

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA**

**ANTONIO NARRO**

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**“ESTUDIO BACTERICIDA DE PELÍCULAS COMESTIBLES DE OLIGOSACÁRIDOS DE QUITOSÁN APLICADAS SOBRE CARNE DE RES”**

**Por:**

ALFREDO AVENDAÑO ALVAREZ

**TESIS**

**Presentada como Requisito Parcial para obtener el título de:  
INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

**Diciembre de 2010**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA**

**"ANTONIO NARRO"**

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**ESTUDIO BACTERICIDA DE PELÍCULAS COMESTIBLES DE  
OLIGOSACÁRIDOS DE QUITOSÁN APLICADAS SOBRE CARNE DE RES**

**TESIS:**

Que se somete a consideración del H. Jurado examinador como requisito parcial  
para obtener el título de:

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Presentado por:

**ALFREDO AVENDAÑO ALVAREZ**

El presente trabajo ha sido evaluado y aprobado por el siguiente comité:

**Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez**  
ASESOR PRINCIPAL

**Dra. Dolores G. Martínez Vázquez**  
Vocal

**Dr. Mario A. Cruz Hernández**  
Vocal

**M.C. Lorenzo Suarez García**  
Coordinador interino de la División de Ciencia Animal

Universidad Autónoma Agraria  
"ANTONIO NARRO"



**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, Diciembre de 2010.**

COORDINACION DE  
CIENCIA A  
I.

*Tu presente será tu pasado cuando vivas  
en tu futuro, deja de vivir  
de recuerdos y mejor recuerda lo  
que has vivido...*

*Joaquín Jurado*

## **AGRADECIMIENTOS:**

*A mi escuela: mi “ALMA MATER” gracias por todos los aprendizajes que hasta la fecha he tenido, me diste la oportunidad de formarme no solo como profesionista, comprendí la importancia de lo que significa ser un amigo, compañero, hermano e hijo. Los momentos vividos aquí durante el tiempo que duro este trayecto los llevare conmigo siempre y no terminare de expresar el profundo orgullo que me da el pertenecer a esta gloriosa universidad.*

*A la Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez por la confianza depositada al encomendarme la realización de este proyecto del cual me siento muy orgulloso de haber formado parte y más aun bajo su asesoría, “gracias” por su paciencia y disposición para la culminación del proyecto.*

*A la Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez por haber aceptado formar parte de este proyecto, su colaboración y asesoría me ayudo en mucho.*

*Al Dr. Mario Alberto Cruz Hernández por su apoyo, disposición, y sugerencias para la culminación de este proyecto.*

*A mis maestros del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos (M.C. Xochitl Ruelas Chacon, Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó, M.C. María Hernández González, M. C. Ed. María de Lourdes Morales Caballero, Dr. Heliodoro de la Garza Toledo) gracias por sus conocimientos compartidos para mi formación profesional.*

*Al M.C. Oscar Noe Reboloso Padilla por haber sido parte de mi formación como profesionista durante sus cursos impartidos, gracias químico por su amistad.*

*A mis amigos de la generación 2006 de ICTA, gracias porque a pesar de todo supieron demostrar que no importan los obstáculos que tengan si se lo proponen pueden lograrlo, sinceramente deseo que donde quiera que vayan tengan una vida llena de éxitos.*

*A Diana Ivon Luna Sánchez gracias por tu valiosa amistad, me llevo los mejores recuerdos que vivimos en esta etapa de universitarios y de todo corazón te deseo que donde quiera que vayas dios te bendiga a ti y tu familia.*

*A mis AMIGOS (cuates y camaradas): Diego, Yam, Benja, Juan, Mario, Marco Antonio, Nacho, Mata, Miguel Angel, agradezco el haber compartido esta etapa con ustedes, cada triunfo, cada momento de salidas a prácticas, congresos, fiestas y bailes no se*

*olvidaran, les deseo suerte en esta etapa que comienzan y tengan presente que en mí tienen a un amigo.*

*A Iris y Sagrario por hacer mi estancia aun más divertida, gracias por estar ahí cuando necesitaba una llamada de atención, y por las tantas parrandas vividas, por compartir su amistad conmigo.*

*A mis amigos del C.B.T.a. No.35 (Gloría, Pao, Luis, Javier, Domingo, Hernaldo, Síndy, Edgar, Julio, Hugo, Martita) gracias por sus buenos deseos y el apoyo recibido por parte de ustedes.*

*A Gloria Angélica y Estela por estar ahí siempre cuando más necesitaba un consejo y apoyo, por cada momento compartido y por cada una de las vivencias durante todo el tiempo de conocernos.*

*A aquellas personas que durante mi vida he tenido la oportunidad de conocer y más aún contar con su valiosa amistad: Ing. Lourdes (Lú), Manuel M.C., Susana R.M., Analía R.J., Claudia M.Y., Nayeli M.T., Dalía S.C., Candelaria M.A., Lorena P.O., T.L.Q. Laura Maricela (gracias por tu valiosa ayuda y consejos durante la etapa de laboratorio) a todos ellos gracias.*

## **DEDICATORIAS:**

*Primeramente a DIOS por prestarme vida cada día, por darme la fortaleza necesaria para enfrentar cada uno de los obstáculos y aprender de ellos, por darme la oportunidad de terminar esta etapa tan importante para mí y mi familia.*

*A mi padre Sr. Severiano Avendaño Cabanzo , quiero expresar todo el respeto que tengo para tí, gracias por enseñarme que cada cosa que uno se propone debe luchar hasta alcanzarlo, por enseñarme a trabajar por lo que uno desea, y por toda la confianza depositada en mí, no te decepcione hoy este trabajo es dedicado para tí.*

*A mi madre Sra. Leonarda Alvarez Monterola, por ser la persona quien más confianza me tiene, por apoyarme en todo momento y por cada uno de los consejos durante el tiempo que estuve fuera de casa, mi más profundo cariño y respeto, hoy este logro es parte de tí.*

*A mi hermana Erika Avendaño Alvarez gracias por todo el apoyo durante esta etapa, por tus buenos deseos, y por estar ahí siempre cuando más se necesita el unirnos como familia. Este logro también es parte tuya.*

*A mi hermano **Avelardo Avendaño Alvarez** tu ejemplo me motivo a conseguir las metas que me propuse, tu apoyo y consejos fueron parte fundamental para alcanzar este objetivo, sinceramente gracias carnal.*

*A mi hermana **Gabriela Avendaño Alvarez** tus buenos deseos y consejos me ayudaron en todo momento, por estar siempre dispuesta a apoyarnos, bendiciones para tí y tu familia.*

*A mi hermana **Rosario Avendaño Alvarez** por cada buen deseo y el apoyo recibido para seguir adelante cada día.*

*A mi hermano **Alan Avendaño Alvarez** por estar ahí apoyándome, porque si te fijas una meta y le echas ganas lo logras.*

*A mis sobrinos: **Adán, Isabel, Yatzary, Chuchito y Diana**, por cada momento de alegría compartida con ustedes, y por hacer de ellos momentos únicos, espero que tengan presente que cuentan conmigo y ahí estaré cuando me necesiten, este trabajo se los dedico y espero que luchen por alcanzar sus metas.*

*A mi cuñada **Brenda Cruz López** y mi cuñado **Emiliano Guerrero Juárez** gracias por los consejos y el apoyo recibido por parte de ustedes, deseándoles lo mejor en esta vida para ustedes y su familia, que dios los bendiga.*

## ÍNDICE GENERAL

	Página
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>CAPÍTULO I</b>	
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Antecedentes.....	3
1.2 Justificación.....	5
1.3 Hipótesis.....	6
1.4 Objetivo general.....	6
1.4.1 Objetivos específicos.....	6
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>2. Revisión de literatura</b> .....	7
2.1 Quitina.....	7
2.2 Quitosán.....	7
2.2.1 Obtención del quitosán.....	8
2.2.2 Actividad antimicrobiana del quitosán.....	9
2.3 Aplicación del quitosán en la industria alimentaria.....	12
2.3.1 Ingrediente dietético.....	13
2.3.2 Conservador de alimentos.....	13
2.3.3 Emulsiones en alimentos.....	13
2.3.4 Clarificación de jugos de fruta.....	14
2.3.5 Películas y recubrimientos comestibles.....	14
2.4 Oligosacáridos.....	15
2.4.1 Oligosacáridos de quitosán.....	15
2.5 Sustancias inhibidoras y aditivos.....	16
2.5.1 Definición.....	16
2.5.2 Efecto de las sustancias inhibidoras sobre los microorganismos.....	17
2.6 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA'S).....	18
2.6.1 Intoxicación alimentaria.....	19



3.2.1.2 Crecimiento en medio sólido.....	38
3.2.2 <i>Clostridium perfringens</i> .....	38
3.2.2.1 Preparación de medio sólido.....	38
3.2.2.2 Crecimiento en medio sólido.....	39
3.3 Evaluación microscópica de las cepas.....	39
3.3.1 Tinción de Gram.....	39
3.3.2 Tinción de esporas.....	40
3.4 Estudio cuantitativo de crecimiento en medio líquido.....	41
3.4.1 Crecimiento de <i>Bacillus cereus</i> en caldo nutritivo.....	42
3.4.2 Crecimiento de <i>Clostridium perfringens</i> en tioglicolato de sodio.....	43
<b>Etapa Experimental 2:</b> Cinéticas de inhibición cuantitativa de crecimiento en <i>Cl. perfringens</i> y <i>B. cereus</i> empleando oligosacáridos de quitosán.....	44
3.5 Inhibición cuantitativa de crecimiento de <i>Bacillus cereus</i> mediada por OQ de distintos pesos moleculares a diferentes tiempos de fermentación.....	45
3.6 Inhibición cuantitativa de crecimiento de <i>Clostridium perfringens</i> mediada por OQ de distintos pesos moleculares a diferentes tiempos de fermentación.....	46
<b>Etapa experimental 3:</b> Elaboración y caracterización de una película comestible a base de oligosacáridos de quitosán.....	47
3.7 Preparación de la solución.....	47
3.7.1 Formación de la película comestible a base de oligosacáridos de quitosán.....	47
3.8 Caracterización de las películas comestibles a base de	

oligosacáridos de quitosán.....	48
3.8.1 Color.....	48
3.8.2 Espesor.....	
<b>Etapa experimental 4:</b> Aplicación de películas de OQ sobre carne de res.....	48
3.9 Inmersión de trozos de carne de res en solución de OQ.....	48
3.10 Evaluación visual de las muestras de carne de res con película.....	50
<b>CAPÍTULO IV</b>	
<b>4.1 Resultados y discusión</b> .....	51
<b>Etapa experimental I:</b> Estudio cuantitativo del crecimiento microbiano de los microorganismos en medio sólido y medio líquido.....	51
4.1.1 Material biológico.....	51
4.1.2 Mantenimiento y proliferación de las cepas.....	51
4.1.2.1 <i>Bacillus cereus</i> .....	51
4.1.2.2 Crecimiento en medio sólido.....	51
4.1.2.3 Evaluación microscópica.....	52
4.1.3 <i>Clostridium perfringens</i> .....	52
4.1.3 Evaluación microscópica de las cepas.....	53
4.1.3.1 Tinción de Gram.....	53
4.1.3.2 Tinción de esporas.....	53
4.1.4 Estudio cuantitativo de crecimiento en medio líquido.....	54
4.1.4.1 Crecimiento de <i>Bacillus cereus</i> en caldo nutritivo.....	54
4.1.4.2 Crecimiento de <i>Clostridium perfringens</i> en tioglicolato de sodio.....	55
<b>Etapa Experimental 2:</b> Cinéticas de inhibición cuantitativa de crecimiento en <i>B. cereus</i> y <i>Cl. perfringens</i> empleando oligosacáridos de quitosán.....	57
4.1.5 Inhibición cuantitativa de crecimiento de <i>Bacillus cereus</i> mediada por OQ de distintos pesos moleculares a diferentes tiempos de fermentación.....	57

