

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL



**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y
ANTIMICROBIANA DE UN BIOMATERIAL COMPUESTO PARA EL
DESARROLLO DE UN ENVASE ACTIVO”**

POR:

RUBÉN RICARDO RUIZ RAMÍREZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para poder obtener el título profesional de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Diciembre 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
Departamento de Ciencia y Tecnología de alimentos

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA DE UN BIOMATERIAL COMPUESTO PARA EL DESARROLLO DE UN ENVASE ACTIVO”

TESIS

Presentada por:

RUBÉN RICARDO RUIZ RAMÍREZ

Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador como Requisito Parcial
para Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS.

APROBADA

M.C. María Hernández González
Presidente

M.P. Francisco Hernández Centeno
Co asesor

Dra. Ana Margarita Rodríguez Hernández
Sinodal

M.C. Haydeé Yajaira López de la Peña
Sinodal

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

Buenavista, Saltillo, Coahuila. México. Diciembre 2016

Dedicatorias

A mi madre Rosa: por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mis hermanos Carmen, Esi, Lupe y Tavo les agradezco no solo por estar presentes aportando cosas buenas a mi vida, sino por los grandes lotes de felicidad y diversas emociones que siempre me han causado.

Y por último a mi Alma Mater por brindarme un hogar, así como inolvidables momentos vividos.

Agradecimientos

A mi gran **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por permitirme ser parte de ella y ser mi casa durante cuatro años y por permitirme convertirme en una persona profesional en lo que tanto me apasiona en mi corazón siempre estarás **Alma Terra Mater**.

También quiero agradecer al centro de investigación en química aplicada (CIQA) por permitirme ser parte de ellos, y a las personas que a su paso conocí siendo todas ellas maravillosas conmigo al **Dr. Rafael Aguirre Flores, Blanca, Mariana, Celene, Darío, Giromi**.

A la **M.C. María Hernández González** quien se ha tomado el arduo trabajo de transmitirme sus conocimientos especialmente del campo que corresponde a mi profesión. Pero además de eso, ha sido usted quien ha sabido encaminarme por el camino correcto, y que me ha ofrecido sus sabios conocimientos para lograr mis metas y lo que me proponga.

A los catedráticos del departamento de ciencia y tecnología de alimentos por brindarme sus conocimientos necesarios para mi vida profesional, por su confianza y cariño especialmente a el **M.P. Francisco Hernández Centeno** por compartir su sabiduría sus consejos y su amistad, a la **M.C. Haydeé Yajaira López de la Peña**, aunque no tuve la dicha de trabajar mucho con usted me deja grandes conocimientos, a la **M.C. Mildred Inna Marcela Flores Verástegui** por ser un ejemplo de vocación a la docencia e investigación y que siempre me ha brindado su apoyo.

A la **Dra. Ana Margarita Rodríguez Hernández** por permitirme trabajar con usted y los grandes conocimientos que me brindó y el gran apoyo que me dio en la elaboración de este documento.

A **mi familia** por ser ese motor inmenso de apoyo incondicional durante la vida y mi instancia en la universidad gracias por su amor.

A mis amigos de toda la vida, aunque los viera muy poco siempre he contado con su apoyo incondicional gracias por tantos buenos momentos y por los que aún faltan: **Alfredo (anko), Orlando (la güera), Miguel, Arturo (Turkio), Javier Rosales, Javier Bizarrón e Isaí.**

A mis amigos buitres, que más que amigos pasaron a ser parte de mi familia narro, gracias por todos los momentos y situaciones que pasaron buenas y malas que independientemente del tiempo de convivencia y cariño fue muy especial. Espero y algún día nos volvamos a encontrar y poder revivir estos recuerdos a los nayaritas: **Cande, Erik, Misael, Payue, Saul, Lobo, David,** también a **Sabas** y a **Koy.**

A mis compañeros que estuvieron dentro de la carrera de I.C.T.A. y que también forman parte de mi familia buitre: **Omar (el negro), Sergio (pichi la gorda), Mane Zavala (el barber), Mariano.**

A **Mari Carmen Alducin** por brindarme su amistad y por esos momentos vividos, aunque fueron pocos fueron muy buenos.

A **Vanessa Hernández Hernández** eres una de las personas que más admiro y más quiero en esta vida gracias por estar ahí para platicar por cualquier cosa y por todos tus consejos cuando estaba a punto de tirar la toalla, gracias por permitirme compartir momentos contigo, aunque fueron pocos me hicieron muy feliz.

Índice general

Índice general.....	i
Índice de tablas	iv
Índice de figuras.....	iv
Resumen.....	vi

Capítulo I

Introducción.....	1
Justificación.....	4
Hipótesis.....	6
1.3.1. Hipótesis nula	6
Objetivos	6
1.4.1. Objetivo general.....	6
1.4.2. Objetivos específicos.....	6

Capítulo II

Revisión de literatura.....	7
2.1. Empaques activos e inteligentes.....	7
2.1.1 Empaques inteligentes.	7
2.1.2 Empaques activos	8
2.1.2.1. Propiedades de barrera	9
2.1.2.2. Actividad antioxidante	10
2.1.2.3. Actividad antimicrobiana	12
2.2. Microorganismos patógenos alimentarios.....	14
2.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	15
2.2.2. <i>Escherichia coli</i>	17
2.3. Materiales de empaque.....	18
2.3.1. Materiales metálicos.....	18
2.3.2. Materiales cerámicos.....	19
2.3.3. Materiales compuestos.....	20

2.3.4. Materiales poliméricos.....	20
2.3.5. Biomateriales.....	20
2.4. Polisuccinimida	21
2.5. Almidón.....	23
2.5.1.1. Clasificación.....	24
2.5.1.1.1. Primera generación.....	24
2.5.1.1.2. Segunda generación.....	24
2.5.1.1.3. Tercera generación.....	25
2.5.1.2. Tecnologías para su obtención.....	25
2.5.1.2.1. Termoconformado.....	26
2.5.1.2.2. Moldeo por compresión.....	26
2.6. Aditivos.....	26
2.6.1. Aditivos naturales.....	27
2.7. Orégano (<i>Lippia berlandieri Schauer</i>).....	27
2.7.1. Actividad biológica de los componentes del orégano.....	29
2.7.2. Actividad Antioxidante.....	29
2.7.3. Potencial antimicrobiano.....	30
2.7.4. Usos y aplicaciones industriales.....	30
2.7.5. Antimicrobianos naturales.....	31
2.7.6. Antioxidantes naturales.....	31

Capítulo III

Materiales y metodología.....	33
3.1.1. Localización del experimento.....	33
3.1.2. Materiales.....	33
3.1.3. Etapa I. Obtención de material compuesto.....	34
3.1.3.1. Preparación de material: Polisuccinimida y almidón gelatinizado.....	34
3.1.3.2. Termoconformación.....	35
3.1.3.3. Funcionalización del material compuesto.....	35
3.1.4. Etapa II. Viabilización e identificación de las cepas bacterianas.....	36
3.1.5. Etapa III. Valoración de la eficiencia antimicrobiana y antioxidante... ..	37
3.1.5.1. Preparación de los inóculos equivalentes al tubo número 4 de la escala de Mcfarland.....	37

3.1.5.2. Valoración de la antimicrobiana	38
3.1.5.3. Valoración de la actividad antioxidante	38

Capítulo IV

Resultados y Discusion	39
4.1.1. Etapa I. Establecimiento de las condiciones de termoconformación	39
4.1.2. Etapa II. Viabilización e identificación de las cepas bacterianas.....	43
4.1.3. ETAPA III. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES DEL BIOMATERIAL COMPUESTO.....	45
4.1.3.1. CAPACIDAD ANTIMICROBIANA.....	45
4.1.3.1.1. ANTIBIOGRAMA	45
4.1.3.1.2. Cinéticas de crecimiento microbiano	47
4.1.3.2. Comparativo de la observación microscópica de las células de <i>Staphylococcus aureus</i> en microscopio electrónico de barrido (SEM) antes y después del contacto con el material funcionalizado.....	50
4.1.3.3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	51

Capítulo V

Conclusiones.....	54
-------------------	----

Capítulo VI

Bibliografía	55
--------------------	----

Capítulo VII

Apéndices.....	63
7.1.1. Apéndice 1. Metodología para la determinación de antioxidantes por el método: capacidad secuestraste del radical estable DPPH siguiendo la técnica OSU, FAPC: Food and Agricultural Products Center, 2008.....	63
7.1.2. Apéndice 2. Análisis de varianza para el crecimiento microbiano de <i>S.</i> <i>aureus</i>	64
7.1.3. Apéndice 3. Análisis de varianza para el crecimiento microbiano de <i>E.</i> <i>coli</i>	65

Índice de tablas

Tabla 1. Absorbancia con respecto a la escala de McFarland.....	37
Tabla 2. Análisis de las diferentes condiciones de termoconformación	39
Tabla 3. Porcentaje de los compuestos constituyentes del aceite esencial de orégano sinergista.....	43
Tabla 4. Análisis de medias del diámetro de los halos de inhibición para el crecimiento de <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> ante PSI adicionada con aceite esencial de orégano	46

Índice de figuras

Figura 1. Indicadores de calidad en alimentos.	8
Figura 2. Esquema de un envase activo	10
Figura 3. Tinción de Gram <i>Staphylococcus aureus</i>	16
Figura 4. Microfotografía tomada en un microscopio electrónico de barrido de <i>Staphylococcus aureus</i>	16
Figura 5. Tinción de Gram <i>Escherichia coli</i>	18
Figura 6. Microfotografía tomada en un microscopio electrónico de barrido de <i>Escherichia coli</i>	18
Figura 7. Representación esquemática de las tres categorías de los polímeros de tercera generación	25
Figura 8. Estructura química de los principales componentes del orégano	29
Figura 9. Reacción de policondensación térmica del ácido aspártico para formar polisuccinimida	34
Figura 10. Moldes para termoconformadora	35
Figura 11. Termoconformadora	35
Figura 12. Material termoconformado.....	42
Figura 13. Cromatograma para la fracción de aceite esencial de orégano	42
Figura 14. Morfología macroscópica de <i>Staphylococcus aureus</i>	44

Figura 15. Morfología microscópica de <i>Staphylococcus aureus</i>	44
Figura 16. Morfología macroscópica de <i>Escherichia coli</i>	45
Figura 17. Morfología microscópica de <i>Escherichia coli</i>	45
Figura 18. Antibiograma de material funcionalizado vs <i>Escherichia coli</i>	46
Figura 19. Antibiograma del material funcionalizado Vs <i>Staphylococcus aureus</i>	46
Figura 20. Cinética de crecimiento microbiano de <i>Staphylococcus aureus</i> en contacto con el material funcionalizado con aceite esencial de orégano (PF) y material sin funcionalizar (PSI).....	47
Figura 21. Cinética de crecimiento microbiano de <i>Escherichia coli</i> en contacto con el material funcionalizado con aceite esencial de orégano (PF) y material sin funcionalizar (PSI)	48
Figura 22. Microfotografía de SEM para <i>Staphylococcus aureus</i> antes del contacto con el material funcionalizado con aceite esencial de orégano.....	50
Figura 23. Microfotografía de SEM para <i>Staphylococcus aureus</i> después del contacto con el material funcionalizado con aceite esencial de orégano	50
Figura 24. Gráfica de absorción de DPPH por el aceite esencial de orégano y el biomaterial funcionalizado con aceite esencial de orégano.	52
Figura 25. Porcentaje de actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (<i>Lippia berlandieri schauer</i>).....	52

RESUMEN

Los empaques plásticos originados a partir del petróleo están por demás posicionados en lo respectivo al envasado de alimentos sin embargo y desde el punto de vista de la opinión pública es necesario el uso de materiales biodegradables a fin de reducir la cantidad de residuos sólidos no biodegradables presentes en el ambiente, se identifican dos directrices hacia el desarrollo de biomateriales: aquella que se dirige a la sustitución de empaques de origen no renovable por aquellos sintetizados a partir de fuentes renovables, y la segunda, orientada a reducir la cantidad de residuos de los envases usados presentes en el medio ambiente, al ser sustituidos por materiales biodegradables (Narayan, 2006).

Los envases para contener alimentos, ya no cumplen solamente una función pasiva al contener los productos; las tendencias actuales demandan el desarrollo de los denominados envases activos e inteligentes, conceptos que son considerados por la legislación de la Unión Europea (Parlamento Europeo, 2004).

Se entiende como envase activo, a aquel donde existe una interacción entre éste y el alimento y de ambos con su entorno, a fin de alargar la vida útil de los alimentos, mejorar sus propiedades organolépticas y/o inocuidad alimentaria, manteniendo en general la calidad el producto (Suppakul y col, 2003).

En este entorno el presente trabajo tiene como objetivo, valorar la actividad antimicrobiana y antioxidante de un biomaterial compuesto a base de polisuccinimida y almidón funcionalizado con extractos de aceite esencial del orégano, para ser utilizados en el desarrollo de empaques activos.

Se establecieron las condiciones para la obtención del biomaterial, mediante la síntesis de la polisuccinimida por policondensación térmica, posteriormente se adicionó almidón de papa gelatinizado en relación al 50% y glicerol al 15%, para su posterior termoconformación a 135°C, durante 9 minutos a 20 toneladas de presión. El material fue adicionado al 3% con una muestra de aceite esencial de orégano constituida por 22.4 % de timol y 9.6 % de carvacrol, el material funcionalizado fue

evaluado en cuanto a su eficiencia antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* mediante la técnica del antibiograma, encontrándose halos de inhibición de 4 cm de diámetro para *S. aureus* y de 3.97 cm para *E. coli*.

La propiedad antioxidante, fue también evaluada, mediante el método del DPPH, donde se encontró un 68.5 % de inhibición para el aceite esencial del orégano en estado libre y de 40 % para el material funcionalizado. Por lo que debido a los efectos tanto antimicrobiano como antioxidante, es posible determinar que la polisuccinimida funcionalizada con extractos de aceite esencial del orégano, es un biomaterial compuesto con amplias perspectivas para la conservación alimentaria.

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha venido generando un gran desarrollo tecnológico en torno al empaçado de los alimentos para satisfacer las necesidades de los consumidores, quienes demandan formas más naturales de preservación y métodos para el control del empaçado y almacenamiento y así garantizar la seguridad alimentaria.

El empaque activo es indudablemente una de las innovaciones más importantes de este ramo, están diseñados para realizar otras funciones adicionales a las de ser una barrera entre el producto y el medio ambiente; es posible emplear las posibles interacciones entre el alimento y el empaque de una manera favorable, con el fin de mejorar la calidad y aceptabilidad de los productos; por ello el empaque activo es un concepto heterogéneo que involucra una amplia gama de posibilidades que pueden ser dirigidas hacia dos objetivos principales:

- a) extender la vida de anaquel
- b) facilitar el procesado y consumo de los alimentos.

En el primer caso, la solución del empaque activo incluye los sistemas de estudio para controlar el mecanismo de deterioro interno del paquete (p.e. eliminación de oxígeno, absorción de humedad o agente antimicrobiano). En relación al segundo objetivo, el empaque activo permite empatar el empaque con las propiedades del alimento, reducir costos de procesado y realizar algunas operaciones de procesado en el empaque con propósitos de rastreabilidad en el control de calidad del producto. En el desarrollo de los envases activos y sus usos comerciales, deben contemplarse también aspectos relacionados con los términos legales y las tendencias en este campo. (Fernández, 2000).

Los materiales para manufacturar envases activos pueden ser de diferentes tipos; en el ámbito de envasado alimentario se destacan los metálicos, los cerámicos, los poliméricos y más recientemente los compuestos. (Askeland y col, 1998).

La mayoría de los alimentos envasados interaccionan en cierto grado con su envase; tanto los materiales metálicos como los plásticos no son inertes y, al suceder un contacto directo entre el alimento envasado y el contenedor, se puede presentar la migración de sustancias hacia el producto.

Dentro de las sustancias que pueden transferirse se encuentran algunos aditivos del propio polímero, impurezas (como monómeros), residuos de catalizadores, solventes de polimerización y de fracciones poliméricas de bajo peso molecular, con el consiguiente riesgo toxicológico para los consumidores.

Todas estas sustancias están ya clasificadas dentro de las normas establecidas por la FDA como “food indirect additives”, las cuales están descritas como sustancias que no han sido directamente adicionadas, sino que son el resultado del manejo, empaquetamiento o proceso, para los cuales se tienen regulaciones que indica el código federal de regulación. De igual manera, la Unión Europea ha desarrollado una regulación para este tipo de aditivos. (Cedillos y col, 2013).

En el contexto de los aditivos reconocidos como seguros, los aceites esenciales obtenidos de plantas resultan ser una alternativa viable. A partir del orégano (*Lippia berlandieri Schauer*) es posible extraer compuestos activos, monoterpenos, como el timol y carvacrol, ampliamente utilizados en la industria farmacéutica y alimentaria por sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes. (Rangel Ortega, 2007).

La actividad antimicrobiana y antioxidante del aceite esencial del orégano depende de la composición química del mismo, la cual está relacionada con la especie, condiciones geográficas, períodos de cosecha y método de extracción (Portillo-Ruiz, y col, 2008).

Si bien estos compuestos ofrecen ventajas, su campo de estudio aún es amplio debido a que su aplicación sobre el alimento no ha sido bien definida, una solución la genera la inclusión de los aceites esenciales en una matriz que le permita tanto la migración dosificada y prolongada, como la facilidad de uso para los consumidores, la seguridad en cuanto tóxicos presentes y la biodegradabilidad.

