

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



Evaluación de las propiedades antimicrobianas de biocompositos a diferentes grados de hidrofiliidad funcionalizados con Aceite esencial de orégano.

POR

ASTRID CARBAJAL HERRERA

T E S I S

Presentada como requisito parcial para obtener el título profesional de

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre de 2023

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

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Evaluación de las propiedades antimicrobianas de biocompositos a diferentes
grados de hidrofiliidad funcionalizados con Aceite esencial de orégano.**

T E S I S

Presentada por

ASTRID CARBAJAL HERRERA

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

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

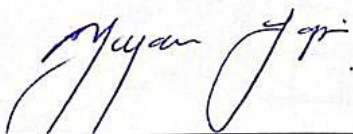
APROBADA



Dra. María Hernández González
Presidente



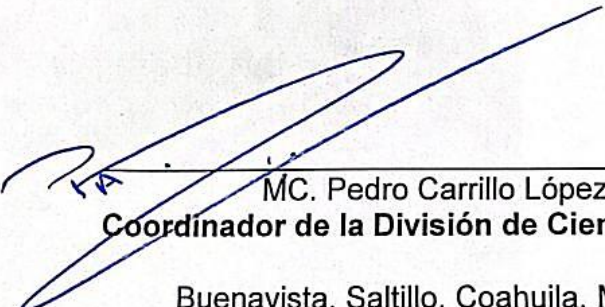
Dra. Ana Margarita Rodríguez Hernández
Vocal



M.C. Haydeé Yajaira López De la Peña
Vocal



Dra. Francisco Hernández Centeno
Vocal suplente



MC. Pedro Carrillo López
Coordinador de la División de Ciencia Animal

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre de 2023

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

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Evaluación de las propiedades antimicrobianas de biocompositos a diferentes
grados de hidrofiliidad funcionalizados con Aceite esencial de orégano.**

T E S I S

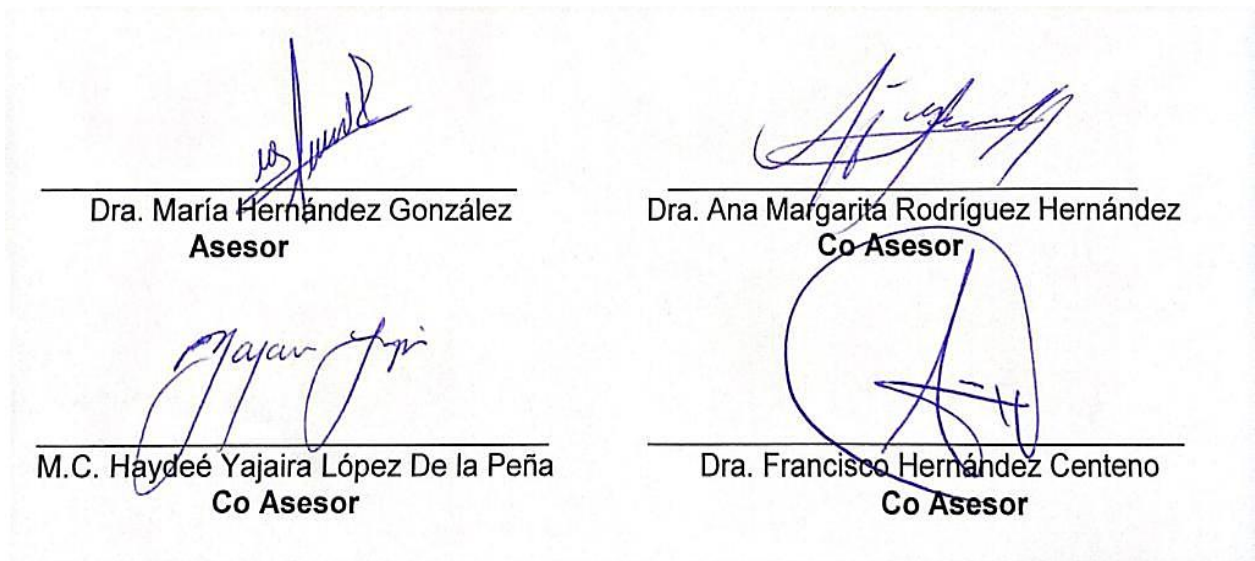
Presentada por

ASTRID CARBAJAL HERRERA.

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

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Fue dirigida por el siguiente comité:



Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre de 2023

DEDICATORIAS

Con este proyecto de investigación concluyo mi etapa de estudios de licenciatura, la cual ha tenido altibajos, pero cada momento me ha dejado una grata experiencia y aprendizaje. A lo largo de mi camino como estudiante de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro ha habido personas dentro de mi núcleo familiar las cuales me han brindado su apoyo incondicional en mi trayecto de la licenciatura. Pero sobre todo, es de reconocerse el gran apoyo de mis padres.

El presente proyecto de investigación esta dedicado a mis padres Saúl Carbajal Zavala y Ma. Luisa Herrera Rodríguez que me han apoyado en todos los sentidos en toda mi vida, me han motivado a seguir desarrollando mi potencial y me han hecho creer en mí, sin ellos no hubiera sido posible esto, quedan cortas las palabras para expresar todo el agradecimiento que siento en este momento de mi vida. Pero solo diré gracias por darme la libertad de tomar mi camino y no dejarme sola, por creer y confiar en mí, por su sacrificio para poder yo estar aquí, por guiarme por un buen camino, por hacerme sentir que están siempre orgullosos de mí y yo lo estoy de ustedes, son mi motor cada día y no me cansare de decir que mejores padres no pude haber tenido.

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, quiero agradecer a Dios por permitirme llegar hasta esta etapa de mi vida con su bendición.

A mis padres Saúl Carbajal Zavala y Ma. Luisa Herrera Rodríguez por guiarme y apoyarme a lo largo de mi vida, sobre todo por impulsarme a desarrollarme como estudiante.

A mis hermanos Leonel Carbajal Herrera y Saúl Alejandro Carbajal Herrera por alentarme y motivarme.

A mi tío José Carbajal Zavala por apoyarme durante mi trayecto estudiantil y motivarme a seguir con mis estudios.

A mi mejor amiga Vassty León Martínez por su apoyo durante el presente proyecto y sobre todo por su incondicional compañía, apoyo y motivación durante todo mi trayecto en la UAAAN, gracias por compartir juntas experiencias de conexión.

A mi compañera Ana Cristina Estrada Montero por su apoyo y arduo trabajo durante el desarrollo de este proyecto de investigación.

A mi asesora principal, la Dra. María Hernández por su brindarme asesoría, apoyo y enseñanzas durante todo el proyecto de investigación, por motivarme e inspirarme.

Al Dr. Francisco Hernández Centeno por brindarme su apoyo y disposición para llevar a cabo el proyecto y por fungir como un excelente tutor durante todo mi trayecto en la UAAAN.

A la Dra. Haydeé Yajaira López de la Peña por valioso apoyo y contribución para desarrollar el proyecto.

A la Dra. Ana Margarita Rodríguez por su apoyo, enseñanzas y disposición en el presente proyecto.

Al Ing. Antonio Pérez por brindarme su apoyo, paciencia y solidaridad y por compartirme sus conocimientos y asesoría durante el proyecto

A la Universidad Autónoma Agraria por recibirme y por brindarme innumerables experiencias y conocimientos.

Al Centro de Investigación en Química Aplicada por permitirme ingresar a sus instalaciones y ser parte de este proyecto en sinergia con su institución.

Al Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos por abrirme sus puertas y mostrar disposición de apoyo para el desarrollo del proyecto.

CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS	viii
INDICE DE TABLAS	ix
RESÚMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	xii
II. JUSTIFICACIÓN	xv
III. HIPÓTESIS	xvi
IV. OBJETIVOS	xvi
a. General.	xvi
b. Específicos.....	xvi
V. REVISIÓN DE LITERATURA.....	xvii
5.1. Bioempaques.....	xvii
5.1.1. Definición	xvii
5.1.2. Empaques inteligentes definición	xvii
5.1.3. Empaques activos definición	xvii
5.2. Empaques activos.....	xviii
5.2.1. Ventajas y desventajas.....	xviii
5.2.2. Clasificación.....	xx
5.3. Deterioro alimentario por flora contaminante	xxv
5.3.1. Principales agentes corruptores de alimentos.....	xxvi
5.3.2. Agentes patógenos corruptores de alimentos	xxvi
5.3.3. Actividad bactericida/ bacteriostática.....	xxix
5.3.4. Cuenta mínima inhibitoria.....	xxix
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	xxx
6.1. Etapa No. 1 Obtención de los materiales base.....	xxx

6.1.1. Obtención de polysuccinimida.....	xxx
6.1.2. Obtención de la microcelulosa	xxx
6.1.3. Obtención AEO	xxxi
6.2. Etapa No. 2 Elaboración de las probetas.....	xxxii
6.2.1. Composición de las probetas	xxxii
6.2.2 Extrusión	xxxii
6.2.3 Termoconformado	xxxiii
6.3. Etapa No. 3 Caracterización química de los materiales base.....	xxxiii
6.3.1. Espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR).....	xxxiii
6.3.2 Grados de sustitución de la Mc acetilada	xxxiii
6.4. Etapa No. 4 Evaluación de las propiedades antimicrobianas y solubilidad.....	xxxiv
6.4.1. Antimicrobianas.....	xxxiv
6.4.2. Evaluación de la solubilidad de las probetas.....	xxxvii
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	xxxix
7.1. Caracterización química de los materiales base.....	xxxix
7.1.1. Espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR).....	xxxix
7.1.2. Grados de sustitución de la Mc acetilada	xliii
7.2. Evaluación de las propiedades antimicrobianas y solubilidad	xliv
7.2.1. Antimicrobianas.....	xliv
7.2.2. Solubilidad de las películas elaboradas	xlvii
VIII. CONCLUSIONES.....	xliv
IX. LITERATURA CITADA	I

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gráfica resultados de caracterización química de la polisuccinimida por analisis	xxxix
Figura 2. Espectro IR (ATR) de la polisuccinimida	¡Error! Marcador no definido.
Figura 3. Gráfica de resultados de la caracterización química por FTIR a la microcelulosa acetilada y sin acetilar.	xli
Figura 4. Gráfica FTIR de MCC y sus derivados (A) microcelulosa cristalina de tallo de maíz, (a) celulosa nanofibrilada, (b-f) celulosa nanofibrada acetilada con valores de DS de 0.21, 0.35, 0.57, 1.31 y 2.27	¡Error! Marcador no definido.
Figura 5. Grafica con resultados de la caracterización química de las probetas por medio de FTIR: T1; Mc 0 hr acetilación, T2; Mc 1 hr acetilación, T3; Mc 3 hr acetilación, T4; Mc 5 hr acetilación, T5; 5 hr acetilación y sin PEG.	xlii
Figura 6. Cinética de crecimiento de E. coli frente a las probetas elaboradas: Testigo; mc sin acetilar, PEG 1; mc acetilada por 1 hr, PEG 2; mc acetilada por 3 hr, PEG 3; mc acetilada por 5 hr, Glicerol; mc acetilada por 5 hr sin PEG.	xlv
Figura 7. Cinética de crecimiento de S aureus frente a las probetas elaboradas: Testigo; mc sin acetilar, PEG 1; mc acetilada por 1 hr, PEG 2; mc acetilada por 3 hr, PEG 3; mc acetilada por 5 hr, Glicerol; mc acetilada por 5 hr sin PEG.	xlv

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Envase activos: ventajas y desventajas.....	xix
Tabla 2. Proporción de los materiales para cada tratamiento de probeta elaborada. .	xxxii
Tabla 3. Formulación para tubos con inóculo infeccioso de E. coli y S. aureus con muestra de placa para medición de cinética de crecimiento.	xxxv
Tabla 4. Grados de sustitución y % de acetilación de la microcelulosa acetilada (media \pm desviación estándar)	xliii
Tabla 5. Resultados del promedio de los halos de inhibición de los diferentes tratamientos frente a <i>Aspergillus niger</i> , T1; mc con 1 hora de acetilación más PEG, T2; mc con 3 hr de acetilación más PEG, T4; mc con 5 hr de acetilación más PEG, T4; mc con 5 hr de acetilación sin PEG.	xlvi

RESÚMEN

Actualmente, la población en el mundo es cada vez más conscientes del impacto ambiental que implica el uso continuo de empaques no biodegradables, por lo tanto, el desarrollo de estos en forma degradable se ha tornado como una alternativa crucial en la sostenibilidad. Además de lo anterior existen varias razones para buscar alternativas a los plásticos derivados del petróleo como el agotamiento de los combustibles fósiles, la alta necesidad de reducir las emisiones de carbono, la gran acumulación de desechos plásticos y la necesidad de crear materiales de envase con nuevas características. Lo que lleva a la gran utilidad de los envases activos en los que se incorporan componentes en el envase que liberan o absorben sustancias hacia o desde los alimentos con el fin de extender la vida útil de los alimentos. Se han realizado múltiples investigaciones en este sentido teniendo como principal problemática a enfrentar el equipar las propiedades mecánicas y de barrera que los materiales de empaque tradicionales ofrecen.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la eficiencia antimicrobiana de biocompositos a diferentes grados de hidrofiliidad funcionalizados con AEO, los cuales buscan responder a las demandas actuales de empaques biodegradables que adicionalmente cumplan con las expectativas de resistencia mecánica y mantenimiento de las propiedades físicas del alimento que se pretende conservar en ellos.

