

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
“ANTONIO NARRO”**

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**



**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA  
POLISUCCINIMIDA FUNCIONALIZADA CON EXTRACTOS DEL  
ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Lippia berlandieri*  
Schauer)**

**POR:**

**HUGO SÁNCHEZ RUIZ**

**TESIS**

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

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Febrero 2015**

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

## “ANTONIO NARRO”

### DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA  
POLISUCCINIMIDA FUNCIONALIZADA CON EXTRACTOS DEL ACEITE  
ESENCIAL DE ORÉGANO (*Lippia berlandieri* Schauer)”

### Tesis

Presentada por:

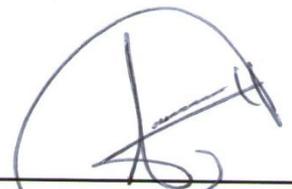
## HUGO SÁNCHEZ RUIZ

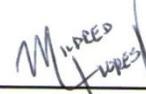
Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito  
parcial para obtener el Título de:

### INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Aprobada

  
\_\_\_\_\_  
M.C. María Hernández González  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
M.P. Francisco Hernández Centeno  
Coasesor

  
\_\_\_\_\_  
M.C. Mildred Inna Flores Verástegui  
Vocal

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Claudia Verónica Ruiz Salazar  
Vocal suplente

  
\_\_\_\_\_  
Dr. José Duñez Alanis  
Coordinador de la División de Ciencia Animal

Buenavista, Saltillo, Coahuila. México. Febrero 2015



## DEDICATORIAS

*A Mis regalos del cielo: **Mis Papás***

*Por el amor, las enseñanzas, las bendiciones y*

*Por las cosas hermosas compartidas...*

***Ma. Carmen Ruiz Gallegos**  
**Clemente Sánchez Ángeles***

*Los quiero mucho*

*A Los confidentes en el caminar de la vida: **Mis Hermanos***

*Por el cariño, la fortaleza, alegrías y*

*El cariño incondicional...*

***Omar Sánchez Ruiz***

***Ángel Mauricio Sánchez Ruiz***

*Se les quiere mucho*

*A Los acompañantes del sueño buitre: **Familia Narro***

*Por su apoyo, cariño, convivencia y*

*Confianza de ser parte de esta vida como buitres...*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A **DIOS** por ser el dador de vida y fe que son la fuerza y anhelo para seguir adelante en el paso de esta vida.*

*A mi gloriosa **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA NARRO** por ser mi casa y por forjar en mí, conocimientos, experiencias, valores y enseñanzas como herramientas principales para triunfar en la vida, en mi corazón siempre estarás **Alma Terra Mater!!!**.*

*Quiero agradecer del mismo modo a la instituciones que me cobijaron y me brindaron la dicha de formar parte de ellas, especialmente a la **Universidad Autónoma de Madrid, Universidad Autónoma de Querétaro, Universidad Autónoma de México y al Centro de Investigación para los Recursos Naturales**, y a las personas que a su paso conocí siendo todas ellas maravillosas para conmigo, mis más sincero agradecimiento.*

*A la **MC. María Hernández González** por ser una persona con mucha calidad humana y carácter profesional siempre entregada a lo que ama hacer. Muchas gracias por guiar en muchos sentidos mi vida universitaria, siendo una de las etapas más increíbles en mi vida, que en un principio fueron sueños y que ahora pasan hacer parte de una historia, gracias por creer en un servidor y por los éxitos compartidos.*

*A los **catedráticos** del departamento de **C.T.A** por brindarme los conocimientos necesarios para ejercer en mi vida profesional, por su confianza y cariño, especialmente a la **MC. Mildred Inna Marcela Flores Verástegui** por ser un ejemplo de vocación a la docencia e investigación, siempre brindado su apoyo con una humildad increíble. En el mismo sentido al **M.P. Francisco Hernández Centeno** por compartir esa sabiduría, enseñanzas y consejos que ningún libro te puede brindar. A la **MC. Sarahi Rangel Ortega** por brindarme la confianza de participar en sus proyectos profesionales lo cual me permitió crecer como persona y como estudiante, además por su valiosa amistad, muchas gracias.*

*Al personal del departamento por brindarme su apoyo, comprensión y calidez humana, logrando crear que el trabajo en el laboratorio fueran muy alegre y ameno, ganándose cada día mi admiración y cariño. Gracias **Zulema y Magda.***

*A **Mi Familia** por ser ese motor inmenso de apoyo incondicional durante la vida y mi estancia universitaria; hoy este logro fue posible gracias a su cariño y apoyo. Mi inspiración y esfuerzo es el fruto de su amor.*

*A los amigos buitres, que más que amigos pasaron a ser mi **FAMILIA NARRO**, gracias por todos los momentos y situaciones que vivimos juntos, que independientemente del tiempo de convivencia el cariño fue muy especial. Espero que su calidad humana, humildad y alegría nunca termine que Diosito me los siga bendiciendo y nos dé la oportunidad de convivir por mucho tiempo más: a los famosos **Don Miguel Ken Manzano (y su becerro) y Julio Barbón Manzano**, a mi compadrito **Vaquero Jiménez (y su cabrito) puertas vaquero**, como olvidar a los compadres inseparables **Gringo Baeza y Tigre Camarillo**, a los hidalgos **Chuy Vicente Martínez, Patrón Martínez, Juan García**, al sobrino **Ing. Richard**, al rival **Chava Armenta** y mi compadre **Joco Cruz.***

*También a los jóvenes **Tranquilo Chávez, al Broncas Pérez, Juve y Marce Manzanos.** A todos gracias por permitirme ser su familia y recuerden **BUITRES POR SIEMPRE.***

*Por último pero no menos importante a los amigos que optamos por el sueño ICTA, espero volverlos a ver especialmente a la **Noña Salinas, Abi Mendoza, Pato Bustamante, Ángeles Carrera** a los baños **Alex, Rafa, Joaquín y Fredy**, al compadre de tesis **Richard Ruiz.***

## **ÍNDICE GENERAL**

ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE TABLAS .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	x

## **CAPÍTULO I**

INTRODUCCIÓN.....	1
JUSTIFICACIÓN.....	3
HIPÓTESIS.....	5
1.3.1. Hipótesis nula.....	5
OBJETIVOS.....	5
1.4.1. Objetivo general .....	5
1.4.2. Objetivo específicos .....	5

## **CAPÍTULO II**

REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
2.1.1. Nuevos métodos de envasado para alimentos.....	6
2.1.2. Envasado activo .....	6
2.1.2.1. Mecanismo de acción .....	7
2.1.2.2. Incorporación del elemento activo .....	8
2.1.3. Principales aplicaciones de envases activos en la industria cárnica.....	9
2.1.3.1. Antimicrobiano .....	9
2.1.3.2. Antioxidante .....	13
2.1.3.3. Eliminadores de oxígeno.....	15

2.1.3.4.	Emisores de dióxido de carbono.....	18
2.1.3.5.	Control de humedad .....	19
2.1.3.6.	Otros sistemas de envasado activo .....	20
2.1.4.	Envasado inteligente .....	22
2.1.5.	Principales aplicaciones de empaques activos en la industria cárnica.....	24
2.1.5.1.	Indicadores de Temperatura-Tiempo.....	24
2.1.5.2.	Indicadores de integridad.....	26
2.1.5.3.	Indicadores de frescura y biosensores.....	27
2.1.5.4.	Etiquetas de identificación por radiofrecuencias (RFID) .....	30
2.1.6.	Microorganismos de descomposición y patógenos en la industria cárnica.....	32
2.1.6.1.	Microorganismos de descomposición .....	33
2.1.6.2.	Microorganismos patógenos.....	34
2.0.5.1.1.	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	35
2.0.5.1.2.	<i>Escherichia coli</i> .....	36
2.1.7.	Aditivos sintéticos comúnmente usados en la industria cárnica para fines antimicrobianos.....	38
2.1.7.1.	Nitratos y nitritos .....	38
2.1.7.2.	Ácido sórbico y sorbatos .....	38
2.1.7.3.	Sulfitos .....	39
2.1.7.4.	Ácido acético y acetatos .....	39
2.1.8.	Aditivos naturales para fines antimicrobianos.....	40
2.1.8.1.	Bacteriocinas .....	40
2.1.8.2.	Bacteriófagos.....	41
2.1.8.3.	De origen animal.....	42

2.1.8.4. Aceites esenciales .....	43
2.1.9. Orégano mexicano ( <i>Lippia berlandieri</i> schauer) .....	48
2.1.9.1. Mecanismos de acción de los principios activos .....	49
2.1.9.2. Tendencias .....	51

### **CAPÍTULO III**

MATERIALES Y METODOLOGÍA .....	55
3.1.1. Localización del experimento .....	55
3.1.2. Materiales .....	55
3.1.3. Etapa I. Atrapamiento del aceite esencial de orégano .....	56
3.1.4. Etapa II. Viabilización e identificación de cepas bacterianas .....	56
3.1.5. Etapa III. Valoración de la eficiencia antimicrobiana .....	57
3.1.5.1. Preparación de los inóculos equivalentes al tubo número 4 de la escala de Mcfarland. ....	57
3.1.5.2. Valoración antimicrobiana .....	58
3.1.6. Etapa IV. Análisis del efecto antimicrobiano mediante microscopía óptica y electrónica de barrido .....	60
3.1.7. Etapa V. Estudio de migración .....	60

### **CAPÍTULO IV**

RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	62
4.1.1. Etapa I Atrapamiento del aceite esencial de orégano .....	62
4.1.2. Etapa II. Viabilización e identificación de cepas bacterianas .....	62
4.1.3. Etapa III. Valoración de la eficiencia antimicrobiana .....	64
4.1.3.1. Antibiogramas .....	64
4.1.3.2. Cinéticas de crecimiento .....	72

4.1.4. Etapa IV. Análisis del efecto antimicrobiano mediante microscopía óptica y electrónica de barrido.....	80
4.1.5. Etapa V. Estudio de migración .....	82
<b>CAPÍTULO V</b>	
CONCLUSIONES .....	92
<b>CAPÍTULO VI</b>	
BIBLIOGRAFÍA.....	94
<b>CAPÍTULO VII</b>	
APENDICES .....	109
7.1.1. Apéndice 1. Análisis t-student de los halos de inhibición del polímero extruido en contacto con <i>Staphylococcus aureus</i> .....	109
7.1.2. Apéndice 2. Análisis t-student de los halos de inhibición del polímero policondensado en contacto con <i>Staphylococcus aureus</i> . .....	109
7.1.3. Apéndice 3. Análisis t-student de los halos de inhibición del polímero extruido en contacto con <i>Escherichia coli</i> .....	109
7.1.4. Apéndice 4. Análisis t-student de los halos de inhibición del polímero policondensado en contacto con <i>Escherichia coli</i> .....	109
7.1.5. Apéndice 5. Análisis t-student del polímero extruido en contacto con <i>Staphylococcus aureus</i> en base al tiempo experimental. ....	110
7.1.6. Apéndice 6. Análisis t-student sobre la inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> en contacto con el polímero extruido.....	111
7.1.7. Apéndice 7. Análisis t-student del polímero policondensado en contacto con <i>Staphylococcus aureus</i> en base al tiempo experimental...	111
7.1.8. Apéndice 8. Análisis t-student sobre la inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> en contacto con el polímero policondensado.....	113

7.1.9. Apéndice 9. Análisis t-student del polímero extruido en contacto con <i>Escherichia coli</i> en base al tiempo experimental. ....	113
7.1.10. Apéndice 10. Análisis t-student sobre la inhibición de <i>Escherichia coli</i> en contacto con el polímero extruido.....	115
7.1.11. Apéndice 11. Análisis t-student del polímero policondensado en contacto con <i>Escherichia coli</i> en base al tiempo experimental.....	115
7.1.12. Apéndice 12. Análisis t-student sobre la inhibición de <i>Escherichia coli</i> en contacto con el polímero policondensado. ....	117

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Características antimicrobianas de los aceites esenciales .....	45
<b>Tabla 2.</b> Componentes químicos del orégano que determinan su calidad comercial. Análisis comparativo con dos especies extranjeras. ....	49
<b>Tabla 3.</b> Absorbancia con respecto a la escala de Mcfarland .....	58
<b>Tabla 4.</b> Halos de inhibición del polímero extruido vs <i>Staphylococcus aureus</i> .....	65
<b>Tabla 5.</b> Halos de inhibición del polímero policondensado vs <i>Staphylococcus aureus</i> .....	67
<b>Tabla 6.</b> Halos de inhibición del polímero extruido vs <i>Escherichia coli</i> .....	69
<b>Tabla 7.</b> Halos de inhibición del polímero policondensado vs <i>Escherichia coli</i> .....	71
<b>Tabla 8.</b> Compuestos mayoritarios presentes en el aceite de orégano ( <i>L. berlandieri</i> Schauer).....	83

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Indicadores de calidad en alimentos: tendencias de los indicadores directos y principales indicadores indirectos.....	24
<b>Figura 2.</b> Tinción de Gram de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	36
<b>Figura 3.</b> Microfotografía tomada en microscopio electrónico de barrido de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	36
<b>Figura 4.</b> Tinción de Gram de <i>Escherichia coli</i> .....	37
<b>Figura 5.</b> Microfotografía tomada en microscopio electrónico de barrido de <i>Escherichia coli</i> .....	37
<b>Figura 6.</b> Ubicación y mecanismos en la célula bacteriana para ser sitios de acción por los componentes de los aceites esenciales.....	47
<b>Figura 7.</b> Morfología macroscópica de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	63
<b>Figura 8.</b> Morfología microscópica de <i>Staphylococcus aureus</i> observada a 100x .....	63
<b>Figura 9.</b> Morfología macroscópica de <i>Escherichia coli</i> .....	63
<b>Figura 10.</b> Morfología microscópica de <i>Escherichia coli</i> observada a 100x .	63
<b>Figura 11.</b> Antibiógramas del polímero extruido vs <i>Staphylococcus aureus</i> . (A) alto timol, (B) alto carvacrol, (C) sinergista.....	64
<b>Figura 12.</b> Análisis de medias de los halos de inhibición del polímero extruido vs <i>Staphylococcus aureus</i> .....	66
<b>Figura 13.</b> Antibiógramas del polímero policondensado vs <i>Staphylococcus aureus</i> . (A) alto timol, (B) alto carvacrol, (C) sinergista.....	67
<b>Figura 14.</b> Análisis de medias de los halos de inhibición del polímero policondensado vs <i>Staphylococcus aureus</i> .....	68

<b>Figura 15.</b> Antibiogramas del polímero extruido vs <i>Escherichia coli</i> . (A) alto timol, (B) alto carvacrol, (C) sinergista. ....	69
<b>Figura 16.</b> Análisis de medias de los halos de inhibición del polímero extruido vs <i>Escherichia coli</i> .....	70
<b>Figura 17.</b> Antibiogramas del polímero policondensado vs <i>Escherichia coli</i> . (A) alto timol, (B) alto carvacrol, (C) sinergista.....	70
<b>Figura 18.</b> Análisis de medias de los halos de inhibición del polímero policondensado vs <i>Escherichia coli</i> . ....	71
<b>Figura 19.</b> Cinética de crecimiento microbiano de <i>Staphylococcus aureus</i> en contacto con el polímero extruido impregnado con las fracciones de aceite esencial.....	72
<b>Figura 20.</b> Análisis de medias del crecimiento microbiano de <i>Staphylococcus aureus</i> en contacto con el polímero extruido .....	73
<b>Figura 21.</b> Cinética de crecimiento microbiano de <i>Staphylococcus aureus</i> en contacto con el polímero policondensado impregnado con las fracciones de aceite esencial .....	74
<b>Figura 22.</b> Análisis de medias del crecimiento microbiano de <i>Staphylococcus aureus</i> en contacto con el polímero policondensado .....	75
<b>Figura 23.</b> Cinética de crecimiento microbiano de <i>Escherichia coli</i> en contacto con el polímero extruido impregnado con las fracciones de aceite esencial.....	76
<b>Figura 24.</b> Análisis de medias del crecimiento microbiano de <i>Escherichia coli</i> en contacto con el polímero extruido .....	77
<b>Figura 25.</b> Cinética de crecimiento microbiano de <i>Escherichia coli</i> en contacto con el polímero policondensado impregnado con las fracciones de aceite esencial .....	78
<b>Figura 26.</b> Análisis de medias del crecimiento microbiano de <i>Escherichia coli</i> en contacto con el polímero policondensado .....	78

<b>Figura 27.</b> Frotis de <i>Staphylococcus aureus</i> en contacto con el antimicrobiano.....	80
<b>Figura 28.</b> Frotis de <i>Escherichia coli</i> en contacto con el antimicrobiano .....	80
<b>Figura 29.</b> Frotis de <i>Staphylococcus aureus</i> con antimicrobiano X 5,000....	81
<b>Figura 30.</b> Cromatograma del análisis del aceite esencial de orégano ( <i>L. berlandieri</i> Schauer) fracción sinergista .....	82
<b>Figura 31.</b> Espectro de masas correspondientes a los cuatro picos principales obtenidos de la separación cromatográfica .....	83
<b>Figura 32.</b> Cromatogramas del análisis de etanol (50 °C), en contacto con el polímero policondensado, a los diferentes intervalos de tiempos .....	85
<b>Figura 33.</b> Espectro de masas correspondientes a los dos picos principales obtenidos de la separación cromatográfica del simulante etanol (50 °C) .....	85
<b>Figura 34.</b> Cromatogramas del análisis de etanol (25 °C) en contacto con el polímero extruido, a los diferentes intervalos de tiempos .....	86
<b>Figura 35.</b> Cromatogramas del análisis de etanol (50 °C) en contacto con el polímero extruido, a los diferentes intervalos de tiempos .....	87
<b>Figura 36.</b> Cromatogramas correspondientes al análisis del etanol (4°C) estando en contacto con el polímero extruido .....	88
<b>Figura 37.</b> Espectro de masas correspondientes a los dos picos principales obtenidos de la separación cromatográfica del simulante etanol en las diferentes condiciones de temperatura .....	89

Correo Electrónico ; Hugo Sanchez Ruiz hugo.sanruiz@gmail.com

## RESUMEN

El envasado activo es una alternativa para alargar la vida útil de los alimentos, ya que permite mejorar la funcionalidad del envase gracias a la adición de una sustancia activa en el material de envasado. El presente trabajo tuvo como finalidad evaluar la efectividad antimicrobiana de un empaque activo a base polisuccinimida ante flora patógena de importancia alimentaria, obtenida mediante dos procesos: extrusión y procedimiento térmico (PAS térmico), adicionada con aceites esenciales del orégano (*Lippia berlandieri* Shauer), como aditivo. Se realizó el atrapamiento de la fracción alta timol, alta carvacrol y sinergista al 3% w/w en el polímero extruido y al 7% w/w en el polímero policondensado. Para evaluar la eficiencia antimicrobiana se realizó un ensayo de difusión en gel y un segundo estudio mediante el monitoreo de las cinéticas de crecimiento en cultivos líquidos de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Las tres fracciones presentaron inhibición con diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) con respecto al control; la fracción alta timol fue la fracción más efectiva del análisis microbiológico. Las micrografías del microscopio óptico y electrónico de barrido confirmaron que el daño sufrido por los microorganismos en estudio fue la lisis de la pared celular. Por último, el estudio de migración mediante cromatografía de gases acoplada a masas arrojó que el p-Cimeno y el limoneno son los únicos componentes que migraron al simulante alimentario etanol, por lo que permite evidenciar que el timol y el carvacrol interaccionan químicamente con los materiales de empaque, ya que son compuestos altamente afines por el simulante en estudio y debió existir una fuerza de atracción mayor entre el empaque y el aditivo, que limita su migración, lo cual resulta interesante, ya que la tendencia actual en las áreas alimentarias y farmacéuticas, se orienta a la búsqueda tanto de materiales biodegradables, como de liberación prolongada.

**Palabras clave:** envase activo, aceite esencial, polisuccinimida, timol, carvacrol, antimicrobiano.

# CAPÍTULO I

## **INTRODUCCIÓN**

Los alimentos frescos y mínimamente procesados se deterioran con el paso del tiempo, bien por la acción de microorganismos, por la acción fisicoquímica del entorno o la actividad biológica del propio alimento. Debido a esto, la industria de los alimentos desde hace muchos años a través de las tecnologías convencionales, busca proteger la integridad, inocuidad y calidad de sus productos desarrollados. Pese a estos avances, en algunos productos perecederos la prevalencia de enfermedades transmitida por alimentos es todavía notoria, sobre todo en la mayor parte de los países subdesarrollados.

Por ejemplo, en México la dirección general de epidemiología de la secretaría de salud, señala que la intoxicación alimentaria de origen bacteriano ocupa el cuarto lugar de las enfermedades diarreicas y el décimo respecto del total de casos notificados. Los principales implicados son los lácteos, las carnes y el pollo, así como los hongos, los pescados y mariscos.

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

Hasta hace algunos años el envase ha actuado solamente como una barrera pasiva para proteger al alimento de las causas de deterioro que limitan su vida de anaquel. En la actualidad uno de los desarrollos más innovadores en el área de envasado de alimentos es el envasado activo y el envasado inteligente; basados en las interacciones deliberadas entre el alimento, envase y medio ambiente (Dainelli, Gontard, Spyropoulos, Zondervan-van den Beuken, & Tobback, 2008).

Los envases activos con efecto antimicrobiano emplean sustancias añadidas al material de envasado que migrarán al alimento de forma gradual, o que son efectivas sin migrar (Kerry, O'Grady, & Hogan, 2011) (Jung, 2005). Entre los aditivos empleados actualmente destacan los compuestos de origen natural, siendo protagonistas las especias y sus aceites esenciales como agentes de conservación.

Existe una gran variedad de especias nativas de México reconocidas por sus compuestos bioactivos, entre las que destaca el orégano. Los principales componentes químicos bioactivos de esta planta son el timol y el carvacrol, presentando características antimicrobianas y antioxidantes (Arana Sanchez, y otros, 2009) (Bakkali, Averbeck, Averbeck, & Idaomar, 2008) (Silva Vázquez, Gastélum Franco, Torres Muñoz, Moorillón, & G.V., 2008).

De esta manera el presente trabajo pretende evaluar la efectividad cualitativa y cuantitativa del aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri* Shauer) después de su atrapamiento en polisuccinimida extruida y policondensada como posible material de envase, ante la flora de descomposición y patógena de la carne; que pueden tener un uso potencial como sistemas de envasado activo de carne en el futuro.

## JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se ha reflejado un creciente interés por parte de los consumidores a exigir productos alimentarios con características más cercanas a lo natural, con menos aditivos sintéticos y lograr extender su vida útil con tecnologías de conservación que no presentan un impacto significativo en las características nutricionales, fisicoquímicas, organolépticas y de inocuidad.

Los aditivos químicos, aunque han sido empleados durante varias décadas para el control del crecimiento microbiano, generan gran controversia por los efectos secundarios sobre la salud humana (Reische, Lillard, & Eintenmiller, 1998). Sin embargo, la proliferación de microorganismos en los alimentos es un problema importante que puede conducir al deterioro de la calidad de los productos o, lo más grave, causar enfermedades para los consumidores (López De Ávila, Castaños Peláez, & Mejía Gómez, 2013).

Múltiples investigaciones se han centrado en innovar y desarrollar sistemas de envasado que ayuden a inhibir y/o retrasar el desarrollo de microorganismos descomponedores y patógenos; así como ayudar a mantener parámetros sensoriales, fisicoquímicos y nutricionales aceptables, al igual que ocasionen un menor impacto al medio ambiente.

El envasado activo resulta muy interesante debido a que se basa en una interacción envase-producto-entorno para alargar la vida útil de los alimentos, mejorar las propiedades organolépticas y/o inocuidad alimentaria, manteniendo la calidad del producto (Suppakul, Miltz, Sonneveld, & Bigger, 2003); esta integridad permite atacar esos puntos débiles que algunos alimentos envasados sufren. Dentro de la amplia gama de los tipos de envasados activos, el envase activo con capacidad antimicrobiana reduce el riesgo de microorganismos patógenos y descomponedores asociados a los alimentos. Este tipo de envasado es una forma prometedora principalmente

para productos cárnicos, puesto que la contaminación microbiana de los productos cárnicos ocurre principalmente en la superficie debido al manejo post-procesamiento (Kerry, O'Grady, & Hogan, 2011).

La procedencia de agentes activos antimicrobianos es muy variada, en México no es la excepción, destacando los aceites esenciales extraídos de especias nativas. Resultados obtenidos en investigaciones, reportan que el aceite esencial de orégano presenta interesantes propiedades antimicrobianas como fungistático y antibacteriano atacando a la mayoría de bacterias patógenas, debido a sus componentes mayoritarios (Silva Vazquez, 2003).

En el mismo sentido, los problemas medioambientales derivados del elevado consumo de material plástico en el sector alimentario, y el hecho de que el petróleo sea una fuente de energía no renovable, cada vez más escasa, han conducido a una continua evolución del sector. El desarrollo de materiales de envasado a base de biopolímeros supone el uso de materiales biodegradables, (Marcos Mutual, 2011).

Es de suma importancia dentro de la industria alimentaria, instituciones, científicos, etc. el desarrollo de envases activos a los cuales se les haya incorporado agentes antimicrobianos, donde tomen protagonismo aquellos extraídos de fuentes naturales; aunado a esto, que dichas matrices poliméricas sean más amigables con el medio ambiente, para obtener como resultado un envase más integral que pueda atacar en su mayoría la problemática antes mencionada.

## **HIPÓTESIS**

La polisuccinimida extruida y la obtenida por policondensación térmica (PAS térmico) son adecuadas para el diseño de un empaque activo con actividad antimicrobiana.

### **1.3.1. Hipótesis nula**

La polisuccinimida extruida y la obtenida por policondensación térmica no son adecuadas para el diseño de un empaque activo con actividad antimicrobiana.

## **OBJETIVOS**

### **1.4.1. Objetivo general**

Evaluar la efectividad cualitativa y cuantitativa del aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri* Shauer) después de su atrapamiento en polisuccinimida obtenida mediante dos procesos (extrusión y PAS térmico) ante la flora de descomposición y patógena de la carne.

### **1.4.2. Objetivo específicos**

- Efectuar el atrapamiento de los aceites esenciales de orégano en la polisuccinimida extruida y policondensada.
- Valorar la eficiencia antimicrobiana mediante cinéticas de crecimiento y antibiogramas contra bacterias que presentan diferente composición a nivel de pared celular (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*).
- Comprobar el mecanismo del efecto antimicrobiano mediante microscopía óptica y electrónica de barrido, y un estudio de migración por medio de cromatografía de gases acoplado a masas.

## **CAPÍTULO II**

### **REVISIÓN DE LITERATURA**

#### **2.1.1. Nuevos métodos de envasado para alimentos**

Desde que se comenzaron a utilizar los envases, su finalidad estaba enfocada en ser el medio contenedor, aquel que identifica e informa sobre el producto, la barrera física entre el alimento y el exterior; protegiéndolo de las influencias externas como: microorganismos, oxígeno, malos olores, en algunos casos, de la luz; de igual manera, garantizar la fácil manipulación en las operaciones antes de ser consumido, entre otros. Por tanto, ser inertes cuando se pongan en contacto con el alimento es el objetivo clave de estos materiales, es decir, debe haber un mínimo de interacción entre los alimentos y el envase.

En las últimas décadas, sin embargo, uno de los desarrollos más innovadores en el área de envasado de alimentos es el envasado activo y el envasado inteligente; basados en las interacciones deliberadas entre el alimento, envase y medio ambiente (Dainelli, Gontard, Spyropoulos, Zondervan-van den Beuken, & Tobback, 2008).

A pesar de los intensos trabajos de investigación y desarrollo, se requiere investigación adicional para promover el uso de los envases activos e inteligentes como una herramienta eficaz para garantizar la calidad y seguridad de los alimentos, considerados como parte de las nuevas tecnologías emergentes.

#### **2.1.2. Envasado activo**

Las innovaciones en envases se han ampliado debido a la generación de nuevas materias primas para su fabricación, tales como: nuevos polímeros y complejos multicapa con nuevos diseños y características tecnológicas que resuelven problemáticas específicas, siendo así alternativas potenciales para su aplicación en la industria alimentaria. El proceso de

envasado es uno de los más importantes entre todos los procesos de fabricación de alimentos; en este tenor, se han desarrollado nuevos conceptos, tal es el caso del envase activo.

Dentro de los conceptos establecidos, se puede definir como un tipo de envasado en donde existe una interacción envase-producto-entorno para alargar la vida útil de los alimentos, mejorar las propiedades organolépticas y/o inocuidad alimentaria, manteniendo la calidad del producto (Suppakul, Miltz, Sonneveld, & Bigger, 2003).

Respecto a la legislación establecida por la Unión Europea que se incluye en el reglamento marco sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos (1935/2004), define a los materiales y objetos activos como “los materiales y objetos destinados a ampliar el tiempo de conservación, mantener o mejorar el estado de los alimentos envasados y que están diseñados para incorporar deliberadamente componentes que transmitan o absorban sustancias a los alimentos envasados y/o al entorno de éstos”. (Parlamento Europeo y del Consejo, 2004).

#### **2.1.2.1. Mecanismo de acción**

Los materiales y objetos activos tienen permitido llevar acabo cambios en la composición o en las características organolépticas de los alimentos a condición de que dichas modificaciones cumplan las disposiciones previstas en las legislaciones nacionales e internacionales de alimentos.

Dicho envasado permite mejorar la funcionalidad del envase gracias a la adición de una sustancia activa al material del mismo (Appendini & Hotchkiss, 2002). Los componentes activos son capaces realizar tareas específicas o variadas que los métodos tradicionales de procesamiento y conservación de alimentos resuelven de manera limitada.

Los principios de los envases activos están basados en las propiedades intrínsecas del polímero utilizado como material del envase en

sí o en inclusión, atrapamiento, etc. de determinadas sustancias en el interior del polímero (Gontard, 2000. Citado por Dainelli y colaboradores, 2008).

Entre los mecanismos de actuación se destacan dos principalmente: el primero es la introducción del elemento activo en el interior del envase junto con el producto a envasar, tales como: sobres, etiquetas o bolsitas y segundo, la incorporación del elemento activo en el propio material del envasado en forma de aditivo. Este último mecanismo es más atractivo para su aplicación en la industria alimentaria, debido a que presenta ventajas interesantes, tales como:

- Elimina la operación de introducción del sistema activo en el interior del envase.
- Es más atractivo para el consumidor, ya que no existe la presencia de ningún elemento extraño junto con el alimento.
- Toda la superficie del componente activo entra en contacto con el alimento envasado.