4.1.5.1 Curvas de Inhibición mediada por OQ concentración de 0.3%.....	57
4.1.5.2 Curvas de Inhibición mediada por OQ concentración de 2.0%.....	62
4.1.6 Inhibición cuantitativa de crecimiento de <i>Clostridium perfringens</i> mediada por OQ de distintos pesos moleculares a diferentes tiempos de fermentación.....	67
4.1.6.1 Curvas de Inhibición mediada por OQ concentración de 0.3%.....	67
4.1.6.2 Curvas de Inhibición mediada por OQ concentración de 2.0%.....	72
<b>Etapas Experimentales:</b>	
<b>Etapas Experimentales 3:</b> Elaboración y Caracterización de una película comestible a base de oligosacáridos de quitosán.....	80
4.1.7 Preparación de la solución.....	80
4.1.8 Formación de la película de oligosacáridos de quitosán.....	80
4.1.9 Caracterización de las películas comestibles a base de oligosacáridos de quitosán.....	82
4.1.9.1 Color.....	82
4.1.9.2 Espesor.....	87
<b>Etapas Experimentales 4:</b> Aplicación de películas de OQ sobre carne de res.....	94
4.1.10 Inmersión de trozos de carne de res en solución de OQ....	94
4.1.11 Evaluación visual de las muestras de carne de res con película.....	95
<b>CONCLUSIONES</b> .....	98
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	99
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	100

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Proceso de obtención del quitosán.....	9
<b>Figura 2.</b> Método de siembra por estría abierta cruzada, utilizado para la proliferación de las cepas en medio sólido.....	38
<b>Figura 3.</b> Técnica de tinción de Gram.....	40
<b>Figura 4.</b> Técnica de tinción de esporas utilizado para la identificación microscópica de <i>Cl. perfringens</i> .....	41
<b>Figura 5.</b> Fotografía de los oligosacáridos de quitosán en buffer de ácido acético-acetato de sodio a diferentes pesos moleculares y tiempos de fermentación, utilizados como inhibidores.....	44
<b>Figura 6.</b> Preparación de matraces con caldo nutritivo y el inhibidor a concentración de 0.3 y 2.0%.....	45
<b>Figura 7.</b> Tubos de ensaye con tioglicolato de sodio, OQAPM1 e inóculo a una concentración de 0.3 y 2.0%.....	46
<b>Figura 8.</b> Aplicación de las películas de OQ sobre trozos de carne de res por sumergido en solución.....	49
<b>Figura 9.</b> Formato de evaluación para la prueba triangular entregada a los jueces.....	50
<b>Figura 10.</b> Colonias de <i>Bacillus cereus</i> en agar nutritivo.....	51
<b>Figura 11.</b> Observación microscópica (100X) de <i>B. cereus</i> (bacilos Gram+).....	52
<b>Figura 12.</b> Observación microscópica (100X) de <i>Cl. perfringens</i> (bacilos Gram+).....	53
<b>Figura 13.</b> Curva de crecimiento para <i>B. cereus</i> en caldo nutritivo.....	55
<b>Figura 14.</b> Curva de crecimiento para <i>Cl. perfringens</i> en tioglicolato de sodio.....	56
<b>Figura 15.</b> Curva de inhibición <i>B. cereus</i> en caldo nutritivo con OQAPM1 a una concentración de 0.3%.....	58
<b>Figura 16.</b> Curva de inhibición <i>B. cereus</i> en caldo nutritivo con	

OQAPM2 a una concentración de 0.3%.....	59
<b>Figura 17.</b> Curva de inhibición <i>B. cereus</i> en caldo nutritivo con OQMPM1 a una concentración de 0.3%.....	59
<b>Figura 18.</b> Curva de inhibición <i>B. cereus</i> en caldo nutritivo con OQMPM2 a una concentración de 0.3%.....	60
<b>Figura 19.</b> Estudio comparativo de cinéticas de crecimiento: curva de <i>B. cereus</i> en caldo nutritivo con OQ a diferentes pesos moleculares a una concentración de 0.3%, y la curva de crecimiento de BC1 (control).....	61
<b>Figura 20.</b> Curva de inhibición <i>B. cereus</i> en caldo nutritivo con OQAPM1 a una concentración de 2.0%.....	62
<b>Figura 21.</b> Curva de inhibición <i>B. cereus</i> en caldo nutritivo con OQAPM2 a una concentración de 2.0%.....	63
<b>Figura 22.</b> Curva de inhibición <i>B. cereus</i> en caldo nutritivo con OQMPM1 a una concentración de 2.0%.....	64
<b>Figura 23.</b> Curva de inhibición <i>B. cereus</i> en caldo nutritivo con OQMPM2 a una concentración de 2.0%.....	65
<b>Figura 24.</b> Estudio comparativo de cinéticas de crecimiento: curva de <i>B. cereus</i> en caldo nutritivo con OQ a diferentes pesos moleculares a una concentración de 2.0%, curva de crecimiento de BC1 (control).....	66
<b>Figura 25.</b> Curva de inhibición <i>Cl. perfringens</i> en tioglicolato de sodio con OQAPM1 a una concentración de 0.3%.....	67
<b>Figura 26.</b> Curva de inhibición <i>Cl. perfringens</i> en tioglicolato de sodio con OQAPM2 a una concentración de 0.3%.....	68
<b>Figura 27.</b> Curva de inhibición <i>Cl. perfringens</i> en tioglicolato de sodio con OQMPM1 a una concentración de 0.3%.....	69
<b>Figura 28.</b> Curva de inhibición <i>Cl. perfringens</i> en tioglicolato de sodio con OQMPM2 a una concentración de 0.3%.....	70
<b>Figura 29.</b> Estudio comparativo de cinéticas de crecimiento: curva de <i>Cl. perfringens</i> en tioglicolato de sodio con OQ a diferentes pesos moleculares a una concentración de 0.3%, curva de crecimiento de	

CP1 (control).....	71
<b>Figura 30.</b> Curva de inhibición <i>Cl. perfringens</i> en tioglicolato de sodio con OQAPM1 a una concentración de 2.0%.....	72
<b>Figura 31.</b> Curva de inhibición <i>Cl. perfringens</i> en tioglicolato de sodio con OQAPM2 a una concentración de 2.0%.....	73
<b>Figura 32.</b> Curva de inhibición <i>Cl. perfringens</i> en tioglicolato de sodio con OQMPM1 a una concentración de 2.0%.....	73
<b>Figura 33.</b> Curva de inhibición <i>Cl. perfringens</i> en tioglicolato de sodio con OQMPM2 a una concentración de 2.0%.....	74
<b>Figura 34.</b> Estudio comparativo de cinéticas de crecimiento: curva de <i>Cl. perfringens</i> en tioglicolato de sodio con OQ a diferentes pesos moleculares a una concentración de 2.0%, y curva de crecimiento de CP1 (control).....	75
<b>Figura 35.</b> Curvas de inhibición obtenidas por Moreno (2009) al aplicar OQ sobre <i>B. cereus</i> : a) concentración de OQ (0.5%), b) concentración de OQ (1.0%), c) concentración de OQ (1.5%).....	76
<b>Figura 36.</b> Curvas de inhibición obtenidas por Moreno (2009) al aplicar OQ sobre <i>Cl. perfringens</i> : a) concentración de OQ (0.5%), b) concentración de OQ (1.0%), c) concentración de OQ (1.5%).....	77
<b>Figura 37.</b> Curvas de inhibición obtenidas por Moreno (2009) y Avendaño (2010): <i>B. cereus</i> en caldo nutritivo y concentraciones de OQ de 0.3, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0%.....	78
<b>Figura 38.</b> Curvas de inhibición obtenidas por Moreno (2009) y Avendaño (2010): <i>Cl. perfringens</i> en tioglicolato de sodio y concentraciones de OQ de 0.3, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0%.....	79
<b>Figura 39.</b> Película de OQAPM1 0.3% desprendida de la caja Petri.....	82
<b>Figura 40.</b> a) Película de OQ 0.3%, b) Película OQ 0.5%.....	83
<b>Figura 41.</b> c) Película OQ 1.0%, d) Película OQ 1.5% y c) Película OQ 2.0%.....	83
<b>Figura 42.</b> Identificación de las películas en el diagrama del sistema	

de notación de color L, a, b.....	86
<b>Figura 43.</b> Medición del espesor en las películas de OQ con el micrómetro digital Mitutoyo.....	87
<b>Figura 44.</b> Espesor de las películas de OQ concentración de 0.3% en cajas Petri de 9cm de diámetro.....	89
<b>Figura 45.</b> Espesor de las películas de OQ concentración de 0.5% en cajas Petri de 9cm de diámetro.....	90
<b>Figura 46.</b> Espesor de las películas de OQ concentración de 1.0% en cajas Petri de 10cm de diámetro.....	91
<b>Figura 47.</b> Espesor de las películas de OQ concentración de 1.5% en cajas Petri de 10cm de diámetro.....	92
<b>Figura 48.</b> Espesor de las películas de OQ concentración de 2.0% en cajas Petri de 10cm de diámetro.....	93
<b>Figura 49.</b> Platos con muestras de trozos de carne de res con película de OQAPM1, OQAPM2, OQMPM1, OQMPM2.....	96

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
<b>Cuadro 1.</b> Efecto del quitosán como inhibidor de colonias de bacterias patógenas en humanos.....	12
<b>Cuadro 2.</b> Clasificación de <i>Cl. perfringens</i> basada en la producción de toxinas.....	26
<b>Cuadro 3.</b> Características de los OQ empleados como inhibidores de crecimiento.....	44
<b>Cuadro 4.</b> Valores de velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) obtenidas al aplicar los OQ en concentración de 0.3%.....	61
<b>Cuadro 5.</b> Valores de velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) obtenidas al aplicar los OQ en concentración de 2.0%.....	66
<b>Cuadro 6.</b> Valores de velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) obtenidas al aplicar los OQ en concentración de 0.3%.....	71
<b>Cuadro 7.</b> Valores de velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) obtenidas al aplicar los OQ en concentración de 2.0%.....	75
<b>Cuadro 8.</b> Diámetro de las cajas Petri utilizadas y estufa usada para el secado de las películas.....	81
<b>Cuadro 9.</b> Valores obtenidos en la lectura con el colorímetro en películas concentración de 0.3%.....	84
<b>Cuadro 10.</b> Valores obtenidos en la lectura con el colorímetro en películas concentración de 0.5%.....	84
<b>Cuadro 11.</b> Valores obtenidos en la lectura con el colorímetro en películas concentración de 1.0%.....	85
<b>Cuadro 12.</b> Valores obtenidos en la lectura con el colorímetro en películas concentración de 1.5%.....	85

<b>Cuadro 13.</b> Valores obtenidos en la lectura con el colorímetro en películas concentración de 2.0%.....	85
<b>Cuadro 14.</b> Espesor promedio de las películas de OQ a concentración de 0.3%.....	89
<b>Cuadro 15.</b> Espesor promedio de las películas de OQ a concentración de 0.5%.....	90
<b>Cuadro 16.</b> Espesor promedio de las películas de OQ concentración de 1.0%.....	91
<b>Cuadro 17.</b> Espesor promedio de las películas de OQ a concentración de 1.5%.....	92
<b>Cuadro 18</b> Espesor promedio de las películas de OQ a concentración de 2.0%.....	93



## RESUMEN

Hoy en día la temática principal sobre aspectos de inocuidad alimentaria exige que los ingenieros, tecnólogos y procesadores de alimentos contribuyan a proteger y garantizar la salud de los consumidores, ofreciendo nuevas alternativas que ayuden a garantizar productos alimenticios libres de microorganismos patógenos, y que a su vez representen novedosas técnicas de conservación de los mismos.

