

# **Instituto Politécnico Nacional**

Centro Interdisciplinario de Investigación para el  
Desarrollo Integral Regional

(UNIDAD OAXACA)

Maestría en Ciencias en Conservación y  
Aprovechamiento de Recursos Naturales

(Ingeniería de Procesos)

"Estudio de la actividad antimicrobiana del aceite  
esencial y extractos vegetales evaluados en queso"

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
PRESENTA

**ADRIAN CRISTÓBAL ENRÍQUEZ ARAUJO**

Directora:

Dra. Luicita Lagunéz Rivera

Diciembre del 2010



SIP-14

**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL  
SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO**

*ACTA DE REVISION DE TESIS*

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez siendo las 13:00 horas del día 20 del mes de octubre del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca (CIIDIR-OAXACA)** para examinar la tesis de grado titulada: "**Estudio de la actividad antimicrobiana del aceite esencial y extractos vegetales evaluados en queso**"

**Enríquez**  
Apellido paterno

**Araujo**  
materno

**Adrián Cristóbal**  
nombre(s)

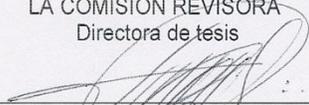
Con registro: 

B	0	8	1	3	3	0
---	---	---	---	---	---	---

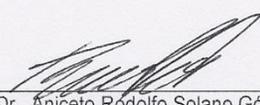
aspirante al grado de: **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

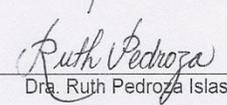
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

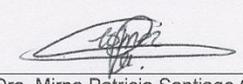
LA COMISION REVISORA  
Directora de tesis

  
Dra. Lucita Lagunéz Rivera

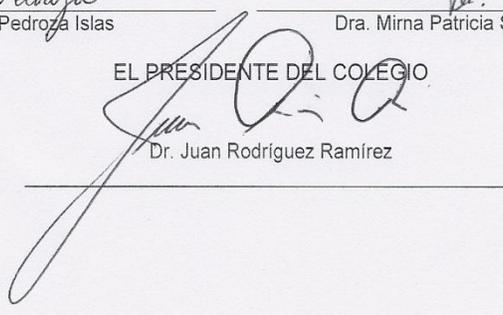
  
Dr. Prisciliano Felipe de Jesús Cano Barrita

  
Dr. Aniceto Rodolfo Solano Gómez

  
Dra. Ruth Pedroza Islas

  
Dra. Mirna Patricia Santiago Gómez

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

  
Dr. Juan Rodríguez Ramírez



CENTRO INTERDISCIPLINARIO  
DE INVESTIGACION PARA EL  
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
C.I.I.D.I.R.  
UNIDAD OAXACA  
I.P.N.



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESION DE DERECHOS*

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día 20 del mes octubre del año 2010, el (la) que suscribe **Enríquez Araujo Adrián Cristóbal** alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro **A081330**, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Luicita Lagunez Rivera y cede los derechos del trabajo titulado: **“Estudio de la actividad antimicrobiana del aceite esencial y extractos vegetales evaluados en queso”**. al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Calle Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca**, e-mail: [posgradoox@ipn.mx](mailto:posgradoox@ipn.mx) ó [ac\\_enar@hotmail.com](mailto:ac_enar@hotmail.com) Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

**Enríquez Araujo Adrián Cristóbal**



CENTRO INTERDISCIPLINARIO  
DE INVESTIGACION PARA EL  
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
C.I.I.D.I.R.  
UNIDAD OAXACA  
I.P.N.

## **Agradecimientos**

**A Dios por mostrarme el camino hacia este lugar y este tiempo, brindándome una satisfacción más dentro mi vida profesional.**

**A mis padres que sembraron en mí el anhelo de superación y motivan a diario para seguir adelante a pesar de lo adverso, pero sobre todo por su cariño manifestado a lo largo de mi vida.**

**A mis hermanos José Antonio, Juan, Karla y Carlos por cada minuto que hemos compartido y disfrutado en compañía de los viejos.**

**Con todo mi amor a mi esposa Elidía por ser mi regulador de estados de ánimo, por su paciencia, comprensión, por soportar mis ausencias pero sobre todo por darme parte de su vida y aceptar la mía.**

**A mis hijos Adrian y Michel porque cada vez que los observo se me olvida lo pesado del camino, encuentro en su inocencia y ternura el más grande halito para enfrentar los retos de la vida.**

**Agradezco a la Dra. Luicita Lagunez Rivera su respaldo a lo largo del proyecto, su paciencia, consejos y enseñanza dentro del área de la investigación, pero sobre todo por su amistad.**

**Asimismo agradezco de manera especial a la M. C. Miriam Cortez Noh, por sus consejos y enseñanza, tanto profesional como moral.**

**De manera muy especial agradezco a la Dra. Ruth Pedroza Islas por creer en mí, por sus consejos, por la oportunidad de trabajar en su equipo, por permitirme conocer a la gran profesional y mejor persona que es. Por brindarme su amistad y hacer de mi estancia en su laboratorio una de las mejores experiencias de mi vida.**

**A los que durante este tiempo brindaron sus conocimientos para enriquecer este trabajo M. C. Dora Luz Villagomez Zavala, M. C. Aracely Vera Guzmán, Dr. Alberto Quezada Gallo, Dr. Rubén Moreno, Dr. Rodolfo Solano Gómez M. C. Aracely Zúñiga, M. C. Eduardo Arias, Dr. Rafael Pérez Pacheco.**

**Al comité revisor Dra. Mirna Patricia Santiago Gómez, Dr. Felipe de Jesús Cano Barrita, Dr. Pedro Montes García por el tiempo dedicado a la evaluación de este trabajo.**

**A los compañeros que participaron en alguna de las etapas de este proyecto, David Toledo, Gladis Cruz, Martin Barragán, Edson Hernández, Ing. Ricardo Reyes Estévez.**

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado durante la realización de este trabajo.**

**Al CIIDIR-IPN-Oaxaca, por las facilidades brindadas en la obtención de recursos económicos mediante el sistema PIFI.**

**A la Universidad Iberoamericana campus Santa Fe, por todas las facilidades prestadas en la realización de este proyecto en el laboratorio de biopolímeros del departamento de Ingeniería de alimentos bajo el mando de la Dra. Ruth Pedroza.**

**A la unidad de investigación CICATA-IPN-Legaria por permitir realizar pruebas en el microscopio electrónico de barrido del laboratorio de pruebas físicas, bajo el mando del Dr. Eduardo San Martín Martínez.**

**A mis compañeros y amigos. Alejandra Rojas Olivos, Isidro Pacheco Reyes, Oscar Mijangos Ricardez, Ana María Pineda Reyes, Isela Coral de la Rosa Sarmiento, Elena García.**