Los materiales que se han aplicado en la industria farmacéutica pueden ser una alternativa de interés, ya que se han dirigido al desarrollo de matrices poliméricas para la liberación lenta y controlada del agente activo, manteniéndolo un tiempo prolongado por encima de la concentración mínima efectiva, pero por debajo del nivel tóxico. Dentro de estos materiales, destacan los conjugados poliméricos tales como polímero-proteína, micelas poliméricas y polímero-aditivo.

Un conjugado polímero-aditivo involucra una unión simbiótica entre los dos componentes: el polímero que actúa como un vehículo de carga y transporte y el aditivo propiamente dicho. El polímero “sabe” cómo vencer los obstáculos biológicos y “entregar su carga” en la terminal adecuada, mientras que el aditivo “disfruta” de un viaje seguro para ejercer finalmente su bioactividad.

Un polímero a base del ácido aspártico, la polisuccinimida, ha sido estudiado recientemente ya que reúne las características de ser biodegradable, biocompatible, hidrosoluble y no tóxico, además de ser muy versátil y ofrecer muchas posibilidades de derivaciones (Zegarra Urquia, 2012).

JUSTIFICACIÓN

De las tendencias tecnológicas en el sector agroalimentario, destacan la orientación de las empresas agroalimentarias hacia el nuevo perfil de consumidor junto con el aumento de los conocimientos y las exigencias de éste, se constituye en uno de los ejes del desarrollo tecnológico del sector en los últimos años.

Las demandas que la empresa debe satisfacer incluyen las relativas a información, calidad y seguridad, así como las que se derivan de los cambios que están teniendo lugar en el modo de vida, como la adaptación de los productos a nuevos modos de consumo fuera del hogar, en porciones, facilidad y rapidez en su preparación, etc. Las demandas se extienden a que el alimento sea capaz de satisfacer las necesidades nutricionales y dietéticas de cada consumidor en particular.

En este contexto se destaca el concepto de envases activos, mismo que aprovecha las posibles interacciones entre el material, el producto que contienen y el entorno para mejorar la salubridad y calidad del alimento y aumentar su vida útil. Este desarrollo viene acompañado de mejoras técnicas, pero también de la aceptación del consumidor de este tipo de productos y de las reformas legislativas que permitan su extensión.

En la actualidad hay una tendencia del consumidor hacia productos calificados como más naturales, rechazando la adición de conservantes químicos. Esta tendencia llevará al desarrollo de productos biológicos a través del uso de productos químicos, manteniendo esta característica durante el procesado y conservación. (Del Pino, 2001).

Por otro lado, el factor medioambiental ha irrumpido con fuerza en los últimos años, en la consideración tanto de los productores como de los consumidores. Entre los primeros, para decidir sobre los procesos de producción más conservadores del entorno; entre los segundos, para decidir sobre aquel producto que no le afecte a su bienestar futuro por el hecho de consumirlo. La base sobre la que se asientan las soluciones al problema de los residuos sólidos está soportada en tres pilares, si

se atiende a los planteamientos actuales de los expertos de la Comisión de la C.E. esos pilares son:

- La reducción de la fabricación de productos susceptibles de generar residuos; reducción de los envases.
- La recuperación de los residuos de los envases de una manera selectiva y eficiente evitando su amontonamiento a la corriente de residuos sólidos municipales.
- El reciclado de los residuos recuperados, bien mediante su reutilización para rellenado en sucesivos ciclos, bien mediante su transformación en nuevos envases idénticos a los primeros (reciclado perfecto), o en otros productos para usos diferentes. (Puig de la Bellasca, 2009).

La evaluación de las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de un biomaterial biocompatible, funcionalizado con un aditivo natural que libera prolongadamente sus principios activos, resulta un área de interés (Porrasy col, 2012). La polisuccinimida es un biomaterial biodegradable y biocompatible (Tudorachi y col, 2011) que ha cobrado atención recientemente en los ámbitos tanto farmacéutico como alimentario, que puede ser probado como base para el desarrollo de un empaque activo (Hernández-González, 2016).

Hipótesis

El biomaterial PSI-almidón termoconformado y funcionalizado con aceite esencial del orégano resulta apto para el desarrollo de empaques activos.

1.3.1. Hipótesis nula

El biomaterial PSI-almidón termoconformado y funcionalizado con aceite esencial del orégano no resulta apto para el desarrollo de empaques activos.

Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Valorar la actividad antimicrobiana y antioxidante de un biomaterial compuesto a base de polisuccinimida y almidón, funcionalizado con extractos del aceite esencial del orégano (*Lippia berlandieri schauer*).

1.4.2. Objetivos específicos

- Establecer las condiciones para la obtención de un biomaterial compuesto a base de PSI y almidón.
- Funcionalizar el biomaterial compuesto con extractos de aceite esencial del orégano.
- Evaluar la capacidad antimicrobiana del material funcionalizado.
- Evaluar la capacidad antioxidante del material funcionalizado.

Capítulo II

Revisión de literatura

2.1. EMPAQUES ACTIVOS E INTELIGENTES.

Tanto el envasado inteligente como el activo son considerados por la legislación de la Unión Europea, en el reglamento marco sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos (1935/2004), el cual define a materiales y objetos que controlan el estado de los alimentos envasados o el entorno de estos (Parlamento Europeo, 2004).

2.1.1 Empaques inteligentes.

El envasado inteligente se refiere a un sistema capaz de monitorizar y comunicar información sobre el estado del producto a lo largo de la cadena de procesamiento y expendio de un alimento, esto a través de la incorporación de una interfaz que comunique una respuesta a los cambios que se quieran detectar en el entorno del producto o en el producto en sí mismo. Esto puede ser aplicado a través de toda la cadena de producción, transporte, almacenamiento y expendio del producto, reduciendo las pérdidas por chatarreo, residuos, logística, trazabilidad y transporte (Heising y col, 2014).

En un principio los indicadores fueron diseñados a fin de que proporcionaran información sobre condiciones de almacenamiento, tales como la temperatura, tiempo o grado de frescura (O_2 , CO_2), exponiendo información indirecta sobre la calidad del propio alimento, tal como la tasa de polimerización, difusión, reacciones químicas o enzimáticas, humedad, entre otros. En la Figura (1) se presentan los indicadores de calidad empleados en alimentos.

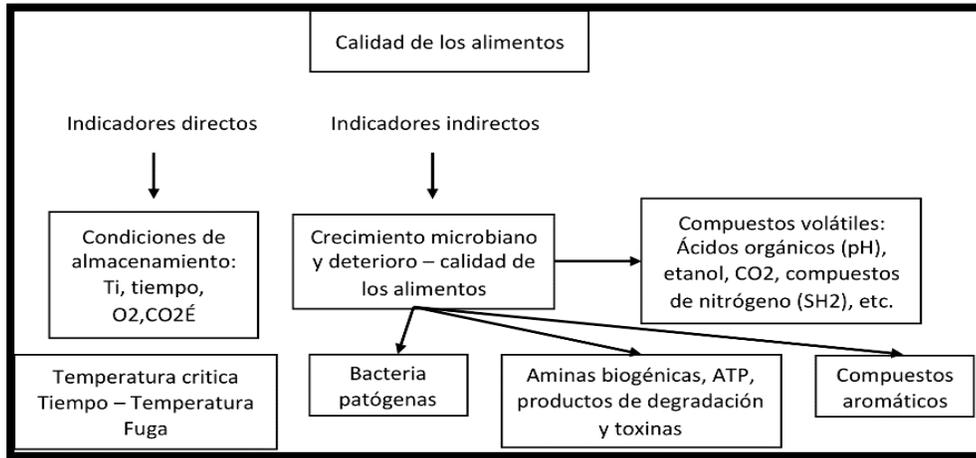


Figura 1. Indicadores de calidad en alimentos (Dianelli y col, 2008).

Lo que se busca es el desarrollo de indicadores de calidad lo más específicos posibles para detección de compuestos volátiles (pueden ser de origen microbiano), aminas biogénicas, toxinas, así como actividad de bacterias patógenas (Dianelli y col, 2008). Es de importancia saber que los envases activos y los inteligentes pueden establecer una sinergia, cuya interacción tendría por finalidad el extender la vida útil de un producto, mejorando y simplificando el monitoreo de los alimentos dentro de sus respectivos envases.

2.1.2 Empaques activos

La generación de nuevas materias primas ha hecho posible la ampliación en las innovaciones en los envases. Algunos de esos materiales son los nuevos polímeros y los compuestos multicapa con nuevos diseños y características tecnológicas que resuelven problemáticas particulares, lo que los convierte en alternativas potenciales para su aplicación en la industria de los alimentos.

Se entiende como envase activo a aquel donde existe una interacción entre éste y el alimento, y de ambos con su entorno, a fin de alargar la vida útil de los alimentos, mejorar sus propiedades organolépticas y/o inocuidad alimentaria, manteniendo en general la calidad el producto (Suppakul y col, 2003).

Otra definición es la que establece la Unión Europea, incluida en el reglamento marco sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto

con alimentos (1935/2004), que cita que “los materiales activos están destinados a ampliar el tiempo de conservación, mantener o mejorar el estado de los alimentos envasados y que están diseñados para incorporar deliberadamente componentes que transmitan o absorban sustancias a los alimentos envasados y/o al entorno de estos” (Parlamento Europeo, 2004).

2.1.2.1. Propiedades de barrera

La determinación de las propiedades de barrera de un polímero es crucial para estimar y predecir la vida útil del producto. Los requerimientos específicos de barrera en los sistemas de empaque están estrechamente ligados a las características del producto y las aplicaciones finales para las que es fabricado, por lo que es necesario unificar y formalizar procedimientos, para así orientar en el diseño, la fabricación y el comercio de este tipo de productos.

La propiedad de barrera al vapor de agua para el envase, cuyo deterioro químico está relacionado con el contenido de humedad, es importante y debe ser cuantificado mediante el coeficiente de permeabilidad al vapor de agua (WVPC) que indica la cantidad de este que permea por unidad de área en un material de empaque [$\text{Kg m m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$]. Juntos, WVTR y WVPC, son expresados en [$\text{cc m}^2 \text{s}^{-1}$] o [$\text{g m}^{-2} \text{día}^{-1}$] (ASTM F1249-2011).

Para el caso de las biopelículas a base de polisacáridos, éstas presentan propiedades de barrera pobres contra el vapor de agua y otras sustancias polares cuando se presentan atmósferas de humedad relativa elevadas, pero en condiciones de humedad relativa intermedia a baja son buenas barreras contra el oxígeno y otras sustancias no polares (Dole y col, 2004).

La tasa de transmisión de vapor de agua en películas a base de almidón resultó de 4 a 6 veces más altas que las de las películas convencionales hechas a partir de polímeros sintéticos. Películas basadas en arabinosilano de plantas anuales, como la cebada, presentan baja permeabilidad al oxígeno y al dióxido de carbono, pero una buena permeabilidad al vapor de agua, debido a que su superficie

se ha hecho menos hidrófila por procesos de fluorinación; sin embargo, estas películas aún no están comercialmente disponibles (Grondahl y col, 2006).

2.1.2.2. Actividad antioxidante

Para muchos alimentos sensibles a la oxidación, la eliminación del oxígeno mediante vacío, atmósferas modificadas o envases activos con secuestradores de oxígeno, puede no ser una solución satisfactoria, pues se pueden establecer condiciones óptimas para el desarrollo de microorganismos anaerobios patógenos o cambios de pigmentación que conlleven a un rechazo del consumidor.

Para este tipo de productos, entre los que se encuentran por ejemplo las carnes frescas, una opción es el envase activo con antioxidantes, en el que éstos se incorporan a la propia composición de material de envase con la intención de que se liberen migrando al alimento de forma controlada como se muestra en la Figura 2, con una cinética adecuada y con la ventaja de que dicha liberación se produciría en la superficie del alimento, que normalmente es la parte más afectada por la oxidación.

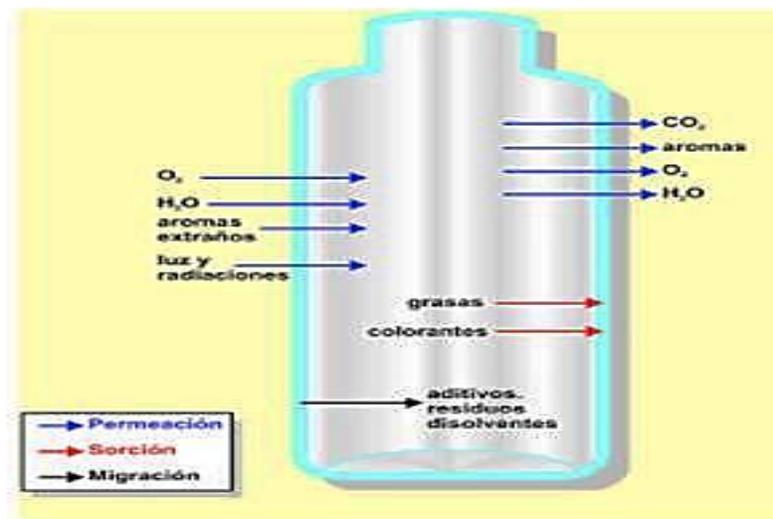


Figura 2. Esquema de un envase activo.

Cabe destacar que estos sistemas activos también podrían ejercer actividad antioxidante sin la necesidad de que se encuentren en contacto directo con el

alimento; es decir, sin que ocurra la liberación y disolución de los compuestos activos en el alimento. Estos sistemas se comportan como secuestrantes de radicales libres, como se ha demostrado en varios trabajos. (Pezo y col, 2007; López de Dicastillo y col, 2016). Además, todos estos sistemas de envases activos han estado constituidos en su mayoría por polímeros convencionales, como poliolefinas; solo en fechas recientes se ha empezado a trabajar con biopolímeros y, aunque las perspectivas son buenas, aún son escasos los resultados.

Investigaciones recientes se centran en la sustitución de antioxidantes sintéticos por compuestos naturales, debido a los potenciales riesgos que aquellos presentan. Se han desarrollado películas para envases con antioxidantes naturales, tales como carvacrol (Peltzer y col, 2009), timol (Park y col., 2012), cinamaldehído (Hu y col., 2012) y sesamol (Zhu y col., 2013), o con extractos naturales ricos en antioxidantes del aceite esencial de citronela (Licciardello y col, 2012). Compuestos fenólicos como el timol evitan la oxidación lipídica (Al-Bandak y col., 2007) y su combinación con nano arcillas aumenta la barrera al O₂ y disminución de la temperatura de transición vítrea (T_g) en PLA (Ramos y col., 2014).

Por ejemplo, Soto-Valdez y col., (2011) mencionan que la incorporación de aditivos antioxidantes naturales a una matriz polimérica permite su liberación y distribución continua durante el almacenamiento de leche deshidratada, extendiendo su vida de anaquel al disminuir la tasa de auto-oxidación lipídica, principal causa de deterioro de las propiedades sensoriales y nutricionales.

La legislación europea regula la migración de componentes del material de empaque hacia los alimentos mediante límites generales de migración (OML) por sus siglas en inglés, aplicables al total del material migrante. Los OML pueden ser vistos como una restricción de contaminantes totales de los alimentos al sumar todas las sustancias que migran, lo cual no está relacionado directamente con la seguridad humana. Por otro lado, no se puede excluir la presencia de migrantes que pueden dañar la salud humana, por lo que ésta debe ser prioridad en el control de los compuestos migrantes (Grob y col., 2007).

La otra arista es la de la migración intencional de compuestos con propiedades para la conservación de los productos contenidos en ellos, como por ejemplo el caso de la conservación de la leche en polvo mediante la migración del tocoferol a partir de una película multicapa, hecha a base de HDPE, PVOH y una capa de LDPE que contiene el aditivo. El modelo de estudio se basó en la ecuación de difusión de Fick, donde los valores D a 20°C resultaron diferentes a aquellos a 30 y 40°C, pero similares entre 30 y 40, lo que asegura la liberación adecuada del aditivo en condiciones de almacenamiento en zonas de clima cálido, lo cual es adecuado, ya que las reacciones de daño oxidativo se ven favorecidas en estas condiciones (Granda-Restrepo y col., 2009).

2.1.2.3. Actividad antimicrobiana

De las diversas aplicaciones de los envases activos, la actividad antimicrobiana es precisamente lo más atractivo ya que, como el mismo nombre lo indica, el principal objetivo del envasado es la extensión de la vida útil del producto y la reducción del riesgo de microorganismos patógenos y corruptores de los alimentos.

La contaminación microbiana ocurre principalmente en la superficie de los productos, sobre todo en aquellos ricos en proteínas, como los cárnicos, debido al manejo posterior a su procesamiento. Se han hecho intentos para asegurar la inocuidad y el retraso de la descomposición mediante sprays o inmersiones antimicrobianas (Kerry y col., 2011).

Debido a la demanda por alimentos más naturales, las innovaciones del envase activo han explorado en mayor frecuencia la incorporación de agentes antimicrobianos de origen natural como parte del material de envasado. El quitosan, la nisina, la lactacina y la pediocina, han sido usados para inhibir o retardar el crecimiento microbiano (Ouattara B y col., 2000; Yingyuad y col., 2006). En algunos casos, el quitosan se ha usado como matriz para portar y liberar otros compuestos con actividad antimicrobiana, principalmente de origen natural, como son los aceites esenciales, extractos de plantas y especias, como el clavo la pimienta, el romero, el

orégano entre otros (Ouattara B y col., 1997; Chi y col., 2006; Gomez-Estaca y col., 2009).

Algunos agentes antimicrobianos usados en el envasado de alimentos son: ácidos orgánicos, sulfitos, nitratos, alcoholes, quelantes, polisacáridos, bacteriocinas y antimicrobianos naturales (Kerry y col., 2011; Marcos-Mutual, 2011).

