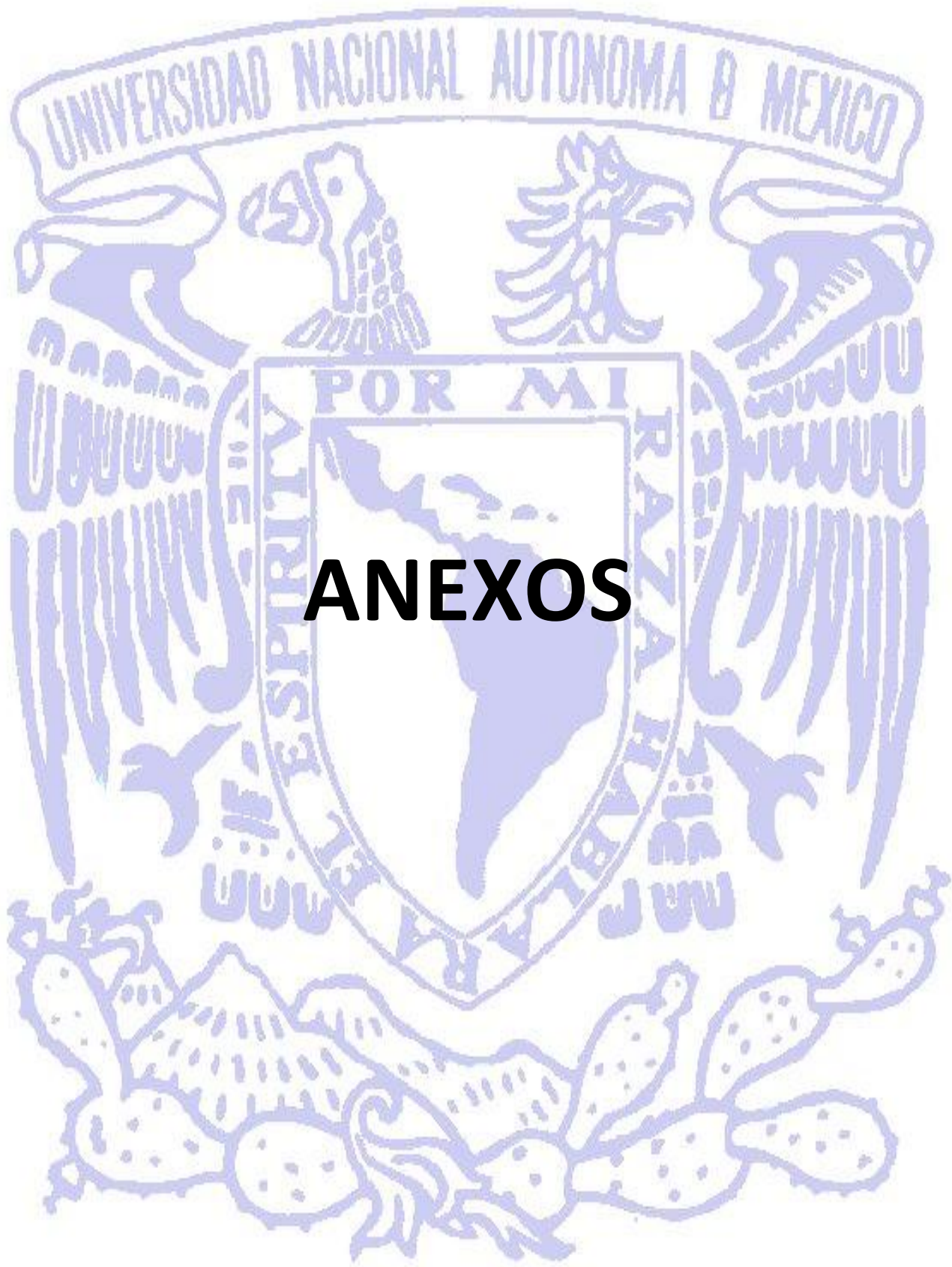
- Gill, A., & Holley, R. (2006). Inhibition of membrane bound ATPases of E.coli and L. monocytogenes by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*. 111:170-174.
- Guilbert, S. (1986). *Technology and Application of Edible Protective Films*. En "Food Packaging and Preservation Theory and Practice". Estados Unidos: Elsevier Applied Science Publishers.
- Guiza, P. D., & Rincón, P. L. (2007). Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial combinado con inactivación térmica sobre sepas de *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Günther, E. (1984). *The essential oils. History and origin in plant production analysis*. New York, USA: Krieger Publishing.
- Harborne, J. (1998). *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*. (5th ed.). London, England: Chapman and Hall.
- Hatakeyama, T., & Quinn, F. (2000). *Thermal analysis fundamentals and applications to polymer science* (2nd ed.). England: John Wiley and Sons.
- Helander, I., & Alakomi, H. (1998). *Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46:3590-3595.
- Hernández, R. A. (1991). *Aspectos ecológicos del orégano en el altiplano potosino*. Dgo, México: Universidad Autónoma Chapingo.
- Huerta, C. (1997). Orégano mexicano: oro vegetal. *CONABIO. Biodiversitas*. 15:8-13.
- ISO 527-3. (1995). Determination of tensile properties of plastics. Berlín: Deutsches Institut for Norming (DIN).
- Karbowiak, T., & Debeaufort, F. (2005). *Wetting properties at the surface of iona-carrageenan-based edible films*. *Colloid and Interface Science*. 294:400-410.
- Kester, J., & Fennema. (1986). *Edible films and coatings*. *Food technology*. 40 (12):47-59.
- Kirk, R. S., Sawye, r. R., & Egan, H. (1996). *Composición y análisis de los alimentos de Pearson*. 2da ed. México: Compañía Editorial Continental.
- Krauskopf, L. (1993). *Plasticizer structure/performance relationships*. *J. Vinyl Technology*.15:140.
- Krochta, J. (1992). *Control of mass tranfer in food with edible-coatings and films*. Florida: Wirakartakusumah MA. Editors.
- Krochta, J. M. (2002). *Proteins as raw materials for films and coatings: Definitions, current status, and opportunities*. In *Protein-Based Films and Coating*. *Food Tehnology*. 51(2):61-74.