#### **2.1.2.2. Incorporación del elemento activo**

La naturaleza de los agentes activos que pueden añadirse es muy diversa (ácidos orgánicos, enzimas, bacteriocinas, fungicidas, extractos naturales, iones, etanol, etc.), así como la de los materiales en los que se van a incluir (matriz) tales como: papeles, polímeros, plásticos, metales o combinaciones de éstos (Dainelli, Gontard, Spyropoulos, Zondervan-van den Beuken, & Tobback, 2008).

Estas metodologías no solo representan el potencial de innovación en los nuevos métodos de envasado, sino que también constituyen un verdadero desafío en la investigación y desarrollo para evaluar la seguridad de los mismos alimentos.

Las ventajas mencionadas anteriormente, cuando el elemento activo es incorporado en el propio material de envasado en forma de aditivo, hace más versátil el procesamiento de dicho envase, al igual que facilita su incorporación. Dos metodologías destacan para la elaboración del material activo:

- A. Por recubrimiento: la cara interna del envase se recubre con una capa que contiene el agente activo (aspersión, laminado, sumersión).
- B. Por extrusión: el agente activo se incluye junto con el resto de componentes durante la formación del envase.

Para determinar la mejor metodología, desde el punto de vista tecnológico y fisicoquímico, es importante conocer a detalle la naturaleza del elemento activo y las interacciones con la matriz del envase durante dicho procesamiento.

### **2.1.3. Principales aplicaciones de envases activos en la industria cárnica**

#### **2.1.3.1. Antimicrobiano**

La inocuidad de los alimentos es muy vulnerable en algunos productos, la contaminación microbiana y su subsecuente desarrollo reduce la vida de anaquel aumentando el riesgo de enfermedades transmitidas por alimentos. De las diversas aplicaciones de los envases activos, esta es precisamente la más atractiva y en la que ha logrado mayor investigación con resultados exitosos; tal logro se ve reflejado con la introducción al mercado de múltiples envases activos antimicrobianos disponibles, principalmente en los países desarrollados.

Como el mismo nombre lo indica, el principal objetivo del envasado antimicrobiano es la extensión de la vida útil del producto y la reducción del riesgo de microorganismos patógenos y corruptores de los alimentos; es una forma prometedora especialmente para cárnicos.

Puesto que la contaminación microbiana de los productos cárnicos ocurre principalmente en la superficie debido al manejo post-procesamiento, se han hecho intentos para asegurar la inocuidad y el retraso de la descomposición mediante, sprays o inmersiones antimicrobianas (Kerry, O'Grady, & Hogan, 2011). Las limitantes de estos antimicrobianos son, por ejemplo, la neutralización de compuestos en contacto con la superficie de la carne o la difusión de compuestos desde la superficie hacia el interior. La incorporación de agentes bactericidas dentro de las formulaciones de la carne puede producir inactivación parcial de los compuestos activos por los componentes propios de la carne en sí y, por tanto, ejercer o limitar su efecto en la microflora superficial (Quintavalla & Vicini, 2002).

El crecimiento de los microorganismos en los empaques activos se ve limitado o inhibido gracias a la prolongación de la fase de latencia, reducción de los recuentos microbiológicos y efecto por contacto (Marcos Mutual, 2011) (Suppakul, Miltz, Sonneveld, & Bigger, 2003) (Quintavalla & Vicini, 2002).

Las películas antimicrobianas se pueden clasificar en dos tipos: aquellas que contienen un agente antimicrobiano, el cual migra a la superficie del alimento; y aquellas que son efectivas contra el desarrollo de flora patógena y corruptora en la superficie sin migración (Kerry, O'Grady, & Hogan, 2011). Las sustancias migrantes son consideradas dentro de los aditivos alimentarios, por consiguiente, deben estar permitidas por la legislación vigente (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2002. Citado por Marcos Mutual, 2011).

Algunos agentes antimicrobianos usados en el envasado de alimentos son: ácidos orgánicos, sulfitos, nitratos, alcoholes, quelantes, polisacáridos, bacteriocinas y antimicrobianos naturales (Kerry, O'Grady, & Hogan, 2011) (Marcos Mutual, 2011). Debido a la demanda por alimentos más naturales, las innovaciones del envase activo han explorado en mayor frecuencia la incorporación de agentes antimicrobianos de origen natural como parte del material de envasado, su inmovilización y elementos incorporados, entre los

que destacan los aceites esenciales, extractos de plantas y especias. Más adelante se abordará con mayor precisión sobre los envases activos antimicrobianos con agentes de origen natural.

En Japón, la zeolita de plata-sustituída se ha desarrollado como el agente antimicrobiano más común incorporado a los plásticos; los iones plata inhiben una amplia gama de enzimas metabólicas. La zeolita se lamina en una capa fina (3-6 micras) en la superficie del polímero en contacto con el alimento liberando iones Ag (menos del 0.001% de la plata se encuentra en la propia lamina). Al inicio de la década pasada, el inconveniente de su uso era que no se lograba su aprobación por la legislación de Estados Unidos de Norteamérica (EUA) y Unión Europea (EU); la tecnología de iones de plata recibió la aprobación el 9 de junio de 2000 de la Food and Drug Administration (FDA) para su uso en todos los tipos de polímeros en contacto con alimentos en el mercado de EUA (Quintavalla & Vicini, 2002), respecto a la EU hace algunos años se incluyó en la lista provisional de aditivos para su uso en materiales dentro del Reglamento de los Productos Biocidas. Una gama importante de estas tecnologías se encuentran en el mercado, por ejemplo, AgION™, Irgaguard®, Biomaster®.

LINPAC Packagin Ltd. y Addmaster desarrollaron una gama de bandejas con antimicrobianos y soluciones para tapas que contiene Biomaster® para reducir patógenos como *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Campylobacter* en carne fresca (LINPAC, 2012. Citado por Realini y Marcos, 2014).

Natrajan y Sheldon (2000) efectuaron un estudio evaluando materiales de envases como vehículos para transporte y transferencia de formulaciones con nisina (100µg/ml) y concentraciones variables de ácido cítrico en la superficie de productos frescos de ave, evaluando cloruro de polivinilo (PVC), polietileno lineal de baja densidad (LLDPE) y nylon como materiales para inhibir *Salmonella typhimurium* en piel de muslos frescos (pollo de engorda), concluyendo que las películas del empaque recubiertas

con nisina eran efectivas para reducir *S. typhimutium* en la superficie de la piel fresca de muslo.

En el mismo sentido Basch, Jagus, y Flores (2013), estudiaron la eficiencia antimicrobiana de la nisina junto con el sorbato de potasio incorporados individualmente o combinados en películas de almidón de tapioca y sus mezclas con hidroxipropilmetilcelulosa contra *Listeria innocua* y *Zygosaccharomyces bailii* in vitro. Concluyendo que la sinergia de los dos aditivos es mejor que cuando se incorporan de forma individual.

Recientemente las bacterias lácticas, por su potencial antimicrobiano, se han considerado para incorporarse a envases activos. Blanco Massani, y colaboradores (2014) evaluaron en dos películas activas (sintética y gluten) la incorporación de la bacteriocina lactocina 705 y lactocina AL705 producidas por *Lactobacillus curvatus* CRL705 con actividad antimicrobiana en salchichas de Frankfurt inoculadas con bacterias lácticas deteriorantes y *Listeria*, almacenadas a 5°C durante 45 días. Concluyendo que en los empaques activos se inhibió en 2.5 ciclos log a *Listeria*, y con respecto a las bacterias lácticas deteriorantes la inhibición fue menor (0.5 ciclos log).

La actividad antimicrobiana de un extracto de semillas de toronja (GFSE) fue examinado por Ha, Kim y Lee (2001) incorporado por co-extrusión y por un proceso de recubrimiento con solución (0.5% y 1%) en multicapas de películas de polietileno (PE) en carne de res picada. Reportando que al recubrir la película PE con GFSE y con ayuda de una poliamida se obtuvo mayor actividad antimicrobiana comparada con la incorporación por co-extrusión, mostrando una mayor eficiencia en películas cubiertas con 1% GFSE contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*. Ambos tipos de películas con GFSE incorporado, redujeron el desarrollo de bacterias aeróbicas y coliformes en la carne hasta por 18 días a 3°C.

En el mismo tenor, se efectuó un estudio para determinar la eficiencia de polietileno de baja densidad incorporando aceite de ajo por extrusión, para la inhibición de patógenos en panes de carne listos para el consumo, con concentraciones de aceite en 0, 2, 4, 6, y 8% w/w. Los resultados mostraron que, independientemente de la cantidad de aceite (2-8%), los envases activos son capaces de reducir el recuento de *Listeria monocytogenes* después de 15 días de almacenamiento (Sung, Sin, Tee, & Bee, 2014).

Por último, se desarrollaron películas flexibles de polipropileno (PP) y polietileno/copolímero de etileno y alcohol vinílico (PE/EVOH) incorporándoles aceite esencial de canela *Cinnamomum zeylanicum*, orégano *Origanum vulgare*, clavo *Syzygium aromaticum* y canela fortificada con cinamaldehído; se evaluó contra una amplia gama de bacterias Gram+, Gram-, hongos y levaduras. Películas con una concentración 4% w/w de canela fortificada, al igual que aquellas con orégano, inhiben completamente el crecimiento de hongos. Respecto a los microorganismos Gram+ y Gram-, se requiere concentraciones por encima del 8% al 10%, respectivamente. Las películas de PP fueron más efectivas que las PE/EVOH según estudios de López, y colaboradores (2007).

#### **2.1.3.2. Antioxidante**

Durante la vida útil de algunos productos, por su bioquímica y tecnología de envasado, existen procesos de oxidación que afectan directamente al color del alimento; estos mecanismos son algunos de los principales responsables en el deterioro de la calidad de los productos cárnicos. En estos productos el factor sobre la decisión de compra entre varias opciones es precisamente la percepción del color. Los procesos que están estrechamente relacionados con el color son: la oxidación de lípidos y la situación bioquímica de la mioglobina.

Para minimizar o retrasar los procesos oxidativos, los antioxidantes se han empleado con éxito; sin embargo, su aplicación directamente en la

formulación y procesamiento de alimentos trae consigo alteraciones del color o sabor percibidos por los consumidores. Los envases activos representan una estrategia innovadora para incorporar antioxidantes en un polímero para evitar los procesos oxidativos en la carne (Bolumar, Andersen, & Orlien, 2011), identificando varias ventajas en comparación con la adición directa de antioxidantes tales como: liberación controlada, concentraciones bajas, actividad localizada y eliminación de operaciones unitarias en el procesamiento (mezclado, inmersión).

Los agentes antioxidantes pueden aplicarse en los sistemas de empaçado bajo diferentes formas: sobres, etiquetas, películas o inmovilizaciones en la superficie del material, incorporados en la matriz del polímero, películas multicapa, u otros (Realini & Marcos, 2014). Considerando su origen también existen: antioxidantes sintéticos y naturales, destacando estos últimos debido al interés y exigencias de los consumidores.

Contini, y colaboradores (2011) realizaron un estudio sobre el desarrollo de dos envases activos que consisten en polietileno de tereftalato (PET) con una capa atomizada de extractos de cítricos y  $\alpha$ -tocoferol, evaluando la actividad antioxidante en carne cocida almacenada a 4°C; obtuvieron resultados significativamente menores en la oxidación de lípidos para el envase con extractos de cítricos y observaron diferentes orientaciones de los grupos fenólicos sobre la superficie del PET que podrían explicar la eficiencia entre los dos empaques.

Por su parte Camo, Bletrán y Roncalés (2008) evaluaron la formación de metamioglobina, oxidación lipídica, recuento bacteriano y aspectos sensoriales de dos películas activas con romero (*Rosmarinus officinalis*) y orégano (*Origanum vulgare*) en filetes frescos de cordero durante 13 días almacenados bajo iluminación a  $1\pm 1^\circ\text{C}$ ; presentando los dos empaques activos mayor estabilidad oxidativa con respecto al control; y aquellas con orégano (*Origanum vulgare*) fueron significativamente más eficientes respecto a las de romero (*Rosmarinus officinalis*).

Existen también evidencias de efectos producidos por el procesamiento de los productos cárnicos, como la oxidación de los lípidos. Bolumnar, Andersen y Orlie (2011) señalan que el envasado activo fue capaz de retrasar la oxidación superficial inducida por el procesamiento, en un estudio que se realizó en empanadas elaboradas con pechuga y muslos de pollo con un procesado por alta presión (8000 MPa por 10 min a 5°C), almacenadas a 5°C durante 25 días.

### **2.1.3.3. Eliminadores de oxígeno**

Los niveles altos de oxígeno presentes entre el alimento y el envase pueden facilitar el desarrollo de microorganismo corruptores y/o patógenos aerobios, sabores y olores discordantes, cambios de color y pérdida nutricional; lo que reduce significativamente la vida de anaquel de los alimentos (Kerry, O'Grady, & Hogan, 2011). Debido a esto, es fundamental el control del contenido de oxígeno en el microambiente entre el envase y el alimento para poder limitar la velocidad de las reacciones de deterioro y/o descomposición de los alimentos, así como en productos sensibles a este elemento reducir al mínimo o eliminar el O<sub>2</sub> residual.

Los sistemas absorbedores de oxígeno proporcionan una alternativa al vacío y tecnologías de flujo de gas como un medio para mejorar la calidad del producto y su vida de anaquel. (Ozdemir & Floros, 2004). Aunque los alimentos sensibles al oxígeno se pueden envasar utilizando atmósfera modificada o vacío, estas técnicas no siempre facilitan la eliminación completa del O<sub>2</sub>; sumado a esto, durante la vida útil del producto existe la penetración de O<sub>2</sub> a través del material de envase, teniendo aquí su campo de acción los secuestrantes de dicho elemento residual después del envasado.

El uso combinado de eliminadores de O<sub>2</sub> con envasado en atmósfera modificada o envasado al vacío, asegura casi por completo la eliminación de O<sub>2</sub> en microambiente entre el alimento y el envase; mediante su disolución en el producto (Realini & Marcos, 2014). Los eliminadores de oxígeno son

capaces de reducir O<sub>2</sub> residual en el envase a menos del 0.01% según lo declarado por algunos fabricantes (Vermeiren, Heirlings, Devlieghere, & Debereve, 2003).

Las tecnologías existentes para la eliminación de O<sub>2</sub> se basan principalmente en los siguientes conceptos: oxidación de hierro en polvo, oxidación de ácido ascórbico, oxidación de colorantes fotosensibles, oxidación enzimática (glucosa oxidasa y alcohol oxidasa), ácidos grasos insaturados (ácido oleico o linoleico), extracto de arroz o levadura inmovilizada en sustrato sólido (Floros, Dock, & Han, 1997).

Las primeras aplicaciones de absorbedores de oxígeno se incorporaban en el envase en forma de una bolsita, etiqueta o película (incorporación del agente absorbente dentro de la película), tarjeta, línea de cierre o concentrado (Suppakul, Miltz, Sonneveld, & Bigger, 2003).

Tewari y colaboradores (2006) realizaron un estudio donde se evaluó la eficiencia de 2 absorbedores comerciales de O<sub>2</sub> Ageless™ FX-100 y FreshPax™ R-2000 en combinación con un proceso de envasado utilizando atmósfera controlada (nitrógeno) evaluando el cambio de color en filetes de carne *M. psoas major* almacenados a 1 ± 0.5 °C. Los filetes sin absorbedores presentaron mayor cambio de color y proporciones significativas mayores de metamioglobina en comparación con los que sí estuvieron en contacto con absorbedores. La prevención en la formación de metamioglobina se encuentra influenciada por el número y no por el tipo de absorbedor de oxígeno evaluado.

Por su parte, Martínez y colaboradores (2006), sometieron 105 salchichas de carne de cerdo a varios tratamientos de atmósferas modificadas (%O<sub>2</sub>, %CO<sub>2</sub> y %N<sub>2</sub>), algunos en combinación con absorbedores de O<sub>2</sub> y otros más a vacío durante 20 días a 2 ± 1°C en la oscuridad, evaluando parámetros de pH, color, olor y bacterias aerobias. Concluyendo que las salchichas de cerdo almacenadas en 20%CO<sub>2</sub>, 80%N<sub>2</sub> más

Ageless™ FX-40 como absorbedor, redujeron su cuenta microbiana psicotrópica aerobia y extendieron su vida de anaquel en términos de estabilidad de color, olor y lípidos por más de 20 días.

Sin embargo, desde el punto de vista del consumidor, estas aplicaciones a nivel comercial presentan percepciones negativas debido a la presencia del elemento extraño no comestible; además, desde el punto de vista tecnológico y seguridad representan un riesgo de ruptura accidental de las bolsas y propiciar un consumo inadvertido de su contenido.

Recientemente, se generaron alternativas de incorporación de absorbedores de oxígeno dentro del mismo envase. Por tanto, algunas etiquetas de eliminación de oxígeno que se han creado, tales como etiquetas de ATCO® de laboratorios STANDA, son capaces de eliminar los niveles de oxígeno de hasta 100 a 200 cm<sup>3</sup> (Kerry, 2014 y Laboratorios STANDA, 2014<sup>a</sup>. Citado por Realini y Marcos, 2014). Etiquetas a base de hierro (Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc.) pueden absorber oxígeno durante la refrigeración y en condiciones de congelación (Mitsubishi Gas Chemical 2009. Citado por Realini y Marcos, 2014).

En el mismo tema, Cryovac Dision y Sealed Air Corporation USA, desarrollaron una película a base de polímeros Cryovac® OS2000™; que se activa con luz UV y que puede reducir el O<sub>2</sub> de 1% a ppm en 4-10 días. Las películas OS2000™ tienen aplicación en productos cárnicos (Butler, 2002. Citado por Kerry y colaboradores, 2011). Otra alternativa es la inclusión de microorganismos: en los estudios realizados por Anthierens y colaboradores (2011) lograron incorporar esporas del género *Bacillus amyloliquefaciens* como un agente activo en tereftalato de polietileno 1,4- ciclohexano dimetanol y mantener su viabilidad. Concluyendo con éxito que dichas esporas podrían consumir activamente oxígeno en un mínimo de 15 días, después de un periodo de activación de 1-2 días a 30°C en condiciones de humedad alta.

#### **2.1.3.4. Emisores de dióxido de carbono**

El dióxido de carbono en un envase tiene la función de suprimir el desarrollo microbiano. Por tanto, un sistema generador de bióxido de carbono puede considerarse como una técnica complementaria a la absorción de oxígeno (Suppakul, Miltz, Sonneveld, & Bigger, 2003). Se recomiendan niveles altos de dióxido de carbono 10-80% para alimentos como carne y pollo, con el fin de inhibir el desarrollo microbiano en la superficie del producto y así extender la vida de anaquel. Cuando se elimina el O<sub>2</sub> o cuando se llena un envase con una mezcla de gases, incluyendo el dióxido de carbono, puede ocasionar que un envase flexible se colapse. Para estos casos, se recomienda una liberación simultánea de dióxido de carbono de las bolsas o almohadillas insertadas, las cuales consumen el O<sub>2</sub>. Estos sistemas se basan en carbonato de fierro o en una mezcla de ácido ascórbico y bicarbonato de sodio (Rooney, 1995. Citado por Kerry, O'Grady y Hogan, 2011).

Algunos ejemplos comerciales disponibles con doble acción que combinan generadores de dióxido de carbono/absorbedores de oxígeno son: Ageless® G (Mitsubishi Gas Chemical Co., Japón) y FreshPax® M (Multisorb Technologies Inc., USA). Dentro del mismo ámbito el envase Verifrais™, fabricado por SARL Codimer (Francia), se ha utilizado para extender la vida de anaquel de carne fresca; este envase consiste en una bandeja estándar MAP pero que presenta un doble fondo, en el cual, se coloca una bolsa porosa con bicarbonato de sodio/ascorbato. Cuando el jugo exuda de la carne empacada y gotea en la bolsa, se emite el dióxido de carbono absorbido por la carne previniendo que el envase colapse (Kerry, O'Grady, & Hogan, 2011).

Como parte de la evolución de este tipo de envases activos, se han desarrollado emisores de dióxido de carbono que son incorporados dentro de los mismos envases. Aunque las investigaciones son limitadas, recientemente existen aplicaciones directas al control de productos cárnicos.

Un estudio realizado en muestras de jamón inoculadas con una mezcla de cinco cepas de *Listeria monocytogenes* fueron empacadas y valoradas microbiológicamente en diferentes envases: nylon, Etilen-Vinil-Alcohol (EVOH) y polietileno, adicionadas con una película de Activ-Polymer® (CSP Technologies EUA), que contenían O<sub>2</sub> o CO<sub>2</sub> e isotiocianato de alilo. Las muestras se almacenaron entre 4-22°C; los envases con O<sub>2</sub> o CO<sub>2</sub> fueron más eficientes que aquellos con isotiocianato de alilo; presentando inhibiciones significativas con respecto a este último en el recuento microbiano (Chen & Brody, 2013).

#### **2.1.3.5. Control de humedad**

Después del envasado los alimentos requieren un control de humedad, por lo que es conveniente que los materiales no permitan la absorción de humedad del ambiente hacia el interior, así como una eliminación de la existente en el producto. El exceso de agua dentro del envase promueve el crecimiento de bacterias corruptoras y/o patógenas principalmente y, en algunos casos mohos, así como una percepción negativa por parte de los consumidores, es decir, una reducción de la vida útil.

Por otro lado, la evaporación excesiva de agua a través del material de envase puede dar lugar a la desecación del alimento, de igual manera puede favorecer a la oxidación de lípidos. Para disminuir las problemáticas antes mencionadas y controlar la humedad relativa en el interior del envase, durante las operaciones unitarias de envasado se recomienda emplear películas con permeabilidad adecuada al vapor de agua o utilizar una almohadilla o bolsita (absorción por goteo) para el control de la humedad (Vermeiren, Devlieghere, van Beest, de Kruijf, & Debevere, 1999).

Los ciclos de temperatura en alimentos con elevada A<sub>w</sub> han generado el uso de plásticos con un aditivo antiniebla que disminuye la tensión interfacial entre el condensado y la película, permitiendo al consumidor ver claramente el alimento envasado; sin embargo, no modifica la cantidad

existente de agua líquida dentro del empaque (Rooney, 1995. Citado por Kerry, O'Grady, & Hogan, 2011). Existen desecantes que se han utilizado en productos cárnicos y que han presentado resultados positivos. Algunos ejemplos de almohadillas absorbentes utilizadas para el envasado de carne y pescado son Cryovac®Dri-Loc® (Sealed Air Corporation), MoistCatc™ (Kyodo Printing Co. Ltd.) y MeatGuard® (McAirlaid Inc.) (Realini & Marcos, 2014). Algunas almohadillas absorbentes de goteo localizadas bajo el pollo o cortes del mismo tales como: Thermarite® (Australia), Toppan™ (Japón) y Fresh-R-Pax™ (USA), basadas en un polímero súper absorbente localizado entre dos capas de un polímero micro-poroso o no tejido son actualmente comercializadas (Suppakul, Miltz, Sonneveld, & Bigger, 2003).

Finalmente, Nor®Absorbit (Nordenia International AG) es un ejemplo de un material de envase flexible apto para absorber la humedad cuando es necesario el uso del microondas. Estas películas, durante el calentamiento en microondas, son capaces de absorber el exceso de grasa y el agua liberada de los alimentos envasados (por ejemplo, alimentos empanados). Dichas películas remplazarían el uso de susceptores de microondas (Mondi, 2011. Citado por Realini & Marcos, 2014).

#### **2.1.3.6. Otros sistemas de envasado activo**

Además de las técnicas ya mencionadas anteriormente, existen otras aplicaciones potenciales de envasado activo en carnes y productos cárnicos. Durante el almacenamiento de productos cárnicos pueden tener lugar interacciones bioquímicas modificando el perfil organoléptico del alimento. Los absorbentes de sabor/olor pueden tener una aplicación positiva en la industria cárnica.

Algunas tecnologías podrían ser útiles para eliminar olores y sabores discordantes, por ejemplo, los resultantes de la oxidación de lípidos en alimentos cárnicos envasado, tal es el caso del polvo BHM™ que se puede incorporar en envases a base de papel que absorbe aldehídos en los intersticios de los poros del polvo (Kerry, O'Grady, & Hogan, 2011). Los

sabores incorporados pueden ser utilizados para minimizar la pérdida de aroma durante el almacenamiento o proporcionar un medio para enmascarar malos olores procedentes del alimento; también existe la opción de la emisión de sabores agradables y encapsular aromas que se liberen después de la apertura del envasado. Bajo el mismo parámetro, existe un empaque que permite la formación de color rojo en la carne envasada al vacío (FrshCase®) que consiste en una película de nitrito de sodio que cuando entra en contacto con la carne se transforma en óxido nítrico para dar lugar al rojo típico de la carne fresca (Bemis Curwood innovates, 2014).

La aplicación de las tecnologías antes mencionadas deben estar permitidas por la legislación vigente y cumplirlos estándares de calidad, descartando la posibilidad de su aplicación indebida para enmascarar defectos tecnológicos y microbiológicos que perjudiquen la salud de los consumidores.

Por último, han surgido una gran variedad de soluciones de envases activos para el calentamiento en microondas. Los problemas existentes con este tipo de calentamiento se hicieron más frecuentes debido al aumento de alimentos que requieren de esta tecnología para ser consumidos, el cambio de estilos de vida, menor tiempo para la preparación de alimentos, variedad de alimentos listos para consumo, entre otros. Cabe mencionar que los calentamientos se presentan de forma heterogénea en los alimentos, entre ellos los cárnicos (Ryyananen, Risman, & Ohlsson, 2004). Por lo tanto, el envasado activo para microondas está diseñado para mejorar el comportamiento del calentamiento en alimentos como el uso de susceptores o modificadores de calentamiento (Regier, 2014).

Estudios recientes han desarrollado válvulas como parte del empaque que permite la liberación de vapor cuando se alcanza un punto de presión específico durante el calentamiento en el microondas, por ejemplo, válvulas de vapor Flexis™ y MicVac® (Avery Dennison, 2011 y SEALPAC, 2014<sup>a</sup>. Citados por Realini & Marcos, 2014).

#### **2.1.4. Envasado inteligente**

Dentro de las tecnologías emergentes, otro concepto que en la actualidad se convirtió atractivo en los sistemas de envasado, es el envasado inteligente. Este es definido por algunos autores como un sistema capaz de monitorizar y comunicar información acerca del estado del producto a lo largo de la cadena de procesado y tiempo de vida útil mediante la incorporación de un elemento de respuesta a cambios.

Al igual que el envasado activo, el inteligente es considerado por la legislación de la Unión Europea en el reglamento marco sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos (1935/2004), el cual define a “materiales y objetos que controlan el estado de los alimentos envasados o el entorno de estos” (Parlamento Europeo y del Consejo, 2004).

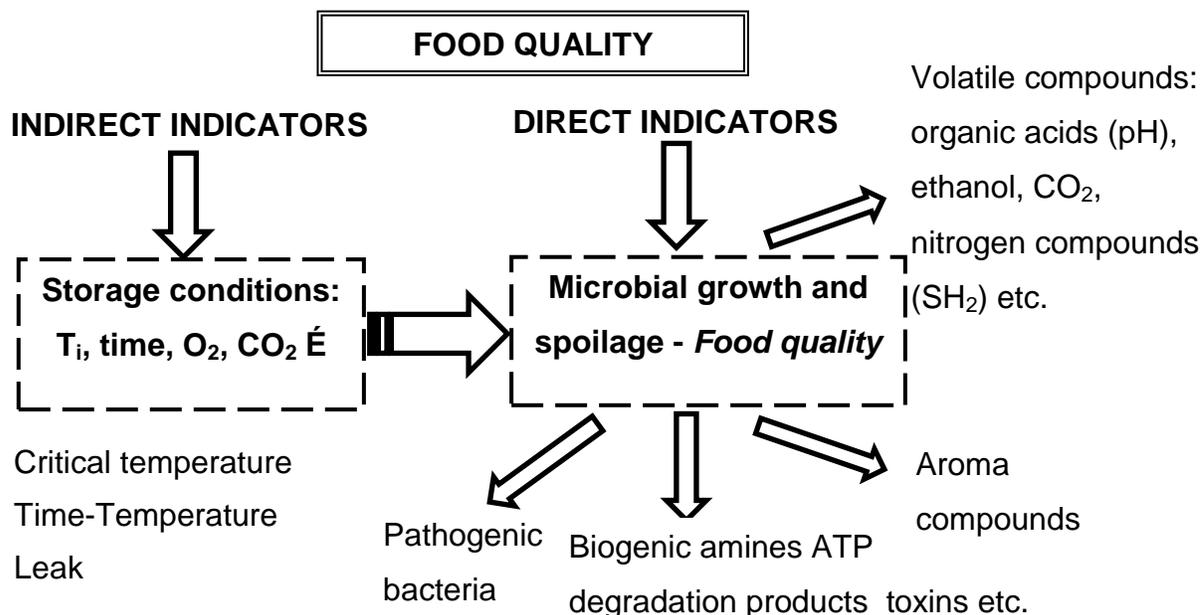
Como parte complementaria e innovadora en comparación con las funciones del envasado tradicional, el envasado inteligente comunica y/o registra al consumidor y a la misma empresa cambios en el alimento o en su entorno. Esto permite también detectar irregularidades a través de toda la cadena hasta su consumo, lo que se traduce en una cadena de suministro más seguro y eficiente, reduciendo las pérdidas por alimentos y residuos, logística, trazabilidad y transporte. Los envases inteligentes también contribuyen como una herramienta en la gestión de los sistemas de certificación y calidad alimentaria como el HACCP (Heising, Dekker, Bartels, & Van Boekel, 2014), por ejemplo:

- Detectar oportunamente alimentos inseguros (finalización de vida útil, incidencias a las que ha estado sometido, etc.).
- Identificar riesgos de salud y establecer estrategias y procedimientos para prevenir, reducir o eliminar su ocurrencia.
- Identificar los procesos que afectan fuertemente los atributos de calidad y eficiencia mejorando la calidad de alimentos.

Inicialmente los indicadores fueron diseñados para proporcionar información sobre las condiciones de almacenamiento tales como: temperatura, tiempo, frescura ( $O_2$ ,  $CO_2$ ), y por tanto indirectamente la información sobre la calidad del propio alimento por ejemplo, tasa de polimerización, difusión, reacciones químicas o enzimáticas, humedad, entre otros, siendo los más utilizados los indicadores críticos de temperatura-tiempo, frescura e indicadores de fugas. En la Figura 1 se presentan los indicadores de calidad empleados en alimentos.

La tendencia es desarrollar indicadores de calidad más específicos para detectar: compuestos volátiles (de origen microbiano), aminas biogénicas, toxinas, así como las propias bacterias patógenas (Dainelli, Gontard, Spyropoulos, Zondervan-van den Beuken, & Tobback, 2008). Es importante comentar que los envases activos e inteligentes pueden establecer una sinergia, interactuando de una manera más integral para extender la vida útil mejorando el estado de los alimentos envasados.