Los aceites esenciales son mezclas muy complejas que pueden contener alrededor de 20 a 60 componentes en concentraciones variantes, pero se caracterizan por dos o tres componentes principales en concentraciones relativamente altas en comparación con los otros componentes presentes en cantidades traza (Bakkali y col., 2008).

En el caso del aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri Schauer*), se caracteriza por dos terpenos bioactivos: el timol y carvacrol, mismos que son responsables de las actividades antimicrobianas y antioxidantes. El timol es estructuralmente muy similar al carvacrol, la diferencia radica en la ubicación del grupo hidroxilo en el anillo fenólico. Debido a su estructura química, ambos compuestos fenólicos aumentan la permeabilidad de la membrana celular, afectando la homeostasis del pH y la concentración de iones. (Lambert y col., 2001). En el mismo contexto, también son capaces de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, debido a la liberación de lipopolisacáridos y el aumento de la permeabilidad de la membrana citoplasmática de ATP (Helander y col., 1998).

Juven y col., (1994) examinaron el funcionamiento de timol contra *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus* presentando como hipótesis que el timol se une a las proteínas de membrana hidrófoba por medio de enlaces de hidrógeno, cambiando así las propiedades de permeabilidad de la membrana.

Otro estudio se realizó desarrollando nanocompuestos bactericidas a base de celulosa conteniendo nano partículas de plata para su uso como envase activo alimentario, donde se encontraron propiedades antibacteriales contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en las películas que contienen partículas de 41nm de

plata. (Moura y col., 2012), y más recientemente, en 2016, (López de Dicastillo y col., 2016) probaron extractos de fruta murta adicionados en películas de celulosa de metilo, reticuladas con la misma finalidad de probar su actividad antimicrobiana y antioxidante. La incorporación del glutaraldehído como agente de entrecruzamiento afectó negativamente las actividades antioxidantes y antimicrobianas del material cuyos rangos variaron en reducciones de entre 3.85 y 3.00 ciclos logarítmicos en contraste con reducciones de solo 0.85 ciclos logarítmicos para el material libre de extractos.

Las limitantes de estos antimicrobianos son, por ejemplo, la neutralización de compuestos en contacto con la superficie de la carne o la difusión de compuestos desde la superficie hacia el interior. La incorporación de agentes bactericidas dentro de las formulaciones de la carne puede producir inactivación parcial de los compuestos activos por los componentes propios de la carne en sí y, por tanto, ejercer o limitar su efecto en la flora microbiana superficial (Quintavalla y col.,2002).

El crecimiento de los microorganismos en los empaques activos se ve limitado o inhibido gracias a la prolongación de la fase de latencia, reducción de las cuentas microbianas y efecto por contacto (Marcos-Mutual, 2011; Suppakul y col., 2003; Quintavalla y col.,2002).

Los empaques activos con actividad antimicrobiana se pueden clasificar en dos tipos: aquellos que contienen un agente antimicrobiano, el cual migra a la superficie del alimento, y aquellas que son efectivas contra el desarrollo de flora patógena y corruptora en la superficie sin migración (Kerry y col., 2011). Las sustancias migrantes son consideradas dentro de los aditivos alimentarios, por consiguiente, deben estar permitidas por la legislación vigente. (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2002 citado por Marcos-Mutual, 2011).

2.2. MICROORGANISMOS PATÓGENOS ALIMENTARIOS

La frecuencia de las enfermedades transmitida por alimentos es elevada, principalmente en países subdesarrollados. A pesar de los avances para erradicar este problema, las intoxicaciones alimentarias siguen estando presentes en los

consumidores, siendo la carne y los productos cárnicos una fuente importante de infecciones transmitidas por alimentos.

Los responsables de estas enfermedades son los microorganismos patógenos que son, definidos como aquellos microorganismos indeseables que amenazan la salud del hombre, la de los animales o ambos. Las enfermedades producidas por aquellos que afectan tanto al hombre como a los animales, se conocen como zoonosis.

Los microorganismos patógenos implicados en las enfermedades transmitidas por los alimentos conforman un grupo diverso y sus mecanismos de patogenicidad son muy variados. Dentro de la carne y los productos cárnicos, las bacterias Gram negativas son las que suelen predominar en esta microbiota. De entre las Gram positivas, las que prevalecen más son los enterococos, junto con los lactobacilos. (Jay y col., 2009).

Algunos de los microorganismos causantes de toxoinfecciones alimentarias más importantes en la actualidad y que pueden ser transmitidos por la carne a sus consumidores son: *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, algunos serovares de *C. botulinium*, *Staphylococcus aureus*, *C. pefringes*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* y *Yersinia enterocolítica* (Norrung y col., 2008; Hui y col., 2006).

Dentro de estos microorganismos es importante precisar a detalle sus características, para esta investigación se abordaron las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* como las más importantes de las descritas anteriormente.

2.2.1. *Staphylococcus aureus*

La intoxicación estafilocócica se encuentra dentro de las enfermedades transmitidas por alimentos más importantes en el ámbito mundial, presente en productos con gran valor proteico.

Esta bacteria pertenece a la familia *Micrococcaceae* y presenta una morfología coco Gram positiva de 0.05-1.5 micras de diámetro, no esporulado e inmóvil, catalasa positiva y que generalmente presenta metabolismo glucosa

oxidativo y fermentativo. Las células de *Staphylococcus* muestran un arreglo característico en racimos como consecuencia del modo de división y algunos producen pigmentos carotenoides de color amarillo o dorado. (Fausto, 2006; Hui y col., 2006; Sánchez-Ruiz, 2015). En las Figuras 3 y 4, se muestra la morfología tras la tinción de Gram y observada en el microscopio electrónico de barrido, respectivamente.

Son mesófilos halotolerantes (10% NaCl) que requieren de un $A_w = 0.98$, una temperatura mínima de 7°C y una máxima de 48°C, siendo la óptima 37°C; el rango en pH va desde los 4 a los 10, presentando el óptimo a 6.5 (ICMSF, 1997. Citado por Díaz Cortés, 2007).

Staphylococcus aureus produce algunos compuestos extracelulares como las hemolisinas, enterotoxinas, coagulasa, nucleasas y lipasas; de las cuales las enterotoxinas son las responsables de la intoxicación, y presentan características termostables, coagulasa positiva y termonucleasa positiva. La mayoría de las carnes crudas se contaminan durante el sacrificio de los animales, ya que estos son ampliamente manipulados.

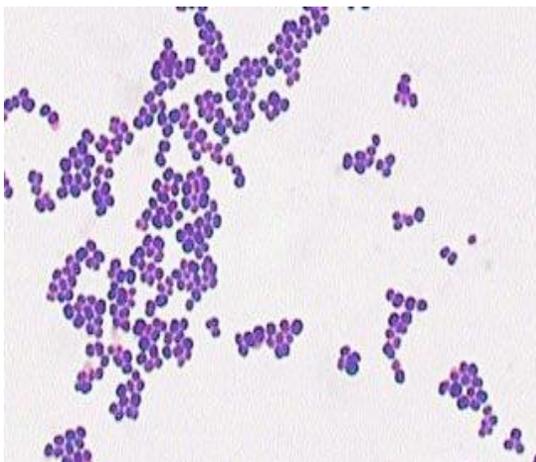


Figura 3. Tinción de Gram De *Staphylococcus aureus* (Microbitos, 2011).

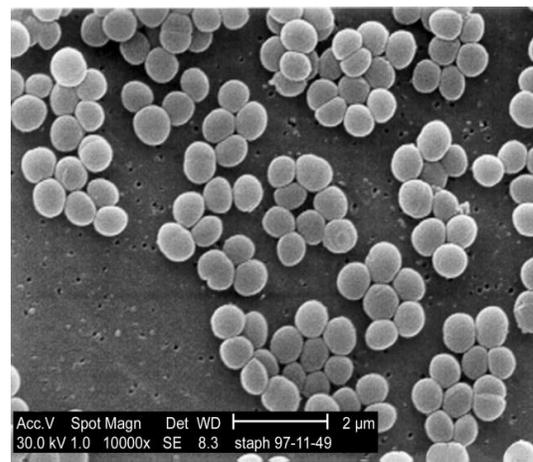


Figura 4. Microfotografía de *Staphylococcus aureus* tomada en un microscopio electrónico de barrido (Microbitos, 2011).

2.2.2. *Escherichia coli*

Es una bacteria que se encuentra normalmente en el intestino del ser humano y animales de sangre caliente. La mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas; Sin embargo, algunas de ellas, como *E. coli* enterohemorrágica, pueden causar graves enfermedades a través de los alimentos. La bacteria se transmite al hombre principalmente por consumo de alimentos contaminados, como productos de carne picada cruda o poco cocida. (Organización Mundial de la Salud, 2014).

Las bacterias de la especie *E. coli* son representantes de la familia Enterobacteriaceae. Como tales, los organismos son bacilos cortos Gram negativos, catalasa-positivos, oxidasa negativos y anaerobios facultativos. La mayoría de las cepas fermentan la lactosa, aunque algunas son fermentadoras lentas de este azúcar y algunas son anaerogénicas (Ramis Vergés, 1998; Sánchez-Ruiz, 2015). La morfología después de la tinción de Gram y una microfotografía tomada del microscopio electrónico de barrido se muestran en la Figura 5 y 6, respectivamente.

Es una bacteria mesófila que crece a temperatura desde 7°C hasta 50°C, con una temperatura óptima de 37°C, aunque existen referencias de algunas cepas enterohemorrágicas que crecieron a temperaturas menores a 4°C y capaces de resistir el almacenamiento en refrigeración o congelación durante tiempos prolongados. Un pH casi neutro es óptimo. Su A_w mínima de crecimiento es de 0.95 (Adams & Moss, 1997. Citado por Morales Ángeles, 2005; Al-Bandak y col., 2007; Sánchez-Ruiz, 2015).

Las cepas se identifican basándose en tres antígenos de superficie que permiten su serotipificación: O (somático), H (flagelo) y K (cápsula). Las cepas de *E. coli* que causan diarrea se categorizan en grupos específicos basados en sus propiedades virulentas, los mecanismos de patogenicidad, los síndromes clínicos y los distintos serogrupos OH. Algunas de estas categorías son: las cepas enteropatógenicas, toxigénicas, enteroinvasivas, las de adherencia difusa, las enteroagregativas y las enterohemorrágicas (Hui y col., 2006; Sánchez-Ruiz, 2015).



Figura 5. Tinción de Gram de *Escherichia coli*. (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Delegación Cataluña, s.f.).

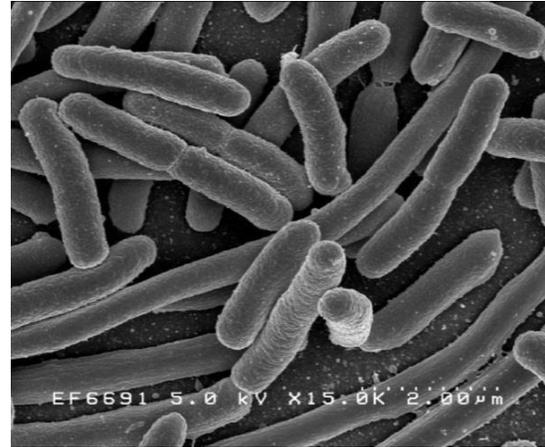


Figura 6. Microfotografía de *Escherichia coli* tomada en un microscopio electrónico de barrido. (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Delegación Cataluña, s.f.).

2.3. Materiales de empaque

Los envases son los pilares principales de las mejores técnicas de conservación de los alimentos, pero también pueden ser engañosos para el consumidor, ya que pueden esconder la verdadera composición del producto, y en otras ocasiones ser causantes del encarecimiento de éste. (Demuner-Carreón y col., 2004).

Los materiales se clasifican en cinco grupos: metales, cerámicos, polímeros, semiconductores y materiales compuestos. Los materiales de cada uno de estos grupos poseen estructuras y propiedades distintas. (Askeland y col., 1998).

2.3.1. Materiales metálicos

El metal es el material más resistente, por sus características puede soportar cualquier proceso de esterilización y es más ligero que el vidrio. Las ventajas del metal son su rigidez, ligereza y hermetismo, además de que ofrece un alto grado de conservación de los alimentos, facilidad de manejo y de transporte, lo que hace que sea posible disponer de ellos en cualquier época. El embalaje metálico está particularmente recomendado para una larga conservación gracias a la solidez inerte de sus materiales y a su impermeabilidad a los líquidos, a los gases y a la luz.

Particularmente el aluminio (empleado en las latas para bebidas gaseosas) es un material ligero que cumple con gran eficiencia las funciones de envasado, transportación y presentación, pero no es recomendable para contener productos ácidos ni para someterlos a temperaturas muy altas. (Demuner-Carreón y col., 2004).

2.3.2. Materiales cerámicos

Se caracterizan por tener baja conductividad eléctrica y térmica y a menudo son utilizados como aislantes. Los cerámicos son fuertes y duros, aunque también muy frágiles o quebradizos. (Mari, 2011).

En este grupo, en el ramo alimentario se destaca el vidrio, producto que ha dominado el mercado mundial de envases durante mucho tiempo y muestra cómo la tecnología no compite con la tradición algunas veces, sobre todo cuando el salto de lo artesanal hacia lo industrial permite satisfacer las necesidades locales. El vidrio es el material que mejor garantiza la integridad de los productos alimenticios pues es una barrera absoluta contra la intemperie, no despidе olores ni sabores y conserva las características organolépticas de los alimentos, porque cuando se utiliza correctamente no requiere del uso de conservadores. Además, el consumidor puede observar a través de él lo que compra. También es impermeable a los gases, vapores y líquidos y es químicamente inerte frente a los alimentos; es fácil de lavar y esterilizar, puede colorearse y aportar así una protección frente a los rayos ultravioletas que en ciertas condiciones podrían dañar el contenido, resiste las elevadas presiones internas que producen ciertos líquidos que contienen gas carbónico (sidra, cerveza, refrescos, etc.), y permite el paso de las microondas.

El vidrio es el único material que cumple con el proceso de reciclaje de forma continua, para lo cual la pedacería de vidrio se lava y después se tritura para ser fundida nuevamente gracias a que no se degrada, por lo que se transforman envases en mal estado en otros con propiedades físico químicas idénticas a los originales y muy abundantes: arena sílica, cloruro de potasio, caliza y feldespato. En el reciclado, el vidrio roto (conocido como cullet) sustituye en la fórmula original a la arena sílica. (Demuner-Carreón y col., 2004).

2.3.3. Materiales compuestos

Se forman a partir de dos o más materiales, produciendo propiedades que no se encuentran en ninguno de los materiales de manera individual. Se conocen como materiales compuestos de FRP o compósitos y cubren una gran variedad de aplicaciones, desde los elementos estructurales y arquitectónicos, hasta la construcción de barcos o la energía eólica. (Miravete, 2004).

En este grupo se presentan los envases poli-laminados, que es uno de los desarrollos tecnológicos más especializados en el sector de envases, pues combina las propiedades de diversos recipientes para proteger, preservar y contener. Están constituidos por láminas de distintos materiales, como el papel, que proporciona la estructura mecánica que da fuerza y rigidez; el aluminio, que ofrece una barrera contra la luz porque ésta acelera la descomposición de los productos y ataca sus colores, y el polietileno, que protege los alimentos del aire. La mezcla de dichos materiales forma un sello hermético en la vida de anaquel y le da ligereza. Sin embargo, esta tecnología no sirve para envasar productos sólidos, pero la investigación está dirigida a resolver ese problema. (Demuner-Carreón y col., 2004).

2.3.4. Materiales poliméricos

Producidos mediante un proceso conocido como polimerización; es decir, creando grandes estructuras moleculares a partir de moléculas orgánicas. Los polímeros incluyen el hule, los plásticos y muchos tipos de adhesivos. Tienen baja conductividad eléctrica y térmica, reducida resistencia y no son adecuados para utilizarse a temperaturas elevadas. Los polímeros termoplásticos, en los cuales las largas cadenas moleculares no están conectadas de manera rígida, tienen buena ductilidad y conformabilidad. Los polímeros termoestables son más resistentes, aunque más frágiles porque las cadenas moleculares están fuertemente enlazadas. Los polímeros se utilizan en muchas aplicaciones. (Askeland y col., 1998).

2.3.5. Biomateriales

La creciente explotación de la petroquímica durante el siglo pasado marcó un fuerte desarrollo en la producción de polímeros sintéticos, lo que ha suplantado de

manera importante al uso de productos químicos de base biológica y sus polímeros, sobre los cuales se ha originado un renovado interés, derivado ello principalmente de las consecuencias negativas del uso de derivados del petróleo y su impacto en el medio ambiente (Laurichesse y col., 2013;2014), lo que es mención común en la actualidad junto con la advertencia acerca de las consecuencias para el planeta si no se realiza un cambio inmediato hacia el uso de materiales más amigables con el medio ambiente, como es el caso de los biomateriales (Scholz y col., 2006).

Debido a que la realidad es que los empaques plásticos originados a partir del petróleo están por demás posicionados en lo respectivo al envasado de alimentos y que desde el punto de vista de la opinión pública es necesario el uso de materiales biodegradables a fin de reducir la cantidad de residuos sólidos no biodegradables presentes en el ambiente, se identifican dos directrices hacia el desarrollo de biomateriales: aquella que se dirige a la sustitución de empaques de origen no renovable por aquellos sintetizados a partir de fuentes renovables, y la segunda, orientada a reducir la cantidad de residuos de los envases usados presentes en el medio ambiente, al ser sustituidos por materiales biodegradables (Narayan, 2006).