- Krochta, J. M., Baldwin, E. A., & Nisperos-Carriedo, M. O. (1994). *Edible Coating and films to improve food quality*. USA: CRC Press.
- Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona: Omega.
- Lammbert, R., Skandamis, P., & Coote, P. (2001). *A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol*. *Journal of Applied Microbiology*. 91:453-462.
- Larmond, E. (1973). Physical requirements for sensory testing. *Food Technology*. 27-28.
- Mc Hugh, T. H., & Krochta, J. M. (1994). *Sorbitol vs Glicerol plasticized whey protein edible films: Integrated oxygen permeability and tensile property evaluation*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42 (4):841-845.
- McClements, D. (1999). *Food Emulsion: Principles, Practice ad Techniques*. FL., EUA: CRC Press.
- McFarland, J. (1907). Nephelometer:an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and vaccines. *Journal of American Medical Association*. 14:1176-1178.
- Mustafizur, R., & Brazel, C. (2004). *The plasticizer market: an assessment of traditional plasticizers and research trends to meet new challenges*. *Prog. Polym. Sci*. 29:1223.
- Navarrete, N. M., Grau, A. A., & Boix, A. C. (1998). *Termodinámica y cinética de sistemas alimento entorno*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- NMX-F-074-SCFI. (2011). Alimentos para humanos, Aceites esenciales, aceites y grasas vegetales o animales. Determinación del índice de refracción con el refractómetro ABBE. Secretaría del Comercio y Fomento industrial.
- NMX-F-075-SCFI. (2012). Alimentos- Aceites y grasas vegetales o animales- Determinación de densidad relativa. México: Secretaria del Comercio y el Fomento Industrial.
- NMX-F-429. (1983). Alimentos. Especies y Condimentos. Orégano. Normas Mexicanas.
- NMX-K-129. (1976). Determinación del índice de refracción en aceites esenciales y productos aromáticos.
- Nychas, G. (1995). *Natural antimicrobials from plants. New methods of preservation*. Glasgow: Springer science, G.W. Gould.
- O Cliver, D., & Riemann, H. P. (2002). *Foodborn diseases* (2nd. ed.). Academic Press.

- Osborne, B., Fearn, T., & Hindle, P. (1993). *Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis* (2nd. ed.). Harlow, Inglaterra: Longman Scientific & Technical.
- Osés, J. (2006). *Desarrollo, caracterización y aplicaciones alimentarias de recubrimientos comestibles basados en proteína de suero de leche, almidón y goma de mezquite*. Universidad Pública de Navarra.
- Paredes, A. M., Gastélum, F. M., & Silva, V. R. (2007). Efecto antimicrobiano del orégano mexicano (*lippia berlandieri* Schauer) y de su aceite esencial sobre cinco. México: Revista Fitotecnia Mexicana. 30 (3):261-267.
- Pretsch, E. (2009). *Structure Determination of Organic Compounds. Tables of spectral data*. Switzerland: Springer.
- Raybaudi-Massilia, R. (2003). *Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas frescas y cortadas*. (Vol. 01). Desarrollo de las tecnologías para la conservación de vegetales frescos cortados.
- Rodríguez, G.-C. Á. (2010). Estudio del ángulo de contacto y de la mojabilidad a alta temperatura de fases líquidas en la sinterización de metales. Leganés, Universidad de Madrid. Tesis de Licenciatura.
- Rodríguez, H. M., Sánchez, G. L., González, M. C., Cháfer, M., & Vargas, M. (2011). Caracterización de recubrimientos comestibles a base de HPMC con aceite esencial de Bergamota. España: Universidad Politécnica deValencia.
- Romero, B. C., Zamudio, F. P., & Bello, P. L. (2011). Antimicrobianos en películas de almidón oxidado de plátano: Efecto sobre la actividad antibacteriana, microestructura, propiedades mecánicas y de barrera. México: Revista Mexicana de Ingeniería Química. 10 (3):297-301.
- Ronquillo, E. (2007). *Evaluación del potencial antimicrobiano de películas comestibles de aceites esenciales in vitro e in situ*. México: Universidad Autónoma Metropolitana. Tesis doctoral.
- Sacsaquispe, C. R., & Velásquez, P. J. (2002). *Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión*. Lima: Instituto Nacional de Salud.
- Sahin, S., & Sumnu, S. G. (2009). *Propiedades físicas de los alimentos*. Zaragoza, España: Acribia.
- Salager, J. L. (1987). *Fenómenos interfaciales en dispersiones polifasicas y medios porosos*. Venezuela: Universidad de los Andes.
- Schlech, W., Lavigne, P., & Bortolussi, R. (1985). *Epidemic listeriosis evidence for transmission by food*. N Engl J Med. 312-404.