Se elaboraron materiales de empaque a base de materiales biocompatibles (poslisuccinimida, almidón, microcelulosa en diferentes niveles de acetilación, aceite esencial de orégano) teniendo dos agentes plastificantes de diferente grado de hidrofiliidad (glicerol y polietilenglico). Las probetas fueron elaboradas mediante procesos de extrusión y termoconformado, las cuales fueron evaluadas fisicoquímicamente y en función a sus propiedades antimicrobianas contra bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus*) gram negativas (*Escherichia coli*) y hongos (*Aspergillus niger*). De la caracterización química por FTIR fue posible apreciar las bandas características de los materiales que las conforman destacándose un ensanchamiento y corrimiento en la banda presente a los 3200 cm^{-1} atribuida a las interacciones por enlaces tipo puente de hidrógeno que se dan entre los materiales. De las pruebas de solubilidad fue posible apreciar que se redujo en un 12% en la muestra de 3 h de acetilación con respecto al testigo. En cuanto a la propiedades antimicrobianas,

las pruebas de difusión en placa mostraron halos de inhibición de 3 a 5 mm lo que evidencia la sensibilidad contra *Aspergillus niger* y en las cinéticas de crecimiento microbiano se presentaron reducciones significativas en el crecimiento de la ambas bacterias estudiadas, después de las 24 h de incubación, siendo *Staphylococcus aureus* el microorganismo que mayor sensibilidad presentó ante las probetas analizadas, lo cual es atribuido a que es un microorganismo gram positivo, del cual se ha reportado una gran sensibilidad ante el aceite esencial de orégano, que es el agente funcionalizante de los materiales estudiados.

Palabras clave: polisuccinimida, almidón, aceite esencial, polietilenglicol, hidrofilicidad, antimicrobiano.

I. INTRODUCCIÓN

Un empaque biodegradable es aquel que cumple con la función básica de un empaque convencional y a su vez cumplir con la definición de desarrollo sustentable, es decir, debe satisfacer las necesidades de la generación presente sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras de satisfacer sus propias necesidades. Para que un empaque se considere biodegradable debe cumplir la biodegradabilidad final con la descomposición de un compuesto químico orgánico por microorganismos en presencia de oxígeno para dar dióxido de carbono, agua, sales minerales en cualquier elemento presente (mineralización) y nueva biomasa; o bien en ausencia de oxígeno para dar dióxido de carbono, metano, sales minerales y nueva biomasa. (Rivera et al., 2019).

En el sistema del empaque activo el producto, el envase y el entorno actúan de manera positiva para extender la vida útil o lograr alguna característica deseada que no se puede obtener de otra manera, para ello, implica alguna acción física, química o biológica para alterar las interacciones entre el paquete el producto y el espacio libre. (Yam et al., 2005). La aplicación de agentes antimicrobianos en empaques activos se ha convertido en un tema cada vez más popular ya que presenta un tema serio en la industria alimentaria porque los alimentos son sumamente propensos a contaminación durante el transporte y el almacenamiento. (Mousavi Khaneghah et al., 2018). Los aceites esenciales de plantas aromáticas poseen un fuerte potencial antimicrobiano y antioxidante, por lo que su uso como conservantes natural satisface la demanda de los consumidores de alimentos sanos y seguros; pueden actuar contra los microorganismos patógenos que causan enfermedades en los consumidores y así mismo la vida útil de los alimentos se alargará y la calidad se mantendrá. Los aceites esenciales tienen una amplia variedad de compuestos químicos que realizan actividades antimicrobianas, antioxidantes, antifúngicas, antivirales, insecticidas, entre otras que los caracterizan (Cevallos & Londoño, 2018). La acción antimicrobiana del aceite esencial de oregano (AEO) ha sido objeto de investigación que justifica su uso popular en la preparación, conservación de alimento y medicinal. El Aceite Esencial de Oregano resulta ser eficaz contra *Escherichia coli* (Oyarzabal et al., 2011), *S. aureus*, *L. monocytogenes*, entre otros microorganismos asociados con las contaminación de alimentos (Carhuallanqui et al., 2020). Dentro de los envases activos, existe un término llamado envase de liberación controlada que es

diseñado para controlar la liberación de sustancias específicas durante periodos prolongados de tiempo, la liberación de un compuesto antimicrobiano dentro del empaque activo sería desencadenado por un cambio en el entorno del producto o empaque alimentario. Por lo tanto, la liberación de una sustancia en el alimento puede activarse mediante cambios químicos, bioquímicos o biológicos. (Mousavi Khaneghah et al., 2018).

La polisuccinimida (PSI), es comúnmente sintetizada a través de polimerización térmica, es un precursor de poliimida para la producción de tales polímeros biocompatibles y degradables como ácido poliaspartico y varias poliaspartamidas. El ácido poliaspartico generalmente se obtiene por hidrólisis de PSI. La polisuccinimida es uno de los polímeros solubles en agua de interés ya que muestran biocompatibilidad y degradabilidad y tienen potencial aplicación en las ciencias médicas y alimenticias. (Jalalvandi & Shavandi, 2018).

La afinidad por el agua de los plásticos biodegradables derivados de almidón se debe esencialmente a la estructura y naturaleza química del almidón. El almidón es un polisacárido conformado por dos polímeros: amilosa y amilopectina. La abundancia de grupos hidroxilo en la amilosa le otorga propiedades hidrofílicas a este polímero, impartándole afinidad por el agua. (Rene Ceron, 2013). A pesar del obstáculo que presenta este material, se ha logrado reducir la hidrofílicidad de las películas de almidón mediante la modificación y la incorporación de otros polímeros (Vargas Pérez, 2017). Por lo anterior, para modificar algunas características de hidrofílicidad, se incorporó Polietilenglicol (PEG) a la biopelícula. PEG es uno de los polímeros biodegradables aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA de EE. UU.), es un poliéter compuesto de etilenglicol repetido de unidades de $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$. E PEG posee alta flexibilidad estructural, biocompatibilidad, anfifílicidad, es carente de obstáculos estéricos y posee capacidad de hidratación. Presenta una alta solubilidad en la mayoría de los compuestos orgánicos y disolventes inorgánicos además de que forma una monocapa interfaz aire-agua, por lo que desempeña un papel importante en la solubilización y la permeación. (D'souza & Shegokar, 2016).

En el presente trabajo de investigación se elaboraron materiales de empaque a base de materiales biocompatibles (PSI, almidón, mc en diferentes grados de acelitación y AEO) el los materiales se utilizaron dos agentes plastificantes (glicerol y plietilenglicol) con diferentes grados de hidrofiliidad para responder a la necesidad de cambiar las características de higroscopicidad que se presentan en las películas elaboradas a base de almidón, para esto, se creó una formulación en donde se incluye polietilenglicol el cual es un plastificante que cumple con las características requeridas para cambiar moderadamente las propiedades de las películas con almidón, y a su vez, que la película cumpla con una función activa antimicrobiana. Las probetas elaboradas se sometieron a los análisis antimicrobianos en donde las cinéticas de crecimiento para E. coli y S. aureus mostraron reducciones después de las 24 hr, en las siembras en placa de A. niger se presenciaron halos de inhibición de 3-5 mm, de igual manera se realizaron el análisis de solubilidad de las probetas mostrándose una reducción del 12% del porcentaje de solubilidad en comparación con la probeta que contenía solamente glicerol como plastificante.

II. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, la población en el mundo es cada vez más conscientes del impacto ambiental que implica el consumo diario en los empaques no biodegradables, por lo tanto, el uso de empaques biodegradables se ha tornado como una alternativa crucial para usar como herramienta en la sostenibilidad. Además de que hoy día existen varias razones para buscar alternativas a los plásticos derivados del petróleo como el agotamiento de los combustibles fósiles, la alta necesidad de reducir las emisiones de carbono, la gran acumulación de desechos plásticos y la necesidad de crear materiales de envase con nuevas características. Lo que lleva a la gran utilidad de los envases activos en los que se incorporan componentes en el envase que liberan o absorben sustancias hacia o desde los alimentos con el fin de extender la vida útil del producto, como en este caso utilizando el aceite esencial de orégano como agente funcionalizante. La película elaborada es a base de almidón, este material presenta una importante desventaja gracias a que posee un carácter altamente hidrofílico por lo que en la conformación de la película también se incluye glicerol que mejora la extensibilidad de la película aumenta la flexibilidad y mejora las propiedades de barrera de vapor de agua, sin embargo, se presentaba la necesidad de incluir un nuevo plastificante que mejorara la característica de higroscopicidad que presenta el almidón, por lo que el material seleccionado para realizar una nueva formulación fue el polietilenglicol que posee alta flexibilidad estructural, biocompatibilidad, anfifilicidad, es carente de obstáculos y con capacidad de hidratación, además de que es neutro y tiene muy baja reactividad, lo que lo hace un plastificante a fin con la formulación ya establecida, por lo que una vez incorporó en la nueva formulación, esta no tendría un impacto negativo y seguiría conservando sus propiedades antimicrobianas otorgadas por el aceite esencial de orégano sin afectar la composición en la aplicación de alimentos.

III. HIPÓTESIS

H₀: La composición del biocomposito influye significativamente en las propiedades antimicrobianas del mismo independientemente del agente funcionalizante (AEO).

H_a: La composición del biocomposito no influye significativamente en las propiedades antimicrobianas del mismo independientemente del agente funcionalizante (AEO).

IV. OBJETIVOS

a. General.

Evaluar la eficiencia antimicrobiana de biocompositos a diferentes grados de hidrofiliidad funcionalizados con AEO.

b. Específicos.

- i. Obtener biocompositos a base de polisuccinimida, reforzados con MCA y diversos tipos de agentes plastificantes (glicerol y polietilenglicol)
- ii. Viabilizar y caracterizar cepas microbianas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Aspergillus niger*.
- iii. Preparar inóculos infecciosos de las cepas seleccionadas. (Escala de McFarland).
- iv. Evaluar las características químicas de los materiales base de las probetas elaboradas.
- v. Evaluar las propiedades antimicrobianas de los biocompositos obtenidos (CMI).
- vi. Evaluar la solubilidad de las probetas obtenidas.

V. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1. Bioempaques

Los envases biodegradables son hechos a partir de materiales que proceden de fuentes renovables, bien extraídos de la biomasa, como la celulosa o el almidón, o bien producidos por microorganismos como los polihidroxicanoatos.

Con el uso de biopolímeros para el desarrollo de nuevos materiales de envase, se consigue una reducción de materiales poliméricos procedentes de fuentes no renovables, como el petróleo. Un empaque biodegradable es aquel que cumple con la función básica de un empaque convencional y a su vez cumplir con la definición de desarrollo sustentable. (Rivera et al., 2019).

5.1.1. Definición

5.1.2. Empaques inteligentes definición

Se definió empaque inteligente (EI) como un sistema de empaque basado en la ciencia y la tecnología que puede llevar a cabo funciones inteligentes (como detección, registro, comunicación y aplicación de lógica científica) para facilitar la toma de decisiones y acciones correctivas para extender la vida útil, aumentar la seguridad, mejorar la calidad, proporcionar información y advertir sobre posibles problemas. La singularidad del EI está en su capacidad para comunicarse. Debido a que el paquete y el alimento se mueven constantemente juntos a lo largo del ciclo de la cadena de suministro, el paquete es el mejor compañero del alimento y está en la mejor posición para comunicar las condiciones del alimento.

Un paquete es "inteligente" si tiene la capacidad de sentir el entorno y comunicarse con los humanos: por ejemplo, un paquete inteligente es aquel que puede monitorear la condición de calidad/seguridad de un producto alimenticio y proporcionar una alerta temprana al consumidor o al fabricante de alimentos. Es importante enfatizar que un EI es un sistema de entrega de productos que involucra no solo el paquete, sino también el producto alimenticio, el entorno externo y otras consideraciones. (Yam et al., 2005)

5.1.3. Empaques activos definición

Anteriormente, los materiales de empaque primario se consideraban "pasivos", lo que significa que funcionaban solo como una barrera inerte para proteger el producto contra el oxígeno y la humedad.