Esta tecnología en la actualidad también ofrece diferentes aplicaciones atractivas en los alimentos de la industria cárnica; por lo que es importante describir la clasificación y ejemplos de empaques inteligentes con mayor incidencia en estos productos.



**Figura 1.** Indicadores de calidad en alimentos: tendencias de los indicadores directos y principales indicadores indirectos. (Dainelli, Gontard, Spyropoulos, Zondervan-van den Beuken, & Tobback, 2008).

## 2.1.5. Principales aplicaciones de empaques activos en la industria cárnica.

### 2.1.5.1. Indicadores de Temperatura-Tiempo

Es la aplicación que en la actualidad se encuentra por encima en investigación, desarrollo e innovación en comparación con las otras categorías de los envases inteligentes.

La temperatura es un factor que influye en el deterioro de los alimentos debido a las variaciones de temperatura durante el almacenamiento y distribución, comprometiendo la inocuidad y vida útil de los alimentos perecederos, tales como las carnes y los productos cárnicos. Los indicadores de temperatura-tiempo (TTI) son herramientas efectivas para el monitoreo continuo de la hora y temperatura del historial de los productos refrigerados y congelados a lo largo de la cadena alimentaria (Lee & Rahman, 2014).

Los TTI son indicadores con cambios visuales debido a la exposición acumulativa tiempo-temperatura superiores a los niveles críticos. Por lo tanto pueden informar acerca de la ruptura de la cadena de frío (indicador indirecto de vida útil). Los indicadores disponibles se basan en procesos biológicos, físicos, químicos o enzimáticos.

Los requisitos básicos de los TTI son: reacción clara, continua e irreversible a los cambios de temperatura. Idealmente también deberían ser de bajo costo, pequeño, de fácil integración, con larga vida útil (pre y post-activación), considerar límites amplios en información de temperaturas, no presentar ningún riesgo toxicológico, entre otras (Kerry, O'Grady, & Hogan, 2011).

La gama de indicadores TTI es variada; existen etiquetas basadas en los códigos de barra que contienen tintas que van desapareciendo debido al abuso de temperatura, por ejemplo: FreshCode™ (Varcode Ltd.) y Tempix® (Tempix AB) (Realini & Marcos, 2014). Por su parte, Ellouze y Augustin (2010) evaluaron dos indicadores biológicos comerciales (EO®) para predecir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* en carne molida de res y rebanadas de pollo envasados en atmósfera modificada. Los autores concluyeron que, cuando existen malas condiciones de almacenamiento, los TTI podrían indicar efectivamente la mala calidad de los mismos, reduciendo la incertidumbre de los alimentos alterados a su exposición con los consumidores.

Por último, polímeros basados en TTI como Freshness Monitor® Fresh-Check se fundamentan en reacciones de polimerización, de temperatura en el que los cristales diacetileno polimerizan a través de la vía 1,4 por la adición de un polímero altamente coloreado. Los cambios en la reflectancia se pueden medir mediante el escaneo con una varita óptica laser. Para la versión del consumidor utilizan una etiqueta circular (dos círculos inscritos) en el que el color del círculo interior se compara con el del

círculo exterior a fin de establecer su estado (Kerry, O'Grady, & Hogan, 2011).

### **2.1.5.2. Indicadores de integridad**

La mayoría de los indicadores se han desarrollado para mantener la integridad de los envases de productos cárnicos, para asegurar los estándares de calidad, la no invasión de agentes externos y dictar información sobre el tiempo en que el alimento se abrió por primera vez en toda la cadena de distribución. En la industria cárnica estos indicadores representan aplicaciones fundamentales en carnes y productos cárnicos envasados en atmosfera modificada (Yam, Takhistov, & Miltz, 2005), considerando a los indicadores de gas los más atractivos.

La causa más común de daño en la integridad de los envases plásticos flexibles se asocia con sellados, es decir, fugas (Hurme, 2003). Pero, también los problemas de fugas se deben a la inadecuada manipulación de los productos en la cadena de distribución.

En los productos envasados en atmosferas modificadas (MAP) se caracterizan por los niveles altos de CO<sub>2</sub> y una pequeña concentración de O<sub>2</sub>; por lo que la detección de fugas se realiza usando indicadores del nivel de O<sub>2</sub>. Los indicadores de O<sub>2</sub> se basan en colorantes redox, como el azul de metileno y un agente reductor como la glucosa en medio alcalino. Un inconveniente de este tipo de indicadores es que el cambio de color es reversible, es decir, la concentración de O<sub>2</sub> se reduce a su forma inicial (Mills, 2005). Si existe O<sub>2</sub> disponible puede ser aprovechado por microorganismos para su proliferación, lo que no es deseable

Las tabletas: Ageless Eye® (Mitsubishi Gas Chemical Company Inc.) son indicadores reversible usados en combinación con amortiguadores de O<sub>2</sub> AGELESS. El color de las pastillas cambia a rosa a niveles de O<sub>2</sub> <0.1% y a niveles de O<sub>2</sub><0.5% a color azul a una velocidad que depende de la temperatura (Realini & Marcos, 2014).

Vu y Won (2013) desarrollaron un indicador de O<sub>2</sub> que se activa tras la exposición a la luz UV, resistente al agua, el cual que permite identificar la presencia de éste elemento en los envases de manera muy económica y simple. Las películas fueron fabricadas utilizando tionina, glicerol, Ti O<sub>2</sub> y zeína como tinte redox, un donador de electrones, un fotocatalizador semiconductor absorbente de UV y alginato como polímero de encapsulación.

### **2.1.5.3. Indicadores de frescura y biosensores**

Dentro de los indicadores que proporcionan información directa se encuentran los indicadores de frescura, actualmente el desarrollo e innovación de estos se encuentra limitada. A pesar de esto, existe un potencial para el desarrollo de los indicadores, tal es el caso de aquellos con aplicación en la industria cárnica. Al igual que en su aplicación general en alimentos, los indicadores de frescura proveen información inmediata sobre la calidad del producto resultante del crecimiento microbiano y/o cambios químicos dentro del alimento (Realini & Marcos, 2014).

La calidad microbiológica se puede determinar visualmente a través de reacciones entre los metabolitos de crecimiento microbiano e indicadores integrados dentro del paquete (Vanderroost, Ragaert, Devlieghere, & De Meulenaer, 2014), la mayoría se basan en un cambio de color en el indicador debido a la presencia de los metabolitos. La formación de los metabolitos potenciales en productos cárnicos depende del tipo de producto, flora asociada al deterioro, condiciones de almacenamiento y sistema de envasado.

Entre ellos se encuentran los indicadores basados en los cambios de pH, debido a los cambios de concentración de ácidos orgánicos tales como *n*-butirato, *L*-ácido láctico, *D*-lactato y ácido acético (Kerry, O'Grady, & Hogan, 2011). El etanol, ácido láctico y ácido acético, es un indicador importante del metabolismo fermentativo (bacterias ácido lácticas). La producción de CO<sub>2</sub> durante el crecimiento microbiano es otro metabolito que

se puede utilizar como indicador del deterioro de alimentos (Realini & Marcos, 2014). Otros autores se han centrado en la detección de aminas volátiles, conocido como nitrógeno básico volátil total (indicador de frescura en peces), algunas aminas biogénicas como histamina, putrescina, cadaverina y tiramina han sido implicadas como indicadores en carne.

Se han desarrollado indicadores con aplicación en productos cárnicos. Como Kuswandi y colaboradores (2014) se enfocaron en la elaboración de una etiqueta con rojo de metileno determinando así la frescura del pollo. El rojo de metileno se inmovilizó sobre una membrana de celulosa bacteriana, un sensor de frescura fundamentado en el aumento de pH mediante las aminas volátiles producidas gradualmente en el espacio de cabeza del envase, basada en un cambio de color; de rojo a amarillo como índice de putrefacción. Los resultados obtenidos muestran que la etiqueta podría ser utilizada para determinar el grado de frescura en el pollo durante condiciones ambientales y en refrigeración.

Por otra parte, Smolander y colaboradores (2002) evaluaron un indicador de frescura en carne de aves envasada en atmosfera modificada que indica la presencia de sulfuro de hidrógeno producido durante el envejecimiento de la carne. Dicho indicador se basa en un cambio de color de la mioglobina de agarosa inmovilizada. Los resultados preliminares arrojaron una correlación del indicador con la calidad microbiológica y sensorial del pollo.

Un enfoque potencial es el uso de matrices en sensores calorimétricos capaces de ofrecer información a través de modulaciones de color adecuado dirigido para su aplicación en cárnicos, minimizando las limitaciones de los indicadores anteriormente mencionados basados en la detección de solo un compuesto que presenta el riesgo de ofrecer falsos positivos o falsos negativos (Kerry, O'Grady, & Hogan, 2011).

Salinas y colaboradores (2014) desarrollaron una nariz optoelectrónica compuesta de siete materiales con sensores basados en indicadores de pH y reactivos cromogénicos selectivos en materiales inorgánicos (UVM-7 y alúmina), con diferentes propiedades de reconocimiento químico, para controlar la calidad de salchichas de cerdo envasadas en atmósfera modificada. Según los resultados obtenidos, la matriz fue capaz de supervisar el proceso de deterioro de salchichas frescas.

En el mismo orden de ideas, los biosensores son sistemas inteligentes capaces de detectar metabolitos de destino que pueden ser incorporados a los envases de alimentos. Ellos son capaces de controlar la frescura de los alimentos de manera más específica que los indicadores de frescura, ya que pueden detectar la formación de productos de degradación y pueden ser diseñados para adaptarse de acuerdo con el tipo de producto.

Un biosensor es un dispositivo analítico compacto que detecta, registra y transmite la información relativa a las reacciones bioquímicas; sus componentes principales son: un bioreceptor que reconoce un analito diana y un transductor que convierte las señales bioquímicas en una respuesta eléctrica cuantificable. (Realini & Marcos, 2014).

Kelly, Murray y Uy (2005) patentaron un sensor de huella polimérica molecular para el deterioro de alimentos que comprende un polímero con un complejo de poliazamacrocíclico, metal de transición. El complejo se une selectivamente a aminos biogénicos, tales como cadaverina, putrescina e histamina, que se liberan por microorganismos causantes de deterioro. El polímero experimenta un cambio de color detectable tras la exposición a aminos biogénicos, dicho polímero se incorpora fácilmente en los envases de alimentos comunes.

La evaluación de frescura en carne de cerdo se realizó mediante el desarrollo de un sensor para detectar glucosa; usando un electrodo de oro modificado con L-cisteína y nanogold, y una oxidasa poliglutamato-glucosa.

Los resultados mostraron que el sensor desarrollado es un método rápido y viable, según el estudio de Umuhumuza y Sun (2011).

#### **2.1.5.4. Etiquetas de identificación por radiofrecuencias (RFID)**

Esta tecnología de envases inteligentes representa una tecnología independiente. Las RFID se agrupan bajo el término de identificación automática junto con los códigos de barras, códigos QR, tintas magnéticas, etc. La identificación por radiofrecuencia usa campos electromagnéticos de radiofrecuencia para almacenar y comunicar información en tiempo real del producto, identificando automáticamente los productos (trazabilidad).

Las etiquetas RFID consisten en un circuito integrado, conectado a una antena para la transmisión de información almacenada en el microchip a un lector. RFID ofrecen una serie de beneficios potenciales para la producción de carne, distribución, mejoramiento de la trazabilidad, gestión de inventario, entre otras. Se pueden clasificar en tres tipos en función a la fuente de alimentación:

- Etiquetas RFID pasivas: no tienen batería y son alimentadas por las ondas electromagnéticas emitidas por el lector mediante dos mecanismos: acoplamiento de inducción y de retrodispersión. En comparación con otras etiquetas, éstas son más pequeñas y livianas, pudiendo leerse a pocos metros.
- Etiquetas RFID semi-pasivas: utilizan una batería para mantener la memoria en la etiqueta, que permite modular las ondas electromagnéticas emitidas por la antena del lector. La batería también ayuda a extender el alcance de la transmisión de datos que se remonta al lector.

- Etiquetas RFID activas: son alimentadas por una batería interna que se utiliza para ejecutar los circuitos del microchip y emitir una señal al lector; generalmente garantizan un mayor alcance de lectura pero son más costosas. (Vanderroost, Ragaert, Devlieghere, & De Meulenaer, 2014).

Las aplicaciones comerciales de este tipo de etiquetas en la industria cárnica son muy variadas. Algunos países han empleado RFID para rastrear animales, principalmente ganado vacuno, desde su nacimiento hasta la planta de procesamiento. La clave para la trazabilidad animal reside en la capacidad para transferir información de forma secuencial y con precisión a las subpartes durante la producción (Kerry, O'Grady, & Hogan, 2011).

Martínez Olmos y colaboradores (2013) inventaron una etiqueta RFID con un indicador óptico para la medición de  $O_2$  que se compone de una membrana de detección a base de platino y un sistema completamente electrónico para la comunicación, impresos en un sustrato flexible. Los datos de salida corresponden a la red de coordenadas del espacio de color RGB directamente relacionada con la concentración de  $O_2$  y se envía a un microcontrolador. El sistema resultó perfectamente adecuado para su uso en sistemas de envasado en atmósferas modificadas, donde la concentración de  $O_2$  se reduce por debajo del 2%, representando un límite de detección de 40ppm.

Finalmente, algunas industrias de envases han incorporado sistemas con RFID en cajas de alimentos. Mondi Plc ha presentado su caja inteligente, que consta de una caja corrugada con una etiqueta RFID, lo que permite rastrear a lo largo de la cadena de almacenamiento el alimento (Mondi, 2014. Citado por Realini & Marcos, 2014).

### **2.1.6. Microorganismos de descomposición y patógenos en la industria cárnica**

El tipo y cantidad de microorganismos que se encuentran presentes en los alimentos depende: del medio ambiente en el cual se obtuvo originalmente el producto sin procesar o en su estado crudo; de las condiciones sanitarias bajo las cuales se manipuló o procesó; y de las condiciones posteriores de empaque, manejo, almacenamiento y distribución.

En general, todos los alimentos contienen un cierto número y tipo de microorganismos que, por inocuidad, es importante que se mantengan en niveles bajos, esperando que los alimentos que se producen en buenas condiciones de manufactura tengan un perfil microbiológico diferente a aquellos que se producen y almacenan bajo condiciones poco deseables (Hui, Guerrero, & Rosmini, 2006).

Para los productos a base de músculo, es decir, carne y productos cárnicos, es importante considerar que las partes internas de los tejidos animales están generalmente estériles y que es teóricamente posible producir productos libres de microorganismo. Sin embargo, la microflora existente en la carne, como ya se resaltó anteriormente, representa los microorganismos existentes en el entorno y los que se acumulan durante su tratamiento, manipulación, envasado y durante la cadena de distribución.

Es conocido que un alimento, que contenga mayor población de microorganismos de descomposición y/o patógenos, tendrá una vida de anaquel más corta. Por consiguiente, para poder establecer su vida de anaquel y los criterios microbiológicos, es fundamental conocer los tipos y niveles de microorganismos presentes en las diferentes etapas de procesamiento que tengan mayor impacto en nuestro producto (Hui, Guerrero, & Rosmini, 2006).

En la carne se distinguen cuatro grupos de microorganismos que se clasifican de acuerdo con las funciones que pueden realizar: microorganismos patógenos, de descomposición, tolerables y benéficos (Hui, Guerrero, & Rosmini, 2006). Esta clasificación ocasiona superposiciones entre los últimos tres grupos mencionados debido a que su consideración debe ser para cada producto; por consiguiente, la presencia de un microorganismo de estos grupos debe enjuiciarse siempre en relación al producto. Por ello algunos autores consideran la suma de estos tres grupos a llamarlos microorganismo de descomposición (Hui, Guerrero, & Rosmini, 2006). A continuación se abordará con detalle los microorganismos de descomposición y patógenos con impacto en la industria cárnica.

#### **2.1.6.1. Microorganismos de descomposición**

La carne es uno de los alimentos más perecederos debido a que se constituye con abundante cantidad de todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de bacterias, levaduras y mohos, es decir, es un buen sustrato para el crecimiento de microorganismo por su elevada  $A_w$ , rica en proteínas, lípidos y diversos componente solubles de bajo peso molecular, vitaminas, minerales y pequeñas concentraciones de carbohidratos; sumando a estos factores intrínsecos y extrínsecos (Salas Valerio, 2014).

Los microorganismos de descomposición son aquellos microorganismos indeseables que no presentan propiedades patógenas pero, debido a su metabolismo, causan alteraciones en los productos que, finalmente, afectan la estética y vida de anaquel de los mismos (Salas Valerio, 2014).

Dentro de las alteraciones más comunes en la carne se encuentran:

- Mucosidad en superficie: la temperatura y humedad influyen en el microorganismo protagonista.

- Cambios de color: alteraciones del pigmento rojo a colores verdes, marrón o gris como resultado de los compuestos oxidados.
- Sabores y olores desagradables: resultado del crecimiento de flora sobre superficie produciendo compuestos volátiles, causando olores y sabores desagradables.
- Fosforescencia: poco común, efecto causado por bacterias fosforescentes o luminosas. (Salas Valerio, 2014)

#### **2.1.6.2. Microorganismos patógenos**

La frecuencia de las enfermedades transmitida por alimentos es elevada, principalmente en países subdesarrollados; a pesar de los avances para erradicar este problema, las intoxicaciones alimentarias siguen estando presentes en los consumidores siendo la carne y los productos cárnicos una fuente importante de infecciones transmitidas por alimentos.

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

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

Algunos de los microorganismos causantes de toxoinfecciones alimentarias más importantes en la actualidad y que pueden ser transmitidos

por la carne a sus consumidores son: *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, algunos serovares de *C.botulinium*, *Staphylococcus aureus*, *C. pefringes*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolítica* (Norrung & Buncic, 2008) (Hui, Guerrero, & Rosmini, 2006).

Dentro de estos microorganismos es importante precisar a detalle sus características, para esta investigación se abordarán las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* con fuerte impacto en la industria cárnica, como índices de calidad en los productos.

#### **2.1.6.2.1. *Staphylococcus aureus***

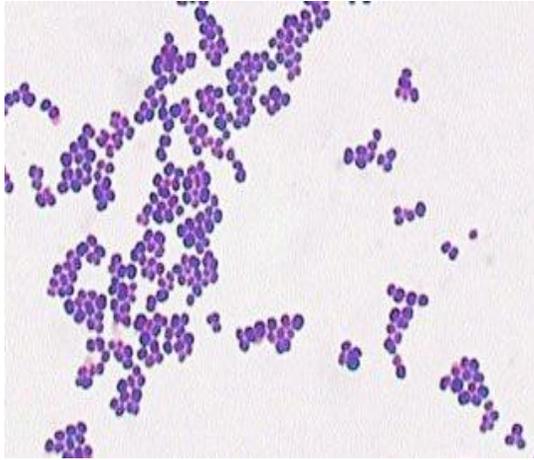
La intoxicación estafilocócica se encuentra dentro de las enfermedades por alimentos más importantes en el ámbito mundial, presente en productos con gran valor proteico.

Esta bacteria pertenece a la familia *Micrococcaceae* y presenta una morfología coco Gram positiva de 0.05-1.5 micras de diámetro, no esporulado e inmóvil, catalasa positiva y que generalmente presenta metabolismo glucosa oxidativo y fermentativo. Las células de *Staphylococcus* muestran un arreglo característico en racimos como consecuencia del modo de división y algunos producen pigmentos carotenoides de color amarillo o dorado. (Fausto, 2006) (Hui, Guerrero, & Rosmini, 2006). En las Figuras 2 y 3, se muestra la morfología tras la tinción de Gram y observada en el microscopio electrónico de barrido, respectivamente.

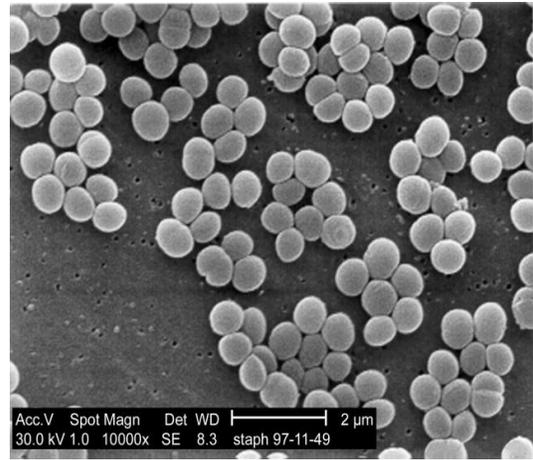
Son mesófilos halotolerantes (10% NaCl) que requieren de un  $A_w=0.98$ , una temperatura mínima de 7°C y una máxima de 48°C, siendo la óptima 37°C; el rango en pH va desde los 4 a los 10, presentando el óptimo a 6.5 (ICMSF, 1997. Citado por Díaz Cortés, 2007).

*Staphylococcus aureus* produce algunos compuestos extracelulares como las hemolisinas, enterotoxinas, coagulasa, nucleasas y lipasas; siendo responsables de la intoxicación las enterotoxinas con características termoestables, coagulasa positiva y termonucleasa positiva. La mayoría de

las carnes crudas se contaminan durante el sacrificio de los animales, ya que estos son ampliamente manipulados.



**Figura 2.** Tinción de Gram.  
(*Staphylococcus aureus*, 2011)



**Figura 3.** Microfotografía tomada en microscopio electrónico de barrido  
(*Staphylococcus aureus*, 2011)

#### **2.1.6.2.2. *Escherichia coli***

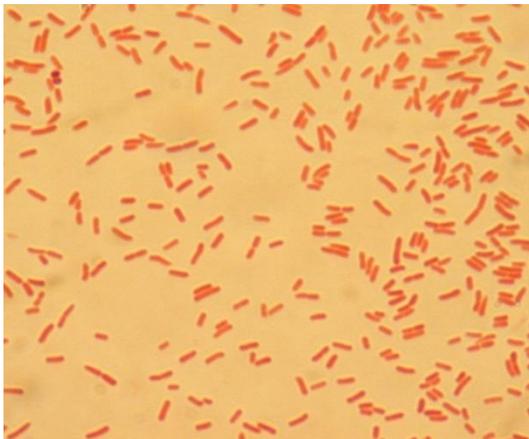
Es una bacteria que se encuentra normalmente en el intestino del ser humano y animales de sangre caliente. La mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas. Sin embargo algunas de ellas, como *E. coli* enterohemorrágica, pueden causar graves enfermedades a través de los alimentos. La bacteria se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

Las bacterias de la especie *E. coli* son representantes de la familia Enterobacteriaceae. Como tales, los organismos son bacilos cortos Gram-, catalasa-positivos, oxidasa negativos, anaerobios facultativos. La mayoría de las cepas fermentan la lactosa, aunque algunas son fermentadoras lentas de este azúcar y algunas son anaerogénicas (Ramis Vergés, 1998). La morfología después de la tinción de Gram y una microfotografía tomada del

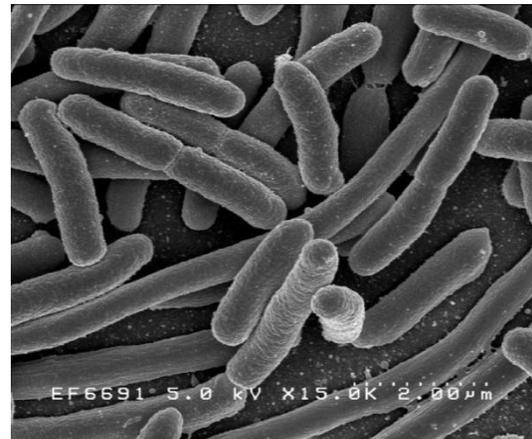
microscopio electrónico de barrido se muestran en la figura 4 y 5, respectivamente.

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

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



**Fig. 4** Tinción de Gram. (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Delegación Cataluña)



**Fig. 5** Microfotografía tomada en microscopio electrónico de barrido. (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Delegación Cataluña)

### **2.1.7. Aditivos sintéticos comúnmente usados en la industria cárnica para fines antimicrobianos**

Los conservadores sintéticos se han utilizado en la industria alimentaria para el control del crecimiento microbiano desde hace muchos años. Estos compuestos son agentes químicos definidos sintetizados en el laboratorio que se agregan intencionalmente a los alimentos. No cualquiera de ellos es adecuado para todos los alimentos, varios factores están inscritos como especificidad de acción, composición del alimento, espectro de acción, nivel inicial de contaminación, manejo y distribución del producto terminado.

La industria cárnica ha implementado una variedad de estos compuestos para extender la vida útil de sus productos en los que podemos destacar:

#### **2.1.7.1. Nitratos y nitritos**

En la elaboración de embutidos cárnicos se emplean como ingredientes de las sales de curación, fosfatos junto con azúcar y otros. La función principal es como conservador inhibiendo la proliferación de *Clostridium botulinum*, microorganismo anaerobio muy peligroso por las neurotoxinas que sintetiza. Los nitritos son más efectivos a pH de 5.5, cuando se mezcla con NaCl, presentando una sinergia (Badui Dergal, 2006).

Además es, responsable del color en productos cárnicos, formando pigmentación estable con la mioglobina; generando el color rosado en los productos cárnicos tratados por calor. Por último, también contribuye a la formación de aroma y sabor; sin embargo, su uso máximo es muy limitado por la generación de nitrosaminas (García Martín, 2013).

#### **2.1.7.2. Ácido sórbico y sorbatos**

Este ácido, al igual que sus sales de sodio y potasio, se usa en menos del 0.3% en peso para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras en los

alimentos con un pH hasta de 6.5. Su forma efectiva aumenta al reducir el pH, es decir, la forma sin disociar es la activa.

El sorbato de potasio es la sal más empleada para controlar hongos, y existen evidencias en algunas bacterias. Por esta razón, los sorbatos se han sugerido como sustitutos de los nitritos y los nitratos que se usan en la curación de los derivados cárnicos; de igual manera se emplean al 5% para rociar o sumergir piezas de carne.

Su función se ejerce al unirse a la superficie de las células microbianas, modificando la permeabilidad de la membrana y el metabolismo, aunque también se ha sugerido que su estructura de dieno interfiere con el sistema enzimático de las deshidrogenasas de los microorganismos (Badui Dergal, 2006).

#### **2.1.7.3. Sulfitos**

Se agrupan en compuestos muy hidrosolubles y cumplen varias funciones en los alimentos, principalmente ejerciendo acciones contra hongos, levaduras y bacterias. Por su importancia destacan los sulfitos de sodio y potasio.

En la industria cárnica son ampliamente utilizados en carnes frescas, productos cárnicos frescos y adobados como conservadores. Ellos presentan inhibición al oscurecimiento no enzimático de Maillard e inhibe el oscurecimiento enzimático debido a que impide la síntesis de quinonas (Badui Dergal, 2006).

#### **2.1.7.4. Ácido acético y acetatos**

Este ácido es el agente activo del vinagre, presente en una concentración entre 3 a 5%; además de que contribuye al gusto y aroma de los alimentos, se utiliza para controlar diferentes especies de levaduras, bacterias y en menor grado hongos; en productos cárnicos que se

almacenan por corto tiempo. Su efectividad incrementa con la reducción de pH, ya que la molécula sin disociar es la activa.

Los acetatos de sodio, potasio y calcio se emplean como conservadores en preparados de carne picada y en preparados cárnicos crudos adobados (Badui Dergal, 2006).

#### **2.1.8. Aditivos naturales para fines antimicrobianos**

Durante las últimas décadas, las innovaciones en las técnicas de producción y desarrollo de alimentos, junto con el creciente interés por la inocuidad alimentaria, han llevado a los consumidores a demandar productos con menos aditivos sintéticos. Ante este escenario, se han explorado nuevas alternativas para extracción y aplicación de antimicrobianos de origen natural, centrandó dichas investigaciones en compuestos biológicamente activos extraídos de plantas o especias, como los aceites esenciales y extractos, también compuestos producidos por microorganismos o algunos de sus metabolitos.

Los compuestos de origen natural han generado lo que ahora se conoce como bioconservación, la cual se define como la extensión de la vida útil y seguridad de los alimentos a través del uso de microbiota natural o controlada y/o sus compuestos antimicrobianos, también por el uso de compuestos antimicrobianos de plantas o sus extractos (García Martín, 2013)

##### **2.1.8.1. Bacteriocinas**

Son péptidos o proteínas producidas por bacterias con capacidad para destruir o inhibir el crecimiento de otras bacterias. El mecanismo de defensa frente a otros microorganismos es, precisamente, la producción de bacteriocinas; la acción antimicrobiana origina permeabilidad en puntos concretos de la membrana, inhibe enzimas de reparación de membrana y la síntesis de la pared celular.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) tienen un gran potencial para el uso en la bioconservación ya que son “generalmente reconocido como seguro” (GRAS) para su consumo y durante el almacenamiento es natural que dominen la microbiota de muchos alimentos (Castellano, Belfiore, Fadda, & Vignolo, 2008)

Las BAL forman parte de la microbiota endógena de la carne y juegan un importante papel en su conservación. Las BAL, gracias a la producción de metabolitos antimicrobianos, principalmente bacteriocinas, responden a una función protectora, debido a la competencia por nutrientes y nicho ecológico con otros microorganismos (Marcos Mutual, 2011). Por este motivo, las bacteriocinas normalmente son efectivas contra un pequeño espectro de microorganismos, similares al productor y que se compiten con él por un mismo y escaso recurso.

Lo antes mencionado se ve reflejado en un estudio realizado por Vignolo y Castellano (2006) el cual consistía en evaluar la inhibición de las bacteriocinas Lactocina 705 y AI 705 producidas por *Lactobacillus curvatus* CRL705 contra *Listeria innocua*, *Brochothrix thermosphacta* y BAL en carne envasada al vacío, almacenadas a 2°C durante 36 días. Los resultados demostraron que las dos bacteriocinas revelaron inhibición con respecto al control, para las dos primeras bacterias mencionadas, reduciendo 3 y 2.1 ciclos log respectivamente; respecto a las BAL, mostraron una menor tasa de crecimiento en presencia de Lactocina 705.

#### **2.1.8.2. Bacteriófagos**

Dentro de las nuevas alternativas en la bioconservación de alimentos, los bacteriófagos presentan aplicaciones atractivas. En primer término, los bacteriófagos son definidos como virus que infectan y matan (fagos líticos), multiplicándose en bacterias de manera específica. Su gama de huéspedes es muy diversa, pero algunos de ellos son específicos para una estrecha gama de cepas bacterianas. Su aplicación puede prevenir incidencias en

enfermedades transmitidas por alimentos causadas por patógenos (Zinno, Devirgiliis, Ercolini, Ongeng, & Mauriello, 2014)

Algunos de los mecanismos de acción se basan en adsorción a receptores bacterianos específicos, penetración, inyección de ácido nucleico, replicación, formación de nuevos fagos y lisis de la bacteria hospedadora por acción de endolisinas, entre otras (García Martín, 2013).