- Schwartz, B., Hexter, D., & Broome, C. (1989). *Investigation of an outbreak of listeriosis: New hypotheses for the etiology of epidemic Listeria monocytogenes infections*. J Infect Dis. 559-680.
- Sears, J., & Darby, J. (1982). *The Technology of Plasticizers*. Nueva York: Wiley.
- SEMARNAT. (2007). Manual que establece los criterios técnicos para el aprovechamiento sustentable de recursos forestales no maderables de clima árido y semiárido. *Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias*. México, D.F.
- Sherman, P. (1968). *General Properties of Emulsions and Their Constituents*. Inglaterra: Emulsion Science.
- Skoog, D. A., Holler, J. F., & Crouch, S. R. (2008). *Principios de análisis instrumental* (6ta. ed.). México: CENGAGE Learning.
- Sothornvit, R., & Krochta, J. (2000). *Plasticizer effect on oxygen permeability of lactoglobulin films*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48:6298-6302.
- Trezza, T. A., & Krochta, J. M. (2000). *The gloss of edible coatings as affected by surfactants, lipids, relative humidity, and time*. . Journal of Food Science. 65(4):658-662.
- Ultee, A., Bennink, M., & Moezelaar, R. (2002). *The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus*. Apriel and environmental Microbiology. 68 (4):1561-1568.
- Ultee, A., Gorris, L., & Smid, E. (1998). *Bactericidal activity of carvacrol towardas the food-borne pathogen Bacillus cereus*. Journal of Applied Microbiology. 85 (2):211-218.
- Vásquez, O., Alva, A., & Marreos, J. (2001). Extracción y caracterización de aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*). *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*. 1 (1):38-42.
- Vázquez, N. G., & Echeverría, O. (2000). *Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas*. México: Fondo de cultura económica.
- Vazquez-Boland, J., Kuhn, M., & Berche, P. (2001). *Listeria Pathogenesis and molecular virulence determinants*. CMR. 584-640.
- Villar del Fresno, Á. M. (1999). *Farmacognosia General*. Madrid.
- Villavicencio, G. (2007). *Orégano: Recurso con alto potencial*. Revista Ciencia y Desarrollo. 33:60-66.
- Villavicencio, G. E., Cano, P. A., & García, C. X. (2010). Metodología para determinar la existencia de orégano (*Lippia graveolens* H.B.K) en rodales naturales de Parras de la Fuente Coahuila. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias.

WHO. (1998). *World Health Organization. Quality Control Methods for Medicinal Plants Materials*. Geneva.