**Extiendo mi agradecimiento a mis amigos de toda la vida Víctor González, Juan Carlos Guzmán, Juan Manuel Ramírez, Roberto Jiménez, Rubén Pacheco, Orlando Jiménez, Iginio Mendoza, Matilde Villa, Judith Rivera, Iris Zuen Hernández, Julio Reyes, Ricardo Fuentes, Juan Carlos Rosas, Víctor Miguel González, Filberto Salazar Ramírez.**

## CONTENIDO

	<b>Pagina</b>
<b>Resumen</b>	13
<b>Abstract</b>	15
<b>INTRODUCCIÓN</b>	17
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	19
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	20
<b>OBJETIVOS</b>	21
<b>HIPOTESIS</b>	22
<b>1. MARCO TEORICO</b>	23
1.1. Especies vegetales	23
1.1.1. Especies cultivadas y silvestres	24
1.1.2. Plantas medicinales	24
1.2. Principios activos de especies vegetales	25
1.2.1. Extracción	26
1.2.1.1. Fenómenos que se llevan a cabo en la extracción	27
1.2.1.2. Variables del proceso extractivo	27
1.2.1.3. Principales sustancias contenidas en los extractos vegetales	27
1.3. Composición química de los extractos y aceites esenciales de plantas	28
1.4. Microbiología de los alimentos	29
1.4.1. Microorganismos patógenos en los alimentos	29
1.5. Quesillo (Queso Oaxaca)	30
1.5.1. Elaboración del quesillo	31
1.6. Películas comestibles	32
<b>2. ANTECEDENTES</b>	33

2.1. Modo de acción de los antimicrobianos vegetales	38
2.1.1. Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana	39
2.1.1.1. Prueba Kick Bauer (Difusión en disco)	40
2.1.1.1.1. Fundamentos de la prueba	40
2.2. Efecto sinérgico de los agentes antimicrobianos	41
2.2.1. Películas comestibles	42
<b>3. METODOLOGIA</b>	<b>44</b>
3.1. Obtención y evaluación microbiológica de extractos vegetales	44
3.1.1 Materia prima	44
3.1.2 Descripción de los procedimientos	44
3.1.3 Extracción de los principios activos	44
a) Extracción por solventes (Mezcla hidroalcohólica)	
b) Hidrodestilación	
3.2. Evaluación microbiológica	45
3.2.1. Evaluación microbiológica de los extractos vegetales extraídos	45
3.2.2. Evaluación microbiológica de las películas emulsionadas	47
3.2.3. Evaluación microbiológica del queso con recubrimiento emulsionado	47
3.3. Elaboración y caracterización de películas comestibles emulsionadas	48
3.3.1. Estabilidad de las emulsiones	48
3.3.2. Formación de las películas	49
3.3.3. Medición de ángulo de contacto	50

3.3.4. Determinación de color	50
3.3.5. Propiedades mecánicas	51
3.3.6. Determinación de permeabilidad al agua	51
3.3.7. Caracterización morfológica de las películas	52
3.4. Diseño experimental	53
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>55</b>
4.1. Selección de plantas con potencial antimicrobiano	55
4.1.1. <i>Walteria indica</i> L. (Sterculiaceae)	55
4.1.2. <i>Tecoma stans</i> (Bignoniaceae)	56
4.1.3. <i>Oenothera rosea</i> (Onagraceae)	56
4.1.4. <i>Clinopodium laevigatum</i> (Lamiaceae)	56
4.1.5. <i>Litsea glaucescens</i> (Lauraceae)	57
4.1.6. <i>Verbascum gnaphalium</i> (Escrophularaceae)	57
4.1.7. <i>Pimpinella anisum</i> (Umbelliferiaceae)	57
4.1.8. <i>Persea americana</i> (Lamiaceae)	58
4.1.9. <i>Salvia elegans</i> (Lamiaceae)	58
4.1.10. <i>Janiperus communis</i> ( Cupresaceae)	58
4.2. Humedad de las plantas a extraer	59
4.3. Rendimiento de las extracciones	59
4.4. Evaluación microbiológica de extractos obtenidos	60
4.5. Películas emulsionadas	64
4.6. Tamaño de partícula	65

4.7.	Formación de las películas	66
4.8.	Humedad de las películas emulsionadas	70
4.9.	Determinación de color	71
4.10.	Hidrofobicidad de películas emulsionadas	72
4.11.	Propiedades mecánicas	72
4.12.	Permeabilidad al vapor de agua de las películas elaboradas	73
4.13.	Morfología de películas emulsionadas	74
4.14.	Evaluación microbiológica de las películas emulsionadas	77
4.15.	Evaluación microbiológica del queso con recubrimiento emulsionado	78
	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>79</b>
	<b>REFERENCIAS</b>	<b>81</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>88</b>

## INDICE DE TABLAS

	<b>Pag.</b>
<b>Tabla 1.</b> Familias representativas de plantas alimenticias	23
<b>Tabla 2.</b> Métodos de extracción de especies vegetales	28
<b>Tabla 3.</b> Actividad antimicrobiana de especies vegetales	36
<b>Tabla 4.</b> Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana	39
<b>Tabla 5.</b> Selección del método de extracción	45
<b>Tabla 6.</b> Nomenclatura del diseño experimental de la evaluación microbiológica de extractos vegetales	49
<b>Tabla 7.</b> Diseño experimental para los extractos etanolicos	53
<b>Tabla 8.</b> Diseño experimental para los aceites esenciales	53
<b>Tabla 9.</b> Nomenclatura del diseño experimental sección evaluación microbiológica de películas emulsionadas	54
<b>Tabla 10.</b> Diseño experimental para la evaluación microbiológica de las películas comestibles	54
<b>Tabla 11.</b> Porcentaje de humedad de las especies vegetales seleccionadas	59
<b>Tabla 12.</b> Rendimientos de las extracciones por ambos métodos	60
<b>Tabla 13.</b> Diámetros de inhibición mostrados por los extractos	62

etanolicos sobre microorganismos patógenos evaluados

<b>Tabla 14.</b> Diámetros de inhibición de los aceites esenciales sobre los microorganismos patógenos evaluados	63
<b>Tabla 15.</b> Concentración mínima inhibitoria de los extractos etanolicos y aceites esenciales sobre microorganismos patógenos evaluados	64
<b>Tabla 16.</b> Índices de color de las películas con y sin emulsionar	70
<b>Tabla 17.</b> Propiedades mecánicas que determinan la viabilidad de las películas emulsionadas	72
<b>Tabla 18.</b> Permeabilidad de las películas de caseinato y alginato	73
<b>Tabla 19.</b> Evaluación microbiológica de películas	76
<b>Tabla 20.</b> Evaluación microbiológica del queso con cubierta emulsionada	79