2.4. Polisuccinimida

A fechas recientes, las aplicaciones tanto farmacéuticas como alimentarias se dirigen al desarrollo de preparados que permitan el traslado y liberación controlada de principios activos y/o aditivos.

Los compuestos de interés pueden estar unidos, ya sea covalentemente o mediante fuerzas secundarias, o macromoléculas acarreadoras. Los vehículos acarreadores están preferentemente constituidos por bloques de construcción bio-compatibles, de tal forma que pequeñas moléculas no tóxicas puedan ser liberadas mediante degradación enzimática.

Estudios han presentado a polímeros enteramente constituidos por aminoácidos como materiales iniciadores potenciales, biodegradables y buenos contenedores de los principios activos. Un precursor que llama la atención es la

polisuccinimida (PSI), la cual puede ser sintetizada a partir del ácido aspártico, mediante poli-condensación.

La poli-condensación del ácido aspártico no requiere de agentes para su unión, o grupos protectores, ya que la formación de los anillos de succinimida es un proceso que se ve favorecido termodinámicamente. Las uniones imida formadas pueden ser aperturadas por agentes nucleofílicos, tales como iones hidroxilo, llevándolo a poli(aspartato), lo que es técnicamente importante. Los reactivos donadores de nitrógeno, como la etanolamina, generan cadenas laterales sobre la PSI mediante enlaces amida, (Torma y col. 2007).

Los estudios en este ámbito son prometedores y se han reportado varios estudios para el uso de este polímero como vehículo para transportar y liberar compuestos con actividad biológica con resultados exitosos, como es el caso del complejo vanadio- α - β -poli (DL-ácido aspártico), mismo que fue sintetizado por combinación de una solución diluida del polímero con soluciones de VO_2^+ , ambas de diferentes concentraciones; la técnica de síntesis del complejo fue desarrollada en base al trabajo de (Thombre y col., 2005). Finalmente, el complejo fue caracterizado y probado en forma de un conjugado hidrosoluble, con una estructura octaédrica, en donde de acuerdo a la espectroscopía IR y UV-Visible, fue posible descartar la posibilidad de que el VO_2^+ no se encuentre acomplejado sino simplemente absorbió como VO_2^+ o VO_2 por el α - β -poli (DL-ácido aspártico); así mismo, se estableció que la proporción relativa de unidades α - β es de 28.5% y 71.5%, respectivamente, distribuida en una secuencia al azar. (Zegarra Urquia, 2012).

En el presente proyecto de investigación se propuso realizar la inclusión de extractos del aceite esencial del orégano, valorados en el ámbito alimentario por sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes, basándose en los estudios anteriormente expuestos.

2.5. Almidón

El almidón es sintetizado en forma de gránulos semicristalinos, almacenado en diferentes órganos de plantas incluyendo: hojas, semillas, tubérculos, raíces y frutas. El almidón está conformado por dos tipos de polisacáridos: la amilosa, una molécula fundamentalmente lineal compuesta de glucanos unidos mediante enlaces α -(1,4), y por la amilopectina, una molécula de mayor peso molecular altamente ramificada con enlaces α -(1,6). La funcionalidad del almidón y organización física dentro de la estructura granular se debe a estas macromoléculas (French, 1984).

Las cantidades relativas de estos dos polímeros y su organización física dentro de la estructura granular, les confieren propiedades fisicoquímicas y funcionales características a los diferentes almidones (Bello-Perez y col., 1996).

Los almidones son la principal fuente dietética de glúcidos utilizables. Son polímeros de glucosa y constituyen la reserva energética de la mayoría de vegetales. Los gránulos de almidón tienen una forma y tamaño característico en cada vegetal. Están integrados por dos tipos de cadenas: amilopectina, componente mayoritario y de carácter ramificado, y amilosa, formada por cadenas lineales. Se encuentran exclusivamente en los vegetales y tienen las siguientes propiedades:

- a) No poseen carácter dulce;
- b) Son poco solubles en agua fría;
- c) Forman engrudos y geles en agua caliente.

Casi todas las industrias han encontrado algún uso para el almidón; en la industria de alimentos, industria textil, papel, adhesivos y farmacéutica.

En 2006, el Instituto Internacional del Almidón, reportó que el maíz es la principal fuente de obtención del almidón a nivel mundial, seguido de la papa, el camote y la yuca. La mayor parte de los almidones comerciales se producen a partir de maíz y papa; más del 80% del almidón que se produce a nivel mundial se obtiene

de maíz, principalmente en Estados Unidos. Europa es el mayor productor del almidón de trigo y papa; en Asia se produce almidón a partir de yuca y tapioca; en varios países se produce en menor proporción almidón de arroz y camote (Jobling, 2004; Huang y col., 2007).

El almidón es una materia prima con un amplio campo de aplicaciones que van desde la impartición de textura y consistencia en alimentos hasta la manufactura del papel, adhesivos y empaque biodegradables (Zhao y col., 1994).

2.5.1.1. Clasificación

Los biomateriales utilizados para envasado de alimentos pueden ser clasificados de diversas formas: de acuerdo a su composición química, origen, método de síntesis, importancia económica, aplicación, entre otros. (Weber, 2000) describe una clasificación de acuerdo a su desarrollo histórico:

2.5.1.1.1. Primera generación

Fue usada para bolsas de compras y consistió de polímeros sintéticos tales como el polietileno de baja densidad (LDPE) con 5-15% de rellenos de almidón y aditivos pro-oxidativos y auto-oxidativos. Si bien estos materiales se desintegraban o bio-fragmentaban en moléculas más pequeñas al ser composteados, no se biodegradaban. Esto dio una imagen muy pobre a los productos biodegradables, generando una sensación de fraude hacia los consumidores.

2.5.1.1.2. Segunda generación

Consistió de una mezcla de almidón gelatinizado y LDPE con la adición de un co-polímero hidrofílico con un ácido etilen-acrílico, alcohol polivinílico (PVOH) y vinil acetato, los cuales actúan como agentes de compatibilidad. La desintegración completa del almidón se lleva a cabo en 40 días y la degradación de la lámina completa en 2 a 3 años. La reacción de los consumidores a estas películas fue parecida a la generada para los materiales de primera generación.

2.5.1.1.3. Tercera generación

Consiste de materiales completamente biobasados y puede ser subclasificada en tres categorías principales de acuerdo con su origen y método de producción, como se describe en la Figura 7. Dentro de la categoría 2, se incluye los productos obtenidos por síntesis química clásica a partir de monómeros.

Existen sin embargo otros monómeros con posibilidades de estudio a partir de los cuales se pueden generar materiales aptos para el desarrollo de biomateriales para empaque.

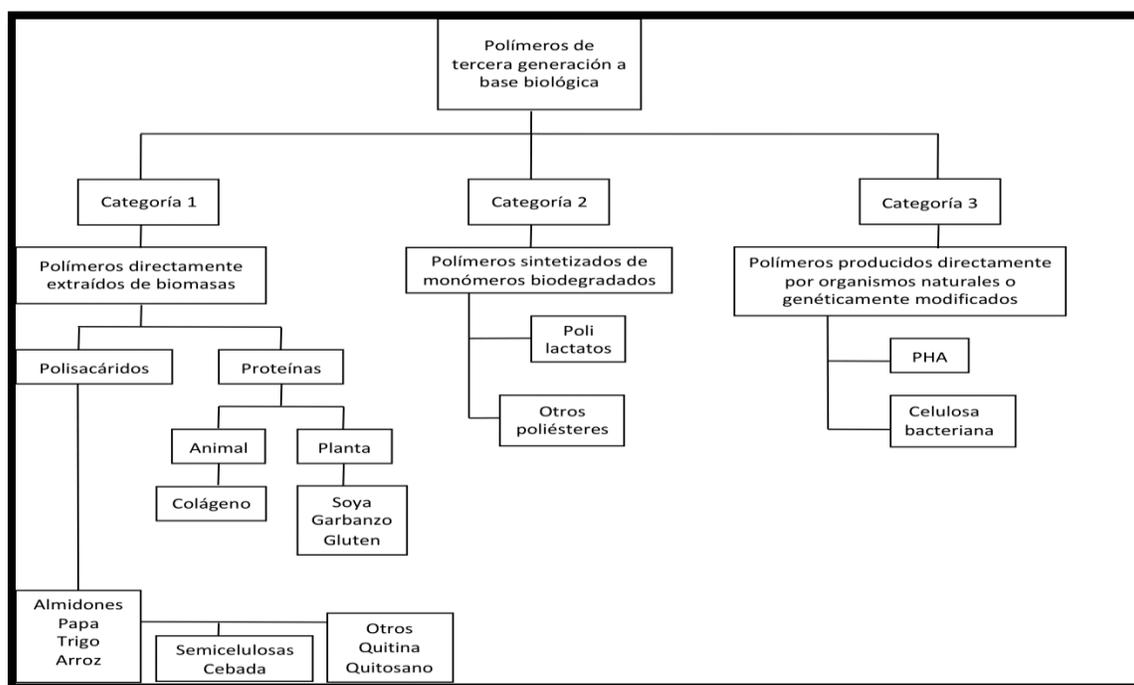


Figura 7. Representación esquemática de las tres categorías de los polímeros de tercera generación.

2.5.1.2. Tecnologías para su obtención

Existen varios métodos para el procesamiento de polímeros, entre los cuales se mencionan: extrusión, modelo por inyección, modelo por soplado, calandrado, modelo rotacional y casting; pero los más importantes para el trabajo que se realizó fueron los siguientes:

2.5.1.2.1. Termoconformado

Se conoce también como termoformado y es un proceso en el cual una lámina o película termoplástica es calentada a una temperatura y tiempo específicos para adquirir la forma del molde utilizado. Puede desarrollarse por técnicas de vacío, aire a presión o fuerzas mecánicas (Osswald y col. 2006).

2.5.1.2.2. Moldeo por compresión

En este proceso se ubica el polímero en la cavidad del molde (hembra) y se aplica presión (molde macho) y temperatura para solidificar o curar el polímero, el cual adopta la forma al interior de la cavidad (Vincent y col., 2006).

2.6. Aditivos

Hoy en día, más de 2500 aditivos se añaden intencionadamente a los alimentos con el fin de mantener ciertas propiedades o para extender la vida útil, mientras muchos otros han sido prohibidos a lo largo de los años; algunos de ellos a nivel mundial y otros sólo en determinados países (Branen y col., 2001).

Los aditivos alimentarios se definen como sustancias que no se consumen solos como alimento, pero se les permite ser utilizados para proteger, reparar y evitar cambios no deseados de los alimentos durante la preparación, clasificación, elaboración, envasado, transporte, almacenamiento y distribución de ellos. El propósito es extender la vida útil de los alimentos para preservar las cualidades de los mismos, mejorar o desarrollar propiedades sensoriales, prevenir los riesgos a la salud, reducir las pérdidas de alimentos y proteger la salud humana.

Los aditivos alimentarios se agrupan en tres principales partidas que son en forma de colorantes, edulcorantes y otros aditivos. El uso de aditivos alimentarios está regulado por las leyes, los propósitos de estas regulaciones involucran el prevenir el mal uso de los mismos y sus efectos adversos sobre la salud. Debido a que el uso de aditivos alimentarios se hizo inevitable, se debe también concientizar sobre su uso racional (Erkan, 2010).

El grupo de los conservantes se divide en 3 subgrupos, aunque algunos

aditivos pueden servir a más de una función en los alimentos: antimicrobianos, antioxidantes y agentes antipardecimiento (Branen y col., 2001).

A pesar de las diversas clases de aditivos y las diferentes clasificaciones utilizadas, estos pueden ser clasificados en 4 grupos fundamentales con respecto a su origen y a la producción: aditivos naturales (obtenidos directamente de animales o plantas), similar a los aditivos naturales (producido sintéticamente imitando a los naturales), modificado a partir de (aditivos naturales que se modifican entonces químicamente), y, finalmente, aditivos artificiales (compuestos sintéticos).

2.6.1. Aditivos naturales

Los consumidores deliberadamente escogen alimentos mínimamente procesados por encima de los procesados, y cuando tienen que elegir los alimentos procesados seleccionaran aquellos con menos aditivos y/o que contengan aditivos naturales. Aunque los aditivos naturales no siempre representan un beneficio en comparación con los productos químicos, en la mayoría de los casos se cree son más saludables, que puede llevar a cabo diversas funciones en el alimento y conferir valor añadido (bioactividad, nutracéuticos). Los aditivos naturales son compuestos, o grupos de compuestos, o aceites esenciales de las plantas que ya se utilizan empíricamente por la población para estos propósitos. Los hongos y las algas marinas también son fuentes interesantes de aditivos naturales. Estos compuestos naturales han existido desde hace algún tiempo, pero en los últimos años han adquirido un mayor interés de la industria alimentaria para su aplicación directa o en sinergia con otros aditivos naturales o químicos. Entre los muchos efectos de los aditivos naturales, los más estudiados son su actividad antimicrobiana y antioxidante (Carocho y col., 2013).

2.7. Orégano (*Lippia berlandieri Schauer*)

El “orégano” comprende más de dos docenas de diferentes especies de plantas con flores y hojas que presentan un olor característico a “especioso”. Las hojas secas del *Origanum vulgare*, nativo de Europa, y del *Lippia graveolens*, planta nativa de México, son de uso culinario común (Pierce, 1999, citado por Arcila-Lozano

y col., 2004). La hoja del orégano se usa no solo como condimento de alimento, sino también en la elaboración de cosméticos, fármacos y licores; motivos que lo han convertido en un producto de exportación. Adicionalmente la Organización Mundial de la Salud estima que cerca del 80% de la población en el mundo usa extractos vegetales o sus compuestos activos, por ejemplo, los terpenoides, para sus cuidados primarios de salud. (Arcila Lozano y col., 2004).

Existen diversos estudios sobre la composición química del orégano, en los cuales se han utilizado extractos acuosos y sus aceites esenciales (Pacual, 2004, citado por Arcila-Lozano y col., 2004). La Figura 8 muestra la estructura química de los principales componentes en el orégano. Se han identificado flavonoides como la apigenina y la luteolina, agliconas, alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano (Justesen, 2001 citado por Arcila-Lozano y col., 2004). Los aceites esenciales de especies de *Lippia* contienen limoneno, β -cariofileno, cimeno, canfor, linalol, α -fineno timol y carvacrol, los cuáles pueden variar de acuerdo al quimiotipo.

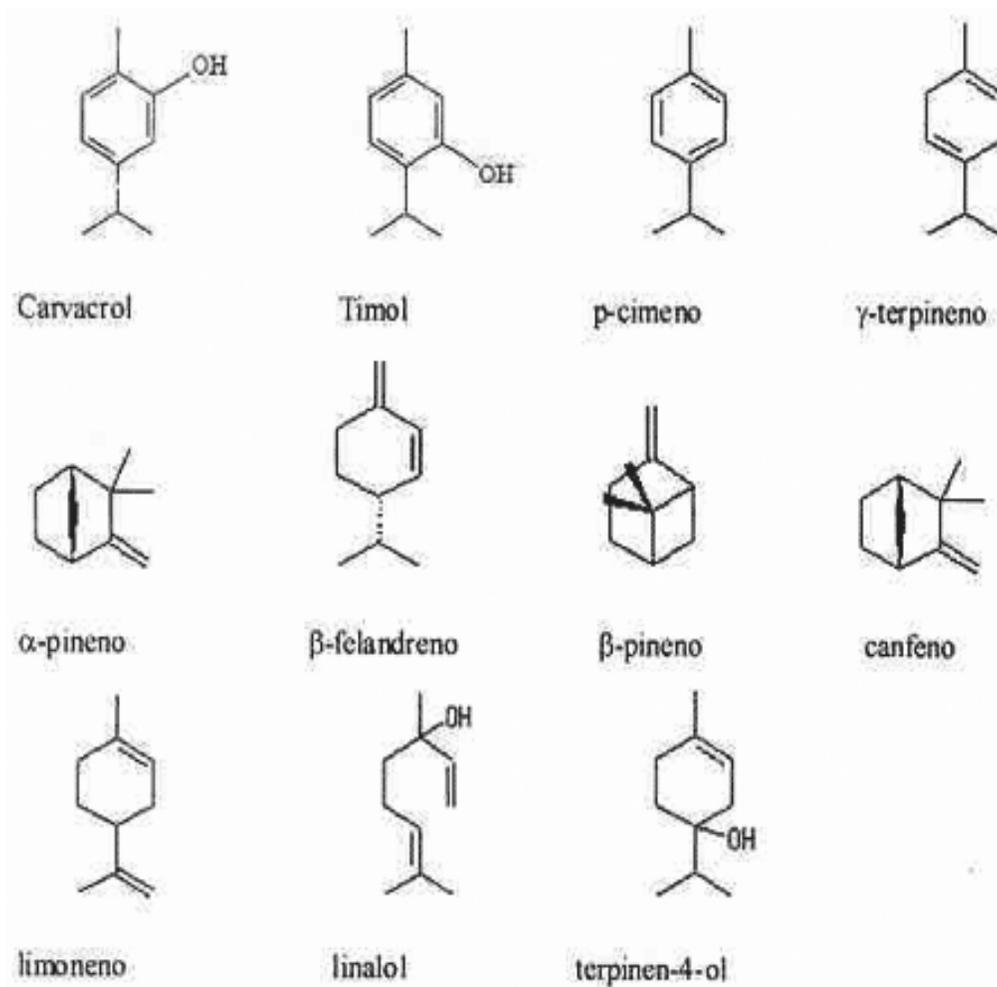


Figura 8. Estructura química de los principales componentes del orégano.

