

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA**

**“ANTONIO NARRO”**

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

**Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos**



**“EVALUACIÓN DEL ATRAPAMIENTO Y LA LIBERACIÓN DEL ACEITE  
ESENCIAL DE ORÉGANO (*Lippia berlandieri schauer*) EN POLISUCCINIMIDA”.**

**POR:**

**LAURA MARÍA SOLÍS SALAS**

**TESIS**

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

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. JUNIO 2013.**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

“EVALUAR EL ATRAPAMIENTO Y LA LIBERACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE  
ORÉGANO (*Lippia berlandieri schauer*) EN POLISUCCINIMIDA PARA EL  
DESARROLLO DE UN ENVASE INTELIGENTE.”

Por:

**LAURA MARÍA SOLÍS SALAS**

Tesis

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

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Aprobada por el comité de tesis:

---

M.C. María Hernández González

Asesor principal

---

Dra. Catalina Pérez Berumen

Co-asesor

---

M.C. Mildred I. Flores Verástegui

Vocal

---

Dra. Claudia A. Rodríguez González

Vocal suplente

## Dedicatorias

“solo quien es capaz de mirar con humildad el cielo, podrá mirar con valentía la tierra...”

A **Dios**, por permitirme vivir cada día y darme la fortaleza para luchar siempre por lo que quiero, así como por las personas que has puesto en mi camino.

A mi madre **Norela H. Salas Soto**, por ser el motor de mi vida, por creer y confiar en mí a ciegas, por la dedicación que pusiste en mí y mis hermanos, por enseñarme a luchar por lo que quiero y que no hay obstáculo en la vida que no pueda superar, pero sobre todo por el amor que me das.

A mi tío **Gerardo Salas Soto**, porque has sido mi padre, y has creído en mí y siempre me has impulsado en todo, y por todo tu amor.

A mis hermanos, **Arturo Salas** y **Gilberto Salas**, por estar a lo largo de este camino, por desvelarse conmigo cada que estudiaba o hacía tareas, por hacerme reír, cuidarme y amarme los amo feos.

A mis tíos, **Verónica Salas**, **Carmen Salas**, **Erika Gamiño**, **Luis Nolasco**, **Silvia Flores**, **Martín Salas** por estar siempre a mi lado, apoyándome e impulsándome para culminar siempre mis sueños, y por todo el amor que me han brindado.

A mis primos que más que primos son mis hermanos, **Alex, Tania, Chris, Diego, Lary, Gabo, Diana**, gracias por todo su apoyo y todos los momentos vividos, los amo hermanos!

A mis sobrinos, **Reginita, Dany, Lidia**, por inyectarle alegría a mi vida, los amo.

A mis amigos los “Perfidos”, **Gaby Victorino, Mary Victorino, Héctor Velázquez, Karen Trejo, Lalo Pérez**, por haber estado a lo largo de este camino y que se nunca se irán de mi vida, los quiero!

## Agradecimientos

A mi alma mater la “**Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**”, por permitirme ser parte de esa casa de estudios, y brindarme un hogar por casi 5 años, así como la oportunidad de formarme profesionalmente.

A mi grupo de amigos “**los pérfidos**” ahora ingenieros: Mary Victorino, Karen Trejo, Gaby Victorino, Héctor Velázquez, Lalo Pérez, Pamelita Gamboa, por su apoyo durante este proyecto, así como durante toda la carrera, por todos los momentos vividos y su cariño.

Así como a toda mi generación **CXIV**, con quienes juntos finalizamos este camino, y pase un sin fin de experiencias, e hicieron mi estancia en mi alma mater más divertida y gratificante. En especial a Ulises Solís y María Rodríguez por su apoyo durante la realización de este trabajo, y por su amistad. Así como a Marlen Ramírez por su amistad de tanto tiempo

A mis maestros quienes forjaron mi educación académica: **Dr. Mario Alberto Cruz**, **Dr. Heliodoro de la Garza Toledo**, **Dra. Dolores Gabriela Martínez**, **M. Ed. Ma. De Lourdes Morales**, **QFB. Carmen Julia García**, **Mc. Patricia Dorantes**, **Dra. Ana Verónica Charles**, **Lic. Laura Olivia Fuentes**, **Mc. Sarahí Rangel Ortega** por su apoyo y amistad, **Q.F.B. Carlos Alberto Agustince** por su ayuda durante toda mi carrera pero sobre todo por su amistad.

Especialmente a la **Mc. Mildred Flores Verástegui** por su apoyo para la realización de este trabajo, así como haber formado parte de mi jurado y por su valiosa amistad. A la **Dra. Catalina Pérez Berumen**, por su valiosa contribución, su apoyo y tiempo para la realización de este trabajo así como haberme proporcionado el polímero con el que se desarrolló este trabajo, a la **Mc. María Hernández González** por apoyarme en la realización de este trabajo, por el tiempo incondicional invertido en dicho proyecto y en asesorarme de manera objetiva, por la confianza que tuvo en mí, por el apoyo durante mi carrera pero sobre todo por la amistad que me brinda.

Al **Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos** por permitirme trabajar en sus laboratorios, a la **Universidad Autónoma de Coahuila** en especial al laboratorio de química orgánica por haberme permitido trabajar en sus instalaciones, y por último y no menos importante a la **Universidad de Cd. Juárez** en especial a la **Dra. Claudia Alejandra Rodríguez González**, por la toma de las fotografías con microscopio electrónico de barrido.

A **Cheli, Cristy, Carlitos**, por su apoyo para la realización de este trabajo, así como al laboratorio de ciencias básicas y al laboratorio de parasitología.

# Índice General

Dedicatoria.....	II
Agradecimientos.....	IV
Índice general.....	VI
Índice de cuadros.....	X
Índice de figuras.....	XI
Resumen.....	XII
<b><u>Capítulo 1</u></b>	
1.1. Introducción.....	15
1.2. Justificación.....	17
1.3. Hipótesis.....	19
1.3.1. Hipótesis nula.....	19
1.4. Objetivos.....	19
1.4.1. Objetivo general.....	19
1.4.2. Objetivos específicos.....	19
<b><u>Capítulo 2</u></b>	
<b>2.1. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>21</b>
2.1.1. Deterioro.....	21
2.1.1.1. Deterioro de alimentos.....	21
2.1.2. Microorganismos Patógenos.....	22
2.1.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	23

2.1.3. Aditivos.....	24
2.1.3.1. Aditivos Sintéticos.....	25
2.1.3.2. Ventajas y desventajas de aditivos sintéticos.....	26
2.1.3.3. Aditivos Naturales.....	27
2.1.3.4. Ventajas y desventajas de aditivos naturales.....	27
2.1.4. Aceites esenciales.....	28
2.1.4.1. Aplicación de los aceites esenciales.....	29
2.1.5. Orégano.....	29
2.1.5.1. Clasificación taxónomica.....	30
2.1.5.2. Usos del orégano.....	32
2.1.5.3. Propiedades del orégano.....	33
2.1.5.4. Países productores de orégano.....	33
2.1.5.5. Estados productores de orégano en México.....	33
2.1.6. Encapsulación.....	34
2.1.6.1. Microencapsulación.....	35
2.1.6.2. Microcápsula.....	36
2.1.6.3. Métodos para la microencapsulación.....	36
2.1.6.3.1. Secado por aspersion.....	37
2.1.6.3.2. Atrapamiento en liposomas.....	37
2.1.6.3.3. Extrusión.....	37
2.1.6.3.4. Polimerización de interfase.....	38
2.1.7. Biopolímeros.....	38
2.1.8. Succinimida.....	39
2.1.8.1. Ácido L-aspártico.....	40
2.1.9 Caracterización de polímeros.....	41

### **Capítulo 3**

3.1. Materiales y metodología.....	43
3.1.1. Localización del experimento.....	43

3.1.2. Metodología.....	44
3.1.2.1. Etapa 1. Atrapamiento del aceite esencial de orégano en un polímero (succinimida).....	44
3.1.2.2. Etapa 2. Caracterización del polímero (succinimida) y su interacción con el aceite esencial de orégano.....	44
3.1.2.2.1. Determinación del peso molecular mediante un osmómetro de presión de vapor.....	44
3.1.2.2.2. Observación en microscopía electrónica de barrido.....	45
3.1.2.2.3. Análisis de infrarrojo por transformada de Fourier.....	45
3.1.1.2.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	45
3.1.2.3. Etapa 3. Valorar la eficiencia de la liberación del principio activo del vehículo.....	46
3.1.2.3.1. Viabilización e identificación de la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	46
3.1.2.3.2. Preparación del inóculo al tubo número 4 de la escala de McFarland.....	46
3.1.2.3.3. Valoración de la efectividad del antimicrobiano fijado al polímero.....	47
<b><u>Capítulo 4</u></b>	
4.1. Resultados y discusión.....	49
4.1.1. Etapa 1. Atrapamiento del aceite esencial de orégano en un polímero (polisuccinamida).....	49
4.1.2. Etapa 2. Caracterización del polímero (succinimida) y su interacción	

con el aceite esencial de orégano.....	52
4.1.2.1. Determinación del peso molecular mediante un osmómetro de presión de vapor.....	52
4.1.2.2. Observación de la estructura polimérica mediante microscopía electrónica de barrido.....	52
4.1.2.3. Análisis de infrarrojo por transformada de Fourier.....	55
4.1.2.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	57
4.1.3. Etapa 3. Valorar la eficiencia de la liberación del principio activo del vehículo .....	59
4.1.3.1. Viabilización e identificación de la cepa <i>Staphylococcus aureus</i> .....	59
4.1.3.2. Identificación de la cepa <i>Staphylococcus aureus</i> .....	60
4.1.3.3. Viabilización de la cepa <i>Staphylococcus aureus</i> .....	60
4.1.3.4. Preparación del inóculo al tubo número 4 de la escala de McFarland.....	63
4.1.3.5. Valoración de la liberación del antimicrobiano.....	63
<b><u>Capítulo 5</u></b>	
5.1. Conclusiones.....	68
<b><u>Capítulo 6</u></b>	
6.1. Apéndice 1. Análisis de t-student de la etapa 1. Atrapamiento del aceite esencial de orégano en un polímero (succinimida).....	69
6.2. Apéndice 2. Análisis de t-student de la etapa 4. Valoración de la eficacia de la liberación del principio activo del vehículo.....	70
6.3. Apéndice 3. Análisis de los elementos presentes en el polímero en su estado original.....	71
6.4. Apéndice 4. Análisis de los elementos presentes en el polímero con el aceite de orégano adherido.....	71

6.4. Apéndice 5. Análisis de los elementos presentes en el polímero con el antimicrobiano en contacto con la cepa.....	71
--	----

## **Capítulo 7**

7.1. Bibliografía.....	72
------------------------	----

## **ÍNDICE DE CUADROS**

Cuadro N°1. Microorganismos Patógenos a nivel de industria alimentaria.....	23
Cuadro N°2. Límites de tres factores ecológicos para el desarrollo de <i>S. aureus</i> .....	24
Cuadro N°3. Principales especies conocidas en México como orégano.....	31
Cuadro N°4. Ingredientes encapsulados utilizados en alimentos.....	34
Cuadro N°5. Tipos de coberturas usadas para microencapsulación.....	35
Cuadro N°6. Absorbancia con respecto a escala de Mcfarland.....	47
Cuadro N°7. Medias de absorción del antimicrobiano diluido o libre en función al tratamiento.....	49
Cuadro N°8. Temperatura de fusión para el polímero en sus tres facetas.....	59
Cuadro N°9. Medias de la cinética de crecimiento en Log 10 de U.F.C./ml de la cepa pura de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	61
Cuadro N°10. Medias de Log 10 d U.F.C./ml en la liberación del antimicrobiano.....	65
Cuadro N°11. Análisis de t-student de la etapa 1. Atrapamiento del aceite	

esencial de orégano en un polímero (succinimida).....	69
Cuadro N°12. Análisis de t-student de la etapa 3. Valoración de la efectividad del antimicrobiano fijado al polímero.....	70

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura N°1. Estructura química de los principales componentes del orégano.....	30
Figura N°2. Estructura química de succinimida.....	40
Figura N°3. Reacción de la aspartasa.....	41
Figura N°4. Gráfica de medias de absorción con relación al tipo de vehículo.....	50
Figura N°5. Gráfica en relación vehículo y tiempo.....	51
Figura N°6. Viruta de polisuccinimida.....	52
Figura N°7. Polímero original X400.....	53
Figura N°8. Polímero original X3700.....	53
Figura N°9. Polímero con antimicrobiano X500.....	54
Figura N°10. Polímero con antimicrobiano X3700.....	54
Figura N°11. Polímero con antimicrobiano y en contacto con la cepa de <i>S. aureus</i> X500.....	55
Figura N°12. Polímero con antimicrobiano y en contacto con la cepa de <i>S. aureus</i> X3700.....	55

Figura N°13. Infrarrojo del polímero original.....	56
Figura N°14. Infrarrojo del polímero con aceite esencial.....	56
Figura N°15. DSC para el polímero en estado original.....	57
Figura N°16. DSC para el polímero con aceite esencial.....	58
Figura N°17. DSC para el polímero con aceite esencial y en contacto Con la cepa de <i>S. aureus</i> .....	58
Figura N°18. Morfología microscópica <i>Staphylococcus aureus</i> .....	60
Figura N°19. Morfología macroscópica <i>Staphylococcus aureus</i> .....	60
Figura N°20. Gráfica de la cinética de crecimiento de la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	62
Figura N°21. Antibiograma para el antimicrobiano.....	64
Figura N°22. Frotis de <i>S. aureus</i> con el antimicrobiano X3700.....	64
Figura N°23. Frotis de <i>S. aureus</i> con el antimicrobiano X5000.....	64
Figura N°24. Gráfico de medias Log 10 de U.F.C./ml de <i>Staphylococcus Aureus</i> .....	66
Figura N°25. Gráfico de interacción de la concentración.....	67
Figura N°26. Gráfica de la cinética del crecimiento de la cepa <i>S. aureus</i> .....	67

## RESUMEN

El uso de polímeros biodegradables ha ido en aumento en los últimos años debido a su capacidad para transportar compuestos bioactivos así como por su relación amigable con el medio ambiente, aunado a esto la demanda del consumidor y la tendencia de mercado con respecto a los empaques, ha hecho que se abra una puerta en el estudio de estos materiales, para añadir a la matriz polimérica aditivos naturales como el aceite esencial de orégano, con propiedades antimicrobianas y antioxidantes, que permitan alargar la vida de anaquel de los productos de una manera más natural, lo cual otorga beneficios a los usuarios de estos productos; sin embargo y a fin de corroborar que los beneficios potenciales de estos productos sean reales, es indispensable la caracterización puntual tanto de los vehículos como de los principios activos antes citados.

Debido a lo anterior, el presente trabajo realizó la caracterización de algunos factores del polímero (succinimida), el cual se pretende sirva como vehículo para adicionar el aceite esencial del orégano, con fines de conservación alimentaria.

El estudio revela que es un compuesto con un peso molecular de 1780 g/mol, completamente orgánico ya que en el análisis de los materiales constitutivos arroja la presencia de carbono y oxígeno. En cuanto a su morfología se observó que es una estructura uniforme semi porosa con filamentos claros, lo que permitió la absorción del aceite esencial de orégano absorbiéndose en su totalidad, presentando un aspecto redondeado. Se determinó mediante un análisis calorimétrico que su punto de fusión está alrededor de los 130°C con una ligera variación de cerca de 2°C para los diversos tipos de tratamientos a los que fue sometido; polímero libre, con aceite esencial y en contacto con la cepa de *Staphylococcus aureus*.

Para la compatibilidad entre el polímero y el aceite esencial se observó que el vehículo permite que el aceite se fije de mejor forma a su estructura en su estado puro, logrando el punto óptimo de fijación a los 300 minutos de contacto. De igual

manera se pudo apreciar que la liberación del aceite al medio ocurrió sin afectar su capacidad de conservación, dando una inhibición de cerca de 1 ciclo logarítmico en 24 horas de contacto con una cepa de *Staphylococcus aureus*, esto debido a la alta concentración de los compuestos fenólicos responsables de la propiedad antimicrobiana; ya que al poner en contacto solo en polímero con el microbio, no se presentó dicho efecto.

Palabras clave: Orégano, antimicrobiano, *Staphylococcus aureus*, biopolímeros, succinimida

# CAPITULO 1

## 1.1. INTRODUCCIÓN

Desde que el alimento se cosecha, se recoge, se captura o se sacrifica, inicia una serie de etapas de descomposición progresiva.

Todos los seres vivos requieren nutrimentos, por lo que las bacterias, levaduras, mohos, insectos y roedores, entre otros, compiten constantemente con el hombre para consumir su provisión de alimentos.