ANEXOS

ANEXOS

ANEXO I. DIAGRAMA DE PROCESO 1

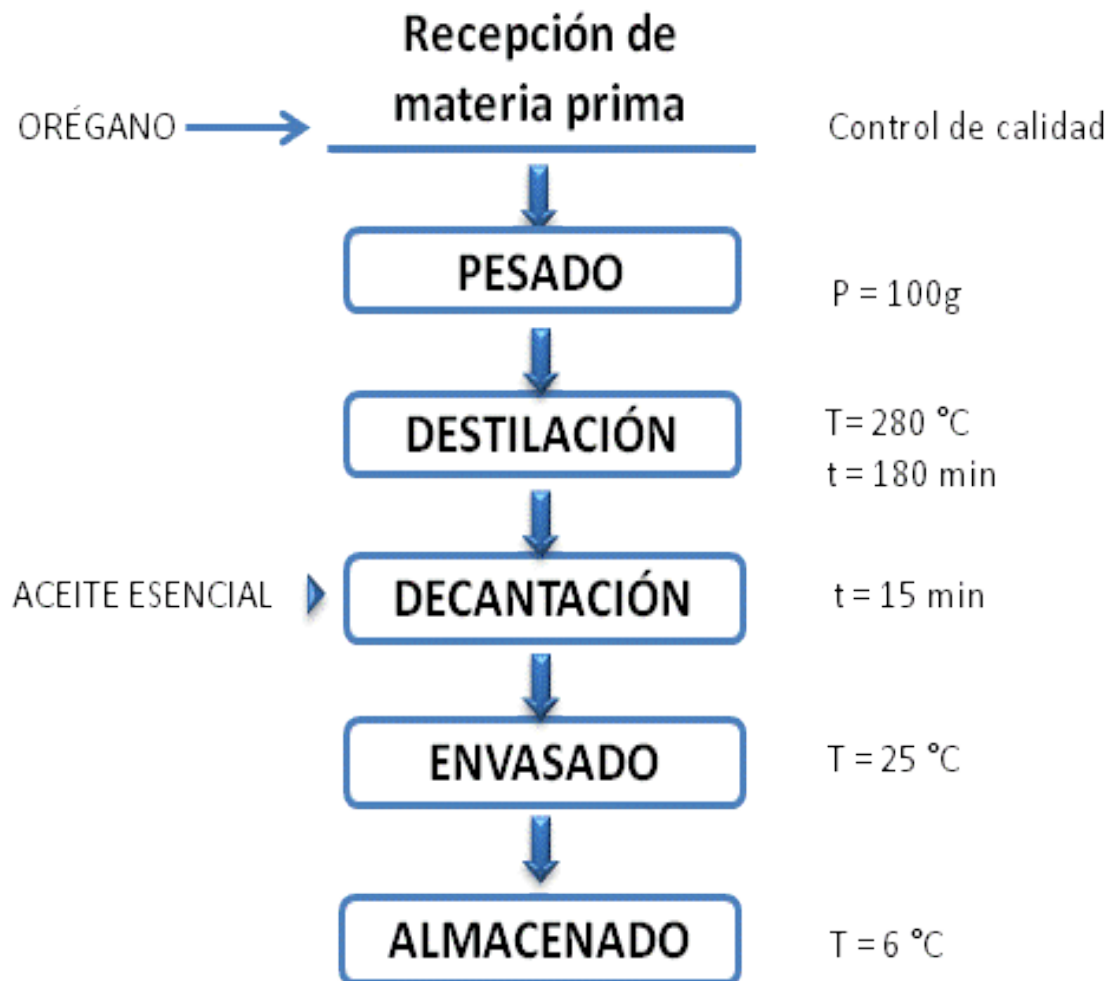


Figura 47. Diagrama de proceso para extracción de aceite esencial de orégano.

ANEXO II. PRUEBA DE EVALUACIÓN SENSORIAL

PRODUCTO: ACEITE ESENCIAL.

Juez: _____ Fecha: _____

INSTRUCCIONES:

Ante usted hay muestras identificadas codificadas, evalúe los parámetros que se le piden siguiendo un orden de izquierda a derecha.

- Pruebe la muestra indicada con el número 1(A) y seleccione la opción que represente mejor el sabor que percibe, repita el procedimiento para la muestra 1(B).

	A	B
Especiado	()	()
Picante	()	()
Herbal	()	()
- Tome la muestra número 2(A) y compare con la carta de colores que tiene a su derecha, indique cual es el color que se aproxima al del producto que se está valorando, repita el procedimiento para la muestra número 2(B).
(A) _____ (B) _____
- De las muestras empleadas en la prueba anterior, describa la apariencia que presenta el aceite esencial que está evaluando.
(A) _____
(B) _____
- De su lado derecho tiene una muestra de materia vegetal, perciba el aroma; tome la muestra número 3(A) y seleccione la opción que corresponda a la muestra analizada, repita el procedimiento para la muestra 3(B).
(NOTA: Procure no inhalar de forma directa, sino haciendo pequeños movimientos de un lado a otro cerca de la nariz).

	A	B
Característico	()	()
No característico	()	()
Sin aroma	()	()

COMENTARIOS / OBSERVACIONES:

GRACIAS.

Figura 48. Prueba de evaluación sensorial de aceite de orégano.