El embalaje activo es una solución en la que interactúan el embalaje, el producto y el medio ambiente. Estos son los sistemas que (como resultado de las actividades químicas, físicas y biológicas) cambian activamente las condiciones de los alimentos envasados, prolongan su sostenibilidad y, por tanto, su vida útil, y garantizan o mejoran significativamente la calidad del producto, seguridad microbiológica y/ o propiedades sensoriales, manteniendo su calidad. (Wyrwa & Barska, 2017).

Recientemente, se ha desarrollado una gran cantidad de nuevos materiales de envasado que brindan una protección "activa" a los productos alimenticios. Empaque activo (EA) se ha definido como un sistema en el que el producto, el envase y el entorno interactúan de manera positiva para prolongar la vida útil o para lograr algunas características que no se pueden obtener de otra manera. También se ha definido como un sistema de envasado que cambia activamente la condición del envase para prolongar la vida útil o mejorar la seguridad alimentaria o las propiedades sensoriales, manteniendo la calidad del alimento.

Todas las tecnologías del EA implican alguna acción física, química o biológica para alterar las interacciones entre el paquete, el producto y el espacio de cabeza del paquete para lograr un determinado resultado deseado. (Yam et al., 2005)

5.2. Empaques activos

5.2.1. Ventajas y desventajas

Las ventajas de la actividad microbiana de los polímeros son la no volatilidad, la estabilidad química, no toxicidad, capacidad para prolongar la vida útil del producto mayor eficiencia y selectividad, minimizando al mismo tiempo su impacto ambiental, a comparación con los agentes microbianos convencionales. (Guirado-moreno et al., 2022).

Al usar Aceites esenciales como conservantes naturales, algunas de las desventajas son el impacto sensorial y percepción debido al fuerte sabor característico de los AE. Además, debido a su falta de inercia debido al fuerte sabor de los AE se puede afectar a las preferencias del consumidos por el producto, afectando así las propiedades organolépticas y su aceptación en general. (Chacha et al., 2022).

En general, los envases con activos antimicrobianos presentan múltiples beneficios, entre los que se incluyen la reducción de los microorganismos que causan deterioro, la

prolongación de la vida útil que conduce a la reducción del desperdicio de alimentos, la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos que aumentan la seguridad alimentaria y el mantenimiento de la calidad de los alimentos en términos sensoriales o de color. , indicando un obstáculo adicional que conduce a un procesamiento más fácil de los alimentos y, finalmente, un paso hacia un etiquetado limpio mediante la sustitución de conservantes artificiales por naturales o el uso de menos conservantes. (Yildirim & Röcker, n.d.)

Tabla 1 *Envase activos: ventajas y desventajas.*

Empaque activo	
Desventajas	Ventajas
Más caro que el embalaje tradicional.	Puede controlar las condiciones internas,
Ciertas sustancias liberadas como resultado del envasado activo pueden afectar la composición de los alimentos.	reaccionando a ellas en consecuencia emitiendo sustancias beneficiosas o absorbiendo aquellas que afectan negativamente al producto.
En caso de daños en el embalaje, reacciones químicas nocivas.	Detecta la presencia de metabolitos de microorganismos, puede producirse dióxido de carbono, amoníaco, dióxido de azufre, sulfuro de hidrogeno, etanol y compuestos ácidos o aminas.
Requiere más conocimiento y conciencia del consumidor.	Permite una vida útil más larga y mantiene el producto intacto, incluso puede depositarse en las propiedades sensoriales de los productos.
Algunos de los compuestos utilizados para su producción (p. eje. dióxido de azufre) pueden ser depositados en la superficie de frutas y debido a su fuerte olor característico, pueden causar rechazo hacia el producto por el consumidor.	Garantiza o mejora significativamente la seguridad microbiológica de los alimentos.
Algunos de los compuestos químicos, por ejemplo, el dióxido de carbono, pueden ayudar a reducir el uso de conservantes alimentarios prolongando la vida útil del producto, pero afecta negativamente a su color, lo que puede tener un impacto	Puede reducir el uso de conservantes alimentarios.

negativo en las decisiones del consumidor.	Protege a los consumidores contra la falsificación y manipulación de productos alimenticios.
Pueden usarse de manera poco ética para la adulteración de alimentos, usar cantidades de clase inferior o no observar y/o descuidar principios estrictos de buenas prácticas de fabricación.	Promueve el consumo sostenible Contribuye a la protección del medio ambiente mediante el uso de Soluciones biodegradables y biocompatibles. Permite al consumidor realizar una elección racional e informada, aumentar la confianza en el producto

(Wyrwa & Barska, 2017)

5.2.2. Clasificación

5.2.2.1. Agentes absorbedores

Los absorbentes comunes actuales son productos de un solo uso compuestos de gel de sílice o celulosa recubierta de plástico (Han et al., 2018) y generalmente no tienen funcionalidad antimicrobiana o su actividad antimicrobiana cesa cuando se administran todos los agentes antimicrobianos. (Guirado-moreno et al., 2022).

Los agentes absorbedores se aplican dependiendo de la aplicación, pueden estar asociados a la absorción de oxígeno, humedad, etileno o dióxido de carbono. Para conseguir efectos específicos se utilizan sustancias como la zeolita, celulosa, carbón activado, gel de sílice, iones de hierro, ácido ascórbico, permanganato de potasio e hidróxido de calcio. (Wyrwa & Barska, 2017)

Los absorbentes de líquidos que contienen dos o más capas están hechos de polímeros sintéticos, en cuya estructura hay sustancias higroscópicas, que absorben líquidos en carnes y pescado. (Wyrwa & Barska, 2017)

Los eliminadores de humedad más simples están hechos de materiales absorbentes como gel de sílice, zeolitas, fibras de celulosa o cloruro de sodio. (Wyrwa & Barska, 2017).

Los polímeros superabsorbentes típicos incluyen sales de poliacrilato, carboximetilcelulosa y copolímeros de injerto de almidón, que tienen una fuerte afinidad con el agua. (Benbettaieb, 2014).

Mediante el uso de captadores de oxígeno, es posible controlar el oxígeno residual dentro del embalaje, lo que evita un mayor deterioro de la calidad de los productos envasados. Las tecnologías de captación de oxígeno comercializadas en el mercado se basan principalmente en la oxidación de polvo de hierro, oxidación de materia colorante fotosensible, oxidación de ácido ascórbico, oxidación enzimática utilizando glucosa oxidasa, ácidos grasos insaturados o levadura inmovilizada sobre un sustrato sólido, sin embargo, uno de los más eficaces, se basa en la oxidación del hierro y sales ferrosas mediante bolsitas, almohadillas, tiras o etiquetas que contienen polvo de hierro. En la innovación de la tecnología de envasado de alimentos se incorporan absorbentes de O₂ en los componentes plásticos del film, bandeja o caja del envase.

Como captadores de oxígeno se utilizan compuestos fácilmente oxidables (hierro en polvo, ácido ascórbico, ácidos grasos insaturados e hidrocarburos insaturados), enzimas (glucosa oxidasa y alcohol oxidasa) o colorantes fotosensibles. (Wyrwa & Barska, 2017).

5.2.2.2. Agentes liberadores

El empaque de liberación controlada es un grupo de tecnologías que utiliza materiales de empaque como un sistema de entrega para liberar compuestos activos (como antimicrobianos, antioxidantes, enzimas, sabores y nutracéuticos) C

El principio de los sistemas de difusión o emisores se basa en emitir los gases deseados al espacio superior del paquete para impactar positivamente en el alimento envasado, retardar procesos adversos y asegurar la extensión de la vida útil. Los emisores de gases más utilizados se basan en la liberación de etanol (C₂H₅OH), dióxido de azufre (SO₂) y CO₂.

Los principales sistemas de liberación en envases activos se basan en liberadores de antimicrobianos, antioxidantes, etileno, dióxido de carbono y sabor.

En los emisores de CO₂, se encuentran disponibles sobres que utilizan ácido ascórbico y carbonato ferroso o ácido ascórbico con bicarbonato de sodio para absorber el O₂ y generar un volumen equivalente de CO₂. (Benbettaieb, 2014). el CO₂ se aplica ampliamente en la industria alimentaria para prolongar la vida útil y preservar la calidad. En general, se preferirían altas concentraciones de CO₂ para la carne fresca, el pescado,

las aves y las frutas no climatéricas para reducir eficazmente el crecimiento de microorganismos, lo que aumenta la fase de retraso y el tiempo durante la fase de microorganismos logarítmicos a través de un complejo conjunto de mecanismo.

Los antioxidantes pueden integrarse en las películas poliméricas de embalaje como material de recubrimiento sobre la superficie de los alimentos para limitar la oxidación de los componentes grasos. Los antioxidantes naturales serían una alternativa viable a los antioxidantes sintéticos ya que son biodegradables y son materiales seguros, hoy en día, los investigadores se centran en incorporar antioxidantes naturales en películas basadas en biopolímeros para aplicaciones alimentarias.

Lograr una liberación controlada adecuada de agentes en AP es fundamental para mantener la concentración de sustancia activa por encima de la concentración mínima inhibidora contra microorganismos patógenos o de deterioro durante la vida útil del producto, desde este punto de vista, se han sugerido diferentes estrategias basadas en: películas multicapa, mezcla inteligente de biopolímeros, entrecruzamiento de matrices, tecnología de encapsulación e incorporación de diversos tipos de ácidos grasos. (Soltani Firouz et al., 2021).

Los emisores de dióxido de carbono se utilizan a menudo con captadores de oxígeno. En tales sistemas, el oxígeno absorbido por un eliminador de oxígeno se reemplaza directamente con dióxido de carbono.

El grupo más numeroso de emisores está formado por sustancias antimicrobianas que se utilizan en el interior de los envases. Estas sustancias pueden añadirse a los envases de diferentes formas, como:

- Bolsitas o tapetes con compuestos antimicrobianos volátiles.
- Sustancias activas incrustadas en la estructura del polímero.
- Sustancias activas aplicadas a la superficie del polímero.
- Sustancias activas inmovilizadas sobre el polímero mediante enlaces iónicos y covalentes.
- Películas de embalaje, que tienen propiedades antimicrobianas. (Wyrwa & Barska, 2017).

5.2.2.3. Capacidad antioxidante

En los envases activos se utiliza un método que evite la oxidación de alimento mediante la liberación controlada de sustancias activas naturales o sintéticas. (Chacha et al., 2022) Son de particular interés los antioxidantes obtenidos de fuentes naturales como especias y hierbas debido a los beneficios para la salud y seguridad en comparación con los antioxidantes sintéticos. Los antioxidantes naturales contienen compuestos fenólicos los cuales donan átomos de hidrogeno para apagar los radicales libres mientras permanece estable debido a la deslocalización del anillo aromático se los electrones desapareados. (Nwakaudu et al., 2019). (Chacha et al., 2022)

Los Aceites esenciales poseen sustancias activas antioxidantes y se pueden obtener a partir de especias y hierbas. Por lo anterior, los AE son considerados como antioxidantes naturales o agentes antibacterianos para preservar y mejorar la calidad general de la carne y sus productos. (Chacha et al., 2022).

Los antioxidantes naturales pueden interactuar con el producto alimenticio y el espacio libre del paquete, lo que protege a lo productos alimenticios contra la oxidación.

El empaque activo que incorpora antioxidantes al polímero representa una alternativa para los sistemas de captación de oxígeno ya que permite la liberación controlada de antioxidantes. Los agentes activos contenidos en el envase pueden actuar por mecanismo de liberación: donde el agente activo migra a los alimentos mediante difusión y partición y luego el efecto disminuye con el tiempo, contacto directo: donde el efecto deseado se consigue a través de la superficie de contacto sin difusión, y por evaporación-liberación: que ocurre dentro del espacio libre de los envases sin contacto entre el envase y el alimento. (Benbettaieb, 2014).

5.2.2.4. Capacidad antimicrobiana

La utilización de agentes antimicrobianos en los envases de alimentos es beneficiosa para prevenir el crecimiento de microbios y bacterias que se pueden encontrar en los alimentos envasados o en los materiales de envasado y, por lo tanto, aumenta la vida útil de los productos alimenticios. Las investigaciones realizadas en este campo muestran que las películas antimicrobianas son más efectivas en comparación con la adición directa de agentes antimicrobianos a los alimentos porque la combinación de agentes antimicrobianos se libera lentamente desde la superficie de la película del empaque a los

productos alimenticios con la concentración requerida para prevenir el crecimiento microbiano. (Soltani Firouz et al., 2021).

La capacidad antimicrobiana se refiere a la capacidad del material de inhibir el crecimiento de bacterias. Los sistemas de envasado antimicrobianos están diseñados para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y deteriorados en envases activos. (Yildirim & Röcker, n.d.).

Los aceites esenciales extraídos de plantas como el cilantro, el clavo, el romero, el orégano, la hierba de limón, el árbol del té, la albahaca y el hinojo tienen un gran impacto en la inhibición del crecimiento de microorganismos. Esto crea un buen potencial en su uso como aditivos antimicrobianos para aplicaciones de envasado de alimentos. (Soltani Firouz et al., 2021).