## INDICE DE FIGURAS

	<b>Pag.</b>
<b>Fig. 1.</b> Estructuras químicas de los principales componentes de los aceites esenciales	29
<b>Fig. 2.</b> Diagrama de flujo de la elaboración del quesillo	32
<b>Fig. 3.</b> Sitios de acción de los antimicrobianos en la célula bacteriana	39
<b>Fig. 4.</b> Zona de inhibición por el método de difusión en placa	42
<b>Fig. 5.</b> Ubicación de los filtros impregnados con antimicrobianos	47
<b>Fig. 6.</b> Grafico para la interpretación de los resultados microbiológicos	48
<b>Fig. 7.</b> Formación de películas emulsionadas	50
<b>Fig. 8.</b> Microscopio de barrido electrónico	53
<b>Fig. 9.</b> Halos de inhibición de los extractos evaluados	66
<b>Fig. 10.</b> Tensiones superficiales de las soluciones bases	67
<b>Fig.11.</b> Formación de la emulsión	67
<b>Fig. 12.</b> Tamaño de partícula representativa de la emulsión de alginato	68
<b>Fig. 13.</b> Tamaño de partícula representativa de la emulsión de caseinato	69

<b>Fig. 14.</b> Distribucion del aceite esencial en a) emulsión b) película de alginato	70
<b>Fig. 15.</b> Distribución del aceite esencial en a) emulsión b) película de Caseínato	70
<b>Fig. 16.</b> Humedad de las películas después de estabilizarlas a (54-60)%	71
<b>Fig. 17.</b> Pruebas mecánicas a películas	72
<b>Fig. 18.</b> Microestructuras película alginato	75
<b>Fig. 19.</b> Microestructuras película Caseínato	76
<b>Fig. 20.</b> Quesillo con cubierta de película comestible emulsionada	78

## Resumen

La evolución de la industria de los alimentos y el incremento de las enfermedades crónicas degenerativas, han inducido a la industria a la búsqueda de alimentos mínimamente procesados y conservados por medios naturales. Este trabajo explora el uso de aceites esenciales obtenido por hidrodestilación convencional y extractos vegetales extraídos por solvente hidroalcohólico, como inhibidores microbianos en el queso.

Las especies vegetales probadas son usadas como medicina y/o alimento en tres regiones del estado de Oaxaca, México, la sierra mixe, la cañada y el istmo de Tehuantepec. El laurel mexicano (*Litsea glaucescens*), aguacatillo (*Persea americana*), hierba del monte (*Walteria indica*), tronadora (*Tecoma stans*), anís (*Pimpinella anisum*), gordolobo (*Verbascum phlomoides*), hierba del cáncer (*Oenothera rosea*), salvia (*Salvia elegans*), hierba del borracho (*Clinopodium laevigatum*), enebro (*Janiperus communis*).

La actividad antimicrobiana se realizó sobre tres bacterias patógenas indicadores de calidad en alimentos, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella Typhi*. Los extractos que presentaron mayor actividad fueron los aceites esenciales de laurel (*Litsea glaucescens*) y aguacatillo (*Persea americana*) mostraron inhibición media en concentración de (0.03 g/mL) y alta en (0.9 g/mL). Sin embargo para su aplicación en queso fue necesario incorporarlo a través de una película comestible a base de alginato y caseinato de sodio. La interacción de los extractos con los hidrocoloides repercute en inhibición microbiana. El aceite esencial de aguacatillo disminuye su eficacia y el laurel al contrario se ve beneficiada por esta interacción, es decir existe un sinergismo que se refleja en la evaluación microbiológica lo cual hace un factor de decisión el tipo de hidrocoloide seleccionado para la aplicación de los extractos.

El uso de extractos vegetales como inhibidores del desarrollo de microorganismos patógenos o degenerativos en conjunción con las películas comestibles son una gran alternativa para la conservación de los alimentos.

**Palabras clave:** Plantas medicinales, extractos etanólicos, aceites esenciales, películas comestibles, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella thypi*.

## Abstract

The evolution of the food industry and the increase in chronic degenerative diseases, has led the industry in search of minimally processed foods and preserved by natural means. This paper explores the use of essential oils obtained by conventional hydrodistillation and solvent extracted vegetable extracts hidroalcoholic as microbial inhibitors in the cheese.

Tested plant species are used as medicine and / or food in three regions of the state of Oaxaca, Mexico, the Sierra Mixe, Glen and the Isthmus of Tehuantepec. The Mexican laurel (*Litsea glaucescens*), aguacatillo (*Persea americana*), mountain grass (*Walterio indica*), Thunderstrike (*Tecoma stans*), anise (*Pimpinella anisum*), mullein (*Verbascum phlomoides*), cancer herb (*Oenothera rosea*), sage (*Salvia elegans*), grass drunk (*Clinopodium laevigatum*), juniper (*Janiperus communis*).

The antimicrobial activity was conducted on three pathogenic bacteria in food quality indicators, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella Typhi*. The extracts showed greater activity were the essential oils of laurel (*Litsea glaucescens*) and aguacatillo (*Persea americana*) showed mean inhibition concentration (0.03 g / mL) and high (0.9 g / mL). However for use in cheese was necessary to insert through an edible film based on alginate and sodium caseinate. The interaction of the extracts with the hydrocolloid affects microbial inhibition. Aguacatillo essential oil reduces its effectiveness and the laurel on the contrary it is benefiting from this interaction, there is a synergy that is reflected in the microbiological evaluation factor making a decision on the type of hydrocolloid selected for the application of extracts. The use of plant extracts to inhibit the development of pathogens or degenerative in conjunction with edible films are a great alternative for food storage.

**Keywords:** Medicinal plants, ethanol extract, essential oils, edible films, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella thypi*.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido la base de la alimentación desde el inicio de los tiempos, eran utilizados como alimento o medio de conservación, debido a que están constituidos de una gran cantidad de compuestos de importancia para la vida. Sin embargo en los últimos años se ha recurrido al uso de extractos y aceites esenciales de vegetales como antimicrobianos en la industria alimentaria, además del uso de películas comestibles y empaques biodegradables con la finalidad de proteger a su vez la ecología y la conservación de los recursos naturales, comúnmente la conservación de los alimentos está basada en aditivos sintéticos que pueden causar problemas en la salud de los consumidores además, la mayoría de los empaques utilizados son derivados del petróleo, estos no son degradables. Actualmente la tendencia en la conservación de alimentos va hacia lo natural o mínimamente procesados tratando de tener un menor impacto ambiental. Las plantas usadas como condimentos ó medicinales tienen la característica de ser aromáticas en su mayoría, debido a sus metabolitos secundarios que constituyen sus extractos y aceites esenciales, principalmente son terpenos, alcoholes y aldehídos, estos le confieren la propiedad antimicrobiana.