Los principales factores bióticos causantes de la descomposición de los alimentos son los microorganismos provenientes del ambiente (bacterias y parásitos), y las enzimas presentes en los mismos; así como factores abióticos del ambiente natural tales son: calor y frío, luz, oxígeno, humedad y sequedad. Estos factores provocan diversos cambios físicos y químicos, que se manifiestan por alteraciones de color, olor, sabor, consistencia o textura de los alimentos. En cualquier caso, la actividad de estos agentes destructores puede ser eliminada o controlada con eficacia si el producto alimenticio se conserva adecuadamente.

En muchos casos el objetivo de la conservación no es tan sólo la de preservar el producto en condición comestible, sino, que además, mantenerlo tanto como sea posible en su alta calidad en lo que respecta a olor, apariencia, sabor, y contenido vitamínico (Huerta, B. 2010).

El orégano es una de las riquezas florísticas con las que cuenta el territorio mexicano, se conoce su utilización desde tiempo ancestrales, como planta medicinal y como condimento de platillos regionales. La especie que se encuentra en aproximadamente 24 estados de nuestro país se conoce como *Lippia berlandieri* Schauer (Melendez, N. 2012). El estado de Chihuahua se encuentra entre los principales productores (Gastélum, M *et al.*2008).

El orégano y sus derivados están siendo estudiados, los componentes químicos bioactivos de esta planta principales son el timol, el carvacrol y el p-cimeno, los cuales son fáciles de obtener por medio de la extracción del aceite esencial y se les atribuyen actividades antioxidantes y antimicrobianas, además que son los responsables del olor característico.

La actividad antimicrobiana depende de la composición química del aceite esencial del orégano, la cual está relacionada con la especie del orégano, condiciones geográficas, períodos de cosecha y método de extracción (Gastélum, M *et al.* 2008).

A manera de darle un uso extra a los aceites esenciales, estos están siendo utilizados para la elaboración de envases de barrera, estudios en el área de envasado de alimentos están experimentando un gran desarrollo, los cuales favorecen la interacción envase/alimento, respondiendo a la demanda del consumidor y las tendencias del mercado con respecto a los empaques, el cual ya no debe de ser solo un elemento externo al producto, si no que debe ser capaz de prolongar la vida útil del producto e incorporar valor agregado a éste (Illanes, J. 2008). Los sistemas alimentarios activos de embalaje se basan en materiales en los que algunos aditivos con propiedades antimicrobianas y/o antioxidantes se añaden a la matriz del polímero, con el objetivo de ampliar la vida útil de los productos dando así mayor seguridad al consumidor (Garrigós, M; *et al.* 2012).

Los polímeros son una serie de materiales visco elásticos. Las caracterizaciones estructurales y mecánicas son herramientas importantes de la introducción de la medición de las propiedades físicas de polímeros industriales en el campo de la investigación de polímeros biodegradables. Las películas comestibles o películas biodegradables tienen una amplia aplicación en el mercado de la industria por sus propiedades térmicas y mecánicas.

Además de que su composición, estructura y propiedades funcionales de biopolímeros permiten determinar sus posibles aplicaciones (Galicía García. *et al.* 2010).

Cabe mencionar que el uso de biopolímeros como vehículos de sustancias, ha ido aumentando en los últimos años ya que ofrecen la posibilidad de transportar compuestos bioactivos a tejidos, células y compartimentos celulares, una ventaja que sobresale y se puede mencionar es la biodegradabilidad; la cual se hereda a las nanopartículas formadoras del polímero, siendo éstas de organismos vivos como lo son: los polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos, quienes cuentan con dicha propiedad (Bernard, Gontard, y Guilbert, 1998 citado por Sachiko Kaihara Nitta y Keiji Numata, 2013).

## 1.2. JUSTIFICACIÓN

Hay diversas causas que propician la degradación de los alimentos durante su desarrollo ya sea, de preparación, almacenamiento y distribución, siendo una de las principales el ataque microbiano. Para contrarrestarlos, la industria de los alimentos emplea conservantes, en su mayoría de origen sintético. Dicho esto, la utilización de sustancias sintéticas no está siendo muy aceptada por los consumidores, ganando mucho más auge la tendencia por el uso de sustancias naturales u orgánicas, (Fernández, j; *et al.* 2008) ya que se podrían relacionar los compuestos químicos con alergias o enfermedades.

El crecimiento de la petición por el uso de aditivos de origen natural ha favorecido a un incremento en el número de estudios basados en extractos naturales como lo son los aceites esenciales, que son clasificados como *Generalmente Reconocidos como Seguros* (GRAS) por la FDA (Food and Drug Administration) (Garrigós, M. 2012 citado por Persico et al., 2009), pudiéndose tomar en cuenta como una factible alternativa contra los aditivos sintéticos (Garrigós, M. 2012 citado por Valentao; et al., 2002 ).

Es por esta razón, que se ha incrementado el enfoque hacia la búsqueda de nuevas maneras para la conservación de alimentos, por medio de la utilización de sustancias antimicrobianas naturales sobre las sintéticas (Gastélum, M; *et al.*2008).

En este ámbito las especias y sus aceites están siendo muy valorados, aunque cabe mencionar que originalmente el uso de éstas era para modificar, enmascarar o aumentar características organolépticas de los alimentos, aunque actualmente está ampliamente demostrado que pueden prolongar la vida útil del alimento debido a sus propiedades antimicrobianas (Fernández, J; *et al.* 2008).

El envasado se realiza por medio de materiales capaces de prevenir el deterioro de los alimentos envasados, de igual manera el uso de éstos permite reducir la interacción del alimento con el medio que lo rodea, dando como resultado la pérdida o ganancia de aromas, sabores, compuestos oxidantes, así como ataques microbianos (García, A.; *et al.*).

Y así como lo menciona Batlle en el 2005 los “Envases antimicrobianos están aumentando la atención de la industria alimentaria y del envasado, debido a las crecientes demandas de los consumidores por productos mínimamente procesados y sin conservantes”.

El sector de empaque está muy interesado en encontrar disponibilidad en el mercado de empaque biodegradable, de bajo costo, debido a que la mayor demanda de plásticos procesados está en este sector siendo el mayor consumidor final el empaque de alimentos, seguido por la industria farmacéutica y de cosméticos (Ruíz Avilés, G. 2006).

Es por esto que el objetivo del presente proyecto fue el de evaluar el atrapamiento del aceite de orégano (*Lippia berlandieri schauer*) en la matriz polimérica (succinimida) y determinar la liberación del antimicrobiano para no ver afectada esta propiedad, así como se evaluaron algunos puntos de la caracterización del polímero para ampliar el conocimiento sobre este, para que así en trabajos

futuros se pueda desarrollar un envase inteligente del mismo biopolímero con el aceite esencial proporcionándole la actividad antimicrobiana.

### **1.3. HIPÓTESIS**

Es posible el atrapamiento y la liberación del aceite de orégano (*Lippia berlandieri Schauer*) en polisuccinimida, sin afectar la eficiencia de la capacidad inhibitoria del mismo.

#### **1.3.1. HIPÓTESIS NULA**

El atrapamiento y la liberación del aceite esencial del orégano (*Lippia berlandieri Schauer*) en polisuccinimida, afectará la capacidad antimicrobiana.

### **1.4. OBJETIVOS**

#### **1.4.1. OBJETIVO GENERAL**

Establecer las condiciones de atrapamiento y liberación del aceite esencial del orégano (*Lippia berlandieri Schauer*) en polisuccinimida, sin afectar la capacidad inhibitoria del antimicrobiano.

#### **1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar la polisuccinimida

- Realizar y evaluar el atrapamiento del aceite de orégano en la polisuccinimida.
- Valorar la actividad antimicrobiana del aceite esencial del orégano contenido en el material de polisuccinimida.

## **CÁPITULO 2**

### **2.1. MARCO TEÓRICO**

#### **2.1.1. Deterioro**

Todos los alimentos que ingiere el ser humano son de origen biológico, pues derivan de las plantas y de los animales. Este carácter biológico es lo que los hace alterables mediante cambios de origen biótico o abiótico que hacen que el alimento no sea adecuado para el consumo. La acción de enzimas existentes en el propio alimento las cuales, provocan en las biomoléculas reacciones químicas que las transforman y alteran el producto, traería como consecuencia un deterioro físico. O bien, la multiplicación de microorganismos (bacterias y hongos) presentes en ellos, que además de utilizar como nutrientes las biomoléculas de alimentos que sería el resultado de las relaciones ecológicas entre el alimento y el microorganismo, pueden producir sustancias tóxicas sobre él, (Marzo Rojas, I. 2010.).

##### **2.1.1.1. Deterioro de alimentos**

Los alimentos se deterioran fundamentalmente por tres métodos que pueden ser de índole; bioquímico, físico y microbiano.

En el deterioro bioquímico puede ser de dos tipos: enzimático y no enzimático; el deterioro enzimático se origina por la acción de las enzimas (catalizadores biológicos) presentes en los alimentos y se pone de manifiesto por oscurecimiento (por ejemplo; papas, manzanas, y otras frutas), y ennegrecimiento (por ejemplo camarones), cambios de textura, rancidez enzimática de grasas y otras manifestaciones; mientras que el deterioro no enzimático se pone de manifiesto por

rancidez oxidativa de los lípidos y de las grasas, caramelización y otras reacciones de oscurecimiento y oxidación (Barreiro, J.A. *et al.* 1994).

En cuanto al deterioro físico, éste se asocia a cambios físicos ocurridos en el alimento, como, por ejemplo, golpes y cortes en las frutas (los cuales pueden también inducir deterioro bioquímico), ruptura o pérdida de la integridad (por ejemplo huevos), deshidratación superficial por mal empaque y quemado del frío en carnes y vegetales, condensación y ganancia de humedad (puede inducir un deterioro microbiológico), transferencia de olores entre productos, pérdidas de peso por goteo o deshidratación, quemado por exceso de fritura o de cocción y daños físicos causados por plagas (Barreiro, J.A. *et al.* 1994).

Mientras que el deterioro microbiológico es causado por microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) que pueden crecer en el alimento bajo ciertas condiciones. Los microorganismos consumen los nutrientes (proteínas, carbohidratos, grasas y minerales) presentes en el alimento, multiplicándose en éste y produciendo diversas sustancias como consecuencia de su metabolismo, algunas de las cuales pueden ser tóxicas al ser humano. Ello se manifiesta, algunas veces, por la generación de malos olores, sabores, cambios de color y textura.

La contaminación y el deterioro microbiológico de los alimentos son de especial importancia desde el punto de vista de la salud pública, ya que ellos originan la mayoría de las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA). No todos los alimentos deteriorados microbianamente son necesariamente dañinos a la salud.

### **2.1.2. Microorganismos Patógenos**

Como es bien conocido el deterioro microbiano se presenta cuando hay aparición de microorganismos, los cuales pueden ser patógenos o no. Los microorganismos patógenos son agentes capaces de producir enfermedades o daños a un huésped, sea humano, animal o vegetal, de los cuales, a nivel de

industria alimentaria destacan los siguientes, los cuales serán mostrados en el cuadro N°1.

**Cuadro N°1. Microorganismos patógenos a nivel de industria alimentaria.**

	<b>Microorganismos Patógenos</b>				
	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>C. botulinum</i>	<i>B. cereus</i>
<b>Morfología</b>	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
<b>Tinción de Gram</b>	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
<b>Movilidad</b>	Si	Si (flagelos)	Si (en caldos)	Si	Si
<b>Respiración</b>	Aerobios y facultativos anaerobios	Anaerobio facultativo	-	Anaerobio obligado	-
<b>Temperatura</b>	35 -37°C	-	37°C	--	30°C
<b>Ph</b>	3.8 – 9.0	-	7	-	7
<b>Actividad acuosa</b>	0.94	-	-	-	0.93
<b>Esporulado</b>	-	No	No	Si	

Fuente:(Fernández Escartín. 2008)

Dentro de los microorganismos patógenos a nivel industria alimentaria también se puede enmarcar el *Staphylococcus aureus*, el cual se describe a continuación.

#### **2.1.2.1. *Staphylococcus aureus***

Son cocos Gram positivos, no esporulan y no presentan movilidad., son parásitos. Las fuentes de aislamiento del *Staphylococcus aureus* son el hombre y los

animales; del hombre se aísla de la mucosa nasal, nasofaringe y la piel. La fuente de contaminación de *Staphylococcus aureus* a los alimentos es el hombre, en ocasiones el origen animal es definido, como por ejemplo; la mastitis en el ganado lechero (Fernández Escartín. 2008).

Los tres principales factores para que el *Staphylococcus aureus* se desarrolle bien se presentan en el cuadro N°2.

**Cuadro N°2. Límites de tres factores ecológicos para el desarrollo de *S. aureus*.**

Parámetro	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura	7 °C	37 °C	48 °C
Ph	4.3 - 4.0	6.0 – 7.0	9.0 - 10
Actividad acuosa	0.83	0.98	0.99

Fuente:(Fernández Escartín. 2008)

### 2.1.3. Aditivos

El término “aditivo” se define por el Reglamento de Etiquetado de Alimentos (1984) como: “cualquier sustancia, normalmente no considerada o usada como alimento, que se añade o se usa o ésta sobre los alimentos, en cualquier etapa, para alterar sus cualidades de conservación, textura, consistencia, apariencia, olor, alcalinidad o acidez, o para realizar cualquier otra función tecnológica relacionada con el alimento”.

Los procesos de fabricación, transformación, distribución y almacenamiento de productos de índole alimenticios se ven auxiliados por el uso de aditivos químicos

que en su mayoría se aplican durante el procesado o bien al momento del empaclado; encontrándose inmersos en el material diseñado para este objetivo.

La evaluación de la seguridad de los aditivos en alimentos para su uso a nivel mundial es responsabilidad del Comité Conjunto de Expertos sobre Aditivos en Alimentos de la FAO/OMS.

Los aditivos se han clasificado como aditivos sintéticos o inorgánicos y aditivos naturales u orgánicos (Egan, H. *et al.* 1996).

### **2.1.3.1. Aditivos Sintéticos**

Son compuestos que no se encuentran presentes en la naturaleza y que son sintetizados en laboratorio, la aplicación de estos agentes químicos es una actividad muy practicada en la industria de los alimentos para inhibir el crecimiento de microorganismos indeseables (Morales, 2005 citado por Sarahí Rangel, 2007). De los cuales se podrían mencionar:

**Nitratos y nitritos:** Se han usado por muchos años con el cloruro de sodio como componentes de mezclas secas para preparaciones de salmuera en la preparación de carne curada (Cubero, N. *et al.* 2002). Así como tienen uso en la fabricación de algunos quesos. También ayudan a resaltar características de color y sabor en alimentos. La toxicidad de los nitratos depende de la conversión de nitritos por acción bacteriana, tanto durante el curado como en el aparato digestivo (Egan, H. *et al.* 2004), aunque también puede darse la transformación por procesos enzimáticos o por agentes reductores como el ácido ascórbico.

**Ácido Bórico:** El ácido bórico se empleó como conservador antes de ser prohibido en 1925. Sin embargo durante la segunda guerra mundial aproximadamente entre 1939 y 1945 se permitió su uso en margarinas y tocino. Actualmente se usa como conservador para caviar (Egan, H. *et al.* 2004).

Ácido Benzoico: Su uso es común como conservador en forma de sales de calcio, potasio o de sodio pero, para efectos reglamentarios se calcula como el ácido mismo. Este ácido retarda el desarrollo de levaduras, hongos y sólo es eficiente en forma no disociada. Su acción óptima es en pH entre 2.5 y 4.0. (Egan, H. *et al.* 2004). El ácido benzoico es un agente micoestático, actuando sobre enzimas de la célula microbiana, así como su acción a nivel de membrana; interfiriendo la permeabilidad de la pared celular, dando lugar a una acidificación de contenido celular (Cubero, N. *et al.* 2002).

Ácido Sórbico: Por lo general, se incorpora como una de sus sales y resulta más efectivo contra las levaduras y los hongos que contra bacterias por lo que el ácido y sus sales se emplean como agentes fungistáticos. Su acción se debe a la forma no disociada de la molécula, y a que atraviesa la membrana celular del microorganismo actuando en su interior (Cubero, N. *et al.* 2002).

Sulfitos y Sulfatos: Las formas de ión sulfito, bisulfito y metabisulfito, presentan un equilibrio según el pH del medio de disolución. Su acción se da hacia levaduras, hongos y bacterias. Dicha actividad aumenta al disminuir el pH. Una vez ya en la célula del microorganismo, actúa sobre los grupos "tiol" de las proteínas, así como en enlaces disulfuro de las proteínas escindiéndolos, (Cubero, N. *et al.* 2002).

### **2.1.3.2. Ventajas y Desventajas de aditivos sintéticos**

Entre las ventajas se pueden encontrar, bajo costo de producción, fácil producción, paliación a nivel industrial y mayor tiempo de conservación de los alimentos mientras que como desventajas se tienen que poseen propiedades cancerígenas y toxicológicas, así como difícil eliminación del organismo (González, 2005 citado por Rangel Ortega, S. 2007).