Los Aceites esenciales poseen sustancias activas, con características antibacterianas y antioxidantes gracias a los terpenoides, terpenos, fenilpropenos y otros compuestos con azufre y nitrógeno que se han encontrado en los componentes químicos antibacterianos de los AE. (Chacha et al., 2022).

Los envases antimicrobianos de alimentos actúan para extender la fase de retraso y reducir la fase de crecimiento de los microorganismos, extendiendo así su vida útil y manteniendo la calidad y seguridad del producto. (Benbettaieb, 2014).

5.2.2.4.1. Estado del arte actividad antimicrobiana

En los sistemas de envasado antimicrobianos se han incorporado en la última década agentes antimicrobianos como aceites esenciales, ácidos orgánicos, bacteriocinas, enzimas, metales y óxidos metálicos, así como sus nanopartículas, en diversas matrices poliméricas y se demostró que estas películas antimicrobianas son eficaces contra una amplia gama de patógenos transmitidos por los alimentos y microorganismos de descomposición en medios de laboratorio y aplicaciones alimentarias reales. (Yildirim & Röcker, n.d.).

Se describieron los principales modos de acción con respecto a la actividad antimicrobiana de los Aceites Esenciales o sus componentes principales: cambios en la morfología de la célula (cinamaldehído, eugenol y timol), alteración de la membrana citoplasmática (carvacol, eugenol, timol y orégano), alteración de la membrana externa en bacterias Gram negativas (tomillo), cambios en las propiedades de la membrana

(carvacol, timol y romero), alteración del potencial de membrana (carvacol, timol, canela, cilantro, y orégano), alteración de la homeostasis del pH intracelular (carvacol), alteración de la respiración celular (canela y orégano), inhibición de enzimas particulares (alicina, cinamaldehído y eugenol), inhibición de la división celular (cinamaldehído) cambios en el transcriptoma (alicina y timol), cambios en el proteoma (carvacol y timol) y cambios en la producción de toxinas (carvacol y orégano). (Maisanaba et al., 2016).

5.3. Deterioro alimentario por flora contaminante

Los contaminantes son sustancias que no han sido añadidas intencionadamente a los alimentos, pero que se encuentran en los mismos como resultado de las distintas etapas que siguen a lo largo de toda la cadena alimentaria: producción, fabricación, transformación, preparación, tratamiento, acondicionamiento, envasado, transporte y almacenamiento; o como consecuencia de la contaminación medioambiental.

Una enfermedad o infección transmitida por alimentos es cualquier enfermedad gastrointestinal resultante de la ingestión de alimentos contaminados alterados por una entidad patógena, como bacterias, hongos, virus, mohos, protozoos o parásitos.

Podría haber innumerables géneros microbianos que pueden estar involucrados en el deterioro de los alimentos: moldes, levaduras fermentativas y oxidativas, pseudomonasáceas, neisseriáceas, enterobacterias, micrococcáceas, bacterias de ácido láctico y corineformes.

Dependiendo de las categorías de alimentos, prosperan microorganismos específicos, lo que provoca deterioro y las consiguientes enfermedades transmitidas por los alimentos.

Dependiendo de la naturaleza de los alimentos sometidos, los microorganismos provocarán cambios en la apariencia, sabor, olor y otras cualidades de los alimentos.

Estos procesos de deterioro incluyen:

- **Putrefacción:** En alimentos enriquecidos con proteínas, en presencia de microbios proteolíticos, una mezcla de aminoácidos, aminas, amoníaco y H₂S.
- **Fermentación:** donde los microbios sacarolíticos actuaron sobre los alimentos con carbohidratos para producir una mezcla de ácidos orgánicos, alcoholes y gases.
- **Rancidez:** se puede observar en alimentos ricos en lípidos que están putrefactos con indicación de olor desagradable con producción de ácidos grasos y glicerol debido a la acción de microbios lipolíticos. (Majumdar et al., 2018).

5.3.1. Principales agentes corruptores de alimentos

Según el origen del contaminante, existen diferentes tipos: biológicos, químicos y físicos. Todos los alimentos son susceptibles de ser contaminados con cualquiera de estos orígenes.

Contaminantes biológicos. Los contaminantes biológicos en alimentos son sustancias producidas por seres vivos. Aquí se incluye la contaminación bacteriana, la contaminación viral o la contaminación por parásitos que se transmiten por la saliva, los excrementos de las plagas, la materia fecal o la sangre. Los agentes infecciosos suelen ser: bacterias, virus, protozoarios, toxinas, parásitos, hongos, entre otros.

Contaminantes químicos. Son sustancias químicas que entran en contacto con el producto y pueden llegar a ser nocivos o tóxicos a corto, mediano y largo plazo. Las fuentes de contaminación química más comunes en alimentos son: productos de limpieza, pesticidas, herbicidas, plaguicidas, metales pesados, plásticos, conservantes, toxinas naturales.

Contaminantes físicos. Son aquellos objetos presentes en ellos que no deben encontrarse allí. Algunos de los principales contaminantes físicos son: huesos, astillas, espinas, cascaras, plásticos, cristales, porcelana, trozos de madera y metal, objetos personales, cabellos, uñas, materiales de envasar o empacar, plagas como insectos.

5.3.2. Agentes patógenos corruptores de alimentos

5.3.2.1. Staphylococcus aureus

La intoxicación alimentaria por estafilococos se encuentra entre las causas más frecuentes de gastroenteritis en todo el mundo. Es resultado de la ingestión de una o más enterotoxinas estafilocócicas preformadas en los alimentos contaminados con estafilococos. Los agentes etiológicos de la intoxicación por estafilococos son miembros del género *Staphylococcus*, del que predomina *Staphylococcus aureus*. Esta forma de intoxicación alimentaria se considera una intoxicación y no implica infección ni crecimiento de bacterias dentro del huésped. (Park & Seo, 2019).

Los alimentos contaminados con una o más enterotoxinas, producidas por algunas especies y cepas de estafilococos, desarrollan *S. gastroenteritis*.

S. aureus posee propiedades de resistencia únicas que facilitan su contaminación y crecimiento en los alimentos, es uno de los patógenos humanos que no forman esporas

y es resistente al estrés ambiental y puede sobrevivir en periodos prolongados en un estado seco.

La temperatura de crecimiento de *S. aureus* oscila entre 6 y 48°C, su crecimiento óptimo es de 35 y 41°C. La tolerancia al pH varía de 4 a 10, con un crecimiento óptimo entre pH de 6 a 7.

Hoy en día, la mayoría de las fuentes de intoxicación por *Staphylococcus* son humanos que contaminaron los alimentos durante la preparación, además, también puede introducirse a través de equipos contaminados utilizados en el procesamiento de alimentos. (Park & Seo, 2019).

Los estafilococos crecen en medios comunes, caldo o agar simple, pH = 7, temperatura óptima de 37°C. Las colonias son formadas en placa después de 18-24 horas de incubación, en las que aparecen redondeados, lisos y brillantes. (Feitosa et al., 2017).

5.3.2.2. Escherichia coli

Escherichia coli es un miembro de la familia bacteriana *Enterobacteriaceae*, es el habitante comensal más frecuente del tracto gastrointestinal de humanos y animales de sangre caliente, así como uno de los patógenos más importantes. Vive en una asociación mutuamente beneficiosa con sus huéspedes y rara vez causa enfermedades. Sin embargo, también es uno de los patógenos humanos y animales más comunes, ya que es responsable de un amplio espectro de enfermedades. (Allocati et al., 2013). *Escherichia coli* normalmente coloniza el tracto gastrointestinal de los bebés humanos pocas horas después del nacimiento. Por lo general, *E. coli* y su huésped humano coexisten con buena salud y en beneficio mutuo durante décadas. (Kaper et al., 2004).

Entre los patógenos intestinales hay seis categorías bien descritas: *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroagregativa (ECEA), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI) y *E. coli* difusamente adherente (ECDA).

Las infecciones urinarias son las infecciones extraintestinales por *E. coli* más comunes y son causadas por *E. coli* uropatógena (ECUP). (Kaper et al., 2004).

Las cepas de ECEP causan diarrea principalmente en niños, particularmente en condiciones de mala higiene, así como en animales. ECEH es un patógeno típicamente transmitido por los alimentos que causa colitis hemorrágica. Los ECET son los patógenos

más comunes que causan diarrea del viajero con diarrea acuosa de leve a grave en humanos de todas las edades. Las cepas de ECEA están asociadas con diarrea persistente en humanos y han sido reconocidas como la causa de varios brotes de enfermedades diarreicas en todo el mundo. ECDA causa diarrea particularmente en niños. (Allocati et al., 2013).

5.3.2.3 *Aspergillus niger*

Aspergillus niger es un hongo ascomiceto filamentoso que está omnipresente en el medio ambiente y ha sido implicado en infecciones oportunistas de humanos. Además de su papel como patógeno humano oportunista, *A. niger* es económicamente importante como organismo de fermentación utilizado para la producción de ácido cítrico.

A. niger es un hongo filamentoso que crece aerobiamente sobre materia orgánica en la naturaleza se encuentra en el suelo y basura, en abono y en material vegetal en descomposición. *Aspergilli*. *A. niger* puede crecer en un amplio rango de temperatura de 6 a 47 °C con una temperatura relativamente alta óptimo entre 35 y 37 °C. El límite de actividad del agua para el crecimiento es 0,88, que es relativamente alto en comparación con otras especies de *Aspergillus*, *A. niger* puede crecer en un rango de pH extremadamente amplio: 1,4–9,8.

Se dividió el género *Aspergillus* en grupos según el color de las conidiosporas. *Aspergilli* con esporas de color marrón a negro constituyen el grupo *A. niger*, aunque los miembros de este grupo varían considerablemente, solo unos pocos difieren tan claramente de los que la mayoría pueden clasificarse fácilmente como especies separadas (por ejemplo, *A. carbonarius*, *A. japonicus*, *A. ellipticus*, *A. heteromorphus* y *A. aculeatus*) la mayoría marrón. Los *Aspergillus* negros pertenecen al otro grupo de especies, los cuales son difíciles de distinguir siendo *A. ficuum*, *A. phoenicis*, *A. niger*, y *A. awamori* las más destacadas.

Otro grupo potencial de toxinas, conocido como ocratoxinas, comprende al menos siete metabolitos secundarios estructuralmente similares, de los cuales la ocratoxina A (OA) es el más tóxico. Los hongos de almacenamiento conocidos principalmente por su producción de OA incluyen *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus ostianus*, *Aspergillus mellus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus carbonarius*. (Schuster et al., 2002).

5.3.3. Actividad bactericida/ bacteriostática

La actividad bactericida es la capacidad de matar a más del 99.9% de las bacterias, mientras que la capacidad bacteriostática es la capacidad del biomaterial para inhibir el crecimiento de bacterias. Las dos tienen gran importancia clínica.

La Concentración Mínima Bactericida (CMB) es la concentración más baja de Aceite Esencial para matar el 99.9% o más de un inóculo de bacterias. (Maisanaba et al., 2016).

5.3.4. Cuenta mínima inhibitoria.

La cuenta mínima inhibitoria es la concentración más baja de un agente antibacteriano expresada en mg/l (μ g/mL) que, en condiciones in vitro estrictamente controladas, previene por completo el crecimiento visible de la cepa de prueba de un organismo.

Se utilizan los siguientes métodos para determinarla

1. Métodos de dilución.
 - En agar.
 - En medio líquido micrométodo/ microdilución macrométodo/ macrodilución.
2. Métodos en gradiente
 - Tiras impregnadas con un gradiente de concentración predefinido de antibiótico. (Kowalska-krochmal & Dudek-wicher, 2021).

La Cuenta Mínima Inhibitoria (CMI) se determina como la concentración más baja de Aceite Esencial que crea una zona de inhibición visible. (Maisanaba et al., 2016).

La Concentración Mínima Bactericida (CMB), se define como la mínima concentración de antimicrobiano que elimina a más del 99.9% de los microorganismos variables después de un tiempo determinado de incubación (generalmente 24 horas). (HORNA QUINTANA et al., 2012).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

La obtención de los materiales base utilizados se llevó a cabo en el laboratorio de Inocuidad Y Empaques en el Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos (DCTA) en la UAAAN, las probetas se elaboraron en el laboratorio de * y * en el Centro de Investigación en Química Aplicada, la Espectroscopia Infrarroja por Transformadas de Fourier (FTIR) se realizó en el laboratorio de Caracterización en el DCTA en la UAAAN, la evaluación de las propiedades antimicrobianas y de solubilidad se llevaron a cabo en el laboratorio ** en el DCTA en la UAAAN. La metodología se realizó en cuatro etapas:

6.1. Etapa No. 1 Obtención de los materiales base.

6.1.1. Obtención de polysuccinimida

La Polysuccinimida fue obtenida mediante policondensación térmica del ácido Aspártico de acuerdo con la siguiente metodología proporcionada por *:

- Colocar de 30-100g de ácido aspártico en un vaso de precipitado de 500 mL de capacidad.
- Llevar una parrilla de calentamiento a 250-300°C manteniendo en constante agitación con ayuda de una espátula.
- Retirar de la parrilla cuando el ácido aspártico se torne a un color rosa coral y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Enseguida, tomar una muestra de 3g del resultante y someterla a una serie de lavados dentro de un embudo con papel filtro que consisten en: 5mL de ácido clorhídrico al 0.1%, posteriormente 5mL de agua destilada, después 15mL de solución saturada de bicarbonato de sodio, y por último, 5mL de agua destilada.
- Al terminar los lavados llevar a secar la muestra con el papel filtro a 60°C por 24 horas.