ANEXO III. DIAGRAMA DE PROCESO 2

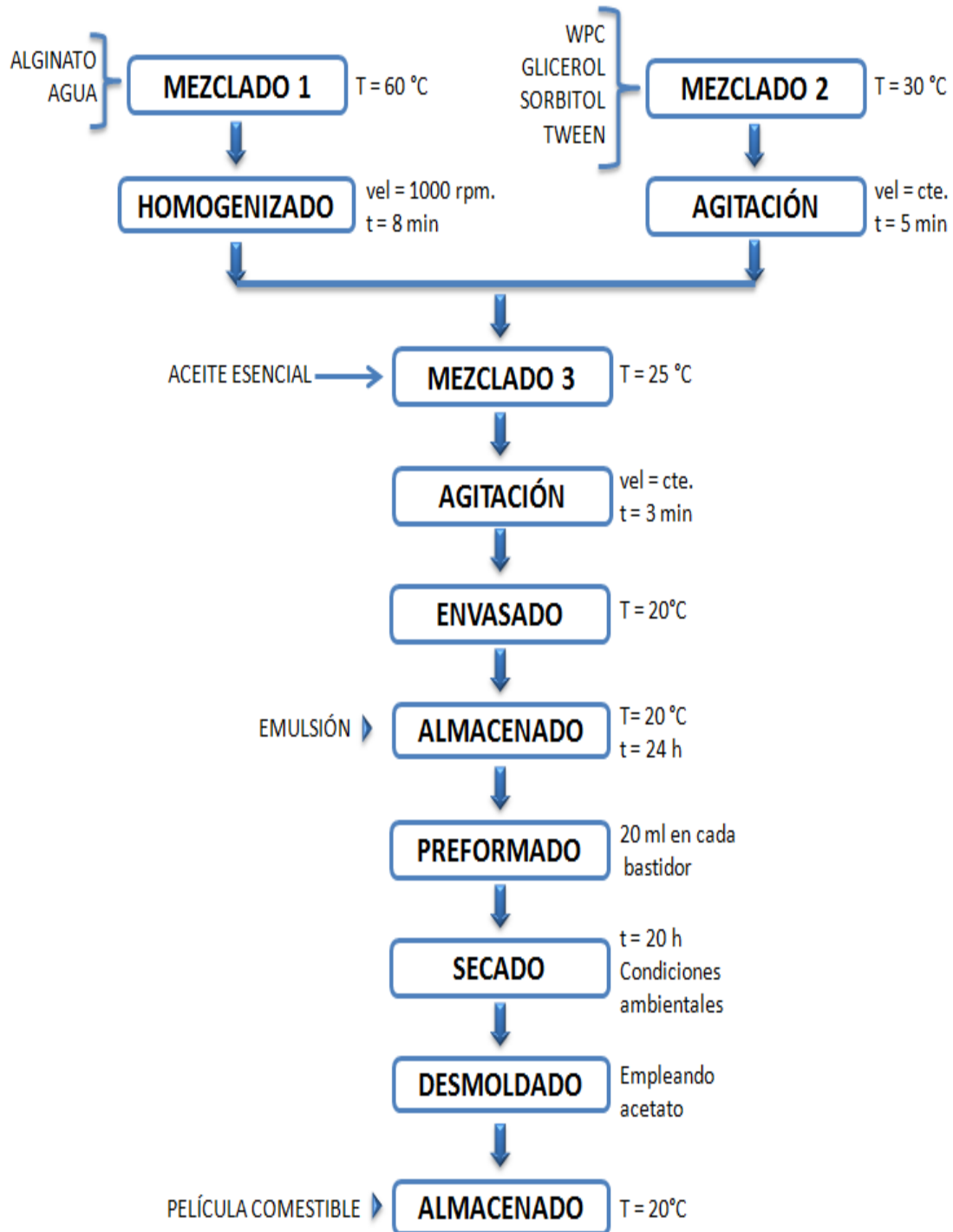


Figura 49. Diagrama de proceso para elaboración de películas comestibles.

ANEXO IV. CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
SECRETARÍA GENERAL ACADÉMICA
CARRERA DE BIOLOGÍA





FESI/HI/30/2013

MELISSA SARAHÍ JARAMILLO SUÁREZ,
Alumno de la Carrera de Ingeniería de Alimentos,
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM
Presente.

Por este conducto me permito proporcionar a usted la identificación taxonómica del material botánico de respaldo de trabajo de tesis: “Extracción de aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) VERBENACEAE y desarrollo de películas comestibles antimicrobianas para control de *Listeria monocytogenes*”, que se realiza en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (Campo 1) y bajo la dirección de la QFB Brígida del Carmen Camacho Enríquez.

Así mismo, le informo que la planta ha sido integrada en la **Colección Etnobotánica** del Herbario Iztacala con el siguiente número de registro:

NOMBRE CIENTÍFICO	FAMILIA	NOMBRE POPULAR	NO. DE REGISTRO
<i>Lippia graveolens</i> Kunt	VERBENACEAE	“Orégano”	2187 IZTA

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Los Reyes Iztacala, Edo. de México., 20 de junio de 2013



M. EN C. MA. EDITH LÓPEZ VILLAFRANCO
RESPONSABLE DEL HERBARIO IZTACALA





Edificio de gobierno, primer piso
Tel: 5623-1147 • 5623-1149
Fax: 5623-1149
Av. de los Barrios N.º 1, Los Reyes Iztacala,
Tlalnepantla, CP 54090,
Estado de México, México.

Herbario IZTA
Edificio L4, Planta baja
Av. de los Barrios No.1
Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla
Estado de México, CP 54090 MÉXICO
Tel/Fax: 5623-1378
herbario_izta@campus.iztacala.unam.mx




Figura 50. Certificado de identificación taxonómica de orégano.

