



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

COMPARACIÓN DEL EFECTO DE DOS RECUBRIMIENTOS ANTIMICROBIANOS
FRENTE A *SALMONELLA SPP.* PARA SER APLICADO EN AGUACATE *HASS.*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

ROSARIO BERENICE DÍAZ MÉNDEZ

ASESORAS:

DRA. CLARA INÉS ÁLVAREZ MANRIQUE
IQ. GUADALUPE FRANCO RODRIGUEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2016



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.

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

DEDICATORIA:

Esta tesis se la dedico a mis dos amores (mi pequeño Alexis y a Ricardo) y a mis padres y hermano ya que sin ellos no hubiera podido llegar a la meta lo amo.

AGRADECIMIENTOS:

A mi compañero de vida, Ricardo quien fue mi motor para salir adelante junto con mi pequeño Alexis, el logro fue de los dos, Te amo.

A mi pequeño Alex por regalarme el tiempo empleado para culminar este proyecto, valió la pena hijo.

A mis padres, los cuales caminaron a mi lado durante todo este tiempo gracias por acompañarme a la meta, los amo.

A mi hermano, el cual es mi orgullo gracias por darme tu apoyo en cada etapa de mi vida, te amo.

A mis suegros por todo el apoyo brindado durante todos estos años.

A mis amigos de la FES C: Mine, Laura, Lulú, Cedillo, Obed, Johany, Absa, Delbert con los cuales viví una de las etapas más bonitas de mi vida, los quiero mucho, gracias por esos días inolvidables y por todo su apoyo.

A la doctora Clara Inés por ser más que mi asesora mi amiga, gracias por todo el logro es de las dos, la quiero mucho.

A la doctora Gíncela y a la profesora Ana María de la Cruz por sus consejos, las quiero mucho.

A mis sinodales por su valioso tiempo al revisar este trabajo.

Por último a la UNAM por ser mi segunda casa y por darme la oportunidad de sentir el orgullo de ser PUMA.

POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU...

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
I.MARCO TEÓRICO	
1.1 Generalidades del aguacate	4
1.1.2 Clasificación y Variedades	5
1.1.3 Morfología, fisiología y bioquímica del aguacate	7
1.1.4 Composición y valor nutritivo	10
1.1.5 Aspecto socioeconómico	13
1.1.5.1 Producción en México	13
1.1.5.2 Distribución	15
1.1.5.3 Exportación e importación	17
1.1.6 Normatividad	19
1.2 Importancia de los recubrimientos, usos y aplicaciones	20
1.2.2 Características	21
1.2.3 Propiedades de recubrimientos	22
1.2.3.1 Propiedades barrera	22
1.2.3.1.1 Barrera al vapor de agua	23
1.2.3.1.2 Barrera a los gases	23
1.2.4 Factores que afectan la calidad de los recubrimientos	24
1.2.5 Composición de los recubrimientos	24
1.2.5.1 Hidrocoloides	24
1.2.5.1.1 Proteínas	25
1.2.5.1.2 Polisacáridos	25
1.2.5.2 Lípidos	26
1.2.5.3 Mezcla de componentes	26
1.2.5.4 Aditivos	27
1.2.5.4.1 Plastificantes	27
1.2.5.4.2 Compuestos Antimicrobianos	29
1.2.5.4.3 Ejemplo de empaques con función antimicrobiana	33
1.2.6 Recubrimientos antimicrobianos	34

ÍNDICE

1.2.6.1 Ventajas y desventajas de incorporar antimicrobianos a recubrimientos.	35
1.2.7 Mecanismo de formación de recubrimientos	35
1.2.8 Métodos para la aplicación de películas y recubrimientos	37
1.2.8.1 Inmersión	37
1.2.8.2 Spray	37
1.2.8.3 Coating	37
1.3 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)	38
1.3.1 Clasificación de ETA	38
1.3.2 Modo de transmisión de ETA	40
1.3.3 Situación Nacional e internacional en el ámbito de ETA	41
1.3.4 Microorganismos comunes relacionados con ETA	44
1.3.5 <i>Salmonella spp.</i>	47
1.3.5.1 Características	47
1.3.5.2 Enfermedades atribuidas a <i>Salmonella spp.</i>	48
1.3.5.3 Fuentes de transmisión	50
1.3.6 Prevención y control de ETA	50
JUSTIFICACIÓN	53
OBJETIVOS	54
CUADRO METODOLÓGICO	55
II METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	
2.1 Elaboración de curva de crecimiento microbiano	56
2.1.1 Preparación de suspensiones bacterianas	56
2.1.2 Estandarización de caldo de cultivo	56
2.1.3 Determinación de fase estacionaria de <i>Salmonella spp.</i>	56
2.2 Prueba de inhibición cualitativa por el método de Difusión en caja	58
2.2.1 Prueba de inhibición “in vitro” de crecimiento de <i>Salmonella spp.</i> A diferentes concentraciones de Antimicrobiano	59
2.2.2 Confirmación de la actividad bactericida/bacteriostática del antimicrobiano	60

ÍNDICE

2.2.3 Toxicidad del neutralizante para la bacteria <i>Salmonella spp</i>	60
2.3 Desarrollo de recubrimientos y películas antimicrobianas	61
2.3.1 Elaboración de bastidores	61
2.3.2 Elaboración de recubrimientos antimicrobianos	62
2.3.4 Pruebas de inhibición “ <i>in vitro</i> ” de los recubrimientos	64
2.3.1.4 Pruebas de inhibición “ <i>in vitro</i> ” en caja	64
2.3.4.2 Pruebas de inhibición “ <i>in vitro</i> ” por dilución en tubo	65
2.3.5 Caracterización fisicoquímica de los recubrimientos	65
2.3.5.1 Propiedades de barrera	66
2.3.5.2 Propiedades térmicas	68
2.4 Recubrimientos aplicados a aguacate	70
2.4.1 Selección de la materia prima	70
2.4.4 Recubrimiento de aguacates por inmersión	72
2.4.5 Pruebas de inhibición “ <i>in vivo</i> ” en aguacate	75
2.5 Análisis estadístico	77
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1 Determinación de fase estacionaria de <i>Salmonella spp.</i>	78
3.1.1 Curva de crecimiento microbiano	78
3.2 Prueba de inhibición “ <i>in vitro</i> ”	80
3.2.1 Prueba de inhibición cualitativa por el método de Difusión en caja	80
3.2.2 Prueba de inhibición por el método de dilución en tubo	81
3.2.3 Confirmación de la actividad bactericida/bacteriostática	84
3.2.4 Toxicidad del neutralizante para la bacteria <i>Salmonella spp</i>	85
3.3 Desarrollo de recubrimientos y películas antimicrobianas	86
3.3.1 Pruebas de inhibición “ <i>in vitro</i> ” de los recubrimientos	90
3.3.1.2 Pruebas de inhibición “ <i>in vitro</i> ” en caja	90
3.3.1.3 Pruebas de inhibición “ <i>in vitro</i> ” por dilución en tubo	91
3.3.2 Caracterización fisicoquímica de los recubrimientos	92
3.3.2.1 Propiedades de barrera	92

ÍNDICE

3.3.2.2 Propiedades térmicas	94
3.4 Pruebas de inhibición " <i>in vivo</i> " en el aguacate	97
CONCLUSIONES	108
CONSIDERACIONES	109

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Cuadro 1. Variedades de aguacate cultivadas en México	6
Cuadro 2. Composición química del aguacate	11
Cuadro 3. Aminoácidos presentes en el aguacate	11
Cuadro 4. Porcentaje de ácidos grasos en el aguacate	12
Cuadro 5. Vitaminas hidrosolubles y liposolubles del aguacate	12
Cuadro 6. Minerales presentes en el aguacate	13
Cuadro 7. Porcentaje de producción nacional de aguacate durante todo el año	15
Cuadro 8. Características de matrices poliméricas formadoras de recubrimientos	27
Cuadro 9. Principales agentes patógenos relacionados con ETA en Estados Unidos	42
Cuadro 10. Microorganismos comunes en la contaminación de alimentos	45
Cuadro 11. Tiempo definido para cada toma de muestra durante la realización de la curva de crecimiento de <i>Salmonella spp.</i>	57
Cuadro 12. Siembra de <i>Salmonella spp.</i> En agar cuenta estándar para prueba de toxicidad del neutralizante	61
Cuadro 13. Formulación 1 a base de alginato de sodio con antimicrobiano (8000, 9000, 10 000 ppm)	62
Cuadro 14. Formulación 2 a base de pectina y cera de candelilla con antimicrobiano (7000, 8000, 9000 ppm)	62
Cuadro 15. Formulación 3 a base de almidón de maíz y grenetina con antimicrobiano 7000 ppm	62
Cuadro 16. Resultados obtenidos por conteo microbiano y por espectrofotómetro	78
Cuadro 17. Efecto inhibitorio del desinfectante frente a <i>Salmonella spp.</i>	82
Cuadro 18. Efecto bactericida del antimicrobiano	85
Cuadro 19. Características de los recubrimiento probados	87
Cuadro 20. Características de películas preformadas de pectina y alginato	89
Cuadro 21. Resultados obtenidos en la prueba de ángulo de contacto para las películas de pectina	93
Cuadro 22. Comportamiento térmico de las películas de alginato	94
Cuadro 23. Comportamiento térmico de las películas de pectina	95
Cuadro 24. Efecto antimicrobiano del recubrimiento de pectina aplicado a aguacate Hass.	98

ÍNDICE

Cuadro 25. Efecto antimicrobiano de recubrimiento de alginato aplicado a aguacate Hass.	99
Cuadro 26. Observaciones del recubrimiento de alginato a lo largo de 2 semanas	101
Cuadro 27. Observaciones del recubrimiento de pectina a lo largo de 2 semanas	104
Cuadro 28. Ventajas y desventajas de los recubrimientos antimicrobianos aplicados a aguacate Hass durante la experimentación.	108
Cuadro 29 Reactivos de caldo neutralizante	119

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura1. Morfología de aguacate	8
Figura2. Producción de aguacate (miles de toneladas) en el periodo del 2000-2013	14
Figura3. Porcentaje del valor de la producción por entidad federativa en el año 2013.	14
Figura 4. Comercio exterior de aguacate	17
Figura 5. Principales países importadores de aguacate	18
Figura 6. Importaciones de aguacate en Estados Unidos	18
Figura 7. Principales destinos de las exportaciones mexicanas	19
Figura 8. Esquema general de las intoxicaciones alimentarias más frecuentes	39
Figura 9. Esquema general de las infecciones más frecuentes causadas por alimentos	40
Figura 10. Casos e incidencia por año de intoxicaciones alimentarias en México	44
Figura 11. <i>Salmonella spp.</i>	47
Figura 12. Cuadro metodológico	55
Figura 13. Esquema para la elaboración de la curva de crecimiento microbiano	58
Figura 14. Esquema de siembra por el método de gota	58
Figura 15. Metodología empleada para prueba de inhibición “ <i>in vitro</i> ”	60
Figura 16. Bastidor elaborado para el preformado de las películas antimicrobianas	61
Figura 17. Equipo TANTEC, Contact Angle Meter	67
Figura 18. Preparación de la muestra para la prueba de ángulo de contacto: a) división de la película en segmentos para la toma de muestra; b) cuadros de 3x3 cm.	67
Figura 19. Evaluación de la película	68
Figura 20. Medidor del ángulo de contacto que se forma en la película	68
Figura 21. Calorímetro TA-INSTRUMENTS	69
Figura 22. Representación de la ubicación de las cápsulas en la sección interna.	69
Figura 23. Representación gráfica de un análisis DSC.	70
Figura 24. Etapas de maduración de aguacate	71
Figura 25. Desinfección de frutos	72
Figura 26. Prueba para descartar presencia de <i>Salmonella spp.</i> en aguacates desinfectados	73
Figura 27. Recubrimiento de alginato de sodio.	74
Figura 28. Aguacate recubierto con solución de alginato de sodio	74
Figura 29. Aguacate recubierto con solución de pectina	74

ÍNDICE

Figura 30. Almacenamiento de frutos recubiertos	75
Figura 31. Corte representativo para la evaluación del recubrimiento	75
Figura 32. Cáscara de aguacate inoculada con <i>Salmonella spp.</i>	76
Figura 33. Frotación de la muestra inoculada	76
Figura 34. Toma de muestra para evaluación del recubrimiento	76
Figura 35. Tubos sembrados con la muestra del recubrimiento y <i>Salmonella spp.</i>	77
Figura 36. Curva de crecimiento bacteriano en función del tiempo	79
Figura 37. Curva de crecimiento bacteriano con respecto a la medición de la absorbancia.	80
Figura 38. Prueba de inhibición en caja a diferentes concentraciones de antimicrobiano	81
Figura 39. Prueba de toxicidad del neutralizante	86
Figura 40. Recubrimientos elaborados a partir de polímeros naturales	86
Figura 41. Películas preformadas a partir de los recubrimientos elaborados	89
Figura 42. Evaluación antimicrobiana de los recubrimientos de alginato en caja.	90
Figura 43. Evaluación antimicrobiana de los recubrimientos de pectina en caja.	90
Figura 44. Efecto bactericida de los recubrimientos evaluados	91
Figura 45. Termograma comparativo de las películas de alginato	95
Figura 46. Termograma comparativo de las películas de pectina	96

RESUMEN

En este proyecto se evaluaron dos recubrimientos formulados con un antimicrobiano de origen natural frente a su capacidad inhibitoria de *Salmonella spp.*; se determinó la actividad del antimicrobiano utilizando la bacteria en fase estacionaria (la cual se alcanzó en 8 horas de incubación a 37°C/ 24 h con agitación a 80 rpm) como lo sugiere *Iturriaga, et al. (2012)*.

Se desarrollaron dos recubrimientos antimicrobianos utilizando como matriz polimérica alginato de sodio 1% o pectina 3% con cera de candelilla 1.5%, glicerol 1.5% como plastificante, como agente antimicrobiano se empleó Bioxitral® (antimicrobiano de amplio espectro hecho a base de ácidos orgánicos) a concentraciones de 7000, 8000, 9000 y 10000 ppm.

Con el fin de evaluar la eficacia de los recubrimientos antimicrobianos se efectuaron pruebas de inhibición “*in vitro*” siguiendo la norma NMX-bb-040-SCFI-1990.

Además se realizaron pruebas fisicoquímicas (propiedades barrera) y calorimétricas (DSC) con el objetivo de caracterizar los recubrimientos para posteriormente ser aplicados sobre aguacate *Hass* y fomentar su inocuidad. Posteriormente se seleccionaron 42 aguacates de acuerdo a su estado de madurez de consumo (firme al tacto, “no maduro”, se lavaron y desinfectaron, 21 aguacates fueron con la formulación de alginato y 21 frutos con la formulación de pectina y se tomaron como controles aguacates sin recubrir (1 para cada día de muestreo).

Los aguacates recubiertos se almacenaron durante 14 días a 17 °C; para evaluar la efectividad de los recubrimientos en el aguacate se realizaron pruebas de inhibición “*in vivo*” en los días de muestreo establecidos (0, 3, 5, 7, 9, 12 y 14) .

La concentración del antimicrobiano incorporado al recubrimiento de alginato fue de 10 000 ppm. y para el recubrimiento de pectina con cera de candelilla fue de 9000 ppm.; ambos recubrimientos antimicrobianos (pectina y alginato) lograron controlar el crecimiento de *Salmonella spp.* durante 9 días, presentando efecto bactericida.

Sin embargo el recubrimiento antimicrobiano de pectina evaluado en este proyecto presentó mejores resultados, por lo cual representa una buena propuesta para ser utilizado en aguacate *Hass* a escala comercial.

INTRODUCCIÓN

El aguacate proviene de un árbol que se originó en una amplia zona geográfica que abarca desde la planicie central de México hasta la costa de la América Central, en el Pacífico (CONACYT, 2008). Este fruto tiene más de 400 variedades, sin embargo, la variedad *Hass* es la más consumida en el ámbito mundial, siendo el principal cultivar comercial en el estado de Michoacán, ocupando el 98% de las plantaciones poniendo así a México como el principal productor de aguacate en el mundo, ya que en el 2011 alcanzó 1 millón 92 mil 344 toneladas (*Morales, 2012*). En el año 2008 la exportación de aguacate se vio frenada debido a brote de salmonelosis que enfermó a 23 personas en Carolina del Norte y a más de 1,200 personas en Estados Unidos por infección de *Salmonella* en Chile Jalapeño y aguacate, cultivados en México (*Department of health and human services, 2008*). Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) representan uno de los problemas de salud pública más importantes a nivel mundial, anualmente se registran un total de 6 a 81 millones de casos.

El microorganismo más común en los casos de enfermedades transmitidas por los alimentos es la *Salmonella*, un patógeno importante que causa un gran impacto socioeconómico en todo el mundo por enfermedades gastrointestinales, gastos médicos y pérdida de la productividad en alimentos contaminados, se estima que afecta al año a decenas de millones de personas de todo el mundo y provoca más de cien mil defunciones (*OMS, 2013*).

Esta bacteria generalmente está asociada con agua y alimentos, como mantequilla de maní, frutas y hortalizas, almendras, huevos y productos cárnicos (*Mani et al., 2012*).

Aunado a esto se han desarrollado películas y recubrimientos comestibles (elaborados con polisacáridos, proteínas, lípidos y/o combinaciones de los mismos), los cuales son capas delgadas de materiales no tóxicos que se aplican en los productos alimenticios actuando de barrera frente a humedad y oxígeno principalmente; también pueden ser utilizados como soporte de aditivos, componentes antimicrobianos, conservadores, acidificantes, sales o antioxidantes que permitan mejorar su conservación y apariencia (*Herrera, 2011*).

Otra de sus funciones es proteger el producto contra daños mecánicos, físicos y químicos, así como prevención en el desarrollo de microorganismos, influyendo enormemente en la conservación, distribución y comercialización de los alimentos (*Falguera et al., 2011*).

INTRODUCCIÓN

Los términos recubrimiento y película se utilizan indistintamente pero su diferencia radica en la forma en la que se elaboran y aplican al alimento; un recubrimiento es una capa delgada de materiales comestibles que se aplica en forma líquida y directamente al alimento mediante aspersión o inmersión; mientras que una película comestible es una capa delgada preformada como láminas sólidas de materiales comestibles, que una vez formada se puede colocar como envoltura en o entre los componentes de los alimentos. Los recubrimientos y las películas pueden ser utilizados como soporte de aditivos, conservadores, antioxidantes, componentes antimicrobianos que permiten mantener altas concentraciones de estas sustancias en las superficies de los alimentos mejorando así su conservación y apariencia (Herrera, 2011; Jung, 2014). Se han propuesto varios compuestos para la actividad antimicrobiana en el envasado de alimentos, incluidos los ácidos orgánicos, enzimas, especias y aceites esenciales (Saucedo et al., 2009). La aplicación de ácidos orgánicos en películas y recubrimientos antimicrobianos son una buena alternativa al ser eficientes en la inhibición de microorganismos patógenos, son económicos, se caracterizan por ser compuestos de origen natural reconocidos como seguros (GRAS), sin embargo es necesario tomar en cuenta si se presentan cambios en las características sensoriales al ser incorporados al alimento (Falguera, et al. 2011). De ese modo la realización de este proyecto está enfocada en el fomentar la inocuidad en aguacate Hass para minimizar pérdidas por presencia de patógenos como la *Salmonella* y lograr la aceptación del consumidor por medio de la comparación de dos recubrimientos antimicrobianos utilizando como matriz estructural un polisacárido, una mezcla de hidrocoloide-lípido y como agente antimicrobiano un desinfectante a base de ácidos orgánicos, para seleccionar el recubrimiento que represente una opción viable al ser utilizado en aguacate Hass a escala comercial.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1 Generalidades del aguacate

El aguacate proviene de un árbol que se originó en una amplia zona geográfica que abarca desde la planicie central de México hasta la costa de la América Central, en el Pacífico (CONACYT, 2008). El árbol del Aguacate es frondoso y de hoja perenne, es un árbol que alcanza de 6 a 20 m. de altura, sus hojas son verdes y grandes, las flores son diminutas y amarillas y de ellas nacen los aguacates, tiene una floración muy generosa y se obtiene fruto en un porcentaje muy alto (SIA, 2010).

El fruto que es una baya de una semilla de forma periforme, ovoide, globular o elíptica, tiene un rango de peso bastante amplio que en las variedades comerciales oscila entre los 120 g y los 2.5 kg, es de color verdoso (según la variedad), el fruto está cubierto de una cáscara de diferentes espesores, las cuales pueden ser delgadas, lisas, rugosas y gruesas, piel fina o gruesa; cuando está maduro, la pulpa tiene una consistencia como de mantequilla, al interior presenta un color amarillo claro, casi inodora y sabor algo parecido a las avellanas, es muy rica en proteínas y en grasas, con un contenido en aceite del 10 al 20%. Los suelos más recomendados para su cultivo son los de textura ligera, profundos, bien drenados con un pH neutro o ligeramente ácidos (5.5 -7) puede cultivarse en suelos arcillosos o franco arcillosos siempre que exista un buen drenaje. Su cultivo se recomienda en altitudes entre 800 y 2,500 m, para evitar problemas con enfermedades, principalmente de las raíces (SE, 2012; COMA, 2012).

El fruto es sensible al frío y a la humedad, por lo que su establecimiento por lo regular es en regiones de vientos calurosos, secos y libres de heladas.

La temperatura y la lluvia son los dos factores de mayor incidencia en el desarrollo de este cultivo, en cuanto a precipitación, se considera que 1,200 mm anuales bien distribuidos son suficientes. Las sequías prolongadas provocan la caída de las hojas, estimulando un bajo rendimiento, la precipitación excesiva durante la floración y fructificación, reduce la producción y provoca la caída del fruto. El viento produce daño, rotura de ramas y caída del fruto; cuando el viento es muy seco durante la floración, se reduce el número de flores polinizadas y por consiguiente de frutos, lo que provoca que disminuya la producción anual del fruto (SE, 2012; Barrientos et al., 2006).

1.1.2 Clasificación y Variedades

- **Clasificación**

Hay básicamente tres grupos ecológicos de aguacate: Mexicana, Guatemalteca y Antillana.

- ✓ **Mexicana:** Mayor resistencia a las heladas, madurez precoz con frutos periformes o alargados y cascara no leñosa, resistente al frío.
- ✓ **Antillana:** Se siembra en lugares muy cálidos y con gran humedad, los árboles son menos vigorosos, los frutos son de color verde y presentan pecas y su peso oscila entre los 250 y 750 gramos. Su sensibilidad elevada al frío merma su comercialización.
- ✓ **Guatemalteca:** La vida de post cosecha del frutos es más larga, sus frutos son ovoides con un peso entre los 125 y 1250 gramos. Su resistencia al frío es intermedia y la cantidad de aceite es menor a la mexicana (SAGARPA, 2011).

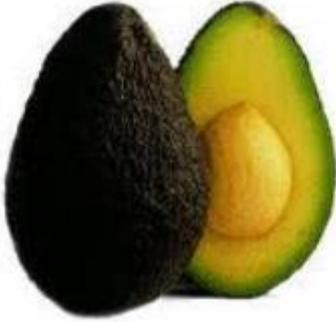
- **Variedades**

El cultivo denominado *Fuerte*, prolifera en California y otras regiones mediterráneas subtropicales es, aparentemente, un híbrido natural entre las variedades mexicana y guatemalteca, si bien con características predominantes de la variedad mexicana.

De las tres especies primigenias (mexicana, guatemalteca y antillana) se derivan variedades adaptadas a cada condición de cultivo, dando frutos con sabores, texturas, colores y olores variados (cuadro 1).

Las variedades más comercializadas internacionalmente son las de origen Guatemalteca o Mexicana, especialmente *Hass* y *Fuerte*.

Cuadro 1. Variedades de aguacate cultivadas en México

Variedad	Característica
<p>Hass</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • El fruto se puede mantener en el árbol por algunos meses después de su madurez fisiológica. • Al momento de la cosecha, su cáscara es rugosa y gruesa pero flexible, de color verde, forma ovalada y con semillas que van de pequeñas a medianas difíciles de desprender. • Al madurar, su cáscara cambia de color verde a negra, la textura de la pulpa se torna cremosa y de color verde pálido y su semilla se desprende fácilmente. • Es muy rico en grasas y en proteínas. El peso de la fruta oscila entre los 120 g y los 400 g.
<p>Fuerte</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Esta variedad es originaria de California. Tiene forma de pera y semillas de tamaño medio y se puede pelar fácilmente. • Su tamaño es mayor que el de otros tipos de aguacates, su peso puede variar de 141 y 400g. • Su piel es suave y verde manteniéndose verde cuando está maduro, la pulpa es de color verde pálido.
<p>Bacon</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Frutos de 198 a 340 g., forma ovoide y semillas grandes. • Cáscara verde oscuro, delgada, de buen sabor. • Pulpa de color amarillo-verde pálido.
<p>Reed</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • La fruta es redonda de 226 a 283 gramos, cáscara gruesa y color verde, de buen sabor. • Contenido de aceite de 18 a 20% la fruta puede permanecer en el árbol buen tiempo después de su maduración fisiológica.

Fuente: Coma, 2012.

1.1.3 Morfología y fisiología del aguacate

- **Morfología**

El fruto del aguacate es una baya que deriva de un gineceo unicarpelar y que contiene una sola semilla. El pericarpio consiste de tres capas: el exocarpio que comprende la cáscara, el mesocarpio pulposo que es la porción comestible de la fruta, y una capa interna delgada junto a la cubierta de la semilla que corresponde al endocarpio (figura 1).

- ✓ **Exocarpio**

Comúnmente se conoce como cáscara, puede ser rugoso e irregular como en las variedades Hass, Pinkerton, y Whitsell, o completamente liso como en el caso de algunas variedades Mexicanas.

El grosor del exocarpio en las tres razas de aguacate es de la siguiente manera: raza Guatemalteca >raza Antillana>raza Mexicana, en la raza Guatemalteca hemos registrado hasta un grosor de 0.5 cm y en donde el estado de madurez de consumo de tales frutos es difícil de determinar al tacto y la única manera de saberlo es presionando en la base de la unión del fruto al pedicelo que es la parte más blanda del fruto.

- ✓ **Mesocarpio**

Se caracteriza por ser la parte comestible del fruto y está compuesto por lípidos, proteínas, carbohidratos y un contenido alto de humedad correspondiente al 78%, además cuenta con un alto contenido de nutrientes mencionados en el siguiente apartado.

- ✓ **Endocarpio**

El endocarpio del aguacate consiste en una capa frágil que es difícil de identificar en el fruto maduro, ya que este tejido está fuertemente asociado con la envoltura de la semilla.

- ✓ **Semilla**

La semilla está formada por dos cotiledones en cuyo interior se localiza el embrión y esta se encuentra revestida por una capa (endocarpio), algunas veces fuertemente adherida a los cotiledones y otras veces suelta (*Barrientos et al., 2006*).

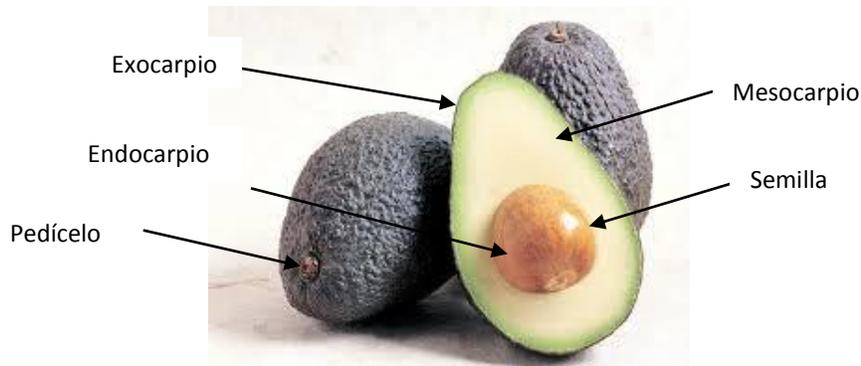


Figura 1. Morfología de aguacate

- **FISIOLOGÍA**

Durante el desarrollo y crecimiento del aguacate suceden una serie de cambios que conllevan a la adquisición de las características típica de la variedad en estudio.

La vida de todas las frutas se puede dividir en tres etapas fisiológicas: el crecimiento, la maduración y la senescencia.

El crecimiento implica la división celular y el subsiguiente desarrollo de las células que dan cuenta del tamaño final alcanzado por el producto.

La maduración fisiológica suele iniciarse antes de que termine el crecimiento e incluye diferentes actividades en los distintos productos.

La senescencia se define como una fase en la que los procesos bioquímicos anabólicos dan paso a los catabólicos conduciendo al envejecimiento y finalmente a la muerte tisular.

El aguacate sigue creciendo ligeramente después del corte y la semilla hasta ocupar todo el espacio en la cáscara; se le clasifica como un fruto climatérico debido su respiración, ya que aumenta conforme este madura. En la etapa de maduración organoléptica, la actividad respiratoria aumenta de manera significativa (*Estrella, 2012*).

A lo largo de la maduración se llevan a cabo diferentes cambios en el fruto:

- ✓ **Cambios físicos**

Cambios de color: Los cloroplastos de las células del fruto sufren un desmantelamiento, que acaba con las clorofilas.

Este fenómeno desenmascara otros pigmentos existentes, percibidos en un cambio en el color del fruto, que deja de ser verde.

El etileno que se produce en forma natural en el fruto se considera como un regulador del crecimiento, provocando entre otros cambios la biosíntesis de diferentes pigmentos y degradación de la clorofila.

Alteraciones en el sabor: cambios en la acidez, astringencia y dulzor. En la respiración hay una degradación oxidativa de los materiales de reserva (compuestos carbonados: almidón) del fruto que da lugar a compuestos sencillos como los azúcares y ácidos orgánicos.

Otro cambio que se da en la maduración es la oxidación de las grasas, que provoca sabores y olores desagradables; el cambio de color pardo se debe a los compuestos, la cuales reaccionan con el oxígeno, este cambio de color puede aumentar al tener alguna contaminación fúngica.

Las enzimas: polifenoloxidasas (PPO) y la peroxidasa (PDO) catalizan la oxidación de fenoles propios de las células a quinonas, las cuales son altamente reactivas con proteínas, ácidos nucleicos, flavonoides y otras quinonas; estas reacciones, además de generar colores pardos, reducen las propiedades sensoriales de textura, color y sabor, disminuyen la calidad nutricional del alimento y desembocan finalmente en la muerte del fruto (*Castillo, 2012*).

Cambios en la textura del fruto: las células de los frutos son cada vez más permeables durante la maduración, porque la integridad de los compuestos de las paredes celulares se pierden. Por acción del etileno se activan una serie de enzimas hidrolíticas (poligalacturonasa y celulasa), que rompen los enlaces entre los polisacáridos de la pared.

La infiltración de Ca^{2+} tiene un efecto retardante en la maduración y envejecimiento del fruto, ya que este elemento tiene una función restauradora de la integridad de la membrana y restablece sus propiedades de permeabilidad selectiva.

En el aguacate se ha observado ablandamiento asociado al patrón climatérico, ya que al aplicar tratamientos que supriman este comportamiento resulta en un retardo de la maduración. Los cambios de los compuestos pécticos son los responsables del ablandamiento en el mesocarpo. Estos cambios van acompañados de un rápido decrecimiento en la protopectina y un incremento en la pectina soluble en agua (*Aguilar et al., 2008*).

✓ **Cambios metabólicos**

Hay una relación entre la tasa respiratoria y la duración en la conservación de un producto vegetal. Los tejidos que tienen una tasa respiratoria más baja es posible conservarlos por periodos más largos de tiempo. La tasa respiratoria puede disminuirse por efecto de bajas temperaturas, la

concentración de dióxido de carbono (CO₂), oxígeno (O₂) y etileno (C₂H₄) que son los factores principales que pueden modificar la oxidación biológica y que amplían la conservación.