2.7.1. Actividad biológica de los componentes del orégano

Las principales actividades biológicas del orégano son su capacidad antioxidante, antimicrobiana, antiparasítica, entre otras, mismas por lo que es valorado en la industria alimentaria como un potencial aditivo natural.

2.7.2. Actividad Antioxidante

Este efecto se debe a la presencia de grupos hidroxilo en los compuestos fenólicos (Shahidi, 1992 citado por Arcila-Lozano y col, 2004). El potencial

antioxidante de los extractos de orégano ha sido determinado por su capacidad para inhibir la peroxidación lipídica de hidrógeno y por pruebas de rancidez. En todas estas pruebas los extractos de orégano han mostrado ser efectivos, en algunos casos a niveles superiores a los presentados por el propil galato, BHT y BHA (Murcia y col., 2009).

2.7.3. Potencial antimicrobiano

Existen múltiples estudios sobre la actividad antimicrobiana del extracto de diferentes tipos de orégano. Se ha encontrado que los aceites esenciales de las variedades del orégano presentan actividad contra bacterias gram negativas, como *Salmonella Typhimurim*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae*; y las gram positivas, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listera monocytogenes* y *Bacillus subtilis* (Elgayyar, 2001, Slyropoulou,1996; citado por Arcila-Lozano y col., 2004). Los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para los aceites esenciales se han establecido entre 0.28-1.27 mg/ml para bacterias y de 0.65-1.27 mg/ml para hongos.

2.7.4. Usos y aplicaciones industriales

Debido a la capacidad antioxidante y antimicrobiana de los extractos acuosos del orégano, se sugiere que éstos pueden ser empleados como sustitutos de los aditivos sintéticos (Murcia y col., 2009). La peroxidación lipídica es uno de los principales problemas en la industria de los cárnicos durante el procesamiento, la preparación y el almacenamiento. Otra forma interesante de evitar la peroxidación de los ácidos grasos en la carne es utilizando aceites esenciales del orégano como suplemento (Arcila Lozano y col., 2004), teniendo como reto encontrar una manera de aplicación que sea fácil y efectiva para los usuarios, utilizando un soporte que permita el transporte, liberación y dosificación de los aceites esenciales, para lo cual se deberá conocer y desarrollar envases a base de materiales que permitan estas funciones, lo cual es un objeto de estudio interesante.

2.7.5. Antimicrobianos naturales

Los antimicrobianos naturales que pueden añadirse a los alimentos son principalmente los terpenos, péptidos, polisacáridos, y compuestos fenólicos, entre otros con menos expresión. Ejemplos de terpenos y sus familias incluyen el carvacrol, timol, y mentol. (Ultee y col., 2001; Ultee y col., 2002; Xu y col., 2008).

Los polisacáridos naturales, que ya están utilizados como aditivos alimentarios, tienen efectos positivos sobre la salud sin reportada toxicidad. El quitosano y sus derivados, quitoooligosacáridos, extraído de las conchas de crustáceos, se utilizan en la comida y las industrias farmacéuticas por sus efectos beneficiosos, a saber, hipocolesterolémico, antimicrobiano, la inmunidad mejora, antitumoral, contra el cáncer, anti -inflamatorio, la mejora de absorción de calcio y el poder antioxidante, entre otros (Xia y col., 2011).

Muchos otros tipos de moléculas de origen natural son eficaces contra los contaminantes microbianos de alimentos, entre ellos, los péptidos, conocidos como bacteriocinas. Las bacteriocinas no deberían confundirse con antibióticos; su uso es estrictamente para los alimentos, mientras los antibióticos son para uso clínico/médico. Estas moléculas no tienen toxicidad o efectos secundarios reportados, a diferencia de los antibióticos (Cleveland y col., 2001).

2.7.6. Antioxidantes naturales

Los antioxidantes presentes en plantas, algas y hongos son excelentes aditivos naturales por su capacidad tanto para donar iones o hidrógeno como para romper cadenas y por ser quelantes de metales. Entre otras, las moléculas naturales más antioxidantes son las vitaminas, los polifenoles y los carotenoides; estos grupos además exhiben propiedades adicionales (Ferreira y col, 2009; Shahidi y col., 2010; Carocho y col., 2013).

Las principales vitaminas con potencial antioxidante, que ya se usan como aditivos alimentarios, son la vitamina C (ácido ascórbico) y la vitamina E (tocoferol) (Davey y col., 2000).

Por otro lado, los polifenoles son metabolitos secundarios de plantas que son

excelentes antioxidantes. Entre sus múltiples efectos (antimicrobiano, antimutagénico, anticarcinogénico, anti tumoral, anti-inflamatorio) ellos también eliminan radicales, quelan metales, neutralizan átomos de oxígeno y pueden actuar como donadores de hidrógeno). Se han descrito 8,000 polifenoles divididos en 8 grupos: ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinmicos, cumarinicos, lignanos, chalconas, flavonoides, ligninas y xantonas. Algunos polifenoles exhiben buena actividad antioxidante como componentes puros incorporados en los productos alimenticios, en tanto que otros dependen del sinergismo para llevar a cabo su efecto protector. Esto constituye una desventaja y al mismo tiempo una oportunidad para la industria. (Carocho y col., 2013).

Los carotenoides son otro grupo importante de componentes, definidos como pigmentos naturales (Hendry y col., 1996; Nguyen y col., 1998). Recientemente se les ha atribuido actividad antioxidante, lo que les da un valor agregado cuando son incorporados en los alimentos, ya que no presentan efectos toxicológicos, por lo que son excelentes aditivos naturales alimentarios (Osterlie y col., 2005).

Aunque los aditivos naturales son benéficos como antimicrobianos y antioxidantes, algunos de ellos presentan desventajas; en algunos casos la cantidad necesaria para causar la inhibición es más alta que la necesaria para aditivos sintéticos. Por otro lado, ciertos aditivos pueden añadir sabores a la comida, lo que puede ser una desventaja. Además, algunos fenoles pueden interactuar con proteínas, carbohidratos, minerales y vitaminas, los cuales pueden no producir su efecto benéfico o no ejercer las funciones deseadas en los alimentos, por lo que es necesario realizar mayores estudios a profundidad (Lule y col., 2005; Rasooli, 2007).

Capítulo III

MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1.1. Localización del experimento

La fase experimental se desarrolló en su mayoría en los laboratorios del departamento de ciencia y tecnología de alimentos, perteneciente a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro localizada en Buenavista, Saltillo, Coahuila. La parte de termoconformación del material se desarrolló en la planta piloto No. 1 del Centro de Investigación de Química Aplicada (CIQA), ubicado en Saltillo, Coahuila.

3.1.2. Materiales

Los materiales requeridos para el desarrollo de la presente investigación fueron proporcionados como sigue:

- Fracciones de aceite esencial de orégano (*L. berlandieri Schauer*) Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Polisuccinimida PAS térmico: Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*: Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Almidón y Glicerina: Departamento de Ciencia y tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

3.1.3. Etapa I. Obtención de material compuesto

3.1.3.1. Preparación de material: Polisuccinimida y almidón gelatinizado

La polisuccinimida se obtuvo de acuerdo con los lineamientos de la “polimerización verde”. Se vertió el ácido L-aspártico en un vaso de precipitado, mismo que fue colocado en un manta de calentamiento de manera que quedara cubierto hasta la parte media del mismo. Se llevó a calentamiento a una temperatura de 250°C y se mantuvo hasta que todo el sólido tomara un color bronceado o amarillo o bien por dos horas, lo que sucediera primero. Se debió mantener la agitación con una varilla de vidrio, para evitar zonas de sobre calentamiento. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, para su posterior lavado a través de un filtro a vacío con una solución saturada de NaHCO₃ (3:5 mL), agua (1:5 mL), solución acuosa de HCl al 1% (1:5 mL), y agua (1:5 mL). El sólido fue removido del filtro y colocado en una estufa de secado Novatech por al menos 30 minutos (Bennet, 2005).

La Figura 9 presenta el esquema de la polimerización térmica del ácido aspártico para formar polisuccinimida.

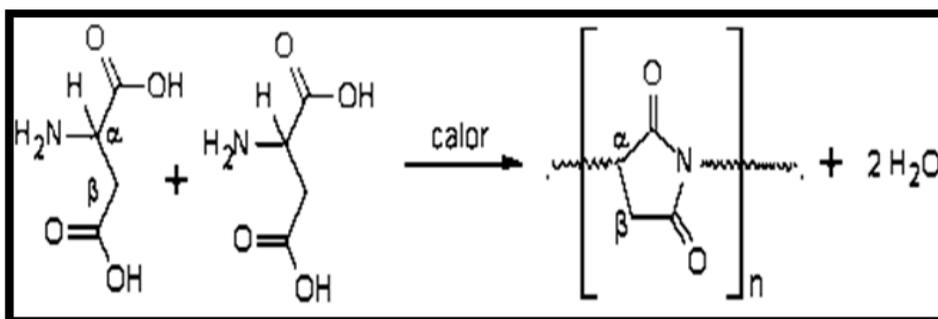


Figura 9. Reacción de policondensación térmica del ácido aspártico para formar polisuccinimida.

Para la preparación del almidón, se empleó almidón de papa grado reactivo CTR Scientific, el cual fue colocado en un vaso de precipitado y disuelto en agua caliente con agitación constante. Posteriormente se introdujo en una autoclave a una temperatura de 120°C durante 30 minutos a 15 psi de presión.

Una vez obtenidos los dos materiales base, se prosiguió con la integración y el acondicionamiento de los mismos. El almidón en estado líquido se colocó en una parrilla de calentamiento con agitación continua, se añadió posteriormente el glicerol y la polisucinimida, manteniendo las condiciones hasta obtener una mezcla homogénea. Las proporciones fueron: 50% almidón y 15% glicerol con respecto a la polisuccinimida.

Se retiró el exceso de humedad colocando el compuesto en una estufa de secado Novatech a 60°C.

3.1.3.2. Termoconformación

Para la termoconformación se probaron temperaturas de 110 a 140°C, a intervalos de 5°C. Se aplicaron presiones de 10, 15 y 20 toneladas con tiempos de contacto de 3 a 10 minutos, utilizando los moldes ilustrados en la Figura 10, en el equipo para termoconformación PHI que se ilustra en la Figura 11.

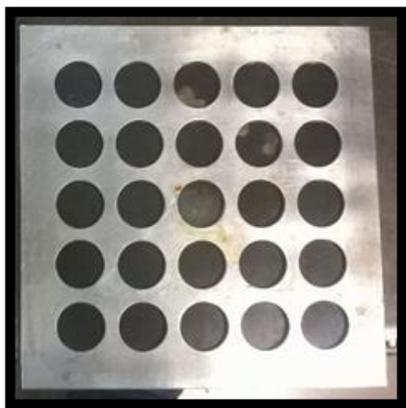


Figura 10. Moldes para termoconformado.



Figura 11. Termoconformadora.

3.1.3.3. Funcionalización del material compuesto

El material se funcionalizó con aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri* Schawer) obtenido mediante arrastre por vapores y fraccionado en una columna de fraccionamiento, caracterizado mediante cromatografía de gases, a través de lo cual se identificaron las muestras como completa y alta timol-carvacrol.

El proceso fue por absorción por contacto directo. Se pesó inicialmente el material en estado libre y se puso en contacto con una cantidad de aceite esencial, en relación 3% peso-peso, hasta su completa absorción.

3.1.4. Etapa II. Viabilización e identificación de las cepas bacterianas

Se trabajó con dos cepas bacterianas de gran impacto en la industria alimentaria: *Staphylococcus aureus*, como representante Gram positivo, y *Escherichia coli*, como representante Gram negativo.

- a) *Staphylococcus aureus*: se viabilizó por medio de pre-enriquecimiento en tubos de cultivo con caldo de soya tripticasa (TSB) BD Bioxon; se incubó en un horno de secado Novatech durante 36 h a temperatura de 37°C. Se prosiguió sembrando por estría cruzada en agar cerebro-corazón por triplicado y se incubaron por 24 h. a 37°C. Por último, se realizó la tinción de Gram para su análisis morfológico, observándose en el microscopio óptico Labomed cxL a 100x.

- b) *Escherichia coli*: también se viabilizó por medio de pre-enriquecimiento en tubos de cultivo TSB; seguido de una incubación por 36 h a 37°C. Posteriormente se sembró por estría cruzada en agar eosina azul de metileno BD Bioxon por triplicado, y se incubó a 37 °C durante 24 h después del tiempo cumplido se realizó el análisis morfológico también mediante la tinción de Gram, y se observó en el microscopio óptico a 100x.

3.1.5. Etapa III. Valoración de la eficiencia antimicrobiana y antioxidante

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

Se emplearon dos medios de enriquecimiento; el caldo TSB para *Staphylococcus aureus* y el caldo infusión cerebro corazón BD Bioxon para *Escherichia coli*; se colocó un inóculo de 0.1mL de una de las cepas en 4 mL de su respectivo caldo en tubos de ensaye, se realizó esta operación por triplicado, se incubaron a 37 °C el tiempo necesario para llegar a la absorbancia equivalente al tubo número 4 de la escala de Mcfarland, modificada por Rangel Ortega, S. en el (2007). La escala modificada de Mcfarland se presenta en la Tabla 1. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro Genesys 10 UV a 540 nm.

Tubo	ml de BaCl ₂ al 1%	ml de H ₂ SO ₄ al 1%	Bacterias/ml	Absorbancia a 540 nm
1	0.1	9.9	300,000,000	0.2115
2	0.2	9.8	600,000,000	0.3655
3	0.3	9.7	900,000,000	0.472
4	0.4	9.6	1,200,000,000	0.6815
5	0.5	9.5	1,500,000,000	0.8555
6	0.6	9.4	1,800,000,000	0.976
7	0.7	9.3	2,100,000,000	1.0615
8	0.8	9.2	2,400,000,000	1.1915
9	0.9	9.1	2,700,000,000	1.341
10	1.0	9.0	3,000,000,000	1.4611

Tabla 1. Absorbancia con respecto a la escala de McFarland (Rangel Ortega, 2007).

3.1.5.2. Valoración de la antimicrobiana

Se realizaron antibiogramas de acuerdo a la técnica normalizada de Kirby-Bauer (Bernal, 1984), para lo cual se prepararon placas de petri con los agares antes mencionados, mismas que fueron sembradas con una muestra del inóculo infeccioso previamente preparado. Posteriormente, se colocaron muestras tanto de polisuccinimida como del material compuesto polisuccinimida-almidón-glicerol impregnadas al 3% (p/p) con la muestra alta timol de aceite esencial del orégano. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h, al término de lo cual se procedió a realizar las lecturas.

Por otro lado, se realizaron cinéticas de crecimiento se prepararon tubos con medio de cultivo enriquecido para los cultivos en estudio y se añadieron muestras de los materiales a evaluar. A cada tubo se le adicionó 1 mL, (equivalente al 10% del volumen total de la muestra) del inóculo infeccioso previamente preparado, asegurándose de que el cultivo que se encontrara en la fase de crecimiento exponencial. Se monitoreó el crecimiento microbiano a intervalos de 2 h durante 24 h. Los datos fueron graficados, y analizados mediante ANOVA para, finalmente, calcular el efecto inhibitorio obtenido.

3.1.5.3. Valoración de la actividad antioxidante

La evaluación de la actividad antioxidante se llevó a cabo mediante la prueba del DPPH. Las muestras utilizadas fueron el material compuesto impregnado al 3% (p/p) con la fracción de aceite timol- carvacrol. El análisis se realizó durante 60 minutos tomando lectura cada 30 segundos, siguiendo la técnica OSU, FAPC: Food and Agricultural Products Center, 2008, como se muestra en el anexo 1.

Capítulo IV

RESULTADOS

4.1.1. Etapa I. Establecimiento de las condiciones de termoconformación

El material fue sometido a diversas condiciones para su termoconformación, los resultados de dichas interacciones se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Análisis de las diferentes condiciones de termoconformación.

Temperatura	Tiempo	Resultado Presion 10	Resultado Presion 15	Resultado Presion 20
110	3	Pastilla cruda	Pastilla cruda	Pastilla cruda
115		Pastilla cruda	Pastilla cruda	Pastilla cruda
120		Pastilla cruda	Pastilla cruda	Pastilla cruda
125		Pastilla cruda	Pastilla cruda	Pastilla cruda
130		Pastilla cruda	Pastilla cruda	Pastilla cruda
135		Pastilla cruda	Pastilla cruda	Pastilla cruda
140		Pastilla cruda	Pastilla cruda	Pastilla cruda
110		4	Pastilla cruda	Pastilla cruda
115	Pastilla cruda		Pastilla cruda	Pastilla cruda
120	Pastilla cruda		Pastilla cruda	Pastilla cruda
125	Pastilla cruda		Pastilla cruda	Pastilla cruda
130	Pastilla cruda		Pastilla cruda	Pastilla cruda
135	Pastilla cruda		Pastilla cruda	Pastilla cruda
140	Pastilla quebradiza		Pastilla quebradiza	Pastilla quebradiza
110	5		Pastilla cruda	Pastilla cruda
115		Pastilla cruda	Pastilla cruda	Pastilla cruda
120		Pastilla cruda	Pastilla cruda	Pastilla cruda
125		Pastilla quebradiza	Pastilla quebradiza	Pastilla quebradiza
130		Pastilla quebradiza	Pastilla quebradiza	Pastilla quebradiza

140		Pastilla quebradiza	Pastilla quebradiza	Pastilla quebradiza
110	9	Pastilla quebradiza	Pastilla quebradiza	Pastilla quebradiza
115		Pastilla quebradiza	Pastilla quebradiza	Pastilla quebradiza
120		Pastilla quebradiza	Pastilla quebradiza	Pastilla quebradiza
125		Pastilla quebradiza	Pastilla quebradiza	Pastilla quebradiza
130		Pastilla quebradiza	Pastilla quebradiza	Pastilla quebradiza
135		Pastilla quebradiza	Pastilla quebradiza	Pastilla firme
140		Pastilla quemada	Pastilla quemada	Pastilla quemada
110		10	Pastilla quebradiza	Pastilla quebradiza
115	Pastilla quebradiza		Pastilla quebradiza	Pastilla quebradiza
120	Pastilla quebradiza		Pastilla quebradiza	Pastilla quebradiza
125	Pastilla quebradiza		Pastilla quebradiza	Pastilla quebradiza
130	Pastilla quemada		Pastilla quemada	Pastilla quemada
135	Pastilla quemada		Pastilla quemada	Pastilla quemada
140	Pastilla quemada		Pastilla quemada	Pastilla quemada

Las condiciones establecidas para la compactación adecuada del material son: temperatura de 135 °C, presión de 20 toneladas y tiempo de 9 minutos.