ANEXO V. ESPECTROS INFRARROJO

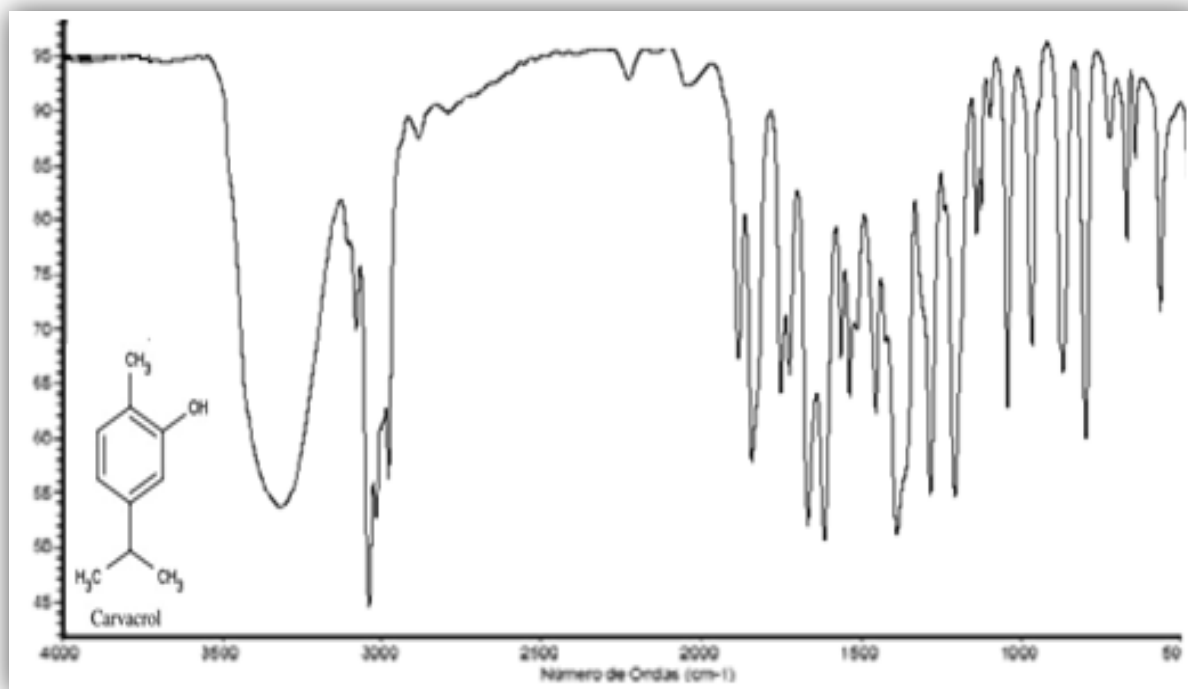


Figura 51. Espectro infrarrojo de Carvacrol.

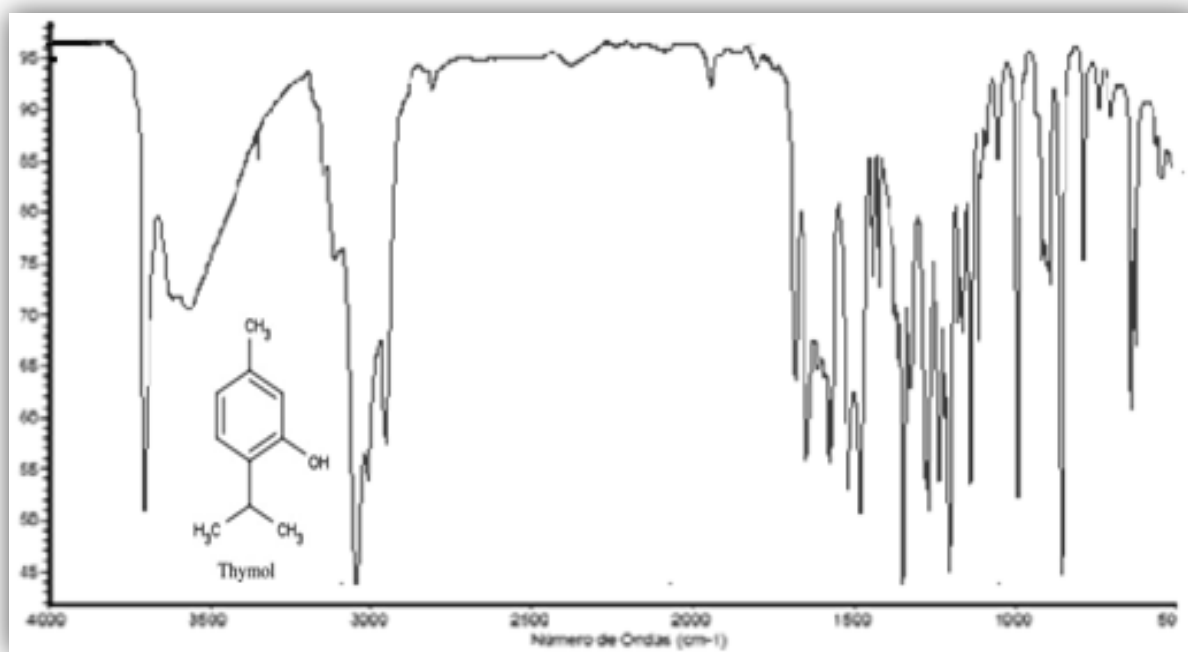


Figura 52. Espectro infrarrojo de Timol.

ANEXO VI. PERMEABILIDAD AL OXÍGENO

Tabla 33. Valores para calcular la permeabilidad al oxígeno de las películas comestibles.

MTA	A(m ²)	L (m)	ΔP (atm)	m (g O ₂ permeado)
1				9.875 E-4
2	1.5904 E-3	6.5 E-5	2.72236	1.185 E-3
3				9.875 E-4

ANEXO VII. PERMEABILIDAD DE VAPOR DE AGUA

Tabla 34. Valores para calcular la permeabilidad al vapor de agua de las películas comestibles.

MTA	J (gh ⁻¹)	A(m ²)	VTVA (g h ⁻¹ m ⁻²)	T (K)	Pw1 (Pa)	Pw2 (Pa)	L (m)
1	0.0925		18.4022				
2	0.0696	5.02656 E-3	13.8464	293	2332.4928	899.5526	6.5 E-5
3	0.0861		17.1290				

ANEXO VIII. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO.