En la maduración existe una difusividad de los gases en los frutos. Una vez que se alcanzan los umbrales de etileno requeridos se inicia el proceso de maduración, con la elevación de la tasa respiratoria y la producción de CO₂

✓ **Climaterio**

Periodo en el desarrollo de ciertos frutos durante el cual tiene lugar una serie de cambios bioquímicos iniciados por la producción auto catalítica de etileno (hormona natural de la maduración), que señala el cambio de crecimiento a envejecimiento, implica un aumento en la respiración y conduce de forma irreversible a la maduración del fruto. Todos los frutos liberan etileno, lo que marca la diferencia entre frutos climatéricos y no climatéricos es la forma de liberarlo. Al aguacate se le clasifica como un fruto climatérico debido su respiración, ya que aumenta conforme este madura (López, 2008; Hernández et al., 2011)

1.1.4 Composición química y valor nutritivo

En el cuadro 2 se observa que el componente prioritario del aguacate es el agua, seguido del porcentaje de aceite, hidratos de carbono, proteínas y fibra. El porcentaje de proteínas y aceite presentes en el aguacate, son de gran valor nutrimental, ya que las proteínas tienen presentes siete de los aminoácidos esenciales, de igual manera en la concentración de aceite se encuentran presentes los ácidos grasos esenciales, además de la vitamina E, importante antioxidante, para el aceite e inhibidora de radicales libres. Estos compuestos deben de ser incluidos en la dieta en forma regular ya que no pueden ser sintetizados por el organismo.

El aguacate fresco contiene los niveles más altos de β-sitosterol, lo cual clínicamente ha demostrado reducción en el nivel sanguíneo de colesterol de baja densidad al bloquear su absorción en el intestino.

El Aguacate aporta prácticamente todas las vitaminas requeridas por el organismo; a excepción de la vitamina B12, presente solo en el reino animal; destacándose dentro de las hidrosolubles el importante porcentaje de ácido ascórbico, que potencializa el poder antioxidante de los tocoferoles presentes en la vitamina E.

Este fruto es un alimento que puede ser consumido en fresco, garantizando la ingesta total de sus nutrientes; evitando la pérdida de vitaminas y la desnaturalización de las proteínas, que

habitualmente sufren la mayoría de los alimentos durante su procesamiento y cocción, las características mencionadas hacen del aguacate un fruto altamente cotizado para ser incluido en el consumo normal de la dieta, ya sea como ensaladas, sopas, guisados, postres e incluso, bebidas. (CONACYT, 2008; Tamayo, 2006).

Cuadro 2. Composición química del aguacate

COMPOSICIÓN QUÍMICA Y VALOR CALÓRICO EN 100 G.DE PULPA DE AGUACATE						
Fuente	Calorías(g).	CHO(g).	Proteínas(g).	Aceite(g).	Agua(g).	Fibra (g).
I.N.N. 81	72	2.9	1.2	6.1	86	0.7
I.N.C.A.P.	154	4.4	1.7	15.8	77	1.8
Handook8	167	6.3	2.1	16.4	74	1.6
A.B. 8	159	7.6	1.7	15.3	74	1.4
FRANCO 5	162	6.4	1.8	16.0	NR	1.4
P.N (6)	177	6.9	2.0	17.3	73	2.1
SOUICI (7)	226	7.4	1.6	21.2	65	2.0
V.promedio	160	5.9	1.7	15.4	75	1.6

FAO, 2013.

En este fruto se encuentran presentes ocho de los aminoácidos esenciales (cuadro 3), de igual manera se encuentran ácidos grasos esenciales (cuadro 4) los cuales no pueden ser sintetizados por el organismo y deben de ser incluidos en la dieta en forma regular.

Cuadro3. Aminoácidos presentes en el aguacate

Aminoácidos en mg/100 g. de pulpa		
Esenciales	Isoleucina	47
	Leucina	46
	Licina	59
	Metionina	29
	Fenil alanina	48
	Treonina	40
	Valina	63
	Tirosina	32
No esenciales	Arginina	47
	Istidina	25

Ortega, 2006

Cuadro 4. Porcentaje de ácidos grasos en el aguacate

Composición media de ácidos grasos	
Ácidos grasos saturados	16-22%
Ácidos grasos monoinsaturados	66-72 %
Ácidos grasos poliinsaturados	8-11%

Ortega, 2006

El aguacate contiene prácticamente todas las vitaminas, tanto liposolubles como hidrosolubles, cubriendo un buen porcentaje de la cantidad diaria recomendada (Cuadro 5).

En el cuadro 6 se muestra el contenido de minerales presentes en 100 g. de pulpa de aguacate, los cuales deben de ser aportados por los alimentos, las cantidades necesarias son generalmente del orden de unos cuantos microgramos, pero sin embargo juegan un importante rol en el metabolismo.

Cuadro 5. Vitaminas hidrosolubles y liposolubles del aguacate

Valor vitamínico y aporte nutricional de aguacate			
VITAMINAS	CONTENIDO EN 100 g. DE AGUACATE (mg).	RDA(*) mg.	% DE LA RDA. CUBIERTAS POR 100g, DE AGUACATE
VITAMINA A	85.00	900	9.4
VITAMINA D	10.00	5.0	200.0
VITAMINA E	3.00	9.0	33.0
VITAMINA K	8.00	110.0	7.3
VITAMINA B 1	0.11	1.4	7.8
VITAMINA B2	0.20	1.6	12.5
VITAMINA B6	0.45	2.1	21.4
NIACINA	1.60	16.0	10.0
AC. PANTOTÉNICO	1.0	5.5	18.2
BIOTINA	10.0	100.0	10.0
Ac. FÓLICO	32.0	200.0	16.0
VITAMINA C	14.0	60.0	23.3

Ortega, 2006

Cuadro 6. *Minerales presentes en el aguacate*

MINERALES EN PULPA DE AGUACATE			
MINERALES	CONTENIDO EN 100 g. DE AGUACATE (mg)	NECESIDADES DIARIAS (mg)	%DE NECESIDADES CUBIERTAS POR 100 g. DE AGUACATE
CALCIO	10.0	800.0	1.25
HIERRO	1.06	15.0	7.06
FÓSFORO	40.0	800.0	5.0
COBRE	0.35	1.7	20.58
MAGNESIO	41.0	300.0	13.66
MANGANESO	2.30	3.5	65.71
SODIO	4.0	3450.0	0.12
POTASIO	463.0	4900.0	0.12

Ortega, 2006

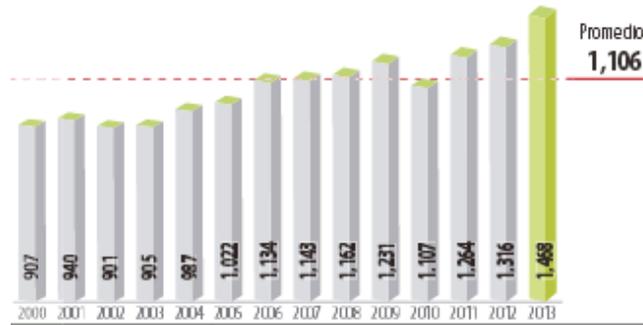
1.1.5 Aspecto socioeconómico

1.1.5.1 Producción en México

En México, existen 21,511 productores (10,000 se encuentran en Michoacán), 279 empacadoras y comerciantes nacionales, 17 empacadoras / exportadores, 14 instalaciones de procesamiento de guacamole, pulpa, mitades, productos congelados, bebidas refrescantes y aceite no refinado. (Dorantes, 2004).

El destino de la producción de aguacate fresco de Michoacán en el mercado nacional, son las ciudades del Distrito Federal, Monterrey y Guadalajara. La Central de Abastos del DF, Monterrey y Guadalajara controla el 88% del mercado mayorista del Aguacate Michoacano.

Cada año se incorporan más hectáreas para el cultivo de aguacate, lo cual ha detonado un incremento del volumen de la cosecha como se muestra en la figura 2 el volumen de producción de aguacate ha incrementado notablemente del año 2000 al 2013, lo cual favorece a la economía del país.



Dorantes, 2004.

Figura 2. Producción de aguacate (miles de toneladas) en el periodo 2000-2013.

En México, 15 entidades federativas cultivan aguacate (figura 3), siendo el Estado de Michoacán el principal productor al obtenerse de esa entidad 8 de cada 10 toneladas del fruto que se cosecha en todo el país con 950 mil toneladas en el año 2013, de un total nacional de 1,107 millones, lo que representa de la producción 85.9% del total. Otras entidades federativas que también participan en la producción de aguacate son: Jalisco (4.9%), Estado de México (3.9%), Morelos (1.3%), Nayarit (1%), Guerrero (0.6%), Puebla (0.5%), Chiapas (0.4%), Oaxaca y Veracruz (0.3%), Yucatán, Colima, Hidalgo y Durango (0.2 %) y Nuevo León (0.1%) (SAGARPA, 2014).



SAGARPA, 2014

Figura 3. Porcentaje del valor de la producción por entidad federativa en el año 2013.

El aguacate se encuentra disponible en todos los meses, sin embargo, entre marzo y julio se obtiene 49.1% de la producción nacional anual (Cuadro 7).

Cuadro 7. Porcentaje anual de producción nacional de aguacate

Mes	Porcentaje de producción	Mes	Porcentaje de producción
Enero	4.8	Julio	11.5
Febrero	7.9	Agosto	5.8
Marzo	6.0	Septiembre	6.7
Abril	9.3	Octubre	10.8
Mayo	9.2	Noviembre	7.4
Junio	13.1	diciembre	7.5

SAGARPA, 2014

1.1.5.2 Distribución

El sistema de comercialización del aguacate está compuesto por un flujo del producto en el cual se involucran una serie de empresas e instituciones mediante la prestación de servicios de transporte, almacenamiento, empaque, distribución y publicidad, entre otras.

La comercialización del aguacate producido en el Estado de Michoacán, concurre al mercado por medio de los siguientes canales: intermediario local, intermediario de otras ciudades, empacadora local, comisionistas y en forma directa a centros de abasto. La mayor parte de la producción de Michoacán es consumida en el mercado nacional, y el restante se exporta como fruta fresca, pulpa congelada o aceite refinado.

Para que se lleve a cabo la distribución es necesario seguir una serie de procedimientos previos con el propósito de que el aguacate vaya desde la huerta hasta la mesa del consumidor final.

Recolección: se realiza unos días antes que maduren los frutos. El aguacate alcanza su madurez una vez que ya han sido recolectados para su venta.

Selección. Se recibe la fruta y descarga de los camiones, se procede al recorte de pedúnculos y a seleccionar el aguacate; se presenta en cajas de diferentes colores para identificar su destino final:

mercado interno, la exportación y la fruta orgánica; aplicando los criterios de calidad e inocuidad especificados para cada caso. La selección se lleva a cabo manualmente o con la ayuda de máquinas.

Empacado: Inicia con el proceso de pre-enfriamiento del fruto, esto significa que después de la cosecha, se deja en pallets (plataforma de madera de dos pisos entre los que pueden introducirse los brazos de un montacargas) por 24 horas, para disminuir la temperatura del producto. Después, se lava el fruto con agua y una solución fungicida, Seguido por el secado del fruto y una ligera cepillada, con lo que adquiere una apariencia brillante.

Se empaacan en cajas de 4 o 6 kilos dependiendo al país destino, se estiban de 200 a 255 cajas en tarimas de madera o fibra de vidrio, que soportan 1,200 kg.

Almacenamiento: Las cajas pasan inmediatamente en cámaras frigoríficas donde primero se someten a un proceso de pre-enfriamiento, luego, van a entrar en la cámara de preservación para mantener los aguacates a 3-7 °C y en una atmosfera controlada para que puedan conservar su calidad y estado, donde permanecerá hasta que se cargue en la unidad de transporte. En estas condiciones, la vida del producto en el almacén puede ser hasta de 2 semanas.

Transporte: El transporte de la fruta de las empacadoras se realiza mediante camiones con una capacidad de 10 toneladas.

La fruta de exportación viaja 2 días de Uruapan a Altamira en el estado de Tamaulipas (Golfo de México) en camiones con contenedores refrigerados y desde allí 15 días más a Europa en un buque de carga.

La temperatura de almacenamiento debe mantenerse con una variación máxima de 1 ° C. Esto es particularmente importante cuando los frutos van a ser almacenados a lo largo de un período relativamente largo antes de ser comercializados.

El daño por frío aparece entre la tercera y cuarta semana del periodo de refrigeración. Esto debe ser considerado para la larga distancia en transportes marítimos. Al llegar al puerto de destino, los aguacates deberá ser enviados de inmediato a los canales de distribución al por menor, con el objetivo de acortar el tiempo de refrigeración.

Las características y cualidades del producto son acorde al canal de comercialización al que llega el consumidor final para demandar el fruto, es decir, se toma en consideración si el destino son los canales tradicionales como mercados, fruterías, centrales de basto o canales modernos como supermercados, tiendas de conveniencia (SAGARPA, 2011; Sandoval et al. 2010; NMX-AA-150-SCFI, 2009; Velásquez, 2006; Dorantes, 2004; Salazar et al., 2004; NMX-FITO-66-2002).

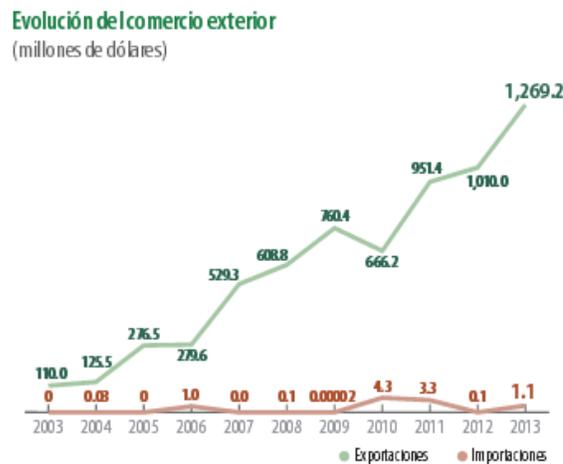
1.1.5.3 Exportación e importación

México es el primer productor mundial de aguacate exportando 1,316,104 toneladas, aporta 3 de cada 10 toneladas de aguacate que se producen en el mundo; respecto a Indonesia, el volumen nacional es 4.4 veces mayor. La participación de la producción de México en el mundo es del 30.9%, el país mantiene un saldo favorable en la balanza comercial de aguacate, cercano a 1,270 millones de dólares anuales.

El aguacate tiene un gran mercado como fruta fresca, además de su uso en el aceite, cosmético, jabón, champú y en la industria; así como alimentos procesados derivados de ella, tales como guacamole, productos congelados y pasta de aguacate (Salazar et al., 2004).

Sólo 3.4% de aguacates producidos en México se exportan como un producto procesado. Los principales destinos de los productos derivados del aguacate son: EE.UU., Alemania, Francia, España, Nueva Zelanda (Dorantes, 2004). En el periodo del 2014-2015 se registró un crecimiento de 39 por ciento en las exportaciones de este fruto a Estados Unidos, además se han exportado 22 mil 428 toneladas de aguacate a Japón; Canadá, 17 mil 331; Centroamérica, 12 mil 671; Europa, seis mil 676, y países de Asia, tres mil 490, es decir, un total de 62 mil 596 toneladas (SAGARPA, 2015).

En la figura 4 se observa la evolución de las exportaciones e importaciones de aguacate Hass en México durante el periodo 2003 al 2013, se observa que el incremento de las exportaciones es mucho mayor comparado con las importaciones de aguacate Hass, lo cual favorece ampliamente a la economía del país.



SAGARPA, 2015

Figura 4. Comercio exterior de aguacate

Recientemente ha crecido la demanda del fruto mexicano por parte de Japón, que ocupa el 2º lugar en volumen de compras después de Estados Unidos (80%).

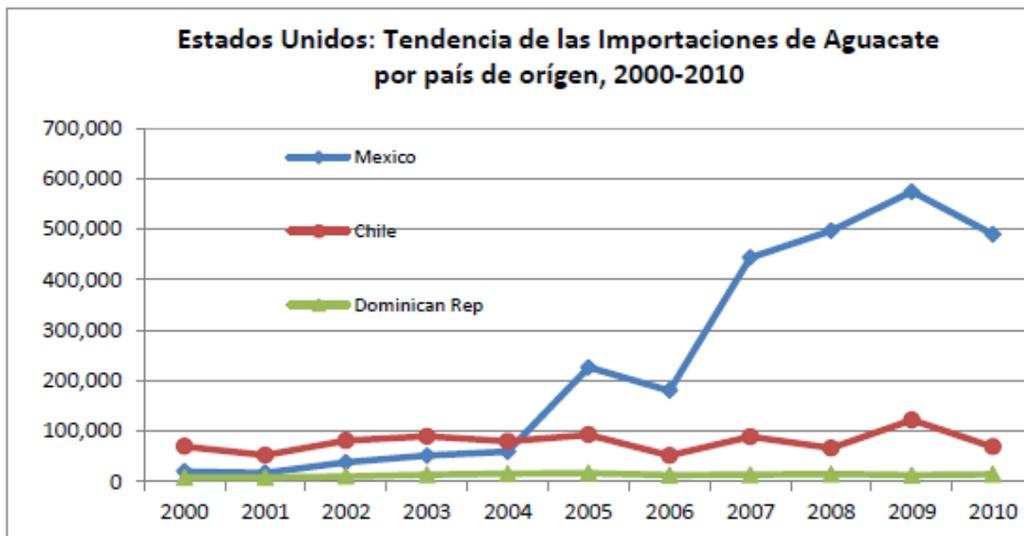
Como se observa en la figura 5, México exporta principalmente a países como Canadá, Estados Unidos y Japón.



SAGARPA, 2015

Figura 5. Principales países importadores de aguacate

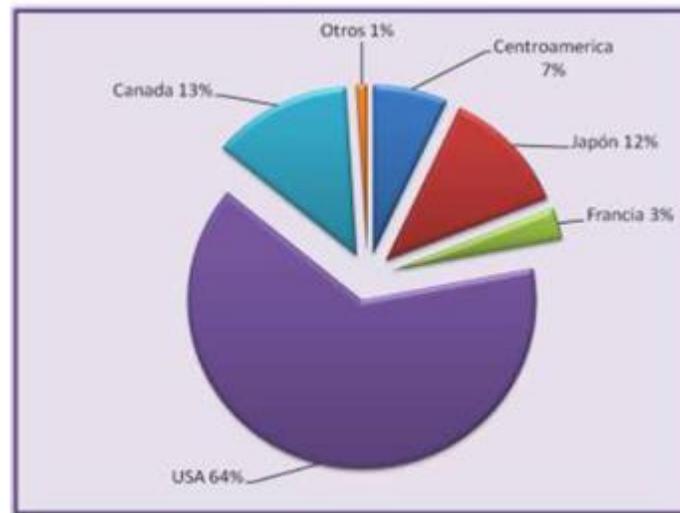
Estados Unidos, por su parte, que es el principal mercado de exportación de México, también importa aguacate de República Dominicana y Chile en menor volumen, México es su principal proveedor pues cubre el 50% de sus importaciones, con tendencia creciente a la alza (figura 6).



SAGARPA, 2014

Figura 6. Importaciones de aguacate en Estados Unidos

Por su parte, en el mercado internacional, el total de las importaciones se muestra en la figura 7:



SAGARPA, 2014

Figura 7. Principales destinos de las exportaciones mexicanas.

1.1.6 Normatividad

La Norma Mexicana (NMX) que aplica para el producto de aguacate en este proyecto es la norma **NMX-FF-016-2002**, la cual establece las especificaciones de calidad que debe cumplir el aguacate en su variedad *Hass*.

a) Requisitos mínimos generales: los frutos deben haber alcanzado al menos 21.5% de materia seca en la pulpa, ser cortados con gancho, pedúnculo cortado al ras y evitar contacto con el suelo; que se transporten del huerto a la empacadora en cajas limpias y en camiones cubiertos con lona.

b) Calidad del fruto (Suprema, Calidad I y Calidad II), de acuerdo a la tolerancia en la presencia de daños visibles en la epidermis causados por roña, viruela o clavo, trips, granizo, rozaduras, quemadura de sol, heladas y daño mecánico o causado por larvas.

c) Calibre del fruto: Súper extra (> 266 g), extra (211-265 g), primera (171-210g), mediano (136-170) comercial (85-135 g) y canica (< 85 g).

d) Etiquetado y envase.

1.2 Recubrimientos, importancia, usos y aplicaciones

Las películas y recubrimientos son capas delgadas de materiales comestibles aplicados en los productos alimenticios que juegan un papel importante en su conservación, distribución y comercialización, están dirigidos a mejorar la calidad de los productos alimenticios, lo que resulta en mejorar la seguridad y alargar la vida de anaquel; se producen a partir de biopolímeros que pueden ser proteínas, polisacáridos (carbohidratos y gomas), lípidos, o una mezcla multi componente, pudiendo o no incorporar aditivos de calidad alimenticia (*Falguera et al., 2011*).

Los términos películas y recubrimientos se utilizan indistintamente pero su diferencia radica en la forma en la que se elaboran y aplican al alimento; un recubrimiento es una capa delgada de materiales comestibles que se aplica generalmente en forma líquida directamente al alimento mediante aspersion o inmersión; mientras que una película comestible es una capa delgada preformada como láminas sólidas de materiales comestibles, que una vez formada se puede colocar como envoltura en o entre los componentes de los alimentos (*Jung, 2014*).

- **Importancia**

Muchas de las funciones de los recubrimientos comestibles son similares a las de los empaques sintéticos; sin embargo, los materiales de recubrimientos comestibles deben ser elegidos de acuerdo con el tipo de alimento que será recubierto y los principales mecanismos de deterioro de la calidad del mismo.

El uso de recubrimientos comestibles como envase primario puede sustituir potencialmente a los materiales de envasado convencionales, parcial o totalmente y de esa manera se puede reducir la utilización de materiales sintéticos, maximizando así la actividad de biodegradación.

- **Usos**

Actualmente, los recubrimientos comestibles se utilizan en varios productos alimenticios, principalmente frutas, verduras, dulces y algunos frutos secos.

Recubrimientos a base de colágeno se utilizan para embutidos, recubrimientos de cera en las frutas y verduras, en caramelos y revestimientos de azúcar en los frutos secos son las aplicaciones comerciales más comunes de recubrimientos comestibles.

El uso de éteres de celulosa (tales como carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y metilcelulosa) como ingredientes en recubrimientos para frutas, verduras, carnes, pescados, frutos secos,

productos de confitería y productos de panadería, granos y otros productos agrícolas está aumentando.

La industria farmacéutica utiliza revestimientos de azúcar en píldoras y películas de gelatina para cápsulas blandas.

Los recubrimientos pueden ser utilizados en situaciones no alimentarias, tales como, aplicaciones agrícolas, farmacéuticas, fabricación de papel, modificación de plástico, así como en la industria de la pintura.

En usos agrícolas, que pueden ser utilizados para acolchado, envoltura y recubrimientos de semillas.

- **Aplicaciones**

Los recubrimientos comestibles pueden aumentar la eficacia de algunas operaciones unitarias en el procesamiento de alimentos.

A continuación se muestran algunos ejemplos:

- ✓ Los recubrimientos comestibles sobre rodajas de patata puede reducir la absorción de aceite durante la fritura.
- ✓ Recubrimientos comestibles sobre frutas y verduras pueden retardar la oxidación de productos secos durante la deshidratación y mejorar la extensión de la vida útil impartida por irradiación.
- ✓ Recubrimientos comestibles también pueden reducir la pérdida de color, sabor, o nutrientes en los alimentos durante el procesamiento y distribución.
- ✓ Recubrimientos comestibles pueden mejorar la eficacia en el proceso de fabricación de palomitas de maíz y actuar como agentes de adhesión entre sus ingredientes heterogéneos.
- ✓ La aplicación de recubrimientos comestibles antes de la deshidratación osmótica puede prevenir la migración de ingredientes valiosos en los fluidos deshidratantes durante el proceso.
- ✓ Recubrimientos comestibles aplicados a productos alimenticios pueden ser beneficiosos en procesos de liofilización, ya que el revestimiento permeable a la humedad puede impedir la evaporación de sabores volátiles (*Appendini et al., 2002*).

1.2.2 Características

Los recubrimientos se utilizan especialmente en alimentos altamente perecederos frescos y mínimamente procesados (frutos, hortalizas y cárnicos) ya que crean una atmósfera modificada

que puede influir en la calidad del producto, como cambios color y firmeza, cambios en propiedades antioxidantes, control microbiano, producción de etileno y compuestos volátiles como resultado de los procesos anaeróbicos.

También tienen la capacidad de retardar la migración de humedad, controlar el transporte de gases (O₂, CO₂ y etileno), retener componentes volátiles, servir de vehículo de aditivos (antioxidantes, antimicrobianos, emulsificantes), mejorar las propiedades ópticas (brillo y la opacidad) y mecánicas (flexibilidad, tensión), además de impartir una mayor integridad a la estructura del producto protegiéndolo contra daños mecánicos, físicos, químicos, actividad microbiana y oxidación de los nutrientes, manteniendo íntegramente las propiedades organolépticas de los alimentos; todos estos atributos así como los mecanismos de deterioro que se desarrollan de acuerdo a las características específicas de cada alimento o productos se utilizan como parámetros para la elección del recubrimiento (*Jung, 2014; Falguera et al., 2011; Marzo, 2010*).

Estas características se ven influenciadas por parámetros tales como el tipo de material aplicado como matriz estructural (composición, distribución de peso molecular) las condiciones bajo las cuales se forman previamente las películas (tipo de disolvente, pH, concentración y temperatura de los componentes) el tipo y concentración de aditivos (*Muhammad et al., 2014; Falguera et al., 2011; Olivas et al., 2008*).

1.2.3 Propiedades de los recubrimientos

1.2.3.1 Propiedades de Barrera

El interés en los recubrimientos comestibles aplicados como revestimiento o en embalaje se ha renovado en los últimos años debido a su gran potencial para preservar la calidad, mejorar su apariencia y extender la vida útil en el alimento.

Actúan como barreras a la transferencia de masa creando una atmósfera interna en el producto que proporciona protección frente a los procesos de deterioro lo cual se le atribuye a la reducción de la humedad, intercambio de gases, disminución en la tasa de respiración y de reacción oxidativa, así como suprimir desórdenes fisiológicos en las frutas recién cortadas.

La eficacia del recubrimiento para limitar la respiración y deshidratación de los productos procesados depende de las propiedades de la película como barrera a los gases y vapor de agua (*Kowalczyk & Bark, 2011; Villalobos et al., 2009; Bosques et al., 2003*).

1.2.3.1.1 Barrera al vapor de agua

La actividad de agua es un factor crítico que afecta las características sensoriales y la vida de anaquel de los productos alimenticios. Durante el almacenamiento de los alimentos, muchas reacciones químicas de deterioro y enzimáticas, así como crecimiento microbiano, ocurren debido a cambios asociados con la actividad de agua de los alimentos.

La naturaleza del recubrimiento empleado desempeña un papel muy importante, ya que la permeabilidad del agua es afectada por numerosos factores tales como el espesor, a_w , la humedad y las proporciones relativas de los componentes utilizados en su formulación; a mayor naturaleza hidrófila de los materiales empleados en la elaboración del recubrimiento, mayor será la permeabilidad al vapor de agua.

La barrera pobre al vapor de agua puede proporcionar algún beneficio, ya que permite el movimiento de vapor de agua través del recubrimiento, evitando así la condensación de agua, lo cual es una fuente potencial de deterioro microbiano, sin embargo en cuestiones de calidad una excesiva pérdida de agua desencadena en cambio de textura en el alimento, lo cual deteriora las propiedades sensoriales en el alimento, como pérdida de peso y firmeza (*Rasgado, 2014; Gutiérrez et al., 2015*).

1.2.3.1.2 Barrera a los gases

Películas y recubrimientos hidrófilos, tales como los de naturaleza proteica y polisacáridos, generalmente proporcionan una buena barrera al oxígeno y la transmisión de dióxido de carbono, pero son una pobre barrera al vapor de agua.

En cierto sentido el oxígeno y dióxido de carbono se necesitan para la respiración de los tejidos vivos como las frutas y verduras frescas recién cortadas, así las barreras moderadas que permiten controlar el intercambio respiratorio son más apropiadas.

En algunas aplicaciones, altas barreras a la migración de gases son indeseables, como en paquetes para las frutas frescas y verduras cuya vida útil depende del acceso a un continuo suministro de oxígeno para la respiración celular sostenida (*Rojas et al., 2007; Saeedeh et al., 2014*).

1.2.4 Factores que afectan la calidad del recubrimiento

La permeabilidad de los recubrimientos puede verse afectada por la naturaleza de la matriz polimérica y de los componentes agregados, por la morfología de la matriz, el grosor y la homogeneidad.

La estructura de la matriz de la película también se ve afectada por el disolvente de la solución formadora de película y la velocidad de secado.

Además, el contenido de humedad de la película y la humedad relativa también puede influir fuertemente en las propiedades de transporte ya que afecta la transición vítrea del polímero en la cual se manifiesta un fuerte cambio de las propiedades físicas y mecánicas del recubrimiento.

Si hay una adecuada homogeneización del sistema es posible garantizar la uniformidad en el tamaño y la distribución de partículas de fase dispersa, mejorando la funcionalidad de barrera contra la transferencia de masa del recubrimiento formado (*Villalobos et al., 2009*)

1.2.5 Composición de recubrimientos

Los principales materiales formadores de los recubrimientos son biopolímeros, tales como proteínas, polisacáridos, lípidos, y resinas, se pueden utilizar solos o en combinación. Las características físicas y químicas de los biopolímeros en gran medida influyen en las propiedades de los recubrimientos resultantes.

1.2.5.1 Hidrocoloides

Los polisacáridos y proteínas son buenos materiales para la formación de recubrimientos comestibles, ya que muestran excelentes propiedades mecánicas, estructurales y ópticas adecuadas pero son muy sensibles a la humedad y tienen una pobre capacidad de barrera contra la transferencia de agua, por tal motivo un número de compuestos hidrófobos, tales como lípidos especialmente aquellos con puntos de fusión altos, tales como cera de abejas y cera de carnauba, son frecuentemente incorporados en las películas a base de hidrocoloides con el fin de mejorar las propiedades barrera contra la humedad (*Saeedeh et al., 2014; Falguera et al., 2011; Hassan & Norziah, 2011*).

1.2.5.1.1 Proteínas

Son macromoléculas con secuencias de aminoácidos específicas, se derivan de muchas fuentes tales como animales y vegetales, incluyendo los tejidos animales, leche, huevos, cereales y semillas oleaginosas.

Las características más distintivas de las proteínas en comparación con otros materiales formadores de recubrimientos son su conformación, desnaturalización, cargas electrostáticas y la naturaleza anfifílica.

Las estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias de las proteínas se pueden modificar fácilmente para conseguir propiedades deseables en la formación del recubrimiento por el uso de desnaturalización por tratamientos físicos (calor, presión, irradiación, tratamiento mecánicos), tratamientos químicos (ácidos, álcalis, iones metálicos, sales, hidrólisis química) y biológicos (tratamiento enzimático). Estos tratamientos pueden finalmente controlar las propiedades físicas y mecánicas de los recubrimientos (*Jung, 2014*).

Los recubrimientos elaborados con hidrocoloides como proteínas presentan buenas propiedades mecánicas, son transparentes y presentan excelentes propiedades de barrera de los gases, sin embargo la resistencia que presentan al vapor de agua es pobre debido a su naturaleza hidrofílica (*Jaramillo, 2014*).

