

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**



**Evaluación de la conservación de carne de res en un envase activo
polisuccinimida microcelulosa aceite esencial de orégano**

POR

MARIA DE LOURDES ZARAZÚA GUERRERO

T E S I S

Presentada como requisito parcial para obtener el título profesional de

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México
Junio de 2021

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Evaluación de la conservación de carne de res en un envase activo
polisuccinimida microcelulosa aceite esencial de orégano**

T E S I S

Presentada por

MARIA DE LOURDES ZARAZÚA GUERRERO

y que somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para
obtener el título profesional de

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

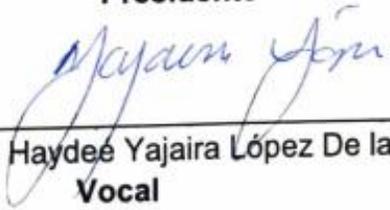
APROBADA



Dra. María Hernández González
Presidente



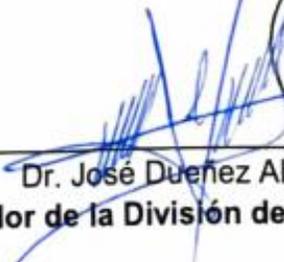
Dra. Ana Margarita Rodríguez Hernández
Vocal



M.C. Haydee Yajaira López De la Peña
Vocal



M.P. Francisco Hernández Centeno
Vocal suplente



Dr. José Dueñez Alanís
Coordinador de la División de Ciencia Animal



Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Junio de 2021

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Evaluación de la conservación de carne de res en un envase activo
polisuccinimida microcelulosa aceite esencial de orégano**

T E S I S

Presentada por

MARIA DE LOURDES ZARAZÚA GUERRERO

y que somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para
obtener el título profesional de

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

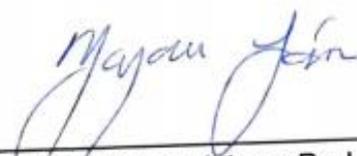
Fue dirigida por el siguiente comité:



Dra. María Hernández González
Asesor principal



Dra. Ana Margarita Rodríguez Hernández
Co-asesor



M.C. Haydee Yajaira López De la Peña
Co-asesor



M.P. Francisco Hernández Centeno
Co-asesor

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México
Junio de 2021

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis símbolo de la culminación de mis estudios universitarios, únicamente a Dios, pues reconozco que ha sido él quien ha puesto a las personas correctas en mi vida, quienes han colaborado en mi desarrollo, quienes me han ayudado a la formación de mi carácter y la persona que soy hoy en día.

Desde la persona más importante que es mi Madre quien me ha educado y me ha enseñado a salir adelante, sin palabras, sino a través del ejemplo del trabajo diario, y también de una manera muy especial a Don Nieves quien fue un personaje importante en mi estancia lejos de casa, quien siempre estuvo para mí, dispuesto a brindarme su mano franca, quien con amor supo darnos un consejo y palabras de aliento, porque ha sido la persona más buena que en la vida me he topado.

Gracias Dios por la fortuna de hoy en día tener a mi madre con salud y gracias por el tiempo que me permitiste convivir con Don Nieves.

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro agradezco el haberme aceptado en esta tan renombrada casa de estudios, gracias por las herramientas brindadas, al Departamento de Ciencia y Tecnología de alimentos por el acceso a laboratorios y equipos necesarios para el desarrollo de conocimientos, gracias a todos los Maestros que contribuyeron con su rol de no solo proporcionar información y promover disciplina, siendo protagonistas del aprendizaje, guías y acompañantes.

Especialmente gracias a la Dra. María Hernández González maravilloso ser humano y mi asesora de tesis, muchas gracias por la oportunidad de trabajar a su lado y empaparme de sus amplios conocimientos y experiencias.

Al Centro de Investigación en Química Aplicada y a la Dra. Ana Margarita Rodríguez Hernández por el apoyo, la confianza y el acceso a las instalaciones y el uso de los equipos y tecnologías con las que cuentan.

Infinitas gracias por todas sus colaboraciones.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	v
CONTENIDO.....	vi
INDICE DE FIGURAS	vii
INDICE DE TABLAS	viii
ABREVIATURAS.....	ix
RESÚMEN	x
I. INTRODUCCIÓN.....	12
JUSTIFICACIÓN.....	13
II. MARCO TEORICO	15
1. Envasado de alimentos	15
1.1. Envasado tradicional.....	15
1.2. Envases Inteligentes.....	16
1.3. Envases activos	17
2. Envases sintéticos y envases biodegradables	22
2.1. Materiales base.....	29
2.1.1 Polisuccinimida.....	29
2.1.2 Microcelulosa.....	31
3. Principales patógenos de cárnicos	33
3.1 Escherichia coli	34
3.2 Staphylococcus aureus.....	35
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	37
4. Materiales y equipos.....	37
4.1. Etapa 1.- Obtención de los materiales base.....	38
4.1.1 Elaboración de Polisuccinimida.	38
4.1.2 Obtención de microcelulosa.	38
4.2. Etapa 2.- Obtención de las probetas para la formación del envase	39
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
5. Etapa no. 1 Características de la probeta	44
6. Etapa no. 2 Características de los microorganismos.....	46
7. Etapa no. 3 Cinética de crecimiento	47
VI. CONCLUSIONES.....	53
VII. LITERATURA CITADA	55
VIII. ANEXOS	59

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Tecnología de envases activos aplicación para frutas y hortalizas.	17
Figura 2 Factores de influencia en la migración de compuestos activos.	24
Figura 3 Factores que influyen en el proceso de degradación de los plásticos biodegradables en el medio ambiente.	27
Figura 4 Proceso general de biodegradación	28
Figura 5 Diferentes categorías de materiales de base biológica.	29
Figura 6 Proceso de síntesis de la polisuccinimida.	30
Figura 7 Agave lechuguilla	32
Figura 8 Riesgo potencial de infecciones en la cadena alimentaria y la carne.	34
Figura 9 Bacteria <i>Escherichia coli</i>	35
Figura 10 Bacteria <i>Staphylococcus aureus</i>	36
Figura 11 Extruder micro compounder	40
Figura 12 Termoconformadora	41
Figura 13 Carne de res inoculada sobre empaque activo MC-PSI.	43
Figura 14 Monitoreo de la temperatura.	43
Figura 15 Identificación <i>E. coli</i> por tinción de gram.	46
Figura 16 Identificación de <i>staphylococcus aureus</i>	47
Figura 17 Cinética de crecimiento <i>E. coli</i>	48
Figura 18 Cinética de crecimiento <i>S. aureus</i>	50

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Sistemas de empaque activo actualmente conocidos.....	18
Tabla 2 Envases activos potenciales para aplicaciones alimentarias	21
Tabla 3 Características según la norma EN 13432, para que un material pueda ser definido “compostable”	26
Tabla 4 Equipos, materiales y reactivos.	37
Tabla 5 Formulación de las mezclas.....	39
Tabla 6 Parámetros equipo Extruder micro compounder Xplor.	40
Tabla 7. Características de cada una de las probetas utilizadas	44
Tabla 8 Inhibición microbiana	45

ABREVIATURAS

BHA	Ácido beta hidróxido
BHT	Butilhidroxitolueno
TBHQ	Terc-butilhidroxitolueno
HDPE ó PEAD	Polietileno de alta densidad
PSI	Polisuccinimida
ST	Almidón
MC	Microcelulosa
AEO	Aceite esencial de orégano
PE	Polietileno
PS	Poliestireno
PP	Polipropileno
CM	Centímetros
ETA	Enfermedades trasmitidas por alimentos
°C	Grados Celsius
ETEC	Enterotoxigénica (Diarrea)
EHEC	Enterohemorrágica (Diarrea)
EIEC	Enteroinvasiva (Diarrea)
EPEC	Enteropatógena (Diarrea)
EAEC	Enteroagregativa (Diarrea)
DAEC	Adherencia difusa (Diarrea)
AEs	Aceites esenciales

RESÚMEN

El envasado alimentario es uno de los temas que en fechas actuales ha tomado relevancia en torno a diversas condiciones que son de gran importancia en diferentes sectores de la sociedad como lo es el ambiental al buscar sustituir el uso de empaques derivados de combustibles fósiles, por materiales de empaque biobasados que contribuyan aminorar este problema. Desde el punto de vista de la tecnología de alimentos, en el sentido de que el empaque debe dejar su papel pasivo de simple contenedor de productos alimenticios por el de ser un agente activo que pueda proporcionar información sobre el estado que guarda el producto contenido en él, hasta contribuir con los procesos de conservación e inocuidad de los alimentos, privilegiando su funcionalización con aditivos de origen natural que se liberen de manera prolongada y sostenida al interior de la matriz alimentaria permitiendo con ello una conservación adecuada, mediante la mínima presencia de aditivos en el producto que será ingerido por los consumidores, reduciendo la consecuente ingesta de los mismos, que ha sido ligada al desarrollo e incremento de diversas enfermedades crónico degenerativas que sufre la sociedad actual.

En este sentido la presente investigación se fijó como objetivo evaluar la eficiencia para detener del desarrollo de dos agentes patógenos alimentarios de amplia prevalencia en los alimentos, como lo son *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* mediante el uso de un material de empaque biobasado de polisuccinimida, almidón y microcelulosa, funcionalizado con concentraciones del 4.50, 6.00 y 7.00% de un extracto de aceite esencial del orégano alto en contenido de timol, que dicho sea de paso contribuye también en el mejoramiento de las propiedades mecánicas del envase, que es una de las principales áreas a mejorar en este tipo de envases. Los materiales base fueron elaborados respetando los lineamientos de la química verde, preservando el sentido ecológico que se promueve vía la sustitución de los envases sintéticos por biobasados. Las probetas elaboradas con los materiales base fueron de forma rectangular simulando las charolas que para la comercialización de carnes frescas actualmente se emplean, en ellos fueron colocadas muestras de carne de res molida, ya que debido a sus condiciones de manejo resulta altamente sensible al deterioro microbiano. se inocularon al 10% con

un inóculo de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, debidamente caracterizadas y propagadas en medios específicos para dicho propósito, equivalentes al tubo 4 en la escala de Mc Farland. Las muestras fueron almacenadas a 15 °C, con la intención de presentar condiciones propicias para la propagación de las cepas a estudiar. Se monitorearon a intervalos de 12, 24 y 72 hs, siguiendo los procedimientos indicados en la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994 para el conteo colonial en medio sólido incubado aeróbicamente. Los resultados evidenciaron la capacidad del compuesto PSI-ST-MC funcionalizado al 7.00% para inhibir el desarrollo de *E. coli* en un ciclo logarítmico a las 72 hs de contacto. En el caso de *S. aureus* El compuesto funcionalizado al 4.50% permite una reducción de dos ciclos logarítmicos después de 24 hs de contacto y su eliminación total después de 72 hs o bien a las 24 hs bajo una concentración del 6.00%. Por lo que es posible indicar que el compuesto, permite una liberación prolongada y estable, y es además adecuado para su uso comercial debido a la capacidad de contener las muestras bajo las formas del almacenamiento y manipulación convencional.

I. INTRODUCCIÓN

El envasado activo de alimentos tiene actualmente una gran demanda en la industria alimentaria para brindar protección a los alimentos. El envasado de alimentos no sólo se utiliza para almacenar y proteger los alimentos del medio ambiente, sino también para aportar valores funcionales con la incorporación de agentes activos. Los aceites esenciales (AE) extraídos de una gran variedad de plantas representan ingredientes activos de origen natural que proporcionan numerosos beneficios para las industrias de alimentos, aromaterapia, farmacéutica y envasado de alimentos debido a sus propiedades funcionales.

Los materiales y la tecnología de embalaje eficientes garantizan la adecuada seguridad y calidad de nuestros productos alimenticios desde el procesamiento y la fabricación hasta la manipulación, el almacenamiento y finalmente el consumo. Los polímeros y materiales utilizados para el envasado de alimentos hoy en día consisten en una amplia gama de materiales plásticos derivados del petróleo, metales, vidrio, papel y cartón, o combinaciones de los mismos. Con la excepción de papel y cartón, todos estos materiales de embalaje son en realidad basados en materiales no renovables, lo que implica buscar nuevas alternativas basadas en recursos renovables, para crear impacto positivo sobre el medio ambiente.

Es así como la celulosa toma gran importancia ya que los envases una vez que cumplen su función (contención, protección, transporte y comunicación,) se convierten en basura, en este sentido los consumidores toman más conciencia y se observa un rechazo del plástico y mayor aceptación por envases más sostenibles como la combinación de materiales celulósicos y biopolímeros sintetizados a través de la química verde, formando así envases compostables y con algunas funciones adicionales, conferidas gracias a la inclusión de aditivos preferentemente naturales, formando así los denominados empaques activos biobasados.

JUSTIFICACIÓN

El envasado de alimentos tiene la principal función de proteger el producto y preservarlo de la contaminación externa en las últimas décadas, se ha producido un gran desarrollo tecnológico en este campo tanto para asegurar la calidad y seguridad del alimento como para alargar su vida útil. Entre las innovaciones más destacadas se encuentran las que se han llevado a cabo en lo que se conoce como envasado activo.

En cuanto a la percepción de los problemas de contaminación se pretende desarrollar empaques que sean biodegradables o biobasados que permitan la reducción ó eliminación de los residuos vertidos al medio ambiente. Aun cuando los envases sean de materiales diferentes al plástico, estos requieren de una película plástica o revestimiento para proteger completamente el producto contenido.