La creciente atención que han recibido los oligosacáridos de quitosán es debido a que presentan mayores ventajas en comparación con el quitosán, entre las que destacan sus efectos inhibitorios en el crecimiento de bacterias y hongos superando a los del quitosán, su solubilidad en agua, su bajo peso molecular y su menor viscosidad en solución (Tian *et al*, 2003).

Aunque no se ha determinado un mecanismo de acción de cómo se realiza esta inhibición, algunos autores suponen que los aminoácidos catiónicos de los oligosacáridos de quitosán se unen a los grupos aniónicos de los microorganismos y retardan su crecimiento (Majeti y Kumar, 2000). Otros investigadores plantean que la acción está dada de forma indirecta al hacer inaccesible el  $Ca^{2+}$ , nutrientes y minerales esenciales para el crecimiento de hongos filamentosos (Roller y Covill, 1999).

Se realizaron siembras en medio sólido agar nutritivo y agar Sheadler para la purificación de las cepas de los microorganismos en estudio *B. cereus* y *Cl. perfringens*.

Para evidenciar el efecto de los oligosacáridos de quitosán sobre el crecimiento de los microorganismos se llevaron a cabo cinéticas de inhibición en medio líquido empleando la técnica de turbidez utilizando concentraciones de 0.3 y 2.0%.

El efecto que presentan los OQ sobre los microorganismos en estudio a concentración de 0.3 y 2.0% es de tipo bacteriostático, observando que el peso molecular es un factor importante sobre el efecto en el microorganismo, siendo los de menor peso molecular los más fáciles de metabolizar, así mismo la concentración empleada es un punto clave debido a que conforme se aumenta su concentración los microorganismos se adaptan al medio, empleándolos como fuente alterna de carbono.

Se formuló una película comestible a base de oligosacáridos de quitosán para ser caracterizada mediante medición de su espesor y de su color, las películas a concentraciones de 0.3 y 0.5% mostraron un color transparente, mientras que en concentraciones de 1.0, 1.5 y 2.0% presentaron una tonalidad ambar que iba aumentando de acuerdo al tipo de OQ.

De los resultados obtenidos por Moreno (2009) se tiene que la concentración del 1.0% presenta un efecto de tipo bactericida sobre los microorganismos esporulados, por lo cual con esta concentración se aplicó la película sobre trozos de carne de res mediante inmersión por tiempo de 1 minuto. Las muestras de carne fueron evaluadas visualmente mediante una prueba triangular mostrando significancia entre ellas, observándose cambios principalmente el aspecto y color.

Para evaluar la vida de almacén de los trozos de carne de res con película se emplearon charolas con muestras almacenadas a temperatura de 3°C y comparando con carne sin película como control, obteniendo un tiempo de 10 días.

***Palabras clave: oligosacáridos de quitosán, inhibición, película comestible, carne de res.***

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

Se sabe que por lo menos tres bacilos Gram-positivos esporógenos producen intoxicaciones bacterianas por los alimentos: *Clostridium perfringens*, *C. botulinum*, y *Bacillus cereus*. La incidencia de la intoxicación alimentaria producida por estos organismos está relacionada con determinados alimentos concretos, de igual modo que lo está la intoxicación alimentaria en general (Monroe, 2002).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha definido a las ETA como “una enfermedad de carácter infeccioso o tóxico que es causada, o que se cree que es causada, por el consumo de alimentos o de agua contaminada”. El Comité de Expertos de la OMS analizó que la mayoría de las enfermedades por alimentos son de origen microbiano, que tal vez sea el problema más extendido en el mundo contemporáneo y una causa importante de la reducida productividad económica (OMS, 2010).

El quitosán, un nombre dado a una forma desacetilada de la quitina, un compuesto natural biodegradable derivado de las conchas de crustáceos, como los cangrejos y camarones, cuyos principales atributos se corresponde con su naturaleza policatiónica (Bautista *et al*, 2005). Su actividad antimicrobiana contra los diferentes grupos de microorganismos, tales como bacterias, levaduras y hongos, ha recibido una atención considerable en los últimos años.

La interacción electrostática entre el quitosán cargado positivamente (polielectrolito catiónico) y algunas bacterias con membranas celulares cargadas negativamente (Gram negativas como la *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus typhimurium*, etc.) altera significativamente las propiedades de barrera de la membrana exterior del

microorganismo (Helander *et al.*, 2001). Algunos autores han propuesto que la formación del complejo polielectrolito bloquea físicamente la membrana celular externa del microorganismo, impidiendo el flujo normal de nutrimentos/desechos, provocando la muerte bacteriana (Chung *et al.*, 2004).

Los oligosacáridos de quitosán (OQ) son polímeros de hasta 20 monosacáridos. La unión tiene lugar mediante enlaces glucosídicos. Se ha establecido un límite arbitrariamente de 20 unidades para definir a los oligosacáridos de quitosán (Tombs, 1998).

Una película comestible, según Guilbert (1986) es una capa delgada y continua, hecha de materiales que puedan ser ingeridos por el consumidor y provee una barrera a la humedad, oxígeno y solutos. El material puede cubrir completamente el alimento o puede colocarse entre los componentes del producto.

Las películas comestibles tienen la capacidad de incorporar agentes antimicrobianos para proveer estabilidad microbiológica a los alimentos; ya que sirven como acarreadoras de un amplio número de compuestos, los cuales incluyen enzimas, agentes quelantes, bacteriocinas, benzoatos, propionatos, parabenos, sorbatos, agentes curantes, y antimicrobianos de origen natural como los aceites esenciales. Estos compuestos tienen la capacidad de extender la vida de anaquel de un producto y reducir el riesgo de crecimiento de patógenos en la superficie de los alimentos (Rooney, 2002; Cagri *et al.*, 2004; Min y Krochta, 2005; Lin y Zhao, 2007; Ozdemir y Floros, 2008).

## **1.2 Justificación**

El creciente interés por el desarrollo de películas y cubiertas comestibles para incrementar la conservación de alimentos se debe fundamentalmente a las exigencias, cada vez mayores de reducir el impacto en la contaminación ambiental que se ha producido con el incremento de desechos generados por el uso de envases y plásticos de origen sintético o no biodegradables para el empaclado y distribución de alimentos.

Otro de los factores que actualmente han llevado a la elaboración de películas comestibles es debido a que el crecimiento microbiano en la superficie de los alimentos es la principal causa de su deterioro y enfermedades transmitidas por éstos, por lo cual es necesario el contar con técnicas novedosas que permitan ofrecer al consumidor productos inocuos que a la vez no influyan de manera directa sobre las propiedades nutricionales y organolépticas del alimento.

El utilizar oligosacáridos de quitosán como agente antimicrobiano en películas comestibles representa una alternativa para combatir el deterioro ocasionado por microorganismos sobre la carne, además de que debido a las propiedades que ofrecen pueden inhibir el crecimiento de patógenos que representan una amenaza a la salud de los consumidores.

### **1.3 Hipótesis**

La aplicación de películas de oligosacáridos de quitosán en carne de res eliminan y/o inhiben el crecimiento de bacterias patógenas esporuladas (*Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens*).

### **1.4 Objetivo general**

Demostrar el efecto inhibitorio celular de películas de oligosacáridos de quitosán aplicadas en carne.

#### **1.4.1 Objetivos específicos**

- Estudiar cuantitativamente el crecimiento microbiano de los microorganismos en medio sólido y en medio líquido.
- Realizar cinéticas de inhibición de crecimiento de *Cl. perfringens* y *B. cereus*.
- Elaborar y caracterizar una película comestible a base de oligosacáridos de quitosán.
- Realizar la aplicación de la película comestible sobre la carne de res para su evaluación visual y de vida de anaquel.

# **CAPÍTULO II**

## **2. Revisión de literatura**

### **2.1 Quitina**

Es un polisacárido presente en el exoesqueleto de artrópodos y zooplancton marinos, formando parte de la pared celular de algunas familias de hongos y levaduras, también está presente en las alas de especies de insectos (Hernández, 2004).

La quitina es un polímero de N-acetilglucosamina, se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza de tal forma que constituye el segundo polímero más abundante después de la celulosa. Es un polisacárido no tóxico y biodegradable (Guzmán, 2003). Se encuentra formada por monómeros 2-acetamido-2desoxi- $\alpha$ -D-glucosa, unido mediante enlaces  $\alpha$ 1-4. Su estructura es similar al de la celulosa con excepción de que los grupos hidroxil en la posición 2 son reemplazados por grupos acetilamino (Peral y Gartzia, 2002).

La quitina fue encontrada por primera vez en 1811 por el profesor Henri Braconnot en hongos. En 1830 se aisló en insectos y se le dio el nombre de quitina (Guzmán, 2003).

La quitina es un producto ligero, en polvos o copos de color blanco o amarillento que puede ser procesada en múltiples derivados como el quitosán (Guzmán, 2003).

### **2.2 Quitosán**

Quitosán (también conocido con el nombre de quitosano, quitosana o chitosan en inglés), un nombre dado a una forma desacetilada de la quitina, un

compuesto natural biodegradable derivado de las conchas de crustáceos, como los cangrejos y camarones, cuyos principales atributos se corresponde con su naturaleza policatiónica (Bautista *et al*, 2005).

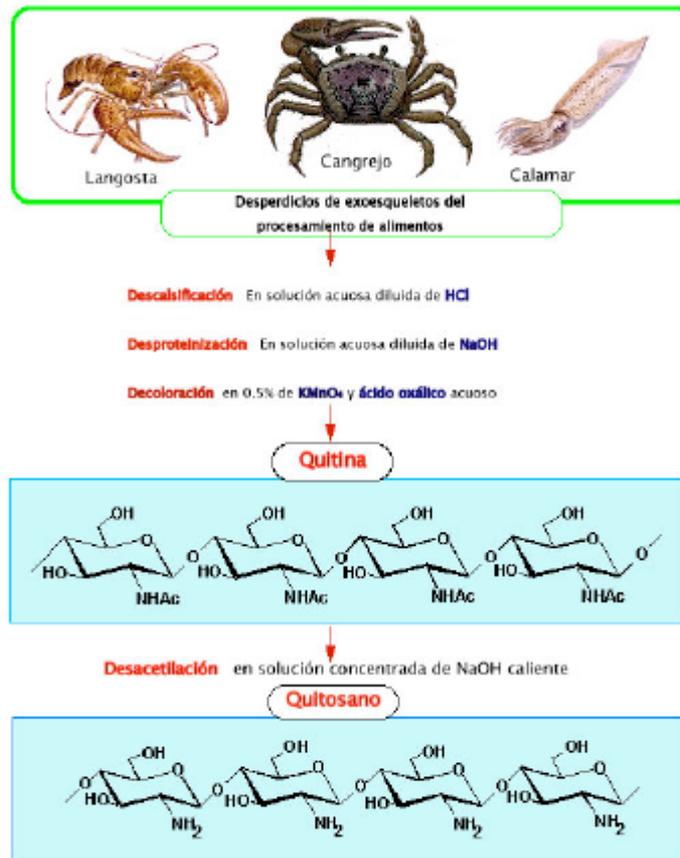
La quitina y el quitosán son polisacáridos, químicamente similar a la celulosa que sólo difieren en la presencia o ausencia de nitrógeno (Bautista *et al*, 2005).

Es un polímero lineal formado por monómeros de D-Glucosamina, los que se encuentran unidos por enlaces  $\beta$ 1-4, siendo nombrada químicamente: 2-amino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranososa. Su masa molar puede variar en el rango de 10 000 hasta el orden de los millones de Daltons (Hernández, 2004).

Se define la quitina y el quitosán como solubles o insolubles en ácido acético a 0.1 mol/L respectivamente o por el grado de desacetilación. La quitina con más de un 50% de desacetilación es considerada quitosán e incluso otros la definen como tal ante un grado de desacetilación superior al 60%. Usualmente en el caso del quitosán, se establece que el grado de desacetilación se encuentra comprendido entre 60-98% (Hernández, 2004).