1.2.5.1.2 Polisacáridos

Revestimientos a base de polisacáridos se han utilizado para extender la vida útil de frutas y verduras mediante la reducción de la respiración y el intercambio de gas debido a permeabilidades selectivas a O₂ y CO₂.

En general, los carbohidratos producen películas con buenas propiedades mecánicas y son barreras eficientes contra compuestos de baja polaridad. Los grandes números de grupos hidroxilo aportan a la molécula un carácter hidrofílico, característica que le confiere al recubrimiento una baja resistencia a la pérdida de agua.

Su selectividad en cuanto a la permeabilidad al oxígeno y al dióxido de carbono, condiciona la creación de atmósferas modificadas en el interior del alimento, lo que se traduce en un aumento de la vida útil del producto (*Aguilar, 2005*).

1.2.5.2 Lípidos

Los lípidos y resinas también se utilizan como materiales formadores de los recubrimientos, pero no son polímeros, sin embargo son biomateriales comestibles y biodegradables.

La mayoría de los lípidos y resinas comestibles son sólidos blandos a temperatura ambiente y pueden ser moldeados después del tratamiento térmico, causando una fase de transición reversible, entre estado líquido (fluido), sólido suave y sólido cristalino.

Debido a su naturaleza hidrofóbica, las películas o recubrimientos formados por lípidos tienen una excelente barrera contra el agua, pero también son menos permeables a los gases y por lo tanto puede estimular la acumulación de CO₂ y etanol, causando el desarrollo de sabores desagradables (*Hadar et al., 2015; Hassan & Norziah, 2012*).

Con el fin de mejorar las propiedades que los lípidos confieren a las películas pueden ser usados en asociación con materiales hidrófilos tales como proteínas y polisacáridos, mediante la formación de una emulsión o la elaboración de recubrimientos de múltiples capas; (*Hadar et al., 2015; Quintero et al., 2010*).

1.2.5.3 Mezcla de componentes

En vista de que las películas de un solo componente presentan desventajas, ya sea en propiedades mecánicas o de barrera a gases, se ha intentado mejorar las propiedades funcionales de esos recubrimientos mediante el uso de mezclas entre dos o más compuestos.

Compuestos biopoliméricos pueden modificar las propiedades del recubrimiento y crear estructuras deseables con propiedades únicas que combinan los mejores atributos de cada componente para aplicaciones específicas, tales como recubrimientos de proteínas (o capas de película) sobre películas de polisacáridos, o capas de lípidos sobre la capa de proteína y películas de polisacáridos. Esta estructura de múltiples capas optimiza las características del producto final.

Por ejemplo, los lípidos aplicados en la formulación del recubrimiento pueden servir como una buena barrera al vapor de agua, mientras que los polisacáridos y proteínas pueden ser razonablemente eficaces como barrera de gases (O₂ y CO₂), por esa razón actualmente se combinan diferentes biopolímeros para el envasado de alimentos y revestimientos (*Hassan & Norziah, 2012*).

En cuadro 8 se muestra de forma sintetizada las características de diferentes matrices poliméricas empleadas para la formación de recubrimientos.

Cuadro 8. Características de matrices poliméricas formadoras de recubrimientos

Componente	Ventajas	Desventajas
Polisacáridos	<ul style="list-style-type: none"> -Recubrimientos con buenas propiedades mecánicas. -Barreras eficientes contra compuestos de baja polaridad. -Buena barrera contra aceites y grasas. -Presenta buena adhesividad y cohesividad. 	<ul style="list-style-type: none"> -Su naturaleza hidrofílica hace que presente una baja resistencia a la pérdida de agua
Proteínas	<ul style="list-style-type: none"> -Buenas barreras al oxígeno, dióxido de carbono. -Se adhieren a superficies hidrofílicas -Presentan buenas propiedades mecánicas 	<ul style="list-style-type: none"> -Pobres como barrera de agua
Lípidos	<ul style="list-style-type: none"> -Buenas barreras contra la humedad -Reducen la deshidratación y transpiración. 	<ul style="list-style-type: none"> -Propiedades mecánicas pobres -Inflexibles, frágiles, inestables
Plastificantes	<ul style="list-style-type: none"> -Incrementa la humectabilidad, flexibilidad y resistencia 	<ul style="list-style-type: none"> -Modifica las propiedades barrera frente a los gases

Hassan & Norziah, 2012.

1.2.5.4 Aditivos

1.2.5.4.1 Plastificantes

Los biopolímeros suelen formar películas frágiles y rígidas debido a extensas fuerzas intermoleculares (fuerzas que actúan entre grupos funcionales dentro de macromoléculas) que involucran interacciones entre las cadenas de polímero a través enlaces de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, enlaces hidrofóbicos; los plastificantes son compuestos de bajo peso molecular que

tienen la capacidad de minimizar estas interacciones al incorporarse dentro de una matriz polimérica posicionándose entre las interacciones de polímeros para incrementar el volumen libre o separación intermolecular reduciendo la rigidez de la estructura; mejora las propiedades mecánicas, aumenta la permeabilidad de vapor de agua y gases (*Hadar et al., 2015; Nur et al., 2013; Amir et al., 2013; Olivas, 2008*).

La capacidad de un plastificante para formar esta clase de enlaces depende del tipo (basado en la compatibilidad del plastificante con el polímero) y grado de concentración del plastificante, así como de la estructura química y la interacción con los polímeros (*Muhammad et al., 2014*).

La incorporación de estos compuestos conlleva a disminuir las fuerzas intermoleculares a lo largo de las cadenas poliméricas, lo cual mejora la movilidad molecular de los componentes. Se cree que los grupos polares (-OH), a lo largo de las cadenas del plastificante, desarrollan puentes de hidrógeno entre el polímero y el plastificante, reemplazando así las interacciones polímero-polímero. La capacidad de un plastificante para formar ese tipo de enlaces depende de su configuración molecular, no de los grupos hidroxilo libres ni de la configuración del biopolímero, es decir depende de la compatibilidad del plastificante con el polímero.

El tamaño molecular, la configuración y el número total de los grupos hidroxilo funcionales del plastificante pueden afectar las interacciones entre el plastificante y el polímero.

El plastificante hace que las cadenas se separen reduciendo la rigidez de las estructuras, aumentando así la flexibilidad de la película (*Olivas, 2008*).

Los plastificantes producen cambios en las propiedades físico mecánicas de los polímeros, como la reducción en la temperatura de transición vítrea, disminución de resistencia a la tracción y un incremento en la elongación y flexibilidad de la película, también modifica la capacidad del sistema para atraer agua y se han observado incrementos en las permeabilidades al vapor de agua, O₂ y CO₂ de películas a base de polisacáridos y proteínas, a medida que la concentración de plastificante aumenta (*Rojas et al., 2007^b*).

Los plastificantes se pueden categorizar como plastificantes primarios, los cuales son solubles en agua y capaces de gelificar el polímero rápidamente bajo un procesamiento en rango de temperatura normal; mientras tanto los plastificantes secundarios tienen capacidades de gelificación inferiores y son normalmente mezclados con plastificantes primarios para mejorar las

propiedades de los productos resultantes, son insolubles en agua por lo cual tienen que ser emulsionados en la fase acuosa de la dispersión de polímeros (Rojas *et al.*, 2007^a).

Además del agua, los plastificantes comúnmente utilizados en películas biodegradables y comestibles son:

- 1.-Monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos (glucosa, jarabes de fructosa o glucosa, miel).
- 2.-Polioles (sorbitol, glicerol, etilenglicol (EG) polietilenglicoles y los derivados del glicerol).
- 3.-Lípidos y derivados (lecitina, cera, ácidos grasos, monoacilgliceroles, derivados éster, fosfolípidos y surfactantes).

El glicerol tiene una alta tolerancia a la temperatura, es soluble en agua, polar y no volátil se ha identificado y utilizado como plastificante favorable y también ha sido aprobado por la FDA (Food and Drug Administración) como aditivo alimentario (Nur *et al.*, 2013).

1.2.5.4.2 Compuestos Antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos son compuestos sintéticos o naturales que se encuentran presentes o se adicionan intencionalmente a los alimentos, pueden usarse comercialmente como aditivos para retardar el crecimiento microbiano o inactivar a los microorganismos, de esa forma detienen el deterioro de la calidad y mantienen la seguridad del alimento (Mani *et al.*, 2012 ; Saucedo *et al.*, 2009).

Algunos ejemplos de compuestos antimicrobianos son los siguientes:

- **Compuestos a base de metal**

Algunos metales pesados tienen poder antimicrobiano en la forma de sales, óxidos y coloides. Estos metales se pueden incorporar en polímeros en forma de recubrimientos con el fin de mejorar las propiedades mecánicas, de barrera y para prolongar la vida útil de los alimentos. Los compuestos metálicos más utilizados son de plata, oro, óxido de zinc, sílice, dióxido de titanio, alúmina y óxidos de hierro. Micro y nano compuestos metálicos representan una nueva generación de ingredientes de envases antimicrobianos para proporcionar nuevas alternativas de envasado de alimentos accesibles y seguros en el futuro (Mani *et al.*, 2012).

- **Las bacteriocinas**

Las bacteriocinas son péptidos o pequeñas proteínas producidas por algunas cepas de bacterias lácticas por síntesis ribosomal y son segregadas por un gran número de bacterias (en la mayoría de

los casos del género *Lactococcus* y algunos *Lactobacillus*) para inhibir el crecimiento de otros microorganismos competidores.

Generalmente son de carácter hidrófobo que desestabilizan la membrana citoplasmática de las bacterias cuando entran en contacto.

Las bacteriocinas inhiben el crecimiento de bacterias causantes del deterioro de alimentos, principalmente bacterias Gram-positivas.

Algunos ejemplos son la Nisina, Pediocina PA-1, Pediocina JD, Curvacina A, Plantaricina E/F, Lactococcina A, Lactococcina B, Lactacina F, Divergicina (*Monrroy et al., 2009*).

- **Extractos naturales**

Los extractos de plantas a partir de semillas de uva, semillas de pomelo y té verde son importantes fuentes de compuestos polifenólicos y ácidos fenólicos con actividad antibacteriana y antioxidante significativa. Estos compuestos imparten un efecto inhibitorio contra las bacterias Gram-positivas. Los polifenoles pueden penetrar la membrana bacteriana semipermeable y reaccionar con el citoplasma o proteínas celulares, desestabilizando células microbianas. Parte de propiedades antimicrobianas de los polifenoles se ha atribuido a sus propiedades quelantes de complejos de iones metálicos que son esenciales para el crecimiento bacteriano. Las paredes celulares de las bacterias Gram-negativas representan una gran barrera para polifenoles para entrar en el citoplasma de la célula (*Corrales et al., 2014*).

- **Aceites esenciales**

Los aceites esenciales son extractos naturales constituidos por grandes cantidades de compuestos hidrófobos y volátiles. Ellos incluyen terpenos, terpenoides, componentes aromáticos, fenoles, alcoholes, aldehídos, cetonas, éteres e hidrocarburos, sobre todo en tipos de especias como la canela, clavo, ajo, mostaza y cebolla; son utilizados en la conservación de alimentos, utilizados en la industria alimentaria como saborizante, productos farmacéuticos, en los cosméticos como fragancias y la medicina alternativa.

Su actividad antimicrobiana tiene un amplio espectro, contribuye a la inhibición de algunos virus, mohos y bacterias principalmente, son generalmente más activos contra Gram-positivos que contra Gram-negativos. El efecto antibacteriano se basa en el carácter hidrófobo de los aceites que pueden separar los lípidos de las membranas de las células bacterianas, haciéndolas más

permeables, también pueden inhibir la producción de enzimas esenciales o afectar el material genético bacteriano.

Los aceites esenciales se pueden incorporar en polímeros o en portadores que pueden estar extruidos o revestidos en materiales de empaque. La actividad antimicrobiana se produce cuando los antimicrobianos volátiles se liberan en el espacio de cabeza o por contacto con el alimento. La principal restricción en contra de la comercialización de los aceites esenciales es su fuerte sabor y su alta reactividad con algunos componentes alimentarios.

La proporción de extracto recomendado de materiales que contienen extractos naturales de canela, clavo de olor, jengibre, romero, orégano, eneldo, albahaca, entre otros, ya sea solos o como mezclas para inhibir o reducir el crecimiento de bacterias, levaduras u hongos varía de 0.1% a 10% en peso, sin embargo la cantidad de extracto no debe ser superior a 1,5% para evitar malos sabores y se mantenga por debajo de los límites reglamentados (*Nashwa et al., 2014; Tajkarimi et al., 2010*).

- **Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)**

El EDTA quelante de metal es uno de los agentes antimicrobianos más comúnmente utilizados debido a su capacidad para romper la estructura de lipopolisacárido de bacterias Gram-negativas. EDTA se utiliza generalmente para mejorar la actividad antimicrobiana de otros agentes tales como la lisozima, nisina y aceites esenciales (*Corrales et al., 2014*).

- **Anhídridos y ácidos orgánicos**

Los ácidos orgánicos son agentes antimicrobianos más comúnmente utilizados en la industria de alimentos como desinfectantes para materiales que están en contacto con los alimentos, sustancias incorporadas al alimento para inhibir o retrasar el crecimiento microbiano, actualmente han sido incorporados en recubrimientos comestibles, de manera directa o en forma de sales.

Algunos ejemplos son ácido benzoico, ácido acético, ácido cítrico, ácido ascórbico y ácidos grasos.

Su espectro de acción antimicrobiana es muy amplio cuando se utilizan en combinación; por ejemplo se puede inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y

Escherichia coli O157: H7 con ácido láctico, ácido acético, ácido ascórbico en alimentos como queso, mortadela y salchichas (Raybaudi et al., 2012).

La actividad inhibitoria óptima ocurre a pH bajo cuando la forma disociada de los ácidos se difunde libremente a través de la membrana celular, dando como resultado la acidificación del citoplasma.

Los ácidos débiles son los antimicrobianos no específicos contra bacterias y hongos. Bacterias Gram-negativas son menos susceptibles a ácidos débiles debido a su membrana externa, que sirve como una barrera. Los ácidos débiles se aplican generalmente a través de inmersión o se pulverizan sobre el alimento, aunque este mecanismo resulta en la pérdida potencial de la actividad antimicrobiana debido a una posible reacción con componentes de los alimentos, dilución o evaporación, su incorporación a películas y recubrimientos mejoran el efecto de protección en el alimento.

Los ácidos débiles son aceptados como GRAS cuando se utiliza de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación o de alimentación (Cruz et al., 2013).

- **Modo de acción de los ácidos orgánicos: efecto antibacteriano.**

Es importante señalar que los ácidos orgánicos ejercen sobre los microorganismos dos tipos de efectos distintos, aunque estrechamente relacionados. En primer lugar, existe un efecto antimicrobiano debido a un declive del pH extracelular (en condiciones específicas de pH como se explicará más adelante). El segundo tipo, más importante es el efecto antimicrobiano específico debido a la forma no disociada, que atraviesa la membrana celular y causa una disminución del pH intracelular.

Todos los microorganismos tienen un pH óptimo de crecimiento y un intervalo de pH fuera del cual les resulta imposible proliferar. Esto se refiere al pH del medio o extracelular ya que el pH intracelular tiene que estar necesariamente cerca de la neutralidad. Las bacterias entéricas, como *Escherichia* y *Salmonella* crecen principalmente a pH próximos a la neutralidad (Skřivanová et al., 2011).

Los ácidos débiles como los ácidos orgánicos están usualmente no disociados y por lo tanto no contribuyen directamente a la disminución del pH del medio, excepto en soluciones en las cuales el pH del medio es mayor al valor de la constante de disociación (pKa) de los ácidos orgánicos, la cual es definida como el valor de pH en el que la concentración del ácido (no disociado) es igual a la concentración del anión (A^-) del ácido disociado, este hecho repercute directamente en la eficiencia del antimicrobiano, ya que a valores de pH superiores

al valor de pKa de los ácidos cualquier acción microbiana es débil debido a la disociación de los ácidos en la solución extracelular.

La forma no disociada de un ácido débil es más permeable a la membrana celular que la forma disociada, de este modo cuando el medio contiene ácidos orgánicos no disociados el efecto antimicrobiano se incrementará dando como resultado daño a la célula bacteriana (*Hamdy et al., 2015; Lehrke et al., 2011*).

Se ha establecido que el mecanismo primario de la inactivación microbiana por ácidos orgánicos implica la entrada no disociada del ácido orgánico (HA) a través de la membrana celular y una vez dentro de la célula bacteriana la molécula de ácido es forzada a disociarse en aniones (A^-) y protones (H^+) cargados, debido al pH cercano a la neutralidad del citoplasma, lo cual causa cambios drásticos de acidez en el interior de la célula lo que conduce a la modificación o desnaturalización de las enzimas y proteínas estructurales, así mismo se obstaculiza la síntesis de ADN/ARN desencadenando daño celular. Por otra parte, el aumento de la acidez en el citoplasma de la célula obliga a utilizar el ATP para exportar el exceso de iones (H^+) que conduce al agotamiento de la energía, con la consiguiente obstaculización del crecimiento microbiano y la muerte celular (*Cano, 2013; Boziaris, 2014*).

1.2.5.4.3 Ejemplo de empaques con función antimicrobiana

La calidad de los alimentos se encuentra afectada por factores físicos, químicos y microbiológicos, el control de dichos factores y en especial el microbiológico es esencial para la preservación de los alimentos.

De ese modo en los materiales de empaque, películas comestibles y recubrimientos se pueden adicionar compuestos antimicrobianos con el fin de mantener altas concentraciones de conservantes en las superficies de los alimentos, ya que en el caso de alimentos sólidos y semisólidos el crecimiento microbiano se produce principalmente en la superficie (*Corrales, 2014*).

Debido a la gran diversidad de alimentos, los materiales de empaque con función antimicrobiana han sido reconocidos como uno de los sistemas de envasado activo más prometedor para extender la vida útil de los alimentos mediante diferentes mecanismos de incorporación de los antimicrobianos los cuales los más utilizados en la industria son:

1.- Encapsulación: Esta técnica se ha aplicado para los compuestos volátiles a partir de aceites esenciales. No ocurre contacto superficial directo con el alimento y los antimicrobianos volátiles se liberan en el espacio de cabeza del empaque donde se inhibe el crecimiento de bacterias patógenas.

2.- Dispersión de los agentes antimicrobianos en los polímeros del envase

Los antimicrobianos pueden ser incorporados por extrusión o presión con calor. La principal desventaja de la extrusión es el uso de altas temperaturas y fuerzas de corte que puede reducir las actividades antimicrobianas; antimicrobianos resistentes al calor tales como la nisina y la imazalil son adecuados para estos empaques.

3.-Recubrimientos y películas: Los compuestos antimicrobianos incorporados están en contacto directo con la superficie del alimento.

Las ventajas de este método son que los compuestos no están expuestos a un calor excesivo y se pueden aplicar en cualquier fase de la cadena de suministro de alimentos.

Esta técnica ha sido utilizada con una amplia gama de agentes antimicrobianos, incluyendo ácidos orgánicos, metales, aceites esenciales y macromoléculas con propiedades antimicrobianas como el caso del quitosán (*Ávila et al., 2008; Corrales, 2014*).

1.2.6 Recubrimientos antimicrobianos como envasado activo

Un recubrimiento antimicrobiano es una forma de envasado activo que contribuye al mantenimiento de la inocuidad, la calidad y la mejora de la estabilidad de los alimentos durante el almacenamiento mediante la creación de una barrera protectora que permite prevenir, reducir o inhibir el crecimiento microbiano (*Villalobos et al., 2009; Mingming et al., 2014*).

La eficacia antimicrobiana de los recubrimientos frente a varios patógenos empleando diferentes sustancias antimicrobianas, tales como ácidos orgánicos, bacteriocinas, extractos de especias o aceites esenciales, ácidos grasos, extracto de semillas de plantas, enzimas, metales de tamaño nanométrico y óxidos metálicos incorporados en las películas comestibles dependerá de su concentración, estructura química y grado de dispersión en la película o recubrimiento y la interacción con la matriz polimérica (*Villalobos et al., 2009*).

Cabe mencionar que los antimicrobianos empleados en los recubrimientos son generalmente reconocidos como seguros (GRAS) de acuerdo a la lista de aditivos alimentarios de la FDA.

El principal potencial de los recubrimientos antimicrobianos es el uso en alimentos que incluyen frutas y hortalizas, carne, pescado, pan, queso, frituras.

Como la contaminación microbiana de la mayor parte de productos de alimenticios ocurre principalmente en la superficie, los recubrimientos y películas antimicrobianas son una opción viable.

1.2.6.1 Ventajas y desventajas de incorporar antimicrobiano al recubrimiento

Ventajas

- Ciertos antimicrobianos actúan como plastificantes, mejorando las propiedades de tracción en particular la flexibilidad de algunos polímeros.
- Mejora de calidad de los alimentos.
- Garantizar la seguridad alimentaria.
- Contribuye a la ampliación de la vida útil de los alimentos.

Desventajas:

- La incorporación de un agente antimicrobiano en un recubrimiento podría alterar las propiedades mecánicas y de barrera de los polímeros.
- Los cambios en la cristalinidad se pueden atribuir a la incorporación de antimicrobianos en ciertos polímeros.
- Compatibilidades interfaciales bajas generan una baja adherencia y huecos en la estructura del material (*Mingming et al., 2014; Galet et al., 2012*).

1.2.7 Mecanismos de formación de recubrimientos

En la formulación de películas y recubrimientos se necesita el uso de por lo menos un componente capaz de formar una matriz estructural que establezca la mejor interacción posible entre las moléculas bajo la acción de tratamientos físicos o químicos con suficiente cohesividad.

La estructura y el estado físico de la superficie del recubrimiento o película terminados dependen en gran medida de la técnica de preparación.

La formación de película generalmente involucra diferentes tipos de enlaces (iónicos, covalentes, puentes de hidrógeno, fuerza de Vanders Walls, interacciones electrostáticas) entre las cadenas que conforman al polímero formando una red semirígida que atrapa e inmoviliza al solvente.

Dos tipos de fuerza intervienen a nivel molecular, fuerza de cohesión que actúa entre las

moléculas del polímero y adhesión que se ejerce entre la película o recubrimiento y la superficie de donde se está aplicando.

El grado de cohesión dependerá de la estructura polimérica, el disolvente utilizado y de la presencia de un plastificante.

Las sustancias formadoras de películas crean una estructura continua mediante interacciones entre moléculas, bajo la acción de un tratamiento químico o físico.

La formación de una película o recubrimiento involucra uno de los siguientes procesos:

- **La coacervación simple**, en la que se consigue la formación de la película a partir del cambio de fase, gelificación o precipitación de un hidrocoloide en disolución acuosa mediante modificación de alguna propiedad del disolvente como puede ser la evaporación del solvente, por la adición de un solvente no-electrolito en el que el polímero es insoluble (alcohol), por la adición de un electrolito que genere un efecto de precipitación de sales o modificando el pH de la solución (pH, carga eléctrica, etc.).

Con este proceso se consigue el rompimiento del polímero y su reordenación mediante enlaces iónicos o de puentes de hidrógeno, favoreciéndose el entrecruzamiento de las moléculas para finalmente formar una matriz.

- **La coacervación compleja**, este proceso involucra la dispersión por separado de hidrocoloides de carga eléctrica opuesta para después combinarlos induciendo interacciones de neutralización y precipitación de la mezcla del biopolímero.

- **La gelificación o coagulación térmica**, mediante la cual el calentamiento de la macromolécula ocasionando su desnaturalización seguida de gelificación, precipitación o incluso el enfriamiento de una dispersión de hidrocoloide que provoca una transición gel-sol, por ejemplo la gelatina o el agar.

- **La eliminación del disolvente**, los componentes principales del recubrimiento se dispersan en un solvente que posteriormente se elimina en un proceso de secado, donde la temperatura y el tiempo influyen en la cristalinidad resultante y en las propiedades mecánicas.

- **La fusión y solidificación**, empleada en películas de naturaleza lipídica. Consiste en el calentamiento de la sustancia empleada por encima de su punto de fusión y su posterior enfriamiento.

Para obtener una película con propiedades mecánicas adecuadas es necesario ajustar correctamente la temperatura y velocidad de secado (*Aguilar et al., 2010; Bosquez, 2003^b*).

1.2.8 Métodos para la aplicación de películas y recubrimientos

Se han desarrollado varios métodos para la correcta aplicación de las matrices comestibles sobre los alimentos, los recubrimientos comestibles se diferencian de las películas comestibles, por el modo en que son aplicados. Las técnicas de Inmersión y spray (pulverización) se utilizan para recubrimientos comestibles y el preformado (casting) para películas comestibles.

Cualquiera de los procesos de formación expuestos se puede utilizar con variadas técnicas de aplicación. Sin embargo, el modo de aplicación de una película comestible depende en gran medida del tipo de producto que se desee recubrir.

1.2.8.1 Inmersión

Consiste en la aplicación de las matrices comestibles sumergiendo el alimento en la solución preparada a continuación se procede a un escurrido y secado con aire para lograr un recubrimiento uniforme en la superficie del producto. Se utiliza especialmente en aquellos alimentos cuya forma es irregular que requieren de una cobertura uniforme y gruesa como frutas, vegetales y productos cárnicos.

1.2.8.2 Spray (pulverización)

Esta técnica se basa en la aplicación de la solución presurizada, de esa manera se consiguen diferentes tamaños de gota. Permite obtener recubrimientos comestibles más finos y uniformes. Se usa en alimentos de superficie lisa o para la separación de componentes de distinta humedad de un alimento compuesto. Otras variaciones a este método pueden ser la aplicación del recubrimiento por medio de cepillos o rodillos.

1.2.8.3 Casting (preformado o pre moldeado)

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 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 obtiene una película para ser aplicada sobre los alimentos (*Jaramillo, 2014; Marzo, 2010; Govantes et al., 2006*).

1.3 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)

La OMS describe a las enfermedades transmitidas por alimentos como el conjunto de síntomas originados por la ingestión de agua y/o alimentos que contengan agentes biológicos, físicos o químicos en cantidades tales que afectan la salud del consumidor en forma aguda o crónica, a nivel individual o de grupo de personas.

Cada año enferman millones de personas en el mundo, muchas de las cuales mueren, en su mayoría niños, mujeres embarazadas, personas inmunocomprometidas o desnutridas y personas de la tercera edad por ingerir agua o alimentos insalubres.

Más de 200 enfermedades conocidas son transmitidas a través de alimentos. Las causas de enfermedades de origen alimentario incluyen: bacterias, virus, parásitos, toxinas, metales y priones siendo más frecuentes las dos primeras, los síntomas de estas enfermedades van desde ligeras gastroenteritis hasta síndromes de tratamiento neurológicos de por vida, hepáticos, renales y hasta cáncer.

A pesar de los avances tecnológicos y los esfuerzos realizados para mejorar la seguridad de los alimentos, las ETA se han incrementado considerablemente tanto en países desarrollados como en países subdesarrollados debido a diversos factores entre los cuales se pueden señalar: la aparición de nuevos agentes causantes o nuevos mutantes con una mayor patogenicidad, la globalización del comercio de alimentos, el crecimiento de la población, la pobreza y la urbanización en los países subdesarrollados (FAO, 2013; Martínez *et al.*, 2014).

1.3.1 Clasificación de Enfermedades transmitidas por alimentos

Se pueden nombrar dos tipos de ETA, las producidas por la ingestión de alimentos y/o agua contaminados por agentes infecciosos específicos y las producidas por la ingestión de toxinas (Vergara *et al.*, 2014).

- **Infecciones alimentarias.**

Estas son generadas por bacterias, virus, hongos, parásitos, que invaden, se multiplican y alteran los tejidos del hospedera.

Ejemplos típicos de las infecciones alimentarias son la salmonelosis, listeriosis, triquinosis y la toxoplasmosis, entre otras.

- **Intoxicaciones alimentarias**

Las Intoxicaciones alimentarias son causadas por la ingestión de toxinas generadas como metabolito producido por microorganismos, hongos, toxinas presentes en tejidos de plantas y animales, especies marinas (ciguatera, saxitoxina) y/o sustancias químicas o radioactivas que se incorporan a los alimentos de manera accidental, incidental o intencional en cualquier momento desde su producción hasta su consumo ejemplos de estos son los plaguicidas, metales pesados u otras (Martínez *et al.*, 2014).

En la figura 8 se muestra de forma sintetizada algunos ejemplos de sustancias o microorganismos causantes de intoxicaciones alimentarias más frecuentes.

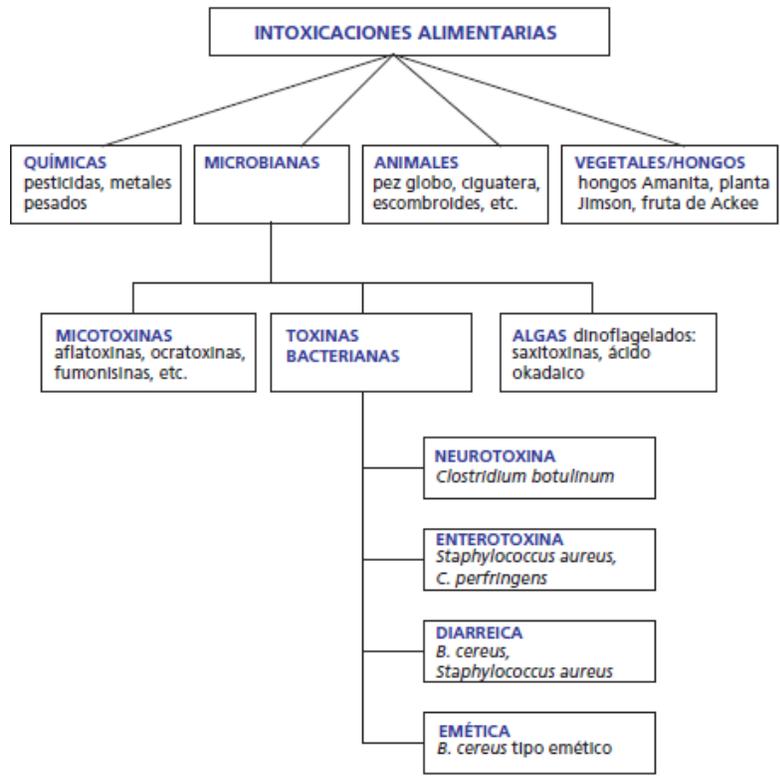


Figura 8. Esquema general de las intoxicaciones alimentarias más frecuentes

- **Toxiinfecciones**

Existe otro tipo de enfermedades transmitidas por alimentos que combina la intoxicación con la infección. Las toxiinfecciones resultan de la infección de alimentos con cierta cantidad de microorganismos patógenos que son capaces de producir o liberar toxinas una vez que han sido

ingeridos; es decir, son generadas por bacterias que no son invasivas y que producen toxinas durante su desarrollo en el intestino.

En esta categoría se encuentran los microorganismos capaces de producir toxinas “*in vivo*” como por ejemplo *Vibrio cholerae*.

Otro grupo está formado por los microorganismos capaces de producir toxinas como es el caso de *Vibrio parahaemolyticus* y *Yersinia enterocolitica* (Kopper, 2012).

En la figura 9 se muestran infecciones alimentarias más comunes causadas por alimentos.