Los envases biodegradables se producen utilizando biopolímeros, moléculas que a menudo se encuentran en organismos vivos, como la celulosa y las proteínas. Esto significa que pueden consumirse de forma segura, degradarse rápidamente y, a menudo, crearse a partir de productos de desecho de la producción agrícola.

La polisuccinimida (PSI) es un biopolímero amigable con el medio ambiente por ser biodegradable, no tóxico, y producido a través de la química verde. La PSI ha tenido relevancia debido a la diversidad de aplicaciones que puede tener en las industrias cosméticas, farmacéuticas, alimentaria, solo por mencionar algunas al ser un compuesto biocompatibles y biodegradable, que permite su incorporación y uso favoreciendo los procesos de biodegradabilidad e inocuidad. La PSI fue probada exitosamente en combinación con el almidón para la formación de un biocompósito cuya principal área de oportunidad era el de la baja resistencia mecánica que poseía misma que fue solventada al incorporarle, microcelulosa, dicho compósito presentó adecuada actividad antimicrobiana como fue reportado en el trabajo realizado por este grupo de investigación (Espinoza, 2019) donde se pudo apreciar la capacidad antimicrobiana frente a bacterias como *Escherichia coli* y *Salmonella ssp*, realizado en un estudio un vitro por lo que es importante evaluar si esas propiedades se mantienen y en que niveles, en un estudio sobre un alimento altamente perecedero como es la carne molida.

1. HIPÓTESIS

H₀: Es posible reducir el riesgo de deterioro por patógenos alimentarios en carne de res contaminada, si esta es conservada en un envase activo a base de PSI-ST-MC-AEO.

H_a: El riesgo de deterioro por patógenos alimentarios en carnes de res contaminada, no se ve afectado al ser conservada en un envase activo a base de PSI-ST-MC-AEO.

2. OBJETIVOS

2.1. General. Evaluar el deterioro en carnes de res colonizada por patógenos alimentarios envasada en un compósito PSI-MC en comparación con envases comerciales

2.2. Específicos.

- Obtener polisuccinimida y microcelulosa para elaborar contenedores a base del compósito PSI-MC.
- Envasar pulpa de res conteniendo un inóculo infeccioso de patógenos alimentarios y almacenarla en condiciones de temperatura controlada.
- Monitorear las variables de respuesta concernientes al desarrollo del inóculo microbiano presente en carne molida almacenado en el compósito PSI-ST-MC, en presencia y ausencia de AEO.
- Analizar estadísticamente los datos obtenidos para emitir conclusiones.

II. MARCO TEORICO

1. Envasado de alimentos

1.1. Envasado tradicional

El envasado tradicional ha sido diseñado con el fin de almacenar y transportar alimentos, la principal función es protegerlos del entorno o de alguna posible contaminación externa, con el envasado también se abarcan otros aspectos como lo son la prevención o reducción del daño, el deterioro en la calidad de los productos (Ibarra, 2016). El empaque fue definido por el ya desaparecido Packaging Institute Internacional, como el envoltorio de productos, artículos o paquetes en una bolsa, caja, bandeja, lata, tubo o botella u otra forma de recipiente para realizar una o más de las siguientes funciones: contención, protección, preservación, comunicación utilidad y desempeño. Si el contenedor realiza una o más funciones es considerado como un paquete. Existen otras definiciones de embalaje incluyendo un sistema coordinado de preparación de mercancías para el transporte, distribución, almacenamiento (Coles, 2011).

El conocimiento del consumidor, sus intereses y percepciones sobre las funciones del empaque son factores fundamentales para su aceptación o rechazo de tecnologías de envasado emergentes (Brennan et al., 2021), generalmente es considerado como que el empaque tiene un impacto negativo para el medio ambiente, es necesaria la innovación de nuevos envases que sean más amigables con el medio ambiente o reduzcan el impacto negativo.

La tecnología del envasado debe equilibrar la protección de los alimentos con otras cuestiones incluidas costos de energía y materiales, aumento en la demanda social, la conciencia ambiental, hasta su desecho como residuos sólidos urbanos (Marsh & Bugusu, 2007). Se contemplan tres distintos niveles de embalaje, el empaque primario que es el que tiene el contacto directo con el alimento, después el secundario que ayuda a mantener en buen estado físico el producto y un empaque terciario que contiene muchas unidades de empaque secundario (Robertson, 2018).

Los envases plásticos petroquímicos son los principalmente utilizados debido a sus propiedades tan favorables como lo son su barrera hacia el O₂, resistencia al desgarro, resistencia a la tracción, sin embargo, también poseen grades desventajas entre las cuales destacan la baja transmisión al vapor de agua y el no ser biodegradables generando contaminación ambiental (Jabeen, 2015).

1.2. Envases Inteligentes

Cada día el consumidor es más exigente y la industria se mantiene en pie respondiendo a esas exigencias: calidad, seguridad e inocuidad. Un envase inteligente es definido como un sistema que monitoriza las condiciones del producto envasado, siendo capaz de registrar y aportar información sobre la calidad del producto o estado del envase, exponiendo las posibles prácticas anormales que haya sufrido el alimento o el envase durante la cadena de suministro (Rodríguez Saucedo et al., 2014).

Los mecanismos de alteración del alimento son debido a procesos fisiológicos, químicos y biológicos, que responden y comunican cambios en la condición del producto como tiempo-temperatura, oxígeno, dióxido de carbono, crecimiento microbiano, etc. A menudo esta tecnología se complementa con biosensores para detectar, registrar y transmitir la información.

Existen diferentes tipos de envases inteligentes como los son indicadores tiempo-temperatura, indicadores de color, indicadores de patógenos e indicadores de fugas.

Los indicadores tiempo-temperatura están basados en función de su principio activo, y se dividen en tres tipos: los sistemas físicos estos dependen básicamente de un fenómeno de absorción o difusión (Herranz et al., 2012), un modelo común se basa en etiquetas multicapa que contienen un tinte o reactivo que es absorbido por una capa porosa, en la cual la presencia de color indica la historia térmica del producto.

Los sistemas biológicos emplean indicadores enzimáticos, y los sistemas químicos se basan en reacciones químicas de polimerización, como por ejemplo la polimerización de cristales de diacetileno disustituidos, que dan como resultado un polímero coloreado. El

empaque inteligente basado en colorantes y biopolímeros se ha introducido como la última tecnología (Alizadeh-Sani et al., 2020).

1.3. Envases activos

En el envasado tradicional el empaque funciona como una barrera física o sea de forma pasiva, existen algunas excepciones, como los productos frescos para los cuales son altamente permeables a los gases o se utilizan materiales de embalaje perforados que permitan el intercambio de los mismos.

En el envasado activo, el envase participa activamente en la conservación del producto generalmente absorbiendo compuestos que deterioran el alimento o emitiendo compuestos que ayudan a su preservación (Pradas & Moreno, 2016). La figura 1 muestra la tecnología de envases activos para su aplicación en la conservación de frutas y hortalizas.

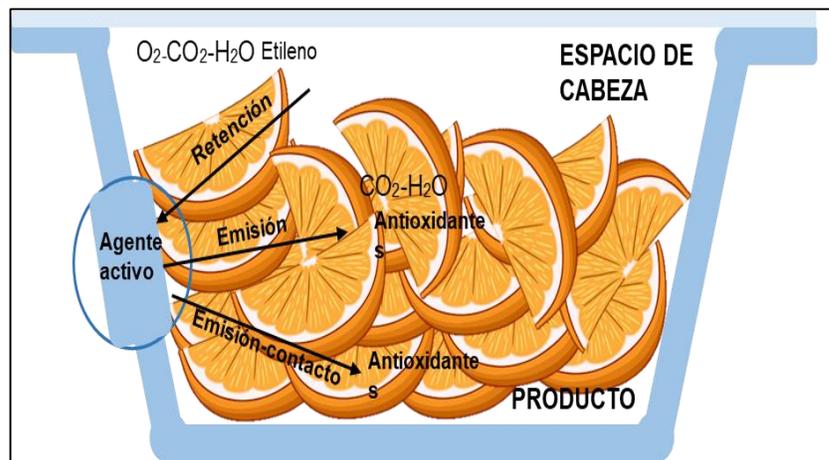


Figura 1 Tecnología de envases activos aplicación para frutas y hortalizas.

(Gavara, n.d.)

Los sistemas de envasado activo frecuentemente usan componentes que incluyen captadores de oxígeno, captadores de etileno, antioxidantes, antimicrobianos, absorbentes o liberadores de aromas y sabores (Schaefer & Cheung, 2018). El control del oxígeno en el envasado de alimentos es importante para limitar las reacciones de deterioro en los alimentos ya que un nivel alto puede facilitar el crecimiento microbiano, el desarrollo de colores y sabores extraños, así como cambios y pérdidas

nutricionales. Los sistemas más comunes de absorción de oxígeno son la oxidación de polvo de hierro por medios químicos o la eliminación mediante el uso de enzimas (Ozdemir & Floros, 2004). La tabla 1 presenta los sistemas de empaque activo actualmente conocidos.

Tabla 1 Sistemas de empaque activo actualmente conocidos

Tipos de sistemas de empaque	Sustancias utilizadas y modo de acción
Absorbente de oxígeno	Sistemas enzimáticos (glucosa oxidasa-glucosa, alcohol oxidasa-etanol vapor). Sistemas químicos (óxido de hierro-azufre, sal de sulfito-sulfato de cobre, oxidación de colorantes fotosensibles, oxidación de ácido ascórbico, conversión catalítica de oxígeno por catalizador de platino).
Emisores o absorbentes de dióxido de carbono	Polvo de hierro-hidróxido de calcio, carbonato ferroso-haluro metálico.
Absorbente de humedad	Gel de sílice, propilenglicol, alcohol polivinílico, tierra de diatomeas.
Absorbente de etileno	Carbón activado, gel de sílice-permanganato de potasio, tierra de diatomeas, bentonita, tierra de batán, polvo de dióxido de silicio, piedra de oya en polvo, zeolita, ozono.
Liberación de antimicrobianos	Sorbatos, benzoatos, propinatos, etanol, ozono, peróxido, óxido de azufre, antibióticos, zeolita de plata, sales de amonio cuaternario.
Liberación de antioxidantes	Ácido beta hidróxido (BHA), Butilhidroxitolueno (BHT), Terc-butilhidroquinona (TBHQ), ácido ascórbico, tocoferol.
Absorción de sabor	Bicarbonato de sodio, carbón activado.
Emisores de sabor	Muchos sabores de comida.
Contenedores de colores	Varios colores alimentarios.
Agentes anti niebla y anti adherentes	Vinylon biaxialmente orientado, polietileno de alta densidad (HDPE) orientado laminado por compresión.
Agentes para absorber luz y control de temperatura	Agentes bloqueadores de rayos UV, hidroxibenzofenona.
Monitores	Indicadores tiempo-temperatura.
Controladores de temperatura	Plástico microperforado no tejido.
Agentes permeables a los gases / permeabilidad	Películas con tratamiento superficial, perforadas o microporosas.

(Ozdemir & Floros, 2004)

A pesar de que los alimentos sensibles al oxígeno pueden ser empacados apropiadamente haciendo uso de atmósferas modificadas o envasado al vacío, estas tecnologías no siempre eliminan el O₂ por completo, incluso el O₂ que penetra a través del envase no siempre puede ser eliminado. Sin embargo, mediante el uso de un captador, el oxígeno residual puede ser absorbido después de envasado (Vermeiren et al., 1999).

Una de las tecnologías más comúnmente usadas es la colocación de un pequeño sobre el cual contiene hierro, al ser altamente a fin al oxígeno es transformado a óxido de hierro, sin embargo su incorporación en alimentos conlleva el riesgo de ser ingerido de manera accidental principalmente por niños, por ello la importancia de contener la leyenda "No comer", por cuestión de seguridad y fines reglamentarios exigidos por la ley de Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos.

Además del óxido ferroso que es el más comúnmente utilizado también se incluyen otros compuestos entre ellos ácido ascórbico, sulfitos, catecol, colorantes fotosensibles, hidrocarburos insaturados, y enzimas como la glucosa oxidasa. Para evitar que los captadores de oxígeno actúen de manera prematura, mecanismos especializados pueden desencadenar la reacción de barrido, un ejemplo de ello son los tintes fotosensibles irradiados con la luz ultravioleta activan la eliminación de oxígeno (Packaging, 2008).

En el caso de los envases activos antioxidantes tienen la finalidad de evitar la oxidación de los alimentos a través de una mejor aplicación de los compuestos, y evitando el aumento innecesario de aditivos incorporados directamente en la formulación del producto ya que favorecen una rápida reacción con el alimento y disminuyen su efectividad en el tiempo (Activos et al., 2011). Este enfoque requiere la incorporación intencional de antioxidantes en materiales de envasado y su posterior migración a los alimentos (Robertson, 2018), la investigación ha tomado el rumbo hacia el uso de antioxidantes naturales como antioxidantes puros o a través del uso de extractos ricos en ellos, entre los cuales destacan extractos de cacao, té verde, orégano, aceite esencial de citronela, la mayoría de ellos son ricos en compuestos fenólicos y flavonoides y el extracto de caléndula que es rico en carotenoides (Colín-Chávez et al., 2014).

Los antioxidantes sintéticos son los aditivos más utilizados para prevenir y/o retardar el proceso oxidativo, dichos aditivos recibieron gran interés debido a preocupaciones toxicológicas, lo que condujo mayor enfoque a fuentes naturales (Souza et al., 2013), principalmente extractos naturales de hierbas, frutas, plantas y algunas especias que han sido ampliamente estudiadas como aditivos alternativos para la conservación de alimentos, por mencionar algunos se tiene que la adición de romero, los extractos de orégano, oliva, semilla de uva o cítricos retardan los procesos oxidativos en la carne (Contini et al., 2014).