### **2.2.1 Obtención del quitosán**

La desacetilación de la quitina para la producción de quitosán se realiza mediante una solución concentrada y caliente de NaOH (40-50%). El proceso de obtención de quitosán se realiza con una serie de lavados alcalinos, ácidos y con suficiente agua (figura 1). Los factores principales que determinan la calidad del quitosán son: el grado de desacetilación (ente mayor sea esta, mejor será la calidad) y la viscosidad estándar, la cual va a reflejar el peso molecular (Díaz, 2003).



**Figura 1.** Proceso de obtención de quitosán (Citado por Díaz, 2003).

### 2.2.1 Actividad antimicrobiana del quitosán

La actividad antimicrobiana de la quitina, el quitosán, y sus derivados contra los diferentes grupos de microorganismos, tales como bacterias, levaduras y hongos, ha recibido una atención considerable en los últimos años.

Nurmiaho *et al.* (2001) señalan dos mecanismos principales sugeridos como la causa de la inhibición de las células microbianas por el quitosán:

- 1) La interacción con los grupos aniónicos en la superficie celular, debido a su naturaleza policatiónica, provoca la formación de una capa impermeable alrededor de la célula, lo que impide el transporte de solutos esenciales. Se ha demostrado por microscopía electrónica que el sitio de acción es la membrana externa en las bacterias Gram negativas. El efecto permeabilizante se ha observado en condiciones ligeramente ácido en el que el quitosán es protonado, pero este efecto permeabilizante de quitosán es reversible.
  
- 2) El segundo mecanismo consiste en la inhibición del ARN y la síntesis de proteínas por la penetración en el núcleo de la célula.

La interacción electrostática entre el quitosán cargado positivamente (polielectrolito catiónico) y algunas bacterias con membranas celulares cargadas negativamente (Gram negativas como la *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus typhimurium*, etc.) altera significativamente las propiedades de barrera de la membrana exterior del microorganismo (Helander *et al.*, 2001). Algunos autores han propuesto que la formación del complejo polielectrolito bloquea físicamente la membrana celular externa del microorganismo, impidiendo el flujo normal de nutrientes/desechos, provocando la muerte bacteriana (Chung *et al.*, 2004).

La interacción electrostática entre los grupos  $\text{NH}_3^+$  del polication y los grupos fosforilos (Fernández *et al.*, 2003) de los fosfolípidos presentes en la membrana celular de bacterias Gram negativas causa daños en ésta, provocando la salida de material intracelular (Liu *et al.*, 2004). En este sentido se han realizado estudios espectroscópicos de la salida de dicho material, el cual absorbe en la región ultravioleta (270 nm). Más recientemente Chung y Chen (2008) han determinado que la salida del material intracelular bacteriano se ve favorecida por grados de acetilación más altos, tanto en bacterias Gram negativas (*E. coli*) como en Gram positivas (*Staphylococcus aureus*).

Para algunas bacterias Gram positivas (como *S. aureus* y *Bacillus cereus*) que carecen de cargas negativas en la membrana celular, el quitosán ha mostrado actividad incluso mayor, en algunos casos, que para bacterias Gram negativas. En el caso de *S. aureus* recientemente se ha planteado la posibilidad de que la membrana celular de estos microorganismos tenga poros lo suficientemente grandes como para que el quitosán logre entrar al interior de las células (Li *et al*, 2007) y alterar ADN, por ejemplo, podría inhibir la replicación del ARNm y la síntesis de proteínas (Hadwiger *et al*, 1985; Sudarshan *et al*, 1992) y su efecto quelante podría disminuir la concentración de algunos metales necesarios en procesos enzimáticos (Cuero *et al*, 1991). Sin embargo, otros autores creen que la longitud de persistencia del quitosán cargado positivamente es demasiado grande para poder pasar al interior de las células (Chung *et al*, 2003).

La interacción selectiva del quitosán con trazas de metales pudiera inhibir la producción de toxinas y el crecimiento microbiano (Sudarshan *et al*, 1992). En este sentido se conoce bien que el quitosán puede ejercer una acción quelante bien específica (Varma *et al*, 2004).

Pérez (2009) demostró que los oligosacáridos de quitosán presentan un efecto bacteriostático sobre *Ps. aeruginosa* en concentraciones de 1.0 y 1.5%, obteniéndose un retraso en el crecimiento de 72 horas y que los oligosacáridos de quitosán presentan un efecto bactericida sobre *E. coli* en concentraciones de 0.5 %.

Moreno (2009) demostró que los oligosacáridos de quitosán de alto peso molecular presentan un efecto bactericida sobre los microorganismos esporulados de *Clostridium perfringens* y *Bacillus cereus* a una concentración de 1 y 1.5%, sin embargo con la concentración de 0.5% solo presentan efecto bacteriostático tanto los oligosacáridos de quitosán de mediano peso molecular como los oligosacáridos de quitosán de alto peso molecular.

**Cuadro 1.** Efecto del quitosán como inhibidor de colonias de bacterias patógenas en humanos.

Patógeno	Concentración de quitosano	Resultados	Referencias
<i>Escherichia coli</i>	100 mg L <sup>-1</sup>	Inhibición de la colonia	Nan <i>et al.</i> , 2006
	10 mg L <sup>-1</sup>	“	Lim y Hudson, 2004
	0.25 µg mL <sup>-1</sup>	“	Qi <i>et al.</i> , 2004
	0.0075%	“	Simpson <i>et al.</i> , 1997
<i>Listeria monocytogenes</i>	1%	“	Beberlya <i>et al.</i> , 2008
	1%	“	Ponce <i>et al.</i> , 2008
	1%	“	Belalia <i>et al.</i> , 2008
	2%	“	Ye <i>et al.</i> , 2008
<i>Salmonella typhimurium</i>	1%	“	Belalia <i>et al.</i> , 2008
<i>S. enterica</i>	1%	“	Su <i>et al.</i> , 2007

(Ramos *et al.*, 2010)

### 2.3 Aplicación del quitosán en la industria alimentaria

El quitosán ofrece una amplia gama de aplicaciones únicas en la industria alimentaria, incluida la conservación de los alimentos debido al deterioro por microorganismos, formación de películas biodegradables y la recuperación de materiales de desecho del procesado de alimentos. Por otra parte, puede actuar como fibra dietética y como ingrediente de alimentos funcionales (Aranaz *et al.*, 2009).

El quitosán ha sido aprobado como alimento funcional en algunos países asiáticos (Japón, Corea) durante la última década. La inclusión de la quitina y el quitosán fueron considerados en 2003 por la Comisión del Codex Alimentarius, pero en la actualidad no figuran en la Norma General para los Aditivos Alimentarios ni ha sido autorizado como nuevo ingrediente alimentario en la UE. Aunque varios estudios han demostrado que este compuesto no es tóxico, no existen estudios reportados a largo plazo de la seguridad humana (Aranaz *et al.*, 2009).

### **2.3.1 Ingrediente dietético**

El quitosán se ha utilizado como suplemento nutricional en múltiples productos debido a su capacidad para unirse a la grasa. Los estudios in vivo tienen la intención de demostrar una reducción significativa en el aumento de peso corporal o en el contenido de lípidos en el plasma de los seres humanos o animales (Aranaz *et al*, 2009).

El quitosán se vende en Estados Unidos y otros países en forma de fibra alimenticia para reducir la absorción de grasa. Sin embargo, la evidencia científica indica solamente un efecto menor en la absorción de grasa (Lárez, 2003).

### **2.3.2 Conservador de alimentos**

El quitosán ha sido identificado como un biopolímero versátil de origen natural para la conservación de alimentos debido a su acción antimicrobiana contra los microorganismos que ocasionan el deterioro de los alimentos, así como de su propiedad antioxidante. La solubilidad depende del pH, lo que le permite adoptar diversas formas (bolas, películas y membranas) utilizando procesos acuosos (Aberg *et al*, 2004).

### **2.3.3 Emulsiones en alimentos**

Las propiedades antimicrobianas del quitosán en un medio líquido será poco representada en los sistemas alimentarios complejos en donde la interacción del quitosán con otros componentes puede modular su actividad (Oh *et al*, 2001).

El quitosán es soluble en solución de ácido acético y su localización en la interfase es excelente predisposición para su aplicación como agente

antimicrobiano dentro de emulsiones en alimentos, a pesar de que las emulsiones contienen grandes concentraciones de aceite (Zivanovic *et al*, 2004).

#### **2.3.4 Clarificación de jugos de fruta**

En varios países se ha aprobado el uso del quitosán para ser utilizado como aditivo en la clarificación de jugos de frutas (Baxter *et al*, 2005; Oszmiański y Wojdyło, 2007), aunque éste presenta los mismos inconvenientes de insolubilidad en medios neutros o alcalinos, por lo que se han ensayado con quitosán modificados para solventar dicha insolubilidad. Una de las vías rápidas que se ha encontrado para solubilizar el quitosán es la disminución de su grado de polimerización mediante hidrólisis con ácido acético a 95 °C (Chatterjee *et al*, 2004); el hidrolizado así obtenido se usó, después de su purificación, como agente coagulante/floculante en la clarificación de jugos de varias frutas (manzana, uva, naranja y limón) obteniéndose resultados satisfactorios. Así por ejemplo, para todos los jugos ensayados con este quitosán se obtuvo una mayor disminución de la turbidez que con otros agentes clarificantes como bentonita y gelatina, un contenido de ácidos y azúcares similar a los originales y un contenido de sólidos totales y proteínas sólo ligeramente inferior; de la misma manera, las propiedades de sabor, color, apariencia y aceptabilidad mejoraron después del tratamiento con quitosán (Lárez, 2008).

#### **2.3.5 Películas y recubrimientos comestibles**

El uso de quitosán para el recubrimiento de frutas y vegetales se ha propuesto y ensayado desde hace más de 15 años (Ghaouth *et al*, 1991) debido a sus propiedades bactericidas y fungicidas, su capacidad para formar películas y su baja toxicidad en seres humanos, la cual había sido estudiada en la década de los sesenta del siglo pasado (Arai *et al*, 1968). En principio, la capacidad del quitosano para formar películas favorece la preservación de los

productos debido a la modificación de la atmósfera interna y a la disminución de las pérdidas por transpiración (Lárez, 2008).

## **2.4 Oligosacáridos**

Los oligosacáridos son un grupo importante de hidratos de carbono poliméricos que se encuentran ya sea libres o en formas combinadas en todos los organismos vivos. El término genérico "oligosacáridos" es utilizado habitualmente para los sacáridos que tienen el grado de polimerización de 2-10 (Nakakuki, 2002).

Estructuralmente, los oligosacáridos están compuestos de 2-10 residuos de monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos que se hidrolizan rápidamente a sus monosacáridos constituyentes, ya sea por ácidos o enzimas específicas (Nakakuki, 2002).

### **2.4.1 Oligosacáridos de quitosán**

Los oligosacáridos de quitosán (OQ) son polímeros de hasta 20 monosacáridos. La unión tiene lugar mediante enlaces glucosídicos. Se ha establecido un límite arbitrariamente de 20 unidades para definir a los oligosacáridos de quitosán (Tombs, 1998).

Los OQ son amino azúcares de bajo peso molecular. Estos oligosacáridos son una mezcla de oligómeros de D-glucosamina con un grado de polimerización de 20.3 y un peso molecular de aproximadamente 2000 Da (Park, 2002).

Los oligosacáridos de quitosán pueden obtenerse por dos métodos fundamentalmente: químicos y enzimáticos. Sin embargo, la degradación enzimática de los polímeros de quitosán posee una mayor efectividad, debido a

que el curso de la reacción de hidrólisis y la distribución de los productos de ella, están sujetos a un mejor control, además de propiciar este método un rendimiento mayor de los productos de hidrólisis (Hernández, 2004).