### **2.1.3.3. Aditivos Naturales**

Los aditivos antimicrobianos de origen natural cumplen con la misma función, son numerosos compuestos de origen vegetal y animal los que se han estudiado, tanto sus propiedades antimicrobianas como toxicológicas, para tranquilidad de los consumidores que prefieren productos mínimamente procesados y frescos (González, 2005, citado por Hernández Centeno., J.J. 2009). Algunos de estos compuestos se encuentran en investigación para su posible uso en conservación de alimentos sobre todo contra microorganismos patógenos (Hernández, 2003, citado por Hernández Centeno., J.J. 2009). El reto es aislar, purificar, estabilizar e incorporar estos antimicrobianos a los alimentos sin afectar las características sensoriales de los mismos. La actividad antimicrobiana depende de la variedad de la especie o hierba, del tipo de microorganismo y el alimento al que se añadirá (Alatríste, 2004, citado por Hernández Centeno., J.J. 2009).

Los compuestos antimicrobianos de las especias, hierbas y plantas o sus extractos se encuentran generalmente en sus aceites esenciales obtenidos de sus hojas, flores, bulbos y frutos (Hernández Centeno., J.J. 2009).

### **2.1.3.4. Ventajas y desventajas de aditivos naturales**

Para los aditivos naturales se tienen como ventajas; que se encuentran distribuidos en la naturaleza, no presentan toxicidad ni son nocivos para la salud en las dosis aplicadas correctamente, son aceptados por la población, mientras que como desventajas se presentan; un bajo rendimiento, alto costo de producción y requieren análisis minuciosos para su aceptación comercial (González, 2005 citado por Rangel Ortega, S. 2007).

#### 2.1.4. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son una mezcla compleja de moléculas volátiles como: hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres, y fenoles (Zekaría, D.), producidos por el metabolismo secundario de plantas aromáticas y se extraen por destilación a partir de partes de la planta (Abirni, J. *et al.* 2008).

Los aceites esenciales se clasifican con base a diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios.

Consistencia: la consistencia de los aceites esenciales se clasifica en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. Dentro de las esencias fluidas se encuentra que son líquidos volátiles a temperatura ambiente. Mientras que los bálsamos son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización. Las oleorresinas son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas y tienen el aroma de las plantas en forma concentrada.

Origen: se clasifica como natural, artificial y sintético. Los aceites esenciales de origen natural, se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores. Debido a que tienen rendimiento muy bajo, se les adjudica un alto costo. Los de origen artificial, se obtienen a través de procesos de enriquecimiento o combinación de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, los cuales en su mayoría de las veces son producidos por procesos de síntesis química. Naturaleza Química: a pesar de poseer una composición compleja con diferentes tipos de sustancias, los aceites esenciales se pueden clasificar de acuerdo con el tipo de sustancias que son los componentes mayoritarios. Según esto los aceites esenciales ricos en monoterpenos se denominan aceites esenciales monoterpenoides (p.ej. hierbabuena, albahaca, salvia, etc.). Los ricos en sesquiterpenos son los aceites esenciales sesquiterpenoides (p.ej. copaiba, pino, junípero, etc.). Los ricos en fenilpropanos son los aceites esenciales fenilpropanoides (Martínez, A. 2003)

#### **2.1.4.1. Aplicación de los aceites esenciales**

Sus aplicaciones se deben a su eficacia bioactiva como fungicidas (Pina-Vazetal.2004 citado por Abirni, J. *et al.* 2008), bactericidas (Kotzekidouetal.2008 citado por Abirni, J. *et al.* 2008), antioxidantes (Eminagaogluetal.2007 citado por (Abirni, J. *et al.* 2008), antígeno tóxicos (Bakkalieta.2006 citado por Abirni, J. *et al.* 2008) y muchas otras actividades biológicas.

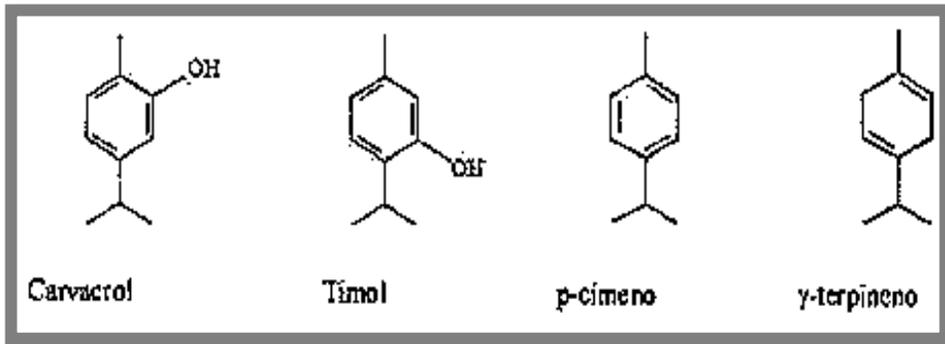
#### **2.1.5. Orégano**

En México existen más de 20 especies comúnmente llamadas orégano; sin embargo la reconocida en el mercado internacional es la especie *Lippia graveolens* H.B.K.

El conocido como orégano mexicano es (*Lippia berlandieri* Schauer, *Lippia graveolens*) perteneciente a la familia *Verbenaceae*. Se considera una planta distinta a sus homólogos europeos ya que sus hojas son más grandes y su color verde es de tono obscuro.

Así mismo, esta planta posee un sabor mucho más fuerte comparado con otras variedades que es atribuido a su alto contenido de aceites esenciales. En el aceite esencial de esta planta se han identificado más de 25 compuestos volátiles entre los que se encuentran  $\beta$ -mirceno,  $\alpha$ -terpineno,  $\gamma$ -terpineno, p-cimeno, carvacrol y timol (Cueto Wong, M.C. 2012).

En la figura N°1. Se presenta la estructura química de los principales componentes del orégano.



**Figura N°1. Estructura química de los componentes del orégano.**

Fuente:(Arcila Lozano, C.C. *et al.* 2004).

### 2.1.5.1. Clasificación taxonómica

El género *Lippia* (familia *Verbenaceae*) incluye aproximadamente 200 especies de hierbas, matorrales y árboles pequeños (Terblanche and Kornelius, 1996 citado por Melendez Rentería, N. 2012). Sin embargo, el término orégano se refiere aproximadamente a 40 especies de plantas herbáceas que comparten características similares de olor y sabor, y comprenden más de un grupo taxonómico (familias *Verbenaceae* y *Labiatae*), lo cual repercute en la cantidad y el tipo de sustancias activas que poseen (Silva-Vázquez et al, 2008 citado por Meléndez Rentería, N. 2012).

En el cuadro N°3 se pueden observar las principales especies conocidas en México de orégano:

**Cuadro N° 3. Principales especies conocidas en México como orégano.**

Nombre científico	Familia	Nombres comunes y distribución geográfica
<i>Brickellia veronicaefolia</i> H.B.K.	Asteraceae (Compositae)	Orégano de cerro (Chihuahua), orégano de campo (México), orégano de monte (Puebla.)
<i>Calamiutha potosina</i> Schaff.	Labiatae	Orégano de Sierra (S.L.P.),
<i>Dalea greggi</i> Gray	Fabaceae (Leguminosae)	Orégano cimarrón (Chihuahua, Oaxaca, Puebla, S.L.P., Sonora.)
<i>Gardoquiamicromerioide</i> Hemsl. (Schaffner)	Labiatae	Orégano (S.L.P.)
<i>Hedeoma floribunda</i> Standl.	Labiatae	Orégano (Chihuahua, S.L.P., Sonora.)
<i>Hedeoma patens</i> Jones	Labiatae	Orégano salvia real (Aguascalientes, Chiapas, Guerrero, Guanajuato, Jalisco, Puebla, Sinaloa, Sonora.)
<i>Lantana involucrata</i> L.	Verbenaceae	Orégano, peonía, colorada, tarete (Michoacán, Sinaloa, Tamaulipas.)
<i>Lantana velutina</i> Mart.	Verbenaceae	Orégano (Guanajuato, S.L.P., Tamaulipas.)
<i>Lippiaberlandieri</i> Schauert	Verbenaceae	Orégano de Castilla, salvia (Coahuila, Durango, Jalisco, Querétaro, Sinaloa, Zacatecas.)
<i>Lippiagraveolens</i> H.B.K.	Verbenaceae	Orégano (Campeche, Yucatán)
<i>Lippiapalmeri</i> Watson	Verbenaceae	Orégano (Baja California, Chihuahua, Sinaloa, Sonora)
<i>Monarda austromontana</i> Epl.	Labiatae	Orégano (Chihuahua, Sonora)
<i>Monarda citriodora</i> Cerv	Labiatae	Orégano (Chihuahua, Nuevo León., Sonora)
<i>Origanum mejorana</i> L.	Labiatae	Orégano europeo (zonas templadas de México, huertos familiares)
<i>Origanum vulgare</i> L.	Labiatae	Orégano europeo (zonas templadas de México, parcelas y huertos familiares)
<i>Paliominth longiflora</i> Gray	Labiatae	Orégano (Coahuila, Nuevo León)

Fuente: (Cueto Wong, M.C. 2012)

### 2.1.5.2. Usos del orégano

El principal uso del orégano es como condimento en la preparación de platillos tradicionales mexicanos, en los que destacan el pozole, menudo, chilpozonte, barbacoa, guisados, sopas, estofados de carnes, etc. Así como en comida extranjera se puede marcar la italiana en pizzas y pastas, en ensaladas típicas de la comida griega, incluso se usa mucho en la cocina India y Marroquí para aromatizar platos de carne y arroz, etc. El mercado y los consumidores han hecho que actualmente lo venden en mezcla con otras hierbas de olor, que se pueden usar en infinidad de platillos.

Otro de los usos que están tomando mucho auge actualmente, es su aplicación del orégano en el área de alimentos por su buena capacidad antioxidante y antimicrobiana contra microorganismos patógenos como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, entre otros (Arcila Lozano, C.C. *et al.* 2004).

El aceite esencial es sub utilizado en perfumes y cosméticos. Del orégano (*Lippia berlandieri Schauer*), también se puede obtener aceite esencial que contiene compuestos activos, utilizados en la industria farmacéutica y alimentaria. “El litro de aceite de orégano se cotiza en el mercado internacional de \$100-200. Con la producción de aceite de orégano se tiene una oportunidad de mejorar las condiciones de vida de los pobladores de comunidades de zonas áridas del país ya que las poblaciones silvestres de orégano se encuentran en sobre-aprovechamiento debido principalmente a que la recolección coincide con la floración de la especie mermando su propagación natural” (Díaz Ramírez. *et al.* 2007).

### **2.1.5.3. Propiedades del Orégano**

Entre las propiedades presentes en la planta se puede mencionar que tónica y digestiva. También ayuda contra el dolor. Es emenágoga, desinfectante, expectorante y carminativa. Se usa para aliviar la tos y el asma. En reglas dolorosas se emplea como calmante y regulador. Antiséptico en las vías respiratorias. Los dolores y reumas se alivian con friegas con aceite de orégano y cataplasmas de la planta. En uso externo en forma de infusión es cicatrizante de heridas, llagas, etc. En farmacia se usa para preparar linimentos antirreumáticos, pomadas para la dermatitis y como desinfectante y cicatrizante. También se usa en perfumería, jabonería y cosmética (Infagrow).

### **2.1.5.4. Países productores de orégano**

En el mercado internacional Turquía, Grecia, y México son los principales países proveedores de orégano seco manufacturado y no manufacturado en el mundo; sin embargo Turquía y México aportan del 65 al 31 por ciento de la producción respectivamente el resto de la producción la aportan otros países del mediterráneo (Villavicencio Gutiérrez, E. 2007).

### **2.1.5.5. Estados productores de orégano en México**

México ocupa el segundo lugar en el mercado internacional. Los principales estados productores de orégano (*Lippia berlandieri Schauer*) son en orden de importancia: Chihuahua, Durango, Tamaulipas, Nuevo León, Coahuila, le siguen

Jalisco, Zacatecas, Querétaro, Hidalgo y Baja California Sur (Villavicencio Gutiérrez, E. 2007), (Cueto Wong, M.C. 2012).

### 2.1.6. Encapsulación

La encapsulación es un proceso mediante el cual ciertas sustancias bioactivas (sabores, vitaminas o aceites esenciales) son introducidas en una matriz o sistema de pared con el objetivo de impedir su pérdida, para protegerlos de la reacción con otros compuestos presentes en el alimento o para impedir que sufran reacciones de oxidación debido a la luz o al oxígeno. Una ventaja adicional es que un compuesto encapsulado se liberara gradualmente del compuesto que lo ha englobado o atrapado y se obtienen encapsulante y la sustancia a encapsular, las aplicaciones para el material microencapsulado, el mecanismo de liberación deseado y el costo. (Fernández Yáñez, J.; *et al.* 2002). En la cuadro N°4 se puede observar el tipo de ingredientes encapsulados utilizados en alimentos.

**Cuadro N°4. Ingredientes encapsulados utilizados en alimentos.**

Tipo de ingrediente
Saborizantes: especias, aceites, sazoadores, y edulcorantes.
Acidulantes, álcalis, buffers (ác. ascórbico, cítrico, fumárico, bicarbonato)
Lípidos: ác. Linoleico
Agentes redox (blanqueadores, maduradores)
Enzimas o microorganismos
Antioxidantes (Ac. ascórbico, cítrico)
Colorantes
Aceites esenciales, aminoácidos, vitaminas y minerales

Fernández Yáñez, J. 2002.

**2.1.6.1. Microencapsulación** La microencapsulación es una técnica utilizada en la industria farmacéutica, alimentaria e incluso en la industria textil. La microencapsulación puede mejorar el sabor y la estabilidad de medicamentos. La microencapsulación han sido también barreras contra malos olores y sabores; ésta también ayuda a que los materiales frágiles resistan las condiciones de procesamiento y empaqueo mejorando sabor, aroma, estabilidad, valor nutritivo y apariencia de sus productos.

En el siguiente cuadro N° 5 se pueden ver los tipos de coberturas utilizadas.

**Cuadro N° 5. Tipos de coberturas usadas para microencapsulación.**

<b>TIPO DE COBERTURA</b>	<b>COBERTURA ESPECÍFICA</b>
<b>Gomas</b>	Goma arábica, agar, alginato de sodio, carragenina.
<b>Carbohidratos</b>	Almidón, dextranos, sacarosa, jarabe de maíz.
<b>Celulosa</b>	Carboximetil – celulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, nitrocelulosa, acetilcelulosa.
<b>Lípidos</b>	Ceras, parafinas, tristearina, ácido esteárico, monoglicéridos, diglicéridos, aceites, grasas.
<b>Proteínas</b>	Gluten, caseína, gernetina, albumina.
<b>Materiales inorgánicos</b>	Sulfatos de calcio, silicatos.

Fuente: Fernández Yáñez, J.; *etal.* 2002

### **2.1.6.2. Microcápsula**

Una microcápsula posee una estructura morfológica relativamente simple, está compuesta por dos elementos claramente diferenciados, el núcleo activo y armazón polimérico delgado, que envuelve al primero. El núcleo puede estar compuesto por sustancias tanto de naturaleza líquida como sólida. En cuanto al recubrimiento del núcleo, el polímero utilizado para la constitución de su armazón puede ser tanto de origen natural como sintético. Para la formación de las microcápsulas existen diferentes técnicas tanto físicas como químicas (Anónimo, 2003). La utilización de microcápsulas abarca una amplia gama de campos: la eliminación controlada de sabores, colores, aromas, perfumes, drogas, fertilizantes y precursores en impresiones.

### **2.1.6.3. Métodos para la microencapsulación**

Los métodos para la elaboración del microencapsulado, han sido divididos en tres:

- a) Procesos físicos: secado por aspersion, extrusión y recubrimiento por aspersion.
- b) Procesos fisicoquímicos: coacervación simple o compleja y atrapamiento en liposomas.
- c) Procesos químicos: Polimerización interfacial e Inclusión molecular. (Fernández Yáñez, J. *et al.* 2002)

#### **2.1.6.3.1. Secado por aspersión**

El secado por aspersión es ampliamente usado en la industria de los alimentos debido a que es un método económico y efectivo en la protección de materiales, en particular empleado en la deshidratación de leche. Los almidones modificados, las maltodextrinas y las gomas son empleados como acarreadores o materiales pared.

El material a encapsular es homogenizado con el acarreador; la mezcla es alimentada al secador por aspersión y se atomiza por medio de una boquilla o disco; las cápsulas son colectadas posteriormente (Fernández Yáñez, J. *et al.* 2002).

#### **2.1.6.3.2. Atrapamiento en liposomas**

Tipo de cápsula con más propiedades versátiles y menos fragilidad que aquellas hechas de grasa es el de los liposomas.

Han sido empleados para la liberación de vacunas, enzimas y vitaminas en el cuerpo y consisten en una o más capas de lípidos no tóxicos y aceptables en alimentos; la permeabilidad, estabilidad, actividad superficial y afinidad pueden variar con el tamaño y la composición del lípido. Los liposomas, vesículas que se forman cuando películas de fosfolípidos son dispersadas en un medio acuoso, al igual que las membranas naturales, son selectivamente permeables a iones; los liposomas se forman cuando una solución acuosa de sustancia activa es mezclada con la película del lípido (Fernández Yáñez, J. *et al.* 2002).