6.1.2. Obtención de la microcelulosa

La microcelulosa se obtuvo al someter las fibras de lechuguilla a un procedimiento que consistía en lo siguiente:

- Secar las fibras de lechuguilla aproximadamente por 6 horas, transcurrido el tiempo, cortarlas de manera uniforme de un grosor de aproximadamente 1cm con ayuda de tijeras o de guillotina.

- Llevar las fibras a una solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 4% y agitar constantemente durante 1 hora a temperatura ambiente, terminado el tiempo, realizar lavados a las fibras hasta conseguir un pH neutro.
- Realizar una cloración con Cloruro de sodio ($NaClO$) al 3.5% con agitación constante durante 1 hora a 30°C. Terminado el tiempo, realizar lavados a las fibras hasta conseguir un pH neutro.
- Someter las fibras a un tratamiento alcalino con Hidróxido de sodio ($NaOH$) al 5% manteniendo en agitación constante por 2 horas a una temperatura de 60-70°C. Transcurrido el tiempo realizar 4 lavados con agua destilada.
- Realizar una segunda cloración con Cloruro de sodio ($NaClO$) al 0.5%, mantener en agitación constante durante 1 hora a temperatura ambiente. Terminado el tiempo realizar lavados con agua destilada hasta llegar a un pH neutro.
- Retirar el exceso de agua a las fibras y llevarlas a un horno de secado * a 60°C durante 24 horas.
- Una vez que las fibras estén secas, realizar una molienda de por medio de un molino * ellas hasta conseguir un polvo fino.

La microcelulosa obtenida se sometió a una acetilación en la que se siguió la metodología obtenida de *:

Depositar en un matraz bola de 500mL una muestra de 18g de la microcelulosa tratada, 4.23g de ácido tartárico y 450mL de ácido acético. Conectar el matraz bola un refrigerante de espiral con un recipiente de agua con hielo y colocar sobre una parrilla de calentamiento para someter la mezcla a ebullición a 120°C. (El tiempo de acetilación tuvo tres variaciones las cuales fueron durante 1 hora, 3 horas y 5 horas para conseguir características diferentes en las probetas elaboradas).

Pasado el tiempo, vaciar la solución a un embudo con papel filtro para realizar lavados a la microcelulosa acetilada con agua destilada hasta conseguir un pH neutro. Enseguida llevar a secar la microcelulosa a 60°C durante 24 horas.

6.1.3. Obtención AEO

El AEO fue proporcionado por el CIRENA (Centro de Investigación en Recursos Naturales de Salaces Jiménez Chihuahua) y fue obtenido mediante arreste de vapores y caracterizado como una muestra alta en timol, por medio de una cromatografía de gases.

6.2. Etapa No. 2 Elaboración de las probetas

Con los distintos materiales base se elaboraron 5 mezclas diferentes para realizar 5 probetas diferentes variando el tiempo de acetilación de la Microcelulosa empleada, las mezclas realizadas se transportaron a CIQA para elaborar las probetas en dos 2 etapas, las cuales fueron: extrusión, en la que se obtuvo una masa en forma de tira larga por medio de * y después se pasó al termoconformado, para darle forma de placa mediante una prensa caliente y una prensa fría.

6.2.1. Composición de las probetas

Las probetas elaboradas consistieron en 5 tratamientos diferentes en los que en su composición se diferenciaba las horas de acetilación a la que fue sometida la microcelulosa empleada como material base, además se usó un testigo en el que no se añadió polietilenglicol como agente plastificante, las especificaciones de la proporción de los materiales empleados para cada probeta se encuentran en la tabla *.

Tabla 2. Proporción de los materiales para cada tratamiento de probeta elaborada.

Material	Proporción				
	Probeta 1 (Mc sin acelarar)	Probeta 2 (Mc 1hr acetilación)	Probeta 3 (Mc 3hr acetilación)	Probeta 4 (Mc 5hr acetilación)	Probeta 5 (Mc 5hr acetilación)
Microcelulosa (Mc)	22%	22%	22%	22%	22%
Polisuccidimida	22%	22%	22%	22%	22%
Almidón	22%	22%	22%	22%	22%
Glicerol	27.45%	27.45%	27.45%	27.45%	30.05%
Polietilenglicol	3.05%	3.05%	3.05%	3.05%	-
Aceite Esencial de Orégano (AEO)	3.5%	3.5%	3.5%	3.5%	3.5%

- Elaboración propia

6.2.2 Extrusión

Las condiciones de la extrusión consistían en meter cargas de 13g de mezcla durante 3 minutos dentro del equipo a 60rpm y una temperatura de 150°C, una vez cumplido el tiempo, se sacaba el material del equipo para enseguida meter otra carga hasta terminar

todo el material de cada probeta. Se realizaba limpieza del equipo para pasar de una mezcla de probeta a otra para evitar contaminación.

6.2.3 Termoconformado

Se utilizó cargas de 30g de muestra obtenida de la extrusión para elaborar cada probeta, el material se depositaban uniformemente dentro de las placas y se pasaban a las prensas; primero en una prensa caliente pero sin presión para fundir el material a 300°F durante 5 minutos, después se sometía a 25T de presión en esta misma prensa durante 7 minutos, una vez cumplido el tiempo se cambiaba las placas a una prensa fría en donde se sometían a 25T de presión durante 10 minutos, por último, se retiraban las placas de la prensa y se colocaban en una mesa para retirar la probeta de las placas.

6.3. Etapa No. 3 Caracterización química de los materiales base

6.3.1. Espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR)

Se realizó la determinación química de las materias primas y de las probetas obtenidas por el entrecruzamiento realizado en el extruder mediante espectroscopia infrarroja por transformadas de Fourier con un equipo PerkinElmer UATR Two del laboratorio de caracterización de la UAAAN.

6.3.2 Grados de sustitución de la Mc acetilada

Para determinar los grados de sustitución se siguió la metodología proporcionada por *. Se utilizó 1 g de muestra de microcelulosa acetilada la cual se colocó en un matraz de 250 mL al que se le añadieron 50 mL de etanol al 75% en agua destilada. Se colocó el tapón al matraz y se agitó levemente con las manos en movimientos circulares, se llevó a calentamiento a 50°C durante 30 minutos, se enfrió a temperatura ambiente y se añadió 40 mL de KOH 0.5M. Se calculó el exceso de álcali con HCl 0.5 M utilizando fenolftaleína como indicador. La solución valorada se dejó reposar durante 2 horas y transcurrido el tiempo se tituló cualquier álcali adicional que pudiera haberse lixiviado de la muestra. Se utilizó una muestra de blanco utilizando la microcelulosa sin haber sido sometida a acetilación para usar los datos en la fórmula empleada.

El porcentaje de acetilo se calculó con la siguiente fórmula:

% acetilo

$$= \frac{(V \text{ usado en la titulación del blanco} - V \text{ usado en la titulación de la muestra}) * M \text{ HCl} * 0.043}{g \text{ de muestra}} * 100$$

6.4. Etapa No. 4 Evaluación de las propiedades antimicrobianas y solubilidad

6.4.1. Antimicrobianas

Los materiales preparados se sometieron a pruebas de actividad antimicrobiana, mediante la prueba de la escala de McFarland contra un microorganismo gram positivo (*S. aureus*) y uno gram negativo (*E. coli*) y difusión en placa contra un hongo (*Aspergillus niger*). Todos los microorganismos de importancia alimentaria. Las cepas provenían de la colección del laboratorio de Inocuidad y Empaques dentro del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, previamente caracterizadas macroscópicamente mediante una siembra en placa en agar selectivos para cada uno de los microorganismos en cuestión utilizando Eosina Azul de Etileno (EMB), para *E. coli*; Infusión Cerebro Corazón (BHI), para *S. aureus* y agar papa dextrosa para *A. niger*, además fueron caracterizados microscópicamente mediante su observación en microscopio óptico de acuerdo a los lineamientos para la tinción de Gram. Las pruebas cuentan de las siguientes fases:

6.4.1.1. Preparación de un inóculo infeccioso equivalente al tubo número 4 de la escala de McFarland y medición de suspensiones bacterianas en opacidad.

Las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* fueron reactivadas en el medio de enriquecimiento infusión cerebro corazón BD Bioxin para las dos bacterias: se colocó 0.001 mL para cada una de las cepas con una asa bacteriológica calibrada en un tubo de ensayo con 7 mL de caldo preparado, esta operación se realizó 5 veces por cada bacteria para obtener 5 tubos de *Escherichia coli* y 5 tubos de *Staphylococcus aureus* los cuales se llevaron a incubación a 37°C durante el tiempo necesario en el que se alcanzara la absorbancia requerida equivalente al tubo número 4 de la escala de McFarland (0.6815 nm). Esta medición se realizó en un espectrofotómetro Genesys 10 UV-Vis a 540 nm. Cuando los tubos con el inóculo infeccioso alcanzaron un nivel de absorbancia de 0.6815 nm, se preparó por separado, 5 tubos equivalentes a las 5 repeticiones por cada tratamiento realizado para inocular con *Escherichia coli* y 5 tubos equivalentes a las 5

repeticiones por tratamiento realizado para inocular con *Staphylococcus aureus*, cada tubo contenía 7 mL de medio de medio de enriquecimiento infusión cerebro corazón además de una muestra de placa de 0.01 g, además de que se dejó reposar los tubos con la infusión cerebro corazón y la muestra de la placa por 24 antes de inocular (en total se obtuvieron 25 tubos para inocular con *E. coli* y 25 para inocular con *S. aureus*), además se prepararon 5 tubos con muestra de placa pero sin inóculo infecciosos para usar como testigo al medir la absorbancia.

Pasadas las 24 horas de reposo de los tubos, se inoculó cada uno con el inóculo infeccioso agregando 0.07 mL de este en el tubo correspondiente con la placa, las especificaciones con el contenido de cada tubo se presentan en la tabla *, (las cantidades presentadas corresponden a cada tratamiento de las bacterias empleadas para el análisis, es decir, se realizó una serie de tubos para *E. coli* y otra para *S. aureus*).

Tabla 3. Formulación para tubos con inóculo infeccioso de *E. coli* y *S. aureus* con muestra de placa para medición de cinética de crecimiento.

Muestra de placa		Infusión cerebro corazón	Inóculo infeccioso con absorbancia de 0.6815 nm
Tratamiento	Repetición		
1	1	7 mL	0.7mL
	2	7 mL	0.7mL
	3	7 mL	0.7mL
	4	7 mL	0.7mL
	5	7 mL	0.7mL
2	1	7 mL	0.7mL
	2	7 mL	0.7mL
	3	7 mL	0.7mL
	4	7 mL	0.7mL
	5	7 mL	0.7mL
3	1	7 mL	0.7mL
	2	7 mL	0.7mL
	3	7 mL	0.7mL
	4	7 mL	0.7mL
	5	7 mL	0.7mL
4	1	7 mL	0.7mL
	2	7 mL	0.7mL
	3	7 mL	0.7mL

	4	7 mL	0.7mL
	5	7 mL	0.7mL
5	1	7 mL	0.7mL
	2	7 mL	0.7mL
	3	7 mL	0.7mL
	4	7 mL	0.7mL
	5	7 mL	0.7mL

* Elaboración propia

Se llevaron a inocular todos los tubos preparados a 37°C en una incubadora * y se estuvieron haciendo mediciones de opacidad en un espectrofotómetro Genesys 10 UV-Vis a 540 nm durante cada hora las primeras 12 horas, después cada 24, 48, 72 y 96 horas de incubación.

6.4.1.2. Siembra en placa en agares selectivos y medición de los halos de inhibición.

Para la siembra en placa y la medición de los halos de inhibición se siguió la metodología aportada por (Bernal R. & Guzmán, 1984).

Siembra de la muestra.