El método enzimático de hidrólisis se basa en el empleo de enzimas con actividad quitosanasas, cuya acción sobre el quitosán permite obtener compuestos hidrolizados por fragmentos menores u oligosacáridos de quitosán, los que se pueden separar cromatográficamente de acuerdo a su grado de polimerización (Hernández, 2004).

La creciente atención que han recibido los oligosacáridos de quitosán es debido a que presentan mayores ventajas en comparación con el quitosán, entre las que destacan sus efectos inhibitorios en el crecimiento de bacterias y hongos superando a los del quitosán, su solubilidad en agua, su bajo peso molecular y su menor viscosidad en solución (Tian *et al.*, 2003).

La longitud de la cadena, el grado de desacetilación (DA) y el peso molecular de los oligosacáridos de quitosán están considerados como los factores importantes que influyen las actividades biológicas. Además de que para que sean eficientemente absorbidos por el cuerpo deben de ser de bajo peso molecular (Choi *et al.*, 1999).

## **2.5 Sustancias inhibidoras y aditivos**

### **2.5.1 Definición**

Las sustancias inhibidoras son moléculas que poseen un poder bacteriostático y/o bactericida, algunas pueden ser sustancias específicamente inhibidoras de mohos. Existe una gama muy variada tanto por su composición química, como por los mecanismos de acción (Bourgeois *et al.*, 1994).

Un aditivo alimentario es una sustancia, o mezcla de sustancias, distinta a la materia prima básica del alimento, que se encuentra en éste como resultado de cualquier fase de su producción, de su tratamiento, de su almacenamiento o de su envasado (Frazier y Westhoff, 2003).

A aquellos aditivos alimentarios que se añaden a los alimentos concretamente para evitar que se alteren o que se contaminen, se les ha dado la denominación de conservadores químicos. La inhibición de la multiplicación y de la actividad de los microorganismos es uno de los principales objetivos del empleo de los conservadores químicos (Frazier y Westhoff, 2003).

Los conservadores pueden inhibir a los microorganismos por dañar su membrana celular, o por obstaculizar la actividad de sus enzimas o sus mecanismos genéticos (Frazier y Westhoff, 2003).

### **2.5.2 Efecto de las sustancias inhibidoras en los microorganismos**

Ciertos alimentos contienen de forma natural sustancias antimicrobianas, es el caso de la lisozima en huevo y leche o el de los aceites esenciales de las especias o el del gopiol un antioxidante presente en las semillas de algodón (Bourgeois *et al*, 1994).

La lisozima posee una actividad específicamente antibacteriana, ya que hidroliza la pared celular; los aceites esenciales y el gopiol tienen un espectro más amplio y son además antifúngicos (Bourgeois *et al*, 1994).

Con fines de estabilización de alimentos, a veces se les añaden sustancias que impiden la proliferación microbiana, bien sea de forma limitada a algunos microorganismos concretos o de forma mucho más amplia (Bourgeois *et al*, 1994).

Los Gram (+) son sensibles específicamente a numerosas moléculas, tales como el citrato, la nisina, hidroxianisol, o el hidroxitolueno butilado, así como a moléculas más conocidas por su acción antifúngica, como los sorbatos o los benzoatos. Los Gram (-) son más resistentes que los Gram (+), no obstante son sensibles a los aditivos de amplio espectro y también al SO<sub>2</sub> (Bourgeois *et al*, 1994).

## **2.6 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA'S)**

La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha definido a las ETA como “*una enfermedad de carácter infeccioso o tóxico que es causada, o que se cree que es causada, por el consumo de alimentos o de agua contaminada*”. El Comité de Expertos de la OMS analizó que la mayoría de las enfermedades por alimentos son de origen microbiano, que tal vez sea el problema más extendido en el mundo contemporáneo y una causa importante de la reducida productividad económica (OMS, 2010).

Los alimentos pueden ser vehículo de transmisión de diversos microorganismos y metabolitos microbianos, algunos de ellos patógenos para el hombre (Mossel y Moreno, 1985).

Es un tanto evidente que para que se produzca una enfermedad transmitida por alimentos se deben ingerir a un patógeno transmitido por alimentos o sus productos tóxicos preformados (Monroe, 2002).

Un brote de ETA se da cuando dos o más personas sufren una enfermedad similar después de ingerir un mismo alimento y los análisis epidemiológicos señalan al alimento como el origen de la enfermedad, que luego es confirmado por el laboratorio (OMS, 2010).

### 2.6.1 Intoxicación alimentaria

Las intoxicaciones alimentarias pueden ser consecuencia de un envenenamiento químico o de la ingestión de una toxina (intoxicación). La toxina se puede encontrar de forma natural en determinadas plantas o animales, o ser un producto metabólico de naturaleza tóxica excretado por un microorganismo (Frazier y Westhoff, 2003).

Cuando se habla de una determinada intoxicación alimentaria bacteriana se alude a las enfermedades alimentarias causadas por la presencia de una toxina bacteriana que se ha originado en el alimento (Frazier y Westhoff, 2003).

La expresión infección alimentaria bacteriana se refiere a enfermedades alimentarias originadas por la entrada de bacterias en el organismo por ingestión de alimentos contaminados y a la reacción del organismo provocada por su presencia o por sus metabolitos. Las infecciones alimentarias se pueden dividir en dos tipos (Frazier y Westhoff, 2003):

- 1) Aquéllas en las que los microorganismos patógenos no necesariamente se multiplican en el alimento, si no que el alimento sólo actúa como vehículo, siendo este el caso de microorganismos patógenos como los que producen la tuberculosis, la difteria, las disenterías, la fiebre tifoidea, el cólera, la hepatitis infecciosa, la fiebre Q, etc.
- 2) Aquéllas en las que el alimento puede servir de medio de cultivo para que los microorganismos patógenos se multipliquen en él y alcancen cifras que aumentarán la posibilidad de que el consumidor del alimento se infecte; en este tipo de enfermedades se incluyen las producidas por las especies de *Salmonella*, por *Vibrio parahaemolyticus*, y por *Escherichia coli* enteropatógeno.

## **2.7 Intoxicaciones alimentarias causadas por bacterias Gram positivas esporógenas**

Se sabe que por lo menos tres bacilos Gram-positivos esporógenos producen intoxicaciones bacterianas por los alimentos: *Clostridium perfringens*, *C. botulinum*, y *Bacillus cereus*. La incidencia de la intoxicación alimentaria producida por estos organismos está relacionada con determinados alimentos concretos, de igual modo que lo está la intoxicación alimentaria en general (Monroe, 2002).

En general, los patógenos Gram-positivos producen sustancias extracelulares que, típicamente, explican la mayoría, si no la totalidad, de los factores de virulencia de este grupo (Monroe, 2002).

### **2.7.1 *Bacillus cereus***

*B. cereus* se conoce desde 1898, donde ya se le asociaba con abscesos, bacteremias y septicemias, infecciones de ojo y oído y muchas otras infecciones que terminan en gangrena. Todas éstas aunque severas, en pocas ocasiones han sido fatales. En Medicina Veterinaria este microorganismo es conocido por su relación con las mastitis bovinas. Recién en el año 1950 se conoció el primer informe de una intoxicación causada por este microorganismo, constituyendo ese caso el primer antecedente que permite la asociación del *B. cereus* con los alimentos (Oviedo, 1996).

En el mundo entero, entre los años 1950 y 1976 se reportaron 230 brotes de intoxicaciones alimentarias producidas por *B. cereus* cuya forma de presentación fue de tipo diarreica. Entre los años 1960 y 1968 *B. cereus* fue la tercera causa de intoxicación alimentaria en Hungría, con 117 brotes. Otros países fueron: Finlandia con 50 brotes, Holanda con 11 y Canadá con 9. Una amplia variedad de alimentos que incluyen carnes, sopas de vegetales, carne

de pollo, vegetales, carne de vacuno, pastas, leche y helados estuvieron implicados (Oviedo, 1996).

#### **2.7.1.1 Taxonomía**

*Bacillus cereus* es un microorganismo Gram-positivo, con forma de bastón alargado, aerobio facultativo y formador de esporas, las cuales no son liberadas del esporangio (FDA, 2010).

Pertenece a la familia *Bacillaceae*, bacilos formadores de esporas termorresistentes, catalasa positivos y oxidasa negativos. Es aerobio, aunque sobre medios complejos puede cultivarse en anaerobiosis (Bourgeois *et al*, 1994).

#### **2.7.1.2 Patogenicidad**

*Bacillus cereus* produce dos enterotoxinas durante su crecimiento exponencial: la toxina diarreica y la toxina emética que dan lugar a dos distintas formas clínicas de intoxicación alimentaria (Manzo *et al*, 2005).

El síndrome emético es causado por un péptido termoestable, tiene un período de incubación de 1 a 6 horas y predominan los síntomas como náuseas y vómitos. Se asocia frecuentemente con arroz frito contaminado, y este hecho ha llevado a confundir la intoxicación por *B. cereus* y atribuirla a *S. aureus* (Manzo *et al*, 2005).

El síndrome diarreico se atribuye a las enterotoxinas, un grupo de proteínas lábiles; que expuestas al calor causan dolor abdominal y diarrea después de la incubación (entre 8 y 16 h), además, hay un crecimiento vegetativo de las bacterias en el intestino. Las manifestaciones se relacionan con la afectación gastrointestinal similar a la intoxicación por *Clostridium perfringens*. Los síntomas son dolor abdominal, diarrea acuosa profusa,

tenesmo y náuseas que generalmente duran 12-24 horas y en algunos pacientes pueden durar más tiempo, de 2 a 10 días (Manzo *et al*, 2005).

La intoxicación alimentaria causada por *B. cereus* se produce debido a la ingestión de alimentos, cuyo contenido del microorganismo sea mayor de 105 UFC/g (Unidades Formadoras de Colonia) (Oviedo, 1996).

Los niveles reportados de *B. cereus* en alimentos envenenados van de 102 a 108 UFC/g. Este número es algunas veces excedido en gran cantidad de alimentos que en la actualidad son ingeridos. Sin embargo, la enfermedad es relativamente rara considerando los altos niveles de *B. cereus* (>105 UFC) que son consumidos. Esto probablemente se representa en una gran variedad de potencial patogénico y en conjunto con la diversidad entre las cepas *B. cereus* (Manzo *et al*, 2005).

### **2.7.1.3 Alimentos asociados a la intoxicación**

Una amplia variedad de alimentos incluyendo las carnes, la leche, los vegetales y los pescados han sido asociados al envenenamiento alimentario de tipo diarreico. Por otro lado, el desencadenamiento del tipo de enfermedad con vómitos ha sido generalmente asociado a los productos elaborados a base de arroz; aunque otros alimentos con alto contenido de almidón como las papas, las pastas y los quesos también han sido involucrados. Las mezclas de alimentos como las salsas, los pudines, las sopas, los guisos, las pastas y las ensaladas han sido frecuentemente relacionadas con los envenenamientos alimentarios (FDA, 2010).

La intoxicación alimentaria puede ocurrir cuando los alimentos son preparados y mantenidos sin la adecuada refrigeración durante horas antes de ser servidos (Manzo *et al*, 2005).

#### **2.7.1.4 Fisiología**

*Bacillus cereus* es un aerobio facultativo. La temperatura óptima de crecimiento está comprendida entre 30 y 37°C, siendo el tiempo de generación a estas temperaturas bastante corto (18-27 min). Puede crecer en un rango de temperatura que varía entre 5 y 55°C, y para algunas cepas entre 15 y 50°C (Bourgeois *et al*, 1994).

Curiosamente, para éstas últimas la germinación se produce a temperaturas más bajas (5-8°C) (Bourgeois *et al*, 1994).