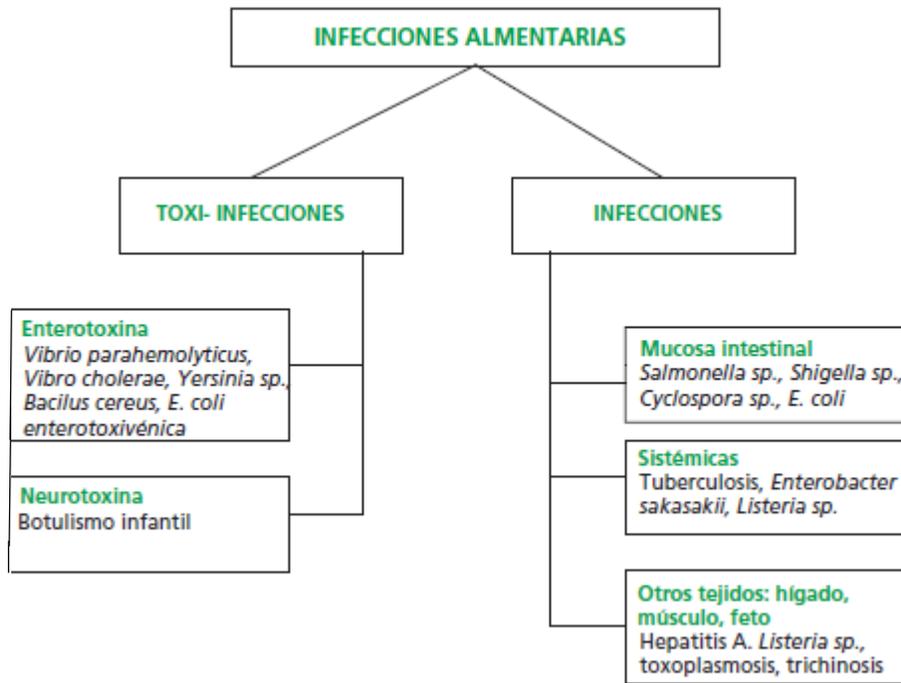


Figura 9. Esquema general de las infecciones más frecuentes causadas por alimentos

1.3.2 Modo de transmisión de las ETA

Las ETA son el resultado de la interacción entre un agente etiológico de tipo biológico o químico y un hospedero susceptible; el estado de salud de la persona, la edad y otros elementos como número de microorganismos ingeridos determinarán en gran medida su predisposición para presentar una ETA.

Para que ocurra una ETA debe haber convergencia del hospedero, del agente y de los factores ambientales. Si no se produce esa convergencia bajo condiciones adecuadas no habrá enfermedad y cualquier acción que tienda a separarlos provocará que la enfermedad no aparezca.

La transmisión de las enfermedades infecciosas a través de contaminación de alimentos puede ser primaria o secundaria.

Contaminación primaria: ocurre cuando la sustancia contaminante está contenida en el alimento y se puede adquirir en el campo, debido a animales enfermos o a cosechas contaminadas.

Ejemplos de contaminación primaria son la triquina en carne de cerdo, *Salmonella spp.* en huevos, estafilococos en leche, toxinas marinas en pescados o mariscos, solanina en papa, aflatoxinas en maíz y otras.

Contaminación secundaria: ocurre durante el procesamiento de los alimentos al entrar en contacto directo o indirecto con otros ingredientes contaminados, la superficie de las mesas, los utensilios, el hielo, los aerosoles, las manos de los operadores o muchos otros elementos.

Otra fuente importante de contaminación son las sustancias tóxicas agregadas de manera intencional, accidental o incidental, tales como dioxinas, plaguicidas, cianuro, residuos de agentes químicos para limpieza, residuos de materiales de empaque, residuos de tuberías y otros (Martínez et al., 2014; Romero, 2007).

1.3.3 Situación Internacional y Nacional en el ámbito de ETA

Las ETA enferman a más de 582 millones de personas en el mundo y matan a más de 350 mil cada año, atribuyendo a padecimientos ocasionados por ingerir comestibles insalubres como carne mal cocida, frutas y hortalizas contaminadas con heces o pesticidas y mariscos crudos que contienen biotoxinas marinas (OPS/OMS, 2015).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la incidencia anual de diarrea estimada en el mundo es de 1.500 millones de casos y se ha descrito que el 70% de las diarreas se originan por la ingestión de alimentos contaminados con microorganismos y/o sus toxinas.

En los países en desarrollo las enfermedades diarreicas representan uno de los problemas de salud pública más importantes, con repercusiones que inciden en el ámbito económico, social y político.

- **Estados Unidos**

Las enfermedades transmitidas por los alimentos constituyen una carga importante para la salud pública en los Estados Unidos. Se estima que 31 de los principales microorganismos conocidos causantes de enfermedades transmitidas por los alimentos encontrados en los productos alimenticios consumidos en los Estados Unidos provocan anualmente 9.4 millones de enfermedades, 55,961 hospitalizaciones y 1,351 muertes (OMS, 2015).

En el cuadro 9 se muestran 14 de los 31 patógenos causantes de ETA los cuales presentaron mayor impacto en la salud de la población de Estados Unidos en el año 2011.

Cuadro 9. Principales agentes patógenos relacionados con ETA en Estados Unidos

Patógeno	Costo de la enfermedad (miles de pesos)	Enfermedades	Hospitalización	Muertes
<i>Salmonella spp.</i>	3309	1027561	19336	378
<i>Toxoplasma gondi</i>	2973	86686	4428	327
<i>Campylobacter spp.</i>	1747	845024	8453	76
<i>Listeria monocytogenes</i>	2655	1591	1455	255
<i>Norovirus</i>	2002	5461731	14663	149
<i>E. Coli 0157:H7</i>	272	63153	2130	20
<i>C. perfringens</i>	309	965958	438	26
<i>Yersinia enterocolitica</i>	252	97656	533	29
<i>Shigella spp.</i>	121	131254	1456	10
<i>Vibrio</i>	47	57616	210	4
<i>Cryptosporidium parvum</i>	107	52228	183	12
<i>E. Coli</i>	327	112752	271	0
Total	61461	8914713	53678	1312

Batz et al., 2015

Se observa que *Salmonella spp.* tiene mayor incidencia en enfermedades transmitidas por alimentos en estados unidos, lo cual genera 23.44 % del total del costo generado por ETA, representa el 11.52% de las enfermedades por microorganismos patógenos, provoca el 36.02 % de hospitalización y el 28.59 % de muertes relacionadas con ETA.

- **América latina**

Las ETA constituyen uno de los problemas más extendidos en el mundo actual, por ejemplo, la enteritis y otras enfermedades diarreicas se encuentran entre las cinco primeras causas de mortalidad en la mayoría de los países de América Latina y el Caribe, asimismo, expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), consideran que entre el 70% y el 80% de las enfermedades diarreicas agudas (EDA), las producen los alimentos y el agua contaminados (*Castillo, 2014*). Se estima que anualmente una de cada cuatro personas en América sufre un episodio de enfermedad transmitida por alimentos. Como se mencionó anteriormente los niños, las embarazadas, los inmunosuprimidos y los adultos mayores son los más vulnerables a este tipo de enfermedad (*Arellano, 2015*).

- **México**

México es una de las naciones que actualmente registra a nivel mundial las tasas de mortalidad más elevadas por padecimientos relacionados con la ingestión de alimentos insalubres, siendo muy elevado el costo tanto en vidas humanas, recursos médicos destinados a la atención de los enfermos como en el aspecto económico por pérdidas de tiempo laborable, ya que constituyen una de las primeras causas de ausentismo laboral.

Los alimentos insalubres causan 350 mil muertes en el mundo y enferman a más de 582 millones de personas; en México las ETA son la quinta causa de enfermedades (*OMS, 2015*).

En la mayoría de los países en vías de desarrollo existen pocos o en algunos casos nulos registros de enfermedades transmitidas por alimentos, lo que dificulta realizar una verdadera evaluación del impacto diario de las ETA.

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), aunque difíciles de cuantificar, se estiman relevantes en la salud de los mexicanos. En particular, las enfermedades agudas de naturaleza infecciosa transmitidas por bacterias, parásitos y virus, en las que una de las vías de transmisión son los alimentos (*OMS, 2013*).

En nuestro país, el panorama de morbilidad predominante es de padecimientos transmisibles, las infecciones respiratorias agudas permanecen en la primera causa de atención médica, seguido de las enfermedades diarreicas. Además, en la lista de las 20 principales causas de morbilidad en México, se encuentran específicamente las amebiasis y las salmonelosis.

Existen más de 250 enfermedades transmitidas por alimentos en el mundo, en el año 2011 se reportaron en México 5 millones 681 mil casos de estas enfermedades, según la cifras oficiales del Sistema Nacional de Vigilancia epidemiológica del País (SINAVE, 2014).

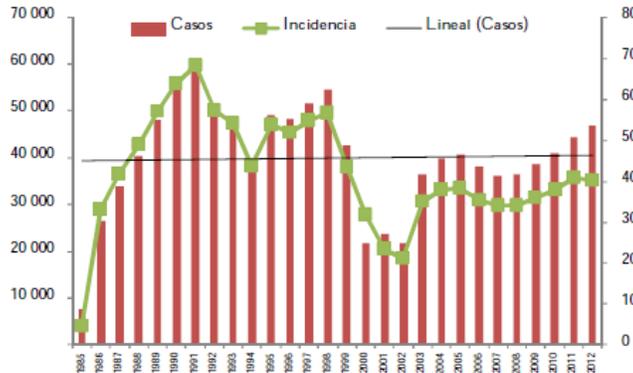


Figura 10. Casos e incidencia por año de intoxicaciones alimentarias en México

En la figura 10 se muestran los casos y la incidencia de intoxicaciones alimentarias en México en el periodo de 1985 al 2012, se observa que el año en el cual se presentan más casos de intoxicaciones alimentarias fue en 1991, se observa que a partir del año 2000 la incidencia no es muy variable en comparación con años anteriores.

Las enfermedades diarreicas en México ocupan uno de los primeros lugares como causa de morbilidad en población menor de cinco años de edad, generando el 20% de la demanda de consulta en los servicios de salud y el 10% de las hospitalizaciones pediátricas. Este grupo de edad presenta entre 2 y 4 episodios diarreicos al año (SSA, 2014).

El estado más afectado es Aguascalientes y el menos afectado es Baja California Sur, en el caso de la salmonelosis, uno de los estados más afectados por este problema es Sinaloa y por lo que se aprecia en las cifras se tiene una tendencia a la alza en el número de casos (Osuna, 2012).

1.3.4 Microorganismos comunes relacionados con ETA a nivel mundial

Los trastornos gastrointestinales pueden obedecer a diversas causas las más comunes es por la ingestión de alimentos o agua contaminada ya sea por la presencia de toxinas bacterianas, infestaciones por parásitos, virus o bacterias (Martínez, 2014).

En el cuadro 10 se muestran los principales microorganismos responsables de enfermedades transmitidas por alimentos a nivel mundial en el año 2011

Cuadro 10. Microorganismos comunes en la contaminación de alimentos

ORGANISMO	NOMBRE COMÚN DE LA ENFERMEDAD	TIEMPO DE APARICIÓN DESPUÉS DE LA INGESTA	SÍNTOMAS	DURACIÓN	ORIGEN ALIMENTICIO
<i>Bacillus cereus</i>	Envenenamiento por consumo de alimentos con <i>B. cereus</i>	De 10 a 16 horas	Calambres abdominales, diarrea acuosa, náuseas.	De 24 a 48 horas	Carnes, guisos, jugo de carne, salsa de vainilla.
<i>Campylobacter jejuni</i>	Campilobacteriosis	De 2 a 5 días	Diarrea, calambres, fiebre y vómitos; puede provocar diarrea con sangre	De 2 a 10 días	Carne de aves cruda o poco cocida; leche sin pasteurizar, agua contaminada.
<i>Salmonella</i>	Salmonelosis	De 6 a 48 horas	Diarrea, fiebre, calambres abdominales, vómitos	De 4 a 7 días	Huevos, aves, carne de res; jugos o leche no pasteurizada, frutas y verduras crudas contaminadas.
<i>Shigella</i>	Shigelosis o disentería bacilar	De 4 a 7 días	Calambres abdominales, fiebre y diarrea. La materia fecal puede contener sangre o mocosidad	De 24 a 48 horas	Frutas y verduras crudas, agua contaminada.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Envenenamiento por consumo de alimentos con stafilococos	De 1 a 6 horas	Inicio repentino de náuseas y vómitos severos. Calambres abdominales.	De 24 a 48 horas	Carne de res, ensaladas, pasteles con crema no refrigerados o refrigerados incorrectamente.

CAPÍTULO I | MARCO TEÓRICO

			Puede presentarse diarrea y fiebre.		
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Infección por V. Parahaemolyticus	De 4 a 96 horas	Diarrea acuosa (ocasionalmente con sangre), calambres abdominales, náuseas, vómito y fiebre.	De 2 a 5 días	Mariscos poco cocidos, tales como los moluscos.
<i>Cryptosporidium</i>	Criptosporidiasis intestinal	De 2 a 10 días	Diarrea (generalmente acuosa) calambres estomacales, malestar estomacal, fiebre leve.	Puede que se remita y haya recaídas durante semanas o meses	Alimentos crudos o contaminados manipulados por persona enferma, agua contaminada.
<i>E. Coli</i>	Infección por E. Coli (causa común de la "diarrea del viajero")	De 1 a 3 días	Diarrea acuosa, calambres abdominales, vómito.	De 3 a 7 días o más.	Agua o alimentos contaminados por heces fecales de humanos.
<i>E. Coli O157:H7</i>	Colitis hemorrágica o infección por E. Coli O157:H7	De 1 a 8 días	Diarrea aguda (a menudo con sangre) dolores abdominales y vómitos. Puede causar insuficiencia renal.	De 5 a 10 días	Carne de res poco cocida, leche y jugo sin pasteurizar, frutas y verduras crudas, agua contaminada.
<i>Clostridium prfringens</i>	Intoxicación por Clostridium prfringens	De 8 a 16 horas	Calambres abdominales intensos, diarrea acuosa.	Habitualmente 24 horas	Carnes, alimentos pre cocidos o deshidratados.

Fuente: CDC, 2011.

1.3.5 *Salmonella spp.*

Cuando un microorganismo es transportado por un alimento contaminado y es ingerido, se establece en el organismo de la persona y se multiplica. Las bacterias, en general, penetran la mucosa intestinal y allí se multiplican.

Algunas permanecen solamente en esa mucosa y otras invaden el sistema circulatorio y se diseminan por distintos órganos.

Las bacterias poseen factores de adherencia o colonización que les permiten multiplicarse en sitios específicos no siendo alteradas ni por el peristaltismo ni por el flujo de mucus o alimentos en suspensión. *Salmonella* es un patógeno importante asociado a casos de enfermedades transmitidas por los alimentos que causa grandes problemas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo (Vivek et al., 2012).

El patógeno es generalmente asociado con alimentos contaminados como mantequilla de maní, almendras, carne, huevos, productos cárnicos, frutas y hortalizas. Esta bacteria puede tener un gran impacto socioeconómico debido a lo que implica la enfermedad, gastos médicos, pérdida de la productividad, discapacidad, muertes, mermas debido a la contaminación de productos.

1.3.5.1 Características

Salmonella (figura 11) pertenece a la familia de las enterobacterias (es decir, asociado con el intestino lo que refleja el hecho de que habitan en el tracto intestinal de los seres humanos y algunos animales), se caracteriza por ser un bacilo Gram negativo, generalmente móvil debido a la presencia de flagelos peritricos, anaerobio facultativo, y no formador de esporas.

Poseen fimbrias que las ayudan a adherirse a superficies o mucosas; la presencia de pili sexuales especializados permite el intercambio de la información genética entre las células que incluye la resistencia a los antibióticos.



Figura 11. *Salmonella spp*

Crece a temperaturas entre 8 y 45 ° C en un intervalo de pH de 4-9 y requiere actividad de agua (aw) por encima de 0.94. La *Salmonella* es sensible al calor y generalmente muere a temperaturas de 70 ° C o superior, son resistentes a la desecación y pueden sobrevivir durante años en el polvo y la suciedad (Vivek et al., 2012; Mani et al., 2012; Tortora et al., 2007).

Casi todos los géneros de *Salmonella* son altamente patógenos (requiriéndose una baja dosis infectante en los seres humanos siendo tan solo de 1000 bacterias), se caracterizan por ser habitantes comunes en el tracto intestinal de muchos animales en especial en aves de corral y del ganado vacuno, así como provenir de aguas contaminadas que se utilizan para el riego de cultivos, contaminando de esa manera alimentos como frutos y hortalizas.

Carne, pollo, leche, huevos, frutas y hortalizas dominan la larga lista de los productos alimenticios que pueden portar a estos organismos unicelulares.

1.3.5.2 Enfermedades atribuidas a *Salmonella*

La presencia de *Salmonella* puede inducir tres tipos de enfermedades al humano: incluyendo gastroenteritis, la fiebre tifoidea e infecciones locales.

- **Gastroenteritis.**

La salmonelosis, causada por la bacteria *Salmonella* es una de las enfermedades de transmisión alimentaria más comunes y ampliamente extendidas. Se estima que afecta anualmente a decenas de millones de personas de todo el mundo y provoca más de cien mil defunciones (OMS, 2013, tortora et al., 2007).

Aunque *Salmonella* incluye más de 2.300 serotipos, *Salmonella Enteritidis* y *Salmonella* entérica serotipo *typhimurium* son los serotipos más comúnmente identificados en la incidencia de salmonelosis.

Los síntomas de la enfermedad incluyen náuseas, vómitos, dolor abdominal, cólicos diarrea y fiebre moderada, comienzan a manifestarse entre 6 y 72 horas (generalmente 12 a 36 horas) después de la ingesta de *Salmonella*, y la enfermedad dura entre 2 y 7 días.

Sin embargo, en algunos casos, particularmente en niños pequeños y en ancianos, la deshidratación causada por la enfermedad puede ser grave y poner en peligro la vida.

En la mayoría de los casos, los síntomas de salmonelosis son relativamente leves y los pacientes se recuperan sin tratamiento específico, en casos no complicados, la fase aguda usualmente se

resuelve dentro de las 48 h la gravedad y duración de la enfermedad en ocasiones depende de la cantidad de bacteria ingerida.

Normalmente la persona se recupera en pocos días, sin embargo muchos pacientes continúan esparciendo el microorganismo en las heces hasta por 6 meses con portadores sanos (*Mani et al., 2012*).

- **Fiebre tifoidea**

La fiebre tifoidea causada por *Salmonella typhi*, es la enfermedad más grave producida por cualquier miembro del género *Salmonella* (*Sudarsan et al., 2012; Suzane et al., 2012*).

Las bacterias ingresan al cuerpo, viajan hacia el intestino y luego hacia al torrente sanguíneo, de donde puede llegar hasta los ganglios linfáticos, la vesícula, el hígado, el bazo y otras partes del cuerpo.

El periodo de incubación de la fiebre tifo se lleva a cabo de 2 a 3 semanas, los síntomas son fiebre elevada, cercana a 40 °C , dolor abdominal, cefalea constante, agitación, escalofríos, sensación de letargo y debilidad. La diarrea comienza en la segunda o tercera semana cuando la fiebre empieza a bajar. En casos graves que pueden ser fatales, son posibles la ulceración y la perforación de la pared intestinal.

Del 1 al 3% de los pacientes recuperados se vuelven portadores crónicos. Albergan al patógeno en la vesícula biliar y continúan eliminando bacterias en las heces durante meses y en algunos casos en forma permanente diseminando la enfermedad (*Tortora et al., 2007*).

- **Infecciones extraintestinales**

Las cepas más frecuentemente relacionadas con este tipo de infecciones son *S. typhimurium*, *S. enteritidis* y *S. choleraesuis*. Los síntomas dependerán de la localización y pueden aparecer en fases tardías.

Las localizaciones extra intestinales más frecuentes son: endocarditis, arteritis, afectación del sistema nervioso central, neumonía, infecciones osteoarticulares, del tracto urinario y tejidos blandos.

1.3.5.3 Fuentes y transmisión

- La bacteria *Salmonella* está ampliamente presente en animales domésticos y salvajes. Es prevalente en aves, porcinos y vacunos, y también en mascotas, incluidos gatos, perros, pájaros y reptiles, entre ellos las tortugas.
- La *Salmonella* puede atravesar toda la cadena alimentaria, desde los piensos para animales y la producción primaria hasta los hogares o los establecimientos e instituciones de servicios de comidas.
- Las personas contraen la salmonelosis a través del consumo de alimentos contaminados de origen animal (principalmente huevos, carne, aves y leche), aunque también otros alimentos se han vinculado a la transmisión, incluidas hortalizas contaminadas por estiércol.
- También puede transmitirse entre las personas por vía fecal-oral.
- Además, se pueden producir casos cuando las personas entran en contacto con animales infectados, incluidas las mascotas. Generalmente, esos animales no presentan signos de la enfermedad.
- La *Salmonella* residen en el tracto intestinal de los animales y / o las personas, puede contaminar las frutas y hortalizas a través de la infiltración de aguas residuales en los campos, el riego con agua contaminada, la presencia de animales en el campo o un abonado incorrecto.
- La contaminación también puede producirse en la manipulación durante la cosecha y el embalaje y en otros pasos de la cadena de distribución y comercialización (OMS, 2013).

1.3.6 Prevención y control de ETA

El ambiente que rodea el alimento, desde su origen en la producción primaria hasta que llega al consumidor después de los diferentes procesos de transformación, ejerce una influencia decisiva para obtener un ambiente inocuo, libre de contaminantes que puedan dañar la salud. Por esta razón se promueve la inocuidad de los alimentos mediante un enfoque integral que incluye todos los eslabones de la cadena del producto: finca, planta de procesamiento, transporte, almacenamiento, manipulación domiciliaria y las prácticas de cocción, incluidos los sucesos de contaminación cruzada.

Los riesgos alimentarios y la pérdida de calidad pueden producirse en diversos puntos de la cadena alimentaria, y es difícil y costoso comprobar su presencia.

Un planteamiento bien estructurado y preventivo que controle los procesos es el método más indicado para mejorar la inocuidad y calidad de los alimentos. Muchos, pero no todos, los posibles riesgos alimentarios se pueden controlar a lo largo de la cadena alimentaria mediante la aplicación de prácticas adecuadas, por ejemplo, buenas prácticas agrícolas (BPA), buenas prácticas de manufactura (BPM) y buenas prácticas de higiene (BPH).

Un importante planteamiento preventivo que puede aplicarse en todas las fases de la producción, elaboración y manipulación de los productos alimenticios es el sistema HACCP. Los principios del HACCP ofrecen una estructura sistemática para la identificación y control de los riesgos transmitidos por los alimentos (FAO, 2013).

Cada país cuenta con organismos, o programas específicos para asegurar la inocuidad alimentaria en todos los eslabones de la cadena alimentaria sin embargo todo está en función a la legislación que adopta cada país para el fomento de la calidad y seguridad alimentaria. Sin embargo hay organismos que interceden por la seguridad alimentaria a nivel mundial tales como:

- La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).
- Organización Mundial de la Salud (OMS)
- Codex Alimentarius: Esta Comisión propone la implementación del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (HACCP) para garantizar la inocuidad de los alimentos.

La FAO junto con la OMS crearon diferentes organizaciones para fomentar la inocuidad alimentaria en el mundo.

- Organización Internacional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA)
- Organización Panamericana de la Salud (OPS)
- Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (INPPAZ)
- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA)

Otra de las alternativas para fomentar la inocuidad en frutos y hortalizas es la aplicación de recubrimientos antimicrobianos (antes de ser expuestos al consumidor, o bien antes de exportarlos) que permiten, retardar o inhibir el crecimiento microbiano en la superficie del producto.

JUSTIFICACIÓN

Los frutos y hortalizas son susceptibles de contaminación a lo largo de toda la cadena de suministro y la contaminación se origina directa o indirectamente por tierra, agua, equipo y materia fecal, ya sea pre o postcosecha.

Los factores que contribuyen a la contaminación son: malas prácticas de manipulación, procesos inadecuados en los campos de cultivo; contaminación cruzada por frutos podridos o dañados; prácticas deficientes de higiene y mal manejo durante el empaque, almacenamiento y transporte.

La presencia de bacterias patógenas como *Salmonella spp.* en frutos como el aguacate se traduce en un grave problema debido al rechazo de la materia prima por países importadores de este fruto, lo que daña severamente la economía de los productores y del país considerando que México produjo 1,107 millones de toneladas tan solo en el 2013 ocupando el primer lugar en la producción de aguacate en el mundo (SAGARPA, 2014).

Los recientes brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos conducen a una búsqueda de formas innovadoras para inhibir el crecimiento microbiano en los alimentos, manteniendo la calidad, frescura y seguridad del producto.

De ese modo, la finalidad del proyecto es establecer una opción para fomentar la inocuidad y minimizar pérdidas por patógenos de aguacate Hass y de esa manera lograr la aceptación por parte del consumidor, mediante el desarrollo de recubrimientos antimicrobianos que permitan el control de *Salmonella spp.*, una bacteria altamente relacionada con casos de ETA en el mundo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar las características antimicrobianas y fisicoquímicas de dos recubrimientos formulados con pectina-cera de candelilla o alginato y un desinfectante natural, mediante pruebas microbiológicas (“*in vitro*” e “*in vivo*”), fisicoquímicas (propiedades barrera) y calorimétricas (DSC) para ser aplicados sobre aguacate *Hass* y fomentar su inocuidad.

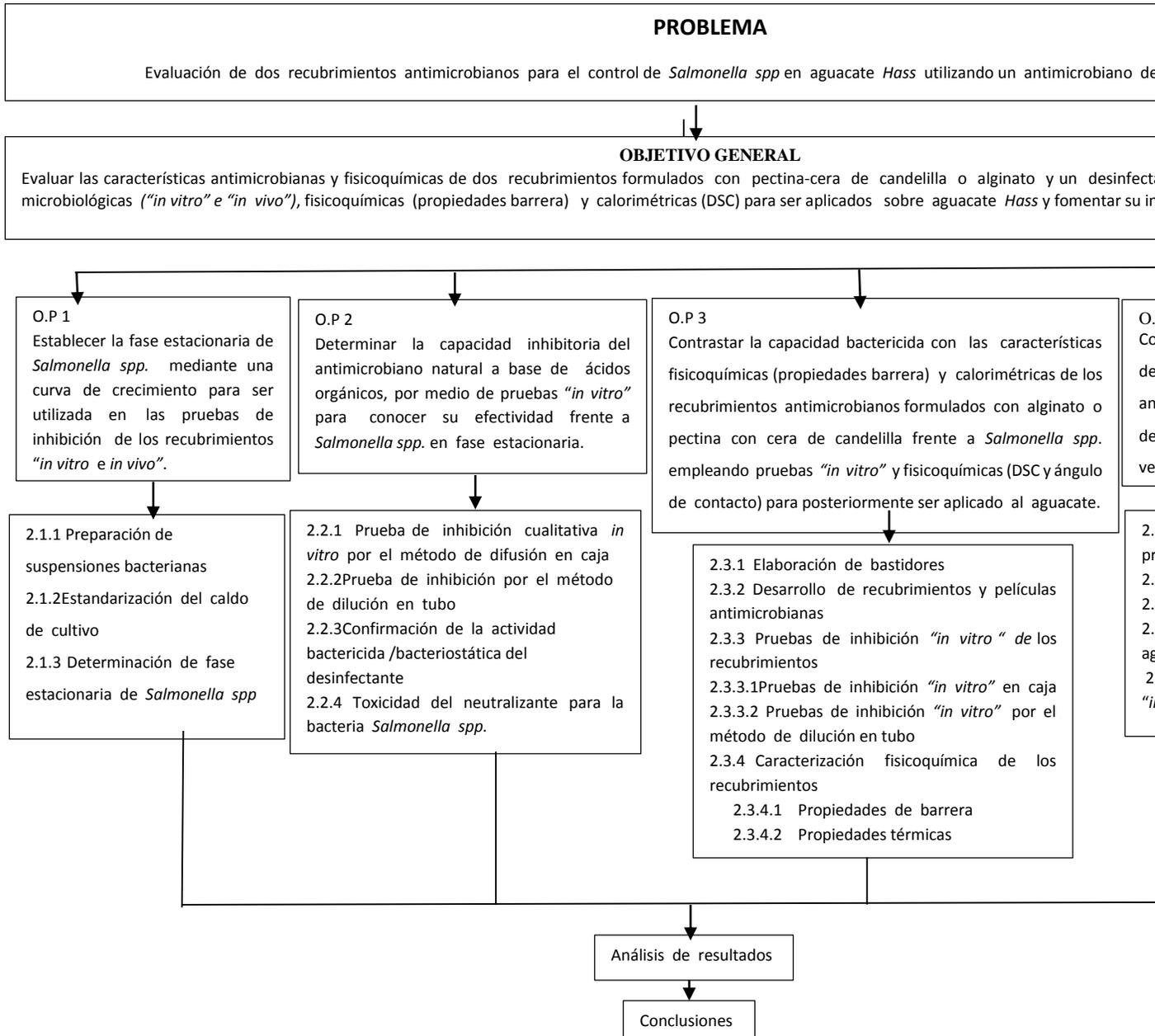
OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.-Establecer la fase estacionaria de *Salmonella spp.* mediante una curva de crecimiento para ser utilizada en las pruebas de inhibición de los recubrimientos “*in vitro* e *in vivo*”.
- 2.- Determinar la capacidad inhibitoria del antimicrobiano natural a base de ácidos orgánicos, por medio de pruebas “*in vitro*” para conocer su efectividad frente a *Salmonella spp.* en fase estacionaria.
- 3.-Contrastar la capacidad bactericida con las características fisicoquímicas (propiedades barrera) y calorimétricas (DSC) de los recubrimientos antimicrobianos formulados con alginato o pectina con cera de candelilla frente a *Salmonella spp.* empleando pruebas “*in vitro*” y fisicoquímicas (DSC y ángulo de contacto) para posteriormente ser aplicado al aguacate.
- 4.- Confirmar la capacidad inhibitoria de cada uno los recubrimientos antimicrobianos sobre su capacidad de inhibición de *Salmonella spp.* una vez aplicado en aguacate.

CUADRO METODOLÓGICO

En la figura 12 se muestra la metodología empleada a lo largo de la experimentación.

Figura12. Cuadro metodológico



CAPÍTULO II: METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.**2.1 Elaboración de curva de crecimiento microbiano****2.1.1 Preparación de suspensiones bacterianas**

La cepa utilizada de *Salmonella spp.* fue proporcionada por el laboratorio de bacteriología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, México.

2.1.2 Estandarización del caldo de cultivo

Se estandarizó un cultivo de 24 horas a una concentración de 10^3 UFC.

- Del cultivo de 24 horas se hicieron 6 diluciones y cada dilución se sembró en una caja Petri con agar Mac Conkey, cada caja se dividió en 4 cuadrantes y en cada cuadrante se sembraron 20 μ L de la muestra.
- Las cajas sembradas se incubaron en una estufa bacteriológica a 37 °C por un lapso de 24 horas
- Después del periodo de incubación se realizó el conteo microbiano con ayuda de un cuenta colonias.
- Los resultados se expresaron como Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/mL) (Iturriaga et al., 2012).

2.1.3 Determinación de fase estacionaria de *Salmonella spp.*

Para determinar la fase estacionaria de la bacteria se elaboró una curva de crecimiento bacteriano:

- 1.- Del cultivo de 24 h. estandarizado a una concentración de 10^3 UFC/mL se inocularon 700 μ L en 25 mL de BHI y se mantuvo a 37°C con agitación (80 rpm) en Baño María.
- 2.- Se tomaron muestras del cultivo bacteriano con los intervalos de tiempo establecidos que se muestran en el cuadro 11 hasta completar 10 horas de incubación. A cada una de las muestras se le midió la absorbancia a 590 nm. Se expresaron resultados según datos obtenidos por la técnicas de conteo microbiológico y por espectrofotometría.