Las plantas tienen potencial para reducir la dependencia de productos químicos sintéticos, ya que tienen la capacidad de sintetizar una gran cantidad de metabolitos secundarios (fenoles, flavonas, flavonoles, flavonoides, quinonas, taninos y cumarinas). Los componentes con estructuras fenólicas como carvacrol, eugenol, y timol muestran ser extremadamente activos contra patógenos, lo cual ayuda a crear envases con una aplicación directa obteniendo empaques activos antimicrobianos (Ananda et al., 2017).

En las frutas y hortalizas frescas se desprende etileno, gas que estimula y regula la maduración. Al captar y eliminar el etileno se puede lograr alargar la vida útil de productos frescos. Para dicho propósito existen tres tipos principalmente, el primero se basa en su reducción a través de una atmósfera modificada, un segundo mediante el uso de materiales de empaque perforados que permitan el intercambio dentro y fuera del mismo, y el tercero con absorbentes que funcionan por medio de una reacción química entre dos materiales (adsorción), o que retiene físicamente la molécula de etileno (adsorción) (Alimentaria et al., 2020).

De la misma manera que los absorbentes de oxígeno los sistemas captadores de etileno implican la inclusión de un pequeño sobre o bolsita que contenga un eliminador apropiado en el envase o la incorporación de un absorbente en la estructura de la película. El componente activo más utilizado es el permanganato de potasio para oxidar/inactivar el etileno, si embargo este no debe estar en contacto directo con el alimento debido a su alta toxicidad (Yildirim et al., 2018).

A menudo con el proceso al que son sometidos los productos a elaborar suelen perderse o degradarse sabores, por ello existe la necesidad de reemplazar los componentes de sabores perdidos, un ejemplo de ello son los fabricantes de café instantáneo seco a menudo llenan el espacio de cabeza con volátiles destilados del proceso de deshidratación para entregar fragancia a café recién hecho cuando el paquete es abierto por primera vez. En el caso contrario los absorbentes de sabor eliminan sabores y aromas indeseables. La tabla 2 proporciona una descripción general de las principales tecnologías de envasado activo y los posibles beneficios en aplicaciones alimentarias.

Tabla 2 Envases activos potenciales para aplicaciones alimentarias

Tipo de envase activo	Tipo de comida	Beneficio potencial
<i>Sistemas de barrido activos (Absorbedor)</i>		
Eliminador de oxígeno	Productos cárnicos cocidos(en rodajas), queso rallado, productos de panadería (parcialmente horneados), jugos de frutas y verduras, semillas, nueces y aceite; polvos instantáneos que contienen grasas, snacks fritos; productos cárnicos secos	Prevención de: crecimiento de moho, decoloración, pardeamiento, rancidez y retención en el contenido de vitamina C
Eliminador de Humedad	Hongos, tomates, fresas, maíz, cereales, semillas, pescado fresco y carne.	Mantenimiento del contenido de humedad, disminución de la condensación de humedad en el empaque, impacto positivo en apariencia, reducción de obscurecimiento o decoloración
Eliminador de oxígeno	Frutas y verduras climatéricas	Reducción de la maduración y senescencia
<i>Sistemas de descargas activos (emisor)</i>		
Liberador de antioxidantes	Polvos instantáneos que contienen grasas, semillas, nueces y aceites, productos fritos	Mejora de la calidad oxidativa
Emisor de dióxido de carbono	Pescado y carne frescos	Prolongación de la vida útil microbiológica, reducción del volumen del espacio de cabeza de los envases en atmósfera modificada
Sistema de envasado antimicrobianos	Carne fresca y procesada, pescado fresco y ahumado, mariscos frescos, productos lácteos, frutas y verduras frescas y procesadas, granos, cereales y productos de panadería, comidas listas para consumir	Inhibición o retraso del crecimiento bacteriano

(Yildirim et al., 2018)

La función de las sustancias activas cuando son añadidas directamente a los alimentos corren el riesgo de inhibirse o reducirse, como resultado de la interacción entre sustancias activas y los componentes alimentarios por tanto su adición directa a los envases puede ser mas eficaz.

2. Envases sintéticos y envases biodegradables

Hoy en día el plástico forma parte esencial de nuestra vida cotidiana, los envases son indispensables para proteger algunos productos, ayudan a reducir el desperdicio de los alimentos desde su origen de producción hasta la llegada a manos del consumidor final, de acuerdo con un informe de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), se explica que una de las razones por las cuales los productos alimenticios se estropean es el embalaje inadecuado de los mismos, proporcionando datos comparativos, Europa con un 3% de producto dañado, frente a un 40% en los países en vías de desarrollo (Mora Barrantes, 2013).

Los plásticos son un variado grupo de materiales de origen orgánico, cuya característica fundamental y que le da nombre es su capacidad de ser moldeados con relativa facilidad, están constituidos por macromoléculas denominadas polímeros cuyo principal componente es el carbón, estos se constituyen a su vez por pequeñas unidades químicas llamadas monómeros, que se unen por medio de una reacción llamada polimerización.

Los plásticos son elaborados a partir de materias primas minerales como petróleo, gas natural, y hulla (carbón), o bien vegetales como el látex (procedente de árboles tropicales) o la celulosa. Es así como sus características: baja densidad (es decir son ligeros en proporción a su volumen), su punto de fusión bajo (que les permite ser moldeados con solo aplicar un poco de calor), el ser insolubles en agua, además de no conducir el calor, ni la electricidad, del mismo modo se vuelven frágiles ante los agentes atmosféricos.

Así pues, el uso de polímeros derivados del petróleo como polietileno (PE), poliestireno (PS), polipropileno (PP), etc., están dominando el campo del embalaje pero estos materiales, no son amigables con el medio ambiente, hoy en día las personas son más

conscientes en este aspecto lo que conduce a la búsqueda de sistemas de envasado eco-amigables (Ananda et al., 2017).

Actualmente se dispone de una amplia gama de diferentes materiales con características adecuadas que cubren las necesidades de las sucesivas fases de la manipulación, transporte, almacenamiento y comercialización de diversos productos, los materiales tradicionales son tales como la madera, el cartón o las fibras naturales, así mismo día a día crece la utilización de materiales plásticos que sustituyen a los materiales convencionales, (Perdomo, 2002).

Para elegir un material lo más adecuado posible, es necesario revisar distintas características técnicas como lo son los métodos de recubrimiento, la facilidad de termosellado, los efectos sobre propiedades físicas y mecánicas de la película, los efectos sobre el color, textura, o el sabor de los alimentos, si existe la capacidad del agente activo ya sea antimicrobiano, antioxidante, etc. Para proporcionar eficacia en todo el paquete y/o ciclo de vida (Taylor & Cooksey, 2007).

Los materiales basados en recursos renovables están siendo desarrollados a un ritmo creciente, hoy en día el único material biodegradable usado comercialmente en el ámbito de envasado de alimentos, está basado en la celulosa, no obstante materiales a base de proteínas, almidones, polilactato, están en desarrollo para el día de mañana formar parte del envasado de alimentos (Taylor, Weber, et al., 2010).

El uso de nuevos materiales de envasado de alimentos ha elevado el número de peligros que ocurren debido a la migración desde el empaque hacia el alimento, a pesar de que los polímeros han monopolizado principalmente el interés de pruebas de migración y experimentación, estudios recientes han revelado que la migración también se produce a partir de materiales tradicionales, que generalmente han sido considerados como seguros, (papel, cartón, madera, cerámica, etc.). Lo que conlleva a la Unión Europea a volverse más estricta respecto a las regulaciones y lineamientos (Taylor, Arvanitoyannis, et al., 2010).

A continuación, en la figura 2, se presentan los factores que pueden influir en la migración de compuestos activos de los aceites esenciales en el envasado de alimentos a los alimentos.

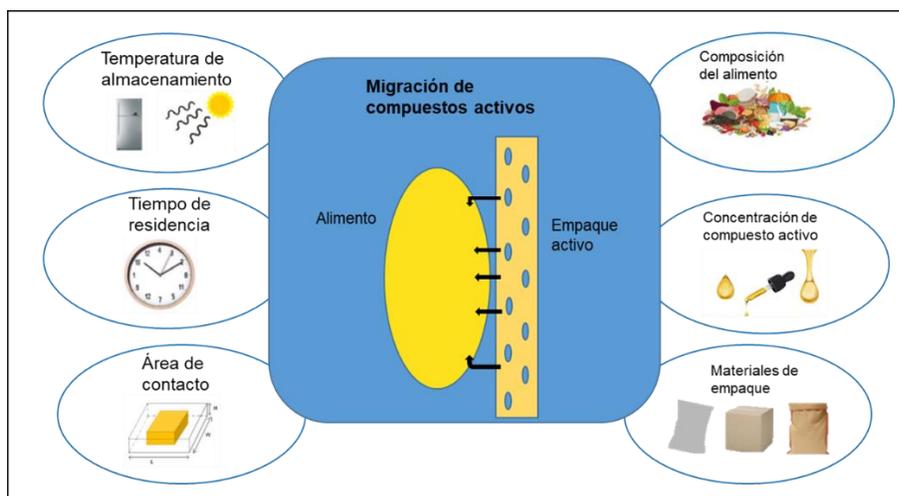


Figura 2 Factores de influencia en la migración de compuestos activos.

(Marsin et al., 2020)

Se estima que los plásticos sintéticos tardan más de 50 años para ser degradados por completo, generalmente la reincorporación ambiental comienza con la fotodegradación lo que conduce a una degradación termo-oxidativa, la luz ultravioleta del sol proporciona la energía de activación requerida para iniciar la incorporación de átomos de oxígeno en los polímeros con esto el plástico se vuelve frágil y se rompe en pedazos más pequeños hasta que las cadenas del polímero alcanzan un peso molecular lo suficientemente bajo para ser metabolizadas por microorganismos (Jafarzadeh et al., 2020).

La propiedad de biodegradabilidad no depende de los recursos base del material, esta característica, se relaciona directamente con la estructura química de un polímero.

El termino bioplástico es vago ya que existe un gran número, cada vez mayor de polímeros alternativos que surgen en el mercado y la falta de características bien definidas sugieren que para ser clasificado como bioplástico debe entrar en alguna de las siguientes categorías: Plásticos de base biológica (plásticos parcial o totalmente hechos de recursos biológicos) tales como granos, tubérculos con almidón, caña de azúcar o aceites vegetales. Plásticos biodegradables (que pueden degradarse naturalmente por

microorganismo presentes en el agua, dióxido de carbono, metano y materia inorgánica en determinadas condiciones) (Kakadellis et al., 2021).

Actualmente existen tres métodos principales para manejar los desechos plásticos: enterramiento en verdadero, incineración y reciclaje. En cuanto al reciclaje son procesos relativamente costosos e ineficientes, en el caso de los enterramientos en verdadero y la incineración crean una fuente de factores ambientales secundarios contaminantes que conducen a la formación de numerosos compuestos nocivos, los cuales en su mayoría son liberados a la atmosfera. Por tanto la biodegradación se convierte en una alternativa atractiva, ya que por lo general es un proceso más barato, potencialmente más eficiente y no produce contaminantes secundarios (Jafarzadeh et al., 2020). Los biopolímeros utilizados como materiales de envasado de alimentos se convierten en la opción ideal, debido al gran potencial para reemplazar los plásticos a base de petróleo, creando impacto en la salud del consumidor y el medio ambiente (Stoica et al., 2020).

Teóricamente el plástico es completamente degradable solo bajo ciertas condiciones específicas, y la degradación en el medio natural sigue siendo algo incierto. La biodegradación ocurre por la acción de enzimas y/o destrucción química con bacterias, hongos y algas (*Penicilliumchrysogenum*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Serratia marcescens*, y *Rhodotorula mucilaginosa*).

Generalmente la biodegradación puede realizarse en dos pasos, el primero mediante de una degradación biofísica: al convertir polímeros, en fragmentos de los mismos por medio de reacciones abióticas como son oxidación, fotodegradación, hidrólisis) o reacciones bióticas (es decir degradación por microorganismos); los componentes poliméricos están hidrolizados, ionizados o protonados para romperse en fragmentos de oligómero debido al crecimiento de células biológicas y la estructura molecular el polímero permanece sin cambios. El segundo paso la degradación bioquímica: asimilación biológica de los fragmentos del polímero y su mineralización a través de la acción directa de microorganismos o enzimas, el polímero se descompone oxidativamente hasta ser degradado en pequeñas moléculas de dióxido de carbono y agua (Zhu & Wang, 2020).

El Comité Europeo de normalización, en cuanto a las características que un material debe poseer para poder ser definido como biodegradable o compostable, pone a disposición la norma europea EN 13432 que lleva por título "Requisitos de los envases y embalajes valorizados mediante compostaje y biodegradación. Programa de ensayo y criterios de la evaluación para la aceptación final de envase o embalaje".

El termino compostable se refiere a normas relacionadas con la toxicidad del material descompuesto bajo condiciones si se abandona en el medio ambiente. Parte de los objetivos de esta norma consiste en definir conceptos cada vez más difundidos entre ellos el termino compostable, y según dicha norma debe cumplir con las características mencionadas en la tabla 3, (ecozema, 2021).

Tabla 3 Características según la norma EN 13432, para que un material pueda ser definido "compostable".