Dentro de las aplicaciones en la industria cárnica existen estudios recientes como los realizados por Guenther y colaboradores (2012) quienes evaluaron la virulencia del fago FO1-E2 para la reducción de *Salmonella typhimurium* en varios alimentos listos para el consumo como fiambres de pavo, perritos calientes, entre otros, durante 6 días a temperaturas de 8°C y 15°C. Reportaron como resultados que a 8°C no se encontraron células viables después de la aplicación de FO1-E2 y a los 15°C el conteo de fagos disminuyó, concluyendo que los fagos virulentos por el bacteriófago ofrece una medida de control eficaz para *Salmonella typhimurium* en alimentos.

### **2.1.8.3. De origen animal**

Como parte de la constante investigación, actualmente se realizan investigaciones en este tipo de bioconservantes, sin embargo, se encuentran limitadas en su aplicación como tal en los alimentos. Dentro de esta clasificación se pueden destacar la lisozima, quitosano y péptidos antimicrobianos; estos últimos son los que requieren mayor investigación (García Martín, 2013).

La lisozima (E1105) es una enzima antimicrobiana de calidad alimentaria, extraída principalmente de la yema de huevo, con actividad bacteriostática bacteriolítica, particularmente contra bacterias Gram- positivas eficientemente en el control del crecimiento de un gran número de patógenos alimentarios debido a su alta estabilidad en un amplio rango de pH y temperatura, mediante la hidrolisis de la pared bacteriana (Mendes de Souza, Fernández, López Carballo, Gavara, & Hernández Muñoz, 2010)

Dentro de las investigaciones en productos cárnicos, Ntimani, Giatrakou y Savvaudis (2010) realizaron un estudio examinando los efectos antimicrobianos naturales: del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), lisozima, romero, orégano, y sus combinaciones, sobre la vida útil de filetes de pollo empacados al vacío, almacenados a 4°C durante 18 días. Dentro de los resultados microbiológicos y sensoriales, las combinaciones de lisozima-romero y lisozima-orégano fueron más eficientes contra el crecimiento de las bacterias Gram negativas, positivas y en menor medida las levaduras, logrando extender la vida útil del producto.

Por su parte el quitosano es un copolímero de glucosamina y N-acetil glucosamina obtenido a partir de la des acetilación de quitina bajo condiciones alcalinas o por hidrólisis enzimática, no tóxico y biodegradable. Ha recibido atención como un potencial conservador de alimentos de origen natural por su actividad antibacteriana y antifúngica (Rao, Chander, & Sharma, 2005); esta actividad antimicrobiana se adjudica por su acción quelante, interacción con grupos aniónicos de bacterias, penetración de oligómeros de quitosano e inhibe formación de esporas e hifas.

Se realizó un estudio para evaluar la eficiencia antimicrobiana y antioxidante de un complejo glucosa quitosano (CGC), al igual que por separado, en carne de cordero. Se obtuvo como resultado que la eficiencia antimicrobiana del complejo y el quitosano por separado fue similar contra *E.coli*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, con una concentración mínima inhibitoria de 0.05%. Respecto a la actividad antioxidante, mostró excelente resultados CGC con respecto a los otros tratamientos. Concluyendo que la adición de CGC a la carne de cordero aumenta su vida útil por más de 2 semanas en refrigeración. (Kanatt, Chander, & Sharma, 2008).

#### **2.1.8.4. Aceites esenciales**

Los agentes antimicrobianos naturales derivados de fuentes tales como los aceites esenciales de plantas, han sido reconocidos y empleados

en alimentos durante siglos como conservadores. Sin embargo, en los últimos años la investigación acerca de las características antibacterianas, antifúngicas y antivirales de estas sustancias han incrementado considerablemente; esto como parte de las exigencias de los consumidores ya mencionadas, enfocándose en extender la vida de anaquel de los productos e incrementar la calidad de los alimentos procesados. (Hernández Figueroa, Palou García, & López Malo, 2014)

Un aceite esencial es un líquido concentrado, hidrófobo que contiene una mezcla de compuestos volátiles aromáticos, con características antimicrobianas, comúnmente derivados de tejidos vegetales (Ha et al., 2008. Citado por Hernández Figueroa, Palou García, & López Malo, 2014). Los aceites esenciales presentan un aroma distintivo a la planta de origen; comúnmente son extraídos por destilación por arrastre con vapor; sin embargo, existen otros métodos de extracción tales como maceración, prensado en frío o extracción con solventes.

Los compuestos de los aceites esenciales son principalmente cadenas cortas de hidrocarburos complementadas con oxígeno, nitrógeno y/o átomos de azufre, unidos en diversos puntos de la cadena (Braca et al., 2008. Citado por Hernández Figueroa, Palou García, & López Malo, 2014). Tales mezclas de diferentes moléculas aromáticas con átomos altamente reactivos, otorgan a estas sustancias las diferentes propiedades funcionales que podrían ser consideradas para muchas aplicaciones en la ciencia y tecnología de los alimentos. (Hernández Figueroa, Palou García, & López Malo, 2014).

Numerosas publicaciones han presentado datos sobre los efectos antimicrobianos de los aceites esenciales de diferentes especias y plantas, al igual que los componentes bioactivos responsables de dichos efectos, con representantes bacterianos Gram+, Gram- y hongos, de relevancia en las enfermedades transmitidas por alimentos; algunos estudios se presentan en la Tabla 1 referente a las características antimicrobianas de algunos aceites esenciales.

Tabla 1. Características antimicrobianas de los aceites esenciales.

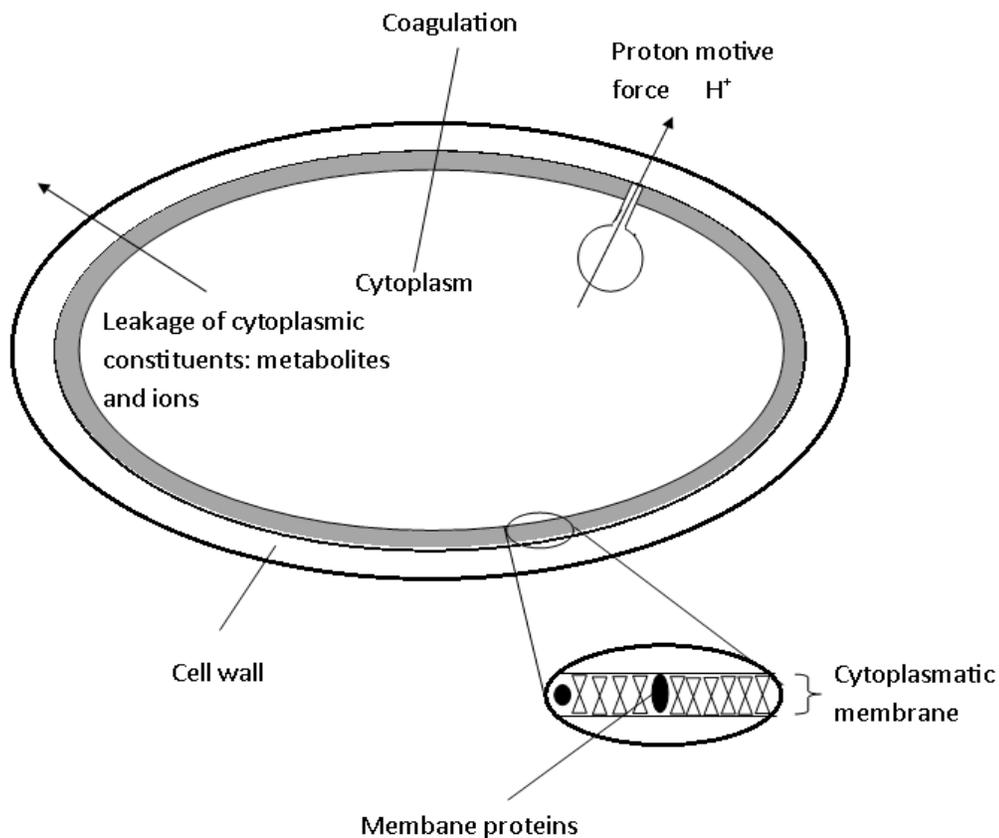
Planta, especie	Constituyentes mayoritarios	Efecto antimicrobiano contra			Referencia
		Bacterias	Hongos		
<b>Ajo (<i>Allium sativum</i>)</b>	Metil disulfuro, alil sulfuro, alil disulfuro, alil trisulfuro, trimetileno trisulfuro, alil tetrasulfuro	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella</i> spp., <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Yersina enterocolitica</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Salmonella infantis</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> .	<i>Alternaria alternata</i>		Roos et al., 2001; Ayala-Zavala et al., 2008b
<b>Albahaca (<i>Ocimum basilicum</i>)</b>	Linalool, metil eugenol, metil cinamato, 1,8 cinelo, cariofileno	<i>Bacillus brevis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klubiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> ,	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium corylophilum</i>		Hammer et al., 1999; Elgayyar et al., 2001; Guynot et al., 2003; Opalchenova y Obreshkova, 2003
<b>Canela (<i>Cinnamoum zeylanicum</i>)</b>	Cinamaldehido, eugenol, copaeno, $\beta$ - cariofileno	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Klubiella pneumoniae</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> ,	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium corylophilum</i> , <i>Alternaria alternata</i>		Chang et al., 2001; Guynot et al., 2003; Rojas-Graü et al., 2006; López-Malo et al., 2007; Du et al., 2009; Yossa et al., 2012
<b>Clavo (<i>Eugenia aromaticum</i>)</b>	Eugenol, acetato de eugenilo, cariofileno	<i>Bacillus brevis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Klubiella pneumoniae</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. entérica</i> .	<i>Candida</i> sp., <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium corylophilum</i> , <i>Rhizopus nigricans</i>		Hammer et al., 1999; Guynot et al., 2003; Burt, 2004; López, et al., 2007; Du et al., 2009; Xing et al., 2011

Tabla 1 Características antimicrobianas de los aceites esenciales (continuación).

<b>Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)</b>	Sabinil monoterpenos , terpinen-4-ol, y-terpineno, carvacrol, timol	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Klubiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i> <i>Shigella spp.</i>	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus stolonifera</i>	Hammer et al., 1999; Elgayyar et al., 2001; Burt 2004; Rojas-Graü et al., 2006; Gutierrez et al, 2008b; Dos Santos et al., 2012
<b>Oregano mexicano (<i>Lippia berlandieri shauer</i>)</b>	Carvacrol, p- cymeno, caryofileno	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> .	<i>Penicillium sp.</i> , <i>Geotrichum sp.</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Bipolaris sp.</i>	Portillo et al., 2005; Avila et al, 2010; Ayala-Zavala et al., 2010; Gómez-Sánchez et al., 2011
<b>Laurel (<i>Laurus nobilis</i>)</b>	1,8-cineole, acetato de $\alpha$ - terpinil, linalool, metil eugenol	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> .		Demo y de las Mercedes Oliva, 2009
<b>Menta piperita (<i>Mentha piperita</i>)</b>	Metanol, metil mentone, metil acetato, mentofurano	<i>Bacillus brevis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Klubiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> .	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium corylophilum</i> .	Hammer et al., 1999; Guynot et al., 2003
<b>Romero (<i>Posmarinus officinalis</i>)</b>	Borneol, verbenona, camphor, a- pimeno, 1,8- cineole	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>Klubiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Shigella spp.</i>	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium corylophilum</i> .	
<b>Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)</b>	Timol, p- cymene, y- terpinene, linalol	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>Klubiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Shigella spp</i> , <i>Clostridium botulinum</i> .	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium corylophilum</i> , <i>Bortrytis cinerea</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> .	

(Hernández Figueroa, Palou García, & López Malo, 2014)

Los mecanismos de acción de los aceites esenciales pueden ser diversos, debido a la gran mezcla de componentes bioactivos que presentan propiedades químicas variadas. El efecto inhibitorio no se atribuye a un solo mecanismo específico en las células sino a múltiples objetivos; entre los que destacan, daño en la membrana citoplasmática, filtración de los contenidos celulares, coagulación del citoplasma, agotamiento de las fuerzas motrices de protones, deterioro en diversos sistemas enzimáticos y cambios en la funcionalidad del material genético, afectan la respiración, producción de toxinas o ácidos, (Ayala-Zavala, OmsOliu, & Odriozola Serrano, 2008) entre otros (Turina, Nolan, Zygadlo, & Perillo, 2006) (Gustafson, y otros, 1998) (Oussalah, Caillet, & Lacroix, 2006) (Barbehenn, Cheek, Gasperut, Lister, & Maben, 2005) (López Malo, Palou, & Alzamora, 2005). Lo anterior se ilustra en la Figura 6.



**Figura 6.** Ubicación y mecanismos en la célula bacteriana para ser sitios de acción por los componentes de los aceites esenciales (Burt, 2004).

Algunos autores reportan estudios de la aplicación de aceites esenciales en productos cárnicos, tal es el caso de Solomakos y colaboradores (2008) quienes determinaron el efecto antimicrobiano de aceite esencial de tomillo, nisina y ambos, contra *Escherichia coli* o157:H7 en carne de res picada durante el almacenamiento a 4 y 10°C. Se obtuvo como resultados que el aceite esencial al 0.6% presenta actividad inhibitoria frente al patógeno en almacenamiento a 10°C, pero no a 4°C; en el mismo sentido, cuando se agregó el aceite esencial a 0.6% y nisina a 500 UI/g mostró una actividad antibacteriana superior a 10°C que a 4°C.

Por su parte, Oussalaha y colaboradores (2006) evaluaron el efecto inhibidor de 60 aceites esenciales contra *Pseudomonas putida*, una cepa asociada con el deterioro de la carne. Los aceites esenciales se ensayaron a concentraciones desde 0.003 hasta 0,8% p/v para determinar la concentración mínima inhibitoria y la concentración máxima tolerada (MIC y MTC) respectivamente, utilizando medios de cultivo. Como resultado se obtuvo que el aceite esencial de *Corydothymus capitatus* fue el más activo ya que muestra una CIM de 0,025% y 0,06% de MTC. Siguiendo de siete aceites esenciales: *Cinnamomum cassia*, *compactum Origanum*, *Origanum heracleoticum*, *Satureja hortensis*, *Satureja montana*, *Thymus Vulgaris carvacroliferum*, *Thymus y vulgaris thymoliferum*; mostrando una MIC de 0,05% y una MTC que van desde 0,013% a 0,025%. Mientras que los restantes presentaban valores menos activos.

### **2.1.9. Orégano mexicano (*Lippia berlandieri schauer*)**

Las especias son plantas aromáticas que han sido utilizadas ampliamente en México para preservar o sazonar diversos alimentos. De la gran variedad de especias nativas de nuestro país, destaca el orégano, específicamente el orégano mexicano (*L. berlandieri schauer*) gracias a sus componentes bioactivos antimicrobianos y antioxidantes (Rangel Ortega, 2007) (Hernández, Silva, Catonga, & Morales, 2007) (Vargas Negrete, 2009)

(Rocha Guzmán, y otros, 2007), siendo así atractivo para su uso en la industria cárnica.

Los estados productores de *L. berlandieri* schauer se ubican en el norte del país, destacando: Chihuahua, Durango, Tamaulipas, Nuevo León, Coahuila. Así mismo, esta planta posee un sabor mucho más fuerte comparado con otras variedades, mismo 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. Citado por Solís Salas, 2013).

En la Tabla 2 se muestran los resultados de un estudio comparativo entre el orégano proveniente de Grecia, Turquía y México, comprueba la calidad y cantidad de los componentes bioactivos mayoritarios de sus aceites esenciales.

**Tabla 2. Componentes químicos del orégano que determinan su calidad comercial. Análisis comparativo con dos especies extranjeras.**

Componentes	Orégano mexicano <i>Lippia berlandieri</i>	Orégano griego <i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>Hirtum</i>	Orégano turco <i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>Gracite</i>
<b>Aceite esencial</b>	6.4%	1.5%	1.5%
<b>Timol</b>	10.4%	23.9%	15.1%
<b>Carvacrol</b>	43.7%	12.2%	9.9%
<b>p-Cimeno</b>	6.4%	15.9 %	8.1%

(Huerta, 2005. Citado por Rangel Ortega, 2007)

### 2.1.9.1. Mecanismos de acción de los principios activos

Los aceites esenciales son mezclas muy complejas que pueden contener alrededor de 20 a 60 componentes en concentraciones variantes, pero se caracterizan por dos o tres componentes principales en concentraciones relativamente altas en comparación con los otros

componentes presentes en cantidades traza (Bakkali, Averbek, Averbek, & Idaomar, 2008).

El orégano (*L. berlandieri* schauer) se caracteriza por dos terpenos bioactivos, el timol y carvacrol, mismos que son responsables de las actividades antimicrobianas y antioxidantes. El timol es estructuralmente muy similar al carvacrol. La diferencia radica en la ubicación del grupo hidroxilo en el anillo fenólico. Debido a su estructura química ambos compuestos fenólicos aumentan la permeabilidad de la membrana celular, afectando la homeostasis del pH y la concentración de iones. (Lambert, Skandamis, Coote, & Nychas, 2001).

En el mismo contexto, el timol y el carvacrol son capaces de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, debido a la liberación de lipopolisacáridos y el aumento de la permeabilidad de la membrana citoplasmática de ATP (Helander, y otros, 1998).

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

También se ha analizado el mecanismo de acción del carvacrol contra *Bacillus cereus* y se encontró que el grupo OH del compuesto y la presencia de un sistema deslocalizado de electrones son requisito importante para la actividad antimicrobiana del carvacrol (Ultee, Kets, Alberda, Hoekstra, & Smid, 2000a). La distorsión de la estructura física sería provocar la expansión y la desestabilización de la membrana, el aumento de la fluidez de la membrana, que a su vez aumenta la permeabilidad pasiva (Ultee, Bennik, & Moezelaar, 2002). Por último también ha resultado antifúngico en cepas como *Penicillium*, *Geotrichum*, *Aspergillus* y *Bipolaris*, cepas que tienen de

impacto en alimentos (Portillo Ruiz, Viramontes Ramos, Muñoz Castellanos, Gastélum Franco, & Nevarez-Moorillon, 2005).

### **2.1.9.2. Tendencias**

La actividad antimicrobiana del aceite esencial tanto de orégano (*L. berlandieri* schauer) como de otras especias, ha sido evaluada en gran número de investigaciones. Sin embargo, la aplicación directa de los aceites esenciales se ve limitada debido a que las concentraciones necesarias para lograr un efecto antimicrobiano son suficientemente altas para modificar el sabor de los alimentos, generando de esta manera alteraciones poco agradables y rechazos por parte del consumidor. Por lo anterior, se busca desarrollar alternativas que minimicen estos problemas, tal es el caso de envases activos en los cuales se incorpora el aceite esencial como parte de los ingredientes para formular el envase.

Por otra parte, los problemas medioambientales derivados del elevado consumo de plásticos y polímeros en el sector alimentario, y el hecho de que el petróleo sea una fuente de energía no renovable cada vez más escasa, han conducido a una continua evolución del sector (Kerry, O'Grady, & Hogan, 2011).

Debido a lo antes mencionado, estos envases buscan el empleo de ingredientes como: polisacáridos, proteínas y lípidos que presentan una variedad de ventajas, tales como; ser biodegradables, comestibles, biocompatibles, de apariencia estética y con propiedades protectoras contra oxígeno y estrés físico; haciendo un empaque más integral, es decir, un empaque activo con características antimicrobianas naturales, empleando ingredientes con menor impacto al medio ambiente (García Martín, 2013). Entre las investigaciones que se pueden puntualizar en este tenor, se citan las siguientes.

Un estudio realizado por Guarda y colaboradores (2011) fue determinar la capacidad antimicrobiana de películas flexibles de plástico, con

un revestimiento de microcápsulas que contienen carvacrol, timol y su combinación, como agentes naturales. Teniendo como premisa la liberación controlada de dichos agentes encapsulados conduciendo así, a la destrucción o inhibición de microorganismos tales como, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Saccharomyces Cerevisiae* y *Aspergillus niger*.

Los resultados con respecto a los hongos presentaron: inhibición para el crecimiento del micelio; sin embargo, no fueron eficaces contra la germinación de las esporas. El timol y carvacrol en concentraciones mínimas inhibitorias de 125-250 ppm y 75-375 ppm respectivamente mostraron actividad significativa contra los microorganismos estudiados. Por, último los resultados arrojados por este estudio para el efecto sinérgico mostraron, que el más alto sinergismo se consiguió a una concentración 50% timol y 50% carvacrol. Por lo anterior, el estudio confirma la idoneidad del uso de estos agentes naturales microencapsulados incorporados en películas de plástico para el envasado de alimentos.

Por su parte, Kuorwel y colaboradores (2011) investigaron la actividad antimicrobiana de películas a base de almidón, recubiertas con linalol, carvacrol y timol contra *Staphylococcus aureus* in vitro e inoculadas sobre la superficie de queso Cheddar. El ensayo realizado in vitro fue en medio sólido utilizando el método de difusión en agar (antibiogramas); se obtuvo como resultado que el efecto inhibitor de los agentes naturales recubiertos sobre las películas, aumentó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) con respecto a la concentración de cada agente. En el mismo contexto, las películas recubiertas inhiben eficazmente el crecimiento de *S. aureus* en la superficie del queso Cheddar. El orden de mayor sensibilidad para dicha bacteria fue timol, carvacrol y linalol respectivamente.

Arana Sánchez y colaboradores (2009) estudiaron la actividad antioxidante (2,2-DiPhenyl-1-PicrylHydrazyl DDPH) y antimicrobiana (MIC) de los aceites esenciales de orégano (*Lippia graveolens*) después de una

microencapsulación en b-ciclodextrina; los aceites esenciales empleados fueron timol, carvacrol y p-cimeno, y el proceso de microencapsulación se realizó mediante un secado por pulverización. Las bacterias empleadas fueron *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *S. aureus*.

Los autores reportaron que los aceites esenciales después de la microencapsulación conservan su actividad antimicrobiana, y aumentaron de 4 a 8 veces su capacidad antioxidante; concluyendo que la microencapsulación en b-ciclodextrina actúa positivamente como protección de los compuestos principales de los aceites esenciales de orégano.

Existen algunas líneas de investigación que se encuentran en desarrollo, tal es el caso de un estudio preliminar que determinó la idoneidad de películas activas ecológicas, obtenidas mediante un proceso de extrusión por difusión, en particular del LDPE, PLA y policaprolactona (PCL), siendo la primera una película reciclable y las dos últimas biodegradables, a las cuales se les impregno extracto de limón, timol y lisozima en diferentes concentraciones.

Los resultados muestran que las temperaturas de procesamiento desempeñan un papel importante en la determinación de la eficiencia antimicrobiana, la película de PCL presentó una mayor retención de los antimicrobianos después de su proceso, debido a que las temperaturas fueron menores que las empleadas con las dos películas restantes. Con respecto a los agentes antimicrobianos, la lisozima presentó mayor estabilidad térmica; por lo que el material a base de PCL e incorporado con lisozima parece ser la matriz polimérica más interesante (Del Nobile, y otros, 2009).

En otro estudio comparativo realizado por Cannarsia y colaboradores (2005) sobre el uso de películas biodegradables para el envasado de carne fresca, los filetes se envasaron en películas de PVC (control), que se utiliza realmente para el envasado de este tipo de alimentos, una película

biodegradable compuesta de almidón-poliéster y por ultimo una película biodegradable compuesta de tres poliésteres biodegradables. Los filetes envasados se almacenaron a 4 y 15°C durante 6 días.

Los autores, después de monitorear parámetros de color y recuentos totales de microorganismos corruptores, reportaron que no observaron diferencias significativas entre las tres películas evaluadas, por lo que sugieren que las películas biodegradables podían remplazar ventajosamente las películas de PVC en el envasado de alimentos.

Por su parte, Ramos y colaboradores (2012) realizaron un estudio sobre la caracterización térmica, estructural y mecánica, así como la efectividad antimicrobiana de películas a base de polipropileno incorporando, timol y carvacrol a concentraciones de 4, 6, y 8% p/p de ambos aditivos, así como una mezcla equimolar.

Las micrografías SEM mostraron porosidad para las películas con altas concentraciones de aditivos, una disminución en el módulo elástico se obtuvo para las formulaciones activas en comparación con el control. La presencia de los aditivos no afectó la estabilidad térmica del polipropileno, pero si presentó una disminución con respecto a la cristalinidad y las propiedades barrera del oxígeno.

Finalmente, el timol mostro una mayor inhibición *contra E.coli* y *S. aureus* en comparación con carvacrol. Los resultados reportados demostraron la permanencia de ciertas cantidades de los aditivos estudiados en la matriz polimérica después de la formación de las películas, haciéndolos capaces de ser utilizados como aditivos en envases activos.

## **CAPITULO III**

### **MATERIALES Y METODOLOGÍA**

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

La fase experimental se realizó en su mayoría en los laboratorios del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, perteneciente a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro localizada en Buenavista, Saltillo, Coahuila. La parte de microscopía electrónica de barrido se desarrolló en laboratorios de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua y en los laboratorios del Centro de Investigación para los Recursos Naturales (CIRENA), ubicado en la comunidad de Salaices, López, Chihuahua, se desarrolló el estudio de migración por cromatografía de gases acoplado a masas.

#### **3.1.2. Materiales**

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

- Fracciones de aceite esencial de orégano (*L. berlandieri* Schauer): CIRENA.
- Polisuccinimida extruida: Universidad Tecnológica de Coahuila. caracterizada por la Universidad Autónoma de Cd. Juárez. Presentando un peso molecular de 1780 g/mol, constituido por 70.62% de carbono y 28.13% de oxígeno, una temperatura de fusión de 133. 14°C, con un flujo de calor de 21.72 J/g (Hernández González, 2014).
- Polisuccinimida PAS térmico: Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

- Cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*: Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

### **3.1.3. Etapa I. Atrapamiento del aceite esencial de orégano**

Se emplearon tres diferentes fracciones de aceite esencial de orégano (*L. berlandieri* Schauer) alto timol, alto carvacrol y timol-carvacrol o sinergista.

La polisuccinimida fue obtenida mediante dos procesos: extrusión y por policondensación. El atrapamiento para las ambas metodologías se desarrolló de la siguiente manera:

- a) Polisuccinimida extruida: se impregnó por inmersión empleando las diferentes fracciones de aceite esencial, antes de esto el polímero fue pesado en una balanza analítica Adventure Ohaus; posterior a la inmersión se monitoreo la ganancia de peso en intervalos de 60 min hasta alcanzar una concentración de 3% w/w aceite esencial/polímero. Este ensayo se realizó por triplicado.
- b) Polisuccinimida policondensada: el polvo obtenido mediante esta metodología se impregnó, agregando concentraciones del 3%, 5% y 7% w/w aceite esencial/polvo de cada una de las fracciones del aceite esencial, homogenizando con una espátula, y posteriormente prensado en una prensa de tipo uniaxial Parr Instrument Co para la obtención de una pastilla.

### **3.1.4. Etapa II. Viabilización e identificación de cepas bacterianas**

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

- a) *Staphylococcus aureus*: se viabilizó por medio de pre enriquecimiento en tubos de cultivo con caldo de soya tripticasa (TSB) BD Bioxon; se incubó en un horno de secado Novatech durante 36 hrs a temperatura de 37°C. Se prosiguió sembrando por estría cruzada en agar Staphylococcus por triplicado; se incubaron por 24 hrs. a 37°C. Por último se realizó la tinción de Gram para su análisis morfológico, observándose en el microscopio óptico Labomed cxL a 100x.
- b) *Escherichia coli*: también se viabilizó por medio de pre enriquecimiento en tubos de cultivo TSB; seguido de una incubación por 36 hrs a 37°C. Posteriormente se sembró por estría cruzada en agar eosina azul de metileno BD Bioxon por triplicado, incubando a 37 °C durante 24 hrs, después del tiempo cumplido se realizó el análisis morfológico también mediante la tinción de Gram, que sería observado en el microscopio óptico a 100x.

### **3.1.5. Etapa III. Valoración de la eficiencia antimicrobiana**

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

Se emplearon dos medios de enriquecimiento; el caldo TSB para *Staphylococcus aureus* y el caldo infusión cerebro corazón BD Bioxon para *Escherichia coli*; se colocó un inóculo de 0.1ml de una de las cepas en 4 ml de su respectivo caldo, en tubos de ensaye, realizando dicha operación por triplicado, se incubaron a 37°C el tiempo necesario para llegar a la absorbancia equivalente al tubo número 4 de la escala de Mcfarland, modificada por Rangel Ortega, S. en el 2007. La escala modificada de Mcfarland se presenta en la Tabla 3. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro Genesys 10 UV.

**Tabla 3. Absorbancia con respecto a la escala de Mcfarland**

<b>Tubo</b>	<b>ml de BaCl<sub>2</sub> al 1%</b>	<b>ml 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

(Rangel Ortega, 2007)

### **3.1.5.2. Valoración antimicrobiana**

Se realizaron antibiogramas, partiendo de cajas Petri estériles con agar selectivo para cada cepa ya mencionados en la Etapa II, a las cuales se les agregó un inculó infeccioso de una de las bacterias correspondiente al tubo 4 de la escala de Mcfarland, modificada por Rangel Ortega, S. (2007), mediante un hisopo estéril sumergido en dicho tubo y rotado contra las paredes del mismo, para remover el exceso del inculo. Posteriormente se sembró el inculo uniformemente sobre la superficie del medio, y para permitir la difusión del medio sembrado se dejó en reposo entre 10 y 20 minutos, manteniendo la caja con la tapa cerrada, metodología normalizada de Kirby Bauer (Maye Bernal, 1984). Trascurrido el tiempo se colocó el material de la siguiente manera:

Para la polisuccinimida extruida: se impregnó al 3% con una de las diferentes fracciones del aceite esencial de orégano, después las virutas son

recortadas en dimensiones de 1cm<sup>2</sup> y colocadas en un extremo de la caja Petrí junto con el mismo material sin adición de aceite que fungirá como control.

En el caso del PAS térmico: se adicionó a concentraciones del 3%, 5% y 7% con cada fracción de aceite esencial, posteriormente se prensa, generando pastillas con un diámetro de 3 cm. Las pastillas con una de las fracciones se colocan en el extremo opuesto al control. Las pastillas que corresponden al control fueron elaboradas con polímero policondensado adicionadas con aceite de canola.