Crece bien en la mayoría de los productos alimenticios, pero especialmente en el arroz y sobre todo si éste lleva proteínas animales (caldo de carne) (Bourgeois *et al*, 1994).

#### **2.7.1.5 Distribución en la naturaleza**

*Bacillus cereus* es una bacteria ampliamente distribuida en la naturaleza. Es un huésped normal del suelo. Puede aislarse de polvo, de vegetales y en los restos fecales del hombre y los animales (Bourgeois *et al*, 1994).

Por lo tanto, no resulta sorprendente encontrar el organismo en el interior o en la superficie de prácticamente todos los productos agrícolas frescos (ICMSF, 1998).

Mediante contaminación cruzada, se puede difundir después a otros alimentos, por ejemplo a los productos cárnicos. Los problemas en la leche y en los productos lácteos son originados por *B. cereus* que se propaga desde la tierra y la hierba a la ubre de las vacas y a la leche fresca. Gracias a la esporulación, las esporas de *B. cereus* sobreviven a la pasteurización y, tras la

germinación, las células están libres de competición con otras células vegetativas (Doyle *et al*, 2001).

#### **2.7.1.6 Medidas de prevención**

Existen dos factores, en la cadena de producción y distribución de los alimentos, que pueden generar una intoxicación alimentaria por *B.cereus*. La primera es el abuso de temperatura de los alimentos, los cuales al ser preparados con muchas horas de anticipación y conservados sin una adecuada refrigeración, permitirían el crecimiento de las esporas y finalmente el desarrollo de las toxinas; la segunda causa es la recontaminación durante el procesamiento, ya sea por el medio ambiente o por la adicción de otros productos. Alimentos que se ven sujetos a un inadecuado proceso de calentamiento y recontaminación hacen que sea arriesgado prolongar un almacenamiento a temperaturas insatisfactorias, condiciones bajo las cuales el *B. cereus* pudiese germinar y multiplicarse (Oviedo, 1996).

La principal medida de prevención es el manejo adecuado de los alimentos. Si los alimentos se preparan de modo que la temperatura se mantenga entre 30 y 50°C se permite la proliferación vegetativa, cuando se las deja enfriar de forma lenta, las esporas se multiplican y elaboran la toxina (Manzo *et al*, 2005).

Las esporas son resistentes al calor sobreviven a la ebullición y germinan como sucede cuando el arroz hervido se deja fuera del refrigerador. La fritura rápida o el recalentamiento breve a temperaturas bajas antes de servir el alimento no son adecuados para destruir la toxina termoestable preformada (Manzo *et al*, 2005).

El enfriamiento rápido y la refrigeración de alimentos, preparado en grandes cantidades, contribuye en forma decisiva para prevenir la enfermedad .En cualquier caso, la aparición de la enfermedad implica la ingestión del

alimento contaminado con las suficientes bacterias o toxinas para vencer la resistencia del huésped (Manzo *et al*, 2005).

### **2.7.2 *Clostridium perfringens***

*Clostridium perfringens* fue reconocido por primera vez como una causa importante de enfermedad alimentaria en las décadas de los años 40 y 50. (Doyle *et al*, 2001). En 1985 ya fue relacionado con la diarrea y el primer alimento vehiculador sospechoso fue un budín de arroz (ICMSF, 1998).

Los primeros informes de *Cl .perfringens* como uno de los agentes de la intoxicación alimentaria datan de 1943, año a partir del cual han sido denunciados brotes en número creciente. Los episodios de intoxicación alimentaria se presentan en todo el año sin predominio especial en ninguna época del mismo (ICMSF, 1998).

#### **2.7.2.1 Taxonomía**

*Cl. perfringens* es un bacilo Gram positivo, anaerobio con capacidad de formar esporas, es bastante grueso, recto con los extremos cuadrados, de 0.6 a 2.4µm de ancho y 1.3 a 19µm de largo, presentándose solos o en parejas. Las esporas muy raros de ver *in vitro*, son grandes, ovales, centrales o subterminales, deformantes (Bourgeois *et al*, 1994).

Pertenece al género *Clostridium*, el cual está compuesto por aproximadamente 150 especies, filogenéticamente heterogéneas, que no representan un taxón coherente. Algunos clostridios son patógenos y causan enfermedades, principalmente por efecto de potentes toxinas extracelulares. Entre las especies patógenas más conocidas se encuentran *Cl. botulinum*, *Cl. tetani* y *Cl. difficile* (Morris y Fernández. 2009).

### 2.7.2.2 Patogenicidad

*Cl. perfringens* produce un gran número de toxinas con actividades muy variadas. En base a la producción de cuatro toxinas letales mayores, los *Cl. perfringens* han sido separados en 5 tipos, nombrados con las letras de la A a la E por Sterne y Warrack en 1964. Estos cinco tipos de *Cl. perfringens* no se pueden diferenciar ni morfológica ni bioquímicamente (Bourgeois *et al*, 1994).

En la actualidad, la toxinotipificación es el método más difundido de clasificación de *Cl. perfringens* (cuadro 2). Este método tipifica a la bacteria en cinco tipos (A, B, C, D y E) según la producción de las toxinas alfa, beta, épsilon y iota (Morris y Fernández, 2009).

**Cuadro 2.** Clasificación de *Cl. perfringens* basada en la producción de toxinas

Toxinotipo	Toxinas			
	Alfa	Beta	Epsilon	Iota
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+		-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+

(Morris y Fernández, 2009)

*Cl. perfringens* es un microorganismo con alto grado de intercambio genético; esto le permite la transferencia de factores de virulencia y le otorga la capacidad de producir las diferentes toxinas como resultado de la pérdida o la ganancia de los genes específicos (Morris y Fernández, 2009).

La enterotoxina de *Cl. perfringens* conocida como CPE según su sigla en inglés fue purificada y caracterizada en la década de 1970. Desde entonces, se ha acumulado suficiente evidencia para proponer a esta toxina como causante principal de la intoxicación por alimentos producida por *Cl.*

*perfringens* tipo A, una de las enfermedades más comunes relacionadas con la ingesta de comida. En Estados Unidos, la intoxicación alimentaria por *Cl. perfringens* tipo A se encuentra entre la 2a y 3a causa de intoxicación por alimentos en humanos. Asimismo, esta toxina se asocia con el 5- 15% de las enfermedades gastrointestinales humanas distintas de las intoxicaciones alimentarias (Morris y Fernández, 2009).

### **2.7.2.3 Alimentos asociados a la intoxicación**

En la mayoría de los casos, la causa actual del envenenamiento por *Cl. perfringens* es el abuso en las temperaturas de los alimentos preparados. Un número pequeño de organismos está presente normalmente después de la elaboración del producto, y pueden multiplicarse hasta llegar a niveles muy peligrosos durante su enfriamiento y almacenamiento. Las carnes y sus derivados son los más implicados (FDA, 2010).

Si las esporas presentes en la carne no son destruidas durante la cocción (esporas termorresistentes), pueden germinar después durante el enfriamiento. Las condiciones de temperatura, la anaerobiosis en el centro de los productos, los valores de pH pueden ser favorables para el crecimiento de *Cl. perfringens* (Bourgeois *et al*, 1994).

En aquellas instituciones que brindan servicios de alimentación (tales como las cafeterías de los colegios, los hospitales, las casas de cuidado de niños y ancianos, las cárceles, etc.), se dan las causas más comunes de ocurrencia de intoxicación por *Cl. perfringens*, debido a que ahí se preparan grandes cantidades de alimentos con muchas horas de anticipación (FDA, 2010).

#### **2.7.2.4 Fisiología**

La temperatura óptima de crecimiento de las cepas del tipo A, D, y E es de 45°C. Las cepas de los tipos B y C se multiplican igualmente bien a 37°C que a 45°C. El rango de las temperaturas que permite el crecimiento de este germen es bastante amplio (para la mayoría de las cepas entre 15 y 50°C). Se ha señalado que ciertas cepas de *Cl. perfringens* pueden cultivarse a 6°C, aunque esta bacteria realmente no es psicrótrofa (Bourgeois *et al*, 1994).

Además esta bacteria crece rápidamente en medios ricos en carbohidratos en los que produce, mediante la fermentación de éstos, grandes cantidades de hidrógeno y dióxido de carbono, que ayudan a mantener el ambiente anaeróbico (Morris y Fernández, 2009).

#### **2.7.2.5 Distribución en la naturaleza**

*Cl. perfringens* es uno de los patógenos bacterianos más ampliamente distribuidos en el medio ambiente. Puede ser aislado de muestras de suelo y de agua y forma parte de la flora intestinal de animales y humanos. Sin embargo, *Cl. perfringens* puede en ciertas ocasiones comportarse como un patógeno oportunista (Morris y Fernández, 2009).

Este organismo es hallado habitualmente en los alimentos, por ejemplo aproximadamente 50% de la carne fresca o congelada contiene algún *Cl. perfringens*. Esta distribución amplia de *Cl. perfringens* ha sido considerada desde hace mucho tiempo la explicación principal del predominio de la intoxicación alimentaria por el tipo A de *Cl. perfringens* (Doyle *et al*, 2001).

### **2.7.2.6 Medidas de prevención**

Para evitar la aparición de toxiinfecciones alimentarias por *Cl. perfringens* conviene primeramente limitar la contaminación de los alimentos. Las encuestas epidemiológicas muestran que, en general, el alimento que da origen a un cuadro clínico de intoxicación es un producto cárnico. Para limitar la contaminación original de las carnes, es necesario respetar estrictamente las técnicas correctas de sacrificio, para impedir que se produzcan durante el mismo bacteremias y contaminaciones exógenas (Bourgeois *et al*, 1994).

*Cl. perfringens* es un contaminante habitual del tubo digestivo de los animales de numerosas especies y a veces pueden estar por tanto contaminadas las canales y las carnes crudas. Las manipulaciones adecuadas de los productos deben evitar la contaminación a partir del ambiente o a partir de los manipuladores (Bourgeois *et al*, 1994).

La prevención total no es posible; sin embargo, los alimentos que han sido cocinados adecuadamente están libres de peligro. El riesgo más alto es la contaminación cruzada, que ocurre cuando el alimento cocido entra en contacto con los ingredientes crudos o contaminados, o con superficies contaminadas, como por ejemplo las tablas para picar (FDA, 2010).

## **2.8 Películas comestibles**

Hoy en día el uso reciente de técnicas que permiten mantener ciertos productos durante tiempos aun más prolongados ha adquirido cierta relevancia, por lo que no es raro el escuchar hablar acerca de los términos: “recubrimiento comestible” y “película comestible”, que sin duda para algunas personas pudiesen significar lo mismo, por lo cual es necesario el saber a qué se refiere cada uno de los términos ya mencionados.

Una película comestible, según Guilbert (1986) es una capa delgada y continua, hecha de materiales que puedan ser ingeridos por el consumidor y provee una barrera a la humedad, oxígeno y solutos. El material puede cubrir completamente el alimento o puede colocarse entre los componentes del producto.

Mientras que un recubrimiento comestible es definido como una capa delgada de material comestible formado como un revestimiento sobre el alimento (McHugh, 2000).

La principal diferencia entre ambos sistemas comestibles es que los recubrimientos comestibles son aplicados en forma líquida sobre el alimento, generalmente por inmersión del producto en una solución, y las películas comestibles son en primer lugar preformadas como láminas sólidas las cuales son posteriormente aplicadas en forma de recubrimiento sobre el alimento (Rojas, 2006).

### **2.8.1 Componentes de una película comestible**

Las películas y recubrimientos comestibles están formados por tres componentes principales: polímero, solvente y plastificante (Avila y López, 2008).