Características de un envase o material compostable	
Degradarse como mínimo un 90% en 6 meses	Valores obtenidos a través del método estándar EN 14046
Al cabo de 3 meses la masa del material debe estar constituida como mínimo 90% de los fragmentos de dimensiones inferiores a 2 mm	Valores obtenidos a través del método estándar EN 14045
El material no debe tener efectos negativos sobre el proceso de compostaje	
Baja concentración de metales pesados incorporados en el material	
Valores de pH	Dentro de los límites establecidos
Contenido salino	Dentro de los límites establecidos
Concentración de sólidos volátiles	Dentro de los límites establecidos
Concentración de nitrógeno, fosforo, magnesio y potasio	Dentro de los límites establecidos

(ecozema, 2021)

Numerosas cantidades de plástico distribuidas en todo el planeta se atribuyen a la baja eficiencia de recolección, se encuentran en un entorno natural no apropiado, como la tierra, el océano y atmosfera, donde las condiciones pueden ser no adecuadas para la biodegradación.

En la figura 3 se presentan los factores que influyen en el proceso de degradación, tipos y formas de plásticos biodegradables, condiciones de degradación y el tiempo (Zhu & Wang, 2020).

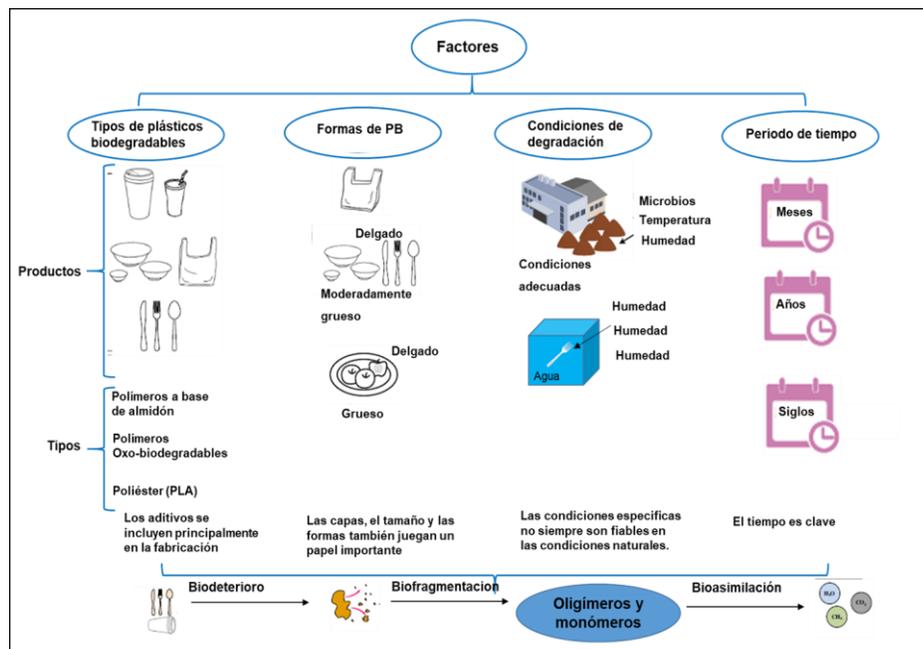


Figura 3 Factores que influyen en el proceso de degradación de los plásticos biodegradables en el medio ambiente.

(Zhu & Wang, 2020)

Es importante hacer una distinción entre los términos biopolímero y polímero biodegradable, el biopolímero tiene una base en sustratos renovables, y los polímeros biodegradables son materiales que sufren una degradación la cual tiene como resultado sustancias inorgánicas con la generación de CO₂, CH₄ y H₂O, ya sea en condiciones aeróbicas y anaeróbicas por la acción enzimática de microorganismos (Srivastava et al., n.d.).

Debido al tamaño molecular de los polímeros y a su falta de solubilidad en agua, los microorganismos no son capaces de transportar el material polimérico a sus células donde la mayoría de procesos bioquímicos tienen lugar, por lo que inicialmente excretan enzimas extracelulares que depolimerizan el material fuera de las células (Figura 4).

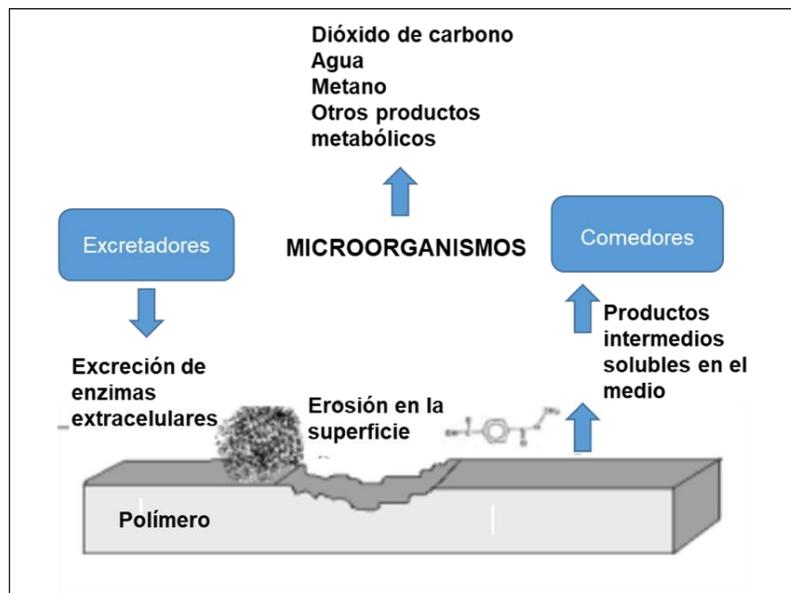


Figura 4 Proceso general de biodegradación

Los biopolímeros pueden ser divididos en tres grupos principalmente, basados en su origen y producción, el grupo 1 está conformado por polímeros que son directamente obtenidos de la biomasa, ciertos polisacáridos (almidón, celulosa, proteínas (caseína y gluten)) representan esta categoría, son deficientes en el embalaje con productos húmedos, pero cuentan con excelentes propiedades de barrera a los gases.

El grupo 2 incluye materiales poliméricos que son sintetizados por un procedimiento de polimerización clásico como copolímeros aromáticos alifáticos, poliésteres alifáticos, polilactida, copolímero alifático, utilizando biobasados renovables monómeros como poliácido láctico y a base de aceite monómeros como policaprolactonas.

Los polímeros del grupo 3 son los producidos por microorganismos o bacterias modificadas genéticamente, hasta la fecha este apartado consiste principalmente en polihidroxi-alcanoatos, pero investigaciones con bacterias también están desarrollando celulosa y otros polisacáridos (Ajay et al., 2018).

La figura 5 expone un panorama de lo descrito anteriormente, las diferentes categorías de los materiales de base biológica.

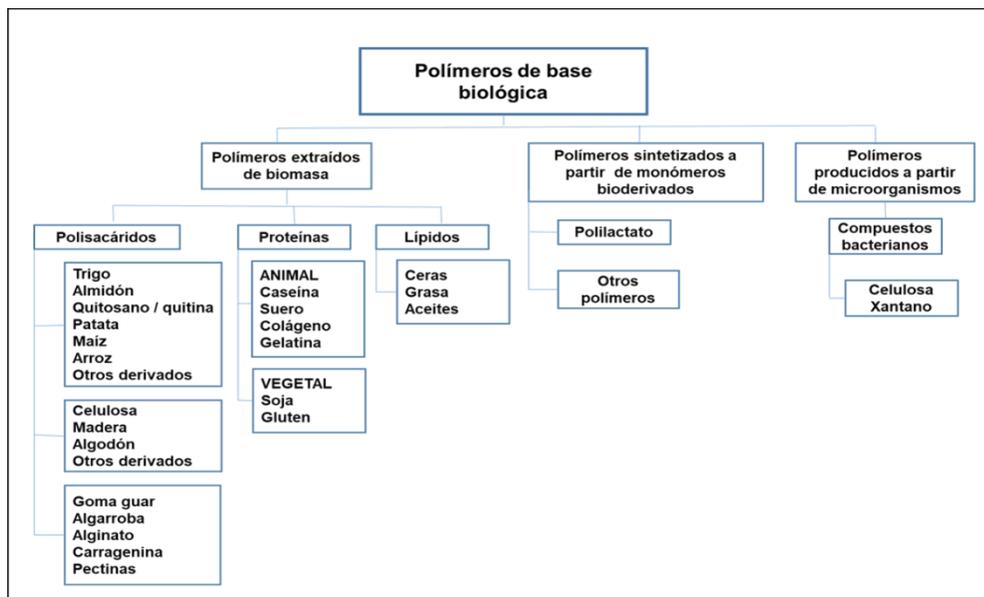


Figura 5 Diferentes categorías de materiales de base biológica.

(Ajay et al., 2018)

Como anteriormente se definió, existe una gran variedad de materiales biobasados que actualmente han sido estudiados para ser empleados en el desarrollo de bioempaques, a continuación, se describen algunos de ellos.

2.1. Materiales base.

A continuación se desarrollan los elementos principales con los cuales fue elaborado el empaque activo.

2.1.1 Polisuccinimida

El poli (2,5-1,3-pirrolidindiilo) una macromolécula amorfa no toxica comúnmente conocida como polisuccinimida (PSI), esta poliimida se puede sintetizar a través de la polimerización térmica del ácido aspártico obteniendo agua como subproducto, aunque PSI es insoluble en agua, se vuelve soluble en compuestos orgánicos. Los anillos de imida de PSI son susceptible a modificaciones químicas para introducir nuevas funcionalidades a lo largo de su columna vertebral conservando su propiedad de biodegradabilidad y biocompatibilidad, por lo cual PSI presenta una amplia gama de propiedades y aplicaciones (Velazco-de-la-garza et al., 2020).

Diferentes derivados de PSI que incluyen ácido poliaspártico y poliaspartamidas se han sintetizado de forma similar a estructuras péptidas y se ha usado como polímeros solubles en agua, biodegradables y biocompatibles para varias aplicaciones (Jalalvandi & Shavandi, 2018). Dentro de las innovaciones de los usos de la PSI se ha encontrado una gran efectividad en la eliminación de tintes utilizados en diferentes industrias como lo son la textil, alimenticia, cosmética y de impresión, a través de la síntesis de una resina a base de PSI, contribuyendo así a la trata correcta de efluentes de estas industrias y colaborando al cuidado de cuerpos de agua, como ríos, lagos, etc. (Mansha et al., 2020).

En el área de medicina gracias a la propiedad de biodegradación, es empleada en la elaboración de una malla fibrosa competente que no obstaculiza la integración de tejidos in vivo, sin presentar efectos citotóxicos (Voniatis et al., 2020), gracias a todos estos resultados es considerado el desarrollo de bio y nanomateriales a partir de polisuccinimida (Salakhieva et al., 2016). En la Figura 6 Se muestra la reacción de polimerización del ácido aspártico a polisuccinimida.

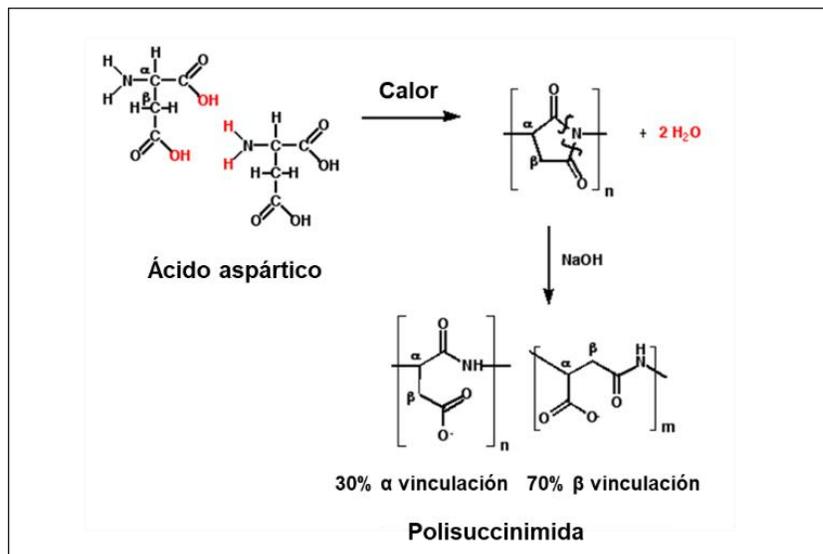


Figura 6 Proceso de síntesis de la polisuccinimida.

(Cann, 2021)

La producción de PSI a través de la química verde va en aumento ya que es un compuesto biodegradable, inclusive se comercializa y vende como inhibidor de la

corrosión, la incrustación, agente dispersante, aditivo para el agua residual y también como polímero agrícola. Gracias a que empresas como Donlar Corporation que invierten en la fabricación, composición y uso final de su tecnología biomedioambiental (Cann, 2021).

2.1.2 Microcelulosa

La celulosa es el componente fundamental de la pared celular de las células vegetales por tanto la celulosa es el compuesto orgánico natural más abundante y por lo tanto una materia prima potencial, se encuentra combinada generalmente con sustancias como lignina, hemicelulosa, pectinas y ácidos grasos, en el algodón y el lino las fibras de celulosa son de gran pureza (90-96%) y tienen aplicación textil, sin embargo el consumo mayor de celulosa está en la producción de papel y cartón muchas veces empleado para envases y embalajes (Tejedor, 2021).

La nanocelulosa incluye principalmente nanocristales de celulosa, nanofibras de celulosa y nanofibras bacterianas, las principales características de nanocelulosa tienen una gran superficie y relación de aspecto excelentes propiedades mecánicas y de baja expansión térmica. Las principales fuentes provienen de desechos de la agricultura, como son paja de trigo, corteza de morera, cáñamo, algodón, celulosa de algas y bacterias.