- Sumergir un aplicador estéril de algodón dentro de una suspensión del microorganismo en estudio. No se deben de usar microorganismos sin diluir.
- Enseguida sacar el aplicador de la suspensión sin sacarlo por completo del tubo y rotarlo contra las paredes del mismo tubo para retirar el exceso del inóculo.
- Sembrar el inóculo de manera uniforme por la superficie del medio de cultivo con el aplicador. Hacer la siembra en tres direcciones. Evitar que los inóculos a utilizar estén muy concentrados o muy diluidos.
- Dejar secar la superficie del medio sembrado de 5-20 minutos, durante el secado la caja debe permanecer con la tapa cerrada.
- Colocar las probetas sobre la superficie del agar ayudándose de un dispensador o de pinzas estériles; con ellas, presionar las probetas ligeramente sobre el agar para asegurar el contacto uniforme.
- Depositar 6 discos alrededor y 1 en el centro (Fig *), dejar un espacio de aproximadamente 2 cm entre disco y disco de manera uniforme; para evitar que las zonas de inhibición queden imbricadas. Colocar los antibióticos que difunden

bien en la parte externa y los que producen halos de inhibición producen pequeña en las partes externas.

- Incubar inmediatamente las cajas o dentro de los próximos 30 minutos a 35°C. No someter a temperaturas más altas ya que algunas cepas de *Staphylococcus* resistentes a la Meticilina pueden no detectarse. No incubas en cámara de CO₂.
- Leer las cajas después de haber pasado de 16-24 horas de incubación.

Medición de los halos de inhibición.

La zona de inhibición se mide sobre una superficie oscura bajo una luz reflejada. Medir el diámetro de la zona de inhibición incluyendo los 6mm del disco, colocando una regla sobre el respaldo de la caja Petri manteniendo está cerrada. Un resultado de 6 mm indica que no hay zona de inhibición. Si se usó agar sangre en la prueba se debe hacer la medición sobre la superficie removiendo la tapa de la caja Petri.

El punto final de inhibición completa del crecimiento se estima a simple vista, a excepción de las sulfonamidas y para algunas especies de *Proteus*.

Si se requiere que el resultado sea rápido, se puede medir el diámetro de la zona de inhibición después de 6-8 horas de incubación, no obstante, estas lecturas se deberán confirmar al término de incubación de 18 horas.

6.4.2. Evaluación de la solubilidad de las probetas

El porcentaje de solubilidad se determinó según lo reportado por Hernández-Centeno *et al.* (2021) con modificaciones. Para las pruebas se utilizó 1 g de muestra, la muestra se colocó en un vaso de precipitado el cual contenía 15 mL de agua destilada, se llevó a agitación constante durante 6 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de agitación, el resultado se depositó en un papel filtro previamente secado en estufa de convección forzada a 110° C durante 2 horas y se esperó a que la mezcla estuviera completamente filtrada, después se llevó a secado por 2 horas en una estufa de convección forzada. Terminado el proceso se registraron los pesos. Las pruebas se realizaron por triplicado.

Para calcular el porcentaje de solubilidad se uso la siguiente formula, en donde se usaron los datos de los pesos del papel filtro despues de haber sido secado durante 2 horas y del restante del papel filtro con la muestra secado durante dos horas.

El porcentaje de solubilidad se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ solubilidad} = \frac{\text{peso papel filtro con muestra seca} - \text{peso del papel filtro secado sin muestra}}{\text{peso del papel filtro secado sin muestra}} * 100$$

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Caracterización química de los materiales base

Los materiales base elaborados fueron analizados por Espectroscopia Infrarroja por Transformadas de Fourier para realizar la caracterización química, también se realizaron los análisis FTIR para cada tratamiento de las probetas elaboradas. Los resultados de la caracterización química se presentan a continuación.

7.1.1. Espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR)

FTIR Polisuccinimida elaborada.

Los resultados del FTIR realizado a la polisuccinimida se muestran en la siguiente gráfica: Gráfica resultados de caracterización química de la polisuccinimida por análisis

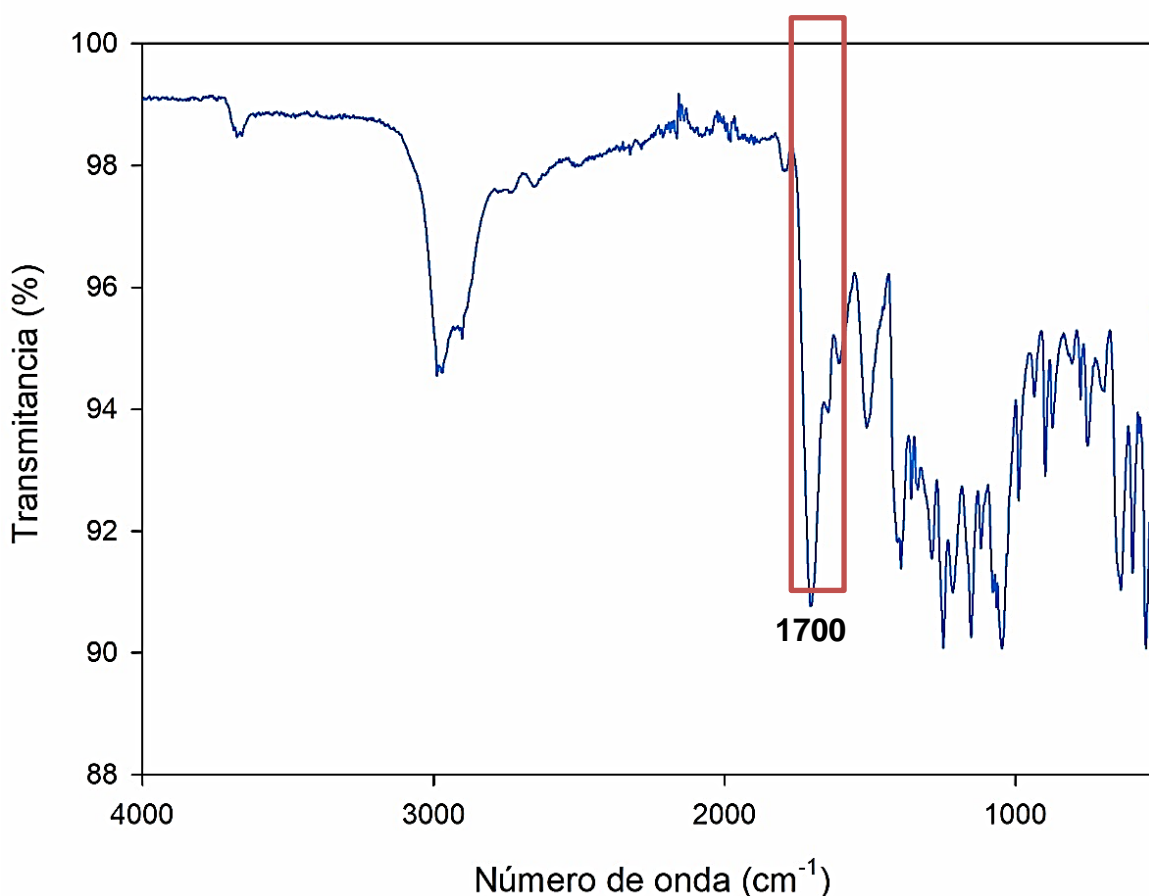


Figura 1. Gráfica resultados de caracterización química de la polisuccinimida por análisis

En los resultados del FTIR realizado a la polisuccinimida elaborada, la banda de relevancia en este caso es la banda en los 1700 cm^{-1} , la cual es correspondiente a los grupos carbonilo, estos se forman al reaccionar el ácido aspártico lo que da la formación de la succinimida.

De acuerdo a lo reportado en la literatura de (Decana, 2015) las señales 1795 y 1703 cm^{-1} se asignan a los estiramientos simétrico y asimétrico del C=O del anillo imida, respectivamente.

FTIR microcelulosa acetilada

La microcelulosa elaborada a partir de fibras de lechuguilla en el presente experimento fueron sometidas a acetilación con tres tratamientos diferentes en el que variaba las hora de acetilación, los resultados de la caracterización química de la microcelulosa empleada se muestran a continuación, incluidos los resultados de la microcelulosa que no fue acetilada.

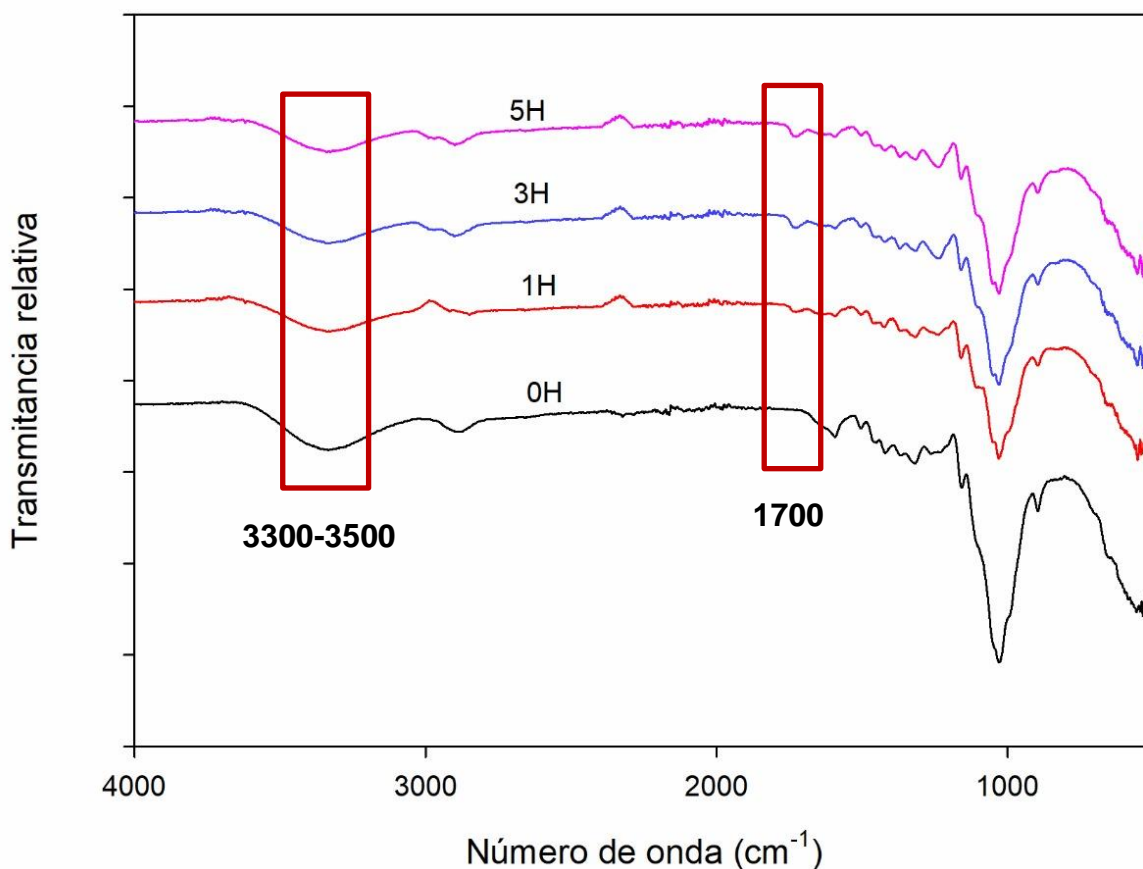


Figura 2. Gráfica de resultados de la caracterización química por FTIR a la microcelulosa acetilada y sin acetilar.

En la figura 3 se observa la gráfica obtenida de los resultados del FTIR realizado a la microcelulosa acetilada, donde la banda ubicada en alrededor de los 1700 cm⁻¹ corresponde a los grupos acetilo, se logra apreciar un estiramiento debido a la diferencia en la intensidad conforme aumentan las horas de acetilación. Además, en la banda ubicada alrededor entre los 3300 y 3500cm⁻¹ correspondiente a los grupos hidroxilo O-H se observa una disminución en la intensidad debido a la sustitución por grupos acetilo en la microcelulosa empleada por el proceso de acetilación al que fue sometida. Lo que indica que la microcelulosa fue correctamente acetilada.

De acuerdo a lo reportado en la literatura de (Cheng et al., 2018) en donde los picos aparecieron entre las bandas de 1735 cm⁻¹ y 1245 cm⁻¹, fueron asignados a los estiramientos de los grupos C=O y CO de los grupos acetilo, lo que confirma que el

proceso de acetilación fue exitoso. El aumento en el valor de los grados de sustitución aumento la intensidad de absorción de C=O e indujo un cambio hacia los números de olas más altos. Mientras tanto la disminución de la intensidad de los OH en la banda de estiramiento indicó una acetilación parcial de las muestras.

FTIR probetas elaboradas.

Se realizó la caracterización química de las 5 probetas elaboradas correspondientes a 5 tratamientos diferentes, en los que variaba las horas de acetilación de la microcelulosa empleada, además de una probeta testigo donde no se utilizó glicerol. Los resultados del análisis FTIR se muestran enseguida.