Cuadro 11. Tiempo definido para cada toma de muestra durante la realización de la curva de crecimiento de *Salmonella spp.*

Nomenclatura	Toma de muestra (horas)
To	0
T1	2
T2	4
T3	6
T4	7
T5	8
T6	9
T7	10
T8	10.5
T9	11
T10	11.5

3.- De cada muestra tomada, se hicieron diluciones en solución salina fisiológica (SSF) y se sembraron por el método de gota 20 μ L por gota (4 en cada caja) en agar Mac Conkey.

4.- Posteriormente se incubaron las cajas a una temperatura de 37° C por 24 horas y se realizó el conteo para la elaboración de la curva.

5.- De cada muestra se tomaron 3 mL para realizar la lectura en el espectrofotómetro y registrar la absorbancia con el fin de correlacionar los resultados obtenidos por conteo microbiológico y por la medición de la absorbancia (*Cavaliere, 2005*).

En la figura 13 se muestra el esquema para la elaboración de la curva de crecimiento estacionario por medio de diluciones.

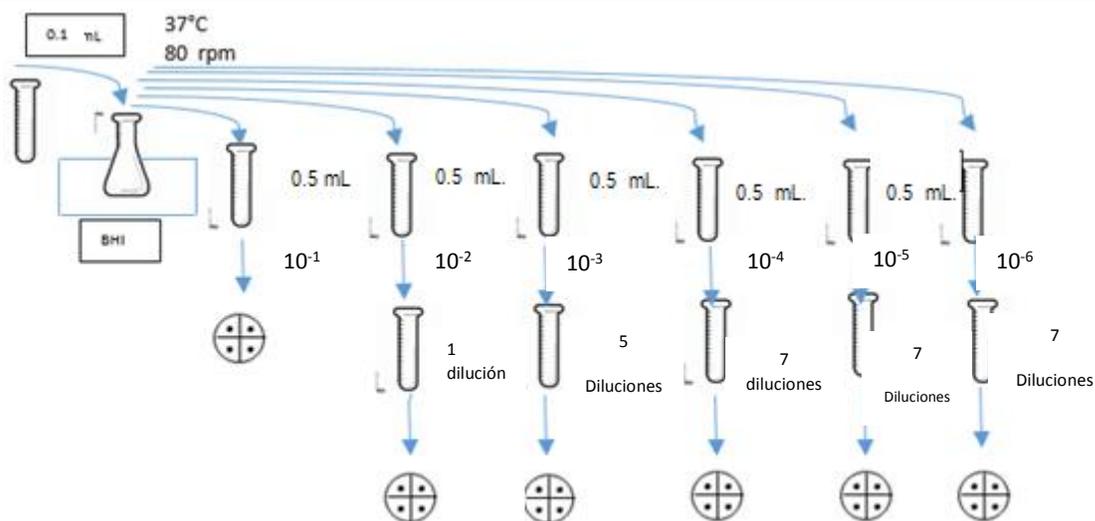


Figura 13. Esquema para la elaboración de la curva de crecimiento microbiano

2.2. Prueba de inhibición cualitativa “in vitro” por el método de difusión en caja

Para determinar la capacidad inhibitoria del antimicrobiano se realizó la prueba de inhibición “in vitro” por el método de difusión, sugerido por *Cavaliere* (2005), con modificaciones.

- 1.- Se preparó y esterilizó agar biotriptasa
- 2.- Se tomaron 100 μL del cultivo de *Salmonella spp.* en fase de crecimiento estacionaria 10^8 UFC (determinada mediante la curva de crecimiento) y se sembró por estría procurando llenar por completo la superficie de la caja del cultivo en agar Biotriptasa.
- 3.- Se dejó secar por 1 h. la caja ya sembrada y se prepararon diluciones del antimicrobiano a concentraciones de 400, 600, 800, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000 y 8000 ppm para posteriormente colocar la muestra del antimicrobiano en la caja sembrada previamente con *Salmonella spp.*
- 4.- Las cajas se dividieron en cuatro para poner cada gota de muestra de las diferentes concentraciones del antimicrobiano (20 μL) en cada cuadrante como muestra en la figura 14:

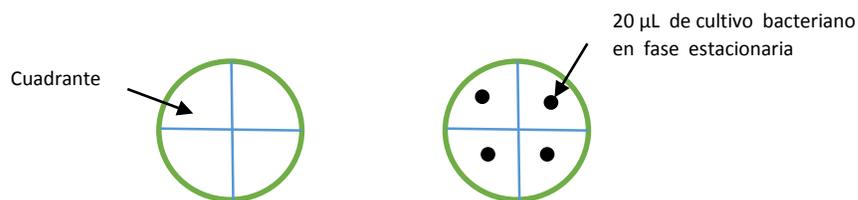


Figura 14. Esquema de siembra por el método de gota

5.- El antimicrobiano actuó en el sitio donde se colocó la muestra.

6.- Transcurridas 24 horas de incubación a 37° C se realizó la lectura observando si existía inhibición o no en el lugar donde se puso la muestra.

2.2.1 Prueba de inhibición “*in vitro*” de crecimiento de *Salmonella spp.* con diferentes concentraciones del antimicrobiano.

- **Método de dilución en tubo.**

Se evaluó el antimicrobiano como lo indica la norma NMX-bb-040-SCFI-1990 (modificando su tiempo de exposición con la bacteria a 30 min.).

Nota: El procedimiento para preparar los reactivos utilizados se incluyen en el anexo 2.

1.- Se prepararon soluciones del antimicrobiano a concentraciones de 200, 400, 600, 800 y 1000 ppm.

2.- Se tomaron 4.5 mL de la solución a cada concentración del antimicrobiano y se vaciaron en 15 tubos de vidrio con rosca.

2.- Se preparó la solución neutralizante diluida (metodología en el anexo 1) y se vaciaron 4.5 mL de la solución en 15 tubos con rosca y posteriormente se esterilizó a 121°C por 15 min.

3.- Del cultivo bacteriano previamente estandarizado en fase de crecimiento estacionario se tomaron 500 µL y se adicionaron a los tubos con la solución del antimicrobiano (a cada concentración propuesta) y se dejó actuar por un intervalo de 30 min.

4.- Transcurrido el tiempo de contacto se tomaron 500 µL de cada solución antimicrobiana con la bacteria inoculada y se vertieron en un tubo con 4.5 mL del neutralizante y se realizaron 3 diluciones de cada muestra.

5.- Posteriormente se tomó 1 mL de cada muestra y se sembró en profundidad en agar cuenta estándar con neutralizante, se homogeneizó, se dejó solidificar y se incubó a 37°C por 24 h.

7.- Se llevó a cabo la lectura mediante turbidez (asociadas a crecimiento bacteriano) o claridad (ausencia de bacterias) de las cajas previamente inoculadas.

En la figura 15 se muestra de forma esquemática la metodología empleada para la prueba de inhibición *in vitro* según lo reportado en la norma NMX-bb-040-SCFI-1990 .

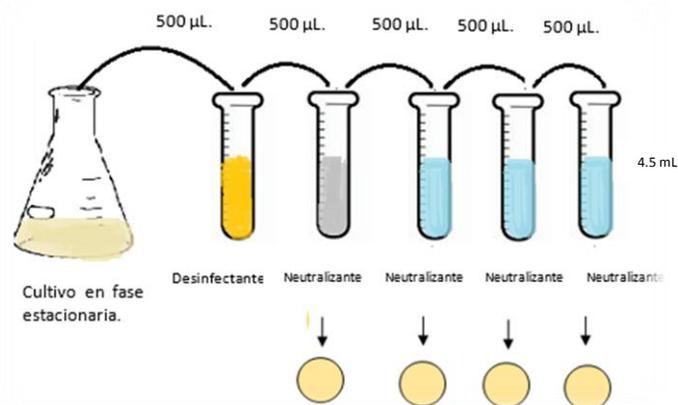


Figura 15. Metodología empleada para prueba de inhibición “*in vitro*”

2.2.2 Confirmación de la actividad bactericida/bacteriostática del antimicrobiano

Se llevó a cabo mediante la inoculación aséptica de las diluciones donde no se observó crecimiento bacteriano en las cajas con agar cuenta estándar previamente inoculadas (Cano, 2013).

- 1.- De las diluciones donde no se percibió crecimiento microbiano se tomaron 500 µL y se sembraron en tubos con 4.5 mL de BHI .
- 2.- Los tubos se incubaron por 8 días a 37° C.
- 3.- La confirmación del efecto bactericida o bacteriostático se observó por la presencia o ausencia del microorganismo mediante turbidez del tubo de BHI.
- 4.- Para corroborar la ausencia del microorganismo a su vez se sembraron por el método de gota en 4 cuadrantes 20 µL de la muestra en agar Mac Conkey y se incubaron las cajas por 24h a 37°C.

2.2.3 Toxicidad del neutralizante para la bacteria *Salmonella spp.*

Diversos inhibidores químicos de antimicrobianos son tóxicos por sí mismos. Este factor se estimó mediante una comparación entre dos poblaciones bacterianas, una expuesta al antimicrobiano y otra respuesta al neutralizante (Marín *et al.*, 2008).

- 1.- Se adicionaron 500 µL de la bacteria en fase estacionaria en 4.5 mL del antimicrobiano diluido a la concentración deseada en agua destilada, se dejó actuar por 30 min. y posteriormente se sembró 1 mL de la solución en agar cuenta estándar, se incubó a 37°C por 24-48 h.

2.- Por otro lado se sembraron 500 μ L del cultivo bacteriano en fase estacionaria en 4.5 mL de neutralizante diluido, se mantuvo en contacto 30 min. seguidamente se tomó 1 mL de la muestra y se sembró en agar cuenta estándar sin neutralizante incubando a 37°C por 24-48 h.

3.- La toxicidad del neutralizante se confirmó mediante la ausencia del microorganismo.

Nota: En esta prueba se tomaron dos controles (cuadro 12) uno positivo (presencia de *Salmonella spp.*) y uno negativo (ausencia de *salmonella spp.*), para tener un patrón de comparación y conocer si el neutralizante empleado es tóxico para la bacteria.

Cuadro 12. Siembra de *Salmonella spp.* en agar cuenta estándar para la prueba de toxicidad del neutralizante.

Muestras	Siembra
Control positivo	<i>Salmonella spp</i>
Control negativo	Desinfectante + <i>Salmonella spp</i>
Muestra de estudio	Neutralizante + <i>Salmonella spp</i>

2.3 Desarrollo de recubrimientos y películas antimicrobianas

2.3.1 Elaboración de bastidores

Se elaboraron bastidores de acrílico que permitieron la formación de películas antimicrobianas con un área de 50 cm con dimensiones de 10x5 cm como base se adaptó una placa de acetato para facilitar el desprendimiento de las películas como muestra la figura 16:



Figura 16. Bastidor elaborado para el preformado de las películas antimicrobianas

2.3.2 Elaboración de recubrimientos antimicrobianos

Se realizaron distintas formulaciones para la elaboración del recubrimiento antimicrobiano utilizando diferentes polímeros que permitieran una buena fijación al fruto con tres formulaciones tentativas:

Cuadro 13. Formulación 1 a base de alginato de sodio con antimicrobiano (8000, 9000, 10 000 ppm)

Componentes	Cantidad
Alginato de sodio	2%
Glicerol	1.5%
Desinfectante natural (Bioxitral)	8000,9000,10 000 ppm
Solución de CaCl ₂ *	2%

(Vera, 2014).

*Baño de CaCl₂ incorporado una vez recubierto el fruto con la solución de alginato.

Cuadro 14. Formulación 2 a base de pectina y cera de candelilla con antimicrobiano (7000, 8000, 9000 ppm)

Componentes	Cantidad
Pectina	3%
Glicerol	1.5%
Antimicrobiano natural (Bioxitral)	7000,8000,9000 ppm
Cera de candelilla	1.5%
Azúcar	1%

(Maftoonazad & Ramaswamy, 2008)

Cuadro 15. Formulación 3 a base de almidón de maíz con antimicrobiano (7000 ppm)

Componentes	Cantidad
Almidón de maíz	3%
Glicerol	1.25%
Antimicrobiano natural (Bioxitral [®])	7000 ppm

(Aguilar et. al, 2008)

***Nota:** Las concentraciones del antimicrobiano aplicadas a las formulaciones se eligieron en base a pruebas microbiológicas (“*in vitro*”) previas.

Se eligieron distintos polímeros para la elaboración de los recubrimientos, cada formulación se realizó siguiendo un proceso de elaboración diferente:

Elaboración del recubrimiento 1 con alginato de sodio:

- 1.- Se prepararon soluciones del antimicrobiano a concentraciones de 8000, 9000 y 10 000 ppm.
- 2.- En la solución del antimicrobiano se agregaron 2 g de alginato de sodio y homogeneizó con ayuda de un agitador magnético.
- 3.- Se dispersó hasta que la disolución se observó completamente homogénea sin ningún sólido suspendido, posteriormente se agregó el glicerol.
- 4.- Se dejó reposar la dispersión en un recipiente tapado por un periodo de 24 horas para eliminar el aire incorporado en la operación de agitación y homogenización.

Nota: El baño de CaCl_2 fue utilizado para el preformado de la película sobre los bastidores y fue incorporado una vez recubierto el fruto con la solución de alginato.

Elaboración de formulación 2 a base de pectina:

- 1.- En 100 mL de agua destilada se preparó la solución del antimicrobiano a concentraciones de 7000, 8000 y 9000 ppm.
- 2.- En una parrilla con agitación la solución preparada del antimicrobiano se calentó a 60°C.
- 3.- Se agregó 1% de azúcar y se disolvió con ayuda de un agitador magnético durante 15 min manteniendo la solución a 60 °C.
- 4.- Posteriormente se agregó el 3% de pectina a la solución y se dispersó hasta que la solución se observó completamente homogénea sin grumos.
- 5.- Posteriormente se agregó 1.5 % de glicerol y se homogenizó por completo.
- 6.- Finalmente se incorporó 1.5 % de cera de candelilla previamente derretida a la solución de pectina.

Elaboración de formulación 3 a base de almidón:

- 1.- En 100 mL de agua destilada se prepararon soluciones con el antimicrobiano a concentración de 7000 ppm.
- 2.- En una parrilla con agitación la solución preparada del antimicrobiano se calentó a 90°C, se agregó 3% de almidón de maíz y se agitó por 30 min.
- 3.- Posteriormente se dejó enfriar la solución a 60 °C y se agregó el 1% de gnetina a la solución y se agitó durante 15 min.
- 4.- Posteriormente se agregó el glicerol y se agitó por 5 min.
- 5.- La solución del recubrimiento se dejó reposar por 1 día para eliminar el aire incorporado en la operación de agitación y homogeneización.

***Nota:** Para asegurar que los recubrimientos presentaban una buena aplicación al aguacate, cada solución de los recubrimientos elaborados se empleó para recubrir un aguacate (muestra) antes de realizar las pruebas subsecuentes; se obtuvo que el recubrimiento elaborado a base de almidón de maíz no presentaba buena aplicación al fruto ya que se escurría por completo al momento de aplicarlo, por tal motivo este recubrimiento se descartó y sólo se evaluaron los recubrimientos de pectina y alginato.

2.3.4 Pruebas de inhibición “*in vitro*” de los recubrimientos

Con el fin de evaluar la efectividad antimicrobiana de los recubrimiento frente a *Salmonella spp.* se efectuaron pruebas de inhibición “*in vitro*” en caja y tubo siguiendo la norma NMX-bb-040-SCFI-1990.

2.3.4.1 Pruebas de inhibición “*in vitro*” en caja

Una vez formado el recubrimiento antimicrobiano se procedió a evaluar el efecto antimicrobiano de cada uno de los recubrimientos elaborados.

- 1.- Se tomaron 100 µL del cultivo de *Salmonella spp.* en fase de crecimiento estacionaria y se sembró por estría masiva llenando por completo la superficie de la caja del cultivo en agar Biotriptasa.

- 2.- Se dejó secar por 1 h. la caja ya sembrada y se colocaron 20 μL de muestra de recubrimiento con antimicrobiano a la concentración deseada en cada cuadrante de la caja sembrada con *Salmonella spp.*
- 3.- Se incubaron las cajas de forma invertida en una estufa bacteriológica a 37°C por 24 h.
- 5.- Transcurridas 24 horas de incubación se realizó la lectura, dando positivo si el lugar donde se puso la muestra se observaba rodeado por una zona de inhibición.

2.3.4.2 Pruebas de inhibición “in vitro” por el método de dilución en tubo

- 1.- Se tomaron 4.5 mL de cada recubrimiento antimicrobiano (estéril) y se vaciaron en tubos de vidrio con rosca.
- 2.- Se preparó la solución neutralizante diluida y se vaciaron 4.5 mL de la solución en tubos con rosca y posteriormente se esterilizó a 121°C por 15 min.
- 3.- Del cultivo bacteriano previamente estandarizado en fase de crecimiento estacionario se tomaron 500 μL y se adicionó en cada tubo con 4.5 mL del recubrimiento a cada concentración propuesta y se dejó actuar por un intervalo de 30 min.
- 4.- Transcurrido el tiempo de contacto se tomaron 500 μL del recubrimiento antimicrobiano con la bacteria inoculada y se vertieron en un tubo con 4.5 mL del neutralizante, y se realizaron 3 diluciones de cada muestra.
- 5.- Posteriormente se tomó 1 mL de cada muestra y se sembró en profundidad en agar cuenta estándar con neutralizante.
- 6.- Se incubó a 37°C por 24 h.
- 7.- Se observó la ausencia o presencia en las cajas sembradas

***Nota:** El procedimiento para la preparación de los reactivos se incluye en el anexo2.

2.3.5 Caracterización fisicoquímica de los recubrimientos

Para las pruebas fisicoquímicas se prepararon las muestras de los recubrimientos como se indicó anteriormente (apartado 2.3.2) y posteriormente se llevó a cabo el preformado de las películas.

- **Preformado de la película de alginato**

Se esparció homogéneamente 20 mL de la muestra en el bastidor previamente elaborado.

Posteriormente se sumergió el bastidor con la muestra en un baño de cloruro de calcio al 2% durante 5 minutos.

Se escurrió el bastidor y se dejó secar la muestra por un periodo de 2 días a 25 °C en un lugar libre de contaminación y polvo.

- **Preformado de la película de Pectina**

Se dejó enfriar la solución y se esparcieron homogéneamente 20 mL de la muestra en un bastidor previamente elaborado.

Se dejó secar la muestra por un periodo de 2 días a temperatura ambiente en un lugar libre de contaminación y polvo.

***Nota:** Para el secado de la muestra se eligió una superficie totalmente plana sin inclinación para evitar variaciones en el espesor de la película.

Una vez que transcurrió el tiempo de secado de la película se desmoldó con ayuda de unas pinzas de punta y guantes de latex (para no alterar el resultado de pruebas posteriores).

Las películas se almacenaron en bolsas de plástico con cierre hermético para evitar variaciones atribuidas con la humedad y temperatura del ambiente, se guardaron en un lugar fresco y seco hasta su uso.

2.3.5.1 Propiedades de barrera

- **Permeabilidad al agua**

Una gota depositada sobre la superficie de un sólido, pone de manifiesto la humectabilidad de dicha superficie. El análisis de su forma permite determinar magnitudes como el ángulo de contacto.

El ángulo de contacto, está definido como el ángulo que forman las interfaces sólido- líquido y líquido-vapor que exhibiría el líquido al mojar un punto de la superficie en el punto cualquiera de la línea de intersección de las interfaces de un sistema sólido-líquido-vapor.

Con ello el ángulo de contacto puede variar a lo largo de la línea de contacto, si la superficie presenta heterogeneidades (*Gea, 2006*).

La permeabilidad al agua de la película se midió por medio de un equipo (TANTEC, Contact Angle Meter, figura 17) que mide el ángulo de contacto de una gota de agua en la superficie de la película.



Figura 17. Equipo TANTEC, Contact Angle Meter.

- **Preparación de la muestra:**

La película formada se dividió en tres partes y se tomaron muestras de aproximadamente 3X3 cm de los dos extremos y del centro de la película como muestra la figura 18.

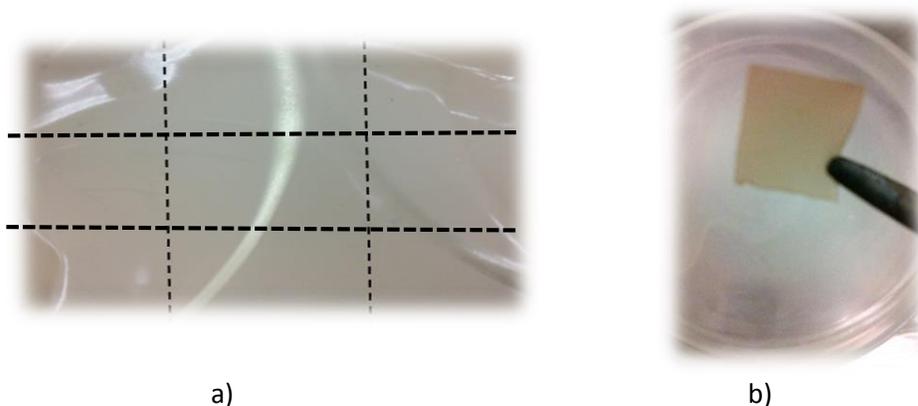


Figura 18. Preparación de la muestra para la prueba de ángulo de contacto: a) división de la película en segmentos para la toma de muestra; b) cuadros de 3x3 cm.

- 1.- Se colocó la muestra en el centro de la charola del equipo y se fijó con las pinzas que se encuentran en la parte de los extremos cuidando de que la superficie de la película se encuentre totalmente plana para evitar alteraciones en la medición (figura 19).
- 2.- Se vertió 1 mL de agua destilada en la jeringa del equipo previamente desmontada.
- 3.-Se conectó y prendió el equipo.
- 4.- Se verificó que la superficie de la muestra se encontrara totalmente paralela a la escala de medición que indica ausencia de ángulo (0°).

5.- Se giró el perno del depósito donde se encontraba la jeringa para dejar caer la gota de agua a la muestra.

6.- Se reportaron los resultados obtenidos mediante la medición del ángulo que formaba cada gota (figura 20).

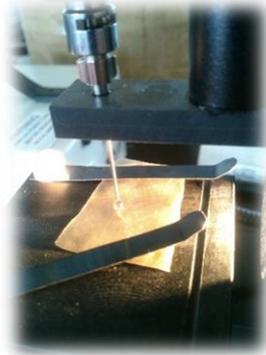


Figura 19. Evaluación de la película



Figura 20. Medidor del ángulo de contacto que se forma en la película

2.3.5.2 Propiedades térmicas

- **Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Esta técnica mide las variaciones energéticas asociadas a los cambios químicos, proporcionando flujo de calor aportado a una muestra y una sustancia de referencia en función de la temperatura de la muestra estando las dos sometidas a un programa de temperatura controlado (*Jaramillo, 2014; Crescencio, 2015*).

Se utilizó un Calorímetro TA-INSTRUMENTS (Figura 21).



Figura 21. Calorímetro TA-INSTRUMENTS

- 1.- Se conectó y prendió el equipo
- 2.- Se programó en el equipo el intervalo de temperatura al que se efectuó la prueba, las muestras se calentaron de 30°C a 150°C, con excepción del alginato y la pectina los cuales se programaron a un intervalo mayor (30 a 200°C); el calentamiento se efectuó a una velocidad de calentamiento de 10°C/min.
- 3.- Se dispuso de dos cápsulas, en una de ellas se adicionaron 3-5 mg de muestra, la otra cápsula que fue la de referencia permaneció vacía como indica la figura 22.

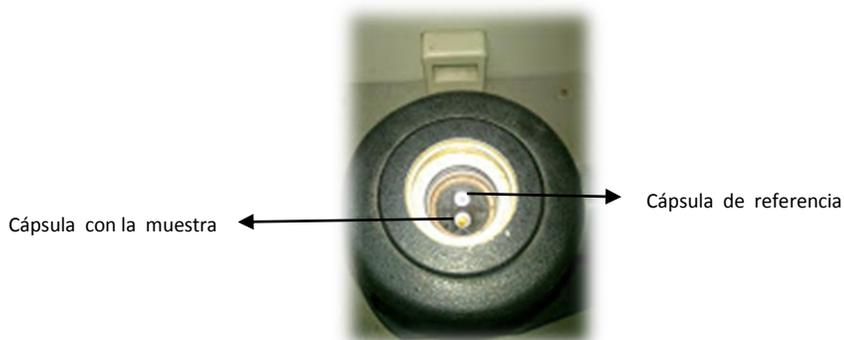


Figura 22. Representación de la ubicación de las cápsulas en la sección interna.

- 4.- Inicialmente la celda de referencia y la muestra se encontraban equilibradas a la temperatura inicial (30°C) después se sometieron a calentamiento hasta llegar a la temperatura máxima programada (150-200°C).
- 5.- Una vez que el equipo calienta la muestra a la temperatura máxima la temperatura desciende hasta la temperatura inicial.

6.- 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 23).

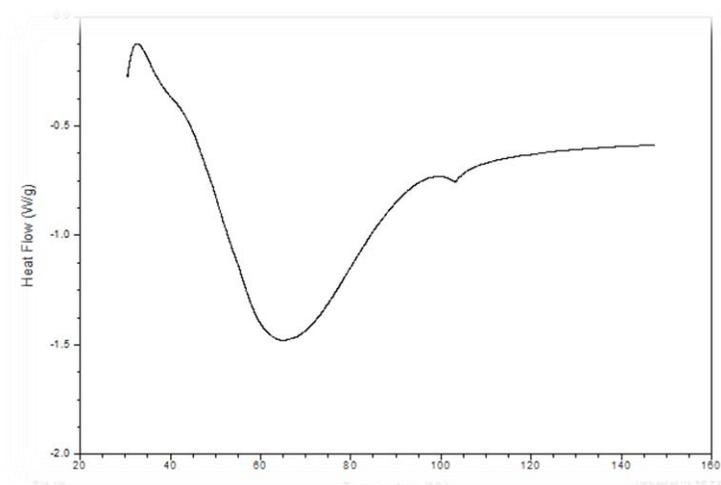


Figura 23. Representación gráfica de un análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC).

2.4 Recubrimientos aplicados a aguacate *Hass*.

2.4.1 Selección de la materia prima

Los aguacates variedad *Hass* fueron adquiridos en el mercado municipal de Cuautitlán Estado de México, dichos frutos provenían del estado de Michoacán.

Fueron seleccionados de acuerdo a su estado de madurez de consumo (figura 24, muy firme al tacto, “no maduro”), considerando para su elección las siguientes características según la norma NMX-FF-016-SCFI-2006:

- Deben estar limpios; prácticamente exentos de cualquier material extraño visible.
- Estar prácticamente exentos de cualquier olor y/o sabor extraño.
- Uniformidad en Color, tamaño y forma.
- Estar sanos; exentos de podredumbre o deterioro, que les permita ser aptos para el consumo.



Fruticultivo, 2014

Figura 24. Etapas de maduración de aguacate

Una vez seleccionados los aguacates se llevó a cabo el lavado, desinfección e inactivación de cloro de la siguiente manera (figura 25):

- Se lavaron los aguacates con jabón líquido y con una fibra lava trastes por tres ocasiones.
- Se enjuagó con agua de grifo.
- Se cepillaron exhaustivamente con jabón todos los frutos con el fin de eliminar todo rastro de suciedad.
- Se enjuagó nuevamente
- Se escurrieron los aguacates limpios.
- Se preparó una solución de cloro al 3% (*Estrella, 2012*).
- Se sumergieron los aguacates previamente lavados y escurridos en la solución de cloro por 15 minutos.
- Una vez desinfectados los aguacates se escurrieron en una tina de plástico.
- Cada aguacate fue enjuagado en varias ocasiones con agua destilada estéril para eliminar los residuos de cloro utilizando guantes para evitar contaminación.
- Se preparó una solución de Tiosulfato de sodio al 0.1% para inactivar el cloro que pudiera quedar presente en los frutos.
- Se enjuagaron nuevamente los frutos con agua destilada estéril.

- Se dejaron secar los aguacates para ser recubiertos posteriormente.

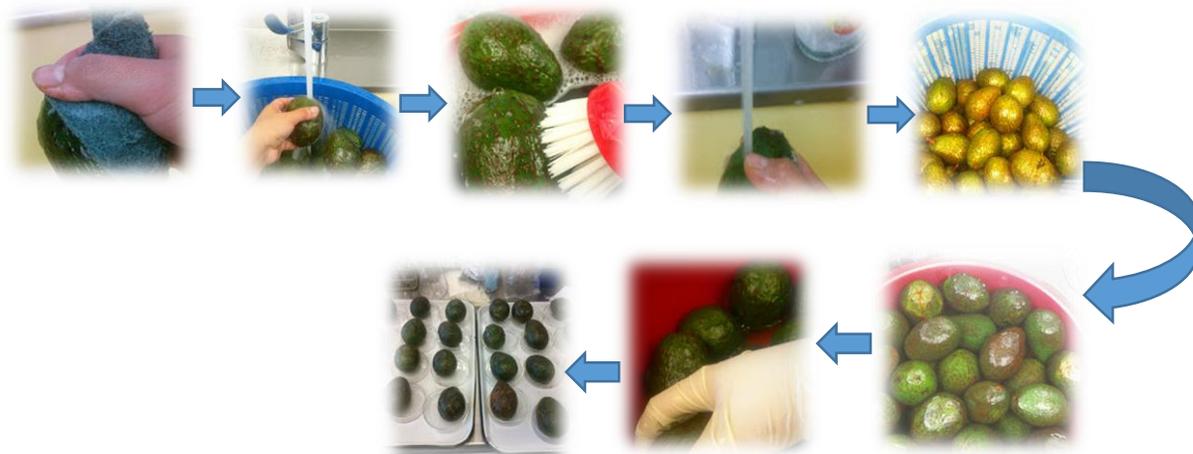


Figura 25. Desinfección de frutos.

2.4.4 Recubrimiento de aguacates por inmersión

- **Prueba para descartar la migración del recubrimiento al interior del fruto.**

Con el fin de asegurar que el recubrimiento no migrara al interior del aguacate se realizó una prueba previa que consistió en cortar un segmento (10X 10 cm.) de la cáscara de aguacate, se limpió la cáscara a modo de que no quedaran residuos de pulpa de aguacate, posteriormente se adicionaron 200 μ L de colorante azul de bromotimol en la superficie de la cáscara, se colocó un segmento de papel filtro blanco en el lado opuesto de la cáscara al cual se colocó el colorante, se dejó reposar 30 min. y se observó la presencia o ausencia de colorante en el papel filtro blanco.

Posteriormente se lavaron y desinfectaron 49 aguacates, se dividieron en 7 lotes de 6 aguacates, los cuales fueron recubiertos de la siguiente manera: 3 aguacates de cada lote con recubrimiento de pectina y tres aguacates de cada lote con recubrimiento de alginato, los 7 aguacates restantes se tomaron como control (sin recubrimiento) para observar los cambios físicos en el aguacate durante los días de muestreo.