Se obtuvo una pastilla plana, compacta, semi-porosa y uniforme. La Figura 12 muestra la imagen del material termoconformado.



Figura 12. Material termoconformado.

El material termoconformado fue adicionado con un extracto de aceite esencial del orégano, mismo que fue caracterizado mediante un cromatógrafo gases-masas, por Hernández-González, M, (2015) como parte complementaria del presente proyecto. El cromatograma para dicha fracción se presenta en la Figura 13.

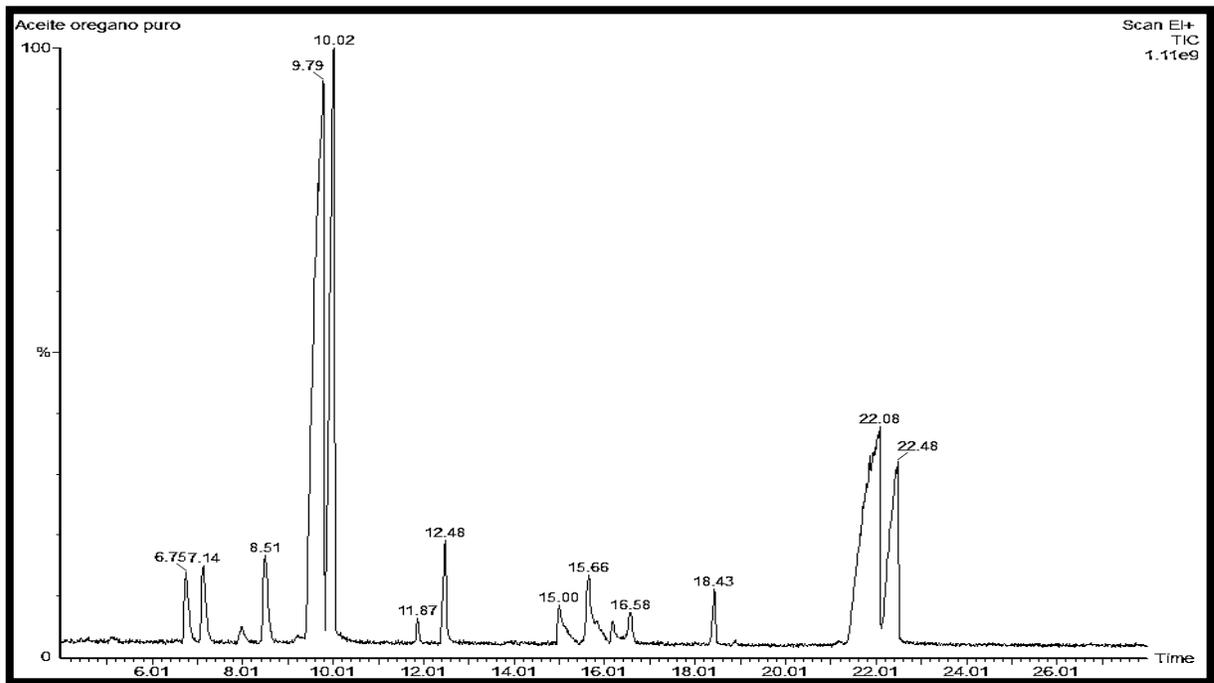


Figura 13. Cromatograma para la fracción de aceite esencial del orégano (Hernández-González, M., 2015).

Para llevar a cabo la evaluación cualitativa y cuantitativa del aceite, se revisó la pureza de cada uno de los picos de los cromatogramas y la comparación de

espectro de masas de los compuestos mayoritarios contra los espectros de la Biblioteca del National Institute of Standards and Technology (NIST02). Los compuestos mayoritarios se presentan en la Tabla 3 donde se destaca la presencia de p-cimeno, limoneno, timol y carvacrol, como agentes principales de la muestra evaluada.

Tabla 3. Porcentaje de los compuestos constituyentes del aceite esencial del orégano sinergista. (Hernández-González, M., 2015).

Compuesto	Tiempo de retención	Área	Área %
Cimeno	9.79	243260672	35.1
Limonene	10.02	128676240	18.5
Timol	22.08	155218752	22.4
Carvacrol	22.34	66454412	9.6

4.1.2. Etapa II. Viabilización e identificación de las cepas bacterianas

Las colonias de *Staphylococcus aureus* macroscópicamente se observaron colonias levemente lenticulares, lisas y de bordes definidos, crecimiento característico del microorganismo debido a la fermentación de manitol e hidrólisis de la gelatina esto coincide con lo reportado por (Elmer Koneman, 2008 citado por Sánchez-Ruiz, 2015), como se ilustra en la Figura 14. Tras la tinción de Gram presentaron microscópicamente ser cocos Gram positivos que poseen tendencia a agruparse en racimo o tétradas; como se observa tras ser enfocada en el microscopio óptico, en la Figura 15. Las características observadas son coincidentes con las reportadas por Cervantes y colaboradores (2014), Fernández Escartín (2008) y Seija (2008) citados por Sánchez-Ruiz, (2015).



Figura 14. Morfología macroscópica de *Staphylococcus aureus*.

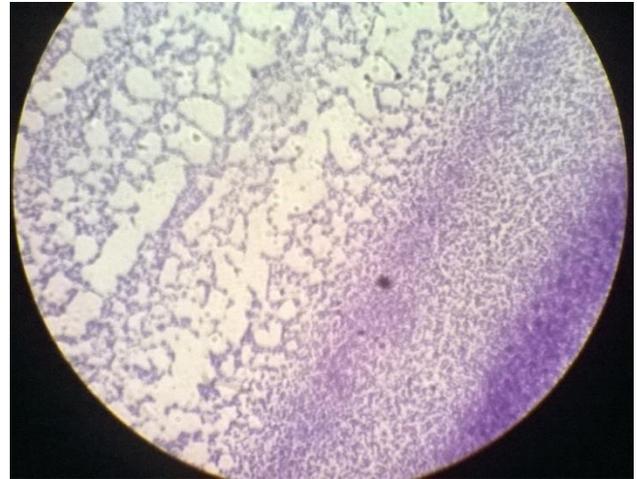


Figura 15. Morfología microscópica de *Staphylococcus aureus* observada a 1000.

La bacteria *Escherichia coli* presentó como morfología en términos macroscópicos, ser colonias convexas, de color verde metálico al ser cultivadas en agar EMB, debido a la rápida fermentación de la lactosa, con bordes lisos y continuos, esto coincide con lo reportado por (Elmer Koneman, 2008 citado por Sánchez-Ruiz, 2015), como se observa en la Figura 16. Microscópicamente tras la tinción de Gram, se observaron bacilos cortos Gram negativos, como se representan en las Figura 17. Las características morfológicas que se han descrito coinciden con las reportadas por Ramis Vergés, (1998), Ramírez Santos y colaboradores (2005) citados por Sánchez-Ruiz, (2015).

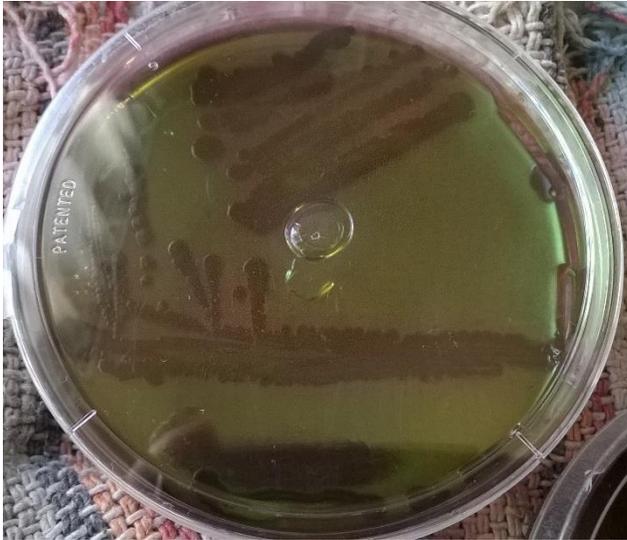


Figura 16. Morfología macroscópica de *Escherichia coli*.

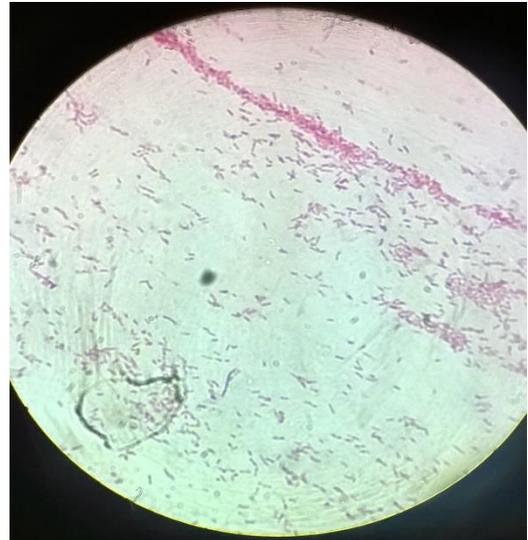


Figura 17. Morfología microscópica de *Escherichia coli* observada a 1000.

4.1.3. ETAPA III. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES DEL BIOMATERIAL COMPUESTO

4.1.3.1. CAPACIDAD ANTIMICROBIANA

4.1.3.1.1. ANTIBIOGRAMA

La Tabla 4 presenta las medias de los diámetros de los halos de inhibición en mm, analizados mediante un ANNOVA $p \leq 0.05$, para el material compuesto (PAG) en contra de *E. coli* y *S. aureus*, de donde es posible apreciar que no existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la eficiencia inhibitoria del material estudiado contra los dos patógenos alimentarios. En las Figuras 18 y 19 podemos observar el efecto inhibitorio del material funcionalizado con aceite esencial de orégano contra *E. coli* y *S. aureus* respectivamente. En cada una de las placas se puede apreciar tanto el efecto del material adicionado como sin adicionar. El material sin adicionar se aprecia un pequeño halo, para la muestra de *S. aureus*, Figura 19, que no es atribuido a inhibición sino más bien a un ligero desplazamiento del material sobre la placa, debido a la manipulación de la mismas.



Figura 18. Antibiograma del material funcionalizado vs *Escherichia coli*.



Figura 19. Antibiograma del material funcionalizado vs *Staphylococcus aureus*.

Tabla 4. Análisis de medias del diámetro de los halos de inhibición para el crecimiento de *E. Coli* y *S. aureus* ante PSI adicionada con aceite esencial de orégano.

Material microbio	Media de diámetro del Halo de inhibición mm
PAG <i>E. coli</i>	39.70 a
PAG <i>S. aureus</i>	40.00 a

*Niveles conectadas por la misma letra no presenta diferencias estadísticamente significativas.

Dicho comportamiento concuerda con los presentado por Ramos y col., (2012) en un estudio para la evaluación de la actividad antimicrobiana en muestras sintéticas de timol y carvacrol adicionadas en películas de polipropileno para empaques para alimentos, con la diferencia que en dicho estudio la concentración de los aditivos fue al 8% y en el presente es al 3%, concordando también en las dimensiones de los halos de inhibición presentados.

El efecto inhibitorio en el presente estudio puede ser atribuible a la presencia de exhibido en el presente estudio se debe a la presencia de los grupos hidroxilo de

los compuestos fenólicos (Dorman y col., 2000), presentes en el aceite esencial adicionado, como se puede constatar en el cromatograma exhibido en la Figura 13 (timol y carvacrol). Hay estudios que demuestran los efectos de estos componentes sobre *E. coli*, donde se ha observado una disminución en el potencial de membrana al exponer las células microbianas a algunos compuestos aromáticos como el eugenol y carvacrol (Enomoto y col., 1991). (Walsh y col., 2003) reportaron también estudios con timol, eugenol y triclocarbón (TCC) en el que los dos primeros agentes antimicrobianos presentaron efecto bactericida contra microorganismos Gram negativos (*E. coli*) y Gram positivos (*Staphylococcus aureus*), provocando daño en la membrana celular y salida de los componentes intracelulares.

4.1.3.1.2. Cinéticas de crecimiento microbiano

Eficiencia antimicrobiana ante *Staphylococcus aureus*

La evaluación de la eficiencia antimicrobiana se evaluó mediante el seguimiento del crecimiento microbiano; la Figura 20 muestra el comportamiento del crecimiento microbiano en U abs/ml como una función del tiempo.

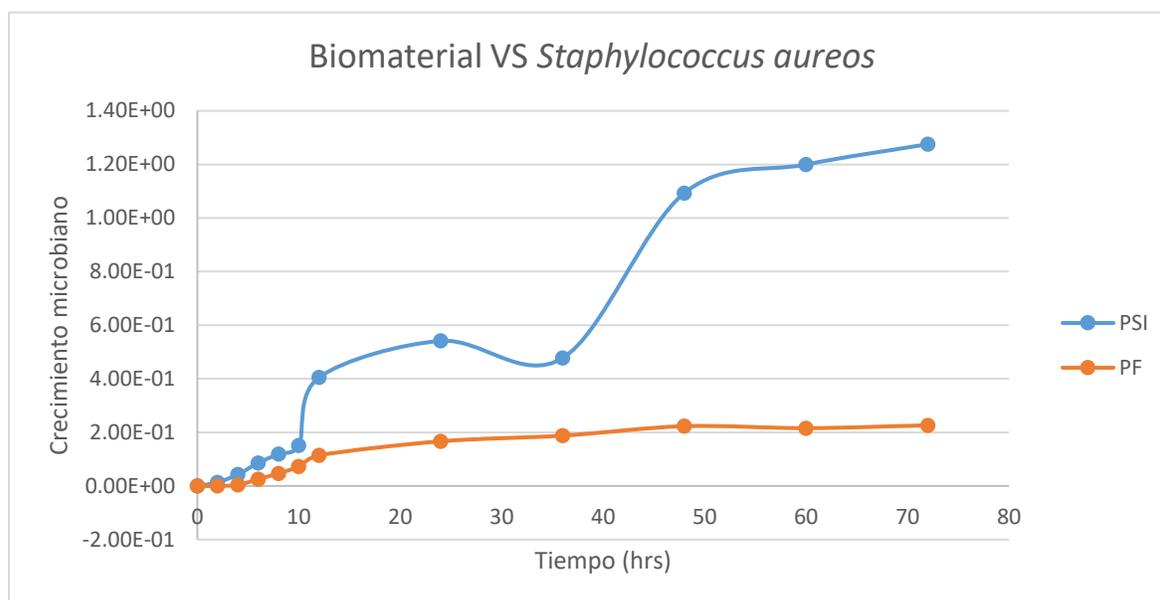


Figura 20. Cinética de crecimiento microbiano de *Staphylococcus aureus* en contacto con el material funcionalizado con aceite esencial de orégano (PF) y material sin funcionalizar (PSI).

Tanto de la Figura 20 como del anexo 2, es posible apreciar el incremento en la población de *Staphylococcus aureus* que se mantuvo en contacto con el material

sin funcionalizar (PSI), a partir de las 4 h del inicio del cultivo, donde se presentan diferencias estadísticamente significativas en cada uno de los intervalos de tiempo monitoreados con un crecimiento sostenido durante las primeras 24 h, para a las 36 h mantenerse los conteos en el mismo nivel de significancia. Durante este periodo se aprecia la típica curva de crecimiento microbiana (Stainer y col., 1992) que exhibe una fase de adaptación durante las primeras 4 h, posteriormente un crecimiento exponencial y finalmente una fase estacionaria que se hace evidente a las 24 h, y finalmente un decaimiento a las 36 h. Sobresale un segundo incremento en la carga microbiana a las 48 h.

Por otro lado la cinética de crecimiento microbiana, en el cultivo que se mantuvo en contacto con el material funcionalizado (PF) no presentó diferencias estadísticamente significativas durante las primeras 6 h de monitoreo, con un ligero incremento a partir de las 8 h, alcanzando los máximos niveles entre las 24 y 36 h; manteniéndose en los mismos niveles de significancia durante el resto del monitoreo del proceso, por lo que es posible aseverar que el material presenta actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*.

Eficiencia antimicrobiana ante *Escherichia coli*

De forma paralela, se realizó un monitoreo a la cinética de crecimiento microbiano de *Escherichia coli*, cuyo comportamiento se muestra en la Figura 21.