Las cajas fueron incubadas a 37°C durante 24 hrs; después de dicho tiempo se midieron los halos de inhibición con una regla. Los resultados se analizaron estadísticamente en el programa JMP 5.0.1<sup>a</sup> mediante una ANOVA y un análisis de medias t-student ( $p \leq 0.05$ ).

Por otro lado se realizaron cinéticas de crecimiento; colocando tubos de ensaye con 4ml de medio líquido de enriquecimiento para cada microorganismo, mencionados en la etapa III, adicionando una muestra de 0.15g de polisuccinimida extruida y PAS térmico por separado; impregnadas con las diferentes fracciones de aceite esencial del orégano y controles sin adicionar, por triplicado.

Los tubos fueron inoculados con 200µL de inóculo infeccioso de *Staphylococcus aureus* correspondientes al tubo 4 en la escala modificada de McFarland por Ortega Rangel, S. y se monitoreó el crecimiento bacteriano en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nanómetros (nm), durante 72 hrs a intervalos de 2 hrs, en incubación a 37°C. Las mismas condiciones experimentales se realizaron para la valoración contra *Escherichia coli*.

Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante un diseño factorial completo y un análisis de medias t-student ( $p \leq 0.05$ ) en el programa estadístico JMP 5.0.1<sup>a</sup>.

### **3.1.6. Etapa IV. Análisis del efecto antimicrobiano mediante microscopía óptica y electrónica de barrido**

Se prepararon frotis a partir de las muestras descritas en la etapa anterior, mismos que fueron recubrimientos con baño de plata para su observación en microscopio electrónico de barrido marca Jeol JSM-70000F.

### **3.1.7. Etapa V. Estudio de migración**

El objetivo es determinar si los compuestos mayoritarios de las fracciones del aceite esencial migran gradualmente después de su atrapamiento en los diferentes materiales evaluados.

Los materiales fueron evaluados en simulantes alimentarios; utilizando aceite de oliva, agua destilada y etanol al 95% (Galotto, Valenzuela, & Guarda, 2004). Dichos materiales solo fueron adicionados con la fracción sinergista, siguiendo la metodología de la Etapa I. Posteriormente se colocó 0.5g de material inmerso en 10 ml de simulante; además, se manejaron tres condiciones dependientes de la temperatura, siendo estas: temperatura ambiente (25-27°C), refrigeración (3-4°C) y calentamiento (47-50°C); las matrices experimentales se mantuvieron por 4 hrs. con lecturas en intervalos de 1 hr.

Las alícuotas obtenidas de los tratamientos se colocaron en viales de vidrio, para ser analizadas por cromatografía de gases acoplado a masas. Las condiciones empleadas en el equipo se precisan a continuación:

Se realizó una inyección automática de 1µL de las muestras presentes en los viales en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus 500 acoplado con un detector de masas. El cromatógrafo se operó usando helio como gas acarreador con un flujo de 50 ml/min, inyección con división de flujo (split 5:1) a 250°C del inyector, utilizando una columna capilar ELITE-1. Se usó el siguiente programa de temperatura de horno: 55°C iniciales seguidos de una rampa de 3°C/min hasta llegar a 95°C, seguidos de una rampa de 1°C/min hasta llegar a 150°C.

El espectrómetro de masas se operó a una velocidad de flujo de 50 ml/min, con un voltaje de ionización de 70eV, con una temperatura de la interface de 250°C, en modo SCAN y en un intervalo de masas de 35-600m/Z.

Se revisó la pureza de cada uno de los picos de los cromatogramas y la comparación de espectros de masas de los compuestos en la muestra con los espectros de la Biblioteca National Institute of Standars and Technology (NIST02), que hace el software Data Analysis de modo automático.

## **CAPITULO IV**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

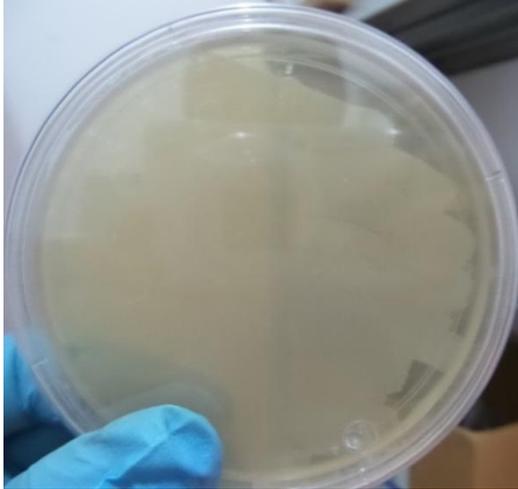
#### **4.1.1. Etapa I Atrapamiento del aceite esencial de orégano**

Las muestras de polisuccinimida extruida, fueron adicionadas con cada una de las fracciones del aceite esencial del orégano, a una concentración de 3% w/w; dicha concentración se logró a los 540 min de contacto entre el material y el aditivo en función a los incrementos de peso.

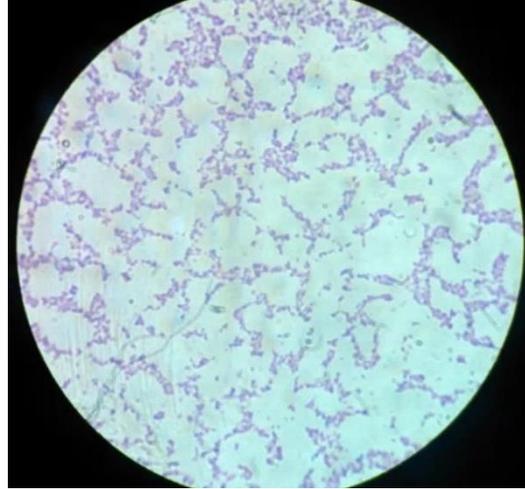
Las muestras obtenidas por policondensación térmica fueron adicionadas integrando el aditivo en una relación 7% w/w, teniendo al aceite de canola como vehículo para humectación y consistencia del material comprimido; al cual se le dio forma en la prensa uniaxial.

#### **4.1.2. Etapa II. Viabilización e identificación de cepas bacterianas**

Las colonias de *Staphylococcus aureus* macroscópicamente se observaron colonias levemente lenticulares, lisas y de bordes definidos, crecimiento característico del microorganismo debido a la fermentación de manitol e hidrolisis de la gelatina (Elmer Koneman, 2008), como se ilustra en la Figura 7. Tras la tinción de Gram presentaron microscópicamente ser cocos Gram positivos que poseen tendencia a agruparse en racimo o tétradas; como se observa tras ser enfocada en el microscopio óptico, en la Figura 8. Las características observadas son coincidentes con las reportadas por Cervantes y colaboradores (2014), Fernández Escartín (2008) y Sejia (2008).

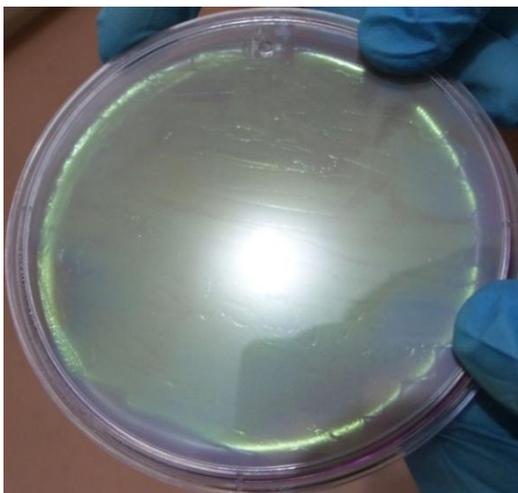


**Figura 7.** Morfología macroscópica de *Staphylococcus aureus*.



**Figura 8.** Morfología microscópica de *Staphylococcus aureus* observada a 100x.

La bacteria *Escherichia coli* presentó como morfología en términos macroscópicos, ser colonias convexas, de color verde metálico al ser cultivadas en agar EMB, debido a la rápida fermentación de la lactosa, con bordes lisos y continuos (Elmer Koneman, 2008), como se observa en la figura 9. Microscópicamente tras la tinción de Gram, se observaron bacilos cortos Gram negativos, como se representan en las Figura 10. Las características morfológicas que se han descrito coinciden con las reportadas por Ramis Vergés, (1998), Ramírez Santos y colaboradores (2005).



**Figura 9.** Morfología macroscópica de *Escherichia coli*.



**Figura 10.** Morfología microscópica de *Escherichia coli* observada a 100x.

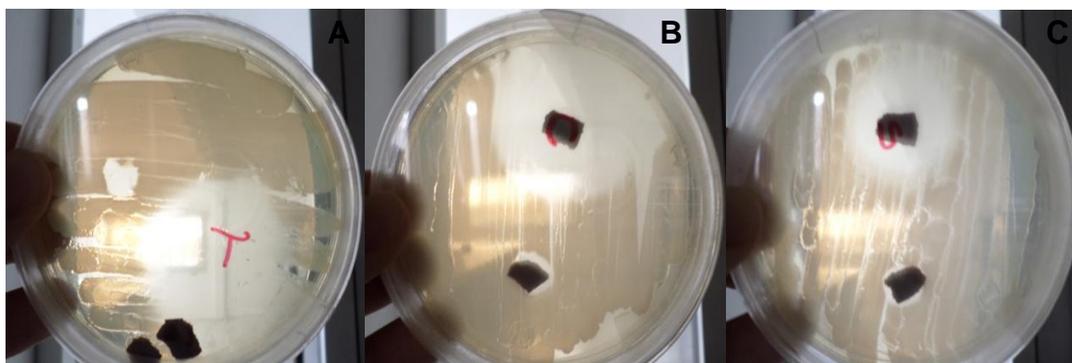
### 4.1.3. Etapa III. Valoración de la eficiencia antimicrobiana

Para evaluar la sensibilidad de ambos microorganismos frente a los materiales con antimicrobiano, se obtuvieron inóculos infecciosos de cada una de las cepas bacterianas equivalentes al tubo número 4 de la escala de Mc farland ( $1.2 \times 10^9$  bacterias viables/ml), a partir de cultivos puros con menos de 24hrs de ser inoculados e incubados en caldo estéril de TSB para *Staphylococcus aureus* y BHI para *Escherichia coli*.

#### 4.1.3.1. Antibiogramas

Este método se basa en la medición de la zona clara causada por la inhibición del crecimiento producida por el material que contiene el agente antimicrobiano al ponerse en contacto directo con un cultivo bacteriano (Singha, Singhb, Bhuniaa, & N., 2003) (Weerakkodya, Caffina, Turnera, & A., 2010).

El polímero extruido impregnado con las fracciones de aceite esencial resultó eficiente cuando se evaluó contra *Staphylococcus aureus* provocando halos de inhibición al emplear las tres fracciones de aceite esencial, a diferencia del control. La Figura 11(A) muestra la inhibición de la fracción alto timol con respecto al material sin aditivo, la de la fracción alto carvacrol se ilustra en la Figura 11(B) haciendo evidente la sensibilidad de la bacteria comparado con el material sin aditivo, y por último en la Figura 11(C) se develó el efecto de inhibición de la fracción sinergista.



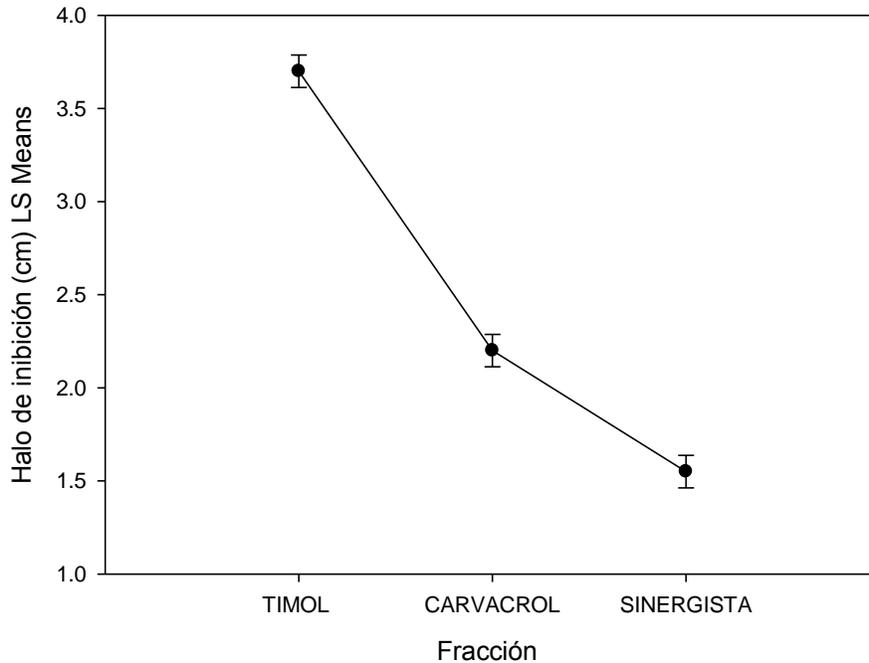
**Figura 11.** Antibiogramas del polímero extruido vs *Staphylococcus aureus*. (A) alto timol, (B) alto carvacrol, (C) sinergista.

De las imágenes presentadas se pudo observar un crecimiento homogéneo en el agar selectivo característico de *Staphylococcus aureus* (Elmer Koneman, 2008); alrededor del área cercana al material sin impregnar, a diferencia de las muestras impregnadas con las diferentes fracciones del aceite esencial del orégano, que evidenciaron su efectividad al presentar halos de inhibición alrededor de la zona en contacto con el material funcionalizado. Por lo que se hace evidente la sensibilidad del microbio ante el material en estudio. El estudio se realizó siguiendo los lineamientos propuestos en la metodología normalizada de Kirby Bauer (Maye Bernal, 1984).

Posteriormente se realizó la medición de los halos de inhibición presentados en los antibiogramas, dichas mediciones se analizaron mediante un ANOVA y un análisis de medias t-student ( $p \leq 0.05$ ) “Apéndice 1”. Los resultados del análisis se presentan en la Tabla 4 y en la Figura 12.

**Tabla 4. Halos de inhibición del polímero extruido vs *Staphylococcus aureus*.**

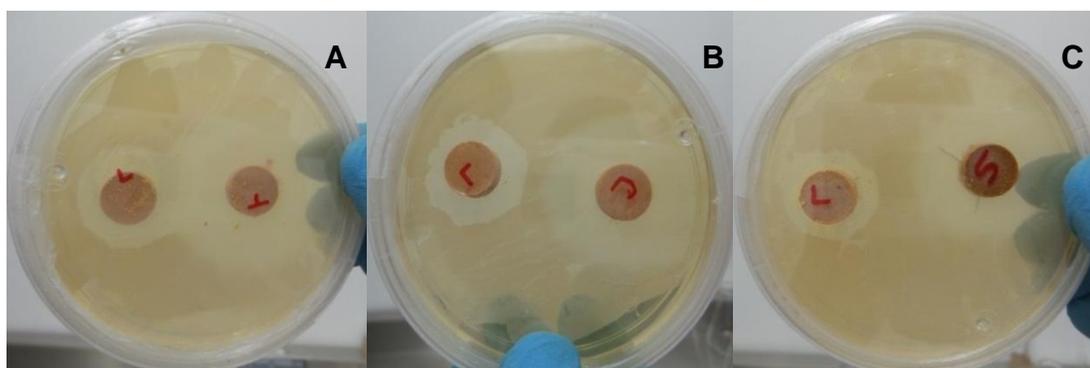
Fracción de aceite esencial de orégano ( <i>L. berlandieri</i> Schauer)	Media de diámetro del halo de inhibición cm
<b>Alto timol</b>	3.70 a
<b>Alto carvacrol</b>	2.20 b
<b>Sinergista</b>	1.55 c



**Figura 12.** Análisis de medias de los halos de inhibición del polímero extruido vs *Staphylococcus aureus*.

De la Figura 12 y Tabla 4 es posibles apreciar que la fracción con mayor efecto inhibitorio ante *Staphylococcus aureus* es la fracción alto timol, seguida de la fracción alto carvacrol, y que la fracción sinergista presentó el menor efecto inhibitorio.

En relación a los resultados del polímero policondensado con la misma bacteria, los tratamientos impregnados con aceite esencial de orégano presentaron zonas de inhibición, sin embargo los controles también se hizo evidente dicho efecto. Lo anterior se ilustra en la Figuras 13 (A), (B) y (C) correspondientes al polímero alto timol, alto carvacrol y sinergista respectivamente, acompañado con su control dentro de la misma caja Petri.

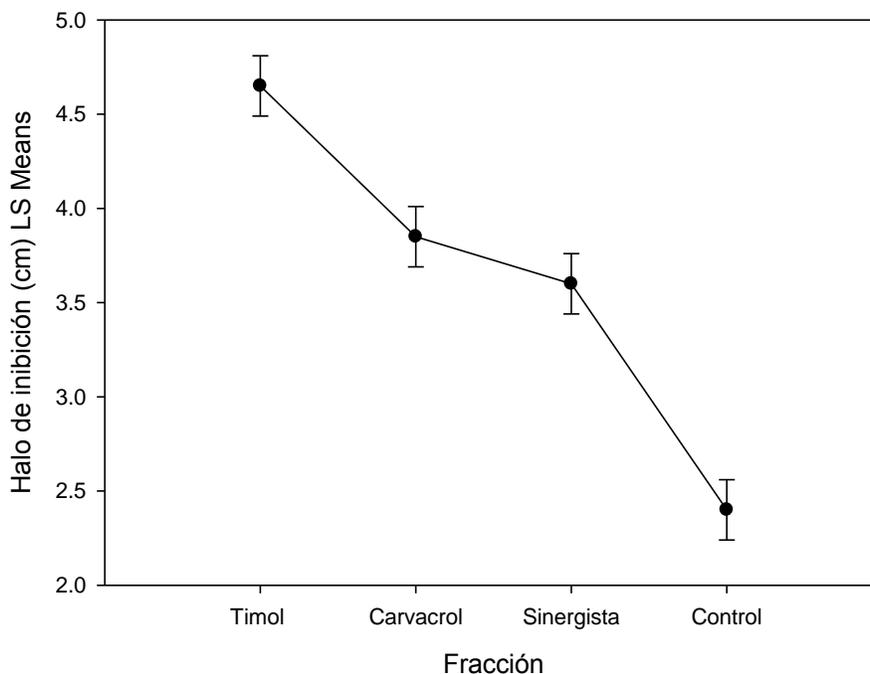


**Figura 13.** Antibiogramas del polímero policondensado vs *Staphylococcus aureus*. (A) alto timol, (B) alto carvacrol, (C) sinergista.

Siguiendo el procedimiento de análisis sobre las zonas de inhibición que presentaron tanto los tratamientos como el control, es importante deliberar si existe diferencia significativa entre los tratamientos y el control mediante un ANOVA y un análisis de medias t-student ( $p \leq 0.05$ ) “Apéndice 2”. Los resultados hicieron evidente que si existe diferencia significativa entre los tratamientos y el control, revelando mayor inhibición por parte del polímero alto timol, sin embargo la inhibición entre el polímero alto carvacrol y sinergista no presentaron diferencia significativa. Estos resultados se representan en la Tabla 5 y la Figura 14.

**Tabla 5.** Halos de inhibición del polímero policondensado vs *Staphylococcus aureus*.

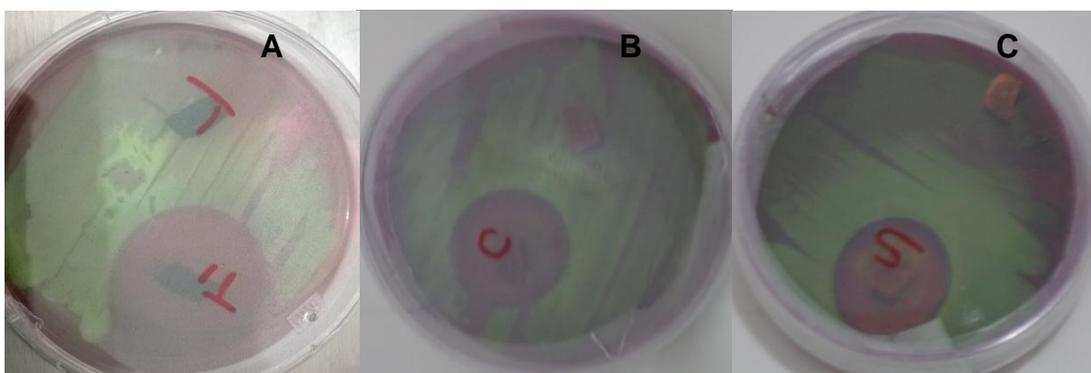
Fracción de aceite esencial de orégano ( <i>L. berlandieri</i> Schauer)	Media de diámetro del halo de inhibición cm
<b>Alto timol</b>	4.65 a
<b>Alto carvacrol</b>	3.85 b
<b>Sinergista</b>	3.60 b
<b>Control</b>	2.40 c



**Figura 14.** Análisis de medias de los halos de inhibición del polímero policondensado vs *Staphylococcus aureus*.

En referencia a la evaluación antimicrobiana del polímero extruido contra *Escherichia coli*, también se obtuvieron resultados similares, es decir, esta bacteria Gram negativa también presentó sensibilidad frente a las diferentes fracciones de aceite esencial de orégano, como se muestra en la Figura 15 (A) donde la fracción alto timol presentó mayor inhibición, seguido del alto carvacrol Figura 15 (B) junto con el sinergista Figura 15 (C).

El comportamiento de inhibición se presentó para los tres tratamientos, a diferencia del control, en las zonas alrededor del material impregnado con aceite esencial, donde presentó un crecimiento característico del microbio (Elmer Koneman, 2008), lo que reveló sensibilidad de *Escherichia coli* frente dicho material frente en la técnica normalizada de Kirby Bauer (Maye Bernal, 1984).

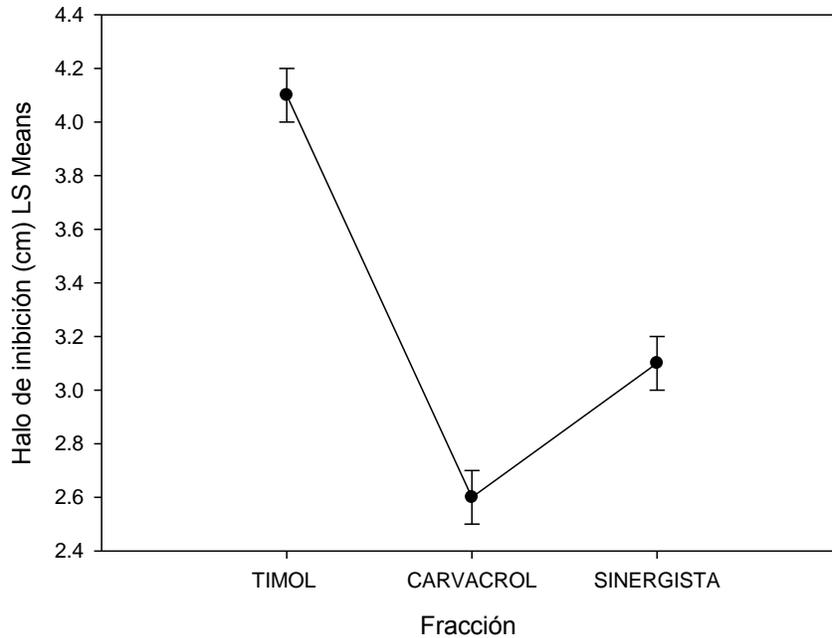


**Figura 15.** Antibiogramas del polímero extruido vs *Escherichia coli*. (A) alto timol, (B) alto carvacrol, (C) sinergista.

Los resultados obtenidos de someter las medias de las medidas de los halos de inhibición a un análisis ANOVA y t-student ( $p \leq 0.05$ ), se muestran en la Tabla 6 y Figura 16. El análisis se detalla en el Apéndice 3.

**Tabla 6. Halos de inhibición del polímero extruido vs *Escherichia coli*.**

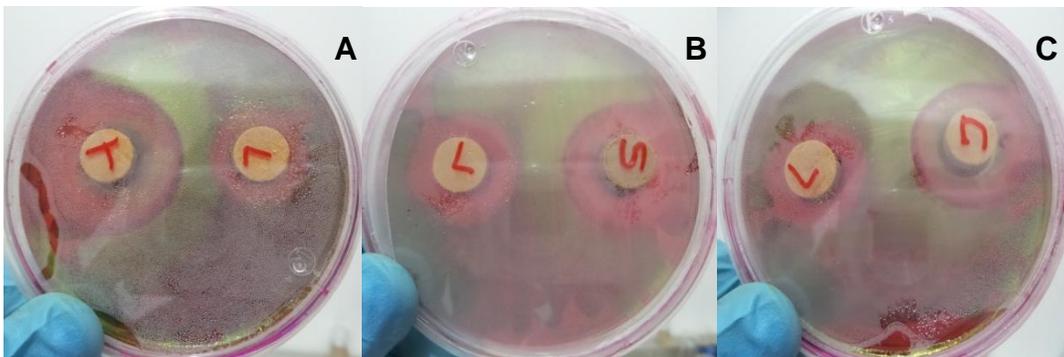
Fracción de aceite esencial de orégano ( <i>L. berlandieri</i> Schauer)	Media de diámetro del halo de inhibición cm
<b>Alto timol</b>	4.10 a
<b>Alto carvacrol</b>	2.60 c
<b>Sinergista</b>	3.10 b



**Figura 16.** Análisis de medias de los halos de inhibición del polímero extruido vs *Escherichia coli*.

Con los resultados obtenidos se reveló que la fracción alto timol es la fracción más efectiva, respecto al material sin aditivo, seguida de sinergista y por último la alta carvacrol.

En el caso del polímero condensado los antibiogramas puntualizan que existe zona de inhibición, sin embargo no solo se presentaron en los tratamientos sino también en el control. La Figura 17 (A), (B) y (C) representan la inhibición de los polímeros alto timol, alto carvacrol y sinergista, respectivamente.

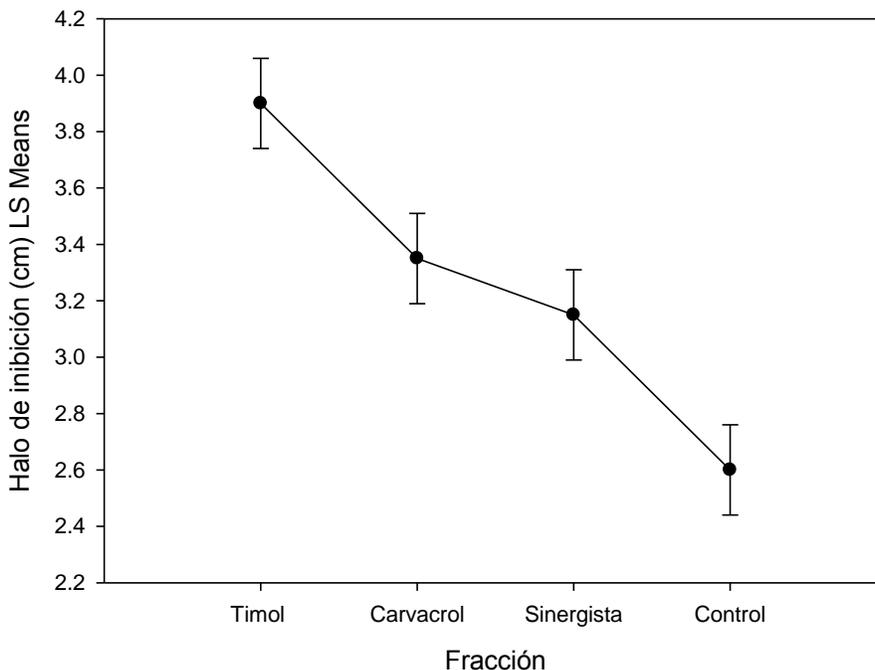


**Figura 17.** Antibiogramas del polímero policondensado vs *Escherichia coli*. (A) alto timol, (B) alto carvacrol, (C) sinergista.

Tras el análisis estadístico ANOVA y análisis de medias t- student, se puede apreciar que el polímero alto timol presentó mayor inhibición con diferencias significativas respecto al control. Alto carvacrol y sinergista, por su parte presentaron el mismo nivel de inhibición. Lo anterior se resume en la Tabla 7 y la Figura 18. El análisis estadístico t- student ( $p \leq 0.05$ ) se puntualiza en el “Apéndice 4”.

**Tabla 7. Halos de inhibición del polímero policondensado vs *Escherichia coli*.**

Fracción de aceite esencial de orégano ( <i>L. berlandieri</i> Schauer)	Media de diámetro del halo de inhibición cm
<b>Alto timol</b>	3.90 a
<b>Sinergista</b>	3.35 b
<b>Alto carvacrol</b>	3.15 b
<b>Control</b>	2.60 c



**Figura 18.** Análisis de medias de los halos de inhibición del polímero policondensado vs *Escherichia coli*.

#### 4.1.3.2. Cinéticas de crecimiento

Esta metodología también tiene como objetivo revelar si existe sensibilidad de los microorganismos bacterianos ante los materiales a probar, en medios líquidos. El primer material fue el polímero extruido contra *Staphylococcus aureus*, el comportamiento de crecimiento bacteriano en los diferentes tratamientos se presentó igual hasta las primeras 6 horas, a partir de este tiempo el polímero impregnado con las fracciones de aceite esencial presentan efecto inhibitorio con diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Después de dicho tiempo el control sigue revelando un constante crecimiento (fase exponencial) hasta las 20 hrs. y por último la muerte celular que se prolonga hasta las 72 hrs, por su parte los crecimientos en los tratamientos se ven inhibidos y las cuentas viables se mantienen cercanas a las iniciales hasta las 24 hrs. de contacto; posteriormente el crecimiento se incrementa hasta las 72 hrs. sin cambios significativos comparados con el control; como se puede ilustrar en el análisis estadístico correspondiente al “Apéndice 5” y la cinética de crecimiento microbiano en la Figura 19.