Dentro de las fibrillas de celulosa, cadenas de celulosa ordenadas o las regiones cristalinas están conectadas con regiones desordenadas o amorfas, para la producción de nanocelulosa es principalmente hidrolizado con ácido, seguido de la eliminación de las regiones amorfas en las fibrillas, y se obtienen estructuras en forma de varilla con dominios cristalinos completos y cristales de nanolongitud (Zhang et al., 2020)

El *Agave Lechuguilla* comúnmente conocido simplemente como lechuguilla es el agave de menor tamaño, suele desarrollarse en zonas áridas y semiáridas del norte de México principalmente en los estados de Chihuahua, Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas.

En la figura 7 se muestran una imagen de dicho agave, el cual está conformado por un promedio de entre once y treinta hojas, con una altura de entre 20 y 70 cm, y 30 a 40 cm de ancho. Las pueden llegar a medir entre 25 y 50 cm de largo y 2 a 6 cm de ancho.



Figura 7 Agave lechuguilla

(Blanco, 2020)

A las fibras de lechuguilla de les llama ixtle y son utilizadas en la fabricación de cepillos, costales, cubiertas de paca de algodón y otros elementos de la industria textil principalmente (cactus, 2021).

Las fibras obtenidas del agave lechuguilla contienen aproximadamente un 80% de celulosa, 5% de hemicelulosa y un 15% de Lignina. Son un recurso renovable muy interesante como materia prima para nuevos productos obtenidos por funcionalización química (Pando-Moreno et al., 2004).

Los nanocristales de celulosa como nanomateriales sostenibles muestran abundancia, renovabilidad y biodegradabilidad, altas propiedades mecánicas, alta capacidad de refuerzo y baja densidad (Yadav & Chiu, 2019).

La celulosa se ha ido aplicando en gran medida en forma de solución, suspensión, nanomateriales, nanofibras, nanocristales, compuestos, nanocompuestos. Potencialmente la aplicación de tales formas de la celulosa se coloca en una zona emergente de desarrollo de hidrogeles, aerogeles, electrodos, películas absorbentes/ materiales de embalaje (Choudhury et al., 2020).

3. Principales patógenos de cárnicos

La carne es el tejido animal principalmente muscular destinado para ser consumido como alimento, es altamente susceptible al deterioro por tanto puede actuar como un vehículo para la propagación de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), los dos principales mecanismos de deterioro que afectan la vida útil de la carne roja cruda son el crecimiento microbiano y los cambios de color.

Desde el sacrificio e incluso en el procesamiento los tejidos suelen estar expuestos a contaminarse por distintas fuentes, ya sean internas o externas al animal como son la piel o las heces, sin embargo las carnes procesadas son más propensas a contaminarse con microorganismos patógenos durante las distintas etapas del procesado, la presencia de patógenos en la cadena de producción de alimentos así sea en números bajos, es indeseable y se considera como la mayor causa de enfermedades gastrointestinales (Heredia et al., 2014) .

Los patógenos de mayor preocupación en carne fresca e incluso en productos congelados son *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, y *Clostridium botulinum* (Mor-Mur & Yuste, 2010).

La NOM-194-SSA1-2004 es el único instrumento para verificar la inocuidad de la carne bovina en México, y se limita a inspeccionar *E. coli* como microorganismo indicador de contaminación fecal, con un límite permisible de 1000 UFC/g en carne refrigerada y 5000 UFC/g en carne molida; además, esta norma también especifica la ausencia de *Salmonella* en 25g de carne.

La importancia de determinar la presencia de estos patógenos en alimentos principalmente la carne, radica en poder establecer su presencia y como consecuencia tener la capacidad de minimizar o eliminar cualquier riesgo para la salud del consumidor.

En la figura 8, un modelo que muestra riesgo potencial de infecciones en la cadena alimentaria y la carne, el cual podría ser útil para productores y consumidores en la comprensión de sus funciones en la prevención o reducción de la contaminación de la carne y productos derivados (Mor-Mur & Yuste, 2010)

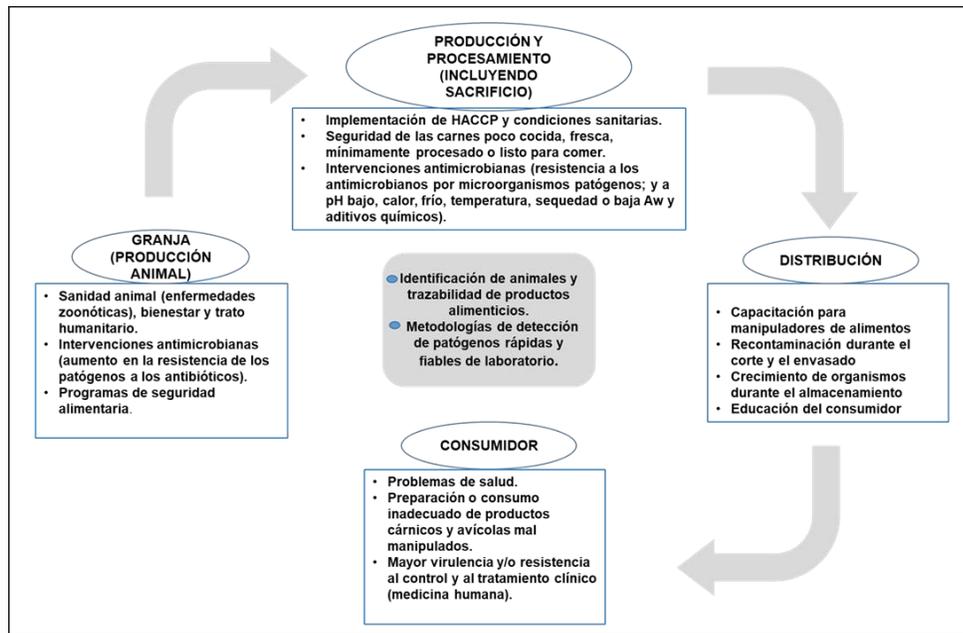


Figura 8 Riesgo potencial de infecciones en la cadena alimentaria y la carne.

(Mor-Mur & Yuste, 2010)

3.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli es un habitante comensal del tracto digestivo, es decir este organismo obtiene alimento y protección a expensas de otro si producir daño ni beneficio, se encuentra en el tracto gastrointestinal de mamíferos y aves, es el agente causal de varias enfermedades en animales y humanos (Elbestawy et al., 2021).

E. coli (figura 9) es una bacteria miembro de la familia de las enterobacterias, es un bacilo gramnegativo, anaerobio facultativo, cuya temperatura de crecimiento es a 37 °C (mesófilo) y comúnmente se mueve por flagelos peritricos.

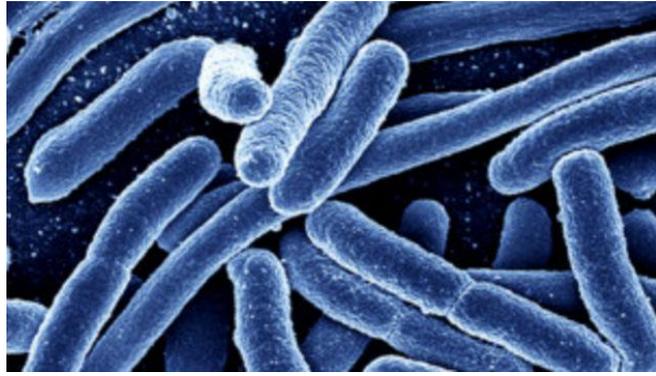


Figura 9 Bacteria Escherichia coli

(Mundasad, 2011)

La mayoría de las variedades de *E. coli* son inofensivas o causan diarrea leve, sin embargo algunas cepas como como *E. coli* O157:H7 pueden causar cólicos abdominales intensos, diarrea con sangre y vómitos, se puede estar expuesto a esta bacteria a través de agua contaminada o alimentos contaminados como vegetales crudos, y especialmente carne de res molida poco cocinada (clinic, 2020).

Escherichia coli coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se considera de flora normal, pero hay descritos seis grupos de *E. coli* productora de diarrea: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC) (Rodríguez-Angeles, 2002).

Pueden ocurrir complicaciones como síndrome urémico hemolítico y púrpura trombocitopénica trombótica (Mor-Mur & Yuste, 2010)

3.2 Staphylococcus aureus

Un patógeno humano importante *Staphylococcus aureus* que afecta o coloniza principalmente a pacientes hospitalizados y a personas con un sistema inmune normal, produce patologías diversas desde un absceso en la piel hasta septicemias mortales y choque tóxico estafilocócico, puede ser causante de intoxicación de alimentos.

Staphylococcus aureus es considerado un patógeno con gran potencial para causar múltiples infecciones en el humano y en los animales. *S. aureus* es la especie tipo del grupo, considerada la más virulenta, responsable de un amplio espectro de enfermedades, que van desde infecciones de la piel y tejidos blandos hasta infecciones graves que amenazan con la vida (Cervantes-García E, 2014). Estas enfermedades pueden ser difíciles de tratar debido a la adquisición de resistencia a numerosos antibióticos de uso clínico.

La presencia de este microorganismo se asocia con la contaminación introducida por los manipuladores de alimentos, el incumplimiento de buenas prácticas de manufactura o la utilización de materia prima contaminada, suele contaminar alimentos y, eventualmente, producir una intoxicación aguda debido a la presencia de una toxina emética muy resistente al calor y a las enzimas proteolíticas. Al ingerirse el alimento contaminado, la enterotoxina se encuentra ya formada, por lo que el período de incubación es muy corto (menos de tres horas). Las manifestaciones clínicas características, que en general cursan sin fiebre, comprenden náuseas, vómitos intensos, espasmo abdominal y diarrea. En algunos casos se observa moco y sangre en los vómitos o en las heces (Eduardo, 2012). La figura 10 muestra una imagen de la bacteria *Staphylococcus aureus* microorganismos aerobios grampositivos.

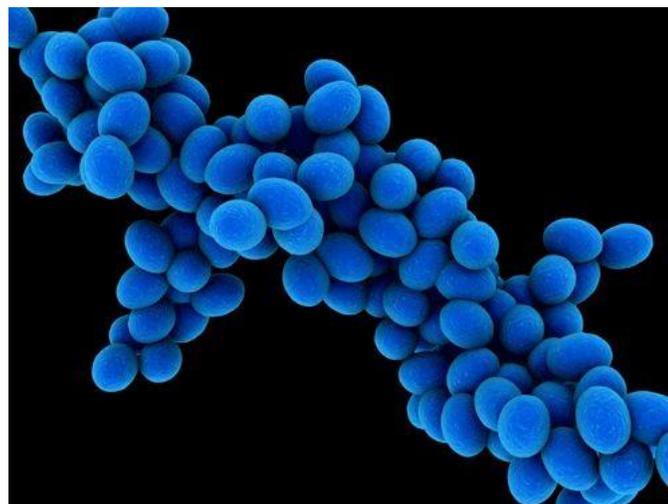


Figura 10 Bacteria *Staphylococcus aureus*

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4. Materiales y equipos

El presente trabajo de investigación fue desarrollado en el Laboratorio de Inocuidad y Empaques del departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en colaboración con del Laboratorio de Agrobiotecnología y la planta piloto de plásticos del Centro de investigación en Química Aplicada, localizadas ambas instituciones en el municipio de Saltillo en el estado de Coahuila.

Para la realización del presente proyecto se emplearon los materiales y reactivos listados en la tabla 4

Tabla 4 Equipos, materiales y reactivos.

EQUIPOS	MATERIALES	REACTIVOS
<ul style="list-style-type: none">• Balanza analítica (Biobase)• Parrilla de calentamiento con agitación magnética• Estufa de secado• Nutribulet• Extruder micro compounder• Termoconformadora• Incubadora• Campana de flujo laminar• Autoclave.• Termómetro digital	<ul style="list-style-type: none">• Espátulas• Vasos de precipitado• Tamiz• Cajas Petri• Micropipetas• Puntillas.• Asa bacteriológica.• Mechero.	<ul style="list-style-type: none">• Ácido aspártico• Ácido sulfúrico• Bicarbonato de Sodio• Ácido sulfúrico• Hipoclorito de Sodio• Hidróxido de sodio• Aceite esencial de orégano alto en timol• Microcelulosa• Almidón• Glicerol• Polisuccinimida• Agar infusión cerebro corazón.• Agar EMB• Caldo infusión cerebro corazón.• Reactivos para la tinción de gram

4.1. Etapa 1.- Obtención de los materiales base.

Los materiales base para la elaboración de los envases activos son polisuccinimida y microcelulosa.

4.1.1 Elaboración de Polisuccinimida.

La síntesis de polisuccinimida se realizó mediante policondensación térmica de ácido aspártico de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Se coloca el de ácido DL-aspártico en un vaso de precipitado de 250 ml y se coloca en la parrilla de calentamiento a una temperatura de 270° C, agitando constantemente con ayuda de una espátula, hasta que el ácido aspártico se torne de un color amarillo pardo uniforme, se deja enfriar a temperatura ambiente y después es lavado en NaHCO₃ acuoso saturado con agua y con HCl.

El sólido obtenido se secó al vacío a 60°C durante 24 h. de acuerdo a la técnica referida por (Bennett, 2005).

4.1.2 Obtención de microcelulosa.

Las fibras de lechuguilla son cortadas (0.3 a 0.5 cm) y secadas a 30 ° C por 12 H. Posteriormente se realizó un primer tratamiento mediante hidrólisis con ácido sulfúrico al 0.4% y agua destilada la reacción se realizó durante 60 min bajo agitación magnética continua, al término se lavaron con agua destilada hasta obtener un pH neutro, seguido de un blanqueamiento de las mismas a través de la cloración al 3.5% con hipoclorito de Sodio la reacción se realizó durante 60 min bajo agitación magnética continua, al término se lavaron nuevamente con agua destilada hasta obtener un pH neutro.