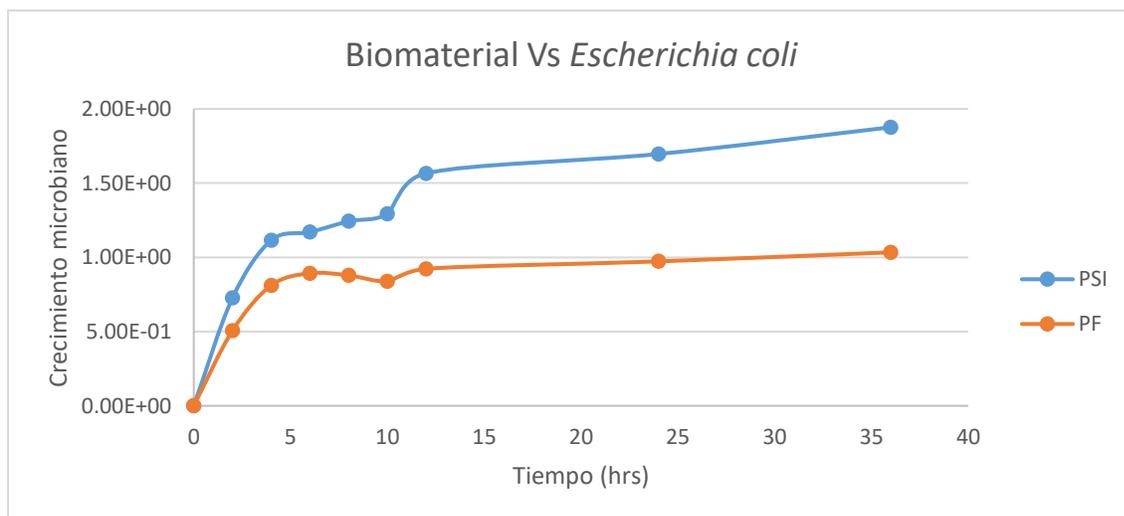


Figura 21. Cinética de crecimiento microbiano de *Escherichia coli* en contacto con el material funcionalizado con aceite esencial de orégano (PF) y material sin funcionalizar (PSI).

A partir tanto de dicha figura, como del apéndice 3, es posible apreciar como la muestra del material sin adición de extractos del aceite esencial del orégano presentó una curva de crecimiento microbiano exhibiendo las fases anteriormente descritas, destacándose que las diversas fases se observaron a intervalos más cortos que el microorganismo evaluado con anterioridad, lo cual se debe tanto a la característica propia del microorganismo, como al inóculo inicial que estuvo en los niveles más altos para los inóculos infecciosos (límite superior del tubo 4 en la escala de McFarland), lo que evidencia la importancia de contar con un inóculo inicial adecuado ya que esto garantiza que existirá efectividad de aditivo, para preservar el alimento y que este no cause daño al consumidor, aun en las máximas condiciones de infestación permitidas por los lineamientos $1 \cdot 10^7$, se considera un producto no apto. La cinética para el crecimiento del cultivo en contacto con el material funcionalizado presentó una fase de crecimiento exponencial a partir de las 2 h de contacto para iniciar con la estacionaria a las 6 h y mantenerse sin incrementos estadísticamente significativos hasta las 24 h con un repunte en el conteo, mismo que se mantiene a las 36 h siguientes.

4.1.3.2. Comparativo de la observación microscópica de las células de *Staphylococcus aureus* en microscopio electrónico de barrido (SEM) antes y después del contacto con el material funcionalizado

Las Figuras 22 y 23 muestran las micrografías de SEM para los cultivos de *Staphylococcus aureus* antes y después del contacto con el material funcionalizado con aceite esencial de orégano.

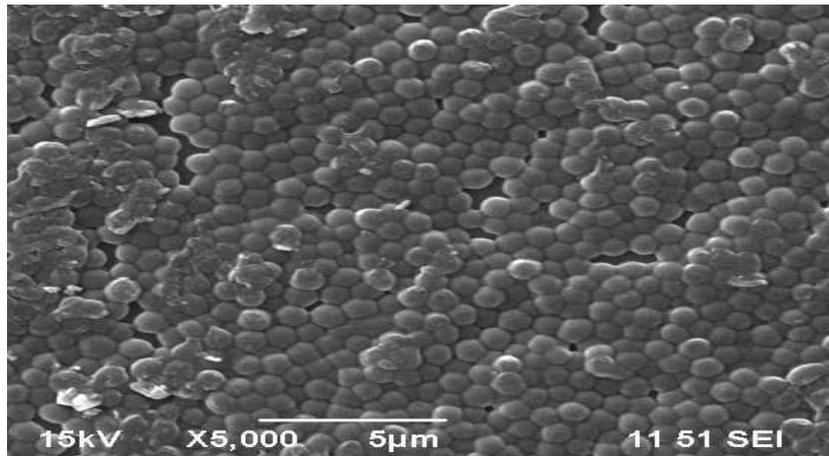


Figura 22. Micrografía de SEM para *S. aureus* antes del contacto con el material funcionalizado con aceite esencial de orégano.

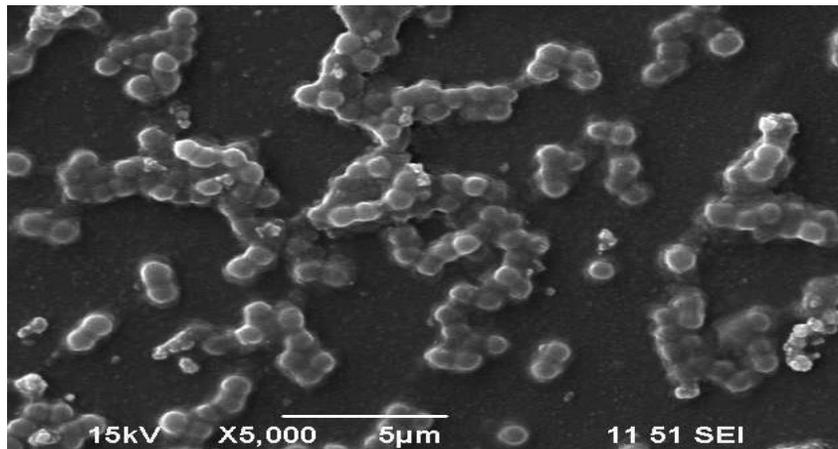


Figura 23. Micrografía de SEM para *S. aureus* en contacto con el material funcionalizado con aceite esencial de orégano.

En la Figura 22, se observan un campo homogéneo cubierto por células redondas, cocoides, con pared celular bien definida, con un diámetro de entre 0.5 y

1.0 μm , formando grupos irregulares de células, lo cual concuerda con la descripción de este género bacteriano (Stainer y col., 1992).

La Figura 23, por su parte, hace evidente un campo que presenta células escasas de forma cocoide asociados de manera irregular, evidenciando en algunos de ellos daños a nivel de pared celular, así como conglomerados, asociados a restos de material celular lisadas. Este daño ha sido reportado para describir el mecanismo de acción de los componentes activos del aceite esencial del orégano que indican que el daño celular se debió a la desintegración de la membrana del microorganismo, permitiendo la salida del material celular al medio externo (Rojas-Graü y col., 2007).

Por lo tanto, el efecto observado en los halos de inhibición obtenidos en los antibiogramas y el sensible decremento en las cinéticas de crecimiento microbiano, fue debido a este mecanismo, característico para los componentes del aceite esencial del orégano, que mantienen su eficiencia al ser incorporado en la polisuccinimida como vehículo de transporte.

4.1.3.3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La capacidad antioxidante tanto de aditivo en estado libre, como del material funcionalizado fue evaluada mediante la capacidad que tienen estos productos para secuestrar radicales libres, la Figura 24 presenta el comportamiento antioxidante tanto del aceite en su estado libre, como del material funcionalizado al 3% w/w con extractos de aceite esencial.

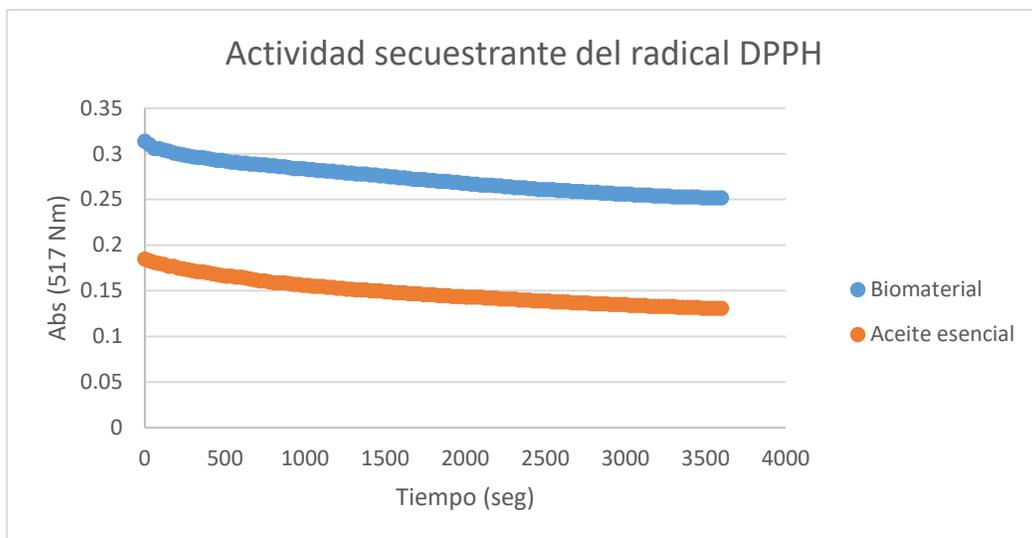


Figura 24. Grafica de absorción del DPPH por el aceite esencial y el biomaterial funcionalizado con aceite esencial de orégano.

A partir de los datos obtenidos se calculó el porcentaje de la capacidad antioxidante DPPH para cada uno de los compuestos analizados, la figura 24 muestra este comparativo.

De la Figura 25 se aprecia que tanto el aceite esencial del orégano en estado libre, como el material funcionalizado, presentaron capacidad antioxidante del 68.50% y 40.00% respectivamente.

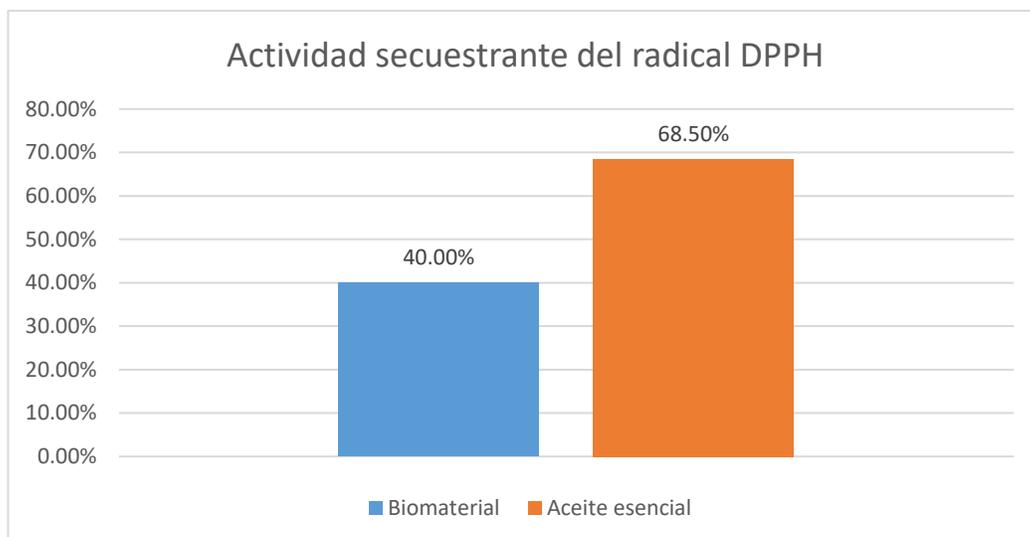


Figura 25. Porcentaje de actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri schauer*).

Vargas-Negrete, (2009) reportó que la fracción alta timol del aceite esencial del orégano es la que presenta la mayor capacidad inhibitoria del radical DPPH, con 53.17%; dicho dato, aunque ligeramente inferior, es similar al obtenido en el presente estudio. Adicionalmente se evaluó al antioxidante comercial BHT, el cual evidenció un 45.11%, este dato se encuentra próximo al presentado por el aditivo después de su incorporación en la matriz polimérica (40.00%), lo que la torna prometedora debido a que el nivel de capacidad antioxidante es equiparable a la manifestada por uno de los antioxidantes comerciales más comúnmente empleados por la industria alimentaria.

Capítulo V

Conclusiones

La polisuccinimida se incorpora adecuadamente con el almidón mediante el proceso de termoconformación, que es llevado a cabo a una temperatura de 135 °C, a 20 toneladas de presión durante 9 min.

El biomaterial compuesto polisuccinimida-almidón puede ser funcionalizado exitosamente mediante absorción por contacto directo con extractos de aceite esencial del orégano.

La polisuccinimida funcionalizada con extractos de aceite esencial del orégano presenta capacidad secuestrante del radical DPPH del 40.00%, que es equiparable a la eficiencia antioxidante del TBHQ, que es uno de los aditivos sintéticos comerciales más ampliamente usados por la industria alimentaria.

El biomaterial compuesto PSI-Almidón funcionalizado causa un efecto antimicrobiano significativo, ya que se obtienen medidas en los halos de inhibición de 4.0 cm de diámetro para *S. aureus* y de 3.97 cm para *E. coli*.

La concentración del 3% w/w es adecuada para lograr los efectos antimicrobianos y antioxidantes descritos.

La capacidad antimicrobiana del biomaterial funcionalizado se debe exclusivamente a la incorporación del extracto del aceite esencial añadido, ya que el biomaterial compuesto por sí solo no presentó ningún tipo de daño sobre las células microbianas, a diferencia de las que fueron expuestas en contacto con el material funcionalizado, las cuales evidenciaron daños a nivel de membrana celular en las micrografías obtenidas.

Capítulo VI

Bibliografía

- Al-Bandak, G., & Oreopoulou, V. (2007). Antioxidant properties and composition of Majorana syriaca extracts. *Eur Journal lipid Sci technol*, 109, 55-247.
- Albani, O., Ternouski, C., Ruiz, E., & Stampella, R. (2001). Estudio de la degradación de envases de hojalata recubierta empleando espectroscopía de impedancia electroquímica. *SAM-CONAMET-AAS*, 649-658.
- Arcila Lozano, C., Loarca-Piña, G., Lecona-Urbe, S., & González de Mejía, E. (2004). El orégano; propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. PROPAC. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Dpto. de Ciencias de Alimentos y Nutrición Humana, University og Illinois, Urbona-Champaign.
- Askeland, D., & Phulé, P. (1998). *Ciencia e ingeniería de los materiales* . International Thomson Editores .
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils a revies. *Food and Chemical Toxicology* , 446-475.
- Bello-Perez, L., Paredes-López, O., Roger, P., & Colonna, P. (1996). Amylopectin properties and fine structure. *Food Chemistry*, 171-176.
- Bennet, G. (2005). A green polymerization of aspartic acid for the undergraduate organic laboratory. *Journal of chemical education*, 82.
- Branen, A. L., Davidson, P. M., Salminen, S., & Thorngate, J. (2001). *Food Additives* . New York : Taylor & Francis .
- Carocho, M., & Ferreira, I. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chemical Toxicology*, 15-25.
- Carocho, M; Ferreira, I.C.F.R. (2013). The role of phenolics compounds in the fight against cancer a review. *Anticancer agents med. chem.*, 58-1236.
- Cedillos, J., & Menjivar, J. (2013). Identificación del polímero presente en envases tetrapack de jugos y néctares provenientes de supermercados de metrocentro San Salvador y sus alrededores. *Tesis de licenciatura*, 34-35.
- Chi, S., Zivanovic, S., & Penfield, M. (2006). Application of chitosan films enriched with oregano essential oild on Bologna-Active compounds and sensory attributes . *Food Sci. Technol. Int.*, 111-117.

- Cleveland, J., Montville, T., Nes, I., & Chikindas, M. (2001). Bacteriocins: safe natural antimicrobials for food preservation. *International Journal Food Microbiology*, 1-20.
- Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Delegación Cataluña. (s.f.). Obtenido de Seres Modélicos: <http://seresmodelicos.csic.es/galeria/bacteri.html>
- Davey, M., Montagu, M., Inz' e, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., . . . Fletcher, J. (2000). Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing . *Journal Sci food agric*, 60-825.
- Del Pino, G. (2001). Tendencias tecnológicas en el sector agroalimentario . *Economía industrial* , 39-46.
- Demuner-Carreón, M., & Verdalet-Guzmán, I. (2004). Envases, empaques y embalajes alimentarios. *La ciencia y el hombre*, 17-22.
- Desrosier, N. (1991). *Elementos de tecnología de los alimentos*. Editado por Norman W. Desrosier .
- Dianelli, D., Gontard, N., Spyropoulos, D., Zondervan-van den Beuken, E., & Tobback, P. (2008). Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *trends in food science & technology*, 103-112.
- Díaz Cortés, N. (2007). *Tesis. Aplicación del aceite esencial de orégano (Lippia berlandieri schauer)*. Saltillo, Coahuila .
- Dole, p., Joly, C., Espuche, E., Alric, I., & Gontard, N. (2004). Gas transport propeties of starch based films. *Carbohydr polym*, 58, 335-343.
- Dorman, H., & Deans, S. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils . *Journal of applied microbiology*, 308-316.
- Enomoto, S., Kashiwayanagi, M., & Kurihara, K. (1991). Liosomes having high sensibility to odorants . *Biochimicaetbiophysycaacta*, 7-12.
- Erkan, T. (2010). Food Additives/ Gidalardaki katki maddeleri. *Turkish Pediatrics Archive* , 315-319.
- Fausto, T. (2006). Técnicas Tradicionales en el Análisis Microbiológico de los Alimentos.
- Fernández, M. (2000). Review: Active Food Packing . *Food science and technology international*, 97-108.
- Ferreira, I., Barros, L., & Abreu, R. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Curr. Med. Chem*, 60-1543.