### **2.1.6.3.3. Extrusión**

La microencapsulación por extrusión involucra el paso de una emulsión del material activo y el material pared a través de un dado a alta presión. La aplicación de este método en el procesamiento de alimentos incluye bebidas, pasteles, gelatinas, postres, así como numerosos sabores (Fernández Yáñez, J. *et al.* 2002).

### **2.1.6.3.4. Polimerización de interfase**

Este método involucra la disolución de un monómero hidrofóbico polimerizable en un material activo hidrofóbico. La mezcla es dispersada en una fase polar y un catalizador provoca la polimerización del monómero; el polímero es insoluble en la sustancia activa hidrofóbica y depositado como pared alrededor de la sustancia activa. Los polímeros que forman coberturas adecuadas son poliéster, poliamidas, poliuretanos y poliureas.

La polimerización interfacial ocurre entre monómeros disueltos en sus respectivas fases inmiscibles; los monómeros solubles son dispersados en la fase acuosa por medio de agitación, la membrana de la cápsula es formada por la adición de un monómero orgánico soluble en la fase continua u orgánica.

### **2.1.7. Biopolímeros**

El consumo mundial de polímeros biodegradables ha aumentado en los últimos años. Estos materiales biodegradables naturales incluyen materiales de embalaje como: bolsas de basura, envoltorios de alimentos, sellantes espuma, recipientes de comida, envolturas de película, papel laminado, tela sin tejer y los

productos de higiene; pañales, hisopos de algodón, bienes de consumo; comida rápida vajilla, contenedores, cajas de huevos, mangos de afeitarse, juguetes, y herramientas agrícolas; películas para abono, macetas (Bernard, Gontard, y Guilbert, 1998 citado por Sachiko Kaihara Nitta y Keiji Numata, 2013).

Los biopolímeros son polímeros producidos a partir de organismos vivos, que se podrían clasificar en tres grupos: polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. Factores que se tienen que tomar en cuenta son:

- Tamaño de partícula
- La carga energética
- La morfología de la superficie
- La velocidad de liberación de las moléculas cargadas

Los biopolímeros tienen características como: biocompatibilidad, biodegradabilidad y baja inmunogenicidad dichas características son heredadas por el material biológico con el cual fue hecho. Los biopolímeros se usan como vehículos para fármacos o genes.

Las nanopartículas de proteínas usadas para la formación de biopolímeros se dan debido a su comportamiento rápido de absorción y liberación proporcionada por su capacidad de difusión y cambio de volumen, así como también ofrecen la posibilidad de transportar compuestos bioactivos (Galicia García, T. *et al.* 2012).

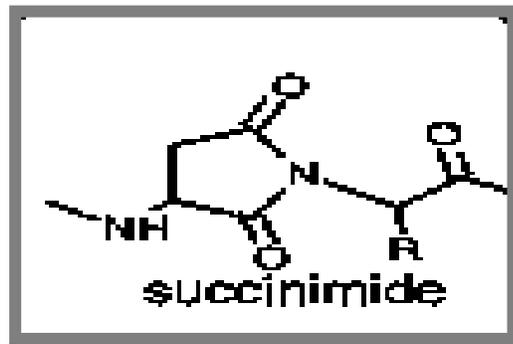
#### **2.1.8. Succinimida**

La isomerización de ácido aspártico a través de succinimida intermedia es quizás la vía más común para la degradación no enzimática espontánea de proteínas biofarmacéuticas. Esta degradación no enzimática ocurre a causa de la alta propensión de los residuos de aspartilo y asparaginilo a someterse a ciclación intramolecular para formar un anillo de succinimida de cinco miembros. Este fenómeno está bien estudiado por su origen, la formación, y la estabilidad de la succinimida utilizando péptidos, así como proteínas. La tasa de formación de

succinimida se ve influida por muchos factores, incluyendo la naturaleza del residuo, la conformación tridimensional global y local, y los factores ambientales tales como el pH, la temperatura, y la fuerza dieléctrica (Amarnath, Ch. *et al.* 2013).

El anhídrido succínico produce la imida cíclica succinimida cuando se calienta con cloruro de amonio a 200°C (McMurry, J. 2008)

En la figura N°2 se ve la estructura química de la succinimida. Cabe mencionar que el desarrollo de la succinimida como un polímero se encuentra en desarrollo e investigación.



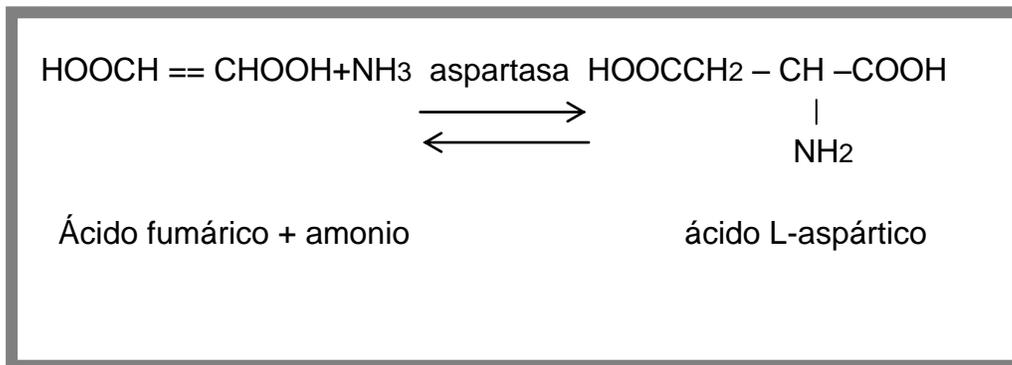
**Figura N°2. Estructura química de succinimida.**

Fuente: Amarnath, Ch. *et al.* 2013.

#### **2.1.8.1. Ácido L-aspártico**

Es un elemento esencial de los aminoácidos, necesarios para trasladar moléculas de NADH con alta energía del cuerpo principal de una célula a sus mitocondrias, o principales zonas de producción de energía. Además de ayudar a la producción de energía, el ácido L-aspártico es un importante neurotransmisor excitatorio.

El ácido L-aspártico se produce industrialmente a partir de ácido fumárico y amonio por los métodos de fermentación o enzimático, empleando la reacción de la aspartasa, como se muestra en la figura N°3.



**Figura N°3. Reacción de la aspartasa.**

Fuente: García Garibay, R. et al. 2004.

### 2.1.9. Caracterización de polímeros

Se realiza la caracterización de los polímeros para obtener información acerca de sus propiedades para así determinar su campo de aplicación. Dentro de la caracterización se puede estudiar; la composición, estructura química, tamaño y forma, morfología en estado sólido, el comportamiento frente a la temperatura, comportamiento ante esfuerzos o en flujo, las reacciones que pueden llegar a sufrir, etc (ref). Para el análisis de todos estos factores se hace uso de diversos equipos, dentro de los que destacan:

- El infrarrojo con transformada de Fourier el cual es útil para discernir las estructuras moleculares, en particular en el reconocimiento de grupos funcionales (Galicia García. *et al.* 2010).

- El osmómetro de presión a vapor (VPO) por sus siglas en inglés, el cual nos permite determinar de la masa molecular de los polímeros ya que es de considerable importancia debido a que la longitud de la cadena es un factor de control en la evolución de la solubilidad, la elasticidad, la formación de fibras, y propiedades de resistencia mecánica Este equipo se centra en el uso de la membrana y osmometría de presión de vapor para determinar el peso molecular promedio en número, el principio con el cual opera es que la presión de vapor de una solución es inferior a la del disolvente puro a la misma temperatura y presión a concentraciones suficientemente bajas, la magnitud de la disminución de la presión de vapor es directamente proporcional a la concentración molar de soluto.
- Calorimetría diferencial de barrido (DSC) por sus siglas en inglés, es una técnica experimental que nos permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia, cuando es mantenida a temperatura constante, durante un tiempo determinado, o cuando es calentada o enfriada a velocidad constante, en un determinado intervalo de temperaturas Baro,S. et al. 1992).

## **CAPITULO 3**

### **3.1. Materiales y métodos**

#### **3.1.1. Localización del experimento**

El trabajo experimental se llevó a cabo en los laboratorios del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro ubicada en Buenavista, Saltillo, Coahuila; en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas, de la Universidad Autónoma de Coahuila con ubicación en Saltillo Coahuila, así como en laboratorios de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua.

Los materiales empleados durante el desarrollo de éste proyecto fueron proporcionados por:

- Aceite de orégano: Centro de Investigación para los Recursos Naturales (CIRENA).
- Polisuccinimida: Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas de la UAdeC.
- *Staphylococcus aureus*: Laboratorio Estatal de la Secretaría de Salubridad y Asistencia en la ciudad de Saltillo, Coahuila

### **3.1.2. Metodología.**

#### **3.1.2.1. ETAPA 1. Atrapamiento del aceite esencial de orégano en un polímero (succinimida).**

El atrapamiento del antimicrobiano, proveniente del aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri Schauer*) en el polímero (succinimida), se realizó con la prueba de punto al equilibrio, realizando cuatro repeticiones evaluando aceite puro de orégano y diluido en aceite comestible a una concentración del 10%.

Las muestras de polímero fueron pesadas en una balanza Adventure Ohaus, sumergidas en el aceite, nuevamente pesadas en balanza analítica en intervalos de tiempo de 60 minutos por 480 minutos. Los resultados arrojados por esta prueba fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza y t-student con el fin de establecer el tiempo necesario para la óptima fijación de aceite en el polímero.

#### **3.1.2.2. ETAPA 2. Caracterización del polímero (succinimida) y su interacción con el aceite esencial de orégano.**

##### **3.1.2.2.1. Determinación del peso molecular mediante un osmómetro de presión de vapor.**

Se determinó el peso molecular mediante un osmómetro de presión a vapor KNAUER K-7000 para lo cual se preparó una curva de calibración empleando como estandar Benzil y como diluyente dimetil sulfóxido (DMSO), preparando soluciones al 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 por ciento. Para la preparación y purificación de la muestra, se trituró el polímero en un mortero, se lavó con agua, bicarbonato de sodio y ácido clorhídrico al 1 por ciento filtrándose a vacío; del líquido obtenido se precipitó utilizando etanol, el cual después se eliminó en un rota evaporador, y el excedente se dejó evaporar en agitación a temperatura ambiente, ya estando el precipitado se

molió en mortero, seguido de esto se prepararon soluciones de polisuccinimida al 0.01, 0.02, 0.03 por ciento usando como diluyente DMSO. Leyéndose las muestras en el equipo.

#### **3.1.2.2.2. Observación de la estructura polimérica mediante microscopía electrónica.**

El polímero, el polímero con aceite esencial de orégano y el polímero con antimicrobiano en contacto con el microorganismo *Staphylococcus aureus* fueron bañados con plata para su observación y toma de evidencia en el microscopio electrónico de barrido JEOL 69-60.

#### **3.1.2.2.3. Análisis de infrarrojo por transformada de Fourier.**

Se realizó un IR en un equipo FT-IR/ATR (Elmer 1100X), para observar los compuestos presentes en el polímero en su estado libre y con el aceite esencial de orpegano.

#### **3.1.3.2.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).**

El polímero, el polímero con aceite esencial de orégano y el polímero con antimicrobiano en contacto con el microorganismo *Staphylococcus aureus* fueron sometidos a un calentamiento con incrementos de temperatura de 10°C por minuto hasta alcanzar 200°C, mediante un equipo de calentamiento TA Instrument Q600.

### **3.1.2.3 ETAPA 3. Valorar la eficiencia de la liberación del principio activo del vehículo.**

#### **3.1.2.3.1. Viabilización e identificación de la cepa de *Staphylococcus aureus*.**

Se prepara caldo de soya tripticasa (TSB) en tubo, se trabajaron cinco repeticiones y como blanco se usó agua destilada, se llevó a cabo un barrido de espectro en un espectrofotómetro Genesys 10 UV, leyéndose en un rango de longitud de onda de 350 a 550, analizándose las lecturas estadísticamente, con el fin de establecer la longitud de onda donde absorbe más efectivamente el medio de cultivo.

La cepa *Staphylococcus aureus* se viabilizó por medio de pre enriquecimiento en tubos con caldo TSB y siembra por estrías en agar TSB, lo cual fue incubado a 32°C por 24 horas, así mismo se realizó un análisis morfológico mediante tinción de Gram en microscopio óptico.

#### **3.1.2.3.2. Preparación del inóculo al tubo número 4 de la escala de Mcfarland.**

Posteriormente se llevó a cabo la cinética de crecimiento de la cepa, para lo que se preparó el inóculo en tubos con caldo TSB por duplicado, se inoculó 0.1 ml de la cepa de *Staphylococcus aureus* incubándose a 32°C el tiempo necesario para alcanzar la absorbancia del tubo número 4 de la escala de Mcfarland modificado por Ortega Rangel, S. en el 2007.

En el siguiente cuadro N° 6. Se observa la correspondencia con la escala de Mcfarland.

**Cuadro N° 6. Absorbancia con respecto a escala de Mcfarland.**

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

Fuente: Ortega Rangel, S. 2007

### **3.1.2.3.3. Valoración de la efectividad del antimicrobiano fijado al polímero.**

Se realizó un antibiograma para el cual se preparó caldo TSB en cajas Petri de 3 compartimientos, en las que se sembró 0.1 ml del cultivo iniciador el cual estaba en escala 4 de Mcfarland, a dos de los espacios se les colocó un trozo del polímero con aceite, mientras que para el tercero no se trabajó con polímero, de igual manera se realizó un frotis recubriendo la laminilla con baño de plata observándose en microscopio electrónico de barrido

Seguido del antibiograma se preparó caldo TSB en tubos por cuatro repeticiones para polímero con antimicrobiano y cuatro repeticiones de tubos para polímero sin antimicrobiano, así como un testigo.

Se agregó una muestra de polímero con antimicrobiano en 4 tubos con caldo TSB, y lo mismo se hizo pero con polímero libre de antimicrobiano, en los 8 tubos se inoculó 0.1 ml del cultivo de *Staphylococcus aureus* en escala 4 de Mcfarland modificada, se incubó a 32°C por 24 horas, midiéndose la absorbancia en intervalos de 2 horas. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 550 nm. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza y t-student así como se hizo un análisis de medias de Log 10 de las U.F.C., para comprobar tanto la efectividad del antimicrobiano ligado al polímero de polisuccinimida.

## CAPITULO 4

### 4.1. Resultados y discusión

#### 4.1.1. Etapa 1. Atrapamiento del aceite esencial de orégano en un polímero (succinamida).

En esta etapa se estableció el tiempo más adecuado para llevar a cabo el óptimo atrapamiento del antimicrobiano en el polímero en estudio así como establecer cómo se adhiere de mejor manera el antimicrobiano al polímero soporte; si en estado libre o diluido. Para dicha etapa se monitoreó el incremento en peso de la muestra inmersa, tanto en el aceite puro de orégano como en el diluido al 10% con aceite comestible.

Los resultados de dicho tratamiento se ven reflejados en el cuadro N° 7.

**Cuadro N° 7. Medias de absorción del antimicrobiano diluido o libre en función al tratamiento.**

<b>TIEMPO</b>	<b>MEDIAS DE ABSORCIÓN DE ANTIMICROBIANO EN EL POLÍMERO EN GRAMOS</b>	
	<b>ANTIMICROBIANO LIBRE</b>	<b>ANTIMICROBIANO DILUIDO</b>
<b>0</b>	0.0000	0.0000
<b>60</b>	0.0136	0.0053
<b>120</b>	0.0121	0.0059
<b>180</b>	0.0113	0.0057
<b>240</b>	0.0138	0.0073
<b>300</b>	0.0144	0.0064
<b>360</b>	0.0142	0.0077
<b>420</b>	0.0128	0.0069
<b>480</b>	0.0129	0.0068

En la figura N°4 se muestra, el análisis de la diferencia en absorción del aceite libre y diluido para el cual se realizó un análisis de medias, para ambos tratamientos, donde es posible apreciar que el aceite libre se fija de manera más eficiente que el diluido; mostrándose diferencias estadísticamente significativas, de acuerdo al análisis de t-student realizado, (apéndice 6.1).