Este estudio evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos y aceites esenciales en medios de cultivos selectivos, posteriormente el extracto con mayor actividad antimicrobiana se evaluó a través de una película comestible en quesillo (queso Oaxaca). Los recubrimientos son de gran importancia en la industria de los alimentos, debido a que brindan protección contra la oxidación y la acción microbiana. En su mayoría son películas plásticas de origen sintético lo que ha originado serios problemas ecológicos ya que no son degradables; las obtenidas de fuentes naturales crean conciencia ambiental porque son compatibles con el entorno, debido a que aprovecha los recursos de origen natural. Su uso ofrece ventajas sobre materiales sintéticos, porque permite una mejor interacción con el

alimento, prolongan la vida de anaquel e inhiben el desarrollo de patógenos, a causa de que retrasan su fase de extensión; todas estas características permiten su uso en la mayoría de los alimentos (Tharanthan, 2003). Por otra parte el uso de antimicrobianos adheridos a las películas permite que sean liberados en la superficie del alimento disminuyendo la concentración, tienen la capacidad de mantener aromas, ya que funcionan como barrera de oxígeno y humedad, mantienen íntegra la estructura permitiendo al alimento conservar sus propiedades organolépticas por mayor tiempo y da estabilidad respecto a su calidad nutricional (Krochta et al., 2005).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En la actualidad existe un uso desmesurado de aditivos sintéticos, si bien logran prolongar la vida útil de los alimentos, también pueden tener efecto nocivo en los consumidores. En los últimos años se ha estudiado el uso de los extractos naturales vegetales como aditivos en la industria alimentaria (Canillac and Mourey, 2003), ya que tienen una actividad antimicrobiana comprobada (Matasyoh et al; 2008).

En el estado de Oaxaca y en particular la región de los valles centrales se distingue por la elaboración de productos lácteos, como quesos, requesón, crema agria y el tradicional quesillo; que por su elevada susceptibilidad a la acción microbiana tiene una vida útil muy corta. Se desea encontrar un extracto natural que evite el crecimiento de microorganismos patógenos en él quesillo para aumentar su vida de anaquel y mantener el producto en condiciones óptimas de consumo, sin poner en riesgo la salud de los consumidores.

## JUSTIFICACIÓN

En la actualidad la mayoría de los consumidores están convencidos de que los mejores y más sanos alimentos, después de los frescos, son los mínimamente procesados que no tienen conservadores, colorantes artificiales u otras sustancias dañinas para la salud. Por esto, la industria alimentaria se ve en la necesidad de orientar sus esfuerzos hacia la investigación de nuevas formas de conservación.

El uso de agentes antimicrobianos en la industria de los alimentos es una práctica muy común para extender la vida útil de múltiples productos, actúan inhibiendo el crecimiento de los microorganismos, patógenos y deteriorativos, se usan principalmente en alimentos susceptibles a la contaminación microbiana (Matasyoh et al; 2008).

El estudio de alternativas de nuevos aditivos derivados de plantas para uso en productos lácteos permitiría a los productores de la región prolongar la vida útil de sus productos en condiciones inocuas, asimismo conservar la calidad original del alimento. Además abre la posibilidad de extender su mercado de distribución a todo el país y el extranjero, fomentando el crecimiento de la actividad económica en la región, y promover el consumo de productos conservados de manera natural.

### **OBJETIVO GENERAL:**

Evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial y extractos de especies vegetales en Quesillo, mediante la aplicación en una película comestible.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS:**

1. Seleccionar las especies vegetales utilizadas como condimentos o hierbas medicinales que crecen en Oaxaca.
2. Extraer los principios activos de las especies vegetales seleccionadas por hidrodestilación y con solventes.
3. Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales y determinar la concentración mínima inhibitoria.
4. Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto seleccionado, mediante la aplicación en una película comestible en quesillo.

## **HIPOTESIS**

La aplicación de extractos vegetales utilizando películas comestibles como vehículo, prolongan la vida útil del queso, conservando sus características sensoriales.

.

## CAPITULO I

### 1. MARCO TEORICO

#### 1.1. Especies Vegetales

A nivel mundial más del 90% de la alimentación humana vegetal proviene de 103 especies cultivadas, si bien el número de especies comestibles a nivel mundial es de 70 000; Sin embargo, el incremento de los alimentos procesados domina la dieta humana, esto ha incrementado la vulnerabilidad de la agricultura y empobrecido la calidad de vida de los consumidores. Actualmente, las plantas domesticadas proveen la mayor parte de productos para la alimentación humana. Las plantas sin domesticar proveen la mayor diversidad y juegan un papel importante en la subsistencia, especialmente de las culturas indígenas y de la población rural (Cueva and Eynden, 2008).

Se depende de un número limitado de especies cultivadas, aunque existe un rango mucho mayor de especies silvestres para el consumo humano. En la tabla 1, Se muestran las diez familias con mayor número de especies alimenticias, entre ellas la Fabaceae, Aracaceae, Melastomataceae, y Solanaceae que son las más dominantes en la flora.

**Tabla 1. Familias representativas de plantas alimenticias (Cueva, et al., 2008)**

Familias Representativas	Número de Especies alimenticias
Fabaceae	140
Aracaceae	70
Melatomataceae	61
Solanaceae	60
Sapotaceae	53
Rubiaceae	52

Rosaceae	49
Ericaceae	48
Myrtaceae	46
Moraceae	40
Asteraceae	24
Araceae	27

El 80% de las especies se consumen crudas y el 13% son preparadas en bebidas como jugo, té o en la preparación de dulces o conservas (frutas en almíbar, jaleas). El 5% se usan en guisados como sopas, estofados y ensaladas.

### **1.1.1 Especies cultivadas y silvestres**

Muchas especies como el maíz fueron introducidos de Mesoamérica, probablemente 5000 a.C. Estas especies, sin embargo, no dominaban la dieta en ese tiempo, sino que complementaban el consumo de plantas silvestres, en combinación con alimentos de origen animal.

En ocasiones, los mismos cultivos tradicionales se han llevado a otros continentes y se han desarrollado en cultivos fructíferos. Algunas de estas especies domesticadas se caracterizan por tener una gran diversidad intraespecífica, ya que han sido parte de los sistemas agrícolas durante siglos (Cueva and Eynden, 2008).