Continua el proceso con una hidrólisis alcalina con NaOH al 5% con agitación constante durante 2 H con una temperatura de entre 60-70°C, las fibras son lavadas hasta alcanzar un pH neutro. Para finalizar se elimina la lignina con un NaOH al 1.7% durante 60 minutos, bajo la misma condición de agitación magnética y, lavados hasta obtención del pH neutro. Son secadas por 24 horas a una temperatura de 60 °C, molidas y tamizadas para obtención del tamaño de partícula deseado (Luis, 2019)

4.2. Etapa 2.- Obtención de las probetas para la formación del envase

Para realizar la investigación se utilizaron tres diferentes formulaciones, las cuales se describen en la tabla 5 dada en %.

Tabla 5 Formulación de las mezclas.

Mezclas				
Materiales	M2	M4	M6	T
PSI	22.22	22.03	22.22	22.22
MC	22.22	22.03	22.22	22.22
Almidón	22.22	22.03	22.22	22.22
AEO	3.11	3.44	2.22	0.00
Glicerol	30.22	30.48	31.11	33.3

PSI= polisuccinimida, MC= microcelulosa, AEO=aceite esencial de orégano

4.2.1. Extrusión

La extrusión del material se llevó a cabo en la planta piloto 1 del Centro de Investigación de Química Aplicada en el equipo Extruder micro compounder Xplore IM 15, Serial 15-14-20, 204-245 V 50-60 Hz; 3100 watts, 14 Amp, cuya imagen es presentada en la figura 11. Bajo las condiciones que se presentan en la tabla 6, previamente establecidas por (Sánchez, 2019).



Figura 11 Extruder micro compounder

Tabla 6 Parámetros equipo Extruder micro compounder Xplor.

Parámetro	Unidades	Condición probada
Temperatura	° C	125
Velocidad de husillo	r.p.m.	60
Tiempo de residencia	min	3

R.p.m=revoluciones por minuto.

Inicialmente se pesaron los reactivos y se mezclaron por separado los líquidos (glicerol y AEO) y los sólidos (almidón, PSI y MC) hasta obtener una mezcla homogénea, posteriormente se juntaron las mezclas en un solo vaso de precipitado se continuó introduciendo el material a la tolva iniciando el proceso de extrusión en el equipo Xplore. Una vez que el equipo ha concluido el proceso de extrusión el material es descargado por el pistón del mismo, y almacenado en frascos de vidrio para posteriormente ser moldeado.

4.2.2 Termoconformación

La termo conformadora marca PHI mostrada en la figura 12, fue utilizada para elaborar las probetas con un grosor de 1 mm aproximadamente mediante moldeado por compresión en una prensa de placa caliente a una temperatura de 80 °C a 25 ton de presión durante 3 min, una vez transcurrido el tiempo se pasaron a una placa de enfriamiento con circulación de agua a 25 ton de presión por 3 min.



Figura 12 Termoconformadora

Adicionalmente las muestras fueron funcionalizadas con AEO para ajustar la concentración de 6.00% en la M2, 7.00% en la M4 y 4.50% en la M6.

4.2.3 Preparación de los inóculos equivalentes al tubo número 4 de la escala de Mcfarland

Las cepas provienen de la colección del laboratorio de inocuidad y empaques del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, previamente caracterizadas macroscópicamente mediante siembra en placa en agar selectivos para cada uno de los microorganismos en cuestión (Eosina azul de etileno, EMB, para *E. coli* e infusión cerebro corazón, BHI, para *S. aureus*) y microscópicamente mediante su observación en microscópico óptico de acuerdo con los lineamientos para la tinción de gram. Una vez que las bacterias fueron caracterizadas, se procedió a preparar un inóculo en el medio de enriquecimiento infusión cerebro corazón BD Bioxon en ambos casos se colocó un inóculo de 0.001 mL de cada una de las cepas con una asa bacteriológica calibrada en un tubo de ensaye con 4 mL de caldo, realizado esta operación por triplicado para cada bacteria, se incubaron a 37 °C durante el tiempo necesario para alcanzar la absorbancia requerida equivalente al tubo número 4 de la escala de Mcfarland (0.6815 nm). Esta medición se realizó en un espectrofotómetro Genesys 10 UV-Vis a 540 nm.

4.2.4 Inoculación de carne de res con bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

Se colocaron 10 gramos de carne de res inoculada con 1 ml de las bacterias previamente proliferadas en cada una de las probetas y cubiertas con papel stretch film, como se muestra en la figura 13, imitando las condiciones de empaque de productos cárnicos en charolas convencionales para la distribución y venta al público. Esto se realizó por triplicado para cada una de las muestras y para cada una de las bacterias, estableciendo una temperatura de 15°C ± 2°C. monitoreando y tomando muestras a intervalos de 12, 24 y 72 horas, la figura 14 expone el montaje del experimento y monitoreo de la temperatura.



Figura 13 Carne de res inoculada sobre empaque activo MC-PSI



Figura 14 Monitoreo de la temperatura.

5.5 Monitoreo del desarrollo microbiano

Para conocer el contenido de microorganismos viables en el alimento se utilizó la técnica de cuenta en placa, expuesta en la NORMA Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994 que establece el método para estimar la cantidad de células viables presentes en el alimento, por la cuenta de colonias en un medio sólido, incubado aeróbicamente.

5.6 Diseño experimental

El análisis estadístico del fue llevado a cabo mediante un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones y un arreglo factorial de los tratamientos. Los factores y niveles analizados fueron dos tipos diferentes de bacterias (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*), cuatro tipos de materiales de envase (T, M2, M4, M6) a diferentes intervalos de tiempo 12, 24 y 72 hs de almacenamiento. El contraste de medias de efectos estadísticamente significativos fue llevado a cabo mediante distribución T de Student ($P < 0.05\%$).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. Etapa no. 1 Características de la probeta

Tras la realización de cada uno de los pasos descritos en la metodología, se obtuvieron los siguientes resultados: en la tabla 7, referentes a las características de las probetas para la formación del envase, elaboradas con los materiales (PSI, MC, AEO, Almidón y Glicerol).

Tabla 7. Características de cada una de las probetas utilizadas

Muestra	Dimensiones (cm)	Espesor (mm)	Peso (g)	Funcionalización %
M2	7.6 x 7.6	1	8.86	6.00
M4	7.6 x 7.6	1	9.21	7.00
M6	7.6 x 7.6	1	8.80	4.50

Como se puede apreciar de la tabla 7 las probetas presentan tamaños y espesores homogéneos con ligeras variaciones en peso, atribuible a las diferencias en el contenido de AEO con que fueron funcionalizadas, después de su proceso de elaboración. El proceso de funcionalización tiene como objetivo primordial el conferir actividad antimicrobiana con un agente con probada capacidad como lo es el AEO, ya que los extractos y aceites esenciales (AEs) de hierbas y especias (orégano, romero, clavo, tomillo y limón) poseen componentes bioactivos los cuales les confieren propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antifúngicas para la preservación de los alimentos. El AEO ha sobresalido por su capacidad antimicrobiana, lo que propicia su uso para el control microbiológico en productos cárnicos.

La actividad antimicrobiana que aporta el aceite esencial de orégano se debe principalmente a sus compuestos volátiles, especialmente timol y carvacrol, cuyo efecto se ha estudiado en bacterias patógenas, y clasificado como se muestra en la tabla 8, con dos variedades distintas de AEO (Amadio et al., 2011).

Tabla 8 Inhibición microbiana

Microorganismo	Origanum x apliedii		Origanum x majoricum	
	Diámetro inhibitorio (mm)	Clasificación	Diámetro inhibitorio (mm)	Clasificación
<i>Enterococcus faecalis</i>	8.50	No sensible	10.00	Sensible
<i>Escherichia coli</i>	12.50	Sensible	17.00	Muy sensible
<i>Listeria monocytogenes</i>	16.50	Muy sensible	17.50	Muy sensible
<i>Staphylococcus aureus</i>	13.00	Sensible	19.50	Muy sensible
<i>Salmonella enteritidis</i>	9.00	Sensible	12.00	Sensible
<i>láctica 1</i>	8.00	No sensible	0.00	No sensible

(Amadio et al., 2011)

En estudios donde el AEO ha sido incorporado al envase activo y probada su capacidad antimicrobiana, este ha sido capaz de inhibir el 100% del crecimiento de microorganismos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus* y *Salmonella enteritidis* en una concentración de 10⁸ UFC / mL. (Martins et al., 2021). Lo que da pauta para generar expectativas sobre su inclusión para el adecuado funcionamiento de este empaque activo.

Debido a que es una nueva matriz de envase es necesario evaluar que esta actividad se mantenga ya que puede verse afectada por estar adherida directamente a la matriz. La incorporación de agentes activos en los sistemas poliméricos da como resultado una variedad de perfiles de liberación con diferentes etapas. En algunos casos, la liberación de aditivos se ha descrito como un proceso de difusión de matriz simple, con degradación que se produce en una etapa posterior (liberación de la sustancia activa). Además, la difusión de antimicrobianos de la película depende del tamaño, la forma (lineal, ramificada o cíclico) y la polaridad de la molécula de difusión, así como la estructura química de la película y el grado de reticulación. Las diferentes interacciones entre la matriz polimérica y el agente antimicrobiano pueden conducir a varios grados de inhibición contra

patógenos, cabe señalar que la actividad antimicrobiana también depende del tipo de compuestos activos, su concentración y especie de microorganismos (Heredia et al., 2014).

6. Etapa no. 2 Características de los microorganismos

Al realizar las siembras de *E. Coli* en medio sólido fue posible observar a simple vista el tamaño de las colonias de 2 a 4 mm de diámetro, un centro grande de color oscuro e incluso negro, y presentar brillo verde metálico cuando se observan con luz refleja. Estas características coinciden con las descritas por (Gonzalez, 2013) en un estudio de caracterización fenotípica de cepas de *Escherichia coli* donde se aprecia esta morfología.

En cuanto a la morfología microscópica del cultivo empleado en el presente trabajo, se presenta en la figura 15 la cual evidencia la presencia de bacilos que reaccionaron negativamente a la tinción de Gram (gramnegativo). Diversos autores describen a *E. coli* por ser bacilos Gram negativos, no esporulante, fermentadores de glucosa y lactosa con producción de gas. Es una bacteria mesófila, por tanto, su desarrollo óptimo se encuentra en torno a la temperatura de los animales de sangre caliente es decir (35-43°C). y la temperatura de límite inferior es de 7°C, lo que indica que un control eficaz de la cadena de frío en las industrias es esencial para evitar el crecimiento en los alimentos (Canet, 2016), por lo que mediante esta caracterización se puede tener certeza que se está trabajando con el microorganismo adecuado.

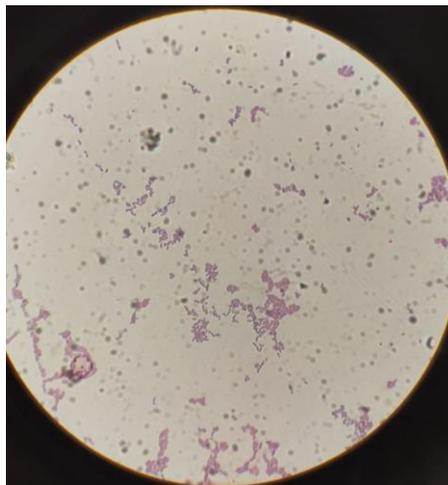


Figura 15 Identificación *E. coli* por tinción de gram.

Dentro de las características coloniales, para *S. aureus* en medio sólido (Infusión cerebro corazón) se percibió a partir de las 24 horas de incubación, notándose colonias bien definidas, de un tamaño pequeño uniforme de aproximadamente un 1 mm de diámetro, el color de las unidades se observó blanco cremoso. Dicha descripción concuerda con los reportado por (Chans, 2015).

A diferencia de la bacteria *E. coli*, *Staphylococcus aureus* es gram positivo como se muestra en la figura 16. Tienen forma de coco y puede aparecer en parejas, en cadenas o en racimos. Su tamaño oscila entre 0,8 a 1,5 micras de diámetro, es inmóvil y algunas cepas producen una cápsula externa mucoide que aumenta su capacidad para producir infección. En relación con su metabolismo, es anaerobio facultativo, coagulasa positivo, catalasa positivo y oxidasa negativo (Piñeros, 2015).

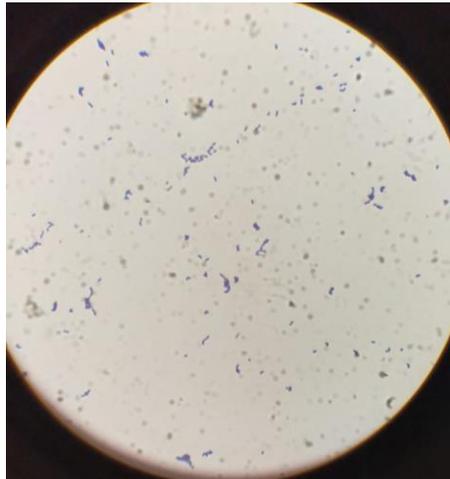


Figura 16 Identificación de *staphylococcus aureus*.