Cabe mencionar que con el fin de descartar que existiera inhibición de la bacteria en estudio sobre la superficie de los aguacates después de la desinfección (en el caso de existir residuos

de cloro), se sembraron 500 μ L de *Salmonella spp.* en un aguacate y posteriormente se realizó un lavado con solución salina fisiológica dentro de una bolsa zip lock[®], se tomó 1 mL de la solución de lavado con la bacteria y se sembró en 4.5 mL de BHI, se incubó a 37°C por 24 h. Con el fin de corroborar que no estaba presente la bacteria de estudio (*Salmonella spp.*) en los aguacates desinfectados (si es que había bacterias aún después de la desinfección) utilizados para la experimentación, se realizó un muestreo de cada aguacate de la siguiente manera (figura 26):

Cada aguacate se frotó vigorosamente durante 3 min. en una bolsa con cierre hermético (estéril) con 30 mL de SSF al 0.85% posteriormente se sembró 1 mL de cada muestra (SSF utilizada para el lavado) en tubos con 4.5 mL de BHI, los tubos con la muestra se incubaron a 37°C por 24h, se dio lectura reportando la ausencia o presencia de *Salmonella spp.*



Figura 26. Prueba para descartar presencia de *Salmonella spp.* en aguacates desinfectados

Se tomó cada aguacate (previamente desinfectado) con unos guantes de latex para evitar contaminación, se recubrieron los frutos como se explica en el siguiente apartado.

- **Recubrimiento de alginato de sodio**

21 aguacates se sumergieron en la solución de alginato de sodio (preparado de acuerdo a lo descrito en el apartado 2.3.2), se escurrió el exceso de solución y posteriormente se sumergieron los aguacates en una solución de CaCl_2 por 5 minutos y finalmente se dejaron escurrir para posteriormente almacenarlos a 17°C (figura 27 y 28).

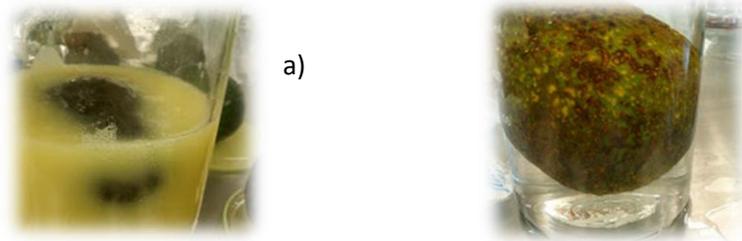


Figura 27. a) Recubrimiento de alginato de sodio; b) baño de CaCl_2 al 2%



Figura 28. Aguacate recubierto con solución de alginato de sodio

- **Recubrimiento de Pectina.**

Los aguacates se sumergieron en la solución del recubrimiento de pectina durante 5 minutos, posteriormente se escurrieron los aguacates y se dejaron secar por 1 hora a temperatura ambiente.



Figura 29. Aguacate recubierto con solución de pectina

- **Almacenamiento de los frutos recubiertos**

Todas las muestras fueron almacenadas durante 14 días a una temperatura de $17\text{ }^{\circ}\text{C}$, en el laboratorio de Bacteriología, en FES Cuautitlán (figura30).



Figura 30. Almacenamiento de frutos recubiertos

Posteriormente se realizaron pruebas de inhibición “*in vivo*” de los aguacates recubiertos con alginato y pectina, en los días 0, 3, 5, 7, 9, 12 y 14.

2.4.5 Pruebas de inhibición “*in vivo*” en el aguacate

Para las pruebas de inhibición “*in vivo*” en el aguacate se utilizó un cultivo bacteriano en fase estacionaria a una concentración de 10^5 UFC.

1.- En cada aguacate se hizo un corte de 5X5 (figura 31) para desprender la cáscara del aguacate recubierto, se tomaron 3 aguacates por cada día de muestreo; el muestreo se realizó en diferentes días de almacenamiento: 0, 3, 5, 7, 9, 12 y 14.



Figura 31. Corte representativo para la evaluación del recubrimiento

Como control se utilizaron 7 aguacates sin recubrir, uno para cada día de muestreo, esto con el fin de comparar los cambios físicos del fruto sin recubrir y recubierto a lo largo de la experimentación.

2.- Después de realizar el corte en la cáscara de aguacate, se inoculó el fragmento de cáscara con 500 μ L de cultivo bacteriano en fase estacionaria, el efecto del recubrimiento se evaluó 1 hora después de la inoculación de la bacteria.



Figura 32. Cáscara de aguacate inoculada con *Salmonella* spp.

3.- Cada muestra fue colocada en bolsas con cierre hermético con 20 mL de SSF al 0.85%, la bolsa fue sellada y frotada vigorosamente durante 2 minutos.



Figura 33. Frotación de la muestra inoculada

4.- Se tomó una alícuota de la solución anterior y se sembró 1 mL en 4.5 mL de BHI



Figura 34. Toma de muestra para evaluación del recubrimiento

5.- Los tubos se incubaron a 37 °C durante 8 días para evaluar la capacidad bactericida del recubrimiento sobre el aguacate

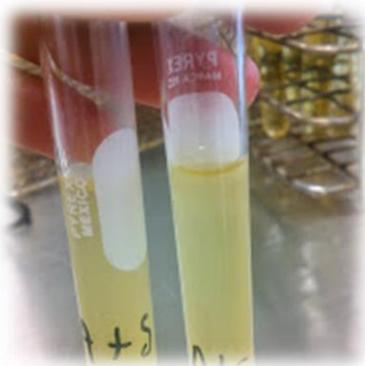


Figura 35. Tubos sembrados con la muestra del recubrimiento y *Salmonella spp.*

6.- Transcurridos los 8 días de la incubación se sembró por el método de gota 20 μ L en agar Mac Conkey para corroborar la ausencia de *Salmonella spp.* en la muestra.

Nota: Con el fin de asegurar que los compuestos presentes en la pulpa del aguacate no alteraran o interfirieran en la evaluación de los recubrimientos antimicrobianos (en el caso de que pudiera estar presente sustancia antimicrobiana en la pulpa de aguacate) se realizó el procedimiento anterior solo que en el segmento de la cáscara no se empleó ningún recubrimiento.

2.4.6 Análisis estadístico

Los experimentos se hicieron por triplicado para obtener un análisis estadístico confiable y representativo; para conocer si había diferencia significativa entre tratamientos se aplicó un ANOVA con un nivel de significancia de 0.05. Se realizó este análisis por medio del programa estadístico Minitab® 17.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Determinación de fase estacionaria de *Salmonella spp.*

3.1.1 Curva de crecimiento microbiano

La curva de crecimiento microbiano se determinó mediante conteo microbiano (método directo) y por turbidimetría (método indirecto) con un espectrofotómetro, reportando la absorbancia medida de cada muestra a 590 nm de longitud de onda.

Los resultados obtenidos se reportan en el cuadro 16:

Cuadro 16. Resultados obtenidos por conteo microbiano y por espectrofotometría

Conteo microbiano		Espectrofotómetro
Tiempo (h)	No. Bacterias (log)	Absorbancia
0	1.17	0.048
2	4.8	0.057
4	5.6	0.059
6	6.22	0.083
7	7.6	0.23
8	8.3	1.001
9	8.55	1.129
9.5	8.56	1.151
10	8.53	1.174

Se realizó un análisis de varianza ANOVA con nivel de significancia de 0.05 lo cual indica que existe diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en los valores reportados de crecimiento microbiano. En la tabla 16 se observa que las bacterias presentes en el cultivo aumenta significativamente del tiempo 0 al 7, a partir del tiempo 8 se observa un crecimiento desacelerado de las células bacterianas, posiblemente en ese periodo las bacterias entran en fase estacionaria, lo que significa que la acumulación de los productos de desecho generado por las bacterias

presentaron cambios en el pH del medio lo que induce a la muerte celular de algunas bacterias, otra razón que podría perjudicar la reproducción bacteriana es que el crecimiento de las poblaciones está limitado por el agotamiento de algunos nutrientes importantes presentes en el medio de cultivo o por la acumulación de compuestos tóxicos del metabolismo y como consecuencia la velocidad de crecimiento disminuye, el número de bacterias viables y el número de bacterias inactivadas se equilibra (Stanier et al., 2005; Romero, 2007).

A partir del tiempo 10 la cantidad de células viables reportadas en el conteo microbiológico fue disminuyendo, lo cual podría significar que las células restantes se situaban en la fase de declinación o muerte.

En cuanto a los datos reportados de absorbancia (cuadro 16) se observa una tendencia diferente en comparación con el conteo microbiano, ya que el aumento en la absorbancia no se mostró acelerado si no que la densidad óptica de las muestras fue aumentando paulatinamente.

Por otro lado en la figura 36 se observa que en el punto que corresponde al tiempo 0 existe crecimiento microbiano debido a la concentración inicial bacteriana empleada para estandarizar esta parte de la experimentación, además se observa aprecia que la fase de crecimiento exponencial termina a las 8 horas de incubación e inmediatamente las bacterias entran a fase de crecimiento estacionario en la cual la tasa de crecimiento disminuye y el número de muertes microbianas compensa el de células nuevas y la población se estabiliza (segmento de curva constante con respecto al aumento de población bacteriana), la actividad metabólica de las bacterias que sobreviven también se torna más lenta en fase estacionaria. La fase de muerte se inicia a las 10 horas de incubación esta parte no se pudo visualizar de una mejor manera por falta de datos experimentales.

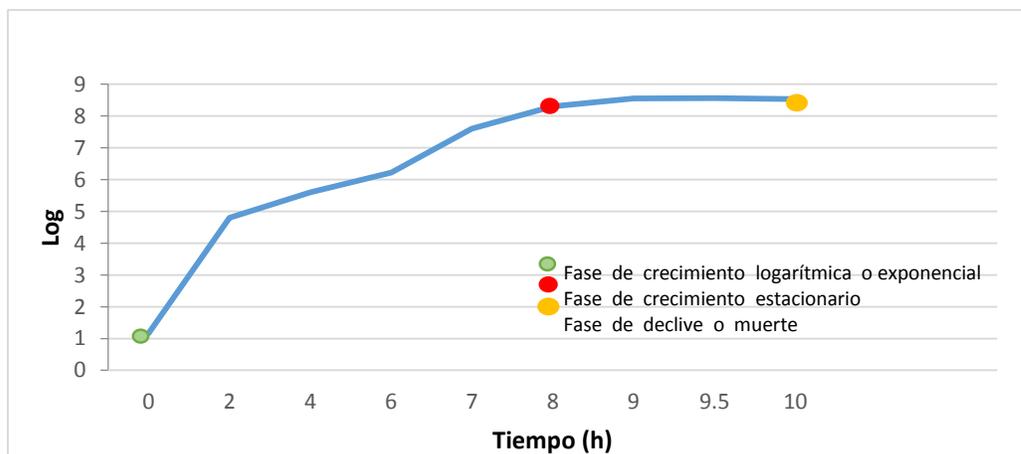


Figura 36. Curva de crecimiento bacteriano en función del tiempo.

En la figura 37 se visualiza claramente que la etapa lag según los datos obtenidos de absorbancia, dura 4 horas, lo cual es demasiado el tiempo en comparación con los datos obtenidos por conteo microbiano, esto posiblemente se debe a que en la técnica empleada mide la densidad óptica de las muestras. Para que puedan visualizarse las primeras trazas de turbidez debe haber más de un millón de células por mililitro y se precisan de 10 a 100 millones por mililitro para que la suspensión se vuelva lo bastante turbia como para ser detectada en un espectrofotómetro (Tortora et al., 2007).

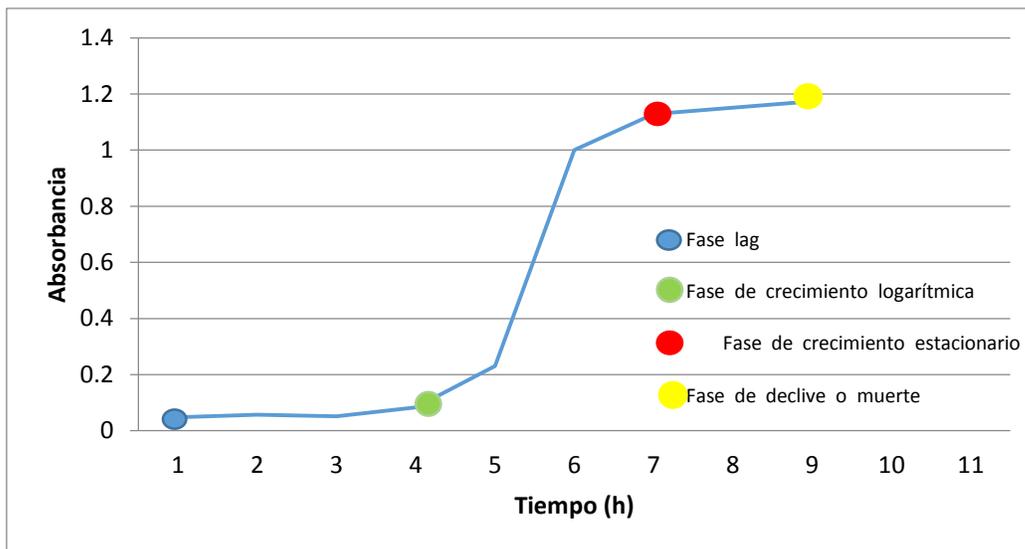


Figura 37. Curva de crecimiento bacteriano con respecto a la medición de la absorbancia.

Con los datos obtenidos se estableció que la fase de crecimiento estacionario se alcanzó a las 8 horas de incubación en medio de cultivo BHI, manteniéndolo en baño maría a 37°C con agitación (80 rpm), con los datos obtenidos en esta prueba, se estandarizó este método para ser empleado a lo largo de la experimentación en la preparación de las cepas bacterianas para las pruebas subsecuentes.

3.2 Pruebas de inhibición “*in vitro*”.

3.2.1 Prueba de inhibición cualitativa “*in vitro*” por el método de difusión en caja

El bioxital líquido (antimicrobiano empleado en este proyecto) es un producto natural complejo compuesto de derivados de cítricos utilizado como efectivo agente antimicrobiano (bacteriostático y bactericida) y antioxidante.

La acción antimicrobiana y antioxidante del producto resulta del efecto sinérgico de los bioflavonoides y ácidos orgánicos presentes en el producto. Los resultados de su efectividad como agente bacteriostático y bactericida representan gran utilidad en una amplia gama de usos en donde se requiere un efectivo control de crecimiento microbiano (*Mani et al., 2012*).

Los resultados de la inhibición de diferentes concentraciones del antimicrobiano (Bioxitral®) sobre *Salmonella spp.* después de 24 horas de incubación a 37°C se muestran en las siguientes imágenes:

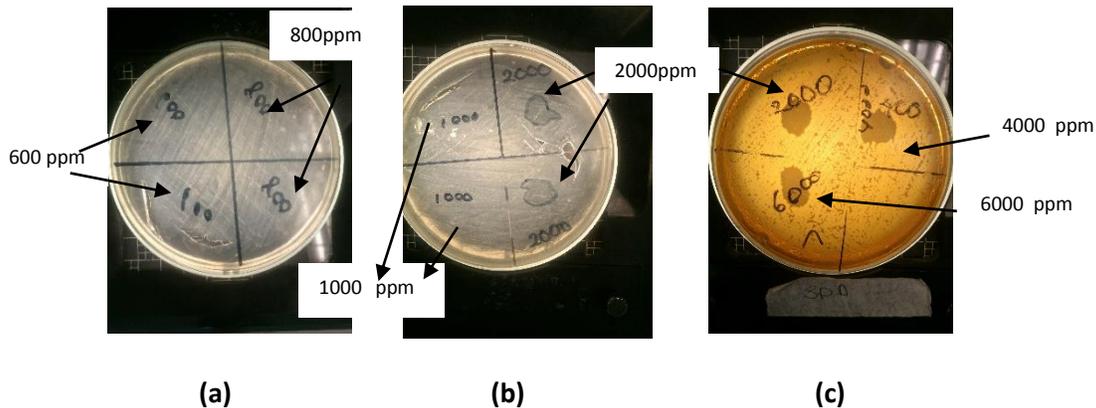


Figura 38. Prueba de inhibición en caja a diferentes concentraciones de antimicrobiano: a) 600, 800 ppm, b) 1000, 2000 ppm, c) 2000, 4000, 6000 ppm.

La concentración de 2000 ppm fue la concentración mínima inhibitoria reportada por este método, sin embargo las imágenes muestran una clara inhibición de la bacteria en el sitio de contacto del antimicrobiano a concentraciones de 2000, 4000 y 6000 ppm, por otro lado a concentraciones de 600, 800 y 1000 ppm no se presentó inhibición alguna.

3.2.2 Prueba de inhibición por el método de dilución en tubo

Debido a que los resultados obtenidos en la prueba de inhibición en caja fueron muy diferentes comparados con los reportados bibliográficamente por *Elmi, 2014* quien evaluó el mismo antimicrobiano, se realizaron pruebas de inhibición por el método de tubo siguiendo la norma NMX-bb-040-SCFI-1990 concentraciones de 200, 400, 600, 800, 2000.

Los resultados de la prueba efectuada al antimicrobiano por el método de dilución en tubo a diferentes concentraciones se muestran en el cuadro 17:

Cuadro 17. Efecto inhibitorio del desinfectante frente a *Salmonella* spp.

Concentración del antimicrobiano(ppm)	Efecto inhibitorio	Imagen	pH de la solución
200	No se presenta inhibición		5.03
400	Inhibición		4.39
600	Inhibición		4.27
800	Inhibición		4.12
1000	Inhibición		4.04
2000	Inhibición		3

En las imágenes se observa que a una concentración de 200 ppm del antimicrobiano diluido en agua destilada no presenta inhibición de la cepa *Salmonella spp* esto posiblemente se debe a que la concentración del antimicrobiano es muy baja y las moléculas de los ácidos orgánicos presentes en el antimicrobiano se encuentran disociadas en el medio extracelular (agua), lo cual quiere decir que no hay suficientes moléculas disponibles del antimicrobiano para causar daño a la célula bacteriana (Tortora, 2007; Shiva, 2007).

Los ácidos débiles como los ácidos orgánicos pueden estar no disociados y por lo tanto es posible que no contribuyan directamente a la disminución del pH del medio, excepto en soluciones en las cuales el valor de la constante de disociación (pKa) de los ácidos orgánicos definida como el valor de pH en el que la concentración del ácido (no disociado) es igual a la concentración del anión (A⁻) del ácido disociado, este hecho repercute directamente en la eficiencia del antimicrobiano, ya que a valores de pH superiores al valor de pKa de los ácidos cualquier acción microbiana es débil debido a la disociación de los ácidos en la solución extracelular.

La forma no ionizada (protonada) de un ácido débil es más permeable a la membrana celular que a la forma ionizada, de este modo cuando el medio contiene ácidos orgánicos no disociados el efecto antimicrobiano se incrementará permitiendo que más ácidos orgánicos entren a la célula bacteriana (Lianou and Koutsoumanis, 2012).

Por otro lado a concentraciones de 400 a 2000 ppm se muestra una clara inhibición de la bacteria atribuible a la ausencia de turbidez en los tubos de BHI después de 24 h de incubación lo que indica que no hubo crecimiento de la bacteria después de ser expuesta al antimicrobiano.

Una vez estando en contacto la bacteria con la solución antimicrobiana las moléculas del antimicrobiano no disociadas en solución acuosa penetran la membrana citoplasmática bacteriana y se disocian en la porción acuosa del citoplasma (alrededor del 78%) lo cual causa la liberación y acumulación de iones cargados (es decir, los protones y los aniones) dentro de la célula afectando directamente al pH intracelular de la bacteria, lo cual altera el metabolismo bacteriano por lo que la bacteria aumenta sus niveles de Na⁺, K⁺ y/o glutamato para compensar el aumento de aniones de los ácidos, esto conlleva a un aumento de la fuerza iónica intracelular. Este mecanismo ejerce una presión mecánica sobre la pared del microorganismo que determina eventualmente que pueda estallar conllevando a la muerte celular (Skřivanová et al., 2011; Shiva, 2007).

El ácido cítrico además de actuar como un potenciador del efecto de otros agentes antibacterianos y fungir como agente permeabilizante de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, tiene la capacidad de secuestrar iones metálicos (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+}) del medio externo requerido para la homeostasis bacteriana lo cual da como resultado la inactivación bacteriana (*Lianou y Koutsoumanis, 2012*).

La quelación de metales por acción del ácido cítrico en algunos casos mejora la inhibición de patógenos en comparación con ácidos monocarboxílicos como el ácido láctico (*Mani, et al., 2012*).

Cabe mencionar que la razón por la cual se empleó menor concentración del antimicrobiano en la prueba de inhibición in vitro por el método de tubo que por el método de difusión en caja fue porque la superficie de contacto en el medio líquido (en la técnica de tubo) es mayor en comparación con la técnica de difusión en caja, además puede haber variaciones en la cantidad de inóculo sembrado en algunos segmentos en la caja de agar debido a una mala técnica de siembra.

Stella y Marín (2009) reportan que la ventaja de la técnica de dilución en tubo sobre los métodos de difusión en caja radica en un aumento de la sensibilidad microbiana para cantidades pequeñas del antimicrobiano de prueba, debido a mayor superficie de contacto, además la técnica de dilución en tubo permite diferenciar entre un efecto bactericida o bacteriostático.

3.2.3 Confirmación de la actividad bactericida/bacteriostática del antimicrobiano

Los resultados obtenidos en esta prueba indican que las concentraciones del antimicrobiano de 400 a 2000 ppm son suficientes como para causar daño irreversible a la célula bacteriana lo cual se explica de la siguiente manera:

El antimicrobiano entra en contacto con la superficie de la membrana celular del microorganismo lo que causa la ruptura de la pared celular, seguido de la penetración de la parte no disociada del antimicrobiano a través de la membrana citoplasmática alterando las funciones normales del microorganismo, así como en la perturbación metabólica resultante de su interferencia con las funciones específicas de la célula bacteriana (por ejemplo, la replicación, síntesis de proteínas), acidificación intracelular, daño de la membrana celular; lo que lleva a la muerte celular (*Lianou & Koutsoumanis, 2012*).

Los resultados obtenidos se reportan en el cuadro 18:

Cuadro 18. Efecto bactericida del antimicrobiano

Concentración De antimicrobiano (ppm)	Efecto inhibitorio después de 8 días de incubación a 37°C	Imagen
400	Bactericida	
600	Bactericida	
800	Bactericida	
1000	Bactericida	
2000	Bactericida	

3.2.4 Toxicidad del neutralizante para la bacteria *Salmonella spp.*

En la figura 39 a existió crecimiento bacteriano observándose turbidez en el medio (agar cuenta estándar) ya que la *Salmonella* solo estuvo en contacto con los nutrientes presentes en el medio de cultivo.

En la figura 39 b también se observa crecimiento bacteriano en presencia del neutralizante lo cual significa que el neutralizante no es tóxico por sí mismo para la bacteria en estudio, debido a que las sustancias que componen el neutralizante no inhibieron el crecimiento ni la reproducción del microorganismo.

La figura 39 c indica la ausencia de *Salmonella spp.* porque previamente la bacteria se puso en contacto con el antimicrobiano lo cual inhibió el desarrollo bacteriano.

Con lo anterior se deduce que el neutralizante utilizado para la prueba de inhibición in “*vitro*” resultó no ser tóxico para la bacteria ya que permitió ejercer la función principal del neutralizante que es inhibir el efecto antimicrobiano del desinfectante y no al microorganismo (Marín et al., 2008).

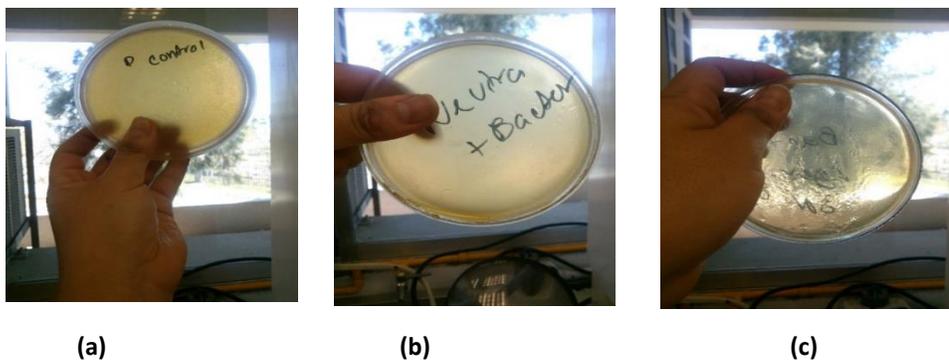


Figura 39. Prueba de toxicidad del neutralizante: (a) *Salmonella* spp., (b) Neutralizante con *Salmonella* spp., (c) Antimicrobiano con *Salmonella* spp.

3.3 Desarrollo de recubrimientos y películas antimicrobianas

Las soluciones de los recubrimientos, así como las características que presentaron al ser aplicados al fruto se muestran a en la figura 40:

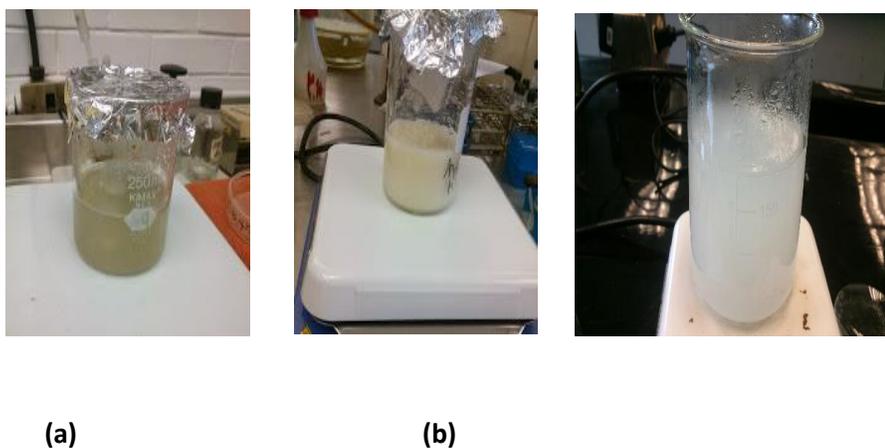


Figura 40. Recubrimientos elaborados a partir de polímeros naturales: (a) recubrimiento de alginato, (b) recubrimiento de pectina, (c) recubrimiento de almidón.

Los recubrimientos de alginato y pectina aportaron características deseables como brillo y buena adherencia al fruto (cuadro 19), mientras que el recubrimiento de almidón de maíz se escurría y no se fijaba al fruto por esa razón se descartó para las pruebas posteriores.

Cuadro 19. Características de los recubrimiento probados

Recubrimiento	Características	Imágenes
Almidón	Solución muy fluida No se adhirió al fruto Solución opaca	
Alginato	Solución viscosa Buena adherencia al fruto Solución cristalina Confiere brillo al fruto	
Pectina	Solución viscosa Buena adherencia al fruto Solución color beige Confiere brillo al fruto	

El recubrimiento de almidón no se adhirió al fruto debido a que no hubo gelificación del polímero por diversos factores tales como:

- ✓ **La composición del almidón de maíz:** el almidón de maíz empleado contiene alrededor del 25 % de amilosa, (parte del almidón implicada en la gelificación) la cual forma una red tridimensional cuando se asocian las moléculas del polímero y el agua, solo la amilosa forma un gel, por otro lado con un porcentaje alto de amilopectina espesara

la solución pero no formarán un gel, porque a diferencia de la amilosa las moléculas de amilopectina no se asocian ni forman enlaces químicos propios de la gelificación (Aguilar et al., 2008).

- ✓ **Solución con bajo contenido de almidón:** En el estudio realizado por Pagella et al. (2005) diferentes tipos de almidón (entre ellos almidón de maíz estándar) fueron evaluados, utilizaron concentraciones del 2 al 8 % de almidón de maíz obteniendo que la concentración más baja 2% no permitió la formación del recubrimiento ya que en soluciones muy diluidas las moléculas del polímero no están lo suficientemente entremezcladas para formar un gel lo cual hace que las partículas de almidón produzcan precipitación. La concentración óptima de la solución de almidón para la formación del recubrimiento fue de 5% al presentarse buenas características de viscosidad, transparencia y homogeneidad; cabe mencionar que en este proyecto se utilizó el 3% de almidón de maíz.
- ✓ **Condiciones de proceso de elaboración del recubrimiento:** La temperatura de gelificación del almidón van de un rango de 60 a 95 °C dependiendo el tipo de almidón, sin embargo Pagella (2005) sugiere que para que se lleve a cabo la gelificación del almidón de maíz se requiere una temperatura de 90 °C con un tiempo de agitación de 2 a 3 horas (Chiumarelli & Hubinger, 2012).

Por otro lado se observa que dentro de las operaciones realizadas para la elaboración de la película, el preformado es una de las etapas importantes, dependiendo de las condiciones en las que se efectúe este proceso, se verá reflejado en las características finales de la película (Jaramillo, 2014).

El espesor fue controlado vertiendo la misma cantidad de muestra en el molde (20 mL) cubriendo en su totalidad la superficie del bastidor, asegurando de esta manera que el espesor de la película fuera uniforme en toda el área superficial. Controlando el tiempo de secado (24 h) se consiguió obtener una película con buena apariencia física frente a características deseables como libre de poros, rugosidad superficial o grietas, color uniforme.

En la figura 41, se muestra la apariencia física de las películas de alginato y pectina sin antimicrobiano y con antimicrobiano.



(a)

(b)

(c)

(d)

Figura 41. Películas preformadas a partir de los recubrimientos elaborados: **(a)** Película de pectina con desinfectante, **(b)** película de pectina sin desinfectante, **(c)** película de alginato con desinfectante, película de alginato sin desinfectante.

En el cuadro 20 se reportan las características físicas observadas en las películas elaboradas durante la experimentación.

Cuadro 20. Características de películas preformadas de pectina y alginato

Muestra	Características
Película de pectina sin antimicrobiano	Se muestra opaca Manejable
Película de pectina con antimicrobiano	Se observa opaca y color ligeramente rosado El color es uniforme Manejable
Película de alginato sin antimicrobiano	Es transparente Muy manejable
Película de alginato con antimicrobiano	Presenta un color amarillento El color es homogéneo Manejable

El antimicrobiano Bioxitral® confiere un cambio de coloración en las películas de alginato y pectina, esto debido a que la sustancia antimicrobiana originalmente presenta color ámbar. Las películas presentan un color homogéneo debido a una buena incorporación de los ingredientes que forman la película antimicrobiana.

Las películas no presentan poros, ni burbujas de aire, presentan una superficie lisa, lo cual es el resultado de eliminación de aire y una buena homogeneización en el proceso de formado.

3.3.1 Pruebas de inhibición “*in vitro*” de los recubrimientos

Para evaluar la efectividad de los recubrimientos frente a *Salmonella spp.* se realizaron pruebas de inhibición “*in vitro*” en caja y en tubo.

3.3.1.2 Pruebas de inhibición “*in vitro*” en caja

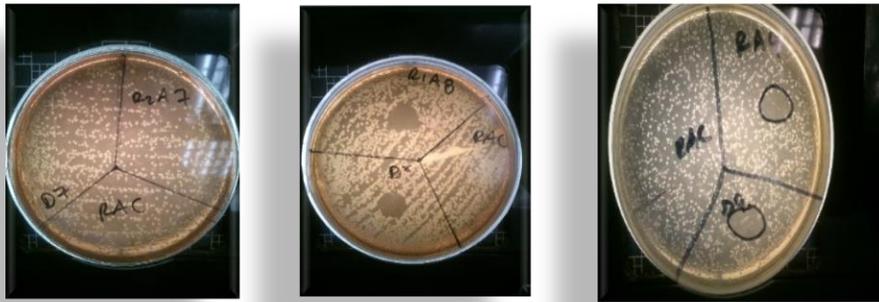


Figura 42. Evaluación antimicrobiana de los recubrimientos de alginato en caja.

Como se observa en las imágenes el recubrimiento de alginato con una concentración del antimicrobiano de 7000 ppm no presentó inhibición alguna, mientras que la concentración de 8000 y 9000 ppm si presenta inhibición sobre *Salmonella spp.*



Figura 43. Evaluación antimicrobiana de los recubrimientos de pectina en caja.