#### **2.8.1.1 Polímero**

Se considera al polímero como el componente mayoritario de una película comestible. Las películas y recubrimientos comestibles se preparan a partir de polímeros como hidrocoloides o lípidos y se hacen películas compuestas cuando estos se mezclan. En las películas y recubrimientos elaborados a partir de hidrocoloides se utiliza una gran gama de proteínas y polisacáridos como almidón, alginatos, derivados de celulosa, quitosano y

derivados del agar. Cuando se utilizan lípidos, son de uso común las ceras, acilgliceroles, y ácidos grasos libres. Las películas y recubrimientos compuestos son una mezcla de hidrocoloides y lípidos, junto con otros ingredientes que pueden variar en sus proporciones; la concentración de cada componente determina las propiedades mecánicas y de barrera de las películas y recubrimientos (Donhowe y Fennema, 1994; Cha y Chinnan, 2004).

#### **2.8.1.2 Solvente**

En cuanto al solvente, es necesario el uso de un compuesto que sea adecuado e inocuo para alimentos. Generalmente se limita al uso de agua con una gran variedad de valores de pH para poder solubilizar al polímero; en algunas ocasiones se utilizan soluciones acuosas de etanol (Banker, 1966; Guilbert, 1996).

#### **2.8.1.3 Plastificante**

Un plastificante es definido como una sustancia no volátil, de alto punto de ebullición, no separadora de sustancias, que cuando se adiciona a otro material cambia las propiedades físicas y/o mecánicas de dicho material. Los plastificantes son compuestos de baja volatilidad que pueden ser añadidos para impartir flexibilidad a una película polimérica (Kester y Fennema, 1986).

El plastificante, a pesar de que se encuentra en menor proporción en la formulación de películas y recubrimientos comestibles, es un componente muy importante para poder formarlas. El uso de plastificantes tiene como objetivo principal emulsificar fases que no son miscibles, además de impartir características particulares a la película como flexibilidad y cierta resistencia. Los plastificantes suavizan la rigidez de la estructura de la película, incrementando la movilidad de las cadenas poliméricas y reduciendo las fuerzas intermoleculares, con esto se mejoran las propiedades mecánicas como la elongación (Avila y López, 2008).

Es importante que el plastificante sea miscible en el polímero, generalmente se utilizan compuestos con bajo peso molecular y alto punto de fusión. El sorbitol, el glicerol, el manitol, la sacarosa y el polietilenglicol son los plastificantes de grado alimenticio más utilizados; se puede utilizar al agua como plastificante, pero afecta de manera importante el contenido de humedad del recubrimiento. En las películas fabricadas con mezclas de lípidos e hidrocoloides, los plastificantes reducen el brillo de la película interfiriendo con los enlaces inter e intramoleculares por puentes de hidrógeno que se forman entre la fase lipídica y el hidrocoloide, lo cual produce un decremento en la fuerza de tensión y la temperatura de transición vítrea (Banker, 1966; Donhowe y Fennema, 1994; Guilbert, 1996; Cagri *et al*, 2004; Srinivasa y Tharanathan, 2007).

## **2.9 Elaboración de películas comestibles**

La formación de la película generalmente involucra diferentes tipos de enlaces (iónico, covalente, puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals) entre las cadenas que conforman al polímero, formando una red semirrígida que atrapa e inmoviliza al solvente. Dos tipos de fuerzas intervienen a nivel molecular. La primera es la fuerza de cohesión que actúa entre las moléculas del polímero, y la segunda es la fuerza de adhesión que se ejerce entre la película y el soporte en donde se está formando. Solo los polímeros de alto peso molecular tienen suficiente fuerza de cohesión y capacidad de coalescencia, para producir estructuras de películas apropiadas para diferentes solventes. El grado de cohesión afecta las propiedades de la película como son la densidad, compactibilidad, porosidad, permeabilidad, flexibilidad y opacidad (Donhowe y Fennema, 1994; Guilbert, 1996; Garcia *et al*, 2000).

La cohesión y adhesión están relacionadas con la estructura, composición química, peso molecular, regularidad de las cadenas estructurales, ramificaciones, polaridad y distribución de grupos polares de la cadena polimérica. La cohesión y rigidez de las películas se ven favorecidas por un orden superior de las cadenas. Los grupos polares disminuyen la difusión molecular pero promueven la formación de cadenas laterales ordenadas. La desnaturalización y algunos aditivos que promueven enlaces cruzados se utilizan para tener un orden molecular. La funcionalidad del polímero también está relacionada con las características del solvente. La solvatación del polímero y la extensión de la cadena polimérica pueden producir películas más eficientes. El grado de cohesión dependerá de la estructura polimérica, el solvente utilizado, la temperatura y la presencia del plastificante (Banker, 1966; Guilbert, 1996; Srinivasa y Tharanathan, 2007).

Existen diferentes técnicas para darle la forma final a las películas y recubrimientos comestibles, las cuales incluyen: la eliminación del solvente, la gelación térmica y la solidificación. La primera se utiliza para producir películas de hidrocoloides, se forma una estructura homogénea estabilizada por interacciones químicas y físicas intermoleculares. En la segunda, se aplica un tratamiento térmico que permite la formación de un gel, el cual es estable y formará junto con el plastificante una estructura rígida, estos dos métodos se aplican tanto para formar películas de soporte como recubrimientos en alimentos. En lo que respecta a la solidificación, las macromoléculas son disueltas en un solvente junto con el plastificante; al homogenizarse la mezcla se vierte en un molde formando una capa fina la cual, al secarse, se libera de la superficie obteniéndose una película (Cagri *et al.*, 2004).

## **2.10 Adición de antimicrobianos en películas comestibles**

Debido a que muchas de las ocasiones los microorganismos que causan deterioro y representan un riesgo al consumidor es a causa de su carácter

patogénico es necesario buscar alternativas que ayuden a prolongar su vida de anaquel por periodos aun más largos, debido a sus características pueden ser susceptibles al ataque microbiano y así mismo pueden representar un vehículo para la proliferación de infecciones e intoxicaciones de origen alimentario.

Las películas comestibles tienen la capacidad de incorporar agentes antimicrobianos para proveer estabilidad microbiológica a los alimentos; ya que sirven como acarreadoras de un amplio número de compuestos, los cuales incluyen enzimas, agentes quelantes, bacteriocinas, benzoatos, propionatos, parabenos, sorbatos, agentes curantes, y antimicrobianos de origen natural como los aceites esenciales. Estos compuestos tienen la capacidad de extender la vida de anaquel de un producto y reducir el riesgo de crecimiento de patógenos en la superficie de los alimentos (Rooney, 2002; Cagri *et al*, 2004; Min y Krochta, 2005; Lin y Zhao, 2007; Ozdemir y Floros, 2008).

Se pueden elegir agentes inhibitorios específicamente para un tipo de contaminante de origen microbiano que esté presente en el alimento. Se puede también, conociendo la velocidad de difusión del antimicrobiano en el producto, controlar la incorporación de otros agentes a la película como agentes antioxidantes, colorantes y saborizantes, para mejorar sus características funcionales (Avila y López, 2008).

Cuando se elaboran películas comestibles que contienen sustancias antimicrobianas, se espera que tengan la capacidad de migrar hacia la superficie del alimento o permanecer retenidas en la película. Ambos fenómenos determinan la efectividad antimicrobiana de una película y se presentan en compuestos antimicrobianos tanto sintéticos como naturales. La migración dependerá de las interacciones electrostáticas entre el antimicrobiano y las cadenas del polímero, los fenómenos de osmosis iónica, los posibles cambios estructurales inducidos por la presencia del agente antimicrobiano y

las condiciones ambientales a las que se exponen las películas y recubrimientos elaborados (Cha y Chinnan, 2004; Sebti *et al*, 2007).

Científicos de la Universidad de Arizona y del Departamento de Agricultura de EUA, USDA, por sus siglas en inglés (2009), evaluaron la actividad antimicrobiana de algunos fitocompuestos aplicados en películas comestibles (hechas a base de manzana) para productos cárnicos. Los fitocompuestos evaluados fueron el cinamaldehído y el carvacrol, los cuales se aplicaron en distintas concentraciones (0.5%, 1.5% y 3%) a las películas comestibles. Estas últimas se usaron posteriormente para envasar tanto pechugas de pollo inoculadas con *Salmonella* entérica o *E. coli* O157:H7, como jamón inoculado con *Listeria monocytogenes*. Todos los productos envasados fueron incubados por 72 h a distintas temperaturas (4 y 23°C) para observar la acción antimicrobiana de los dos fitocompuestos.

Los resultados evidenciaron que los fitocompuestos mostraron mayor acción antimicrobiana en la mayor concentración aplicada (3%). En el caso de las pechugas de pollo incubadas a 4°C, fue el carvacrol con el que se logró la mayor reducción de los microorganismos inoculados. En el jamón, el carvacrol también resultó más efectivo que el cinamaldehído en la reducción de la cuenta microbiana.

Las películas formadas por quitosano limitan la contaminación en la superficie de los alimentos (Cooksey, 2005). Coma *et al.* (2002) elaboraron películas de quitosano (1% p/v), reportando la inhibición del crecimiento superficial de *Listeria monocytogenes* en un 80%, y determinando el mecanismo de acción a nivel de la membrana celular.

Moreira *et al.* (2010) elaboraron películas comestibles híbridas caseinato de sodio/quitosano, y las aplicaron sobre alimentos de origen vegetal, cárnico y lácteo (salame de Milán, queso Cheddar y zanahoria), demostrando que la mezcla quitosano/caseína ejerció un efecto antimicrobiano significativo

principalmente sobre la microflora de queso y salame. El quitosano y la mezcla quitosano/caseína aplicadas por inmersión o cobertura resultaron muy efectivas controlando los recuentos de hongos y levaduras, bacterias mesófilas y psicrófilas presentes en los tres sustratos alimenticios con reducciones entre 2 a 4.5 log. La reducción de la carga microbiana que obtuvieron es considerable comparada con otros métodos de preservación. Esto sugiere que la interacción iónica entre las dos macromoléculas no limita la actividad antimicrobiana del quitosano sino que la potencia.

Rojas (2005) elaboró películas comestibles hechas a base de puré de manzana, pectina prehidratada, glicerol como plastificante, ácido ascórbico y ácido cítrico como antioxidantes, adicionada con aceites esenciales (lemon-grass, canela, orégano, carvacrol, citral y cinamaldehído) a concentraciones de 0.1 y 0.5%, demostrando que entre todos los aceites probados fueron los provenientes del orégano, incluido su compuesto activo (carvacrol) los que presentaron mayor efectividad antibacteriana frente *E. coli* O157:H7 en bajas concentraciones. Por el contrario se observó que cinnamon (canela) y su compuesto activo (cinamaldehído) fueron los menos activos.

En el presente trabajo se estudia el efecto bactericida de los oligosacáridos de quitosán sobre los microorganismos patógenos esporulados *B. cereus* y *Cl. perfringens*, formulando una película comestible a base de los oligosacáridos de quitosán para su caracterización y posterior aplicación sobre carne de res.

# CAPÍTULO III

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

La parte experimental del presente trabajo fue realizado dentro de las instalaciones de la UAAAN, en el laboratorio de microbiología del Departamento de Producción Animal, en el laboratorio del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, así como en el laboratorio de post-cosecha del Departamento de Horticultura.

### **Eta experimental 1: Estudio cuantitativo del crecimiento microbiano de los microorganismos en medio sólido y medio líquido**

#### **3.1 Material biológico**

Las cepas de los microorganismos *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens* utilizadas para el presente trabajo fueron tomadas de cultivos puros aislados e identificados por Díaz (2009) pertenecientes al cepario del Departamento de Producción Animal.