7. Etapa no. 3 Cinética de crecimiento

Evaluación de la actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*

Como es posible apreciar en la figura 17 el desarrollo microbiano para *E. coli* puesto en contacto con los tres tratamientos probados y el testigo, obtuvieron los máximos niveles de desarrollo a las 12 hrs de monitoreo, para experimentar un descenso en el conteo del log de las UFC/mL a las 24 hrs para todos los tratamientos y evidenciar un posterior aumento a las 24 hs. Como se puede apreciar en la misma gráfica, la probeta testigo es la que muestra el mayor desarrollo bacteriano contrastando con las probetas M2 y M4 que presentan los mínimos valores para el desarrollo de *E. coli*.

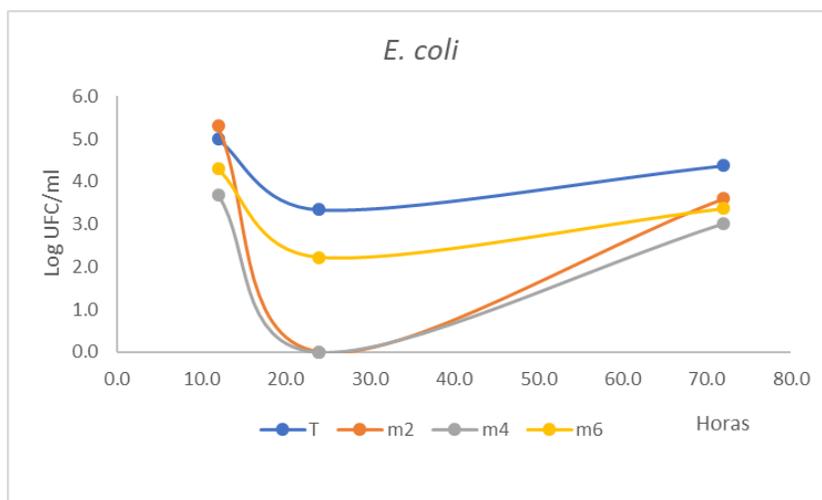


Figura 17 Cinética de crecimiento *E. coli*

En el anexo 1 de este documento es posible apreciar el análisis de student ($p < 0.05\%$) de los datos obtenidos para el conteo del desarrollo bacteriano de *E. coli* descritos anteriormente donde se corrobora que las probetas testigo presentaron los máximos desarrollos a las 12 y 72 hs del ensayo presentando diferencias estadísticamente significativas con el resto de los tratamientos. Por otro lado las muestras identificadas como M2 y M4 mostraron los mínimos niveles a las 24 hs del almacenamiento bajo las condiciones descritas en el apartado de materiales y métodos, comparado con la M6 al mismo periodo de almacenamiento se puede apreciar que hay un mayor desarrollo microbiano presentando diferencias estadísticamente significativas con respecto a las M2 y M4, pero inferiores a los presentados por la probeta testigo a las mismas 24 hs, dicho comportamiento es atribuido a la las diferentes concentraciones de aditivo inclusionadas en las probetas debido a que la M6 contiene el 4.50% de AEO que es la menor concentración probada. Posteriormente se puede apreciar un incremento en la cantidad de UFC/mL donde las M4 fue la que presentó el menor desarrollo de *E. coli*, evidenciando diferencias estadísticamente significativas en comparación con el resto de los tratamientos al mismo intervalo de tiempo, este comportamiento puede asociarse a que esta muestra es la que contiene la mayor concentración de aditivo probada (7.00%) en el presente estudio; no siendo suficiente para inhibir por completo el desarrollo del microorganismo en estudio.

En comparación con (Solomakos et al., 2008) donde se estudió el efecto antimicrobiano de aceite esencial de tomillo, en estado libre, el cual está constituido por compuestos activos similares a los del AEO (fenoles monoterpénicos, como timol, carvacrol, p-cimeno, gammaterpineno, limoneno, borneol y linalol), al 3.00%, 6.00% y 9.00% contra de *E. coli* sobre carne de res picada en trozos pequeños, resultando ser ineficiente la adición del 3.00%, destacando en 9.00%, afecciones de las propiedades organolépticas, y siendo más efectiva la adición del 6.00% contra el patógeno. En el presente estudio el AEO se encuentra incluido en la matriz del envase, lo cual resulta una ventaja ya que además de permitir una fácil manipulación la función de las sustancias activas cuando son añadidas directamente a los alimentos corren el riesgo de inhibirse o reducirse, a lo largo del periodo en el cual realizarán su función como conservador, esto ocurre como resultado de la interacción entre las sustancias activas y los componentes alimentarios por tanto su adición directa a los envases puede ser más eficaz. Esta inhibición se debido a que son insolubles en agua, volátiles, y sensibles al oxígeno, a la temperatura y a la luz, además de generar sabores y olores ajenos al alimento (Sáez, 2017) como se menciona en el estudio antes mencionado. El empaque debe conferir estabilidad mediante la interacción formada entre el polímero y el aditivo por enlaces débiles que adicionalmente le permitan una liberación prolongada a la matriz de interés (Hernández-González et al., 2017). En otras investigaciones se han probado los empaques activos con AEO al 4.50%, en filetes de pescado refrigerado, donde se ha logrado alcanzar un alto efecto antimicrobiano y antioxidante, con ello alargando la vida anaquel de este producto (Martins et al., 2021).

Evaluación de la actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*

El siguiente microorganismo en evaluación fue *S. aureus*, en la figura 18 se puede apreciar el comportamiento del desarrollo colonial del mismo en presencia de los diferentes tratamientos probados, de donde se destaca como la probeta testigo carente de AEO presenta los máximos niveles de desarrollo microbiano con diferencias estadísticamente significativas con respecto al resto de los tratamientos, como se puede apreciar en el análisis de student ($p < 0.05\%$) presentado en el anexo 2 del presente documento apreciándose que el monitoreo a las 12 y 72 hs de contacto presenta los máximos niveles

seguidos del tiempo a las 24 hs, donde existe un decremento con respecto al desarrollo microbiano, este decaimiento es atribuible a la presencia del glicerol, empleado como agente plastificante en la elaboración de las probetas, el comportamiento de los microorganismos en relación a la muestra testigo también sufre una disminución a las 24 horas ya que la mezcla de esta charola, aunque no contiene AEO en la formulación está presente el glicerol, el cual también contribuye a una disminución moderada de la actividad antimicrobiana (Boura-Theodoridou et al., 2020).

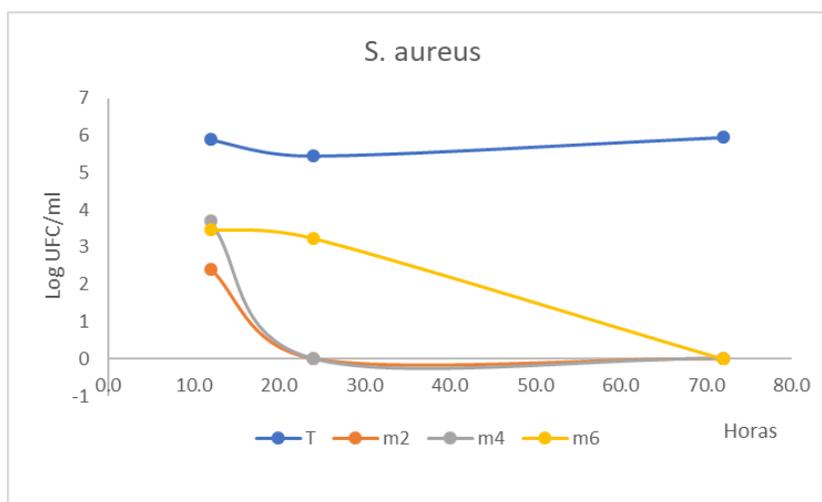


Figura 18 Cinética de crecimiento *S. aureus*

No obstante, la concentración utilizada en la elaboración de las probetas es bajo y no permite un control adecuado ni sostenido para inhibir el desarrollo del microorganismo en estudio.

Por otro lado se puede apreciar un decremento significativo obtenido por el resto de los tratamientos donde es posible apreciar que existe una reducción de al menos dos ciclos logarítmicos al comparar la muestra testigo contra la M4 a la 12 hs de contacto, siendo esta la menor reducción observada durante el ensayo y logrando inhibiciones totales del desarrollo del microorganismo a partir de las 24 hs de contacto para todos los tratamientos estudiados, lo que muestra la eficiencia del aditivo inclusionado en las probetas para *S. aureus* a la mínima concentración ensayada (4.50%).

En un estudio in vitro, donde se puso a prueba la efectividad de algunos antibióticos frente a 143 aceite esenciales, entre ellos el AEO se destacó su efectividad para eliminar *S. aureus* a una concentración del 0.25% la cual podría erradicar toda la fase estacionaria de las células después de una exposición de un día (Xiao et al., 2019).

El aceite esencial de tomillo con características muy similares al AEO, fue probado, en estado libre, sobre carne fresca en dosis del 1.00, 2.00 y 3.00 %, con resultados favorecedores, por lo que se pone de manifiesto la importancia de estudiar su aplicación en empaques activos que funcionalizados con AEO, en cortes de carne fresca ya que pueden tener el potencial de controlar las bacterias patógenas y además mejorar la estabilidad del color con características sensoriales aceptables, la mayor actividad antimicrobiana contra *S. aureus* se presentó al añadir el 3.00% de AEO (Candoğan, 2017), dato que es ligeramente inferior al establecido en el presente trabajo, lo cual puede deberse principalmente al perfil de sustancias activas presentes en el aceite utilizado y de la velocidad con que se libera al medio.

La incorporación de agentes activos en los sistemas poliméricos da como resultado una variedad de perfiles de liberación con diferentes etapas. En algunos casos, la liberación de aditivos se ha descrito como un proceso de difusión de matriz simple, con degradación que se produce en una etapa posterior (liberación de la sustancia activa). Además, la difusión de antimicrobianos de la película depende del tamaño, la forma (lineal, ramificada o cíclico) y la polaridad de la molécula de difusión, así como la estructura química de la película y el grado de reticulación. Las diferentes interacciones entre la matriz polimérica y el agente antimicrobiano pueden conducir a varios grados de inhibición contra patógenos, cabe señalar que la actividad antimicrobiana también depende del tipo de compuestos activos, su concentración y especie de microorganismos (Heredia et al., 2014).

Para el presente estudio, la dosis probada es altamente eficiente ya que con solo 4.50% se logró eliminar por completo al microbio, lo que indica estabilidad del aditivo y liberación adecuada y prolongada de la matriz del envase al cárnico contenido. El AEO ha sido seleccionado para formar parte de distintos envases por sus favorables propiedades antimicrobianas y además que no tiene ningún impacto en la salud humana y el entorno. En un estudio realizado con un material de polímeros termoendurecibles epoxi, que se

funcionalizó con AEO se presentó una actividad antimicrobiana relativamente fuerte y en el material sin funcionalizar no se observó ninguna inhibición (Zavareh et al., 2015) Como se aprecia en el presente trabajo, el empaque activo PSI-ST-MC resultó ser más efectivo para *S. aureus* que para *E. coli*, lo cual se debe a que las bacterias grampositivas (*S. aureus*) son más sensibles que las bacterias gramnegativas (*E. coli*). Esta sensibilidad ha sido atribuida a la constitución de la membrana externa adicional que rodea la pared celular en bacterias gramnegativas que limita la difusión de AEO hidrofóbico a través de su Recubrimiento de lipopolisacáridos (Zavareh et al., 2015).

VI. CONCLUSIONES

- El compósito PSI-ST-MC, tiene afinidad por el AEO, con lo cual es posible su proceso de funcionalización.
- El compósito PSI-ST- MC-AEO posee actividad antimicrobiana eficiente contra un inóculo infeccioso de *Escherichia coli*, equivalente al tubo 4 de la escala de Mc Farland, al ser funcionalizado con una concentración del 7.00%.
- El compósito PSI-ST-MC funcionalizado al 4.50% con AEO permite una reducción de dos ciclos logarítmicos ante la presencia de un inóculo infeccioso de *Staphylococcus aureus* equivalente al tubo 4 en la escala de Mc Farland después de 24 hs de contacto y su eliminación total después de 72 hs o bien a las 24 hs bajo una concentración del 6.00% del mismo agente funcionalizante.
- El compósito PSI-ST-MC-AEO, permite una liberación prolongada y estable del agente funcionalizante, con lo cual se confiere estabilidad y eficiencia al mismo.
- *Staphylococcus aureus* resulta más sensible al AEO inclusionado en el compósito PSI-ST- MC que *Escherichia coli*, tal y como sucede en cuando el AEO se encuentra en estado libre, por lo que su inclusión en la matriz polimérica no afecta a sus propiedades.
- El compósito PSI-ST-MC-AEO, es un material con capacidad de ser empleado en la industria del empaçado activo alimentario ya que fue posible contener en él muestras de carne de res molida almacenada bajo

condiciones regulares de almacenamiento y manipulación para su comercialización.