Por otro lado, todos los recubrimientos de pectina presentaron inhibición sobre la bacteria, sin embargo por este método no se puede saber si los recubrimientos presentan efecto bacteriostático o bactericida, por esa razón se realizó la prueba de inhibición en tubo utilizando

neutralizante para inhibir la acción del antimicrobiano y de ese modo corroborar el efecto bacteriostático o bactericida de los recubrimientos.

3.3.1.3 Pruebas de “*in vitro*” por el método de dilución en tubo

Al evaluar los recubrimientos a las concentraciones planteadas por el método de tubo se obtuvo que tanto los recubrimientos de alginato como los de pectina presentaron un efecto bactericida sobre *Salmonella spp.* ya que hubo ausencia de crecimiento en los tubos de BHI evaluados durante 8 días de incubación.

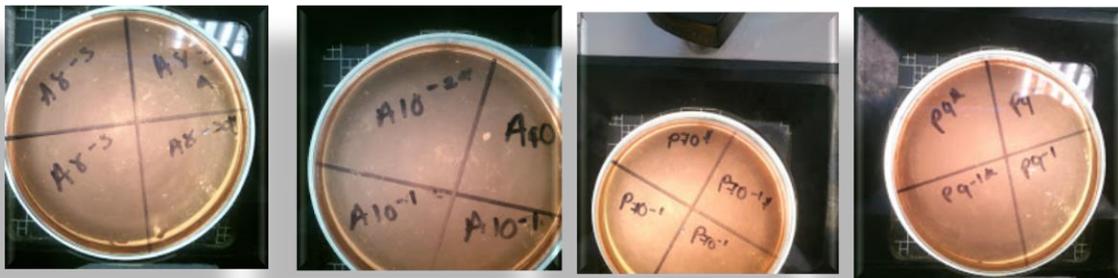


Figura 44. Efecto bactericida de los recubrimientos evaluados

Debido a que se debe asegurar la ausencia de *Salmonella spp.* en el fruto se decidió elegir la concentración mayor del antimicrobiano con efecto bactericida para adicionarlo en la formulación del recubrimiento; en el recubrimiento de alginato se incluyó la concentración de 10,000 ppm y para el caso de la pectina fue de 9,000 ppm.

El grado de disociación del antimicrobiano está en función del pH y la composición del recubrimiento, se ha observado que la mayoría de antimicrobianos naturales usados en la industria alimentaria al ser incorporados a la matriz polimérica disminuyen su efecto antimicrobiano. En el caso del recubrimiento antimicrobiano de alginato su efecto se ve reducido debido a que al disolver el antimicrobiano (compuesto por ácidos débiles) en agua, este se disocia debido al pH neutro del agua, es decir al interactuar con el agua dona protones que se encuentran en la solución y la porción de los ácidos que no se encuentran disociados favorecen la interacción antimicrobiano-bacteria, sin embargo cuando se agrega alginato de sodio (carga negativa) a la solución (carga positiva) este neutraliza el medio, viéndose reflejado en la disminución de la efectividad del antimicrobiano. Por otro lado en

el preformado de la película cuando la solución gelifica en presencia de cloruro de calcio los iones de Na^+ del alginato de sodio se intercambian con iones divalentes de calcio lo cual una vez más hace que el medio se alcalinice, es por esa razón que las películas ejercen menor efecto antibacteriano que el recubrimiento (*Ávila y López, 2008*).

Por otra parte en los recubrimientos de pectina ocurre lo siguiente :

Cuando la pectina entra en solución acuosa, sus grupos carboxilo se disocian parcialmente para formar iones carboxilo con carga negativa provocando así el aumento de la carga negativa.

El azúcar desarrolla una acción deshidratante sobre la solución de pectina; el compuesto antimicrobiano presente en los recubrimientos, libera iones hidrogeno (positivos) lo cual neutraliza la acción de los iones carboxilos negativos, reduciendo al mínimo el aumento de la carga eléctrica y la disociación de la pectina y favoreciendo las uniones de sus moléculas.

Por lo tanto el pH del medio aportado por el antimicrobiano interviene en la gelificación de la pectina y por ese motivo disminuye la acción antimicrobiana del desinfectante, sin embargo al aplicar una concentración alta del antimicrobiano al medio (10000 ppm) hay moléculas no disociadas en el medio las cuales aportan directamente la acción antibacteriana del recubrimiento (*Raybaudi, 2012*).

3.3.2 Caracterización fisicoquímica de los recubrimientos

3.3.2.1 Propiedades de barrera

- **Mojabilidad**

La mojabilidad 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 coseno del ángulo formado entre una gota o burbuja adyacente a una superficie plana y lisa (*Jaramillo, 2014*).

La mojabilidad se interpreta como el coseno del ángulo que se forma entre la superficie de un sólido y el líquido que lo moja $\cos \theta = \mu$; de acuerdo con la ecuación anterior, se considera que el mojado es perfecto cuando la mojabilidad de la superficie es positiva ($\mu = 1$) es equivalente a decir que la superficie es hidrófila, análogamente la superficie es hidrófoba cuando el valor de $\mu = -1$ (respecto al agua) es negativa, cuando la mojabilidad tenga un valor intermedio ($-1 < \mu < 1$) hablamos de mojado parcial (*Gea, 2006*).

Esto se observa claramente en las películas de alginato debido a que al efectuar la prueba no se formó ningún ángulo (0°) y al sustituir la ecuación $\cos \theta = \mu$ se obtiene $\cos 0^\circ = 1$, lo que significa que el líquido (agua) es atraído fuertemente por la película de alginato ya que la gota se extendió completamente al entrar en contacto con la superficie de la muestra; con lo anterior se comprueba que las películas antimicrobianas de alginato son altamente hidrofílicas (Vera, 2014; Jaramillo, 2014; Roopa y Bhattacharya, 2009; Gea, 2006).

Por otro lado los datos obtenidos en las películas de pectina mostraron una tendencia similar a la de las películas de alginato, ya que también presentan un comportamiento hidrofílico al obtener un valor de μ positivo sin embargo en la composición se encuentra presente un lípido lo que hace que el ángulo de contacto muestre valores mayores en comparación con las muestras de alginato (0°).

En los resultados mostrados en el cuadro 21 se observa una relación directamente proporcional entre los datos obtenidos del ángulo de contacto formado y la concentración del antimicrobiano presente en el medio, esto probablemente se debe a la formación de un gel de pectina de alto metoxilo más fuerte al disminuir el pH del medio dispersante.

Cuadro 21. Resultados obtenidos en la prueba de ángulo de contacto para las películas de pectina

Muestra	Extremo 1		Centro		Extremo 2	
	Θ	μ	Θ	μ	Θ	μ
Control Pectina	20	0.41	20	0.41	20	0.41
7000 ppm	26	0.65	24	0.42	24	0.42
8000 ppm	24	0.42	26	0.65	26	0.65
9000 ppm	26	0.65	24	0.42	26	0.65

Según el análisis estadístico ANOVA ($P \geq 0.05$) no se observó diferencia significativa en los datos obtenidos en esta prueba.

3.3.2.2 Propiedades térmicas

- **Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

La calorimetría diferencial de barrido permite el estudio de aquellos procesos en los que se produce una variación entálpica, por ejemplo determinación de calores específicos, puntos de ebullición y fusión, pureza de compuestos cristalinos y entalpías de reacción (Cortés, 2006).

La técnica detecta cambios endotérmicos (+ ΔH) y exotérmicos (- ΔH), que ocurren durante el proceso, la representación gráfica de la técnica es llamada termograma, en donde se muestra el flujo de calor en función de la temperatura (Crescencio, 2015).

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la técnica de calorimetría para las películas de pectina y alginato.

En los cuadros 22 y 23 se reportan los datos obtenidos de las películas evaluadas, las temperaturas registradas son, Temperatura de fusión (temperatura de pico en la cual se lleva a cabo la fusión), Temperatura de transición vítrea y ΔH (representa la energía total a lo largo del tratamiento). El cambio de entalpía total se calculó midiendo el área bajo la curva de la endoterma usando una línea de base entre las temperaturas de comienzo y final de la transición térmica (Porras et al., 2014).

Cuadro 22. Comportamiento térmico de las películas de alginato

Película	T de fusión (°C)	T de transición vítrea (°C)	Entalpía de cambio de fase (J/g)
Alginato	63.44	118.3	206.0
Alginato 8000 ppm	60.40	105.03	140.9
Alginato 9000 ppm	58.08	110.01	94.30
Alginato 10 000 ppm	62.88	105.0	216.8

Durante el proceso endotérmico de fusión, las líneas de flujo de calor se emparejan para las muestras de alginato, teniendo aproximadamente la misma temperatura en el pico de fusión (temperatura de fusión), aunque es de menor magnitud para la película de alginato con antimicrobiano a concentración de 9000 ppm lo que trae como consecuencia una menor entalpía de cambio de fase en la película a concentración de 9000 ppm (Solís 2006).

Los resultados indican que en el proceso de fusión, el efecto del antimicrobiano se observa principalmente en la energía que se requiere para llevar a cabo el cambio de fase (cuadro 22), ya que se requiere una mayor cantidad de energía en la película de alginato sin antimicrobiano.

Cuadro 23. Comportamiento térmico de las películas de Pectina

Película	T Fusión (°C)	Temperatura de transición vítrea (°C)	Entalpía de cambio de fase (J/g)
Pectina	71.60	112.76	66.46
Pectina 7000 ppm	62.30	120.28	108.4
Pectina 8000 ppm	57.84	68.29	16.25
Pectina 9000 ppm	60.71	103.40	75.60

En el caso de las películas de pectina la ΔH de fusión es inversamente proporcional a la concentración del antimicrobiano incorporado al medio, cabe mencionar que las temperaturas y las entalpías de reacción de la muestra de pectina con 8000 ppm del antimicrobiano son muy diferentes a las demás muestras, esto se debe probablemente a condiciones no controladas en el proceso de obtención de esta película como homogeneización deficiente de los componentes de las películas.

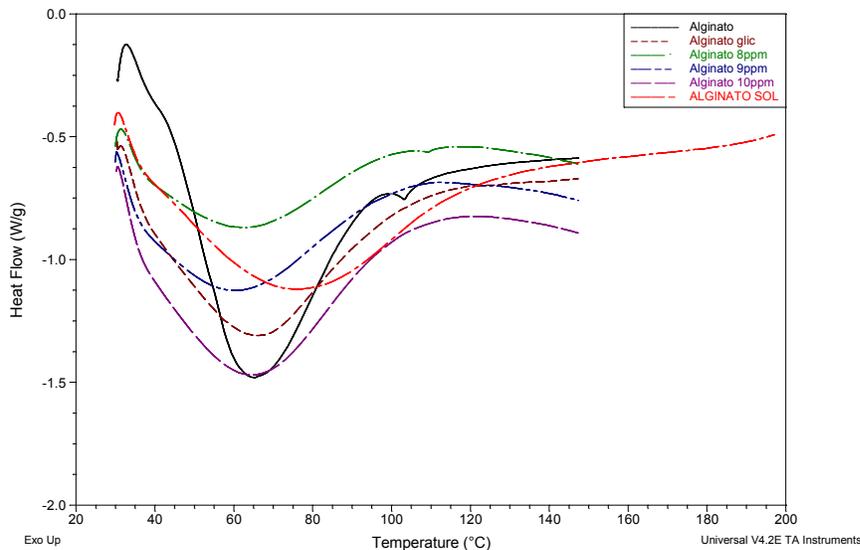


Figura 45. Termograma comparativo de las películas de alginato

Durante el calentamiento de las películas de alginato en el calorímetro se observan diferentes eventos (Figura 45) el primero es la fusión del agua que se había cristalizado, esta fase se caracteriza por ser una transición térmica relacionada con el estado de ordenación de las moléculas o cadenas poliméricas, lo que indica que las películas presentan estabilidad térmica sin cambio aparente en el sistema hasta una temperatura de 58°C a 63.5°C (los valores reales se reportan en la tabla 22 en la columna temperatura de fusión para cada muestra evaluada), el segundo tiene las características de una transición vítrea en un intervalo de temperatura de 105°C a 118.5°C, esto es el resultado de una elevada movilidad de las cadenas poliméricas al incrementar la temperatura (Abraján, 2008).

Cabe mencionar que la temperatura de transición vítrea es la temperatura en la cual el polímero disminuye su densidad, dureza y rigidez; por encima de la temperatura de transición vítrea los enlaces de las moléculas son mucho más débiles, por ello el polímero se torna gomoso y adquiere cierta elasticidad y capacidad de deformación plástica sin fractura (Cortes, 2006).

El sistema se caracteriza por ser un proceso endotermo en el cual se emplea energía para que un cambio de fase se lleve a cabo, en el caso de las películas de alginato el pico representa la fusión del agua con el polímero (proceso endotérmico en el cual el calor fluye de los alrededores al sistema) (Solís, 2006).

Después del cambio de fase las muestras se estabilizan, esto se observa en el periodo en el cual el flujo de calor se mantiene constante.

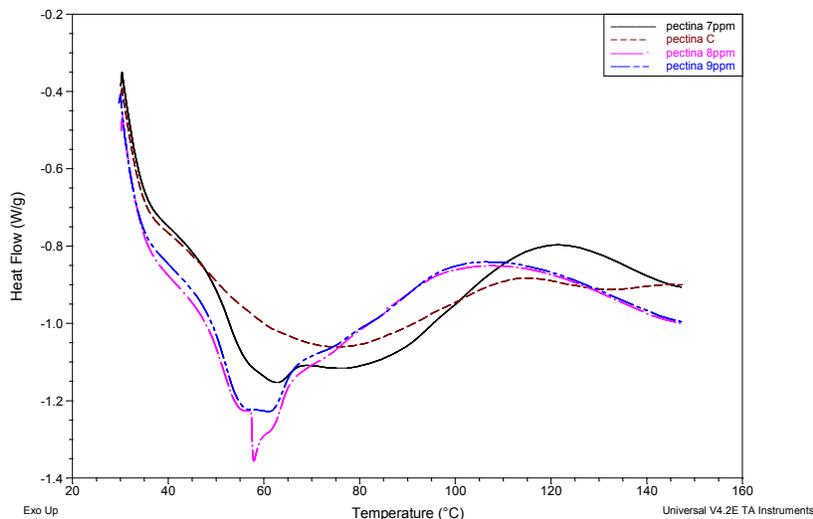


Figura 46. Termograma comparativo de las películas de pectina.

Los termogramas de las películas de pectina muestran una tendencia similar comparada con las películas de alginato al tratarse de un proceso endotérmico caracterizado por el pico mostrado a un intervalo de temperatura de 60°C a 72°C respectivamente para cada muestra evaluada (en la tabla 23 se muestran los valores de temperatura reales para cada muestra) que se debe a cambios físicos que presentan los materiales contenidos en la formulación, así como ruptura de enlaces moleculares asociados con la fase continua del sistema (solución antimicrobiana) lo cual involucra moléculas de agua unidas a los grupos –OH, agua vinculada a los grupos –COO, puentes de hidrógeno.

Las curvas de la películas de pectina con antimicrobiano a 8000, y 9000 ppm siguen una tendencia muy parecida, sin embargo la formulación con 8000 ppm sobresale un pico que puede deberse a espacios vacíos en la cápsula donde se situó la muestra, o bien a las condiciones de proceso (Borchard et al., 2005; Avella et al., 2007; Aguilar, 2010).

3.4. Pruebas de inhibición “in vivo” en el aguacate

El resultado de la prueba preliminar para corroborar que las sustancias presentes en la pulpa del aguacate no inhiben el crecimiento de la bacteria dio positivo a *Salmonella spp.* lo cual indica que la pulpa de aguacate no interfiere con el efecto antimicrobiano de los recubrimientos empleados.

Por otro lado en la prueba realizada con el colorante para descartar la migración del recubrimiento antimicrobiano al interior del fruto, se observó que al aplicar la solución del colorante la sustancia no migró al interior del exocarpio (cáscara) del fruto debido a que el papel filtro blanco colocado del lado opuesto de la cáscara no se tiñó con el colorante, por lo cual se deduce que el recubrimiento solamente se adhiere a la superficie de la cáscara y no migra al interior.

La contaminación microbiana puede ser prevenida por la incorporación de agentes antimicrobianos los cuales contienen compuestos activos que causan daños irreparables a las células de los microorganismos (Guevara y Jiménez., 2008).

Una vez elaborados y evaluados los recubrimientos se procedió a aplicarlos en aguacate *Hass* con el fin de efectuar la prueba de inhibición “in vivo”, a lo largo de 2 semanas, los resultados fueron los siguientes (cuadro 24 y 25):

Cuadro 24. Efecto antimicrobiano del recubrimiento de pectina aplicado a aguacate Hass.

Día de almacenamiento	Efecto inhibitorio del recubrimiento en aguacate
0	Bactericida
3	Bactericida
5	Bactericida
7	Bactericida
9	Bactericida
12	No presenta inhibición
14	No presenta inhibición

Las muestras de los días 0 a 9 dieron negativas a *Salmonella* spp., lo cual indica que el recubrimiento de pectina presenta un efecto bactericida hasta el día 9.

Esto se debe posiblemente a que como lo reporta López (2008) la mayoría de los ácidos orgánicos cuando son incorporados a la matriz de la película comestible, disminuye la migración hacia el alimento aumentando su actividad superficial lo cual hace posible la inhibición de la bacteria a través del contacto directo.

Sin embargo en las muestras de los días 12 y 14 se observó un precipitado blanco, lo que puede ser indicador de presencia bacteriana, las cajas de agar Mac Conkey dieron positivas a la siembra de las muestras de los días 12 y 14.

En el estudio realizado por Saucedo et al. (2009) emplea recubrimientos con cera de candelilla y aceite esencial de benomilo para el control del hongo *C. gloesporioides* en aguacate Hass. en ese estudio se obtuvo que de acuerdo a pruebas de inhibición “*in vivo*” en aguacate el recubrimiento con benomilo retardo por completo la aparición del hongo en un periodo de 22 días a 5°C, retardando además la maduración del aguacate.

Cuadro 25. Efecto antimicrobiano de recubrimiento de alginato aplicado a aguacate Hass.

Día de almacenamiento	Efecto inhibitorio del recubrimiento en aguacate
0	Bactericida
3	Bactericida
5	Bactericida
7	Bactericida
9	Bactericida
12	No presenta inhibición
14	No presenta inhibición

El efecto antibacteriano del recubrimiento de alginato siguió una tendencia similar comparado con el recubrimiento de pectina ya que su efectividad se observó alterada a partir del día 12, ya que en ambas muestras cultivadas en BHI del día 12 y 14 se observó un precipitado blanco, que se debe a crecimiento bacteriano, sin embargo al igual que con las muestras del recubrimiento de pectina se llevó a cabo la confirmación sembrando todas las muestras en agar Mac Conkey, sin embargo las únicas muestras que dieron positivas a crecimiento bacteriano fueron la del día 12 y 14.

Esto se debe a que el recubrimiento de alginato se desprendió parcialmente del aguacate a partir del día 12 debido a la excesiva deshidratación del fruto atribuida a la naturaleza altamente hidrofílica del recubrimiento, lo cual repercutió directamente en el efecto antimicrobiano del mismo.

Por el contrario las muestras de los días 0 a 9 dieron negativas a *Salmonella* spp. lo que demuestra un efecto bactericida en el recubrimiento.

La disminución del efecto antimicrobiano de los recubrimientos aplicados al aguacate se ve influenciada por diferentes factores entre los que destacan los siguientes:

- ✓ Cuando se desarrollan recubrimientos comestibles que contienen sustancias antimicrobianas se espera que tengan la capacidad de migrar hacia la superficie del alimento o permanecer retenidas en el recubrimiento. Ambos fenómenos determinan la efectividad antimicrobiana de un recubrimiento.
- ✓ La migración dependerá de las interacciones electrostáticas entre el antimicrobiano y las cadenas del polímero, los posibles cambios estructurales inducidos por la presencia del agente antimicrobiano y las condiciones ambientales a las que se exponen los recubrimientos elaborados (Cuatzo, 2010).
- ✓ La difusión de los antimicrobianos en un recubrimiento está influenciada por el tipo de polímero, plastificante y proceso de elaboración, las características del alimento a recubrir como pH y actividad de agua, las propiedades hidrofílicas de la película, y las condiciones de temperatura y tiempo de almacenamiento (García, 2012).

En esta etapa de la experimentación también se muestran los cambios aparentes de los recubrimientos aplicados a aguacate *Hass* en el transcurso de las 2 semanas (cuadro 26 y 27).

Cuadro 26. Observaciones del recubrimiento de alginato a lo largo de 2 semanas

Día de Almacenamiento	Observaciones	Imagen
0	El recubrimiento le confirió al aguacate brillo externo y presentó buena adherencia al fruto.	
3	El recubrimiento perdió ligeramente su brillo en el tercer día de almacenamiento, sin embargo se encontró en óptimas condiciones en cuanto a apariencia externa.	
5	No existió cambio visible en cuanto al fruto o recubrimiento.	
7	El aguacate aparentemente continuó con su maduración y el recubrimiento no presentó cambios.	

9	El fruto muestra un ligero deterioro en la superficie ya que se observa una ligera deshidratación del fruto.	
12	El recubrimiento se desprendió con mucha facilidad del fruto, y el aguacate se sentía blando al tacto .	
14	El recubrimiento se desprendió por completo y se presentó una deshidratación excesiva en el fruto.	

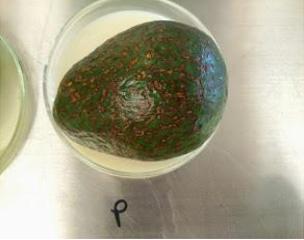
Durante el almacenamiento (aguacates recubiertos con la solución de alginato) se observó deshidratación excesiva del fruto lo cual afectó directamente a la textura (ablandamiento, flacidez, pérdida de consistencia y jugosidad), pérdida de peso y pérdida de apariencia (debido al marchitamiento y deshidratación); *Avendaño, et.al (2013)* reporta que la pérdida de agua del fruto a lo largo del almacenamiento se debe a la naturaleza hidrofílica de los polímeros usados (tal es el caso del recubrimiento de alginato), la naturaleza de la película empleada desempeña un papel muy importante ya que a mayor naturaleza hidrofílica de los componentes usados, mayor permeabilidad al vapor de agua.

Por otro lado el cambio de coloración en los aguacates puede estar relacionado al efecto de la película, en la creación de una atmósfera modificada alrededor del fruto. La presencia de CO₂ en la atmósfera de almacenamiento es un factor importante en la prevención de la degradación de la clorofila (*Maftoonazad y Ramaswamy, 2005*).

La pérdida de peso en frutos de aguacate, como en la mayoría de los frutos y vegetales frescos, es consecuencia directa de la disminución en su contenido de humedad (Aguilar, 2005). Maftoonazad y Ramaswamy (2005) reportaron disminuciones del 50% en la pérdida de humedad para frutos de aguacate recubiertos con películas comestibles, a base de metilcelulosa, después de 6 días de almacenamiento a 20°C, sin embargo en aguacates recubiertos con alginato empleados en la presente experimentación la pérdida de peso se observó indirectamente mediante el cambio de apariencia dado por la deshidratación de los aguacates en el día 9 en el cual fue más evidente.

El ablandamiento de los frutos observado en el día 9 es atribuido a la degradación de los componentes de la pared celular, principalmente pectinas, debido a la acción de enzimas específicas tales como la pectinesterasa y la poligalacturonasa (Aguilar, 2005). Estas modificaciones a nivel celular traen como consecuencia la pérdida de agua por parte de los tejidos vegetales, lo que se ha determinado también, como un factor importante en los cambios texturales sufridos por tales productos (Del Valle et al., 2005). Se ha observado que ambientes con concentraciones bajas en O₂ y altas en CO₂, reducen la actividad enzimática causante de la degradación de las paredes celulares, permitiendo así la retención de la firmeza de frutas y vegetales durante su vida postcosecha (Yaman y Bayoindirli, 2002).

Cuadro 27. Observaciones del recubrimiento de pectina a lo largo de 2 semanas

Día de Almacenamiento	Observaciones	Imagen
0	El recubrimiento le confirió brillo al fruto, se adhiere eficazmente al fruto.	
3	El recubrimiento y el fruto conservan las mismas condiciones en apariencia externa.	
5	Tanto el recubrimiento como el fruto presentan buenas características, como las iniciales.	
7	Existe una ligera deshidratación en la superficie del fruto, el recubrimiento continua en óptimas condiciones.	
9	Se presentó descenso en la calidad superficial acompañada de una ligera deshidratación en la superficie, el recubrimiento no muestra ningún desprendimiento.	

12	El recubrimiento conservó sus características iniciales, sin embargo el aguacate continua perdiendo firmeza	
14	Existe una mayor deshidratación del fruto, sin embargo el recubrimiento continua adherido al aguacate, la pérdida de firmeza es visible.	

Los cambios asociados a la maduración en frutos es la degradación de los hidratos de carbono, esta transformación tiene doble efecto de alterar el sabor como la textura del producto (*Pérez et al., 2007*), en aguacates recubiertos en este proyecto con pectina y cera de candelilla la pérdida de firmeza se hizo notorio en el día 12 de almacenamiento.

Los recubrimientos a base de lípidos han sido uno de los principales compuestos que disminuye la producción de CO₂ haciendo una barrera en la superficie del fruto modificando la composición gaseosa interna, disminuyendo la velocidad gaseosa, diversos estudios confirman esto, tal es el caso de *Pérez et al. (2003)*, donde se utilizaron tres tratamientos para melones cataloupe, los cuales consistían en la incorporación de cera fría.

Otro tipo de recubrimientos también han disminuido la tasa respiratoria de frutos, en el trabajo de *Márquez et al., (2009)* se hizo la comparación de dos recubrimientos a base de quitosan, los cuales consistían en quitosan al 0.6% y sucroester al 1% en níspero japonés, se obtuvo que los recubrimientos disminuyeron la pérdida de peso, la tasa de producción de CO₂ y la pérdida de firmeza con respecto al control.

En el caso de la presente experimentación, los controles (aguacates sin recubrir) llegaron a la senescencia a partir del día 7, en el día 3 fue notable la pérdida de textura, sin embargo los dos recubrimientos lograron incrementar la vida de anaquel del fruto.

Otro de los factores que contribuye al deterioro del fruto es la presencia de enzimas como las polifenoloxidasas y peroxidasas son las cuales intervienen en la oxidación de los compuestos

fenólicos, las cuales catalizan la oxidación de los fenoles propios de las células a quinonas, estas reacciones, además de generar colores pardos, reducen las propiedades sensoriales de textura, color de la pulpa y sabor, disminuyendo la actividad nutricional del fruto y desembocan la muerte del mismo (Rivas, 2009).

La ventaja del uso de recubrimientos es que forman una barrera en la superficie del fruto, modificando la composición gaseosa interna. Esta modificación provoca una disminución en la tasa de respiración y, por lo tanto, una prolongación de la vida postcosecha del producto (Pérez y Báez, 2003). El efecto de las ceras como se ha venido mencionando, actúa como una barrera a la transferencia de agua, retardando la deshidratación y prologando por lo tanto, la firmeza de los frutos recubiertos (Aguilar, 2005).

Los recubrimientos utilizados tuvieron un efecto en la pérdida del color, sin embargo fue más evidente en aguacates recubiertos con pectina y cera de candelilla, ya que al disminuir su respiración por ende disminuyeron su maduración y retardaron la pérdida de color, se ha registrado en varias estudios resultados similares, como en el realizado por Meir et al., (2005) en aguacate donde reportaron cambios menores de color al almacenar los aguacates en atmósferas controladas comparándolas con condiciones normales.

Cuadro 28. Ventajas y desventajas de los recubrimientos antimicrobianos aplicados a aguacate Hass en la experimentación

Recubrimiento	Ventajas	Desventajas
Alginato	Buena aplicación al fruto	Altamente hidrofílico
	Estable a alta temperatura	Contribuye a la pérdida de agua en el fruto
	Confiere brillo al fruto al ser aplicado	Permeabilidad al agua alta
Pectina	Confiere brillo al fruto al ser aplicado	Frágil y quebradizo a lo largo del tiempo.
	Buena adherencia al fruto	Naturaleza hidrofílica
	Estabilidad a alta temperatura	
	Retarda la migración de humedad	
Confiere brillo al fruto al ser aplicado		

En el cuadro 28 se reportan ventajas y desventajas de los recubrimientos aplicados a los aguacates observadas durante la experimentación.

En Las películas elaboradas a partir de polímeros naturales tales como la pectina y el alginato, muestran una baja resistencia a la pérdida de agua y poseen pobres propiedades de barrera al agua, sin embargo poseen una barrera idónea ante el O₂ y CO₂, aceites y grasas (Aguilar, 2005).

Según Herrera, (2011) los cambios fisicoquímicos y bioquímicos que ocurren en los alimentos durante el almacenamiento, se deben principalmente a la migración de agua entre componentes alimenticios o entre el medio ambiente (pérdida o ganancia de humedad), por eso es importante mantener al producto a una humedad relativa adecuada (aún en frutos recubiertos), ya que esta puede ocasionar pérdida de masa, reducción del tamaño (debido a que el agua es uno de los principales componentes de las frutas y hortalizas para realizar sus procesos vitales, los frutos pierden una gran cantidad de agua mediante la transpiración) y en consecuencia pérdida de la calidad del fruto (Quintero, 2006).

Ambos recubrimientos antimicrobianos (pectina y alginato) evaluados en este proyecto lograron controlar la aparición de *Salmonella spp.* a lo largo de 9 días, presentando efecto bactericida y fomentando de esa manera la inocuidad en aguacate Hass.

Sin embargo solamente el recubrimiento antimicrobiano de pectina evaluado en este proyecto es una opción viable y representa una buena propuesta para ser utilizado en aguacate Hass a escala comercial, debido a los efectos benéficos que aporta al ser incorporado a la superficie del producto, entre los cuales se destaca buena adherencia al ser aplicado al fruto, mejoramiento de la apariencia física del fruto, se demostró que la combinación polisacárido lípido contribuye a la disminución de pérdida de agua del fruto durante los días de almacenamiento, el recubrimiento tuvo un efecto positivo al disminuir la pérdida de peso, conservar el color y retardar el ablandamiento de los frutos.

CONCLUSIONES

- ✓ Además de mejorar la apariencia visual de los frutos, los recubrimientos de alginato y pectina aportaron características deseables como el brillo, tuvieron adherencia al fruto y estabilidad a la temperatura de almacenamiento empleada en la experimentación (17°C)
- ✓ Los recubrimientos antimicrobianos fueron efectivos para inhibir el crecimiento de *Salmonella spp.* en fase estacionaria, sin embargo fue necesario emplear una concentración de 9000 y 10000 ppm del agente antimicrobiano para lograr un efecto bactericida.
- ✓ De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación se demuestra que el uso de ácidos orgánicos como agentes antimicrobianos en recubrimientos es una alternativa para mejorar la inocuidad en frutos como el aguacate .
- ✓ Las pruebas realizadas por medio de la evaluación del ángulo de contacto de las películas preformadas muestran que los recubrimientos de pectina y alginato son altamente permeables al agua, lo que indica que son hidrofílicos, sin embargo el recubrimiento de pectina al contener cera de candelilla confiere al sistema menor permeabilidad al agua que el recubrimiento de alginato.
- ✓ De acuerdo a los resultados obtenidos a lo largo de la experimentación se establece que ambos recubrimientos se pueden emplear para recubrir una variedad de frutos y así fomentar la inocuidad después de la cosecha, sin embargo el recubrimiento que posee las mejores características para ser aplicados a aguacate *Hass* fue el de pectina.