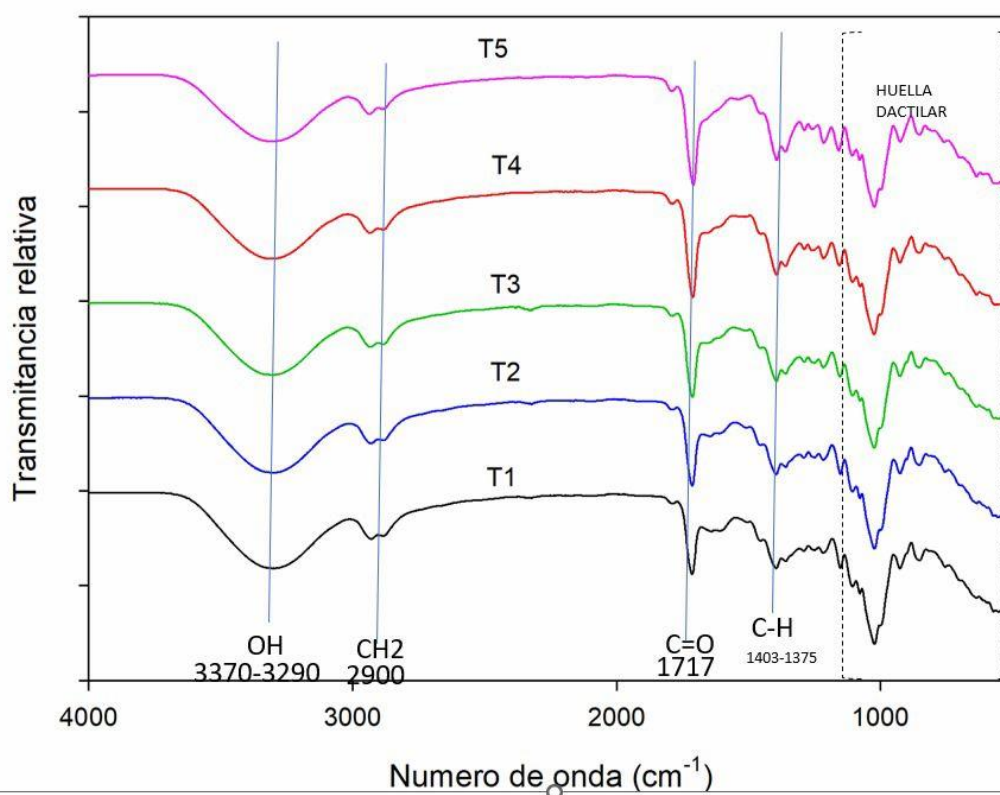


Figura 3. Grafica con resultados de la caracterización química de las probetas por medio de FTIR: T1; Mc 0 hr acetilación, T2; Mc 1 hr acetilación, T3; Mc 3 hr acetilación, T4; Mc 5 hr acetilación, T5; 5 hr acetilación y sin PEG.

En la figura 5 se muestran los resultados de los análisis FTIR realizados a cada probeta por tratamiento elaborada, en ella se puede apreciar un estiramiento en la banda ubicada

en los 3370-3290 cm^{-1} correspondiente a los OH de los grupos hidroxilo, de igual manera, se aprecia un ligero estiramiento en la banda ubicada en 2900 cm^{-1} por el estiramiento de CH de los alcanos, es correspondiente a los grupo metilo ..., en la banda ubicada en los 1717 cm^{-1} correspondiente a los grupos carbonilo

7.1.2. Grados de sustitución de la Mc acetilada

Los resultados en cuanto a los grados de sustitución y el porcentaje de acetilo obtenidos por titulación se muestran a continuación.

Tabla 4. Grados de sustitución y % de acetilación de la microcelulosa acetilada (media \pm desviación estándar)

Muestra	GS	% acetilo
0H	-----	-----
1H	0.4167 \pm 0.1258 ^b	10.030 \pm 2.7080 ^b
3H	0.5733 \pm 0.0750 ^{ab}	12.863 \pm 1.7042 ^{ab}
5H	0.8667 \pm 0.1650 ^a	18.777 \pm 2.8630 ^a

^a y ^b Valores con diferentes literales del superíndice en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) entre tratamientos. 0H, microcelulosa sin acetilar; 1H, acetilada por 1 h; 3H, acetilada por 3h; 5H, acetilada por 5h.

En la tabla 4 se muestran los resultados de los porcentajes de acetilación y de los grados de sustitución realizados a las muestras de microcelulosa acetilada empleada para elaborar las probetas en el presente experimento, tanto los grados de sustitución como el porcentaje de acetilación no se presentaron en cantidades tan altas como las que se esperaba, esto se ocurrió ya que se utilizó el ácido acético como agente acilante, sin embargo, este funciona más como agente activador según la literatura reportada y no es el agente acilante adecuado; la función que cumple este es permitir la entrada de los grupos acetilo y la sustitución de los grupos hidroxilo.

7.2. Evaluación de las propiedades antimicrobianas y solubilidad

Como parte de la evaluación de la efectividad del presente experimento, se realizó las pruebas antimicrobianas de las probetas y el % de solubilidad para comprobar la efectividad de la formulación implementada en un uso como empaque activo.

7.2.1. Antimicrobianas

Se realizaron las pruebas antimicrobianas a las probetas elaboradas frente a microorganismos gram positivo (*Staphylococcus aureus*), gram negativo (*Escherihia coli*) y un hongo *Aspergillus niger*. Para las pruebas frente a las bacterias se utilizó la prueba de medición de la opacidad de acuerdo a la escala del tubo 4 de McFarland midiendo la absorbancia de los tubos a 540 nm en un espectrofotómetro Genesys 10 UV-Vis. Para las pruebas contra *Aspergillus niger* se realizó la siembra en cajas Petri y se midieron los halos de inhibición para medir su eficacia.

7.2.1.1. Opacidad de acuerdo al tubo número 4 de la escala de McFarland

Cinética de crecimiento *E. coli*.

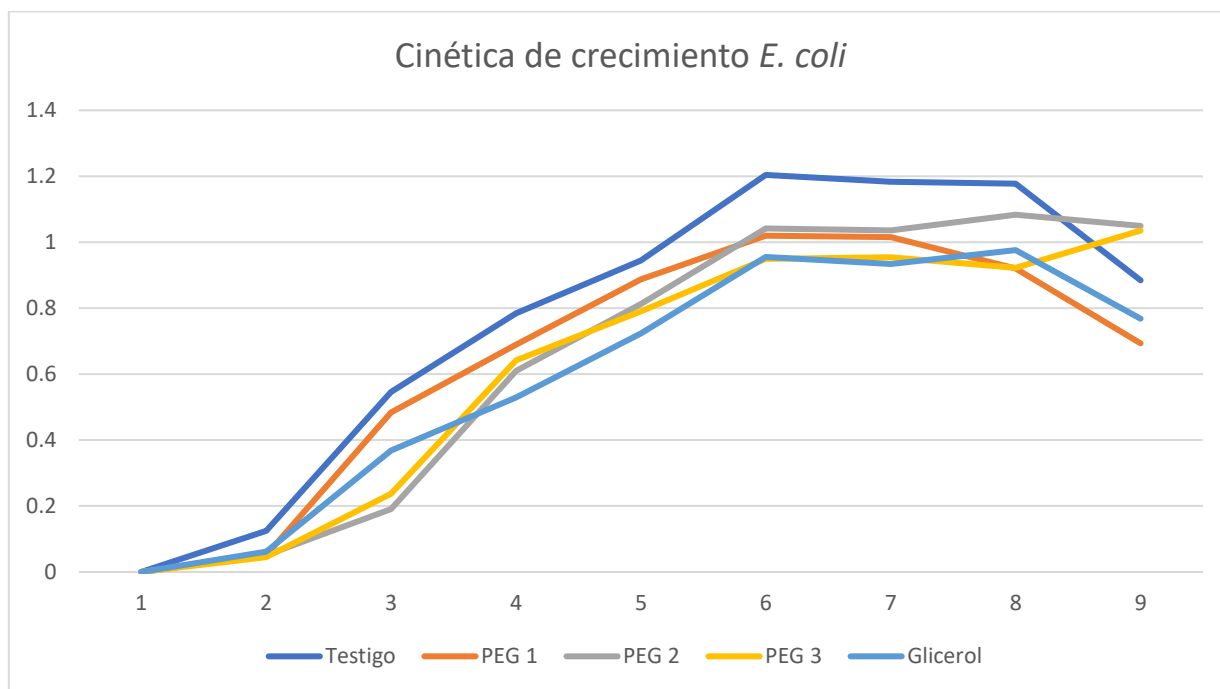


Figura 4. Cinética de crecimiento de *E. coli* frente a las probetas elaboradas: Testigo; mc sin acetilar, PEG 1; mc acetilada por 1 hr, PEG 2; mc acetilada por 3 hr, PEG 3; mc acetilada por 5 hr, Glicerol; mc acetilada por 5 hr sin PEG.

De la figura 6 es posible apreciar la cinética para el crecimiento de la muestra de *E. coli*, donde es posible apreciar que el testigo presenta un crecimiento sostenido desde la primer hora de incubación y presentando diferencias estadísticamente significativas con con el resto de las muestras analizadas, la cuales evidencian reducciones de 0.3 ciclos logarítmicos en promedio con respecto al testigo, siendo la muestra que contiene glicerol como agente plastificante la que presenta el menor crecimiento seguido de la que contiene microcelulosa acetilada por 5 h, dicho comportamiento puede deberse a que el glicerol es referenciado como un agente antimicrobiano por sí mismo, por lo cual pudo haber potenciado dicho efecto en sinergia con el AEO.

Cinética de crecimiento de *S. aureus*

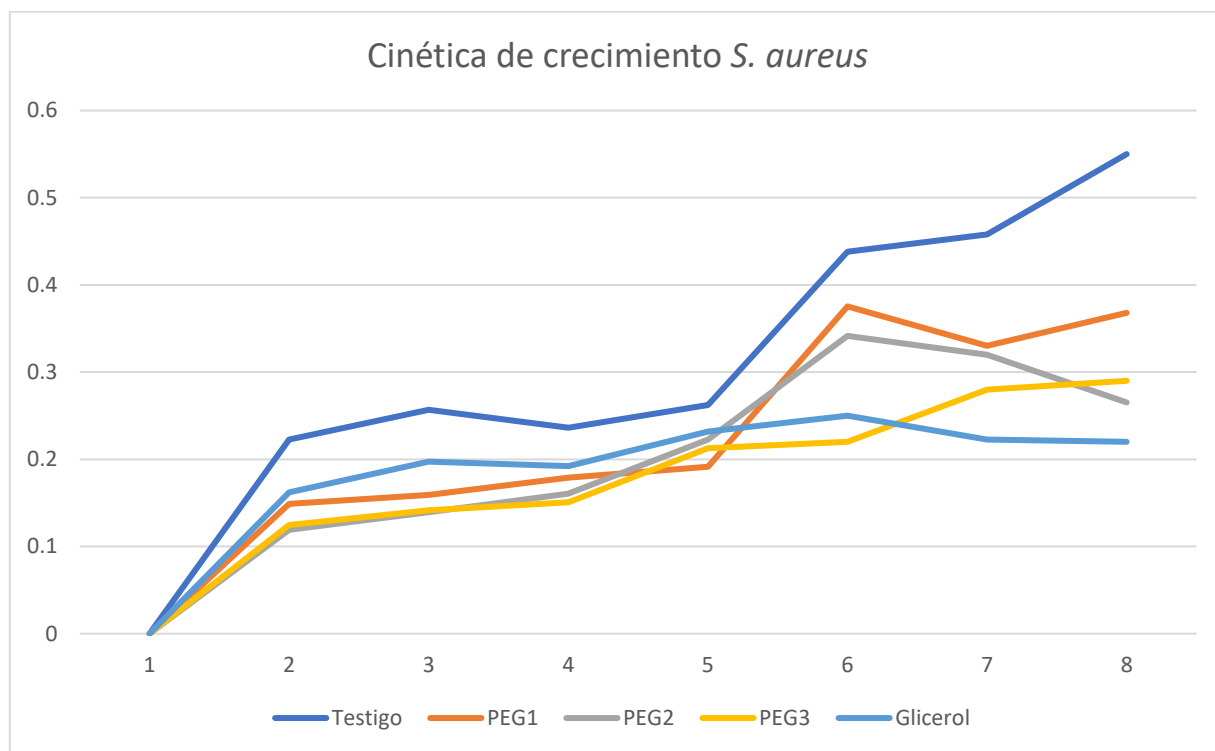


Figura 5. Cinética de crecimiento de *S aureus* frente a las probetas elaboradas: Testigo; mc sin acetilar, PEG 1; mc acetilada por 1 hr, PEG 2; mc acetilada por 3 hr, PEG 3; mc acetilada por 5 hr, Glicerol; mc acetilada por 5 hr sin PEG.