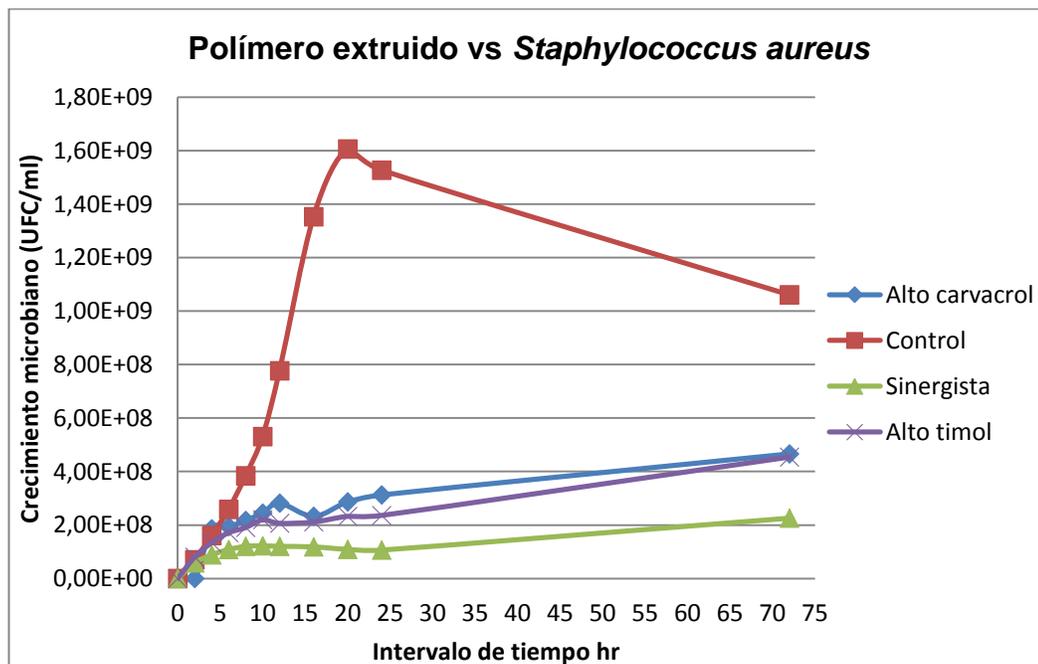
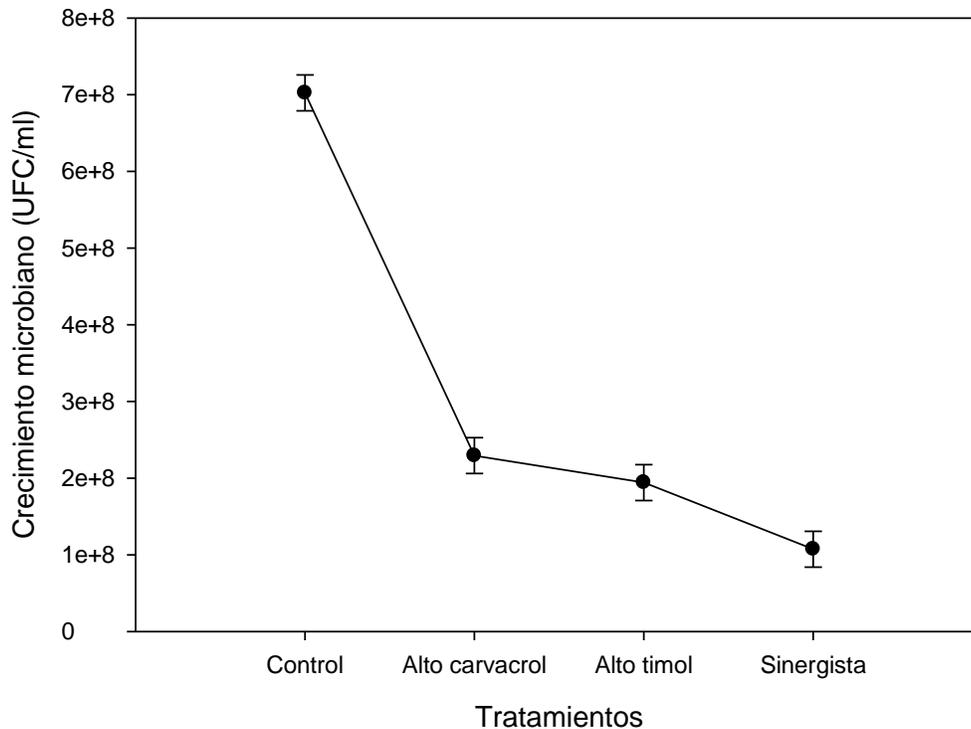


Figura 19. Cinética de crecimiento microbiano de *Staphylococcus aureus* en contacto con el polímero extruido impregnado con las fracciones de aceite esencial.

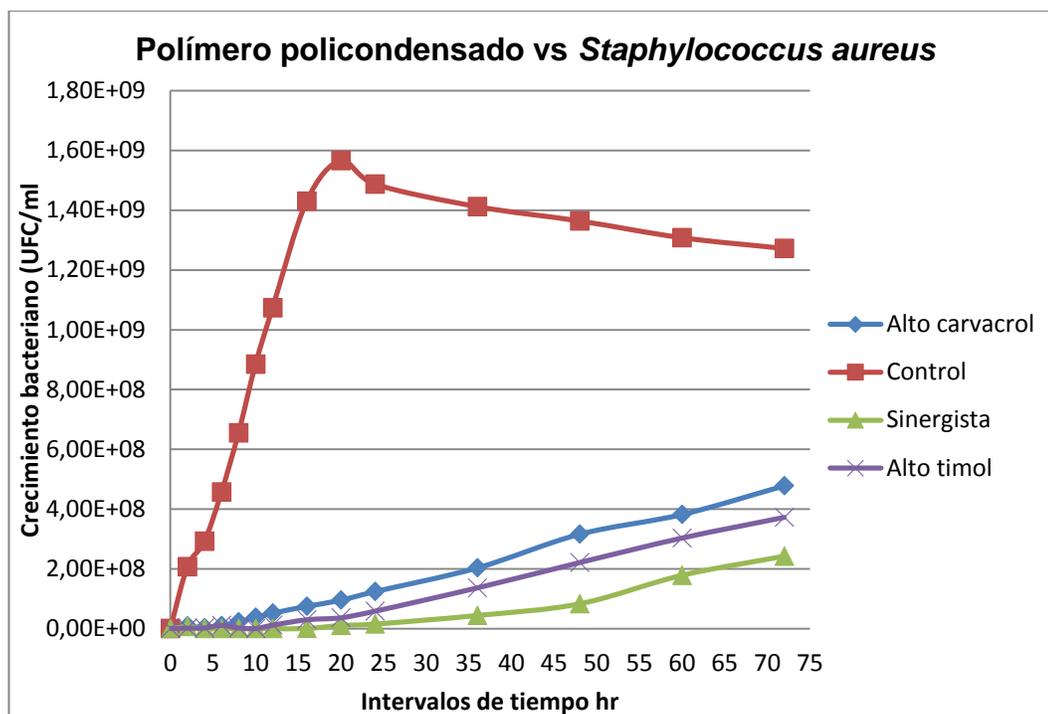
Los datos obtenidos fueron procesados para identificar al tratamiento (fracción) más eficiente. El análisis de medias t-student ( $p \leq 0.05$ ) dictó que el polímero extruido sinergista presentó la mayor inhibición, en comparación con el polímero alto timol, alto carvacrol y el control. Lo antes mencionado se resume en la Figura 20 que muestra el análisis de medias y el “Apéndice 6”.



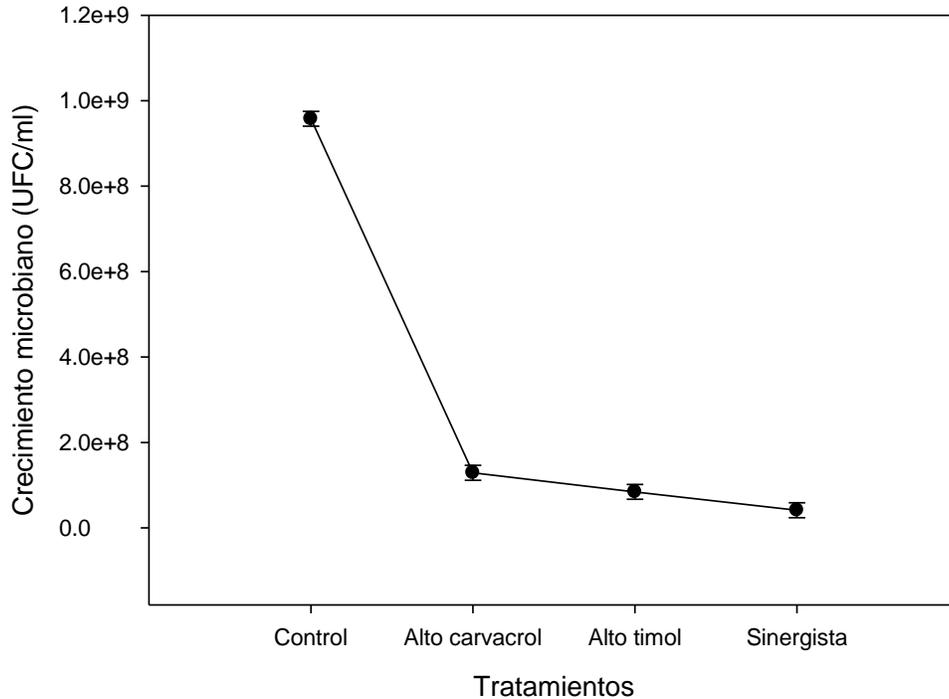
**Figura 20.** Análisis de medias del crecimiento microbiano de *Staphylococcus aureus* en contacto con el polímero extruido.

Por su parte el material policondensado presentó comportamiento similar en las cinéticas de crecimiento cuando se evaluó contra *Staphylococcus aureus*, la única diferencia radica que desde la segunda hora de contacto, los tratamientos se mantuvieron sin diferencia significativa en cuanto a los recuentos microbianos iniciales, esta condición cambio después las 24 hrs. de contacto, después las tendencias de crecimiento son similares a las del polímero extruido, lo anterior se puede observar en la Figura 21 y el análisis de medias en base a el tiempo experimental se ilustra en el “Apéndice 7”.

Los resultados del análisis de medias t-student ( $p \leq 0.05$ ), determinaron que el tratamiento sinergista no presentó diferencias significativas contra el tratamiento alto timol pero si con el tratamiento alto carvacrol, por su parte el tratamiento alto timol y alto carvacrol no tienen diferencias estadísticamente significativas. El análisis estadístico se detalla en el “Apéndice 8”, en el mismo sentido la Figura 22 muestra el grafico obtenido del mismo análisis.

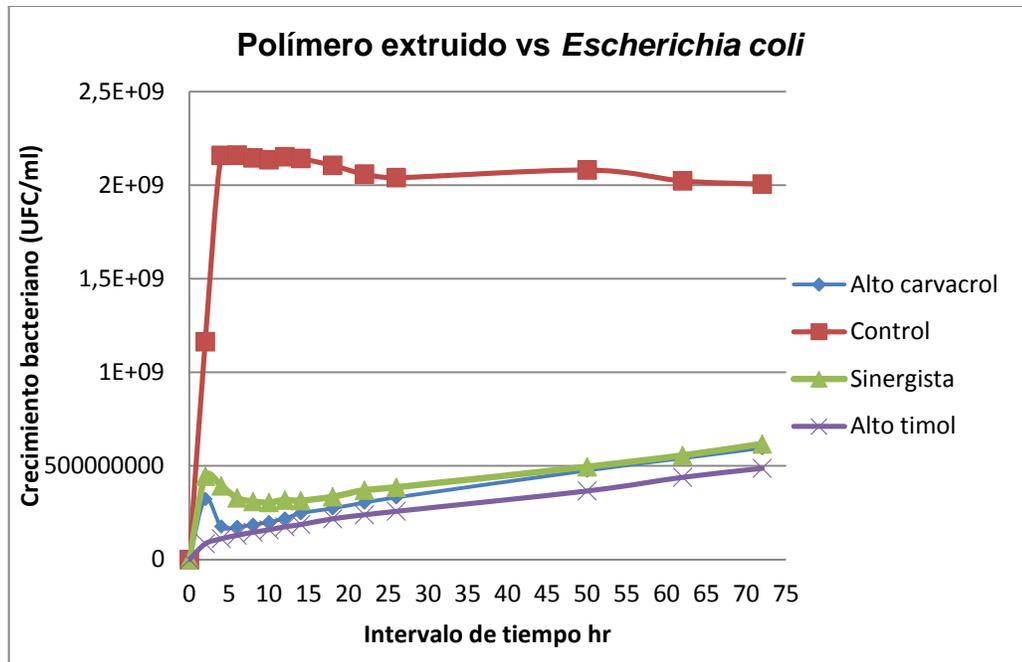


**Figura 21.** Cinética de crecimiento microbiano de *Staphylococcus aureus* en contacto con el polímero policondensado impregnado con las fracciones de aceite esencial.



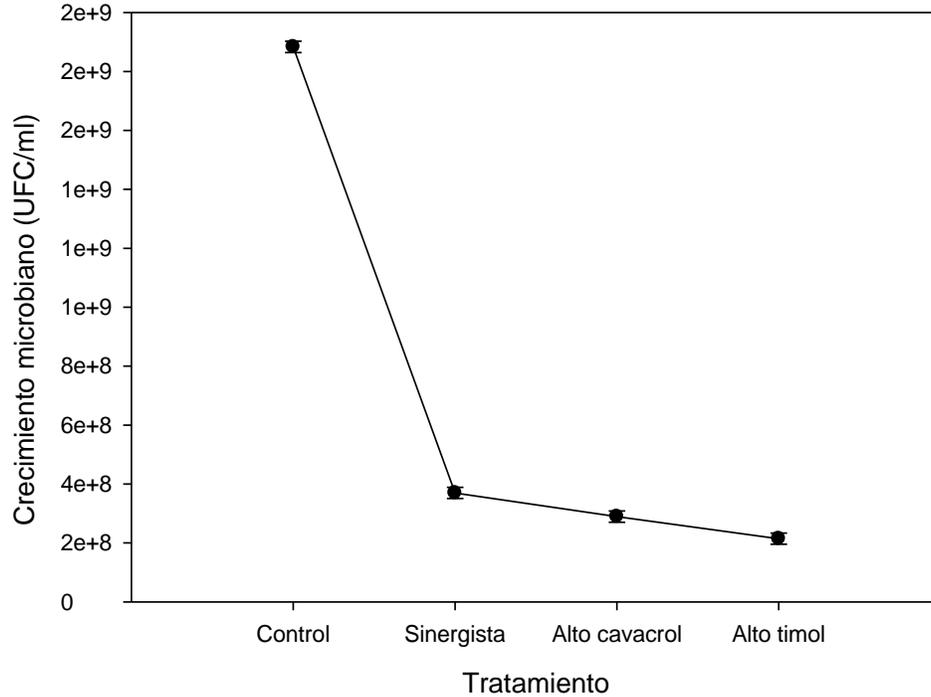
**Figura 22.** Análisis de medias del crecimiento microbiano de *Staphylococcus aureus* en contacto con el polímero policondensado.

Quando se evaluó la capacidad antimicrobiana del polímero extruido contra *Escherichia coli* presentó un crecimiento similar entre el control y los tratamientos durante las primeras 2 horas, posterior a este intervalo de tiempo el control llegó a su máximo crecimiento a las 4 horas, manteniendo su fase estacionaria hasta las 72 horas. Por su parte los tratamientos retrasaron el crecimiento significativamente hasta las 72 horas. La tendencia de las cinéticas entre los tratamientos son similares, caracterizados por mantener el crecimiento cercano a las cuentas viables iniciales, como se puede observar en la Figura 23, este grafico se basa en las medias de crecimiento bacteriano arrojadas por el análisis ( $p \leq 0.05$ ), “Apéndice 9”.



**Figura 23.** Cinética de crecimiento microbiano de *Escherichia coli* en contacto con el polímero extruido impregnado con las fracciones de aceite esencial.

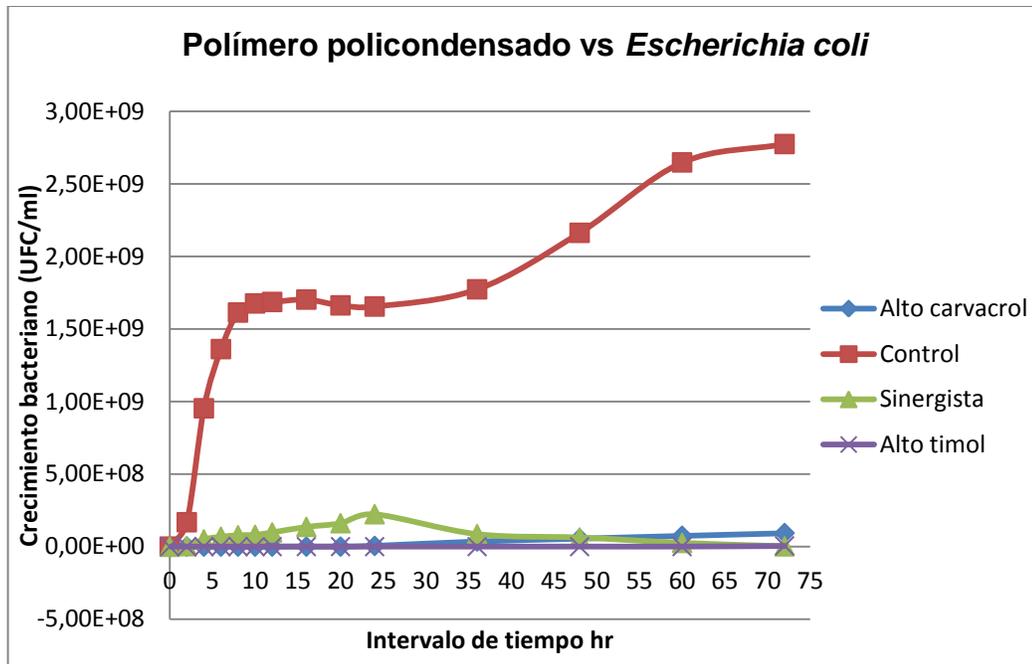
Siguiendo con el análisis se evaluó la sensibilidad de dicha bacteria ante el polímero, resultando el polímero alto timol con mayor capacidad de inhibición, seguido del alto carvacrol y por último al sinergista, presentando diferencias significativas entre las medias de dichos tratamientos tras el análisis t-student ( $p \leq 0.05$ ); como se ilustra en la Figura 24 y el Apéndice 10.



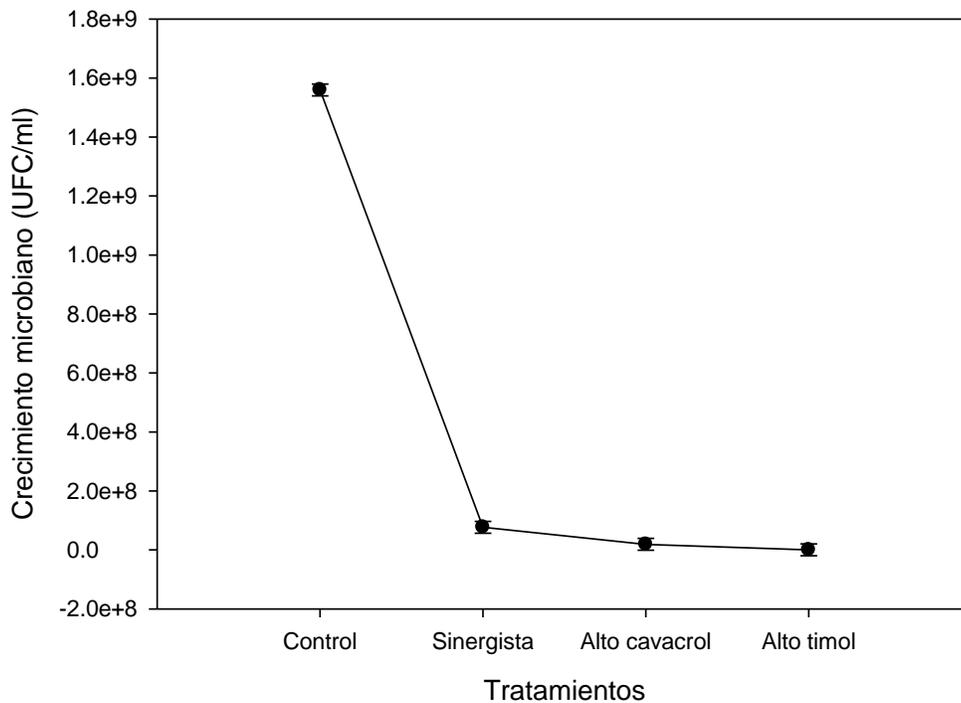
**Figura 24.** Análisis de medias del crecimiento microbiano de *Escherichia coli* en contacto con el polímero extruido.

Los resultados obtenidos del crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* en contacto con el polímero policondensado preservó la misma tendencia del material extruido hasta las 72 horas de lectura, destacando que durante todo el monitoreo experimental los tratamientos mantuvieron las unidades formadoras de colonias iniciales sin diferencias significativas, esto se puede observar en la Figura 25, de igual manera el análisis de medias t-student ( $p \leq 0.05$ ) de los tratamientos a los diferentes intervalos de tiempo se precisan en el Apéndice 11.

A través del análisis de medias t-student ( $p \leq 0.05$ ) de los tratamientos se obtuvo que los tratamientos del polímero policondensado alto timol y alto carvacrol, presentaron mayores efectos inhibitorios en función a la bacteria en estudio con diferencias estadísticamente significativas con respecto al polímero sinergista “Apéndice 12”, como se puede observar en el grafico referente a la Figura 26.



**Figura 25.** Cinética de crecimiento microbiano de *Escherichia coli* en contacto con el polímero policondensado impregnado con las fracciones de aceite esencial.



**Figura 26.** Análisis de medias del crecimiento microbiano de *Escherichia coli* en contacto con el polímero policondensado.

Los resultados obtenidos en las dos metodologías revelaron sensibilidad tanto de *Staphylococcus aureus* como de *Escherichia coli* ante los dos materiales funcionalizados con las fracciones de aceite esencial de orégano (*L. berlandieri* Schauer). En particular el polímero policondensado al adicionarlo al 3 y 5% w/w no presentaron efecto de inhibición, dicho efecto se presentó cuando se adicionó al 7% w/w; el comportamiento se podría deber a la naturaleza del material o la interacción entre el aditivo y el polímero.

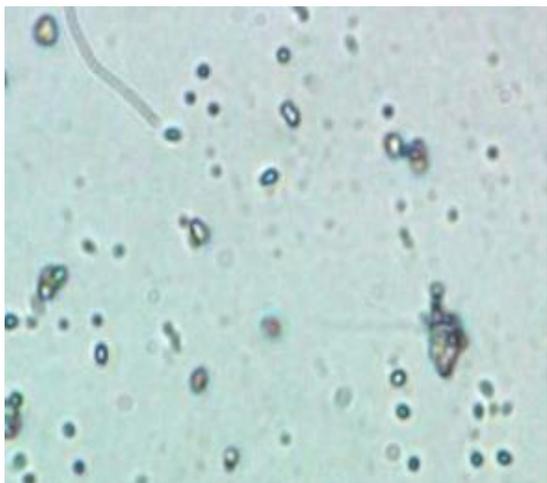
En lo que respecta al material policondensado sin la adición del antimicrobiano, en los antibiogramas, presentaron zonas de inhibición, adjudicable al pH del material (4.4-4.6), el cual se encuentra por debajo del rango óptimo de crecimiento de ambos microbios, siendo este el cercano al neutro (6-8) (Valero, y otros, 2009) (Haberbecka, y otros, 2015).

La fracción más efectiva en ambos materiales fue la alta timol, la cual reveló las zonas de inhibición más grandes en los antibiogramas y los crecimientos microbianos menores en las cinéticas de crecimiento para los dos patógenos de interés alimentario. Estos resultados son similares a los reportados por Ramos y colaboradores (2012) los cuales realizaron un estudio de caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de películas de polipropileno adicionadas con carvacrol y timol sintéticos, contra las mismas bacterias, obteniendo mayor inhibición cuando se agregó timol, la única diferencia radica en que la inhibición se presentó cuando los aditivos se agregaron al 8% w/w.

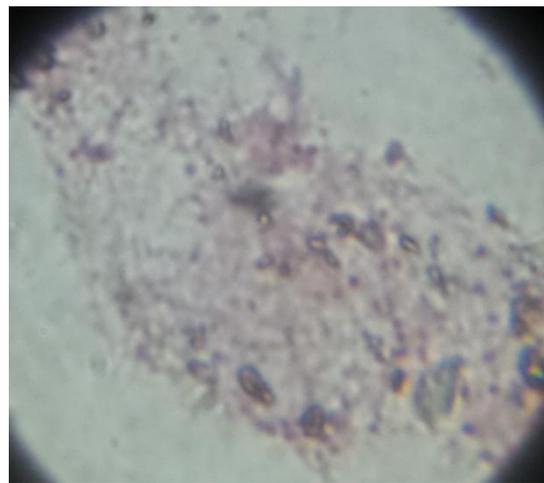
Con respecto a las cinéticas de crecimiento, el comportamiento de inhibición con el polímero extruido se vuelve evidente después de las primeras 4-6 horas de contacto, esto se podría deber al tiempo requerido para que los compuestos se comiencen a liberar de la matriz polimérica, en cambio en el polímero policondensado el efecto es inmediato, debido a la estructura no compacta y polvosa del mismo.

#### 4.1.4. Etapa IV. Análisis del efecto antimicrobiano mediante microscopía óptica y electrónica de barrido.

Se obtuvieron frotis bacterianos de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* que fueron teñidos mediante la tinción de Gram y observados en objetivos de 100X, las morfologías observadas dependen de las propiedades antimicrobianas del aceite esencial de orégano siendo el timol y carvacrol los principales responsables (Sanchez Garcia, M.J., Gimenez, & Lagaron, 2008) (Ramos, Beltrán, Peltzer, Valente, & Garrigósa, 2014), las anomalías celulares fueron observadas tanto en el polímero extruido y como en el policondensado. La Figura 27 muestra el frotis tomado de *Staphylococcus aureus* tras el contacto con el aceite esencial de orégano (*L. berlandieri* Schauer) presentando diferencias morfológicas con respecto a cultivo mostrado en la Figura 8, por su parte el frotis observado de *Escherichia coli* tras la tinción de Gram se muestra en la Figura 28, diferenciando morfológicamente al contacto con el aditivo antimicrobiano si se compara con el crecimiento característico observado en la Figura 10.

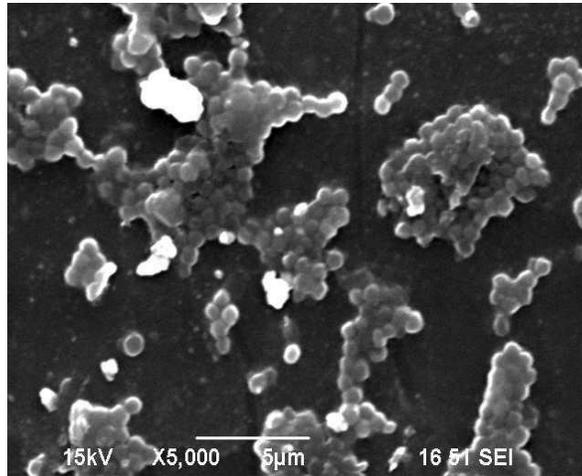


**Figura 27.** Frotis de *Staphylococcus aureus* en contacto con el antimicrobiano.



**Figura 28.** Frotis de *Escherichia coli* en contacto con el antimicrobiano.

Para visualizar con mayor precisión morfológica se tomaron frotis que fueron recubiertos de un baño de plata y observados en el microscopio electrónico de barrido. La Figura 29 ilustra el frotis observado de *Staphylococcus aureus*, donde se evidencia daño celular, presentando cambios morfológicos a nivel de pared celular, tras el contacto con el aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri* schauer).

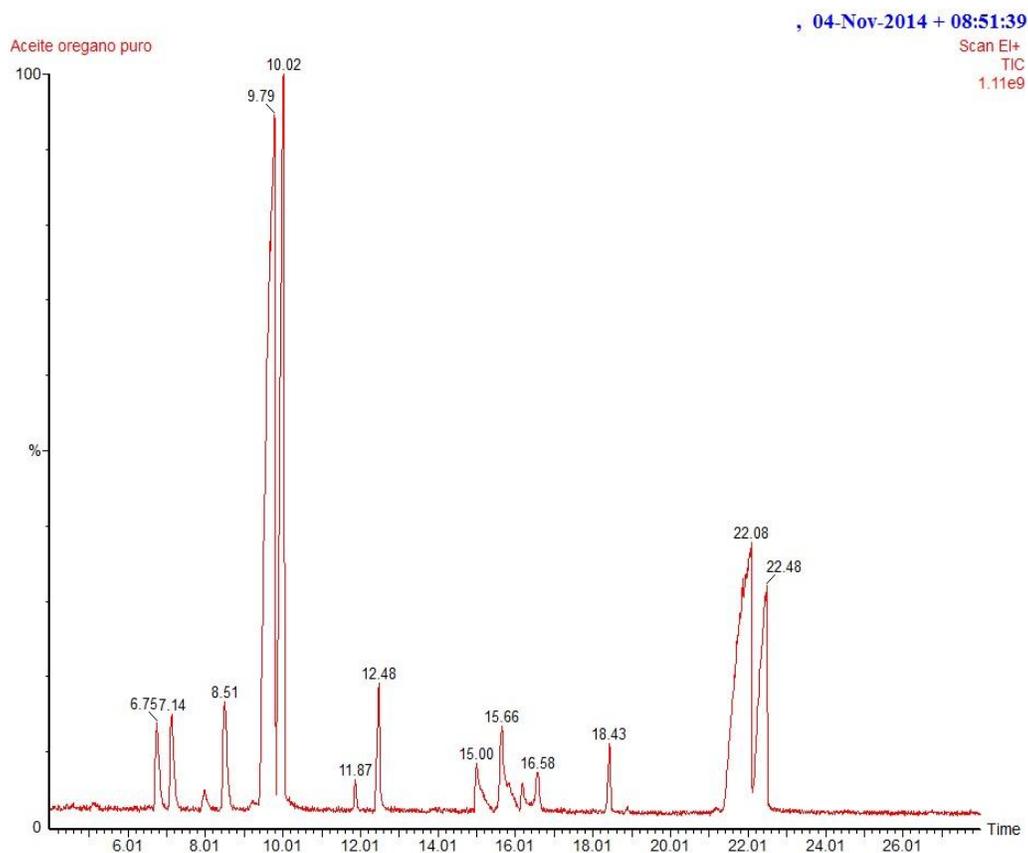


**Figura 29.** Frotis de *Staphylococcus aureus* con antimicrobiano X 5,000.

El efecto antimicrobiano probado en la etapa anterior (Etapa III) y evidenciado en las figuras anteriores, se adjudica a los mecanismos de acción propios del timol y carvacrol. Dicha inhibición es debido a los daños en la integridad de la pared, que afecta a la homeostasis del pH y el equilibrio de los iones orgánicos (Lambert, Skandamis, Coote, & Nychas, 2001) (Becerril, Gómez Lus, Goñi, López, & Nerín, 2007) (Burt, 2004).