### **1.1.2 Plantas medicinales**

Las plantas medicinales, son usadas como materia prima en la obtención de extractos, para el aislamiento de sustancias naturales puras o extractos purificados y estandarizados que permiten una mejor caracterización analítica y presentan mejores requisitos de calidad, seguridad y eficacia exigidos para cualquier medicamento moderno sea natural o sintético.

El interés en las plantas como posible antimicrobiano, surge de la resistencia y escasa actividad de algunos antibióticos, recientemente se ha incrementado la búsqueda de vegetales con esta propiedad principalmente en la medicina popular. Desde los años 80's a la fecha, han sido realizados múltiples trabajos encaminados hacia la evaluación antimicrobiana en todo el mundo y le han dado las bases científicas al uso de plantas en procesos infecciosos.

Las plantas en algunos casos producen sustancias con carácter de antibiótico como respuesta a una infección, es decir forman parte de su mecanismo de defensa y los conocemos comúnmente como metabolitos secundarios, entre familias botánicas comparten muchas características tanto físicas como químicas, por lo tanto podemos considerarlo un buen parámetro para la selección de especies vegetales con posible actividad antimicrobiana.

En todo el mundo existen poblaciones pequeñas con gran riqueza natural (tanto vegetal como animal), que hacen uso de las plantas para tratar un sinnúmero de padecimientos, principalmente por la lejanía y dificultad para la llegada de servicios médicos al lugar y por tradición, han demostrado la eficacia de estos métodos tradicionales, pero aun se desconoce con exactitud su mecanismo de acción, lo que ya se ha podido identificar es que las estructuras químicas de los metabolitos secundarios difieren en su totalidad a la de los antibióticos; están conformados principalmente por terpenos, aldehídos y Alcoholes (Camacho, 2003).

## **1.2 Principios activos de especies vegetales**

Los aceites esenciales se caracterizan por ser volátiles, fuerte olor y color casi transparente. Por lo general se obtienen por hidrodestilación y tienen propiedades antisépticas, fungicida y virucida; hasta el día de hoy, se desconoce sus mecanismos de reacción, a excepción de sus mecanismos de acción que han sido determinados, en particular como antimicrobianos. Se tienen muchos avances en el desarrollo de métodos de extracción de aceites esenciales con la finalidad de

mejorar la calidad de los extractos y optimizar los tiempos de extracción (Masotti et al; 2003 and Angioni et al., 2006).

La composición química de una planta medicinal varía de acuerdo a la forma y tiempo de colecta, las condiciones climáticas, el suelo y las distintas técnicas de cultivo. Cuando se trabaja con material colectado de fuente natural, se pueden presentar variabilidades en cuanto a la concentración de principios activos, la búsqueda de especies vegetales redundante en la posibilidad de falsificación, y destrucción innecesaria de plantas con el riesgo de ocasionar la extinción de muchas especies.

### **1.2.1 Extracción**

La extracción sólido-líquido consiste en el contacto íntimo entre el vegetal y un disolvente orgánico volátil, permitiendo la disolución de la esencia en el disolvente. El extracto es evaporado al vacío para recuperar el disolvente y obtener el *concreto*, el cual es una mezcla de compuestos volátiles y no volátiles (ceras o resinas) solubles en el disolvente usado; mediante una serie de filtraciones sucesivas el líquido separado es evaporado al vacío para obtener el absoluto, que está conformado del aceite esencial enriquecido en terpenos oxigenados solubles en el etanol u otros disolventes. Cuando la materia vegetal y el solvente entran en contacto, este penetra y elimina el aire contenido en el citoplasma y se da inicio la extracción; Las moléculas celulares se adhieren a las del solvente, en función de la polaridad de las sustancias a extraer. En el caso de productos naturales en particular el área de alimentos la selección del solvente está en función de su toxicidad.

El alcohol etílico y sus mezclas con agua son excelentes para la obtención de extractos y tinturas. Se utilizan 70:30 y 80:20; Para la extracción de partes leñosas de la planta, raíces y semillas, para las hojas o partes aéreas verdes la proporción es 1:1, evita la extracción de la clorofila y sustancias polimerizadas o resinoides, estas complican la etapa de purificación (Sharapin, 2000).

#### **1.2.1.1. Fenómenos que se llevan a cabo en la extracción**

- Penetración del solvente
- Disolución de las sustancias extraíbles
- Difusión de las sustancias fuera de la célula

#### **1.2.1.2. Variables del proceso extractivo**

- Estado de fragmentación de la muestra
- Agitación
- Temperatura
- pH
- Naturaleza del solvente
- Tiempo de extracción

El movimiento del líquido desplaza el equilibrio en el sentido de la saturación del solvente, aumentando la eficiencia, y con el incremento de la temperatura, se facilita la extracción de las sustancias, es decir contribuye al desplazamiento de la constante de equilibrio (Sharapin, 2000).

#### **1.2.1.3. Principales sustancias contenidas en los extractos vegetales**

- Alcaloides
- Flavonoides
- Glicosidos
- Terpenos

A continuación se muestra en la tabla 2, los métodos de extracción de diversas especies vegetales aromáticas, así como la parte utilizada.

**Tabla 2. Métodos de extracción de especies vegetales (Cueva and Eynden, 2008)**

<b>Especies Vegetales</b>	<b>Parte de la planta</b>	<b>Método de extracción</b>
Anís ( <i>Illicium verum</i> )	Fruto	Hidrodestilación
Cardamomo ( <i>Elettaria cardamomum</i> )	Fruto	Hidrodestilación
Cebolla ( <i>Cinnamomum zeylanicum</i> )	Hojas	Hidrodestilación
Eucalipto ( <i>Eucalyptus globulus</i> )	Hojas	Hidrodestilación
Ginger ( <i>Zinger officinalis</i> )	Raíz	Hidrodestilación
Tomillo ( <i>Thymus vulgaris</i> )	Hierba	Hidrodestilación
Pino ( <i>Pinus sylvestri</i> )	Coníferas	Hidrodestilación
Pimienta negra ( <i>Piper nigrum</i> )	Fruto	Hidrodestilación
Jazmín ( <i>Jasminum officinalis</i> )	Flor	Extracción con disolventes
Mejorana ( <i>Thymus masticina</i> )	Hierba	Hidrodestilación
Cilantro ( <i>Coriandrum sativum</i> )	Fruto	Hidrodestilación
Salvia ( <i>Salvia officinalis</i> )	Hierba	Hidrodestilación
Cedro ( <i>Cedrus atlántica</i> )	Madera	Hidrodestilación

### 1.3 Composición química de los extractos y aceites esenciales de plantas

Los aceites esenciales son complejas mezclas naturales que puede contener alrededor de 20-60 componentes en diferentes concentraciones. Se caracterizan por dos o tres componentes en gran concentración del (20 al 70%) y otros presentes en trazas, por ejemplo el orégano (*Origanum compactum*) tiene como principales componentes carvacrol en un (30%) y al timol (27%), en el caso del Cilantro (*Coriandrum sativum*) el linalol presente en un (68%), la variedad y concentración de compuestos varía según la especie. Estos componentes determinan las propiedades biológicas de los principales aceites (Matasyoh et al., 2008).