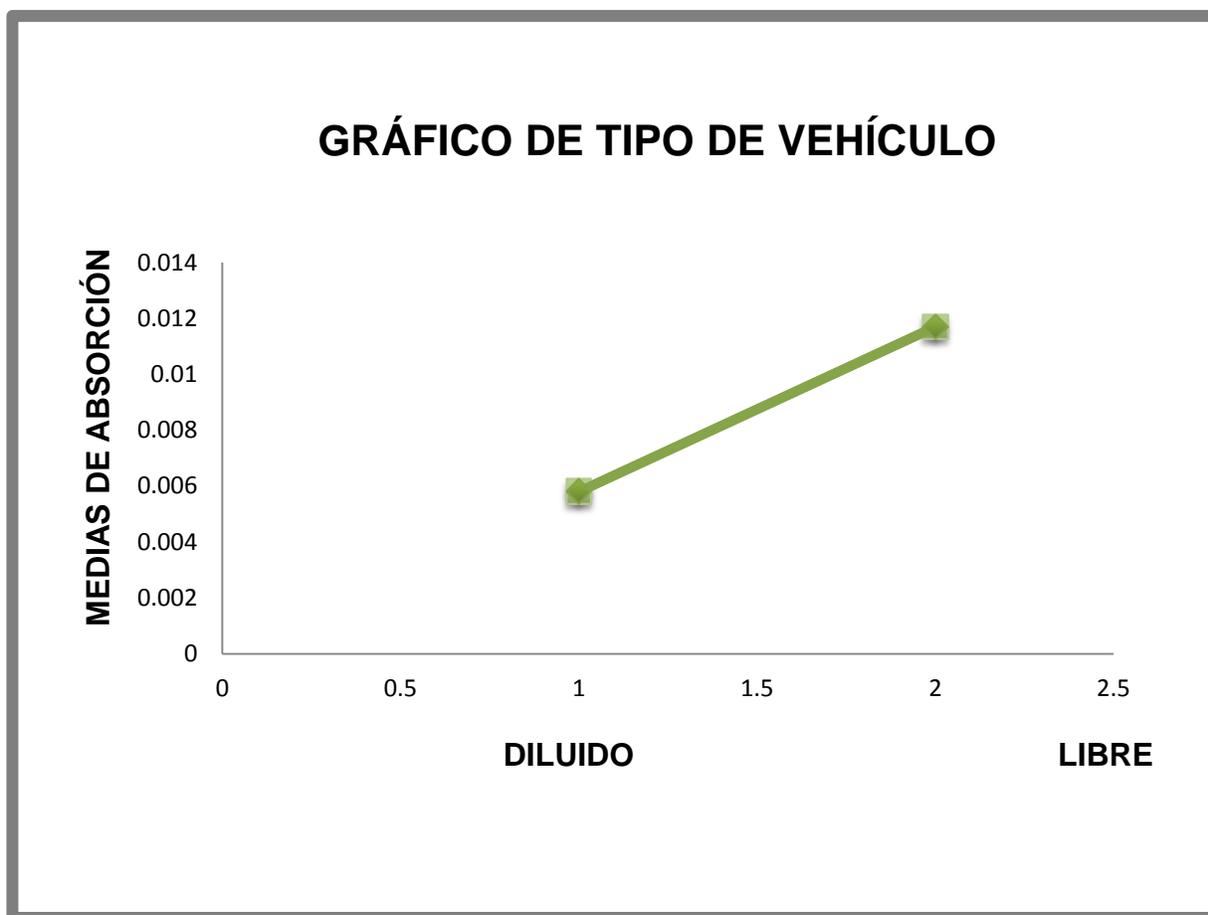


Figura N° 4. Gráfica de medias de absorción con relación al tipo de vehículo.

Posteriormente se analizó el comportamiento de la fijación del aceite esencial del orégano libre y diluido en el polímero de succinimida en función al tiempo, se

trabajó un análisis de medias de la absorción, para ambos tratamientos, y de los resultados se elaboró una gráfica, la cual se puede ver en la figura N°5.

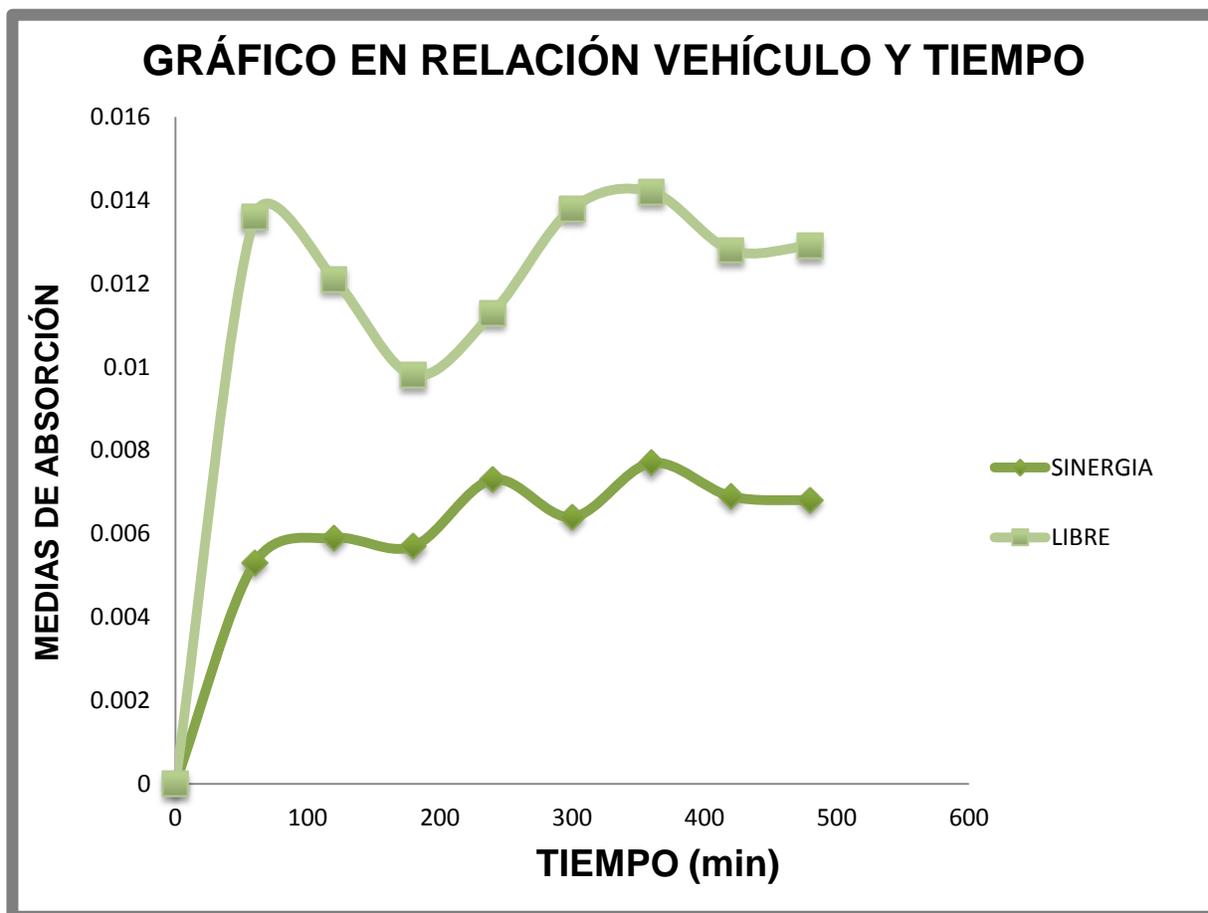


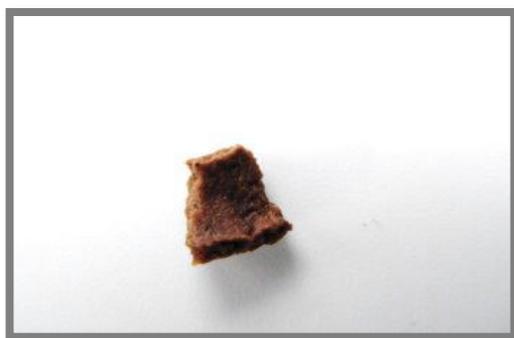
Figura N° 5. Gráfica en relación vehículo y tiempo.

La figura N°5 muestra la capacidad de absorción del polímero, para ambos tratamientos. Donde se aprecia que el pico más alto es en el polímero con aceite libre, el cual se alcanza a los 300 minutos siendo este el tiempo óptimo de atrapamiento. Por otro lado en el caso del aceite diluido es posible apreciar variaciones en función al peso, sin embargo estas no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí (apéndice 6.1); mientras que en comparación con el tratamiento del aceite libre para el tiempo de 300 minutos, en el mismo análisis de varianza se puede observar una diferencia altamente significativa. Confirmando así que la fijación de aceite se realiza mejor en estado libre, a 300 min de contacto.

**4.1.2. ETAPA 2. Caracterización del polímero (succinimida) y su interacción con el aceite esencial de orégano.**

**4.1.2.1. Determinación del peso molecular mediante de un osmómetro de presión a vapor.**

Antes que se realizara la determinación del peso molecular se describió físicamente el polímero tal como lo vemos en la figura N° 6, la cual muestra una foto de la viruta del polímero (succinimida), donde se puede observar que es un sólido, con una coloración café, es porosa en su interior y de estructura lisa.



**Figura N°6. Viruta de polisuccinimida.**

Los resultados arrojados por el osmómetro para las tres soluciones utilizadas el equipo hace un promedio de éstas, obteniendo así para la polisuccinimida 1780 g/mol.

**4.1.2.2. Observación de la estructura polimérica mediante microscopía electrónica de barrido.**

Las figuras N°7 y 8 muestran la presencia del polímero de polisuccinimida antes del contacto con el aditivo a probar, la figura N°7 es una ampliación en 400

veces y la figura N°8 a 3700 veces, de donde es posible apreciar que el producto es una estructura uniforme semi poroso, así como se puede también distinguir a 5 micras un flujo de material en forma de filamentos claros, que pueden ser resultado del proceso de polimerización en flujo continuo con que fue elaborado el material.

De acuerdo al análisis puntual (anexo 6.3) se aprecia que la muestra está constituida por 59.17% de Carbono y 31.40% de Oxígeno en peso y en porcentaje atómico de 70.62% de carbono y de 28.13% de oxígeno, lo que hace posible la aseveración de que se trata de un compuesto de naturaleza completamente orgánica.

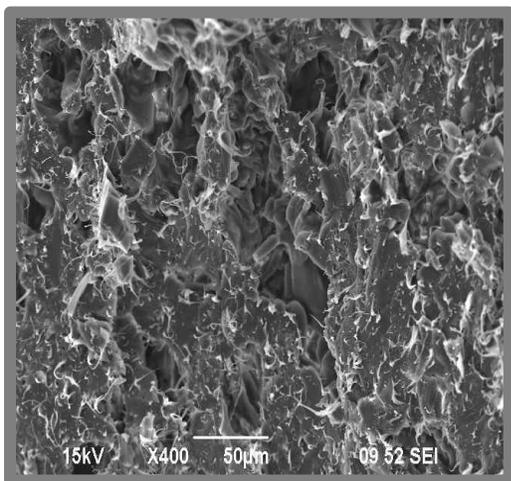


Figura N°7. Polímero original X400.

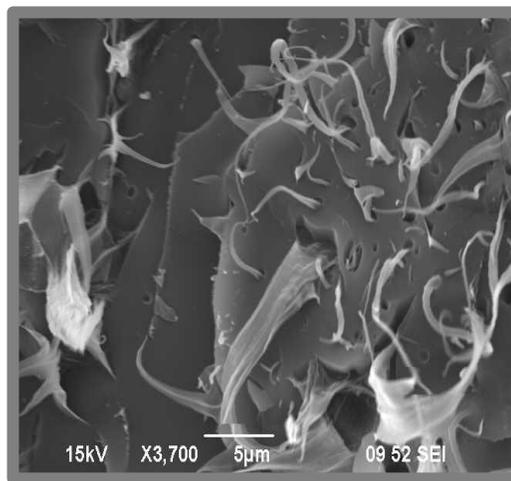


Figura N°8. Polímero original X3700

Las imágenes 9 y 10 son las muestras del polímero después de los 300 min de contacto con el aceite esencial de orégano. La figura N°7 esta amplificada en 500 veces y la figura N°7 en 3,700 veces de estas es posible apreciar la estructura uniforme descrita anteriormente y adherida a está una capa del aceite esencial del orégano con el cual estuvo en contacto, donde se ve que se enmascaran los filamentos presentes en la figura N°8. En la figura N°10 se puede apreciar claramente el revestimiento total de la estructura polimérica, lo que indica un proceso de absorción del aceite en el polímero, este se puede deber tanto a los poros presentes en la estructura original como a las estructuras filamentosas resultantes del proceso de extrusión las cuales cambian su aspecto a una forma redondeada, totalmente cubierta.

De acuerdo al análisis de los elementos presentes (apéndice 6.4) nos muestra que hay un decremento en la constitución de sus compuestos orgánicos en el peso teniendo para oxígeno 25.57 y 49.33 por ciento para carbono y en el porcentaje atómico de oxígeno de 26.29 y para carbono de 69.17.

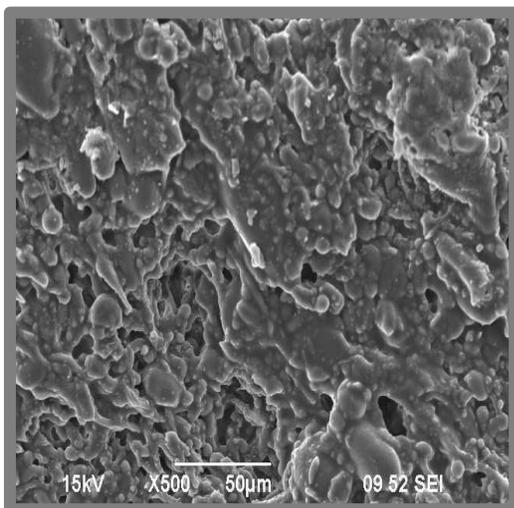


Figura N°9. Polímero con antimicrobiano X500.

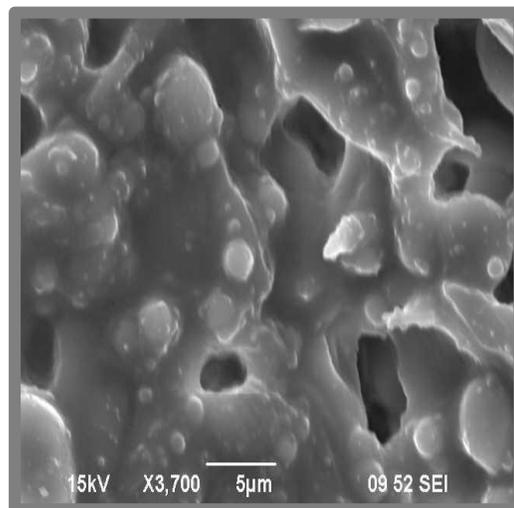


Figura N°10. Polímero con antimicrobiano X3700.