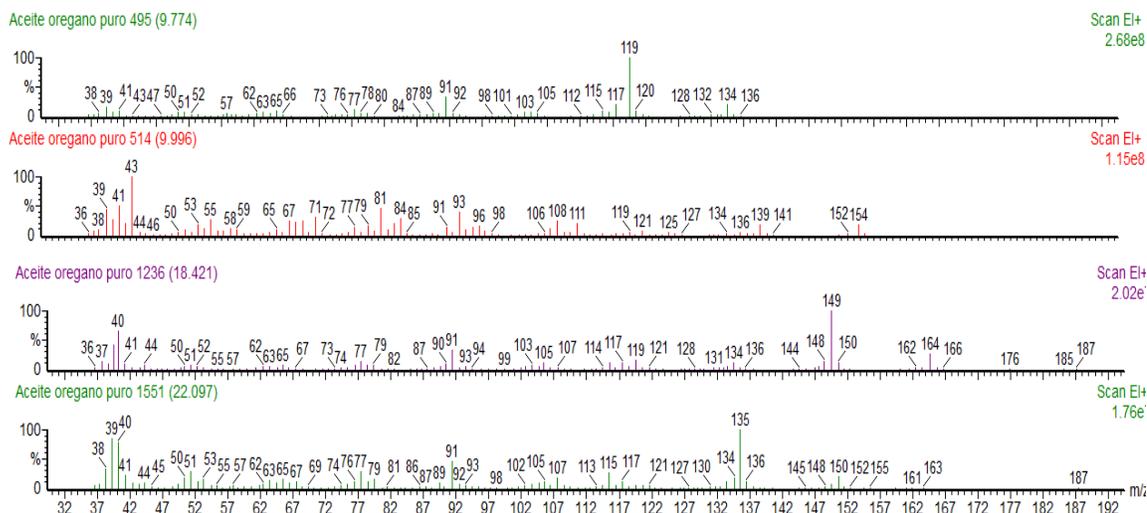
#### 4.1.5. Etapa V. Estudio de migración

Los resultados de la evaluación de migración para los materiales de estudio se obtuvieron utilizando un cromatógrafo de gases acoplado a masas. La primera muestra analizada correspondió al aceite esencial de orégano (*L. berlandieri* Schauer) fracción sinergista, de la cual se obtuvo un cromatograma con cuatro picos mayoritarios con tiempos de retención de 9.79 min, 10.02 min, 22.08 y 22.48 min como se muestra en la Figura 30.



**Figura 30.** Cromatograma del análisis del aceite esencial de orégano (*L. berlandieri* schauer) fracción sinergista.

Partiendo de los picos mayoritarios se procedió a la obtención de masas por separación cromatográfica, dichas masas corresponden a la Figura 31, ordenadas de forma creciente en base al tiempo de retención.



**Figura 31.** Espectro de masas correspondientes a los cuatro picos principales obtenidos de la separación cromatográfica.

Para llevar a cabo la evaluación cualitativa y cuantitativa del aceite, se revisó la pureza de cada uno de los picos de los cromatogramas y la comparación de espectros de masas de los compuestos mayoritarios contra los espectros de la Biblioteca National Institute of Standards and Technology (NIST02), que lleva a cabo con el software Data Analysis de modo automático. Estos compuestos mayoritarios en base al tiempo de retención se describen en la Tabla 8 destacando el contenido presente en la muestra del aceite esencial analizada.

**Tabla 8. Compuestos mayoritarios presentes en el aceite de orégano (*L. berlandieri schauer*).**

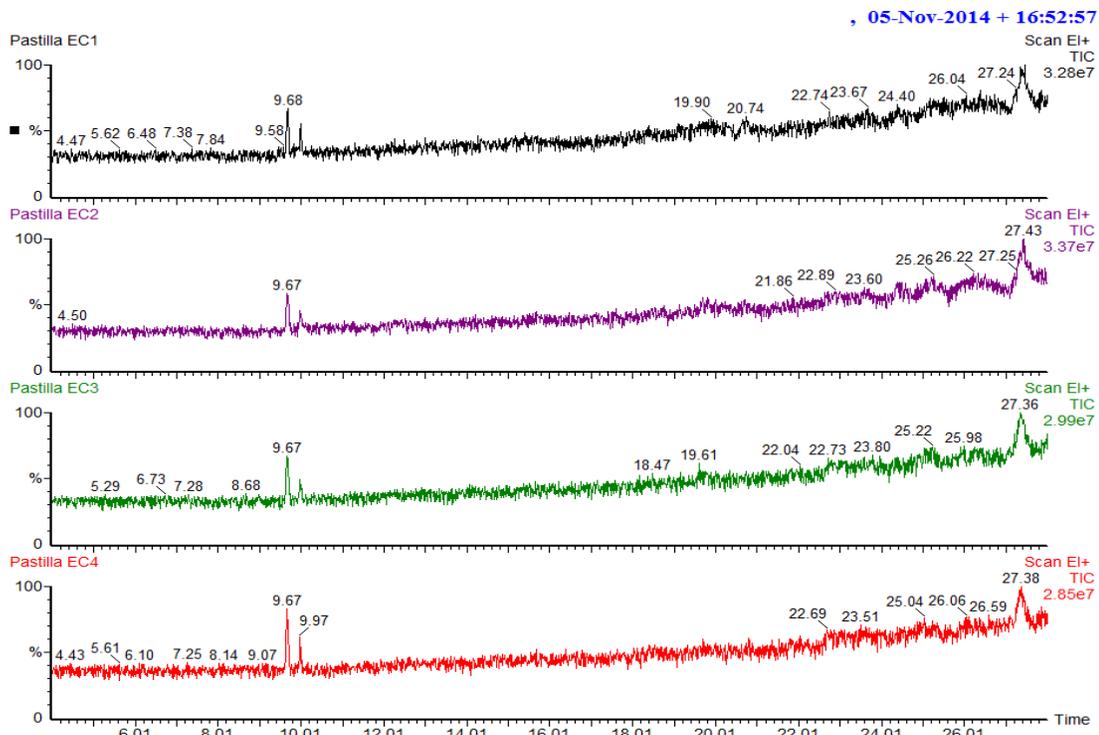
Compuesto	Tiempo de retención	Área	Área %
<b>p-Cimeno</b>	9.79	243260672	35.1
<b>Limoneno</b>	10.02	128676240	18.5
<b>Timol</b>	22.08	155218752	22.4
<b>Carvacrol</b>	22.48	66454412	9.6

De acuerdo a la mezcla de compuestos mayoritarios identificados en la muestra de aceite esencial de orégano (*L. berlandieri* Schauer), se observó que la presencia del p-Cimeno (35.1%), seguido del timol (22.4%), limoneno (18.5) y por último carvacrol (9.6%), representando el 85.6% de los compuestos presentes en el analito.

La siguiente parte del ensayo fue determinar de forma cualitativa la migración de los componentes mayoritarios del aceite esencial de orégano (fracción sinergista) contenido en los diferentes materiales propuestos hacia los medios simulantes alimenticios durante el periodo de tiempo planteado.

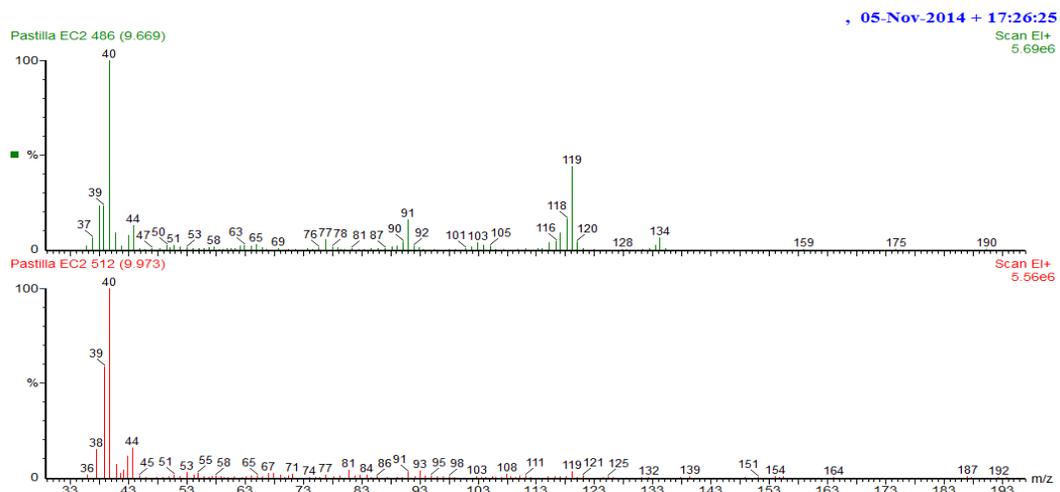
Para el polímero policondensado la migración solo se hizo evidente sobre el simulante etanol en el tratamiento de calentamiento (50°C). Con respecto a las condiciones de refrigeración (4°C) y temperatura ambiente (25°C) para el mismo simulante no se presentó dicho efecto.

Respecto a los simulantes aceite de oliva y agua, no fue evidente ningún grado de migración de algún compuesto detectado en la muestra de aceite (Tabla 7), este comportamiento se observó en todas las condiciones de temperatura propuesta. La Figura 32 muestra los cromatogramas correspondiente a las lecturas de 1, 2, 3 y 4 horas de contacto con el simulante etanol en calentamiento, donde se observan picos a los tiempos de retención 9.67 y 9.97 que hicieron evidente la migración de los compuestos correspondientes a dichos tiempos.



**Figura 32.** Cromatogramas del análisis de etanol (50 °C), en contacto con el polímero policondensado, a los diferentes intervalos de tiempos.

A partir de los picos cromatográficos se obtuvieron las masas, como se presenta en la Figura 33, y se realizó la comparación en la biblioteca NIST02. Lo cual arrojó que el pico detectado en 9.67min corresponde al p-Cimeno y el detectado en minuto 9.97 pertenece al limoneno.

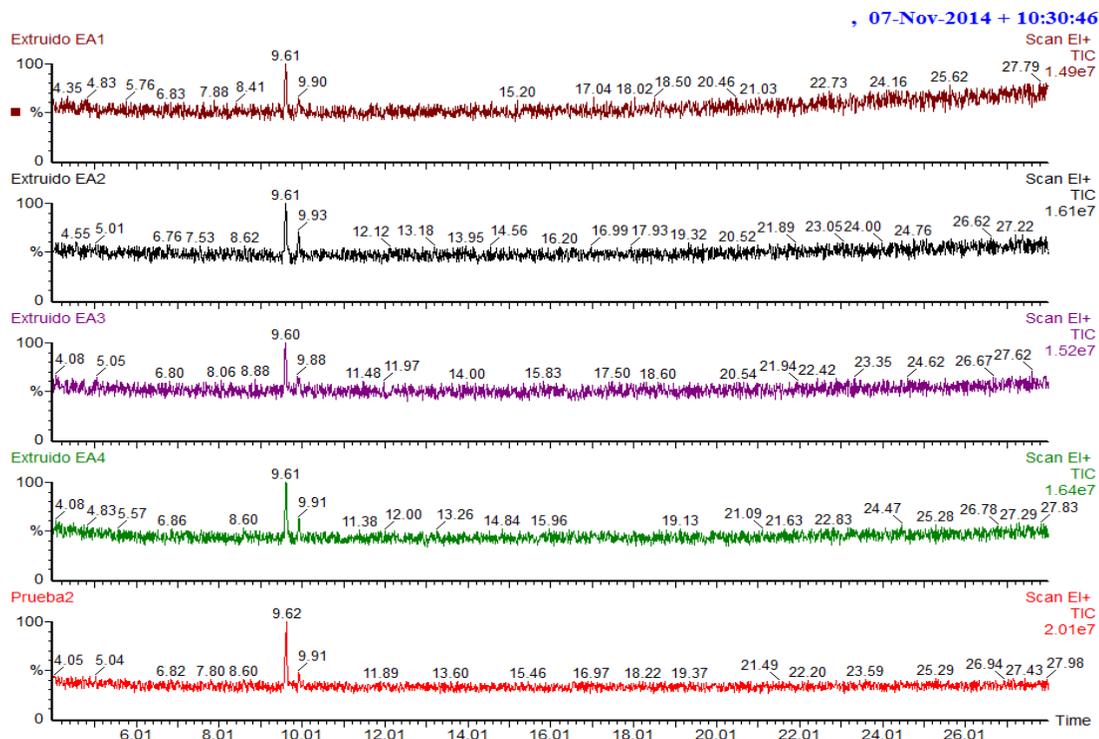


**Figura 33.** Espectro de masas correspondientes a los dos picos principales obtenidos de la separación cromatográfica del simulante etanol (50 °C).

Así mismo, el segundo material evaluado fue la polisuccinimida extruida, donde el comportamiento de la migración en los simulantes de alimentos fue más evidente. La migración sobre los simulantes agua y aceite de oliva fue nula, es decir, los cromatogramas no presentaron picos que revelaran la presencia de compuestos en las diferentes condiciones dependientes de la temperatura.

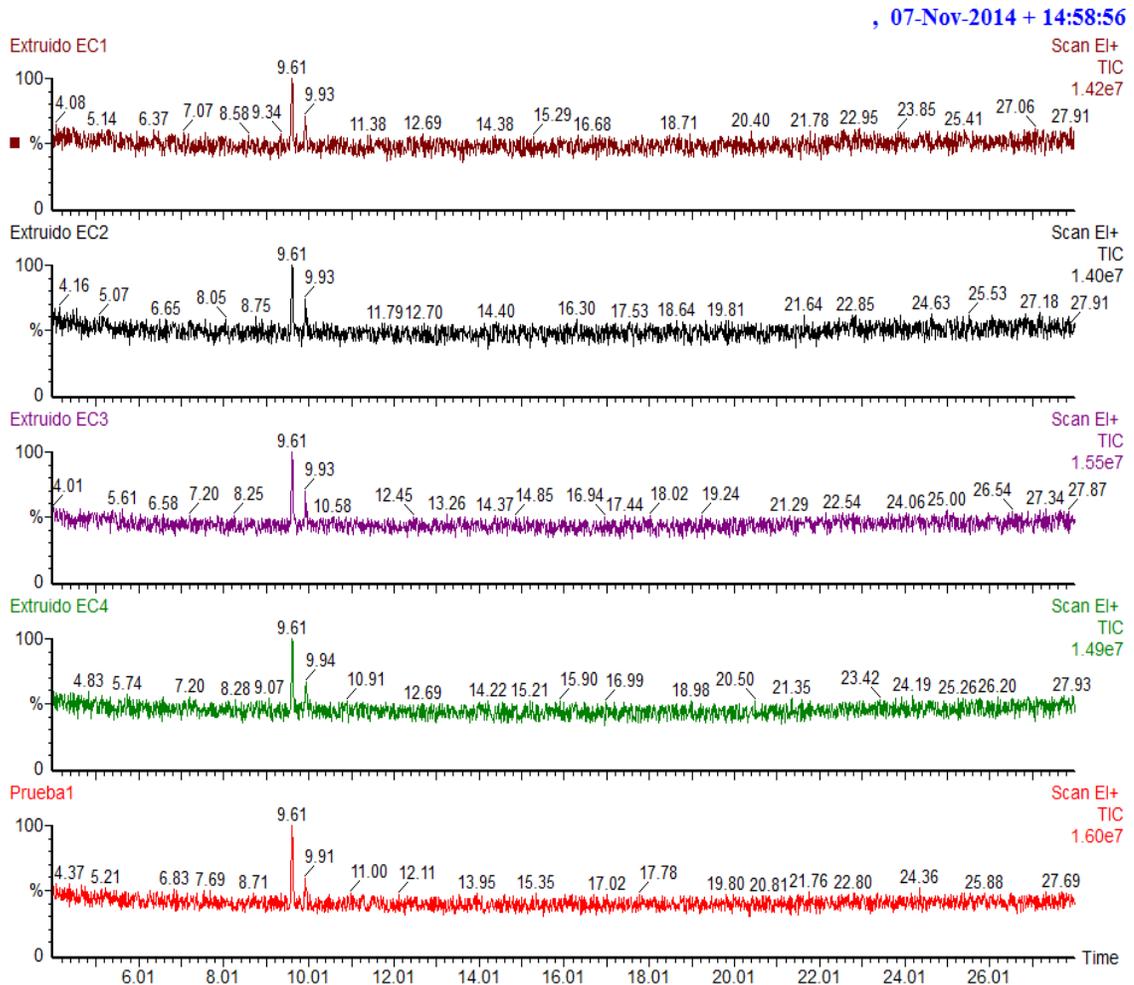
Respecto al simulante etanol existió certeza de migración en condiciones de temperatura ambiente, calentamiento y refrigeración; y debido al comportamiento mostrado hasta las 4 horas de contacto con el material se decidió tomar una última lectura a las 12 horas de contacto.

La Figura 34 ilustra los cromatogramas de las lecturas obtenidas a diferentes tiempos en el simulante etanol a temperatura ambiente (25 °C), donde se obtuvieron picos cromatográficos en 9.60 min. y 9.90 min. de retención. Estos compuestos mayoritarios son los mismos que migraron al simulante etanol cuando estuvo en contacto con el material policondensado.



**Figura 34.** Cromatogramas del análisis de etanol (25 °C) en contacto con el polímero extruido, a los diferentes intervalos de tiempos.

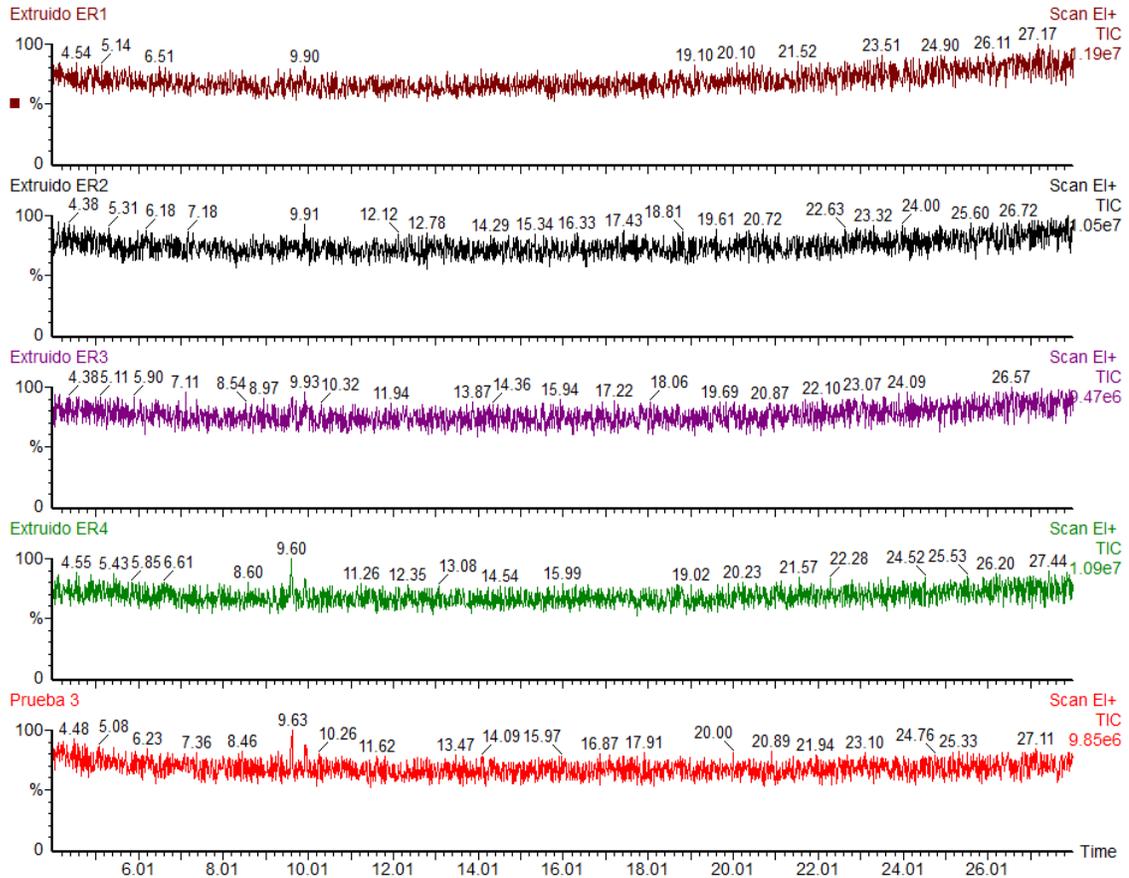
También se hizo evidente la migración en el mismo tiempo de retención sobre el simulante etanol (50 °C); como se reveló en la Figura 35 que muestra dos picos mayoritarios en el cromatograma obtenido.



**Figura 35.** Cromatogramas del análisis de etanol (50 °C) en contacto con el polímero extruido, a los diferentes intervalos de tiempos.

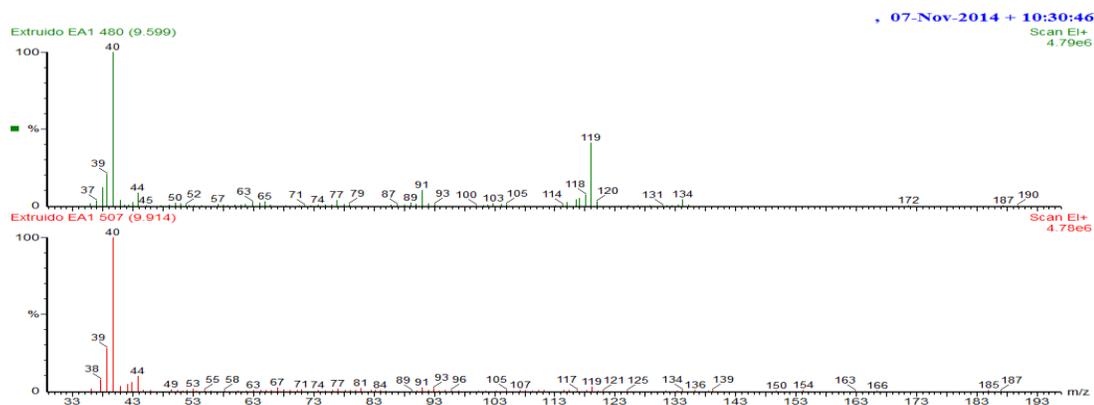
Con respecto a la última condición experimental del etanol, es decir, sometido a refrigeración (4°C), se presentó un efecto similar a las dos condiciones antes mencionadas; la diferencia consistió en la intensidad de los picos cromatográficos, ya que en la refrigeración es menos evidente. Lo anterior se precisa en la Figura 36 donde se muestran los cromatogramas obtenidos de la evaluación de esta condición.

, 07-Nov-2014 + 11:04:12



**Figura 36.** Cromatogramas correspondientes al análisis del etanol (4°C) estando en contacto con el polímero extruido.

Debido a que en las diferentes condiciones experimentales correspondientes al simulante etanol existe persistieron dos picos cromatográficos con similitud en el tiempo de retención; se obtuvieron las masas para determinar los compuestos que migraron (Figura 37). La comparación en la biblioteca NIST02 arrojó que los compuestos detectados al minuto 9.60 y al 9.90, son propios p-Cimeno y limoneno, respectivamente.



**Figura 37.** Espectro de masas correspondientes a los dos picos principales obtenidos de la separación cromatográfica del simulante etanol en las diferentes condiciones de temperatura.

Los resultados de la matriz experimental planteada evidenciaron que de los simulantes alimentarios evaluados, solo existió migración hacia el etanol. Este efecto, con respecto al polímero policondensado, solo se presentó en la condición de calentamiento; mientras tanto, hacia el polímero extruido la migración se hizo presente a temperatura ambiente, calentamiento y refrigeración.

Debido a los picos cromatográficos que mostraron los cromatogramas se reveló que solo hubo migración de los compuestos *p*-Cimeno y limoneno.

El *p*-Cimeno es un alquil benceno constituyente de una serie de aceites esenciales, entre ellos el de comino y el de tomillo; es insoluble agua, pero miscible en etanol y éter dietílico (Klages, 2005) (Geissman, 1974), lo cual explica el comportamiento observado en el presente estudio. El *p*-Cimeno es precursor de compuestos con actividad antimicrobiana y antioxidante, como el timol y carvacrol, pero por sí mismo no es un antimicrobiano eficaz, por lo que la actividad antimicrobiana se hace evidente si está presente junto el timol y carvacrol (Dorman & Deans, 2000) (Juven, Kanner, Schved, & Weisslowicz, 1994);

El D-limoneno (4-metil-1-metilciclohexeno), es un monoterpeneo y componente importante de varios cítricos (Reda Zahi, Liang, & Yuan,

2015). Se ha probado como agente antimicrobiano en alimentos, sin embargo, para lograr dicho efecto se requiere la aplicación de concentraciones elevadas (Reda Zahi, Liang, & Yuan, 2015) (Zhanga, Vriesekoopb, Yuana, & Lianga, 2014), la baja actividad se debe rápida degradación oxidativa (Li & Chiang, 2012).

Por lo que la actividad antimicrobiana valorada como se evidenciado en el análisis antimicrobiano (Etapa III), para ambos materiales adicionados con aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri* Schauer), no puede ser atribuible a la migración de estos componentes (Juliano, Mattana, & Usai, 2000) (Lahlou, 2004)(Pellegrini & Proteggene, 1999).

La estructura química del carvacrol (2-metil-5-(1-metiletil) fenol) está representada por un grupo fenólico, con un alto poder hidrofóbico, capaz de causar daño a nivel celular, como anteriormente se apuntó. La estructura del timol (2-isopropil-5-metilfenol) es similar a la del carvacrol, como ha sido reportado por varios autores (Falcone, Mastromatteo, Corbo, & Sinigaglia, 2007), (Ramos M. , Jiménez, Peltzer, & Garrigós, 2012), diferenciándose únicamente por la posición del grupo hidroxilo.

El timol, por su parte, es un fenol ligeramente soluble en agua a pH neutro, pero muy soluble en alcoholes, así como en soluciones acuosas fuertemente alcalinas debido a la desprotonación del fenol (Klages, 2005), debido a que el carvacrol es un isómero del timol las características químicas son muy similares (Ramos M. , Jiménez, Peltzer, & Garrigós, 2012). La nula detección de la migración de timol y carvacrol en los líquidos simulantes probados podría ser causa de la baja concentración en la migración de los mismos, ya que esto se puede dar de manera prolongada ocasionado por la posible formación de algún tipo de enlace débil entre el polímero y el aditivo en estudio.

Estudios complementarios realizados en la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez Hernández (2014), revelan en los espectros infrarrojos de

muestras de polisuccinimida adicionadas con las fracciones de aceite esencial del orégano, muestran la presencia de una banda ancha entre los 3500 y 3200  $\text{cm}^{-1}$ . Cesteros (2004), hace referencia a este modo espectral cuando una banda de tensión del grupo OH forma parte de un enlace de hidrógeno al desplazarse hacia frecuencias más bajas, junto con un incremento de la intensidad y anchura de la banda, por lo que es probable que entre el péptido obtenido y el aditivo incorporado hayan establecido este tipo de interacción, ya que el aditivo está constituido en mayor medida por fenoles de alto poder hidrofóbico (Lambert, Skandamis, Coote, & Nychas, 2001) y en la mayor parte de las mezclas miscibles de polímeros, que se encuentran en la práctica, corresponden a sistemas en los que la estructura química de los componentes son complementarias; es decir, permiten el establecimiento de interacciones específicas intermoleculares. Esta idea constituye lo que se ha denominado como principio de disimilitud complementaria (Olabisi, Roeson, & Shaw, 1979).

Las condiciones que conducen a la formación de enlaces de hidrógeno usualmente implican al menos a dos funcionales en la misma o en diferentes moléculas: uno se comportará como donador de protones (grupo ácido) y el otro como donador de electrones (grupo básico) (Schuster, Zundel, & Sandorfy, 1976) (Qin, Pires, & Belfiore, 1990). Para el presente caso de estudio el péptido base (polisuccinimida) y el aditivo (Aceite esencial), respectivamente.

Este tipo de interacción permitiría disponer de un material capaz de realizar una liberación prolongada del aditivo incorporado, favoreciendo un incremento en el tiempo de permanencia del compuesto activo en el lugar de liberación o absorción, prolongando la efectividad del mismo, lo cual es ampliamente buscado en materiales empleados tanto en las áreas biomédicas como alimentarias (Rodríguez, Cerezo, & Salem, 2000) (Hernández González, 2014).

## CAPITULO V

### **CONCLUSIONES**

El atrapamiento al 3% w/w de las fracciones de aceite esencial en el polímero extruido se logró a los 540 min de contacto, el cual presentó efectividad en las pruebas antimicrobianas. Dicho efecto en las cinéticas de crecimiento se presentó después de las primeras 4-6 horas de contacto.

El atrapamiento que presentó inhibición microbiana en el polímero policondensado fue a partir de 7% w/w. El efecto en las cinéticas de crecimiento se presentó de forma inmediata.

De los materiales evaluados el polímero extruido presentó mejores características antimicrobianas cuando se funcionalizó con el aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri* Schauer), tocante a la concentración, ya q la inhibición fue evidente al 3% relación w/w. En contraste estudios realizados por Ramos y colaboradores (2012) reportan inhibición solo cuando se agregó una concentración del 8%, similar a la del material policondensado 7%, lo anterior para un estudio sobre películas a base de polipropileno, lo que indica que el polímero extruido es más costeable.

La fracción alta en timol adicionada a los materiales poliméricos en estudio, presentó la mayor efectividad antimicrobiana contra las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, para ambos casos.

Las micrografías del microscopio óptico revelan anormalidades morfológicas en ambos microorganismos patógenos cuando estuvieron en contacto con los aditivos antimicrobianos, por su parte las micrografías del microscopio electrónico de barrido confirmaron la lisis celular tal y como se describe para los daños causados por el timol y carvacrol en los estudios realizados por Lambert y colaboradores (2001), donde se indica que el daño es a nivel de la integridad de la membrana celular, por lo que el efecto antimicrobiano de los

materiales funcionalizados, se puede atribuir a la presencia de estos componente.

Del estudio de migración solo se pudo evidenciar la presencia de limoneno y p-Cimeno, precursor del timol, en el simulante etanol; y no de los compuestos timol y carvacrol, altamente afines a este solvente; por lo que se puede concluir que existe algún otro tipo de interacción molecular de mayor fuerza ejercida entre el polímero y los compuestos en estudio; del tipo puente de hidrógeno (Hernández, 2014), en virtud a análisis infrarrojos realizados al respecto.

El estudio concluye que tanto la polisuccinimida obtenida mediante extrusión como por policondensación son adecuadas para el diseño de un empaque activo con actividad antimicrobiana.