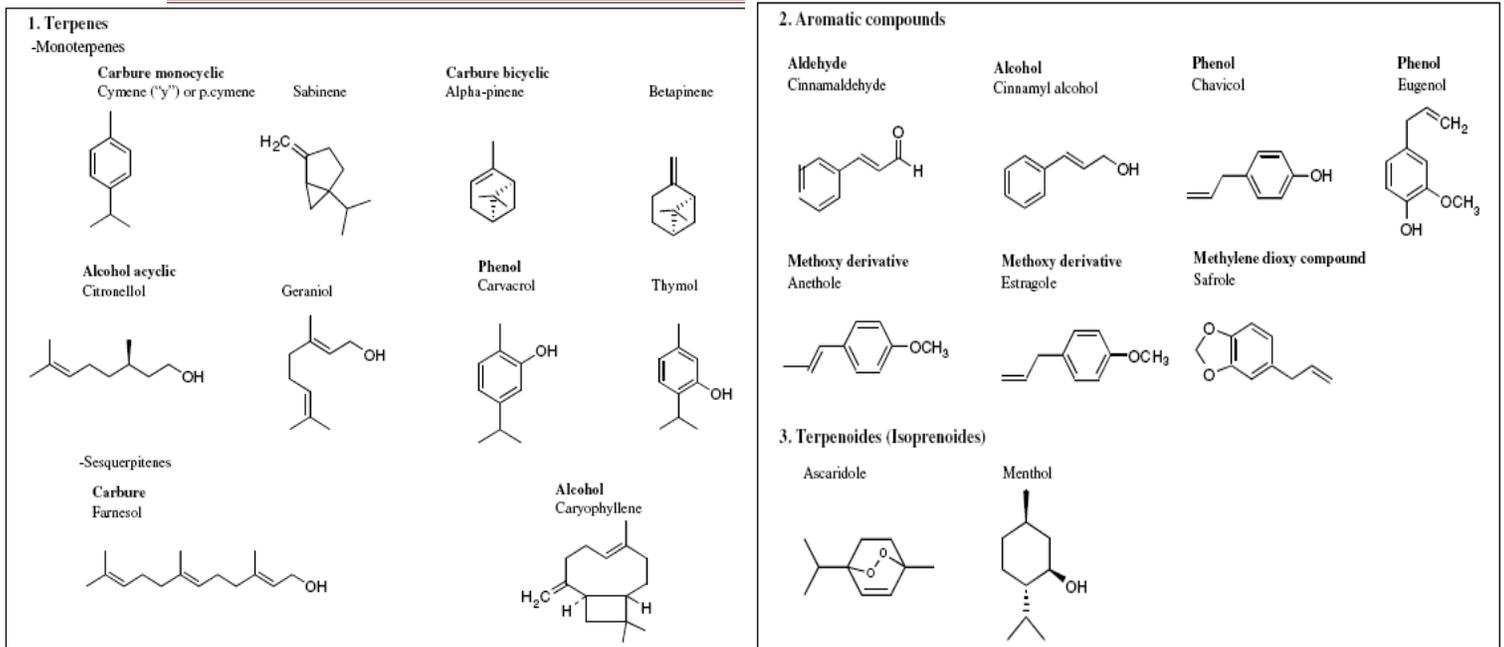


Fig 1. Estructuras químicas de los componentes de los aceites esenciales (Bakkali, 2008).

## 1.4 Microbiología de los alimentos

La microbiología de los alimentos trata todos los procesos donde los microorganismos influyen en las características de los productos alimenticios ya sean destinados al consumo humano o animal. Se distinguen cuatro aspectos importantes en la microbiología de alimentos; los microorganismos como productores de alimentos, factores que afectan el crecimiento microbiano, como agentes deteriorativos y como agentes patógenos transmitidos vía los alimentos siendo estos últimos los que trataremos con mayor énfasis.

Los alimentos deteriorados son aquellos que han sido dañados por agentes químicos, físicos y por supuesto acción microbiana, de tal manera que son inaceptables para el consumo humano. Los agentes causantes pueden ser bacterias, hongos y levaduras (Hayes et al., 1993).

### 1.4.1 Microorganismos patógenos en los alimentos

La mayoría de las enfermedades que afectan el tracto intestinal, son originadas por el consumo de alimentos contaminados, con o sin la presencia de microorganismos. Las toxiinfecciones alimentarias se asocian generalmente con

determinados alimentos, si bien es difícil identificar el alimento responsable, dado que son consumidos en su totalidad antes de que puedan ser analizados, existen pruebas que indican que los alimentos implicados en las toxiinfecciones en general son de origen animal. Casi el 75% de los casos están relacionados con carnes y lácteos.

### **1.5 Quesillo (Queso Oaxaca)**

Debido a que la evaluación de los extractos vegetales se realizara en el quesoillo, abordaremos a continuación los puntos a considerar para obtener un producto con las características y propiedades que determinan la calidad (Hayes et al., 1993). El queso Oaxaca (Quesillo) pertenece al grupo de los quesos de pasta hilada debido a que durante su elaboración la cuajada, previamente acidificada, se somete a un amasado con agua caliente que permite plastificarla y estirarla; de tal forma que pueda formar bandas, a su vez constituidas por estructuras un tanto alineadas que se pueden separar como hilos (Villegas, 1993).

Es un queso fresco, cuya vida de anaquel puede situarse hasta en unas 2 semanas, dependiendo del empaque y las condiciones de conservación en refrigeración, su contenido de agua es relativamente elevado, cercano a 50% en peso. Un queso de alta calidad, además de ser sensorialmente atractivo, debe ser relativamente estable durante su conservación en cadena de frío; de tal manera que no debe desarrollar defectos como la pérdida de textura o de forma. La textura característica de los quesos de pasta hilada puede explicarse, por el arreglo estructural que las moléculas de caseína ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ , que forman parte de las micelas descalcificadas) sufren al someter la pasta a calentamiento y trabajo mecánico; se desarrolla durante el amasado, y el incremento de la temperatura a causa del agua caliente, provocando la desnaturalización de las moléculas de caseína, alterando su conformación  $\beta$ -placa y  $\alpha$ -hélice. La acción mecánica, y el estiramiento al que se somete la pasta en un sentido espacial, orientan y alinean a las proteínas, como si fueran agregados de hilos, el proceso de elaboración se representa en la Fig. 2.