Las figuras N°11 y 12 presentan las muestras del polímero adicionado con el aceite esencial del orégano, posterior al contacto con un medio de cultivo específico para el crecimiento de *S. aureus* y un inóculo del microorganismo en cuestión, la figura N°11 esta amplificada en 500 veces y la figura N°12 en 3700 veces; de estas es posible apreciar que a la base del polímero cuenta tanto con la presencia del aceite adicionado, como con células probablemente del microorganismo inoculado, las cuales presentan irregularidades en su morfología debidas al efecto del aceite esencial, que en estudios previos sugieren que el aceite lisa la pared celular microbiana (Morales Ángeles, G. 2005). Así mismo se presentan filamentos suspendidos, que pueden ser residuos de la lisis microbiana o bien algún tipo de degradación del propio material

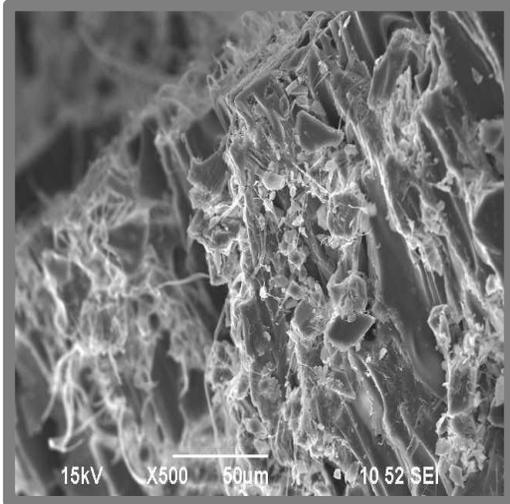


Figura N°11. Polímero con antimicrobiano y en contacto con la cepa *S.aureus* X500

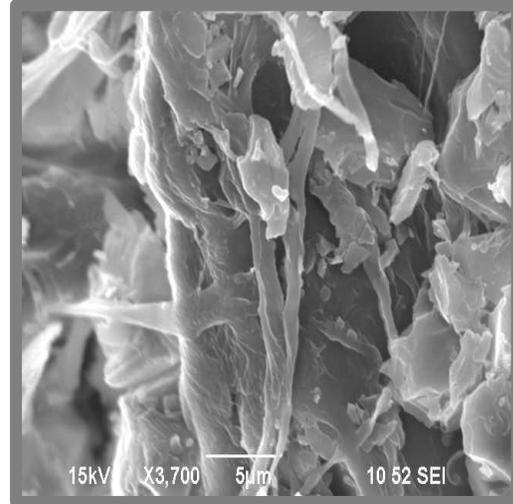
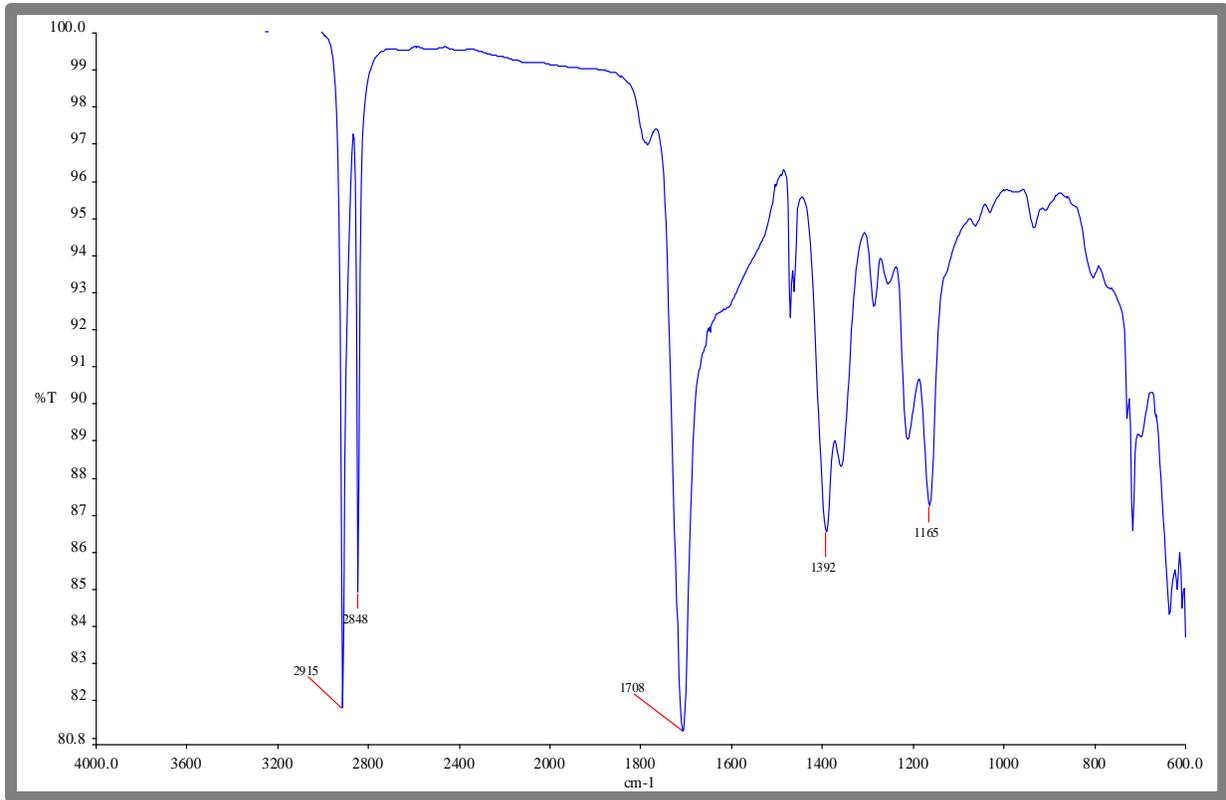


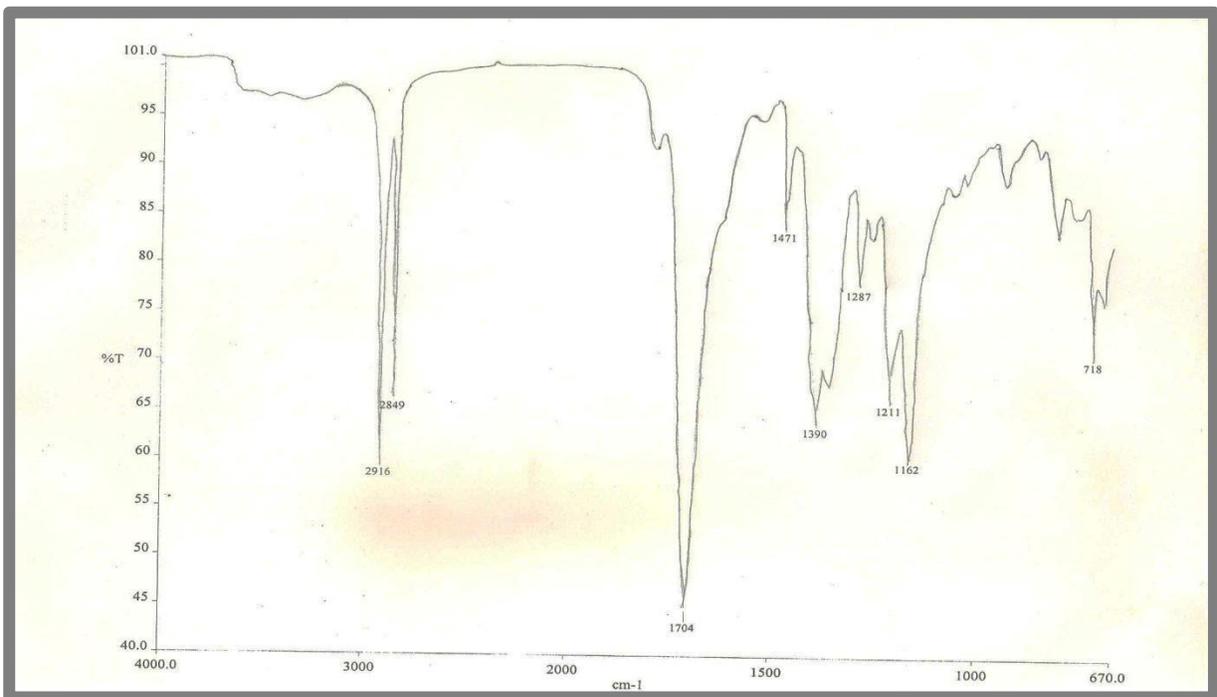
Figura N°12. Polímero con antimicrobiano y en contacto con la cepa *S.aureus* X3700

#### 4.1.2.3. Análisis infrarrojo por transformada de Fourier.

La figura N°13 muestra el espectro infrarrojo para el polímero en su estado original así como la figura N°14 muestra el espectro infrarrojo del polímero después de haber estado en contacto con el aceite esencial, donde es posible apreciar un pico en los 1704  $\text{cm}^{-1}$  para el polímero con aceite esencial y en los 1708  $\text{cm}^{-1}$  para el polímero libre lo cual indica la presencia de grupos carbonilo, por otro lado se observan picos en 2916 y 2849  $\text{cm}^{-1}$  para el polímero con aceite mientras que para el polímero libre en 2915 y 2849 para el polímero libre indicativos de las amidas, propias del ácido aspártico monómero precursor, más adelante se presenta un estiramiento formando un pico en 1390  $\text{cm}^{-1}$  para el polímero con aceite esencial y siendo de 1392 para el polímero libre lo cual indica la presencia de compuestos aromáticos, representativos de timol y carvacrol, componentes del aceite esencial del orégano, finalmente se encuentra una banda de transmisión ancha pasando por los 3000  $\text{cm}^{-1}$  lo cual muestra los grupos hidroxilos característicos del timol y carvacrol del aceite esencial, la banda mencionada anteriormente no desarrolla en el IR del polímero libre.



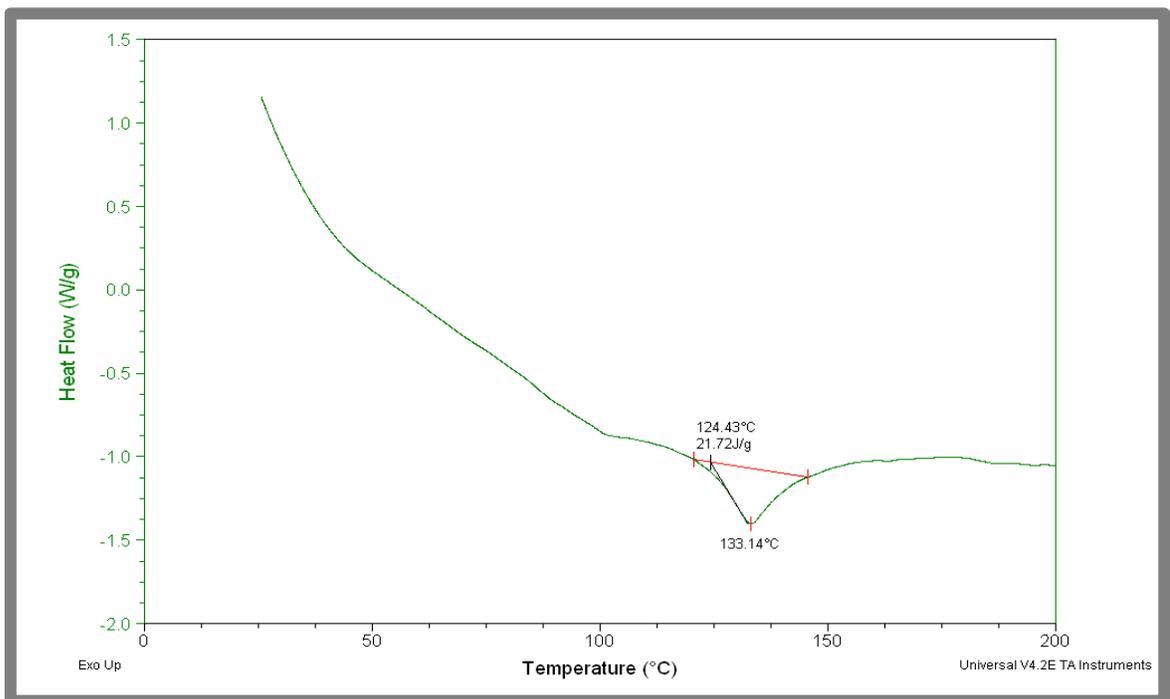
**Figura N°13. Infrarrojo del polímero original.**



**Figura N°14. Infrarrojo del polímero con aceite esencial.**

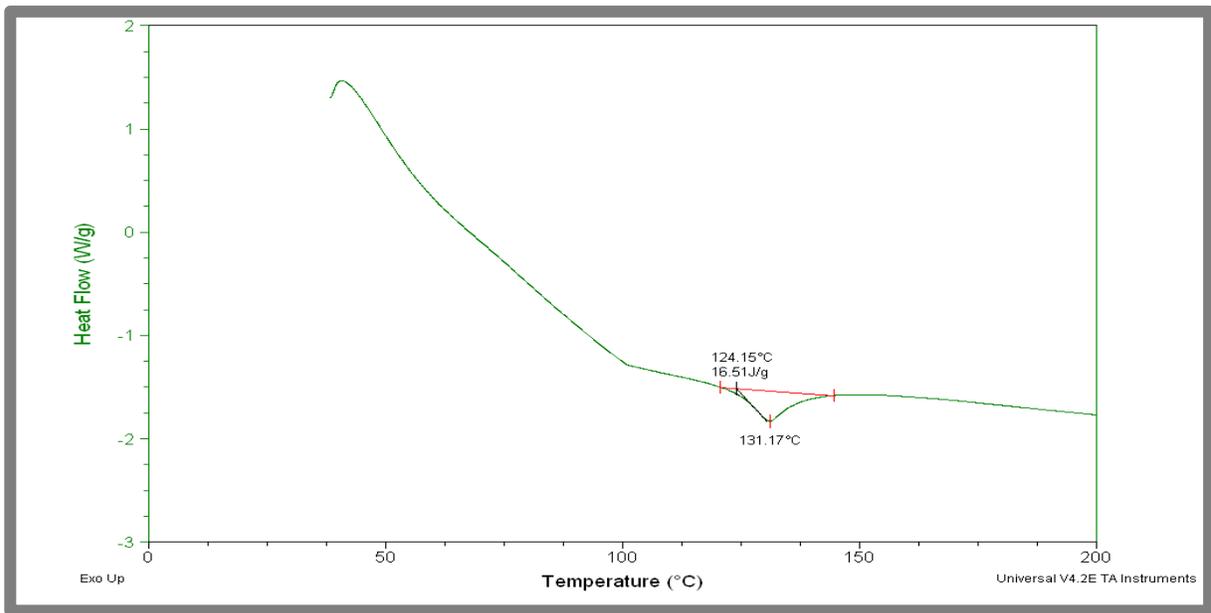
#### 4.1.2.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

La figura N°15 presenta el gráfico del DSC para el polímero en su estado inicial; del cual es posible apreciar un pico endotérmico que indica una temperatura de fusión de 133.14°C con un flujo de calor de 21.72 J/g.



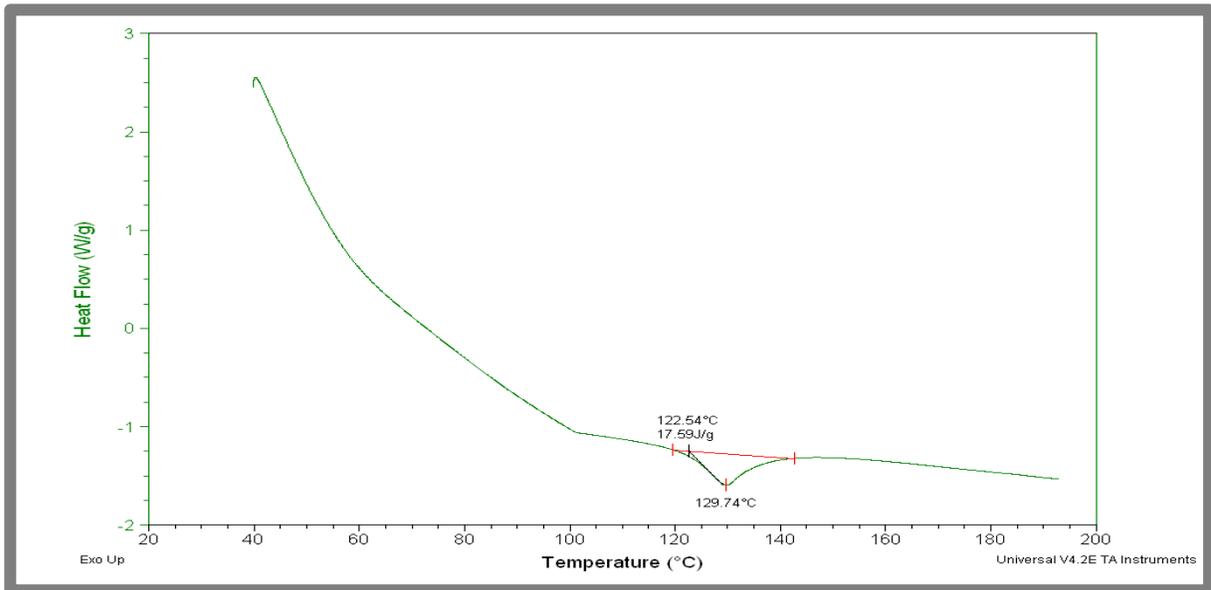
**Figura N°15. DSC para el polímero original**

La figura N°16 presenta el gráfico del DSC el polímero adicionado con el aceite esencial del orégano; del cual es posible apreciar un pico endotérmico que indica la temperatura de fusión de 131°C, con un flujo de calor de 16.51 J/g.



**Figura N°16. DSC para el polímero con aceite esencial.**

La figura N°17 presenta el gráfico del DSC el polímero adicionado con el aceite esencial del orégano y sometido a contacto con una cepa de *S. aureus* en un medio específico para su desarrollo; del cual es posible apreciar un pico endotérmico que indica la temperatura de fusión de 129.74°C, con un flujo de calor de 17.59 J/g.



**Figura N°17. DSC para el polímero con aceite esencial en contacto con la cepa de *S. aureus*.**

En el cuadro N°8 es posible apreciar que las temperaturas de fusión para el polímero en sus tres facetas oscila alrededor de los 130°C, presentando una diferencia menor a 2°C para cada una de los tratamientos, siendo el polímero en su estado natural el que tiene el punto de fusión más alto correspondiente a 133.4°C, seguido del adicionado con el aceite esencial de orégano de 131.7, y finalmente la muestra que tuvo contacto con la cepa microbiana (129.34° C).

<b>Muestra</b>		
	Temperatura de fusión	Flujo de calor
<b>Polímero en estado original</b>	133.14°C	21.72 J/g
<b>Polímero con aceite esencial</b>	131.17°C	16.51 J/g
<b>Polímero con aceite esencial en contacto con la cepa de <i>S. aureus</i>.</b>	129.74°C	17.59 J/g

Cuadro N°8. Temperaturas de fusión para el polímero en sus tres facetas.