De la figura 7 es posible apreciar la cinética de crecimiento para *S. aureus* en presencia de los materiales en estudio, donde es posible apreciar que las probetas funcionalizadas con AEO presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo con reducciones de hasta 0.7 ciclos logarítmicos destacándose las muestras conteniendo glicerol como agente plastificante y la que contiene PEG y microcelulosa acetilada por 5 h. Comparando los resultados de la inhibición del crecimiento de *E. coli* con los de *S. aureus* es posible apreciar que el segundo evidenció mayor sensibilidad, esto obedece a la naturaleza de su membrana celular ya que es un microorganismo gran positivo, los cuales han sido reportados como altamente sensibles al AEO.

7.2.1.2. Halos de inhibición

Para comprobar la capacidad de las probetas contra *Aspergillus niger*, se realizó la siembra de este en cajas Petri, se depositaron placas de tamaño y espacio uniforme entre ellas y se llevaron a incubar el tiempo necesario que en este caso fue de 32 horas para que se lograra diferenciar los halos de inhibición y medirlos. Las muestras se realizaron por triplicado por cada tratamiento, los resultados del promedio de cada muestra se presentan más adelante.

Tabla 5. Resultados del promedio de los halos de inhibición de los diferentes tratamientos frente a *Aspergillus niger*, T1; mc con 1 hora de acetilación más PEG, T2; mc con 3 hr de acetilación más PEG, T4; mc con 5 hr de acetilación más PEG, T4; mc con 5 hr de acetilación sin PEG.

Tratamiento	Halo de inhibición
1	0.5 mm
2	0.4 mm
3	0.5 mm

En la tabla 5 se muestran los resultados de los halos de inhibición, todos los resultados fueron un tanto similares, sin embargo, se logra apreciar que para el tratamiento 1 y el tratamiento 3 los cuales corresponden a los que en la formulación existía PEG además de la mc acetilada por 1 hr y 5 hr respectivamente, estos fueron los dos mejores tratamientos que presentaron capacidad antimicrobiana contra *Aspergillus niger*.

7.2.2. Solubilidad de las películas elaboradas

Las probetas obtenidas de cada tratamiento se sometieron a una prueba de solubilidad mediante la metodología proporcionada por *, en donde se colocó una muestra de 1 g en 50 mL de agua a agitación constante durante 2 horas y se filtró el restante para obtener resultados, las pruebas se realizaron por triplicado y se promediaron los resultados de cada tratamiento. Los resultados de dichas prueba se muestran a continuación:

Tabla 6. Resultados de la solubilidad de las probetas de los 5 tratamientos diferentes: T1; Mc 0 hr acetilación, T2; Mc 1 hr acetilación, T3; Mc 3 hr acetilación, T4; Mc 5 hr acetilación, T5; 5 hr acetilación y sin PEG.

Tratamiento	% Solubilidad
1	50.3333333
2	53.3
3	47.9
4	57.13333333
5	60.1

En la anterior tabla 6, se puede apreciar claramente la diferencia entre tratamientos de acuerdo a los porcentajes de solubilidad, presentándose así que el tratamiento con menor porcentaje de solubilidad fue el 3 el cual estaba conformado por microcelulosa acetilada durante 3 hr y una relación de 90%-10% en cuanto a los plastificantes glicerol y polietilenglicol respectivamente. Este resultado se comparó directamente con el tratamiento número 5 que en su composición estaba la microcelulosa acetilada por 5

horas y una relación de 3:1 100% de plastificante del glicerol, ya que este tratamiento presentó el nivel más alto de porcentaje de solubilidad, los resultados para la solubilidad de las probetas elaboradas con la nueva formulación en donde se añadió una relación de 90%-10% de glicerol-polietilenglicol fueron satisfactorios por el hecho de que en los tratamientos 1-4 bajo el nivel de solubilidad que era uno de los objetivos principales que se buscaba al añadir el nuevo plastificante. Como se mencionó anteriormente, el tratamiento numero 3 fue el tratamiento con menor porcentaje de solubilidad lo que lo convierte en el mejor tratamiento de acuerdo a esta característica, presentándose así una reducción del 12% de la solubilidad en las películas al incorporar polietilenglicol en compañía del glicerol como plastificante.

Para comprobar la capacidad de las probetas contra *Aspergillus niger*, se realizó la siembra de este en cajas Petri, se depositaron placas de tamaño y espacio uniforme entre ellas y se llevaron a incubar el tiempo necesario que en este caso fue de 32 horas para que se lograra diferenciar los halos de inhibición y medirlos. Las muestras se realizaron por triplicado por cada tratamiento, los resultados del promedio de cada muestra se presentan más adelante.

Tabla 7. Resultados del promedio de los halos de inhibición de los diferentes tratamientos frente a *Aspergillus niger*, T1; mc con 1 hora de acetilación más PEG, T2; mc con 3 hr de acetilación más PEG, T4; mc con 5 hr de acetilación más PEG, T4; mc con 5 hr de acetilación sin PEG.

Tratamiento	Halo de inhibición
1	0.5 mm
2	0.4 mm
3	0.5 mm
4	0.3 mm

En la tabla * se muestran los resultados de los halos de inhibición, todos los resultados fueron un tanto similares, sin embargo, se logra apreciar que para el tratamiento 1 y el tratamiento 3 los cuales corresponden a los que en la formulación existía PEG además de la mc acetilada por 1 hr y 5 hr respectivamente, estos fueron los dos mejores tratamientos que presentaron capacidad antimicrobiana contra *Aspergillus niger*.

VIII. CONCLUSIONES

Se realizó un biococomposito a diferentes grados de hidrofiliidad usando como materiales base almidón, microcelulosa a diferentes grados de acetilación para cambiar su hidrofiliidad, polisuccinimida, glicerol y polietilenglicol como nuevo plastificante para cambiar también el nivel de hidrofiliidad otorgado por el almidón, además de utilizar el aceite esencial de orégano como agente funcionalizante, lo que lo convierte en un empaque activo con capacidad antimicrobiana.

Se realizaron las pruebas antimicrobianas para probar la efectividad de las placas contra un microorganismo gram positivo como *S. aureus*, uno gram negativo como *E. coli* y un hongo como *A. niger*, se obtuvieron resultados satisfactorios para las 3 pruebas antimicrobianas mostrando más sensibilidad *S. aureus* ya que es un microorganismo gram positivo, además de mostrar unos buenos halos de inhibición contra *A. niger*, de igual manera, se obtuvo una pausa en la cinética de crecimiento con *E. coli*.

Para comprobar si los grados de hidrofiliidad habían mejorado se realizó la prueba de solubilidad en la que se obtuvieron de igual manera resultados satisfactorios ya que sa comparación de la anterior formulación donde se usaba solamente el glicerol, en la nueva formulación donde se añadió polietilenglicol, se logró disminuir a un 12% la solubilidad en el tratamiento 3 donde se implementó microcelulosa acetilada a 3 horas.

Por lo que se concluye que los resultados obtenidos de acuerdo a las pruebas fueron satisfactorios cumpliendo las necesidades del presente trabajo evaluado.

IX. LITERATURA CITADA

- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., & Di Ilio, C. (2013). Escherichia coli in Europe: An overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12), 6235–6254. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126235>
- Benbettaieb, N. (2014). *Active and Intelligent Packaging*.
- Bernal R., M., & Guzmán, M. (1984). El Antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-bauer. *Biomédica*, 4(3–4), 112. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v4i3-4.1891>
- Carhuallanqui, A., Salazar, M. E., & Ramos, D. (2020). Efecto antimicrobiano del aceite esencial de Orégano frente a *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* Antimicrobial effect of the essential oil of Oregano against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Rev. Investig. Altoandín*, 22(1), 25–33. <http://dx.doi.org/10.18271/ria.2020.530>
- Cevallos, V., & Londoño, L. (2018). *ACEITES ESENCIALES EN LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS* Valeria Ceballos Toro , Lina M. Londoño Giraldo. 1–13. <file:///H:/3659-Texto del artículo-6039-1-10-20181029.pdf>
- Chacha, J. S., Ofoedu, C. E., & Xiao, K. (2022). *Essential oil- based active polymer- based packaging system : A review of its effect on the antimicrobial , antioxidant , and sensory properties of beef and chicken meat*. June, 1–28. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16933>
- Cheng, L., Zhang, D., Gu, Z., Li, Z., Hong, Y., & Li, C. (2018). Preparation of acetylated nanofibrillated cellulose from corn stalk microcrystalline cellulose and its reinforcing effect on starch films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111(2017), 959–966. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.056>
- D'souza, A. A., & Shegokar, R. (2016). Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13(9), 1257–1275. <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1182485>
- Decana, P. (2015). *Universidad Nacional Mayor de San Marcos Síntesis y caracterización de nanopartículas de quitosano - poliácido aspártico conteniendo isoniazida para el tratamiento de tuberculosis Para optar el Título Profesional de Química*.

- Feitosa, A. C., Rodrigues, R. M., Angel, E., Torres, T., & Silva, J. F. M. (2017). *Staphylococcus aureus em alimentos*.
- Guirado-moreno, C., Guembe-garcía, M., Rovira, J., Melero, B., Arnaiz, A., María, A., García, M., & Vallejos, S. (2022). *Metal-free organic polymer for the preparation of a reusable antimicrobial material with real-life application as an absorbent food pad* *Lara Gonz a*. 33(January). <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100910>
- HORNA QUINTANA, G., SILVA DIAZ, M., VICENTE TABOADA, W., & TAMARIZ ORTIZ, J. (2012). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Revista Medica Herediana*, 16(1), 39. <https://doi.org/10.20453/rmh.v16i1.862>
- Jalalvandi, E., & Shavandi, A. (2018). Polysuccinimide and Its Derivatives: Degradable and Water Soluble Polymers (Review). *European Polymer Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.08.056>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic Escherichia coli. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Kowalska-krochmal, B., & Dudek-wicher, R. (2021). *The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance*.
- Maisanaba, S., Pichardo, S., Prieto, A. I., & Jos, A. (2016). *ce pt cr*. 9129(April). <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1175010>
- Majumdar, A., Pradhan, N., Sadasivan, J., Acharya, A., Ojha, N., Babu, S., & Bose, S. (2018). Food Degradation and Foodborne Diseases: A Microbial Approach. In *Microbial Contamination and Food Degradation*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811515-2.00005-6>
- Mousavi Khaneghah, A., Hashemi, S. M. B., & Limbo, S. (2018). Antimicrobial agents and packaging systems in antimicrobial active food packaging: An overview of approaches and interactions. *Food and Bioproducts Processing*, 111, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.05.001>
- Oyarzabal, M. E. B., Schuch, L. F. D., Prestes, L. S., Schiavon, D. B. A., Rodrigues, M. R. A., & de Mello, J. R. B. (2011). Antimicrobial action of *Origanum vulgare* L. essential oil against bacteria isolated from bovine milk | Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas en leche de bovino.

- Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(3), 260–266.
- Park, J. Y., & Seo, K. S. (2019). *Staphylococcus aureus* 21. <https://doi.org/10.1128/9781555819972.ch21>
- Rene Ceron, A. M. (2013). the Hydrophilicity Problem of Starch Based Plastic Materials O Problema Do Hidrofilicidade Do Materiais Plásticos Derivados Do Amido. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial Edición Especial*, 2, 41–48.
- Rivera, C., Contreras, F., Ariza, W., Bonilla, S., & Cruz, A. (2019). respuesta a la consciencia ambiental de los Consumidores. *Realidad Empresarial*, 7, 2–8.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J., & Van Dijck, P. (2002). On the safety of *Aspergillus niger* - A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(4–5), 426–435. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1032-6>
- Soltani Firouz, M., Mohi-Alden, K., & Omid, M. (2021). A critical review on intelligent and active packaging in the food industry: Research and development. *Food Research International*, 141(January), 110113. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110113>
- Vargas Pérez, A. K. (2017). *Diseño y modelado de una máquina para fabricar envases biodegradables*.
- Wyrwa, J., & Barska, A. (2017). Innovations in the food packaging market : active packaging. *European Food Research and Technology*, 243(10), 1681–1692. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2878-2>
- Yam, K. L., Takhistov, P. T., & Miltz, J. (2005). Conceptual framework of intelligent packaging. *Journal of Food Science*, 70(1), 1–10. [http://lib3.dss.go.th/fulltext/Journal/Journal_of_food_science/2005_v.70/no.1/23279jfsv70n1pR0001-0010ms20040382\[1\].pdf](http://lib3.dss.go.th/fulltext/Journal/Journal_of_food_science/2005_v.70/no.1/23279jfsv70n1pR0001-0010ms20040382[1].pdf)
- Yildirim, S., & Röcker, B. (n.d.). *Natural Principles in Active and Intelligent Food Packaging for Enhanced Protection and Indication of Food Spoilage or*.