- French, D. (1984). Organization of starch granules. *Starch: Chemistry and technology*, 183-247.
- Gomez-Estaca, J., De Lacey, A., Gomez-Guillien, M.C, Lopez-Caballero, M.E, & Montero, P. (2009). Antimicrobial activity of composite edible films based on fish gelatin and chitosan incorporated with clove essential oil. *J. Aquat. Food Prod. Tech*, 18, 46-52.
- Granda-Restrepo, D. M., Soto-Valdez, H., Peralta, E., Troncoso-Rojas, R., Vallejo-Córdoba, B., Gámez-Meza, N., & Graciano-Verdugo, A. Z. (2009). Migration of alpha-tocopherol from an active multilayer film into whole milk powder. *Food Research International*, 42, 1396-1402.
- Grob, K., Pfenninger, S., Pohl, W., Laso, M., Imhof, D., & Rieger, K. (2007). European legal limits for migration from food packaging materials: 1. Food should prevail over simulants; 2. More realistic conversion from concentrations to limits per surface area. PVC cling films in contact with cheese as an example. *Food Control*, 18, 201-210.
- Grondahl, M., Gustafsson, A., & Gatenholm, P. (2006). Gas-phase surface fluorination of arabinoxylan films. *Macromolecules*, 39, 2718-2721.
- Heising, J., Dekker, M., & Bartels, P. &. (2014). Monitoring the quality of perishable food: opportunities packaging. *Critical reviews in food science and nutrition*., 645-654.
- Helander, I., Alakomi, H., Latva Kala, K., Mattila Sandholm, T., Pol, I., Smid, E., & Von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 3590-3595.
- Hendry, G., & Houghton, J. (1996). *Natural food colorants*. London, UK: Blackie & Professional .
- Hernández-González, M. (2015). *Reporte de avance de tesis III caracterización de materiales para su elegibilidad en el desarrollo de un envase activo para la conservación alimentaria*. Ciudad Juárez, Chihuahua.
- Hernández-González, M. (2016). Reporte de avance de proyecto de tesis V Caracterización de materiales para su elegibilidad en el desarrollo de un envase activo para la conservación alimentaria.
- Hu, C. Y., Chen, M., & Wang, Z. W. (2012). Release of thymol, cinnamaldehyde and vanillin from soy protein isolate films into olive oil. *Packaging technology and science*, 25, 96-107.

- Huang, Z. Q., Lu, J., Li, X. H., & Tong, Z. (2007). Effect of mechanical activation on physico-chemical properties and structure of cassava starch. *Carbohydrate polymers*, 128-135.
- Hui, Y., Guerrero, I., & Rosmini, M. (2006). *Ciencia y Tecnología de Carnes*. México: LIMUSA.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & A., G. D. (2009). Carnes Frescas. En *Microbiología moderna de los alimentos* (págs. 59-63). New York: ACRIBIA.
- Jobling, S. (2004). Improving starch for food and industrial applications . *Curr. Opin. Plant biol.*, 210-218.
- Juven, B., Kanner, J., Schved, F., & Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents . *Journal of Applied Bacteriologia* , 516-522.
- Kerry, J., O`Grady, M., & Hogan, S. (2011). Utilización actual, pasada y futura de sistemas de empaque activo para carne y productos a base de músculos. *Mundo Lácteo y cárnico* , 9-16.
- Lambert, R., Skandamis, P., Coote, P., & Nychas, G. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* , 453-462.
- Laurichesse, S., & Averous, L. (2013;2014). Chemical modification of lignings: Towards biobases of polymers. *Progress in polymer science*, 39, 1266-1290.
- Licciardello, F., Muratore, G., Mercea, P., Tosa, V., & Nerin, C. (2012). Diffusional behaviour of essential oil components in active packaging polypropylene films by multiple headspace solid phase microextraction-gas chromatography. *Packaging Technology and Science* , 26, 173-185.
- López de Dicastillo, C., Bustos, F., Guarda, A., & Galotto, J. (2016). Cross-linked methyl cellulose films with murta fruit extract antioxidant and antimicrobial active food packaging. *Food Hydrocolloids*, 60, 335-344.
- Lule, S., & Xia, W. (2005). Food phenolics, pros and cons: a review. *Food Rev. Intl.*, 88-367.
- Marcos-Mutual, B. (2011). Tecnologías de conservación emergentes de productos cárnicos . *Mundo Lácteo y Cárnico* , 24-31.
- Mari, E. (2011). *Los materiales cerámicos: aplicaciones estructurales, funcionales y artísticas* (Primera ed.). Buenos Aires: Librería y editorial Alsina.
- Miravete, J. (2004). *Materiales compuestos*. Barcelona, España: Editorial Reverté S.A.

- Morales Ángeles, G. (2005). *Tesis. Aplicación del aceite esencial de orégano (Lippia berlandieri schauer) en la conservación de carne de res.* Saltillo, Coahuila .
- Moura, M., Maltoso, L., & Zucolloto, V. (2012). Development of cellulose-based bacterial nanocomposites containing silver nanoparticles and their use as active food packaging. *Journal of food engineering*, 109, 520-524.
- Murcia, M., Jiménez, A., & Martínez-Tomé, M. (2009). Vegetables antioxidants losses during industrial processing and refrigerated storage. *Food Research international*, 1046-1052.
- Narayan, P. (2006). Biobased and biodegradable polymer materials: rationale, drivers and technology exemplars in Khemani K and Scholz C (Eds), *degradable polymers and materials: Principles and practice*, ASC symposium . *American Chemical Society*, 282-306.
- Nguyen, M., & Schwartz, S. (1998). Lycopene stability during food processing . *Exp. Biol. Med*, 5-101.
- Norrung, B., & Buncic, S. (2008). Microbial safety of meat in the Euroepan Union. *Meat Science*, 14-24.
- Organización Mundial de la Salud. (21 de 10 de 2014). *Enterohaemorrhagic Escherichia coli*. Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>
- Osswald, T., & Hernández-Ortiz, J. (2006). Polymer processing. *Polymer processing*.
- Osterlie, M., & Lerfall, J. (2005). Lycopene from tomato products added to minced meat: effect on storage quality and colour . *Food Res. Intl.*, 9-925.
- Ouattara, B., Simard, R. E., Piette, G., Bégin, A., & Holley, R. A. (2000). inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by aplication of antimicrobial films prepared with chitosan. *Int. J. Food Microbiol*, 62, 139-148.
- Ouattara, B., Simard, R., Holley, R., Piette, G., & Begin, A. (1997). Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *Int. J. Food Microbiology*, 155-162.
- Park, S. H., Lee, H. S., Choi, J. H., Jeong, C. M., Sung, M. H., & Park, H. J. (2012). *Journal Appl Polym Science*, 125, 675-680.
- Parlamento Europeo, y. d. (2004). Reglamento (CE) sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con los alimentos.
- Peltzer, M. A., Wagner, J., & Jimenez, A. (2009). Migration study of carvacrol as natural antioxidant in HDPE for active packaging. *Food Additives and Contaminants*, 26, 938-946.

- Pezo, D., Salafranca, J., & Nerín, C. (2007). Development of an automatic multiple dynamic hollow fibre liquid-phase microextraction procedure for specific migration analysis of new active food packagings containing essential oils . *Journal of Chromatography A*, 85-94.
- Porras, M., Madrigal, S., & Baudrit, J. V. (2012). Síntesis de nanopartículas poliméricas de quitosano funcionalizadas con extractos de la mora (*Rubrus glaucos*) y su evaluación preliminar como agentes antimicrobianos . *Revista científica de la facultad de ciencias químicas y farmacia* , 81-91.
- Portillo-Ruiz, M., Viramontes-Ramos, S., Gastélum-Franco, M., Muñoz-Catellanos, L., Torres-Muñoz, J., & Nevárez-Morillón, G. (2008). Efecto antifúngico de aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia berlandieri schauer*) sobre hongos contaminantes en productos de panadería. *Respyn edición especial*.
- Puig de la Bellasca, J. (2009). Envasados, residuos y medio ambiente. *Distribución y consumo*.
- Quintavalla, S., & Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry . *Meat Science* , 373-380.
- Ramis Vergés, M. (1998). *Escherichia coli* patógeno intestinal. En *Microorganismos de los alimentos* (págs. 147-164). Zaragoza, España: ACRIBIA.
- Ramos, M., Jiménez, A., Peltzer, M., & Garrigós, M. C. (2014). Development of novel nanobiocomposite antioxidant films based on poly (lactic acid) and thymol for active packaging. *Food Chemistry*, 162, 149-155.
- Ramos, M; Jiménez, A; Peltzer, M; Garrigós, M.C. (2012). Caracterización and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. *Journal of food engineering*, 513-519.
- Rangel Ortega, S. d. (2007). *Tesis. Aplicación del aceite esencial de orégano (Lippia berlandieri schauer) como antimicrobiano contra patógenos anaerobios alimentarios*. Saltillo.
- Rasooli, I. (2007). Food preservation - a biopreservative approach . *Food Rev. Intl*, 36-110.
- Rojas-Graü, M., Avena-Bustillos, R., Olsen, C., Friedman, M., Henika, P., Martín-Belloso, O., & McHugh, T. (2007). Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical barrier and antimicrobial properties of alginate apple pure edible films. *Journal Food Engineering* , 634-641.
- Salas Valerio, W. F. (21 de 10 de 2014). *Deterioro e índice de deterioro*. Obtenido de tarwi.lamolina.edu.pe/~fwsalas/CAP-03..rtf

- Sánchez-Ruiz, H. (2015). *Tesis. Evaluación del efecto antimicrobiano de la polisuccinimida funcionalizada con extractos del aceite esencial de orégano (Lippia berlandieri schauer)*. Saltillo, Coahuila .
- Scholz, C., & Khemani, K. (2006). Introduction in Khemani K and Scholz E (Eds), Degradable polymers and materials: principles and practice, ASC symposium. *American Chemical Society*, 2-11.
- Shahidi, F., & Zhong, T. (2010). Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion . *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, 90-930.
- Soto-Valdez, H., Auras, R., & Peralta, E. (2011). Fabrication of poly (lactic acid) films with resveratrol and the diffusion of resveratrol into ethanol. *Journal of Applied Polymer Science*, 121, 970-978.
- Stainer, R., Ingraham, J., Wheelis, M., & Painter, P. (1992). *Microbiología* . Barcelona, España: Editorial Reverté S.A.
- Staphylococcus aureus*. (3 de Agosto de 2011). Obtenido de <http://microbitos.wordpress.com/2011/08/03/staphylococcus/>
- Suppakul, P., Miltz, J., Sommeveld, K., & Bigger, S. (2003). Active packaging technologies with an emphasis antimicrobial packaging and its applications. *Journal of Food science*, 408-420.
- Thombre, S., & Sarwade, B. (2005). Synthesis and biodegradability of polyaspartic acid: A critical review . *Journal of macromolecular science, part A*, 1299-1315.
- Torma, V., Gyenes, T., Szakács, Z., Noszál, B., Némethy, A., & Zrínyi, M. (2007). Novel amino acid-based polymers for pharmaceutical applications. *Polymer Bulletin Springer-Verlag*, 59, 311-317.
- Tudorachi, N., Chiriac, A. P., & Lipsa, R. (2011). Biodegradable polymers with succinimide and lactic units. *Polymery*, 56, 204-2010.
- Ultee, A., & Smid, E. (2001). Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus* . *International J. Food Microbiol*, 8-373.
- Ultee, A; Bennik, M; Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiology*, 1-20.
- Vargas-Negrete, M. (2009). *Tesis Determinación de la capacidad antioxidante del aceite esencia de orégano (Lippia berlandieri Schauer) sobre aceites comestibles* . Saltillo, Coahuila .
- Vincent, M., Álvarez, S., & Zaragoza, J. (2006). *Ciencia y tecnología de polímeros*. Universidad Politécnicna de Valencia, España .

- Walsh, S., Maillard, J., Russell, A., Catrenich, C., Charbonneaus, D., & Bartolo, R. (2003). Activity and mechanisms of action selected biocidal agents on Gram positive and negative bacteria . *Journal of applied microbiology*, 240-247.
- Weber, C. (2000). Biobased packaging materials for the food industry status and perspectives. *a European concerted action*. KVL.
- Xia, W., Liu, P., Zhang, J., & Chen, J. (2011). Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids*, 25, 9-170.
- Xu, J., Zhou, F., Ji, B., Pei, R., & Xu, N. (2008). The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol*, 9-174.
- Yingyuad, S., Ruamsin, S., Reekprkhon, D., Douglas, S., Pongamphai, S., & Siripatrawan, U. (2006). Effect of chitosan coating and vacuum packaging on the quality of refrigerated grilled pork. *Packag. Technol. Sci.*, 19, 149-157.
- Zegarra Urquia, C. L. (2012). Síntesis de un nuevo vehículo polimérico alfa, beta-poli(DL-ácido aspártico) oxovanadio (IV). *Tesis maestría Pontificia Universidad Católica del Perú*.
- Zhao, J., & Whistler, R. (1994). Spherical aggregates of starch granules as flavor carriers. *Food technology*, 104-105.
- Zhu, X., Schaich, K., Chen, X., & Yam, K. (2013). Antioxidant effects of sesamol released from polymeric films on lipid oxidation in linoleic and acid and oat cereal . *Packaging Technologies* .

Capítulo VII

Apéndices

7.1.1. Apéndice 1. Metodología para la determinación de antioxidantes por el método: capacidad secuestraste del radical estable DPPH siguiendo la técnica OSU, FAPC: Food and Agricultural Products Center, 2008.

1. Preparar una solución estándar disolviendo 50 mg de DPPH en 100 ml de metanol (0.50 mg/ml). Diluir esta concentración mezclando 0.5 ml de la solución estándar en 9.5 ml de metanol, haciendo la concentración 0.025 mg/ml (6×10^{-5} M de DPPH o 60 μ M: fórmula peso del DPPH es 394).
2. Igualmente disolver 0.25 ml, 0.75 ml y 1 ml de la solución estándar en 9.75 ml, 9.25 ml y 9 ml de metanol, teniendo así 30 μ M, 90 μ M y 120 μ M de DPPH.
3. Agregar 2 ml de cada una de las diferentes concentraciones preparadas del DPPH en la celdilla y lea absorbancia para obtener la curva de calibración.
4. Mezclar 240 mg de aceite de orégano en un matraz de aforación de 10 ml y complete hasta la marca con metanol. Ahora diluya 1 ml de la solución estándar con 9 ml de metanol haciendo la concentración 2.4 mg/ml (equivaliendo 2.4 g/L).
5. Añadir 2 ml de la concentración de 60 μ M de DPPH, 50 μ L de la solución de orégano y lea absorbancia a 517 Nm durante 60 min cada 30 segundos.
6. Igualmente preparar para 30 μ M, 60 μ M, 90 μ M y 120 μ M la concentración de BHT, o BHA. (para la fórmula del BHT es 220 mg y BHA es 180 mg, disuelva 130 mg/10 ml de BHT y 108 mg/10 ml de BHA en metanol: diluir dos veces 0.5 ml, 1 ml, 1.5 ml y 2 ml de la solución estándar en un matraz de aforación de 10 ml y complete con metanol).
7. Preparar un poco más de la concentración en caso de ser necesario.
8. Seguir el mismo paso mencionado en el punto 5.
9. Calcular el % de DPPH en estado estable con BHT Y BHA utilizando la curva de calibración del DPPH.
10. Calcular EC_{50} que es la concentración de antioxidante.
11. En caso del aceite de orégano siga la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = ((A_{C(o)} - A_{A(t)}) / A_{C(o)}) \times 100$$

Donde: $A_{C(o)}$ = absorbancia control (DPPH + sin antioxidante) al $t = 0$

$$A_{A(t)} = \text{absorbancia de la muestra } t = 60 \text{ min}$$

7.1.2. Apéndice 2. Análisis de varianza para el crecimiento microbiano de *S. aureus*.

Level	Least Sq Mean
PSI,72 A	1.275333
PSI,60 B	1.199667
PSI,48 C	1.093000
PSI,24 D	0.541333
PSI,36 E	0.477000
PSI,12 F	0.405000
PF,72 G	0.226333
PF,48 G	0.223000
PF,60 G	0.215667
PF,36 G H	0.187667
PF,24 H	0.166667
PSI,10 H I	0.150667
PSI,8 I J	0.119000
PF,12 I J	0.114333
PSI,6 J K	0.086000
PF,10 K L	0.072333
PF,8 K L M	0.046667
PSI,4 L M N	0.043000
PF,6 M N O	0.025333
PSI,2 M N O	0.013333
PF,4 N O	0.004000
PSI,0 O	5.5511e-17
PF,2 O	-2.776e-17
PF,0 O	-1.388e-16

Levels not connected by same letter are significantly different.

7.1.3. Apéndice 3. Análisis de varianza para el crecimiento microbiano de *E. coli*

Level	Least Sq Mean
PSI,36 A	1.8760000
PSI,24 B	1.6960000
PSI,12 C	1.5660000
PSI,10 D	1.2933333
PSI,8 D	1.2426667
PSI,6 E	1.1700000
PSI,4 E	1.1143333
PF,36 F	1.0336667
PF,24 F G	0.9726667
PF,12 G H	0.9230000
PF,6 H I	0.8926667
PF,8 H I	0.8790000
PF,10 I J	0.8393333
PF,4 J	0.8110000
PSI,2 K	0.7263333
PF,2 L	0.5063333
PF,0 M	1.6653e-16
PSI,0 M	5.5511e-17

Levels not connected by same letter are significantly different.