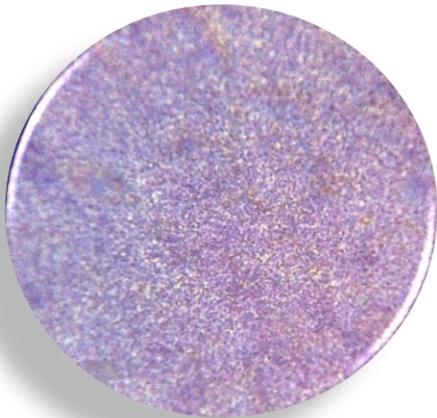
#### **4.1.3. ETAPA 3. Valoración de la eficiencia de la liberación del principio activo del vehículo**

##### **4.1.3.1. Viabilización e identificación de la cepa *Staphylococcus aureus*.**

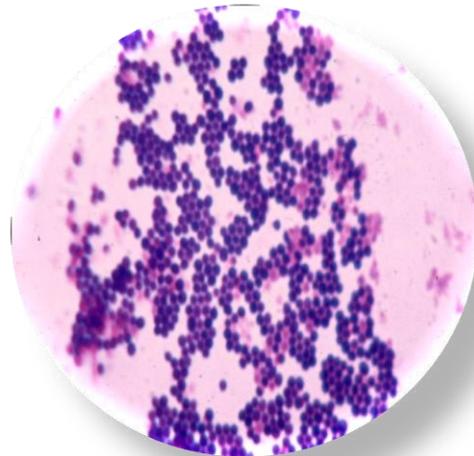
En esta etapa se valoró la eficiencia el aceite esencial de orégano fijado en un vehículo utilizado, así como el efecto antimicrobiano. Para dicha etapa se identificó y se viabilizó una cepa de *Staphylococcus aureus*. Previo a la viabilización se realizó un barrido de espectro en el cual se determinó, la longitud de onda con la cual se leería el caldo TSB que resulto ser de 550 nm, durante dicho proceso de viabilización se llevó a cabo la cinética de crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus*.

#### 4.1.3.2. Identificación de la cepa *Staphylococcus aureus*

En la identificación de la cepa de *Staphylococcus aureus*, la cual se elaboró con tinción de Gram, microscópicamente se observó que son cocos Gram positivos tal como lo menciona Fernández Escartín (2008), macroscópicamente se pudo ver que las colonias son lisas un poco convexas, con bordes lisos y brillantes, estas características concuerdan con las descritas por García del Valle, A. y Zamudio Durán, M. en 1998, por lo que se concluye que se trata de una cepa pura. La observación microscópica de la cepa teñida se puede ver en la figura N° 18 y 19.



**Figura N° 18. Morfología microscópica *S. aureus*. Tinción de Gram**



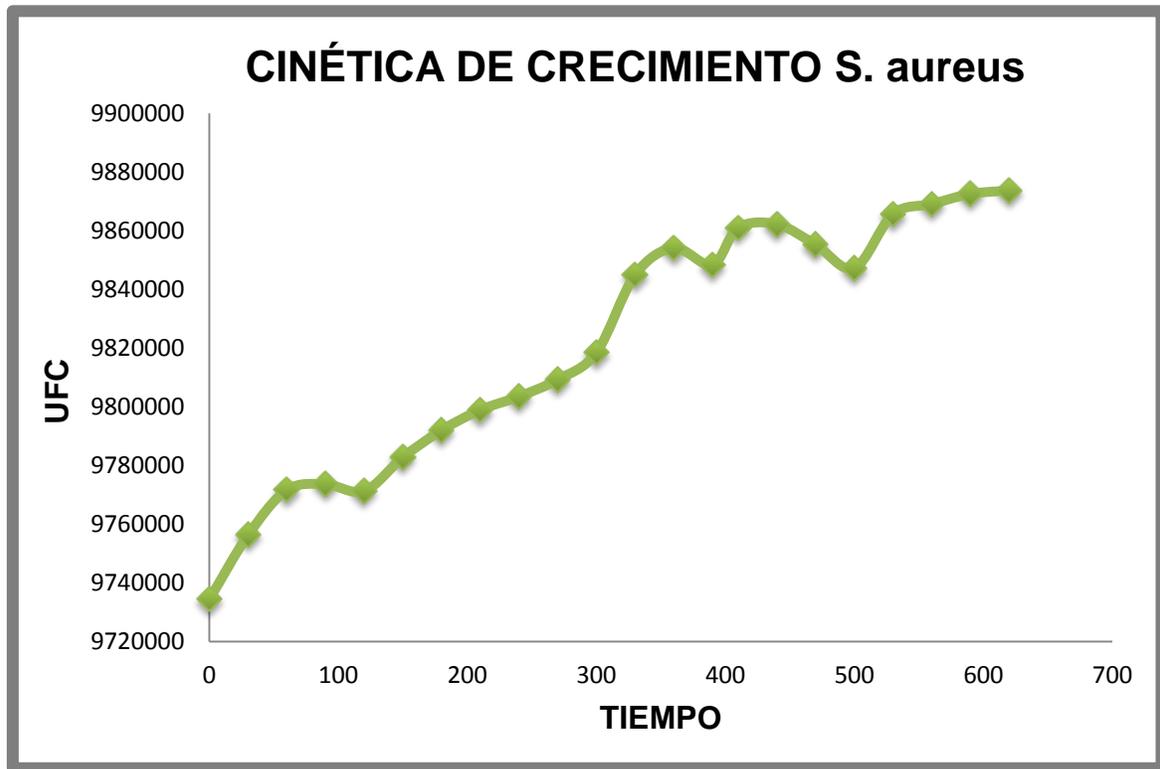
**Figura N° 19. Morfología macroscópica *S. aureus*. Tinción de Gram.**

#### 4.1.3.3. Viabilización de la cepa *Staphylococcus aureus*.

Los resultados obtenidos de la cinética antes mencionada bajo condiciones adecuadas, se observan en el cuadro N°9, donde se puede apreciar el crecimiento microbiano de la cepa.

**Cuadro N°9. Medias de la cinética de crecimiento en Log 10 de U.F.C/ml de la cepa pura de *Staphylococcus aureus*.**

<b>TIEMPO (MIN)</b>	<b>MEDIAS DE UFC/ml</b>
0	9734500
30	9756350
60	9771650
90	9773600
120	9771300
150	9782800
180	9792000
210	9798900
240	9803500
270	9809250
300	9818450
330	9844900
360	9854100
390	9848350
410	9861000
440	9862150
470	9855250
500	9847200
530	9865600
560	9869050
590	9872500
620	9873650



**Figura N°20. Gráfica de la cinética del crecimiento de la cepa *Staphylococcus aureus***

En la figura N°20 es posible apreciar que la fase de adaptación (lag) es relativamente corta de aproximadamente 2 horas, lo cual se debe a que la cepa se transfirió a un medio fresco y se incubó bajo condiciones óptimas para ésta, por lo tanto la bacteria ya se encontraba estable y adaptada al medio. En la fase exponencial (log) de la curva de crecimiento se observa que termina aproximadamente a los 300 minutos, posteriormente se logra ver el inicio de la fase estacionaria finalizando alrededor de los 500 minutos, después de éste tiempo se vuelve a ver un pequeño despunte en el crecimiento, esto puede ser debido a que la transición entre la fase exponencial y la estacionaria implica un periodo de crecimiento desequilibrado, ya que los componentes celulares son sintetizados a diferentes velocidades, según Ingraham, J.L. *et al.*

#### **4.1.3.4. Preparación del inóculo al tubo número 4 de la escala de Mcfarland.**

Para el cultivo de *Staphylococcus aureus* de acuerdo al tubo N° 4 de la escala de Mcfarland se llegó a una absorbancia de 0.6240 nm dando una equivalencia de 1, 098, 752, 751 bacterias por mililitro. Siendo este cultivo el utilizado en las pruebas de eficiencia de la actividad antimicrobiana.

#### **4.1.3.5. Valoración de la efectividad del antimicrobiano fijado al polímero.**

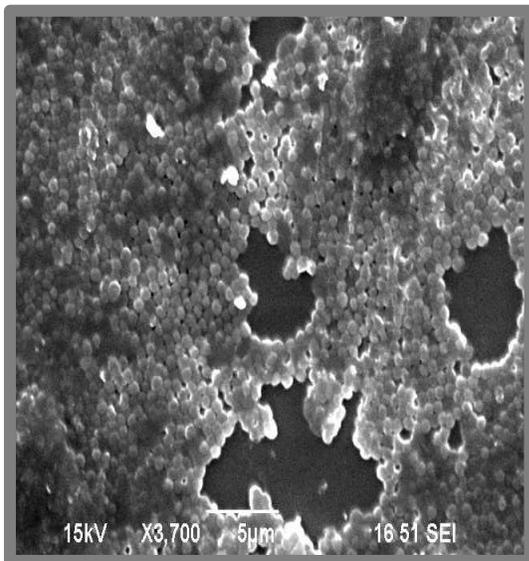
La efectividad del antimicrobiano se comprobó mediante dos pruebas la primera es la de presencia de halos de inhibición, de tipo cualitativa y la segunda de tipo cuantitativa a partir de una cinética de crecimiento microbiano.

Para la prueba cualitativa de los halos de inhibición se puede apreciar en la figura N°21, donde en el área del testigo se ve un crecimiento uniforme, mientras que en el espacio para la M1 y la M2, se observan alrededor del polímero con antimicrobiano, los halos de inhibición presentes por la difusión radial de éste, el tamaño de los halos fue de 7 mm para la M2 y de entre 3 y 7 mm para la M1.

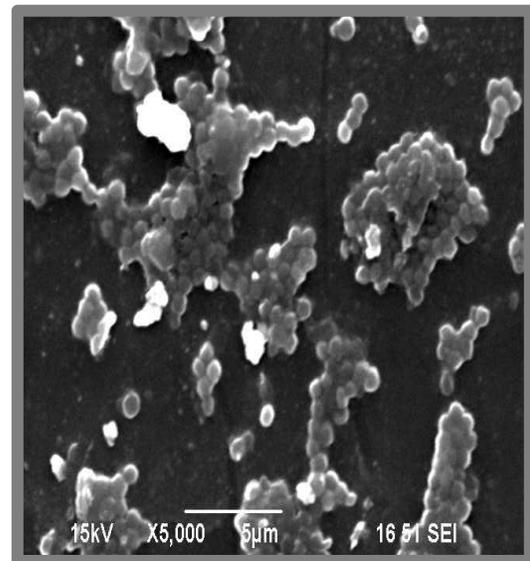
La figura N°22 y 23 muestran el frotis de la M2 donde es posible apreciar la lisis de la pared celular propia de la bacteria, a causa del efecto del aceite esencial esto concuerda con Morales Ángeles en el 2005.



**Figura N°21. Antibiograma para el antimicrobiano (aceite de orégano).**



**Figura N°22. Frotis de *S.aureus* con el antimicrobiano X3700.**



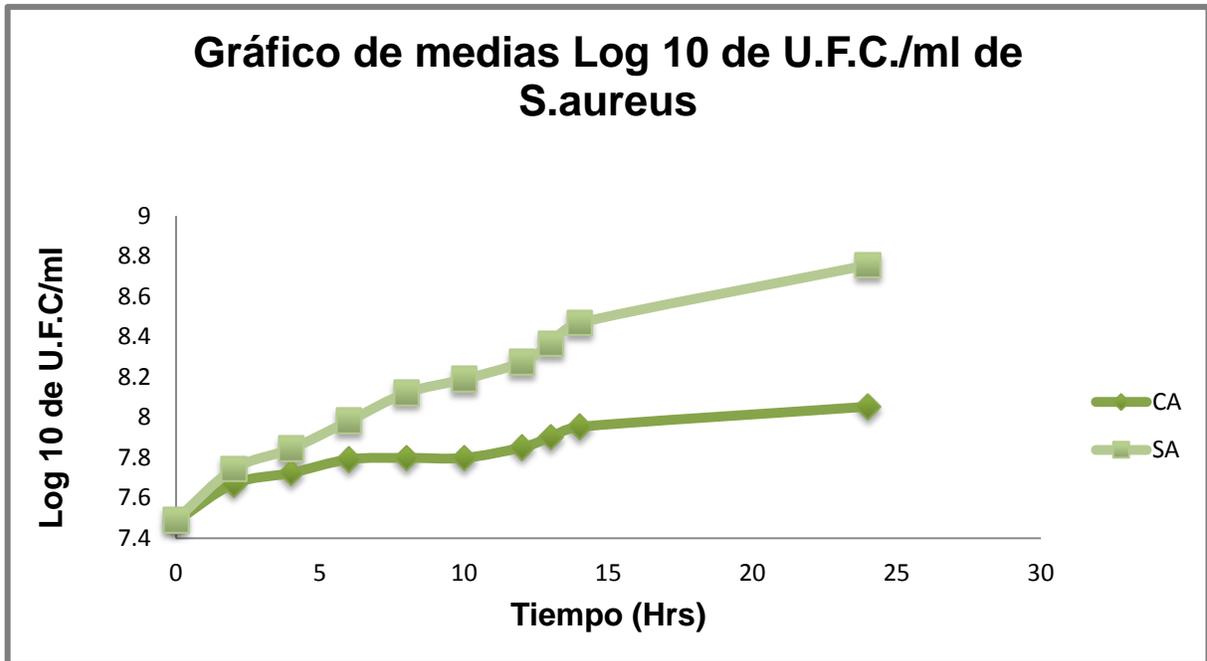
**FifuraN°23. Frotis de *S.aureus* con el antimicrobiano X5000.**

La siguiente valoración fue de tipo cuantitativo donde se trabajaron dos tratamientos para el polímero (succinimida), uno libre del antimicrobiano en estudio y otra adicionada bajo las condiciones establecidas en la etapa N°.1, de ambos tratamientos se llevó a cabo una cinética de crecimiento. Los resultados obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza. El cuadro 10 presenta las medias del Log 10 de las UFC/ml.

**Cuadro N° 10. Medias de Log 10 de U.F.C./ml en la liberación del antimicrobiano.**

Tiempo	Medias Log 10 U.F.C/ml	
	Con antimicrobiano	Sin antimicrobiano
0	7.4911	7.4828
2	7.7442	7.6696
4	7.8445	7.7241
6	7.9828	7.7914
8	8.1223	7.7988
10	8.1902	7.7988
12	8.2739	7.8512
13	8.3652	7.9017
14	8.4696	7.9592
24	8.7571	8.0530

En la figura N°24 se muestra la gráfica de las medias de Log 10 de las U.F.C, para ambos tratamientos.

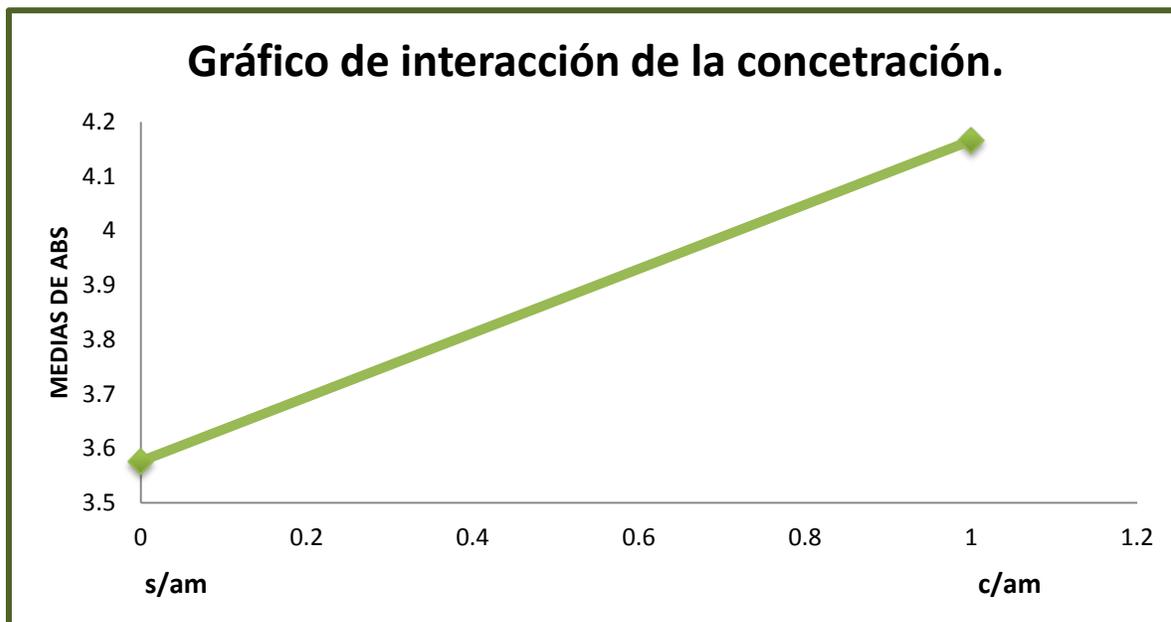


**FIGURA N° 24. Gráfico de medias Log 10 de U.F.C./ml de *Staphylococcus aureus*. Tratamiento SA (sin antimicrobiano) y CA (con antimicrobiano).**

En la figura N°24. Se observa que al inicio de la curva, del tiempo 0 al 2 hay un ligero incremento en cuanto al crecimiento microbiano que se mantiene constante hasta las 4 horas, posterior a esto el periodo entre las 4 y 13 horas se observan variaciones que no presenta diferencias estadísticamente significativas (apéndice 6.2); el ligero incremento presentado durante las primeras 2 horas puede deberse al tiempo en el que aditivo tardo en permear al medio y ejercer su efecto sobre el crecimiento microbiano, mismo que se aprecia después de las 4 horas de monitoreo, donde los datos se mantienen a niveles que no presentan diferencias significativas.