#### **3.2 Mantenimiento y proliferación de las cepas**

##### **3.2.1 *Bacillus cereus***

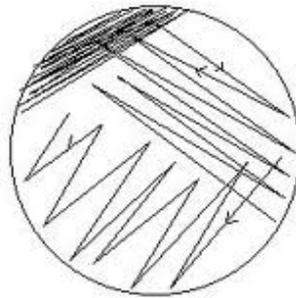
###### **3.2.1.1 Preparación de medio sólido**

Se prepararon cajas Petri con agar nutritivo (BD Bioxon<sup>R</sup>), disolviendo 4.6g en 200ml de agua destilada dentro de un matraz Erlenmeyer, disolviendo a flama de mechero hasta observar coloración cristalina, posteriormente se esterilizó el medio en un autoclave (PRESTO M.R.) a 121°C y 15Lb de presión durante 15min.

El medio esterilizado fue vaciado en cajas Petri de plástico estériles (S y M Laboratorios) de aproximadamente 8cm de diámetro, esto en condiciones de asepsia y desinfección del área de trabajo y evitando corrientes de aire. Se dejó solidificar el medio a temperatura ambiente, etiquetándolo y guardándolo en refrigeración para su posterior uso.

### 3.2.1.2 Crecimiento en medio sólido

Siembras por el método de estría abierta cruzada (figura 2) se realizaron sobre el agar nutritivo, posteriormente se incubó (incubadora arsa, modelo AR-290) a 37°C por 24h hasta observar crecimiento sobre el medio.



**Figura 2.** Método de siembra por estría abierta cruzada, utilizado para la proliferación de las cepas en medio sólido.

### 3.2.2 *Clostridium perfringens*

#### 3.2.2.1 Preparación de medio sólido

Se prepararon cajas Petri con agar Schaedler (BD BBL™), disolviendo 6.28g en 150ml de agua destilada dentro de un matraz Erlenmeyer, disolviendo a flama de mechero hasta observar coloración cristalina, posteriormente se esterilizó el medio en un autoclave (PRESTO M.R.) a 121°C y 15Lb de presión durante 15min.

El medio esterilizado fue vaciado en cajas Petri de plástico estériles (S y M Laboratorios) de aproximadamente 8cm de diámetro, esto en condiciones de asepsia y desinfección del área de trabajo y evitando corrientes de aire. Se dejó solidificar el medio a temperatura ambiente, etiquetándolo y guardándolo en refrigeración para su posterior uso.

### **3.2.2.2 Crecimiento en medio sólido**

Siembras por el método de estría abierta cruzada se realizaron sobre el agar Schaedler, posteriormente se incubó (incubadora arsa, modelo AR-290) a 37°C por 48h bajo condiciones de anaerobiosis, hasta observar crecimiento sobre el medio.

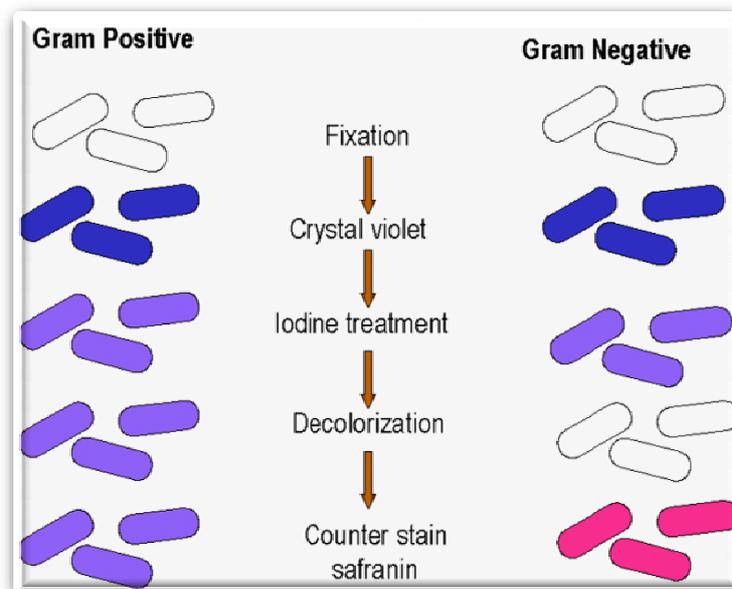
Para la creación del ambiente en condiciones anaeróbicas y favorecer el crecimiento del microorganismo, se utilizaron botes de plástico con tapa de rosca, dentro del cual se colocaron las cajas Petri ya sembradas, se prendía una vela y se cerraba el bote, colocando cinta alrededor de la tapa, cuando la vela se apagaba indicaba la ausencia de oxígeno dentro del bote, obteniendo así las condiciones para el crecimiento de *Cl. perfringens*, introduciendo un medio con indicador (resarsurina) para asegurar las condiciones de anaerobiosis deseadas.

## **3.3 Evaluación microscópica de las cepas**

### **3.3.1 Tinción de Gram**

Se empleó la técnica de tinción de Gram para analizar las características microscópicas de los microorganismos empleados. Para ello se tomó una asada del cultivo puro y se suspendió en un portaobjetos que poseía una gota de agua destilada, se homogenizó la suspensión de bacterias y se extendió un poco en el portaobjetos; posteriormente se fijó la muestra con calor.

Una vez fijada y seca la preparación, se cubrió por completo la superficie, donde se encontraba la muestra, con cristal violeta dejándolo reaccionar por 60 segundos y se enjuagó suavemente al chorro del agua; se cubrió de nuevo la superficie con una solución de yodo (lugol) y se dejó reaccionar por 1 minuto; se enjuagó suavemente y se decoloró con una solución de alcohol-acetona (50/50 v/v) por unos cuantos segundos para después enjuagarse de inmediato. Finalmente se cubrió la superficie de la preparación con una solución de safranina y se dejó actuar por 1 minuto para finalmente enjuagar con agua destilada (figura 3). Se dejó secar la preparación por completo para después observar los microorganismos teñidos empleando un microscopio óptico a 100X con aceite de inmersión (Pérez, 2009).

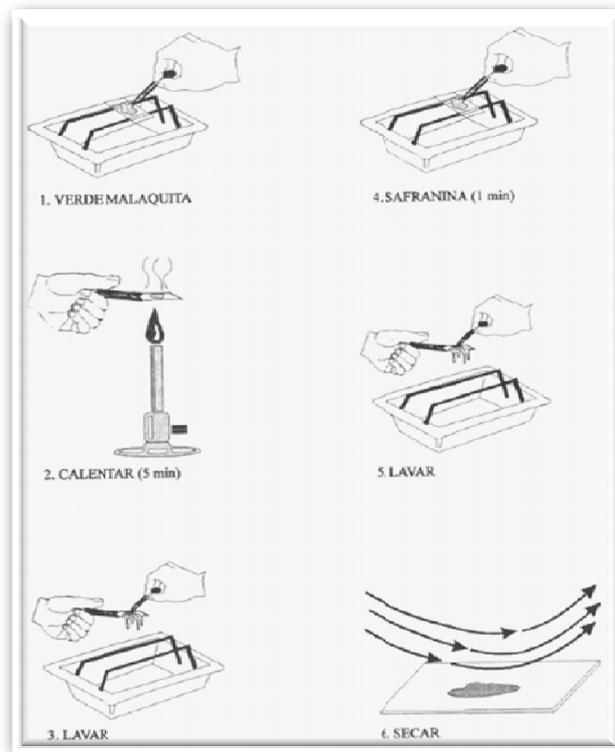


**Figura 3.** Técnica de tinción de Gram.

### 3.3.2 Tinción de esporas

Se empleó la técnica de tinción de esporas de verde de malaquita, la cual consiste en tomar una asada del cultivo puro de *Clostridium perfringens* (no

mayor a 2 días de proliferación), sobre una gota de agua en un portaobjetos, fijar el frotis con calor. Se tiñe empleando verde de malaquita al 5% como colorante; el cual se evapora mediante un baño María, este paso se repite 3 veces. Lavar con agua destilada y teñir con safranina durante 30 segundos (figura 4). Finalmente se observa al microscopio óptico al aumento de 100X utilizando aceite de inmersión (las esporas se tiñen de verde y las células de rojo) (Moreno, 2009).



**Figura 4.** Técnica de tinción de esporas utilizado para la identificación microscópica de *Cl. perfringens*.

### 3.4 Estudio cuantitativo de crecimiento en medio líquido

Para el monitoreo del crecimiento de las bacterias en medio líquido se emplea la técnica de turbidez. La turbidimetría es un método empleado para estudiar el crecimiento bacteriano a través de mediciones de densidad óptica, lo que permite tener una secuencia del crecimiento microbiano en tiempo real (Dalgaard *et al* ,1994; Begot *et al*, 1996). La densidad óptica o absorbancia se

ha utilizado desde hace varios años para medir la concentración, y es expresada en masa, número o longitud media celular de suspensiones bacterianas (Meynell y Meynell, 1970).

De acuerdo con McMeekin *et al.* (1997), en la turbidimetría, el crecimiento microbiano está relacionado con la turbidez del medio.

#### **3.4.1 Crecimiento de *Bacillus cereus* en caldo nutritivo**

Se prepararon 3 matraces Erlenmeyer con 100 ml de caldo nutritivo (BD Bioxon), para lo cual se pesaron 0.8g del medio para cada matraz y se disolvió en 100ml de agua destilada colocando a flama de mechero hasta observar coloración cristalina y sin presencia de grumos. Los matraces con el medio fueron esterilizados en autoclave (PRESTO M.R.) a 121°C por 15 minutos a 15Lb de presión.

Una vez estériles, el caldo nutritivo se dejó enfriar y a un tubo pico de flauta con cultivo puro se le adiciono 1 ml de caldo nutritivo para realizar una suspensión celular. En matraces de 250 ml se inocularon 0.5 ml (500 µL) de la suspensión celular (por duplicado) y se empleo un tercer matraz como control, para tomar la muestra del caldo nutritivo inoculado al  $t_0$  se utilizó una micropipeta (Baxter, 200-1000µL) con puntillas estériles tomando alrededor de 1.5 ml de la muestra y colocándola en tubos Eppendorf los cuales eran identificados e introducidos dentro del congelador para su posterior lectura en el espectrofotómetro (Spectronic<sup>R</sup> 20 GENESYS) , los matraces fueron introducidos en la incubadora (arsa, modelo AR-290) a 37°C , llevando un monitoreo cada 6, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 h, para lo cual en su respectivo tiempo se tomaba la muestra por duplicado bajo condiciones de asepsia y desinfección del área.

Los tubos con las muestras fueron sacados del congelador y una vez descongelados a temperatura ambiente se prosiguió a la lectura en el

espectrofotómetro (Spectronic<sup>R</sup> 20 GENESYS) a una longitud de onda de 590nm.

#### **3.4.2 Crecimiento de *Clostridium perfringens* en tioglicolato de sodio**

Para *Cl. perfringens* se prepararon 16 tubos de ensaye de 13x100 con 3.8ml de tioglicolato de sodio (Bioxon), para lo cual se pesaron 1.94g del medio líquido y se disolvió en 66ml de agua destilada dentro de un matraz Erlenmeyer de 250 ml, se llevó a flama de mechero hasta observar disolución completa y cambio de coloración a rojo (resarsurina, indicador de presencia de O<sub>2</sub>), en cada uno de los tubos se colocó el volumen requerido y se envolvieron por completo con papel aluminio. Posteriormente los tubos fueron esterilizados en autoclave (PRESTO<sub>M.R.</sub>) a 121°C por 15 minutos a 15Lb de presión.

Los tubos estériles se dejaron enfriar y se evaluaron mediante cambio de coloración de rojo a amarillo la ausencia de O<sub>2</sub> en ellos, 2 de los tubos sin inocular fueron utilizados como blancos, mientras que el resto fueron inoculados con 0.2ml (200 µL) de suspensión celular para tener un volumen total de 4ml, de los cuales 2 tubos sin incubar fueron tomados como t<sub>0</sub>, y el resto fueron incubados (incubadora arsa, modelo AR-290) en condiciones de anaerobiosis a una temperatura de 37°C monitoreando cada tubo a los tiempos