RECOMENDACIONES

- ✓ Evaluar el antimicrobiano a base de ácidos orgánicos con diferentes patógenos presentes en alimentos.
- ✓ Se sugieren la incorporación de otros agentes antimicrobianos en las matrices poliméricas empleadas en este proyecto.
- ✓ Se recomienda ampliar la investigación dando seguimiento a la evaluación del efecto del recubrimiento de pectina sobre los parámetros de calidad del fruto.
- ✓ Determinar la vida de anaquel del alimento con el recubrimiento de pectina, así como evaluar el cambio en propiedades texturales, organolépticas y sensoriales del fruto durante el almacenamiento.
- ✓ Evaluar el efecto de los recubrimientos aplicado a otros alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraján Myrna (2008) *Efecto del método de extracción en las características químicas y físicas del mucílago del nopal (opuntia ficus-indica) y estudio de su aplicación como recubrimiento comestible* (Tesis doctoral) Universidad Politécnica de Valencia
- Aguilar Alejandra (2010) *Caracterización de propiedades fisicoquímicas, térmicas, reológicas, y propiedades de barrera a los gases de películas comestibles elaboradas a partir de mucílago de Salvia hispánica y pectina cítrica*, (Tesis para obtener el título de Ingeniero en ciencia y tecnología de alimentos) Universidad Autónoma Agraria.
- Aguilar A, Martínez Eduardo, Cruz Alfredo, Fonseca Mónica (2008) Gelatine–starch films: Physicochemical properties and their application in extending the post-harvest shelf life of avocado (*Persea americana*), *Journal of the Science of Food and Agriculture* (88) 185-196.
- Aguilar, Miguel (2005) *Propiedades físicas y mecánicas de películas biodegradables y su empleo en el recubrimiento de frutos de aguacate* (Tesis de Maestría en Tecnología Avanzada), Instituto Politécnico Nacional, Instituto de Tecnología Avanzada.
- Amir Heydari, Iran Alemzadeh, Manouchehr (2013) Functional properties of biodegradable corn starch nanocomposites *food packaging applications* (50) 954–961
- Appendini Paola, Hotchkiss Joseph (2002), Review of antimicrobial food packaging, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, (3) 113-126
- Arellano, César (2015, 07 abril) Se enferman en el mundo 582 millones de personas por alimentos contaminados, *La Jornada*, recuperado de: <http://observatoriodeprecios.com.mx/index.php/noticias/2137-07-de-abril-2015-se-enferman-en-el-mundo-582-millones-de-personas-por-alimentos-contaminados>
- Avella Maurizio, Di Pace Emilia, Immirzi Barbara, Impallomeni Giuseppe, Malinconico Mario, Santagata Gabriella (2007) Addition of glycerol plasticizer to seaweeds derived alginates: Influence of microstructure on chemical–physical properties *Carbohydrate Polymers* (69) 503–511
- Avendaño Romero, López Malo, E. Palou (2013) Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos, *Temas selectos de ingeniería en alimentos*. (7) 87-96.

- Ávila R., López A. (2008) Aplicación de sustancias antimicrobianas incorporadas en recubrimientos y películas comestibles, *Temas selectos de ingeniería en alimentos* (2) 4-13
- Barrientos Priego, E. García Villanueva, E. Avitia García, (2006) anatomía del fruto de aguacate, *Revista Chapingo*, (2) 189-198.
- Batz Michael, Hoffmann Sandra, Morris J. Ranking the Risks: The 10 Pathogen-Food Combinations With The Greatest Burden on Public Health, *Emerging Pathogens Institute* (5) 23-27.
- Borchard, W., Kenning, A., Kapp, A., & Mayer, C. (2005). Phase diagram of the system sodium alginate/water. *International Journal of Macromolecules* (35) 247–256.
- Bosquez, Elsa (2003) Elaboración de recubrimientos comestibles formulados con goma de mezquite y cera de candelilla para reducir la cinética de deterioro en fresco del limón persa (*Citrus latifolia tanaka*) (Tesis de Doctorado en Ciencias biológicas), Universidad Autónoma Metropolitana.
- Bosquez-Molina E., Guerrero-Legarreta I., Vernon-Carter E.J. (2003) Moisture barrier properties and morphology of mesquite gum–candelilla wax based edible emulsion coatings, *Food Research International* (36) 885–893.
- Bozianis Ioanis (2 ed.) 2014, *Novel food preservation and microbial assessment techniques*, EE.UU Science publishers book
- Cano, María (2013) Evaluación de tres sanitizantes en su capacidad para eliminar bacterias productoras de biopelículas procedentes de una planta procesadora de cárnicos. (Tesis de licenciatura en Ingeniería en Alimentos), Universidad Nacional Autónoma de México, FES Cuautitlán México.
- Castillo, Carmela (2014, Agosto 11) Enfermedades transmitidas por alimentos, *UPSA*, recuperado de: http://www.aupsa.gob.pa/aupsaweb/index.php?option=com_content&view=article&id=264:enfermedades-transmitidas-por-alimentos-eta&catid=1:latest
- Cavalieri Stephen (2005) Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana American *Society for Microbiology*. (2) 1-248
- CDC, (2011) Estimaciones sobre enfermedades transmitidas por alimentos en países miembros de la FAO 2011, Datos y estadísticas, disponible en: <http://www.cdc.gov/spanish/Datos/wdfdtgui/EnfermedadesAlimentos/>
- Chiumarelli Marcela & Hubinger Miriam (2012) Stability, solubility, mechanical and barrier properties of cassava starch Carnauba wax edible coatings to preserve fresh-cut apples *Food Hydrocolloids* (28) 59-67.

- COMA, (2012) *Comisión michoacana del aguacate A.C. sistema producto aguacate*, recuperado de:https://www.google.com.mx/search?q=COMA++michoac%C3%A1n&ie=utf8&oe=utf8&gws_rd=cr&ei=GTtOVd6wClOiyASgmIDwB.
- CONACYT, (2008). *El aguacate en México, origen y amenazas. Ciencia y desarrollo*, recuperado de: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2014/sem14.pdf>
- Corrales Margarita, Fernández Avelina, Jung H. Han (2014) Antimicrobial Packaging Systems, *Food packaging* (7)
- Cortes Luis (2006) Propiedades de los polímeros y aplicaciones, *Industria química* (12) 116-125
- Cortés, Mayra (2006) *Síntesis y caracterización de polímeros vía radicales libres usando Xanntonas* (Tesis de licenciatura en Química), Universidad Autónoma del estado de Hidalgo, FES Cuautitlán México.
- Crescencio Elizabeth (2015) *Cinética de gelificación directa con alginato de sodio* (Tesis de licenciatura en Ingeniería en Alimentos), Universidad Nacional Autónoma de México, FES Cuautitlán México
- Cruz M., Murphy T., Morris M., Cummins E., Kerry J. (2013), Antimicrobial activity of chitosan, organic acids and nano-sized solubilisates for potential use in smart antimicrobially-active packaging for potential food applications *Food Control* (34) 393-397
- Cuatzo, María (2010) *Efecto de las condiciones de proceso en la conservación de alimentos encapsulados por el método de gelificación iónica* (tesis para obtener el título de maestra en ciencias en alimentos), Instituto Politécnico Nacional.
- Dorantes Lidia (2004), Post harvest operations, *FAO* (5) 1-67, <http://www.fao.org/3/a-i0526e.pdf>.
- Estrella, Verónica (2012) *Aplicación de recubrimientos en base de ceras adicionados con compuestos naturales y químicos para controlar antracnosis en aguacate Hass* (Tesis de licenciatura en Ingeniería en Alimentos), Universidad Nacional Autónoma de México, FES Cuautitlán México.
- Falguera Victor, Quintero Juan Pablo, Jimenez Alberto, Aldemar Muñoz José and Albert Ibarza (2011) Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use, *Food Science & Technology* (22) 299-303.
- FAO, (2013) Panorama de la seguridad alimentaria y nutricional en México 2012 recuperado de:http://www.cisan.org.ar/articulo_ampliado.php?id=80&hash=e7ede0955332d7ef4cd8339bf15426dd

- Galet Muriel Virginia, Josep P. Cerisuelo, Gracia López-Carballo, Marta Lara, Rafael Gavara, Pilar Hernández-Muñoz (2012) Development of antimicrobial films for microbiological control of packaged salad *International Journal of Food Microbiology* (157) 195–201
- García A. (2012) Antimicrobial assays and their inhibitory effect against *Salmonella*, *Food microbiology*, (8) 67-86.
- Gea, Pedro (2006) Mojado en condiciones de no equilibrio en superficies reales (Tesis de doctorado en Ciencias), Universidad de Granada.
- Govantes, Diana (2006) *Efecto antimicrobiano de un recubrimiento comestible aplicado a Melón Cantaloupe* (Tesis de licenciatura en Ingeniería en Alimentos), Universidad Nacional Autónoma de México, FES Cuautitlán México.
- Guevara A., Jiménez M., (2008) Materiales utilizados en la encapsulación de alimentos, *Temas selectos de Ingeniería en alimentos* (2) 22-27.
- Gutiérrez Tomy, Tapia María Soledad, Pérez Elevina, Famá Lucía (2015) Structural and mechanical properties of edible films made from native and modified cush-cush yam and cassava starch, *Food Hydrocolloids* (45) 211-217
- Hadar Arnon, Rina Granit, Ron Porat, Elena Poverenov (2015) Development of polysaccharides-based edible coatings for citrus fruits: A layer-by-layer approach, *Food Chemistry* (166) 465–472.
- Hamdy M.B.A. Zaki, Hussein M.H. Mohamed*, Amal M.A. El-Sherif (2015) Improving the antimicrobial efficacy of organic acids against *Salmonella* enterica attached to chicken skin using SDS with acceptable sensory quality *Food Science and Technology* (64) 558-564
- Hassan- Al, Norziah M.H. (2012) Starchgelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers, *Food Hydrocolloids* (26) 108-117
- Hernández María Soledad, Barrera Jaime, Melgarejo Luz Marina, (2011) Fisiología poscosecha, *Bioquímica vegetal* (22), 167-186, http://www.bdigital.unal.edu.co/8545/24/11_Cap09.pdf
- Herrera, Diana (2011) *Desarrollo de dos recubrimientos comestibles con antimicrobianos naturales para carne no procesada* (Tesis de licenciatura en Ingeniería en Alimentos), Universidad Nacional Autónoma de México, FES Cuautitlán México
- Iturriaga L., Olabarrieta I., Martínez de Marañón I. (2012) Antimicrobial assays of natural extracts and their inhibitory effect against *Listeria innocua* and fish spoilage bacteria, after

- incorporation into biopolymer edible films. *International Journal of Food Microbiology* (158) 58–64
- Jaramillo, Melissa (2014) *Extracción de aceite esencial de orégano (Lippia graveolens Kunth) y desarrollo de películas comestibles antimicrobianas para control de Listeria monocytogenes*. (Tesis de licenciatura en Ingeniería en Alimentos), Universidad Nacional Autónoma de México, FES Cuautitlán México
- Jung H. Han (2014) Edible Films and Coatings: A Review, *Innovations in Food Packaging* (9) 213-255.
- Kanmani Paulraj & Rhim Jong-Whan (2014)Antimicrobial and physical-mechanical properties of agar-based filmsincorporated with grapefruit seed extract *Carbohydrate Polymers* (102) 708–716
- Kowalczyk Dariusz, Baraniak Barbara (2011) Effects of plasticizers, pH and heating of film-forming solution on the properties of pea protein isolate films *Journal of Food Engineering* (105) 295–305
- Kopper, Gisela (2012) Estudio de Caso – Enfermedades Transmitidas por Alimentos en Costa Rica, *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico*, (3) 13-46
- Lehrke Giselle, Hernaez Laura , Mugliaroli Sandra, von Staszewski Mariana, Jagus Rosa (2011) Sensitization of *Listeria innocua* to inorganic and organic acids by natural Antimicrobials, *Food Science and Technology* (44) 984-991.
- Lianou and Koutsoumanis Aristotle (2012) Organic acids and other chemical treatments for microbial decontamination of food. *Food Industry* (20) 592-664
- López, Patricia (2008) Interacciones especiales envase-alimento: alta temperatura y envase activo antimicrobiano, *Alimentos envases* (2) 20-27.
- Mani López, García H.S., López Malo A. (2012) Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products, *Food Research International*, (45) 713-721.
- Marín Juan, Navarro Fernanda, Santos Natalia (2008) *Evaluación del método de dilución neutralización aplicado a un desinfectante según la norma técnica Colombiana 5473 del 2007* (Tesis para obtener el título de microbiólogo industrial) Universidad Javeriana

- Martínez Mancel, de la Hoz Fernando, Pacheco Óscar, Quijada Hernán (2014) Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), *Enfermedades transmisibles*, (2) 1-33.
- Marzo, Irene (2010) *Efecto del tipo y contenido de aceites esenciales sobre las propiedades mecánicas y barrera de películas comestibles basadas en zeína extracción* (Tesis de ingeniero técnico agrícola en industrias agrarias y alimentarias), Universidad Pública de Navarra.
- Mingming Guo, Tony Z. Jin, Luxin Wang, O. Joseph Scullen, Christopher H. Sommers (2014) Antimicrobial films and coatings for inactivation of *Listeria innocua* on ready-to-eat deli turkey meat *Food Control* (40) 64-70.
- Monrroy María, Castro Talía, Fernández Francisco, Mayorga Lino (2009) Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias pro bióticas *Universidad Autónoma Metropolitana* (5)63-72.
- Morales, Roberto (8 de abril 2012), Triplica México exportaciones de aguacate. *El economista*. Recuperado de <https://www.google.com.mx/search>
- Muhammad Abdul Haq, Abid Hasnain, Mahmood Azam, (2014) Characterization of edible gum cordia film: Effects of plasticizers, *Food Science and Technology* (55) 163-169.
- Nashwa Tarek, Hossam M., Hassan, Sameh M., AbdelGhani, Radwan I., Hammouda Ola (2014) Comparative chemical and antimicrobial study of nine essential oils obtained from medicinal plants growing in Egypt, *Journal of basic and applied sciences* (1) 1-8.
- NMX-AA-150-SCFI-2009 CAJAS Y EMBALAJES PARA EL ENVASADO DE AGUACATE FRESCO- ESTANDARIZACIÓN DE CAPACIDADES-ESPECIFICACIONES, Consultado 18 de abril del 2014, disponible:http://www.dof.gob.Mx/nota_detalle.php?codigo=5082990&fecha=09/03/2009.
- NMX-bb-040-SCFI-1990, MÉTODOS GENERALES DE ANÁLISIS: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN PRODUCTOS GERMICIDAS, consultado: Mayo 15 del 2015, disponible en: <http://es.scribd.com/doc/235504261/nmx-bb-040-scfi-1999#scribd>.
- NMX-FF-016-2002 PRODUCTOS ALIMENTICIOS NO INDUSTRIALIZADOS PARA USO HUMANO – FRUTA FRESCA – AGUACATE (*Persea americana* Mill) – ESPECIFICACIONES. Consultado 23 agosto del 2014 disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Lists/>

[Instrumentos%20Tcnicos%20Normalizacin%20y%20Marcas%20Colecti/Attachments/67/NMX_AGUACATE.pdf](#)

NMX-FF-016-SCFI-2006, PRODUCTOS ALIMENTICIOS NO INDUSTRIALIZADOS PARA USO HUMANO FRUTA FRESCA -AGUACATE (Persea americana Mill) ESPECIFICACIONES, Consultado Mayo 15 2015, disponible en: <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-FF-016-2002>.

NOM-066-FITO-2002, ESPECIFICACIONES PARA EL MANEJO FITOSANITARIO Y MOVILIZACIÓN DEL AGUACATE, Consultado: Marzo 13 del 2014, disponible en: <http://www.senasica.Gob.mx/?doc=696>

Nur Hanani, J. McNamara, Y.H. Roos, J.P. Kerry (2013) Effect of plasticizer content on the functional properties of extruded gelatin-based composite films, *Food Hydrocolloids* (31) 264-269.

Olivas Guadalupe I., V. Gustavo, Barbosa-Canovas (2008) Alginate–calcium films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity, *Science direct* (41) 359–366.

OMS, (2013) Estadísticas sanitarias mundiales. Fecha de consulta 23/03/15. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/82218/1/9789243564586_spa.pdf.

OMS, (2015) Campañas mundiales de salud pública de la OMS. Inocuidad de alimentos. Fecha consulta 23/03/2015. Disponible en <http://www.who.int/health>

OPS/OMS (2015) Enfermedades transmitidas por alimentos, recuperado de: <http://www.euro.who.int/en/search?q=enfermedades++transmitidas++por++alimentos++en++m%C3%A9xico>

Osuna, Joel, (2012, 17 de febrero) Aumentan enfermedades transmitidas por alimentos, *El portal de Sinaloa*, disponible en: <http://www.noroeste.com.mx/publicaciones.php?id=757008>

Ortega, Miguel (2006) Valor nutrimental de la pulpa fresca de aguacate *Hass Proceedings World Avocado Congress* (5) 741-748.

Pagella C., Spigno and D. M. Faveri (2005) Characterization of starch based edible coatings, *Institution of Chemical Engineers* (8) 193-198

Pérez, Graciela (2013) Extracción de compuestos activos de plantas para su aplicación en recubrimientos para controlar la podredumbre en fresa (Tesis de licenciatura en Ingeniería en Alimentos), Universidad Nacional Autónoma de México, FES Cuautitlán México.

- Porras Martín, Franco Guadalupe, Pedroza Ruth, Martínez Eduardo (2014) Thermal treatment effect on wettability of edible films from whey protein isolated and mesquite (prosopis spp.) gum, *Agro ciencia* (49) 1-13. 2015
- Quintero, C. J., & Aldemar, M. (2010). Películas y recubrimientos comestibles: importancia y tendencias recientes en la cadena hortofrutícola. *Ciencias químicas*, (5)93-118.
- Quintero, C. Juan, Falguera, Victor; Munoz, H. Aldemar. (2010) Películas y recubrimientos comestibles: importancia y tendencias recientes en la cadena hortofrutícola *Ciencias químicas* (5) 93-118.
- Rasgado, Alejandra (2014) *Alimentos vegetales mínimamente procesados* (IV Gama) una revisión con enfoque tecnológico y de prevención en la enfermedades transmitidas por alimentos (Tesis de Químico en Alimentos), Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de química.
- Raybaudi Rosa, Tapia María, Mosqueda Jonathan (2012) Películas y recubrimientos comestibles con efecto antimicrobiano, *Ciencia y tecnología de alimentos* (2) 329-362.
- Rojas María A., Raybaudi-Massilia Rosa M., Soliva-Fortuny Robert C., Avena-Bustillos Roberto J., Mc Hugh Tara H., Martín Belloso Olga (2007) Apple puree-alginate edible coating as carrier of antimicrobial agents to prolong shelf-life of fresh-cut apples, *Postharvest Biology and Technology* (45) 254–264
- Rojas-Grau M.A., Tapia M.S,Rodríguez F.J.,Carmona A.J,Belloso Martin(2007) Alginate and gellan-based edible coatings as carriers of antibrowning agents applied on fresh-cut Fuji apples *Food Hydrocolloids* (21) 118–127.
- Romero Raúl, (3 ed.) (2007) *Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*, México, Editorial médica Panamericana.
- Roopa B.S., Bhattacharya Suvendu (2009) Alginate gels: Rupture characteristics as a function of the conditions of gel formation *Journal of Food Engineering* (91) 448–454
- Saeedeh Shojae-Aliabadi, Hedayat Hosseini, Mohammad Amin Mohammadifar,Abdorreza Mohammadi, Mehran Ghasemlou,Seyede Marzieh Hosseini, Ramin Khaksar (2014) Characterization of carrageenan films incorporated plant essential oils with improved antimicrobial activity *Carbohydrate Polymers* (101) 582– 591

BIBLIOGRAFÍA

- SAGARPA, 2011 *Monografía de cultivos: Aguacate* disponible <http://www.google.com.mx/url?sa> fecha de consulta Abril, 2015
- SAGARPA (2014), Atlas agroalimentario, disponible en: <http://www.siap.gob.mx/pdfjs/web/viewer.php?file=Atlas%20Agroalimentario%202014.pdf>, fecha de consulta Mayo 2015.
- SAGARPA (25 de enero 2015) Crecen 39% exportaciones de aguacate a Estados Unidos: SAGARPA-APEAM, SAGARPA, recuperado de: <http://sagarpa.gob.mx/saladeprensa /2012 /Paginas /2015B057.aspx>.
- Salazar García Samuel, Zamora Cuevas Luis, Vega López Ricardo (2004) Update on the avocado industry in Michoacan, Mexico, California Avocado Society (87) 45-54.
- Sánchez, Gloria (2008, 18 de julio), Las autoridades estatales retiran del mercado chiles jalapeños y aguacates contaminados con *Salmonella*. Department of health and human services, Recuperado de <http://www.ncdhhs.gov/ espanol/ noticias /2008 /2008-7-18-salmonela.htm>.
- Sandoval Aldana Angélica, Forero Longas Freddy, Garcia Lozano Jairo (2010) postcosecha y transformación de aguacate: agroindustria rural innovadora, *Centro de Investigación Natima* (15) 1-112
- Saucedo Saúl, Rojas-Molina Romeo, Antonio Aguilera-Carbó, Aide Saenz-Galindo, de La Garza Heliodoro, Jasso-Cantú Diana, (2011) Edible film based on candelilla wax to improve the shelf life and quality of avocado, *Food Research International*, (42) 511-515.
- SE, 2012, *Monografía del sector aguacate en México: situación actual y oportunidades de mercado*, disponible en: <http://www.economia.gob.mx/>, fecha de consulta Abril 2015.
- SIA, 2010 *Agricultura producción anual* disponible en: <http://www.siap.gob.mx/agricultura-produccion-anual/>, fecha de consulta mayo 2015.
- SINAVE (2014), Programa sectorial de salud, disponible en <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/normatividad/PAE>, fecha de consulta diciembre 2015.
- Skřivanová Eva, Molatová Zuzana, Matěnová Michaela, Houf Kurt, Milan Marounek (2011) Inhibitory effect of organic acids on arcobacters in culture and their use for control of *Arcobacter butzleri* on chicken skin, *Journal of Food Microbiology* (144) 367–371.
- SSA, (2014) Vigilancia epidemiológica, Fecha de consulta: 23 agosto 2015, disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2014/sem14.pdf>
- Suárez, Ramón (2015, 07 abril) La OMS promueve el consumo de alimentos salubres en el Día Mundial de la Salud 2015, *El universal* Recuperado de <http://noticias.Universal.com/art>

<http://www.who.int/mediacentre/news/2015/04/07/salud/consumo-alimentos-salubres-dia-mundial-de-la-salud-2015>

- Sudarsan Mukhopadhyay, Raghupathy Ramaswamy (2012) Application of emerging technologies to control Salmonella in foods: A review, *Food Research International* (45) 666–677.
- Suzanne Finstad a, Corliss A. O'Bryan, John A. Marcy, Philip G. Crandall , Steven C. Ricke(2012) Salmonella and broiler processing in the United States: Relationship to foodborne salmonellosis, *Food Research International* (45) 789–794.
- Stanier Roger, Ingraham John, Wheelis Mark, Painter Page, (2 ed.) (2005) *Microbiología*, Barcelona, Editorial Reverté.
- Tajkarimi M., Ibrahim S., Cliver D. (2010) Antimicrobial herb and spice compounds in food *Food Control* (21) 1199–1218
- Tamayo, Pablo (5 ed.)(2008) *Tecnología para el cultivo del aguacate*, Colombia, Editorial Corpoica.
- Tortora Gerard, Funke Berdell, Case Christyne,(9 th ed.) (2007) *Microbiology and introduction*, EE.UU, Pearson education.
- Velásquez Indira (2006), *Manejo poscosecha de aguacate*, El Salvador, FANTEL
- Vera Marco, (2014) *Desarrollo de un recubrimiento comestible antimicrobiano en el jitomate tipo Saladette para el control de Salmonella* (Tesis de licenciatura en Ingeniería en Alimentos), Universidad Nacional Autónoma de México, FES Cuautitlán México
- Vergara Carlos E. U., Arteaga Neyla N. M., Segovia Lupe, Márquez Luz M. (2014) Caracterización epidemiológica de enfermedades transmitidas por alimentos y agua en el estado Mérida en el periodo 2011–2012, *Médula* (22) 5-9.
- Villalobos Carvajal Ricardo, Hernández Muñoz Pilar, Albors Ana, Chiralt Amparo (2009), Barrier and optical properties of edible hydroxypropyl methylcellulose coatings containing surfactants applied to fresh cut carrot slices, *Food Hydrocolloids* (23) 526–535.
- Vivek K. Bajpai, Kwang-Hyun Baek, Sun Chul Kang (2012) Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review, *Food Research International* (45) 722–734.

ANEXO 1.

I.FICHA TÉCNICA BIOXITRAL

Bioxitral LIQUIDO V02 L es un producto natural complejo compuesto de derivados de cítricos utilizado como efectivo agente antimicrobiano (bacteriostático y bactericida) y antioxidante.

La acción antimicrobiana y antioxidante del producto resulta del efecto sinérgico de los bioflavonoides y los ácidos orgánicos presentes en el producto. Los resultados de su efectividad como agente bacteriostático y bactericida representan una gran utilidad en una amplia gama de usos en donde se requiere un efectivo control del crecimiento microbiano.

Composición:

Debido a la característica natural del producto la composición de sus elementos es variable dependiendo del tipo de cítricos utilizados (origen y características particulares de estas y las cosechas que componen las materias primas). Los rangos de composición se establecen en la siguiente tabla descriptiva:

-Compuestos orgánicos	50 %
(Bioflavonoides cítricos, ácido ascórbico y ascorbato, polifenoles cítricos, ácido cítrico, pectina, biomasa, agua).	
-Vehículo inerte (Glicerina).....	50 %

Estructura química de los principales componentes de bioitral LIQUIDO V 02 L

A) Bioflavonoide glucosídico- "Narginina" (C₂₇ H₃₂ O₁₄) de toronja.

Materias primas de bioitral LIQUIDO V20 L

- Cítrico de toronja (Citrus Paradisi)
- Cítrico de Bergamota (Citrus Aurantium)
- Cítrico de Naranja Dulce (Citrus Sinensis)
- Cítrico de Manadarina (Citrus Reticulata)

- Ácidos orgánicos
- Glicerina vegetal

Características y propiedades físicas:

- **Aspecto:** Líquido cristalino viscoso.
- **Densidad (g/mL):** 1.160 (+- 15 %).
- **Corrosividad:** 2000 ppm es similar al del agua.
- **pH:** 2.0- 3.2
- **Solubilidad:** Agua, alcohol y glicerina.
- **Acidez** (cantidad de producto (mg) neutralizado por 1 mL de NaOH 1N).
- **Nitrógeno (método de Kjeldahl):** 0.62 % (+- 15%).
- **pH para uso en mezclas:** Usar en rangos de pH de 3 a 9.

Características sensoriales:

- **Color:** Apariencia a miel cristalina, con el tiempo se va oscureciendo sin embargo su eficacia no se va afectada.
- **Olor:** semejanza con notas cítricas
- **Sabor:** Notas amargas y astringentes.

Vida de anaquel: 3 años a partir de la fecha de fabricación.

Almacenamiento: Lugar fresco y seco (asegurarse de mantener el envase cerrado).

Estabilidad: El tiempo es un factor para que el producto pueda sufrir cambios de color(oscurecimiento) sin que esto afecte su efectividad. El producto es estable en rangos de temperatura que van de 4 °C a 40 °C sobre 120 °C su estabilidad es reducida. Precauciones de uso: Utilice equipo de protección personal (lentes guantes y cofia). En caso de contacto con piel y ojos, lave profusamente con agua limpia.

Biodegradabilidad: Atendiendo a las características y origen naturales de sus componentes el producto es biodegradable.

Espectro bacteriostático y fungistático de bioxitral LIQUIDO V02 L:

- **Bacterias.**

Salmonella cholera suis, Salmonella tiphy, salmonella anatum, Salmonella enteretidis, Salmonella gallinarum, E. Coli, Staphylococcus aureus, Staphylococcus faecalis Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis Proteus bulgaris, Streptococcus faeciuy, Micrococcus spp., Pasteurella multocida Clostridium Perfingens, Pseudomonas aeruginosa Shigella dysenteriae.

- **Hongos**

Candida albicans, Penicillum spp., Penicillum funiculosum, Aspergillus flavus, Aspergillus uryzae, Mycosphaerella musicola Mycosphaerella fijensis, Fusarium solani, Fusarium spp., Fusarium graminearum, Rhizoctonia solani, Alternaria solani, Phona insidiosa, Colletotrichum lindemuthianum Molinia spp, Sclerotium rolfsii, Drechslera sorokiniana, Nigrospora oryzae.

Propiedades biológicas de bioxitral LIQUIDO V02 L

- Es 100% ecológico y biodegradable.
- Es no tóxico para animales y plantas.
- No es corrosivo ni volátil.
- Tiene acción microbioestática extendida, funcionando contra muchas sepas patogénicas de bacterias y hongos.
- Contiene antioxidantes naturales(ácido ascórbico, bioflavonoides, ácido cítrico) con altos niveles de biodisponibilidad y tiene excelente sinergismo y estabilidad.

II.PREPARACIÓN DEL NEUTRALIZANTE EMPLEADO PARA LA PRUEBA DE INHIBICIÓN IN VITRO SEGÚN LA NORMA NMX-BB-040-SCFI-1990

Preparación de las soluciones

- **Solución amortiguadora de fosfatos 0.25 M**

En un matraz volumétrico de 1 L disolver 34 g. de fosfato monobásico de potasio en 500 mL de agua ajustar pH entre 7.1 y 7.3 con la solución de NaOH, aforar con agua, mezclar y distribuir en porciones de 100 mL. Esterilizar en autoclave 121 °C por 15 min.

- **Solución amortiguadora de fosfatos diluida**

Colocar 1.25 mL. de la solución amortiguadora de fosfatos 0.25 M en un matraz volumétrico de 1 L. y llevar a volumen con agua, mezclar y distribuir en porciones de 9 mL y 99 mL en tubos y matraces respectivamente, esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min.

- **Solución neutralizante concentrada**

Mezclar 40 g. de azolecitina con 280 mL de polisorbato 80 mL y 125 mL de la solución amortiguadora de fosfatos, diluir con agua hasta obtener un volumen final de 1 L; ajustar el pH a 7.2 , distribuir en porciones de 100 mL y esterilizar a 121.1 °C por 20min.

- **Solución neutralizante diluida**

Mezclar 100 mL de la solución neutralizante concentrada con 25 mL de la solución amortiguadora de fosfatos 0.25M adicionar 1.676 mL de agua, esterilizar a 121 °C por 20 min.

Preparación de los medios de cultivo

Preparar y esterilizar los medios de cultivo, en el caso del agar para métodos estándar con neutralizante, antes de esterilizar, adicionar 1 L de agar para métodos estándar y 25 mL de la solución neutralizante concentrada.

- **Caldo neutralizante**

Mezclar los componentes que se indican en la siguiente tabla, calentar hasta disolver, ajustar el pH hasta 7.2, distribuir en tubos y esterilizar en autoclave 121.1°C a 16 minutos.

Tabla 29. Reactivos de caldo neutralizante.

Reactivo	Cantidad
Triptona	5 g
Extracto de levadura	2.5 g
Dextrosa	10 g
Tioglicolato	1 g
Tiosulfato de sodio	6 g
Bisulfito de sodio	2.5 g
Polisorbato 80	5 g
Lecitina de soya	7 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agua destilada	1L