En comparación con el tratamiento libre del antimicrobiano, se puede apreciar que mantienen un crecimiento constante con diferencias estadísticamente significativas (apéndice 6.2.) dicha curva de crecimiento es similar a la de la figura N°6 presente en este trabajo en el que la fase estacionaria se da cerca de las 9 horas mientras que en ésta curva se observa la fase estacionaria alrededor de las 14 horas.

En el siguiente gráfico trabajado desde la interacción de la concentración para el cual se graficaron las medias de ambos tratamientos, observándose así que no se ve perjudicada la eficiencia del antimicrobiano al estar fijo en el polímero.



**FIGURA N° 25. Grafica de interacción de la concentración. Donde c/am es con antimicrobiano y s/am es sin antimicrobiano.**

En la figura N°25 es posible apreciar en el gráfico para el comportamiento global del desarrollo del *Staphylococcus aureus*, con y sin antimicrobiano, donde es posible apreciar la notable diferencia que existe entre las medias del log 10 de las U.F.C/ml. desarrolladas en presencia del polímero libre y del polímero adicionado con aceite esencial de orégano. Por lo que es posible concluir que el efecto inhibitorio observado es consecuencia solo de la adición del aceite de orégano, y no del polímero por si solo.

## CAPITULO 5

### 5.1. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, permitieron corroborar que el aceite esencial de orégano se fija al polímero (succinimida) en su estado libre y diluido a una concentración del 10%. Esta etapa también permitió concluir en que el aceite daba una mejor fijación en su estado libre. Se determinó el punto óptimo de fijación del aceite esencial en la matriz polimérica (polisuccinimida) la cual fue de 300 minutos, de tiempo de contacto.

El polímero obtenido mediante el proceso de extrusión en flujo continuo dio como resultado un compuesto con un peso molecular de 1780 g/mol, que presenta una estructura uniforme semi porosa con filamentos claros resultado del proceso de extrusión, constituida en su totalidad por compuestos orgánicos (carbonos y oxígenos) de acuerdo al análisis puntual efectuado; destacándose grupos carbonilo y amidas según el análisis de espectrometría infrarrojo.

El polímero absorbe eficazmente al aceite esencial del orégano debido a la estructura fibrosa y filamentosa que presenta, la cual se recubre en su totalidad, presentándose de forma redondeada.

El polímero presenta un punto de fusión de alrededor de 130°C el cual varía ligeramente (menos de 2°C) en función a los tratamientos de absorción del aceite y contacto con bacterias.

Para la valoración de la efectividad del antimicrobiano fijado al polímero (succinimida), se vio la inhibición del crecimiento de la cepa de *Staphylococcus aureus*, con esto se concluye que se permitió la liberación por parte del polímero (succinimida), sin crear un perjuicio en la eficiencia de la capacidad inhibitoria del antimicrobiano, resultando una inhibición de alrededor de un 1 ciclo logarítmico en 24 horas, esto pudo ser debido a la alta concentración de los compuestos fenólicos responsables de la propiedad antimicrobiana. Concluyendo también en que el polímero por sí solo no presenta la propiedad antimicrobiana.

## CAPITULO 6

### Apéndices

**6.1. Apéndice 1.** Análisis de t-student de la etapa 1. Atrapamiento del aceite esencial de orégano en un polímero (succinimida).

**Cuadro N°11.** Análisis de t-student de la etapa 1. Atrapamiento del aceite esencial de orégano en un polímero (succinimida).

VEHÍCULO Y TIEMPO	NIVEL			
LIBRE, 300	A			
LIBRE, 360	A			
LIBRE, 240	A	B		
LIBRE, 60	A	B		
LIBRE, 480	A	B		
LIBRE, 420	A	B		
LIBRE, 120	A	B		
LIBRE, 180		B		
DILUIDO, 360			C	
DILUIDO, 240			C	
DILUIDO, 420			C	
DILUIDO, 480			C	
DILUIDO, 300			C	
DILUIDO, 120			C	
DILUIDO, 180			C	
DILUIDO, 60			C	
LIBRE, 0				D
DILUIDO, 0				D

**6.2. Apéndice 2.** Análisis de t-student de la etapa 3. Valoración de la eficiencia de la liberación del principio activo del vehículo.

**Cuadro N°12. Análisis de t-student de la etapa 3. Valoración de la eficiencia de la liberación del principio activo del vehículo. (Donde 0 es el tratamiento con antimicrobiano y 1 es el tratamiento sin antimicrobiano).**

CONCENTRACIÓN Y TIEMPO	NIVEL											
0,24	A											
0,14		B										
0,13		B	C									
0,12		B	C	D								
0,10			C	D	E							
0,8				D	E	F						
1,24				D	E	F	G					
0,6					E	F	G	H				
1,14						F	G	H	I			
1,13						F	G	H	I	J		
1,12							G	H	I	J	K	
0,4							G	H	I	J	K	
1,10								H	I	J	K	
1,8								H	I	J	K	
1,6								H	I	J	K	
0,2									I	J	K	
1,4										J	K	
1,2											K	L
0,0												L
1,0												L

**6.3. Apéndice 3.** Análisis de los elementos presentes en el polímero en su estado original.

Element	Weight%	Atomic%
<b>C K</b>	59.17	70.62
<b>O K</b>	31.40	28.13
<b>Ag L</b>	9.43	1.25
<b>Totals</b>	100.00	

**6.4. Apéndice 4.** Análisis de los elementos presentes en el polímero con el aceite de orégano adherido.

Element	Weight%	Atomic%
<b>C K</b>	49.33	69.17
<b>O K</b>	25.57	26.92
<b>Ag L</b>	25.10	3.92
<b>Totals</b>	100.00	

**6.5. Apéndice 5.** Análisis de los elementos presentes en el polímero con el antimicrobiano y en contacto con la cepa.

Element	Weight%	Atomic%
<b>C K</b>	14.46	60.29
<b>Ag L</b>	85.54	39.71
<b>Totals</b>	100.00	

## CAPITULO 7

### 7.1. BIBLIOGRAFÍA

Abirni, J.; Bourdi, S.; Manresa, A.; Zhiri, A. 2008. "Investigation of Functional and Morphological Changes in Pseudomonas Aeruginosa and Staphylococcus Aureus Cells Induced by Origanum Compactum Essential oil. Tétouan, Marruecos. Journal of Applied Microbiology. ( Abirni, J. *et al.* 2008)

Autor Anónimo. 2003. "Microencapsulación. Nuevas Capacidades Para los Tejidos Tradicionales". Revista: AITEX N°9. (Anónimo, 2003)

Alimentación y Nutrición. "Alimentos. Actualidad y Conservación". Consultado el 5 de septiembre de 2012. En línea en: [www.alimentacionynutricion.org](http://www.alimentacionynutricion.org) (Alimentación y Nutrición. 2005)

Amarnath, Ch.; Anand P.K.; Laxmi, A.; Mukesh, K.; Mutyalasetty, K. 2013. "Distinction of mass spectrometry and in - source Pyroglutamate succinimide A- solution and protein: a case study of rhG – CSF. Revista de la sociedad Americana de la espectrometría de masas. Karnataka, India. (Amarnath, Ch. *et al.* 2013)

Arcila Lozano, C.C.; Loarca Piña, G.; Lecona Uribe, S.; González Mejía, E. 2004. "El Orégano: Propiedades, Composición, y Actividad Biológica de sus Componentes". Revista: Alan. Vol. 54. N° 1. (Arcila Lozano, C.C. *et al.* 2004)

Baro, S.; Bordan, N.; Clavaguera-Mora.; Clavaguera, M.T.; Suriñan, M.D. 1992. "Calorimetría Diferencial de Barrido y su Aplicación a la Ciencia de Materiales". Física de Materiales, Departamento de Física, Universidad Autónoma de Barcelona.

Barreiro, J.A.; Mendoza, S.; Sandoval, A. 1994. "Higiene y Saneamiento en la Preparación y Servicio de Alimentos". (Barreiro, J.A. *et al.* 1994)

Battle, R.; López, P.; Sánchez, C.; Nerín, C. 2005. "Actividades Antimicrobianas y Sólidos en Fase Vapor de Seis Aceites esenciales: la susceptibilidad de las cepas seleccionadas de bacterias y hongos transmitidos por los alimentos." Revista: Química Agrícola y Alimentaria.

Centeno Hernández., J.J. 2009. Microencapsulación de aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri schauer*) para su aplicación en la conservación de carne de res. México. Tesis. ING. U.A.A.A.N. Saltillo, Coah. México. (Centeno Hernández., J.J. 2009)

Consejo Mexicano de la carne A.C.2012. "Presentación del Compendio Estadística 2012 de la Industria Cárnica Mexicana.(Consejo Mexicano de la Carne A.C. 2012)

Cueto Wong, M.C. 2010. "Determinación del Efecto Inhibitorio del Aceite Esencial y Diferentes Extractos de Orégano *Lippia berlandieri* Schauer) Sobre el Crecimiento de *Fusarium Oxysporum* Tanto *in vitro* Como en Plántula de Tomate". Tesis como requisito para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS con acentuación en Alimentos. De la Universidad Autónoma de Nuevo León. (Cueto Wong, M.C. 2012)

Díaz Ramírez, B.; Rivera Montes, G.; Rojas Pérez, M.A.; Silva Vázquez, R. 2007. "Respuesta al Balance Hormonal en Segmentos Nodales de Orégano (*Lippia berlandieri* Schauer)". (Díaz Ramírez. *et al.* 2007) Charley, H. 2007. "Tecnología de Alimentos". Editorial Limusa. México, D.F. (Charley, H.2007)

Egan, H.; Kirk, R.S.; Sawyer, R. 2004. "Composición y Análisis de Alimentos de Pearson". 9ª edición. Editorial continental. México, D.F. Pp 517-519. (Egan,H. *et al.* 2004)

Cubero, N.; Monferrer, A.; Villalta, J. 2002. "Aditivos Alimentarios". Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. Pp 58-74. (Cubero,N. *et al.* 2002)

Fernández Yáñez, J.; Márquez Robles, M.; Ramos Ramírez, E.B.; Salazar Montoya, J.A. 2002. "Aplicaciones Biotecnológicas de la Microencapsulación". Bioingeniería de CINVESTAV. (Fernández Yáñez, J. *et al.* 2002)

Flores Guzmán, J.D.; Morales Castro, J.; Delgado Licón, E.; Gallegos Infante, J.A.; Soto Cruz, O.N. "Empaque con Actividad Antimicrobiana a Partir de Aceite Esencial de Orégano". Instituto Tecnológico de Durango. Postgrado de Ingeniería Bioquímica. Durango, México. (Flores Guzmán, J.D. *et al.*)

García Garibay, R.; López Munguía, C.; Quintero Ramírez, A. 2004. "Biotecnología Alimentaria." Ed. Limusa. México, D.F.

Galicia García, T.; Martínez Bustos, F.; Jiménez Arévalo, O.; Martínez, A.B.; Ibarra Gómez, R.; Gaytán Martínez, M.; Mendoza Duarte, M. 2010. "Thermal and Microstructural Characterization of Biodegradable Films Prepared by Extrusion-Calendaring Process".ELSEVIER. Querétaro, México. (Galicia García. *et al.* 2010)

García, A.; Arellano, S.; Plaza, H. "Elaboración de Biopelículas a partir del nejayote de maíz (*zeamays*) y almidón de sorgo (*Sorghum bicolor Moench*) aplicadas en fresa (*Fragaria vesca.*)". Universidad Politécnica de Guanajuato.

Garrigós, M.; Jiménez, A.; Peltzer, M.; Ramos, M. Abril 2012. "Caracterización y Estudios de Actividad Antimicrobiana de las Películas de Polipropileno con Carvacrol y Timol para Envases". Revista: Journal of Food engineering. Pp. 513-519.

Gastélum Franco, M.; Paredes Aguilar, M.; Silva Vázquez, R. 2007. "Efecto Antimicrobiano del Orégano Mexicano (*Lippia berlandieri Schauer*) y de su Aceite Esencial Sobre Cinco Especies del Género *Vibrio*". Revista Fitotecnia Mexicana. Vol. 30.

Ávila Sosa, R.; Gastélum Franco, M.; Camacho Dávila, A.; Torres Muñoz, J. V.; Nevárez Moorillón, G. V. 2008. "Los extractos de orégano mexicano (*Lippia berlandieri Schauer*) con actividad antioxidante y antimicrobiana". Food and

Bioprocess Technology an International Journal. Chihuahua, Chihuahua, México. (Ávila Sosa, R. *et al.* 2008)

Huerta Valdés, B.; Meneses Avalos, C.; Peralta Varela, F.; Ramírez Vázquez, A. 2010. "Elaboración Higiénica de Alimentos." Colegio de bachilleres del estado de sonora. [www.cobachsonora.edu.mx](http://www.cobachsonora.edu.mx) Consultado el 23 de febrero de 2012.

Illanes Esparza, J.F. 2004. "Envases Flexibles Plásticos: Uso y Aplicaciones en la Industria Alimentaria." Tesis. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. (Illanes Esparza, J.F. 2004)

Infagrow. Consultado el 03 de septiembre de 2012. En línea en: [www.infoagro.com](http://www.infoagro.com)

Ingraham, J.L.; Painter, P.R.; Stanier, R.Y.; Wheelis, M.L. 1992. "Microbiología". Segunda edición. Editorial Reverté. S.A. Barcelona.

Jung, J.; Ko, S.; Puligundla, P. 2011. "Carbon Dioxide Sensors for Intelligent Food Packaging Applications". Seoul. Journal Elsevier. (Jung, J. *et al.* 2011)

Martínez, A. 2003. "Aceites Esenciales". Medellín, Colombia. Universidad de Antioquia. (Martínez, A. 2003)

Marzo Rojas, I. "Efecto del Tipo y Contenido de Aceites Esenciales Sobre las Propiedades Mecánicas y Barrera de Películas comestibles basadas en Zeína". Junio, 2010. Tesis de ingeniería, requisito para obtener el título de; ingeniero técnico agrícola en industrias agrarias y alimentarias. Universidad Pública de Navarra. Pamplona, España. (Marzo Rojas, I. 2010.)

McMurry, J. 2008. "Química Orgánica". 7ª edición. Cengage Learning Editores, S.A. México, D.F.

Melendez Rentería, N. Agosto 2012. "Diversidad Genética y Actividades Microbiológicas de Orégano Mexicano (*LippiaberlandieriSchauer*).". Tesis maestría. Universidad Autónoma de Coahuila. (Melendez Rentería, N. 2012)

Rangel ortega., S. 2007. Aplicación del aceite esencial de orégano (Lippiaberlandierischauer) como antimicrobiano contrapatógenos anaerobios alimentarios. México. Tesis. U.A.A.A.N. Saltillo, Coah., México. (Rangel Ortega, S. 2007)

Ranken, M.D. "Manual de Industrias de la Carne". 2003. 1era edición. Londres. Ed.Blackwell. (Ranken, M.D. 2003)

Ruíz Avilés, G. 2006. "Obtención y caracterización de un polímero biodegradable a partir del almidón de yuca". Tesis para obtener el título en la maestría de ingeniería de procesamiento de polímeros. Universidad EAFIT. (Ruíz Avilés, G. 2006)

Rodríguez Rivera, V.M., Simón Magro, E. "Bases de la Alimentación Humana".2008. 1era. Edición en Español. España. Ed. Netbiblo. S.L. (Rodríguez Rivera, V.M. y col. 2008)

SachikoKaiharaNitta, KeijiNumata. 2013. "Biopolymer - Based Nanoparticles for Drug/Gene Delivery and Tissue Engineering". International Journal of Molecular Sciences. Saitama, Japan.

Villavicencio Gutiérrez, E. 2007. "Orégano Recurso con Alto Desarrollo". Vol. 33. Revista; Ciencia y Desarrollo. (Villavicencio Gutiérrez, E. 2007)

Zekaría, D. "Los Aceites Esenciales una Alternativa a losAntimicrobianos". Laboratorios Calier. En Línea en:[www.calier.es](http://www.calier.es) (Zekaría,D.)

Fernández Escartín, E. 2008. "Microbiología e Inocuidad de los Alimentos." Segunda edición. Editado por: Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ). México. (Fernández Escartín. 2008)

Fernández López, J.; Pérez Álvarez, J.; Ruíz Navajas, Y.; Viuda Martos, M. Mayo 2008. "Uso de los Aceites Esenciales de Especies. Antimicrobianos Naturales." Revista: Alimentación Equipos y Tecnología. Pp. 44-47