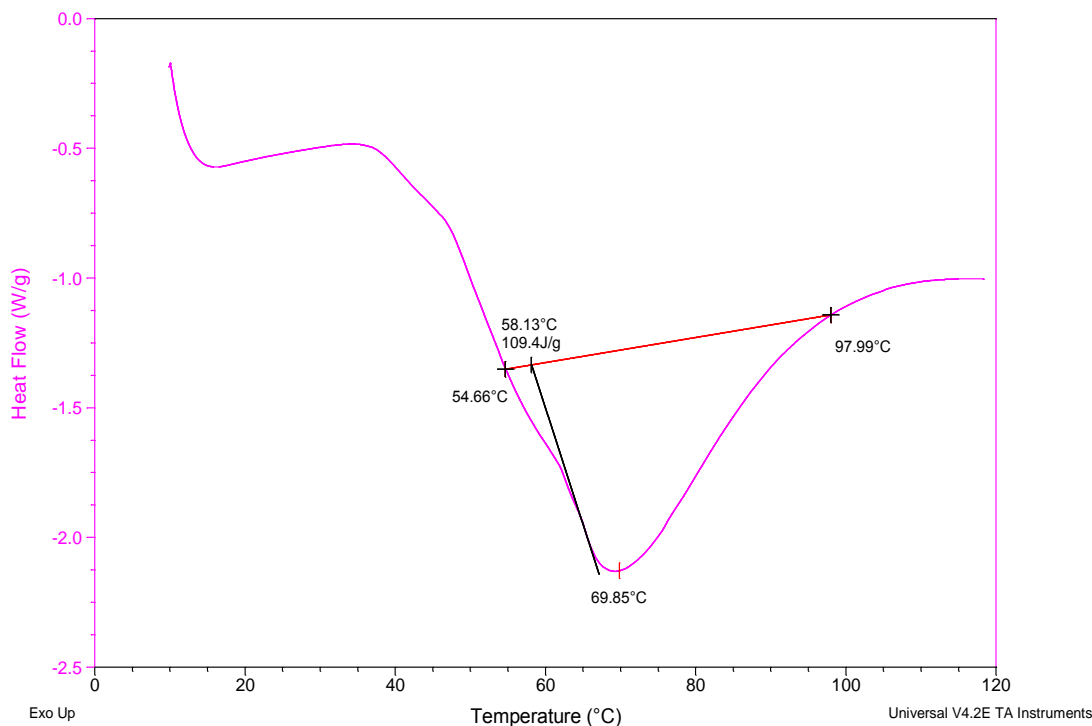


Figura 53. Termograma de la película comestible antimicrobiana.

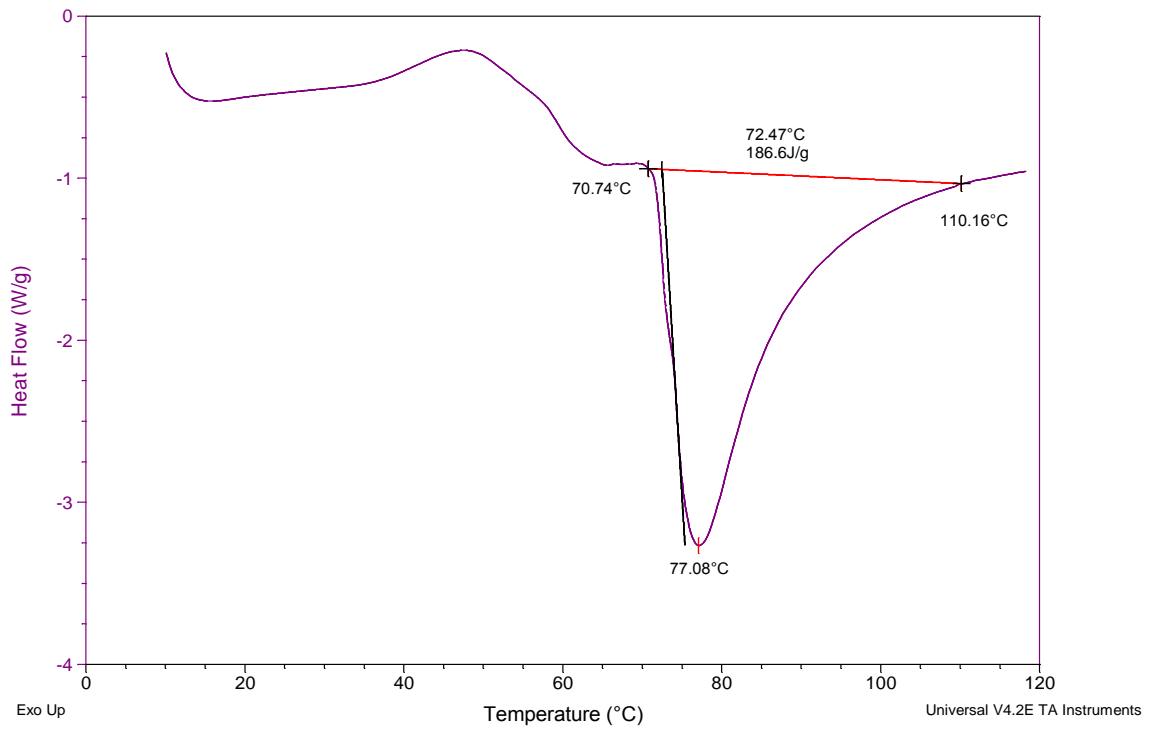


Figura 54. Termograma del concentrado de proteína.