## CAPITULO VI

### **BIBLIOGRAFÍA**

- Anthierens, T., Ragaert, P., Verbrugghe, S., Ouchchen, A., De Geest, B., Nosedá, B., Devlieghere, F. (2011). Use of endospore-forming bacteria as an active oxygen scavenger in plastic packaging materials. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 594-599.
- Appendini, P., & Hotchkiss, J. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 113-126.
- Appendini, P., & Hotchkiss, J. H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*(113-126), 113-126.
- Arana Sanchez, A., Estarrón Espinosa, M., Obledo Vázquez, E., Padilla Camberos, E., Silva Vázquez, R., & Lugo Cervantes, E. (2009). Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in  $\beta$ -cyclodextrin. *Letters in Applied Microbiology*, 585-590.
- Ayala-Zavala, J., OmsOliu, G., & Odriozola Serrano, I. (2008). Biopreservation of fresh-cut tomatoes using . *European Food Research and Technology*, 1047-1055.
- Badui Dergal, S. (2006). *Química de los alimentos* . México: PEARSON.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils A review. *Food and Chemical Toxicology*, 446-475.
- Barbehenn, R., Cheek, S., Gasperut, A., Lister, E., & Maben, R. (2005). Phenolic compounds in red oak and sugar maple leaves have prooxidant activities in the midgut fluids of *Malacosoma disstria* and

- Orgyia leucostigma* caterpillars . *Journal of Chemical Ecology*, 969-988.
- Basch, C., Jagus, R., & Flores, S. (2013). Physical and antimicrobial properties of tapioca starch-HPMC edible films incorporated with nisin and/or potassium sorbate. *Food And Bioprocess Technology*, 2419-2428.
- Becerril, R., Gómez Lus, R., Goñi, P., López, P., & Nerín, C. (2007). Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against *E. coli* and *S. aureus*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1003-1011.
- Bemis Curwood innovates. (Septiembre de 2014). *Bemis Curwood innovates*. Obtenido de <http://curwoodinnovates.com/freshcase/#>
- Blanco Massani, M., Molina, V., Sanchez, M., Renaud, V., Eisenberg, P., & Vignolo, G. (2014). Active polymers containing *Lactobacillus curvatus* CRL705 bacteriocins: Effectiveness assessment in Wieners. *International Journal of Food Microbiology*, 7-12.
- Bolumar, T., Andersen, M., & Orlien, V. (2011). Antioxidant active packaging for chicken meat processed by high pressure treatment. *Food Chemistry*, 1406-1412.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of Food Microbiology*, 223-253.
- Camo, J., Bletrán, J. A., & Roncalés, P. (2008). Extension of the display life of lamb with an antioxidant active packaging. *Meat Science*, 1086-1091.

- Cannarsia, M., Baianoa, A., Marinob, R., Sinigagliaa, M., & Del Nobilea, M. (2005). Use of biodegradable films for fresh cut beef steaks packaging. *Meat Science*, 259-265.
- Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., & Vignolo, G. (2008). A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*, 483-499.
- Cervantes García, E., García González, R., & Salazar Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*, 28-40.
- Cesteros, I. (2004). Aplicaciones de la FTIR al Estudio de las Interacciones Polímero-Polímero. *Revista Iberoamericana de Polímeros*.
- Chen, J., & Brody, A. (2013). Use of active packaging structures to control the microbial quality of a ready-to-meal product. *Food Control*, 306-310.
- Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Delegación Cataluña. (s.f.). Obtenido de Seres Modélicos: <http://seresmodelicos.csic.es/galeria/bacteri.html>
- Contini, C., Katsikogianni, M. G., O' Neill, F. T., Sullivan, M. O., Dowling, D. P., & Monahan, F. J. (2011). Development of active packaging containing natural antioxidants. *Procedia Food Science*, 224-228.
- Dainelli, D., Gontard, N., Spyropoulos, D., Zondervan-van den Beuken, E., & Tobback, P. (2008). Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Trends in Food Science & Technology*, 103-112.
- Del Nobile, M., Conte, A., Buonocore, G., Incoronato, A., Massaro, A., & Panza, O. (2009). Active packaging by extrusion processing of recyclable and biodegradable polymers. *Journal of Food Engineering*, 1-6.

- Díaz Cortés, N. (2007). *Tesis. Aplicación del aceite esencial de orégano (Lippia berlandieri schauer)*. Saltillo, Coahuila.
- Dorman, H., & Deans, S. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 308–316.
- Ellouze, M., & Augustin, J.-C. (2010). Applicability of biological time temperature integrators as quality and safety indicators for meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 119-129.
- Elmer Koneman, W. (2008). *Diagnóstico microbiológico*. Argentina: Panamericana.
- Falcone, P., Mastromatteo, M. D., Corbo, M., & Sinigaglia, M. (2007). Evaluation in vitro antimicrobial activity of thymol toward hygiene-indicating and pathogenic bacteria. *Journal of Food Protection*, 425-431.
- Fausto, T. (2006). *Técnicas Tradicionales en el Análisis Microbiológico de los Alimentos*.
- Fernández Escartín, E. (2008). *Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ). Segunda Edición*.
- Floros, J., Dock, L., & Han, J. (1997). Active packaging technologies and applications. *Food Cosmetics and Drug Packaging*, 10-17.
- Galotto, M., Valenzuela, X., & Guarda, A. (2004). Inocuidad de los envases plásticos destinados al envasado de alimentos. *Santiago de Chile*.
- García Martín, D. (2013). *Memorias de Asignatura. Curso de Nuevas Tecnologías de Conservación*. Madrid, España.
- Geissman, T. (1974). *Principios de química orgánica*. Barcelona, España: Editorial Reverté, S.A.

- Guarda, A., Rubilar, J., Miltz, J., & Galotto, M. (2011). The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology*, 144-150.
- Guenther, S., Herzig, O., Fieseler, L., Klumpp, J., & Loessner, M. (2012). Biocontrol of Salmonella Typhimurium in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2. *International Journal of Food Microbiology*, 66-72.
- Gustafson, J., Liew, Y., Chew, S., Markham, J., Bell, H., Wyllie, S., & Warmington, J. (1998). Effects of tea tree oil on Escherichia coli . *Letters in Applied Microbiology*, 194-198.
- Ha, J., Kim, Y., & Lee, D. (2001). Multilayered antimicrobial polyethylene films applied to the packaging of ground beef. *Packaging Technology and Science*, 55-62.
- Haberbecka, L., Oliveirac, R., Vivijisa, B., Wenseleersc, T., Aertsena, A., Michielsa, C., & Geeraerd, A. (2015). Variability in growth/no growth boundaries of 188 different Escherichia coli strains reveals that approximately 75 % have a higher growth probability under low pH conditions than E. coli O157:H7 strain ATCC 43888. *Food Microbiology*, 222–230.
- Heising, J., Dekker, M., Bartels, P., & Van Boekel, M. (2014). Monitoring the quality of perishable foods: opportunities for intelligent packaging. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*(645-654), 645-654.
- Helander, I., Alakomi, H. L., Latva Kala, K., Mattila Sandholm, T., Pol, I., Smid, E., Von Wright, A. (1998). Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 3590-3595.
- Hernández Figueroa, R., Palou García, E., & López Malo, A. (2014). Utilización de películas comestibles y ciclodextrinas para la liberación

controlada de aceites esenciales como agentes antimicrobianos en vegetales . *Mundo alimentario*, 15-20.

Hernández González, M. (2014). Reporte de avance de Tesis Doctoral II. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.

Hernández, M., Silva, R., Catonga, A., & Morales, G. (2007). Aplicacion de aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri schauer*) en carne de cerdo para su conservación. *Aplicacion de aceite esencial de orégano (Lippia berlandieri schauer) en carne de cerdo para su conservación*, (pág. 2). Saltillo, Coahuila.

Hui, Y., Guerrero, I., & Rosmini, M. (2006). *Ciencia y Tecnología de Carnes*. México: LIMUSA.

Hurme, E. (2003). Detecting leaks in modified atmosphere packaging. *Novel Food Packaging Techniques*, 276-286.

Jay, J. M., Loessner, M. J., & A., G. D. (2009). Carnes Frescas. En *Microbiología moderna de los alimentos* (págs. 59-63). New York: ACRIBIA.

Juliano, C., Mattana, A., & Usai, M. (2000). Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. *Journal of Essential Oil Research*, 516–522.

Jung, H. H. (2005). Antimicrobial packaging systems. *Innovations in Food Packaging*, 80-107.

Juven, B., Kanner, J., Schved, F., & Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriologia*, 516-522.

Kanatt, S. R., Chander, R., & Sharma, A. (2008). Chitosan glucose complex – A novel food preservative. *Food Chemistry*, 521-528.

- Kelly, C., Murray, G., & Uy, O. (2005). *Patente n° US6924147 B2*. EUA.
- Kerry, J., O'Grady, M., & Hogan, S. (2011). Utilización Actual, Pasada y Futura de Sistemas de Empacado Activo para Carne y Productos a Base de Músculos. *Mundo Lácteo y Cárnico*, 9-16.
- Klages, F. (2005). *Tratado de química orgánica*. Barcelona, España: Editorial Reverté, S.A.
- Kuorwel, K., Cran, M., Sonneveld, K., Miltz, J., & Bigger, S. (2011). Antimicrobial Activity of Natural Agents Coated on Starch-Based Films against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Science*, 531-537.
- Kuswandi, B., Jayus, Oktaviana, R., Abdullab, A., & Heng, L. (2014). A novel on-package sticker sensor based on methyl red for real-time monitoring of broiler chicken cut freshness. *Packaging Technology and Science*, 69-81.
- Lahlou, M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother Res.*, 169-172.
- Lambert, R., Skandamis, P., Coote, P., & Nychas, G.-J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacro. *Journal of Applied Microbiology*, 453-462.
- Lee, S., & Rahman, A. (2014). Intelligent packaging for food products. *Innovations in food packaging (2nd ed.)*, 171-209.
- Li, P., & Chiang, B. (2012). Process optimization and stability of d-limonene-in-water nanoemulsions prepared by ultrasonic emulsification using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 192–197.
- Longinos Martínez, S., Mendoza Chapulin, M., Quezada Gallo, J., & Pedroza Islas, R. (2005). Películas Antimicrobianas para Carnes y Productos Cárnicos. *Mundo Lácteo y Cárnico*, 11-17.

- López De Ávila, L. M., Castaños Peláez, H. I., & Mejía Gómez, C. E. (2013). Antimicrobial effect of essential oil from *Salvia Officinalis* L. on food related microorganisms. *SciELO*, 77-83.
- López Malo, A., Palou, E. L., & Alzamora, S. M. (2005). Mixtures of natural and synthetic antifungal agents . 261-286.
- López, P., Sánchez, C., Batlle, R., & Nerín, C. (2007). Development of flexible antimicrobial films using essential oils as active agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 8814-8824.
- Marcos Mutual, B. (2011). Tecnologías de Conservación Emergentes de Productos Cárnicos. *Mundo Lácteo y Cárnico*, 24-31.
- Martínez Olmos, A., Fernández Salmerón, J., Lopez Ruiz, N., Rivadeneyra Torres, A., Capitan Vallvey, L., & Palma, A. (2013). Screen printed flexible radiofrequency identification tag for oxygen monitoring. *Analytical Chemistry*, 11098-11105.
- Martínez, L., Djenane, D., Cilla, I., Beltrán, J., & Roncalés, P. (2006). Effect of varying oxygen concentrations on the shelf-life of fresh pork sausages packaged in modified atmosphere. *Food Chemistry*, 219-225.
- Maye Bernal, R. (1984). El antibiograma de discos, normalización de tecnica de Kirby-Bauer. *Revista biomédica Vol 4*, 112-121.
- Mendes de Souza, P., Fernández, A., López Carballo, G., Gavara, R., & Hernández Muñoz, P. (2010). Modified sodium caseinate films as releasing carriers of lisozyme. *Foos Hydrocolloids*, 300-306.
- Mills, A. (2005). Oxygen indicators and intelligent inks for packaging food. *Chemical Society Reviews*, 1003-1011.
- Morales Ángeles, G. (2005). *Tesi, Aplicación del aceite esencial de orégano (Lippia berlandieri shauer) en la conservación de carnes de res.* Saltillo, Coahuila.

- Natrajan, N., & Sheldon, B. (2000). Efficacy of nisin-coated polymer films to inactivate *Salmonella thymurium* on fresh broiler skin. *Journal of Food Protection*, 1189-1196.
- Norrung, B., & Buncic, S. (2008). Microbial safety of meat in the European Union. *Meat Science*, 14-24.
- Ntzimani, A., Giatrakou, V., & Savvaidis, I. (2010). Combined natural antimicrobial treatments (EDTA, lysozyme, rosemary and oregano oil) on semi cooked coated chicken meat stored in vacuum packages at 4 °C: Microbiological and sensory evaluation. *Innovate Food Science and Emerging Technologies*, 187-196.
- Olabisi, O., Roeson, L., & Shaw, M. (1979). Polymer-Polymer Miscibility. *Academic Press*.
- Organización Mundial de la Salud. (21 de 10 de 2014). *Enterohaemorrhagic Escherichia coli*. Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>
- Oussalah, M., Caillet, S., & Lacroix, M. (2006). Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 1046-1055.
- Oussalaha, M., Cailleta, S., Saucierc, L., & Lacroix, M. (2006). Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*, 236-244.
- Ozdemir, M., & Floros, J. (2004). Active Food Packaging technologies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* , 185-193.
- Parlamento Europeo y del Consejo. (2004). *Reglamento (CE) sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos*.

- Pellegrini, N., & Proteggene, A. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Diol. Med*, 1231-1237.
- Portillo Ruiz, M. C., Viramontes Ramos, S., Muñoz Castellanos, L. N., Gastélum Franco, M. G., & Nevarez-Moorillon, G. V. (2005). Antifungal activity of mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer). *Journal of Food Protection*, 2713–2717.
- Qin, C., Pires, A., & Belfiore, L. (1990). *Polymer Comm.*
- Quintavalla, S., & Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*, 373-380.
- Ramírez Santos, J., Contreras Ferrat, G., & Carmen, G. E. (2005). La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. *Revista latinoamericana de Microbiología*, 95-101.
- Ramis Vergés, M. (1998). *Escherichia coli* patógeno intestinal. En *Microorganismos de los alimentos* (págs. 147-164). Zaragoza, España: ACRIBIA.
- Ramos, M., Beltrán, A., Peltzer, M., Valente, A. J., & Garrigósa, M. d. (2014). Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films. *LWT - Food Science and Technology*, 470–477.
- Ramos, M., Jiménez, A., Peltzer, M., & Garrigós, M. C. (2012). Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films. *Journal of Food Engineering*, 513-519.
- Rangel Ortega, S. d. (2007). *Tesis de licenciatura. Aplicación del aceite esencial de orégano (Lippia berlandieri schauer) como antimicrobiano contra patógenos anaerobios alimentarios*. Saltillo.

- Rao, M., Chander, R., & Sharma, A. (2005). Development of shelf-stable intermediate-moisture meat products using active edible chitosan coating and irradiation. *Journal of Food Science*, M325-M331.
- Realini, C. E., & Marcos, B. (2014). Active and intelligent packaging systems for a modern society. *Meat Science*, 404-919.
- Reda Zahi, M., Liang, H., & Yuan, Q. (2015). Improving the antimicrobial activity of d-limonene using a novel organogel-based nanoemulsion. *Food Control*, 554–559.
- Regier, M. (2014). Microwaveable Food Packaging. *Innovations in Food Packaging (Second Edition)*, 495-514.
- Reische, D., Lillard, D., & Eintenmiller, R. (1998). Antioxidants in food lipids. 423.
- Rocha Guzmán, N., Gallegos Infante, J., González Laredo, R., Ramos Gómez, M., Rodríguez Muñoz, M., Reynoso Camacho, R., (2007). Antioxidant effect of oregano (*Lippia berlandieri* v. Shauer) essential oil and mother liquors. *Food Chemistry*, 330-335.
- Rodriguez, I. C., Cerezo, A., & Salem, I. I. (2000). Sistemas de liberación bioadhesivos.
- Ryynanen, S., Risman, P., & Ohlsson, T. (2004). Hamburger composition and microwave heating uniformity. *Journal of Food Science*, 187-196. Obtenido de Journal of Food Science.
- Salas Valerio, W. F. (21 de 10 de 2014). *Deterioro e índice de deterioro*. Obtenido de [tarwi.lamolina.edu.pe/~fwsalas/CAP-03..rtf](http://tarwi.lamolina.edu.pe/~fwsalas/CAP-03..rtf)
- Salinas, Y., Ros-Lis, J., Vivancos, J.-L., Martíne Máñez, R., Marcos, M., Aucejo, S., Garcia, E. (2014). A novel colorimetric sensor array for monitoring fresh pork sausages spoilage. *Food Control*, 166-176.

- Sanchez Garcia, M., M.J., O., Gimenez, E., & Lagaron, J. (2008). Novel polycaprolactone nanocomposites containing thymol of interest in antimicrobial film and coating applications. *Journal of Plastic Film and Sheeting*, 239-251.
- Schuster, P., Zundel, G., & Sandorfy, C. (1976). The Hydrogen Bond. Recent Development in Theory and Experiments.
- Seija, V. (2008). *Etiopatogenia microbiológica*. Obtenido de Género Staphylococcus : <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Staphylococcus.pdf>
- Silva Vazquez, R. (2003). El Orégano (Los nuevos caminos de la agricultura). Folleto Técnico CONAZA. *CIRENA (Centro de Investigación para los Recursos Naturales)*. Salaices, López. Chihuahua.
- Silva Vázquez, R., Gastélum Franco, M., Torres Muñoz, J., Moorillón, N., & G.V. (2008). Las especies de orégano en México.
- Singha, A., Singhb, R. ., Bhuniaa, A., & N., S. (2003). Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. *LWT - Food Science and Technology*, 787-794.
- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T., & Arsenakis, M. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1202–1205.
- Skandamis, P., Coote Nychas, G. J., & Lambert, R. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, 453-462.
- Smolander, M., Hurme, E., Latva-Kala, K., Luoma, T., Alakomi, H.-L., & Ahvenainen, R. (2002). Myoglobin-based indicators for the evaluation

of freshness of unmarinated broiler cuts. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 279-288.

Solís Salas, L. M. (2013). *Evaluación del atrapamiento y la liberación del aceite esencial de orégano (Lippia berlandieri schauer) en polisuccinimida*. Saltillo, Coahuila.

Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., & Botsoglou, N. (2008). The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. *Meat Science*, 159-166.

*Staphylococcus aureus*. (3 de Agosto de 2011). Obtenido de <http://microbitos.wordpress.com/2011/08/03/staphylococcus/>

Sung, S.-Y., Sin, L., Tee, T.-T., & Bee, S.-T. (2014). Control of bacteria growth on ready-to-eat beef loaves by antimicrobial plastic packaging incorporated with garlic oil. *Food Control*, 214-221.

Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., & Bigger, S. (2003). Active packaging technologies with an emphasis antimicrobial packaging and its applications. *Journal of Food Science*, 408-420.

Tewari, G., Jayas, D., Jeremiah, L., & Holley, R. (2006). Prevention of Transient Discoloration of Beef. *Journal of Food Science*, 506-510.

Turina, A. V., Nolan, M., Zygodlo, J., & Perillo, M. (2006). Natural terpenes: Self-assembly and membrane partitioning. *Biophysical Chemistry*, 101-113.

Ultee, A., Bennik, M. H., & Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 1561-1568.

- Ultee, A., Kets, E. P., Alberda, M., Hoekstra, F. A., & Smid, E. J. (2000a). Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch. Microbiology*, 233–238.
- Umuhumuza, L., & Sun, X. (2011). Rapid detection of pork meat freshness by using L-cysteine- modified gold electrode. *European Food Research and Technology*, 425-431.
- Valero, A., Pérez Rodríguez, F., Carrasco, E., Fuentes Alventosa, J., García Gimeno, R., & Zurera, G. (2009). Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. *International Journal Food Microbiology*, 186-194.
- Vanderroost, M., Ragaert, P., Devlieghere, F., & De Meulenaer, B. (2014). Intelligent food packaging: The next generation. *Trends in Food Science & Technology*, 47-62.
- Vargas Negrete, M. (2009). *Tesis. Determinación de la capacidad antioxidante del aceite esencial de orégano (lippi berlandieri shauer) sobre aceites comestibles*. Saltillo, Coahuila.
- Vargas, M., Pastor, C., Chiralt, A., McClements, J., & González Martínez, C. (2008). Recent advances in edible coating for fresh and minimally processed fruits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 496-511.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., van Beest, M., de Kruijf, N., & Debevere, J. (1999). Developments in the active packaging of Foods. *Trends in Food Science & Technology*, 77-86.
- Vermeiren, L., Heirlings, L., Devlieghere, F., & Debevere, J. (2003). Oxygen, ethylene and other scavengers. *Novel food packaging techniques*.
- Vingolo, G., & Castellano, P. (2006). Inhibition of *Listeria innocua* and *Brochothrix thermosphacta* in vacuum-packaged meat by addition of

bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* CRL705 and its bacteriocins. *Letter in Applied Microbiology*, 194-199.

- Vu, C., & Won, K. (2013). Novel water-resistant UV-activated oxygen indicator for intelligent food packaging. *Food Chemistry*, 52-56.
- Weerakkodya, N. S., Caffina, N., Turnera, M. S., & A., D. G. (2010). In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. *Food Control*, 1408-1414.
- Yam, K. L., Takhistov, P. T., & Miltz, J. (2005). Intelligent Packaging: Concepts and Applications. *Journal of Food Science*.
- Zhanga, Z., Vriesekoopb, F., Yuana, Q., & Lianga, H. (2014). Effects of nisin on the antimicrobial activity of d-limonene and its nanoemulsion. *Food Chemistry*, 307–312.
- Zinno, P., Devirgiliis, C., Ercolini, D., Ongeng, D., & Mauriello, G. (2014). Bacteriophage PP2 to Challenge Salmonella in foods. *Internacional Journal of Food Microbiology*, 69-74.

## CAPITULO VII

### APENDICES

#### 7.1.1. Apéndice 1. Análisis t-student de los halos de inhibición del polímero extruido en contacto con *Staphylococcus aureus*.

Fracción		Least Sq mean	Std error
Alto timol	A	3.70	0.0866
Alto carvacrol	B	2.20	0.0866
Sinergista	C	1.55	0.0866

Las variables con las mismas letras no presentan diferencia significativa entre sí, ( $p \leq 0.05$ ).

#### 7.1.2. Apéndice 2. Análisis t-student de los halos de inhibición del polímero policondensado en contacto con *Staphylococcus aureus*.

Fracción		Least Sq mean	Std error
Alto timol	A	4.65	0.1060
Alto carvacrol	B	3.85	0.1060
Sinergista	B	3.60	0.1060
Control	C	2.40	0.1060

Las variables con las mismas letras no presentan diferencia significativa entre sí, ( $p \leq 0.05$ ).

#### 7.1.3. Apéndice 3. Análisis t-student de los halos de inhibición del polímero extruido en contacto con *Escherichia coli*.

Fracción		Least Sq mean	Std error
Alto timol	A	4.10	0.1000
Sinergista	B	3.10	0.1000
Alto carvacrol	C	2.60	0.1000

Las variables con las mismas letras no presentan diferencia significativa entre sí, ( $p \leq 0.05$ ).

#### 7.1.4. Apéndice 4. Análisis t-student de los halos de inhibición del polímero policondensado en contacto con *Escherichia coli*.

Fracción		Least Sq mean	Std error
----------	--	---------------	-----------

<b>Alto timol</b>	A	3.95	0.1060
<b>Sinergista</b>	B	3.35	0.1060
<b>Alto carvacrol</b>	B	3.15	0.1060
<b>Control</b>	C	2.60	0.1060

Las variables con las mismas letras no presentan diferencia significativa entre sí, ( $p \leq 0.05$ ).

### 7.1.5. Apéndice 5. Análisis t-student del polímero extruido en contacto con *Staphylococcus aureus* en base al tiempo experimental.

Level							Least Sq Mean								
L,20	A						1606000000								
L,24	A	B					1526666667								
L,16		B					1352666667								
L,72			C				1060666667								
L,12				D			776666667								
L,10					E		530666667								
C,72					E	F	466000000								
T,72					E	F	G	454000000							
L,8					E	F	G	H	384000000						
C,24						F	G	H	I	312666667					
C,20						F	G	H	I	J	286666667				
C,12						F	G	H	I	J	282000000				
L,6						F	G	H	I	J	K	258666667			
C,10							G	H	I	J	K	244666667			
T24								H	I	J	K	236000000			
T,20								H	I	J	K	232666667			
C,16								H	I	J	K	232666667			
S,72								H	I	J	K	226000000			
T,10								H	I	J	K	220000000			
C,8								H	I	J	K	L	217333333		
T,16								H	I	J	K	L	211333333		
T,12								H	I	J	K	L	206666667		
C,6								H	I	J	K	L	194000000		
T,8								H	I	J	K	L	190666667		
C,4								H	I	J	K	L	186000000		
T,6								H	I	J	K	L	171333333		
L,4									I	J	K	L	160666667		
T,4										I	J	K	L	134000000	
S,10											I	J	K	L	122666667

S,8	I	J	K	L	120666667
S,12	I	J	K	L	120666667
S,16	I	J	K	L	118666667
S,20	I	J	K	L	109333333
S,6	I	J	K	L	108666667
S,24	I	J	K	L	106666667
C,2	I	J	K	L	101333333
S,4		J	K	L	88666666.7
T,2		J	K	L	80000000
L,2		J	K	L	70000000
S,2			K	L	58666666.7
T,0				L	1.49E-07
C,0				L	5.96E-08
L,0				L	5.96E-08
S,0				L	0

Las variables con las mismas letras no presentan diferencia significativa entre sí, ( $p \leq 0.05$ ).

Polímero alto timol (T), alto carvacrol (C), sinergista (S) y control (L).

#### 7.1.6. Apéndice 6. Análisis t-student sobre la inhibición de *Staphylococcus aureus* en contacto con el polímero extruido.

Fracción		Least Sq mean	Std error
Control	A	702424242	23342344
Alto carvacrol	B	229393939	23342344
Alto timol	B	194242424	23342344
Sinergista	C	107333333	23342344

Las variables con las mismas letras no presentan diferencia significativa entre sí, ( $p \leq 0.05$ ).

#### 7.1.7. Apéndice 7. Análisis t-student del polímero policondensado en contacto con *Staphylococcus aureus* en base al tiempo experimental.

Level		Least Sq Mean
L,20	A	1566000000
L,24	A B	1487333333
L,16	A B C	1430000000



S,4	P	1.79E-07
S,6	P	1.50E-07
S,12	P	9.69E-08
C,0	P	8.94E-08
S,0	P	8.94E-08
S,8	P	5.96E-08
T,0	P	2.98E-08
S,10	P	3.72E-09
T,10	P	3.72E-09
L,0	P	-2.38E-07

Las variables con las mismas letras no presentan diferencia significativa entre sí, ( $p \leq 0.05$ ).

Polímero alto timol (T), alto carvacrol (C), sinergista (S) y control (L).

### 7.1.8. Apéndice 8. Análisis t-student sobre la inhibición de *Staphylococcus aureus* en contacto con el polímero policondensado.

Fracción		Least Sq mean	Std error
Control	A	957666667	17399827
Alto carvacrol	B	129095238	17399827
Alto timol	B C	84428571	17399827
Sinergista	C	41380952	17399827

Las variables con las mismas letras no presentan diferencia significativa entre sí, ( $p \leq 0.05$ ).

### 7.1.9. Apéndice 9. Análisis t-student del polímero extruido en contacto con *Escherichia coli* en base al tiempo experimental.

Level	Least Sq Mean
L,6 A	2160000000
L,4 A	2158666667
L,12 A	2151333333
L,8 A	2141333333
L,14 A	2142000000



T,8	J	K	L	M	N	146000000
T,6		K	L	M	N	130000000
T,4			L	M	N	111333333
T,2				M	N	84666666.7
L,0					N	4.77E-07
S,0					N	2.39E-07
C,0					N	0
T,0					N	-1.19E-07

Las variables con las mismas letras no presentan diferencia significativa entre sí, ( $p \leq 0.05$ ).

Polímero alto timol (T), alto carvacrol (C), sinergista (S) y control (L).

#### 7.1.10. Apéndice 10. Análisis t-student sobre la inhibición de *Escherichia coli* en contacto con el polímero extruido.

Fracción		Least Sq mean	Std error
Control	A	1883476190	19066479
Sinergista	B	369714286	19066479
Alto carvacrol	C	289190476	19066479
Alto timol	D	214476190	19066479

Las variables con las mismas letras no presentan diferencia significativa entre sí, ( $p \leq 0.05$ ).

#### 7.1.11. Apéndice 11. Análisis t-student del polímero policondensado en contacto con *Escherichia coli* en base al tiempo experimental.

L,72	A	2774666667
L,60	A	2648000000
L,48	B	2162666667
L,36	C	1773333333
L,16	C	1702666667
L,12	C	1686000000
L,10	C	1676000000
L,20	C	1662666667
L,24	C	1654666667
L,8	C	1613333333
L,6	D	1361333333
L,4	E	953333333

S,24	F		223333333
L,2	F	G	168000000
S,20	F	G	161333333
S,16	F	G	136000000
S,12	F	G	98000000
C,72	F	G	93333333.3
S,36	F	G	86000000
S,10	F	G	81333333.3
S,8	F	G	78000000
C,60	F	G	74666666.7
S,6	F	G	68000000
S,48	F	G	62666666.7
C,48	F	G	55333333.3
S,4	F	G	49333333.3
C,36	F	G	35333333.3
S,60	F	G	25333333.3
T,72		G	53333333.33
C,24		G	46666666.7
S,2		G	33333333.3
S,72		G	2000000
C,0		G	2.98E-07
S,0		G	2.39E-07
T,0		G	2.39E-07
T,2		G	2.39E-07
C,2		G	1.78E-07
C,8		G	7.82E-08
C,6		G	5.96E-08
T,60		G	5.96E-08
T,6		G	5.21E-08
T,4		G	2.98E-08
C,10		G	1.49E-08
T,8		G	1.11E-08
C,4		G	0.00E+00
T,10		G	-1.86E-08
C,20		G	-2.98E-08
C,12		G	-4.47E-08
C,16		G	-4.47E-08
T,36		G	-4.47E-08
T,12		G	-4.84E-08
T,16		G	-5.40E-08
T,20		G	-6.70E-08
T,24		G	-8.94E-06

T,48	G	-8.94E-06
L,0	G	-2.38E-08

Las variables con las mismas letras no presentan diferencia significativa entre sí, ( $p \leq 0.05$ ).

Polímero alto timol (T), alto carvacrol (C), sinergista (S) y control (L).

### 7.1.12. Apéndice 12. Análisis t-student sobre la inhibición de *Escherichia coli* en contacto con el polímero policondensado.

Fracción		Least Sq mean	Std error
Control	A	1559761905	20062417
Sinergista	B	76761904.8	20062417
Alto carvacrol	C	18809523.8	20062417
Alto timol	C	380952.38	20062417

Las variables con las mismas letras no presentan diferencia significativa entre sí, ( $p \leq 0.05$ ).