### 1.5.1 Elaboración del quesoillo

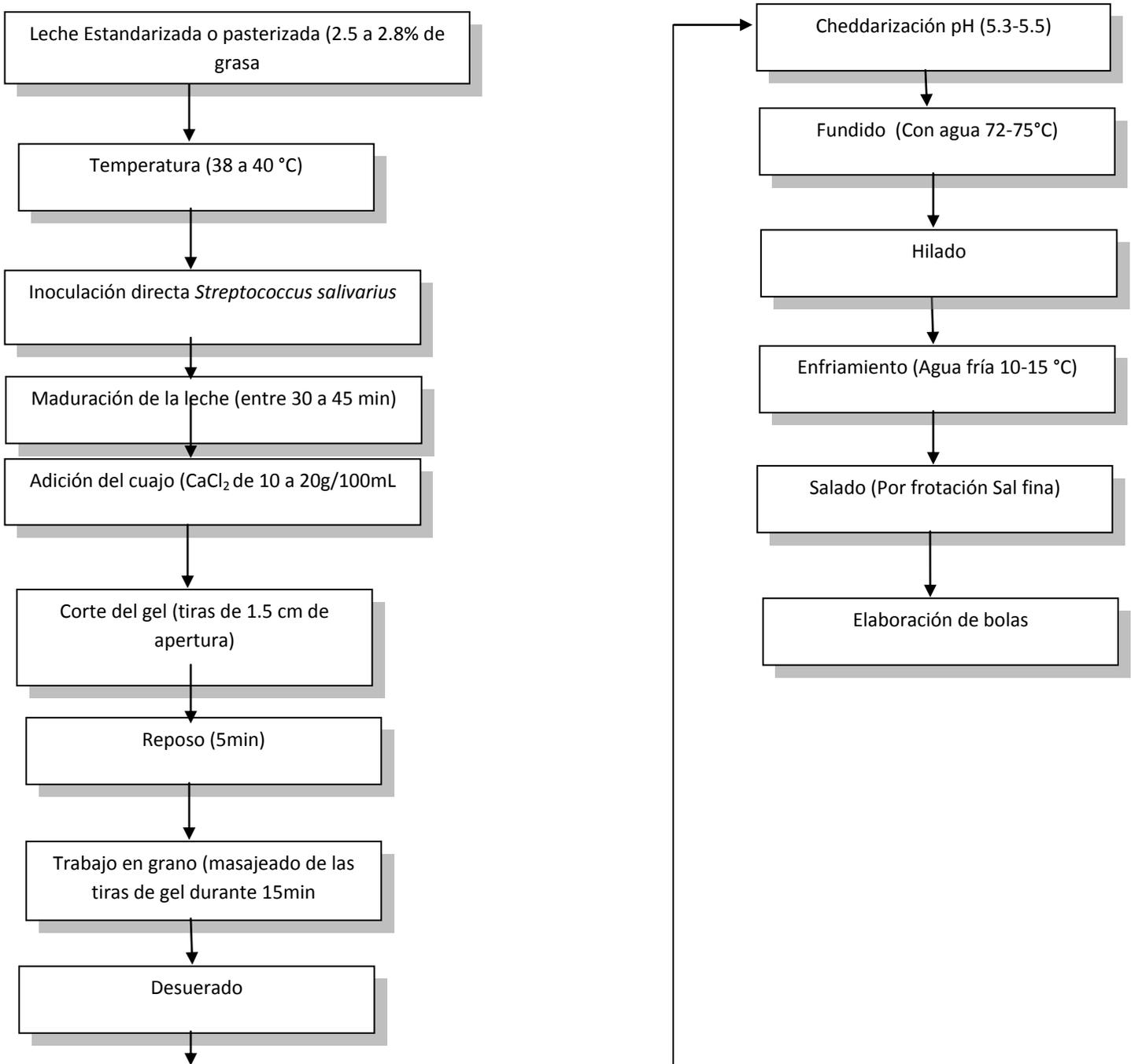


Fig. 2. Diagrama de flujo de la elaboración del quesoillo (Villegas, 1993)

## 1.6 Películas comestibles

El envasado es una disciplina importante en la industria de los alimentos, ya que brinda protección contra la oxidación y la acción microbiana. En su mayoría los envases utilizados en alimentos son sintéticos lo que ha originado serios problemas ecológicos, por no ser degradables. Las películas obtenidas de fuentes naturales crean conciencia ambiental porque son compatibles con el entorno, en vista de su efecto benéfico sobre el ambiente, han recibido mayor atención de la industria como una alternativa de envases para alimentos. Para producir películas comestibles se han utilizados polisacáridos, proteínas y lípidos (Krochta, 2005).

El uso de las películas comestibles como antimicrobianos, al igual que los extractos y aceites esenciales, han aumentado recientemente debido al consumo de productos frescos, los cuales se han visto involucrados en brotes ocasionales de toxiinfecciones. Las películas y los recubrimientos biodegradables en los alimentos han tomado interés, debido a que son portadores de una gran gama de aditivos alimentarios, incluidos los antimicrobianos. Una de las propiedades de las películas es aportar estabilidad a los lípidos contenidos en los alimentos, esto impide que exista pérdida de sus características sensoriales y nutricionales.

El uso de películas como revestimientos ofrece protección a los alimentos y tiene ventajas sobre materiales sintéticos. Los estudios relativos a las películas comestibles van en aumento debido a que incrementan la vida útil de los alimentos impidiendo el desarrollo de patógenos (Tharanthan, 2003). Por otra parte, el uso de antimicrobianos adheridos a las películas permite que sean liberados en la superficie del alimento, por lo que la concentración de los mismos sería menor. A su vez tienen la capacidad de mantener aromas, ya que funcionan como barrera de oxígeno y humedad, permitiendo al alimento conservar sus propiedades organolépticas por mayor tiempo y estabilidad respecto a su calidad nutricional (Krochta, 2005). Impiden el crecimiento de patógenos retrasando su fase de extensión.

## CAPITULO II

### 2. ANTECEDENTES

La industria de los alimentos, ha reducido el nivel de procesamiento, marcando la tendencia hacia el consumo de productos naturales, disminuyendo el uso de aditivos sintéticos, motivo por el cual en los últimos años ha aumentado considerablemente la investigación de las especies vegetales y su acción bactericida, no solo en el área de alimentos también en la agricultura donde el uso de plantas es pilar de la llamada agricultura orgánica, en el área de alimentos se han realizado múltiples trabajos encaminados al aprovechamiento de los vegetales como los realizados por Cowan, (1999), quien determinó que las plantas pueden resistir muchos ataques de parásitos utilizando varios mecanismos de defensa. Uno de estos y probablemente la más importante es la síntesis de sustancias químicas entre ellas flavonoides, terpenoides, alcaloides, saponinas esteroides, taninos, ácidos fenólicos, lactonas, quinonas y polifenoles. Razón por la cual muchas especies vegetales han sido estudiadas por su actividad antimicrobiana derivada de estas sustancias.