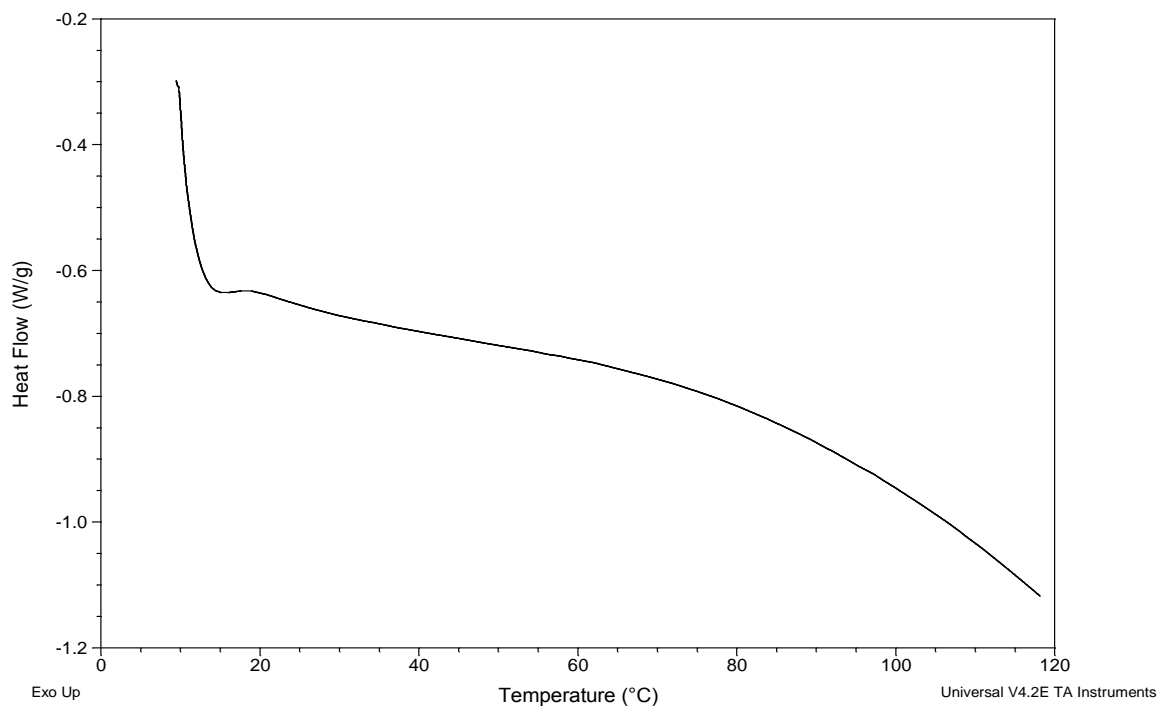


Figura 55. Termograma del aceite esencial de orégano.

ANEXO IX. GLOSARIO

Ápice	Del latín <i>Ápex</i> , propio de la base o relativo a ella.
Brácteas	Órgano foliáceo en la proximidad de las flores y diferente a las hojas normales.
Cáliz	Verticilo externo del perianto; los sépalos en su conjunto.
Conspicuas	Sobresaliente.
Corola	Conjunto de pétalos, generalmente coloreados, que están en el interior del cáliz de la flor y protegen los órganos de reproducción.
Crenado	Del latín <i>Cretatus</i> , crena, muesca, diente redondeado del margen de una hoja.
Enrasar	Procedimiento por el cual se lleva el volumen del líquido al nivel deseado.
Envés	Cara inferior de la hoja.
Fenología	Relación entre los factores climáticos y los ciclos de los seres vivos.
Fitofenología	Estudia cómo afectan las variables meteorológicas a las manifestaciones periódicas o estacionales de las plantas (floración, aparición (cuajado) de frutos y su maduración, caída de hojas y dormancia).
Foliar	Relativo a la hoja.
Haz	Cara superior de la hoja.
Imbricadas	Dicho de una serie de hojas o de piezas florales, que, estando muy próximas, llegan a solaparse por los bordes.
Inflorescencias	Sistema de ramificación o agrupación de flores.
Isotropismo	Cualidad de presentar las mismas condiciones homogéneas de intensidad, variación, fuerza, brillo, forma, etc. en todas las direcciones.

Lancelotadas	Del latín <i>Lanceolatus</i> , angostamente elíptico que se estrecha (por igual) hacia cada extremo (longitudinal:anchura = 6:1 a 3:1).
Oblonga	Más largo que ancho.
Obtuso	Con márgenes de rectos a cóncavos que forman un ángulo terminal mayor de 90 grados.
Pecíolos	Del latín <i>Petiolus</i> , pie, tronco de una planta, es el rabillo que une a la lámina de una hoja a su base foliar o al tallo.
Pedúnculos	Rabillo de la hoja, flor o fruto con que se une un tallo.
Perenne	Del latín <i>Perennis</i> , se trata de un adjetivo que refiere a aquello incesante o continuo, para la botánica se refiere a la planta que vive más de dos años, además indica que el follaje se mantiene verde en todas las estaciones del año.
Peritricos	Bacteria con varios flagelos.
Piloso	Relativo al pelo.
Profilaxis	Acciones que se toman anticipadamente para prevenir una enfermedad.
Saprófita	Que se aloja en el organismo, en especial en el tubo digestivo y se alimenta de materias en putrefacción.
Sépalos	Partes que envuelven a las otras piezas florales en las primeras fases de desarrollo, cuando la flor es sólo un capullo.
Sésil	Hoja sin pecíolo. Que carece de soporte/ unido a una superficie externa.
Subcordada	Con forma casi de corazón.
Subglobosas	Casi esférico.
Tomentoso	Conjunto de pelos largos y muy entrecruzados que cubren totalmente la superficie.