VII. LITERATURA CITADA

- Activos, E., Su, A. Y., Sobre, E., & Calidad, L. A. (2011). *Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169822670002>*.
- Ajay, S. M., Lalit, Y., Dash, M. B. S. K., & Mahanti, N. K. (2018). Application of Biodegradable Polymers in Food Packaging Industry: A Comprehensive Review. *Journal of Packaging Technology and Research*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s41783-018-0049-y>
- Alimentaria, I., Andrés, A., & Rivera, E. (2020). *APLICACIÓN DE ABSORBENTES DE ETILENO A ESCALA DOMÉSTICA: ESTUDIO DE LA VIDA ÚTIL Y CALIDAD DE FRUTAS Y VERDURAS FRESCAS Trabajo final de grado*.
- Alizadeh-Sani, M., Mohammadian, E., Rhim, J. W., & Jafari, S. M. (2020). pH-sensitive (halochromic) smart packaging films based on natural food colorants for the monitoring of food quality and safety. *Trends in Food Science and Technology*, 105(August), 93–144. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.08.014>
- Amadio, C., Medina, R., Dediol, C., Zimmermann, M., & Miralles, S. (2011). Aceite esencial de orégano: un potencial aditivo alimentario. *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo*, 43(1), 237–245.
- Ananda, A. P., Manukumar, H. M., Umesh, S., Soumya, G., Priyanka, D., Mohan Kumar, A. S., Krishnamurthy, N. B., & Savitha, K. R. (2017). A Relook at Food Packaging for Cost Effective by Incorporation of Novel Technologies. *Journal of Packaging Technology and Research*, 1(2), 67–85. <https://doi.org/10.1007/s41783-017-0011-4>
- Bennett, G. D. (2005). A green polymerization of aspartic acid for the undergraduate organic laboratory. *Journal of Chemical Education*, 82(9), 1380–1381. <https://doi.org/10.1021/ed082p1380>
- Brennan, L., Langley, S., Verghese, K., Lockrey, S., Ryder, M., Francis, C., Phan-Le, N. T., & Hill, A. (2021). The role of packaging in fighting food waste: A systematised review of consumer perceptions of packaging. *Journal of Cleaner Production*, 281, 125276. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.125276>
- Chans, G. R. (2015). Estafilococos. *Temas de Bacteriología y Virología Para CEFA*, 1–12.
- Choudhury, R. R., Kumar, S., & Jaydevsinh, S. (2020). Potential of bioinspired cellulose nanomaterials and nanocomposite membranes thereof for water treatment and fuel cell applications. *Cellulose*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03253-z>
- Colín-Chávez, C., Vicente-Ramírez, E. B., Soto-Valdez, H., Peralta, E., & Auras, R. (2014). The Release of Carotenoids from a Light-Protected Antioxidant Active Packaging Designed to Improve the Stability of Soybean Oil. *Food and Bioprocess Technology*, 7(12), 3504–3515. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1359-x>
- Contini, C., Katsikogianni, M. G., O'Neill, F. T., O'Sullivan, M., Boland, F., Dowling, D. P., & Monahan, F. J. (2014). Storage Stability of an Antioxidant Active Packaging Coated with Citrus Extract Following a Plasma Jet Pretreatment. *Food and Bioprocess Technology*, 7(8), 2228–2240. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1210-9>

- Eduardo, A. (2012). *Portación y caracterización de Staphylococcus aureus en manipuladores de alimentos*.
- Elbestawy, A. R., Ellakany, H. F., El-hamid, H. S. A., Ibrahim, M. S., Gado, A. R., Mustafa, N. S., Moussa, I. M., Al-maary, K. S., Al-sarar, D. S., Alshammari, H. O., Dawoud, T. M., Hemeg, H. A., & Galal, H. M. (2021). Comparative evaluation of a live E . coli vaccine and cefotaxime treatment against three E . coli serotypes in broilers. *Journal of King Saud University - Science*, 33(2), 101353. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101353>
- Gavara, R. (n.d.). *Materiales para el envasado de frutas y hortalizas con tratamientos mínimos*.
- Gonzalez, M. (2013). *Caracterización fenotípica de cepas de Escherichia coli uropatógena (UPEC) en pacientes pediátricos y sus perfiles de resistencia a aminoglucósidos , quinolonas y betalactámicos .* 1–28.
- Heredia, N., Dávila Aviña, J., Solís Soto, L., & García, S. (2014). Productos cárnicos: principales patógenos y estrategias no térmicas de control. *Nacameh*, 8(1), 20–42.
- Hernández-González, M., Pérez Berumen, C. M., Sánchez Ruíz, H., Ruíz Salazar, C. V., Hernández Paz, J. F., Olivas-Armendáriz, I., Martel-Estrada, S. A., & Rodríguez González, C. A. (2017). Polysuccinimide functionalized with oregano's essential oil extracts, an antimicrobial extended release bio-material. *Materials Letters*, 191, 73–76. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2017.01.035>
- Herranz, N., Lorente, I., & Otero, S. (2012). *Aplicaciones del envasado de V gama*. 26–28.
- Jafarzadeh, S., Jafari, S. M., Salehabadi, A., Nafchi, A. M., Uthaya Kumar, U. S., & Khalil, H. P. S. A. (2020). Biodegradable green packaging with antimicrobial functions based on the bioactive compounds from tropical plants and their by-products. *Trends in Food Science and Technology*, 100(December 2019), 262–277. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.017>
- Jalalvandi, E., & Shavandi, A. (2018). Polysuccinimide and Its Derivatives: Degradable and Water Soluble Polymers (Review). *European Polymer Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.08.056>
- Kakadellis, S., Woods, J., & Harris, Z. M. (2021). Friend or foe: Stakeholder attitudes towards biodegradable plastic packaging in food waste anaerobic digestion. *Resources, Conservation and Recycling*, 169(January), 105529. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2021.105529>
- Mansha, M., Waheed, A., Ahmad, T., Wajih, I., & Ullah, N. (2020). Synthesis of a novel polysuccinimide based resin for the ultrahigh removal of anionic azo dyes from aqueous solution. *Environmental Research*, 184(March), 109337. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109337>
- Marsh, K., & Bugusu, B. (2007). Food packaging - Roles, materials, and environmental issues: Scientific status summary. *Journal of Food Science*, 72(3). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00301.x>
- Marsin, A. M., Muhamad, I. I., Anis, S. N. S., Lazim, N. A. M., Ching, L. W., & Dolhaji, N. H. (2020). Essential oils as insect repellent agents in food packaging: a review. *European Food Research and Technology*, 246(8), 1519–1532. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03511-1>
- Martins, P. C., Bagatini, D. C., & Martins, V. G. (2021). Oregano essential oil addition in rice starch films and its effects on the chilled fish storage. *Journal of Food Science and Technology*, 58(4), 1562–1573. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04668-z>

- Mor-Mur, M., & Yuste, J. (2010). Emerging bacterial pathogens in meat and poultry: An overview. *Food and Bioprocess Technology*, 3(1), 24–35. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0189-8>
- Mora Barrantes, I. (2013). Envases de plástico: Hechos para proteger. *Revista de Plásticos Modernos*, 105(680), 370–373.
- Ozdemir, M., & Floros, J. D. (2004). Active food packaging technologies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(3), 185–193. <https://doi.org/10.1080/10408690490441578>
- Packaging, B. (2008). *Innovative Food Packaging Solutions*. 73(8). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00933.x>
- Pando-Moreno, M., Eufrazio, O., Jurado, E., & Estrada, E. (2004). Post-harvest growth of lechuguilla (Agave lecheguilla Torr., agavaceae) in northeastern Mexico. *Economic Botany*, 58(1), 78–82. [https://doi.org/10.1663/0013-0001\(2004\)058\[0078:PGOLAL\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0013-0001(2004)058[0078:PGOLAL]2.0.CO;2)
- Perdomo, G. (2002). Plásticos Y Medio Ambiente. *Revista Iberoamericana Polimeros*, 3(2), 1–13. <http://www.ehu.es/reviberpol/pdf/abr/perdomo.pdf>
- Piñeros, J. (2015). DATABiO Staphylococcus aureus. *Databio*, 1–3. [http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas de agentes biologicos/Fichas/Bacterias/Staphylococcus aureus.pdf](http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Bacterias/Staphylococcus%20aureus.pdf)
- Pradas, I., & Moreno, J. (2016). Envasado Activo de Alimentos. *Instituto de Inv. y Formación Agraria, Pesca y Desarrollo Rural.*, 1–18. <https://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/servifapa/registro-servifapa/1edaa00f-fbf6-4d26-bf13-2ff4375abcd9/download>
- Robertson, G. L. (2018). Definitions, Functions, Attributes and Environments of Food Packaging. In *Reference Module in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.22537-7>
- Rodríguez Saucedo, R., Rojo-Martínez, G., Martínez Ruiz, R., Piña-Ruiz, H. H., Ramírez-Valverde, B., Vaquera Huerta, H., & Cong Hermida, M. (2014). Envases Inteligentes Para La Conservación De Alimentos Smart Packaging for Food Preservation. *Ra Ximhai*, 10(10), 151–173. <http://www.redalyc.org/pdf/461/46132135012.pdf>
- Salakhieva, D. V., Gumerova, D. R., & Akhmadishina, R. A. (2016). Anti-Radical and Cytotoxic Activity of Polysuccinimide and Polyaspartic Acid of Different Molecular Weight. *BioNanoScience*, 1–4. <https://doi.org/10.1007/s12668-016-0230-0>
- Schaefer, D., & Cheung, W. M. (2018). Smart Packaging: Opportunities and Challenges. *Procedia CIRP*, 72, 1022–1027. <https://doi.org/10.1016/j.procir.2018.03.240>
- Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., & Botsoglou, N. (2008). The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against Escherichia coli O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. *Meat Science*, 80(2), 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.11.014>
- Souza, C. O. De, Veiga-santos, P., & Druzian, J. I. (2013). Food Quality, Safety and Technology. *Food Quality, Safety and Technology*, 179–188. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1640-1>
- Srivastava, P., Bano, K., Zaheer, M. R., & Kuddus, M. (n.d.). *Biodegradable Smart Biopolymers for Food Packaging: Sustainable Approach Toward Green Environment*.
- Stoica, M., Marian Antohi, V., Laura Zlati, M., & Stoica, D. (2020). The financial impact of replacing plastic packaging by biodegradable biopolymers - A smart solution for the food industry. *Journal of Cleaner Production*, 277, 124013.

- <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124013>
- Taylor, P., Arvanitoyannis, I. S., & Bosnea, L. (2010). *Migration of Substances from Food Packaging Materials to Foods Migration of Substances from Food*. February 2013, 37–41. <https://doi.org/10.1080/10408690490424621>
- Taylor, P., & Cooksey, K. (2007). *Food Additives and Contaminants Effectiveness of antimicrobial food packaging materials*. January 2013, 37–41. <https://doi.org/10.1080/02652030500246164>
- Taylor, P., Weber, C. J., Haugaard, V., Festersen, R., & Bertelsen, G. (2010). *Production and applications of biobased packaging materials for the food industry Production and applications of biobased packaging*. January 2013, 37–41. <https://doi.org/10.1080/0265203011008748>
- Velazco-de-la-garza, J., Avérous, L., Ph, D., Jesús, G. De, D, S. P., Pollet, E., Ph, D., D, A. Z. P., Aleyvick, C., D, S. P., Verónica, N., D, P. P., D, E. O. P., Químicas, F. D. C., Coahuila, U. A. De, Carranza, B. V, Cárdenas, J., & Coahuila, Z. C. (2020). Biological properties of novel polysuccinimide derivatives synthesized via quaternary ammonium grafting. *European Polymer Journal*, 131(March), 109705. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109705>
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., Van Beest, M., De Kruijf, N., & Debevere, J. (1999). Developments in the active packaging of foods. *Trends in Food Science and Technology*, 10(3), 77–86. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00032-1](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00032-1)
- Voniatis, C., Balsevicius, L., Barczikai, D., Juriga, D., Takács, A., László, K., Nagy, K., & Jedlovsky-hajdu, A. (2020). *Co-electrospun polysuccinimide / poly (vinyl alcohol) composite meshes for tissue engineering*. 306, 0–8. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112895>
- Xiao, S., Cui, P., Shi, W., & Zhang, Y. (2019). Identification of essential oils with strong activity against stationary phase uropathogenic *Escherichia coli*. *Discovery Medicine*, 28(154), 179–188. <https://doi.org/10.1101/702951>
- Yadav, M., & Chiu, F. (2019). Cellulose nanocrystals reinforced κ -carrageenan based UV resistant transparent bionanocomposite films for sustainable packaging applications. *Carbohydrate Polymers*, 211(January), 181–194. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.114>
- Yildirim, S., Röcker, B., Pettersen, M. K., Nilsen-Nygaard, J., Ayhan, Z., Rutkaite, R., Radusin, T., Suminska, P., Marcos, B., & Coma, V. (2018). Active Packaging Applications for Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(1), 165–199. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12322>
- Zavareh, S., Darvishi, F., & Samandari, G. (2015). Preparation and characterization of epoxy/oregano oil as an epoxy-based coating material with both antimicrobial effect and increased toughness. *Journal of Business and Psychology*, 30(1), 407–414. <https://doi.org/10.1007/s11998-014-9641-4>
- Zhang, W., Zhang, Y., Cao, J., & Jiang, W. (2020). *Journal of International Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.185>
- Zhu, J., & Wang, C. (2020). Biodegradable plastics: Green hope or greenwashing? *Marine Pollution Bulletin*, 161(PB), 111774. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111774>

VIII. ANEXOS

Anexo 1 Análisis de student para *E. coli*

Level		Least Sq Mean
m2,12	A	5.310757
t,12	A	5.054943
t,72	B	4.385637
m6,12	B	4.376778
m4,12	C	3.698970
m2,72	C D	3.640097
m6,72	D	3.378695
t,24	D	3.344475
m4,72	E	3.011141
m6,24	F	2.224033
m2,24	G	0.000000
m4,24	G	-0.000000

Levels not connected by same letter are significantly different

Anexo 2 Análisis de student para *S. aureus*

Level		Least Sq Mean
t,72	A	5.954243
t,12	A	5.890082
t,24	B	5.453481
m4,12	C	3.698970
m6,12	D	3.464817
m6,24	E	3.237830
m2,12	F	2.418424
m4,72	G	0.000000
m2,72	G	-0.000000
m4,24	G	-0.000000
m2,24	G	-0.000000
m6,72	G	-0.000000

Levels not connected by same letter are significantly different