Yazaki (2006) asevera que las plantas actúan como conservadores de los alimentos al formar parte de los mismos. Las sustancias que forman parte de los metabolitos secundarios intervienen en la regulación de reacciones enzimáticas, la mayoría de las toxiinfecciones son causadas por microorganismos patógenos como las bacterias y hongos que son la principal causa de afectación en los humanos (Ebrahimi, 2008); es necesario desarrollar nuevos aditivos antimicrobianos, debido a que la mayoría de los utilizados en la industria son sintéticos; Pueden generar efecto toxicológico en los seres humanos. De acuerdo a Chopra, (2007) las plantas y hierbas medicinales pueden ser utilizadas por la actividad de sus moléculas. A su vez Nychas (2003), observó que los aceites esenciales y los extractos de diversas especies comestibles, plantas medicinales y condimentos han mostrado potencial inhibición sobre patógenos atribuida a sus constituyentes. Utilizar aceites esenciales y extractos naturales pueden ser

considerados como un factor intrínseco para aumentar la seguridad y la vida útil de los alimentos (Ebrahimi, 2008).

El aceite esencial del cilantro (*Coriandrum sativum*) ha demostrado tener actividad sobre microorganismos patógenos como *S. aureus*, *Bacillus spp.*, *E. coli*, *P. aeruginosae*, *S. Typhi*, etc. (Matasyoh et al., 2008), a diferencia del extracto obtenido por solventes como lo demostró Shan en el (2007) que probó el extracto metanólico del cilantro y no reporta actividad sobre bacterias.

Algunos trabajos reportan la sustancias responsables de dicha actividad antimicrobiana, la presencia de sulfuro de dialilo y disulfuro de dialilo en el ajo y orégano usado en la elaboración de chorizo reduce significativamente el crecimiento de bacterias aerobias (Yin et al., 2003), además el crecimiento de *Listeria Monocytogenes* en pollo es inhibido por la presencia del aceite esencial del clavo (Mytle et al., 2006), tres plantas tropicales (*Actinidia chinensis*, *Feijoa sellowiana*, *Aberia caffra*) han exhibido importante actividad antimicrobiana (Basile, 1997). El crecimiento de *Escherichia coli*, *Salmonella infantis* son inhibidas por el extracto de cebolla, por lo tanto queda demostrado la acción bactericida de los condimentos en los embutidos y platillos.

Las plantas con uso medicinal en enfermedades crónico degenerativas como el Cardo o alcachofa silvestre (*Cynara cardunculus L.*), usado en el tratamiento de la dispepsia y diabetes ha mostrado inhibición sobre bacterias patógenas (Kukic et al., 2008). Las investigaciones han demostrado la presencia de saponinas, terpenos lactonas, flavonas, esteroides como las sustancias responsables de actividad sobre microorganismos. El tomillo (*Thymus caramanicus*) cuyos principales compuestos de su aceite esencial son terpenos muestran actividad sobre bacterias patógenas gram positivas y negativas, lo que demuestra que las plantas son una fuente viable de principios activos naturales que exhiben una acción potencial sobre sistemas patógenos. En la tabla 4 se muestra una serie de estudios sobre la composición química de especies vegetales, utilizadas como condimentos o uso medicinal donde observamos que los componentes principales

son los terpenos como (el cimene, thymol, y carvacrol), aldehídos (Cinamaldehído) y alcoholes (cinamyl alcohol) igualmente se presenta la actividad antimicrobiana en microorganismos patógenos como el *Escherichia coli*, *Salmonella thypi*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringes*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocitogenes* etc., entre otros microorganismos que pueden afectar al queso.

**Tabla 3. Actividad antimicrobiana de especies vegetales**

<b>Especies Vegetales</b>	<b>Principios activos (%)</b>	<b>Método de extracción</b>	<b>Microorganismos sobre los que actúa</b>	<b>Autor</b>
<i>Picea excelsa</i>	B-Pineno (16.33), a-pineno (10.9), Limoneno (8.5)	Hidrodestilación	<i>L. monocytogenes</i>	Canillac et al.,2003
<i>Coriandrum sativum</i>	2E-Decenal (15.9), Decanal (14.3), 2E-Decen-1-ol (14.2), n-Decanol (13.6)	Hidrodestilación	<i>E. coli, S. typhi, S. Aureus, Bacillus spp., C. albicans</i>	Matasyoh et al., 2008.
<i>Satureja cuneifolia</i>	Carvacrol (44.99), p-Cimeno (21.61), Thymol (9.01)	Hidrodestilación	<i>E. coli, C. jejuni, S. sonei, S. aureus, L. monocytogenes, B. cereus.</i>	Oke et al., 2008.
<i>Thymus caramanicus</i>	Carvacrol (68.9), Thymol, pineno	Hidrodestilacion	<i>S. aureus, B. Subtilis, E. coli</i>	Nejad et al., 2008
<i>Artemisia judaica</i>	Piperetoni, Trans etilcinamato	Hidrodestilación	Hongos ( <i>Fusarium oxysporum, Rhizocotonia solani</i> )	Abdalgaleil et al., 2007
<i>Silene armeria L.</i>	Butano (39.2), Metilciclopropano (21.4), 2-Butano (17.9)	Hidrodestilación	Hongos ( <i>Fusarium oxysporum, Rhizocotonia solani,</i>	Bajpai et al., 2008

			<i>Sclerotinia sclerotiorum.</i>	
<i>Cinnamon</i>	Compuestos Azufrados	Solventes (mezcla hidroalcoholica)	<i>E. coli, S. aureus, C. albicans, Ps. Aeruginosa.</i>	Hili et al., 1996
<i>Annona muricata</i>	Compuestos acetogenicos (Dicloxacilina, Dimetil sulfoxido)	Presion	<i>S. aureus, S. mutans, C. albicans, S. mitis.</i>	Zepeda et al., 2006

## 2.1 Modo de acción de los antimicrobianos vegetales

El aumento del consumo de alimentos procesados implica un cambio de estilo de vida, los consumidores exigen cada vez más que los agentes antimicrobianos usados sean de origen natural, día con día se introducen al mercado alimentos con vida de anaquel más largas, sin embargo pese a los modernos sistemas de procesamiento y técnicas de conservación, la alteración de alimentos por microorganismos sigue siendo un problema no controlado del todo. El efecto de los antimicrobianos dentro de una célula se lleva a cabo en partes y/o funciones importantes para la sobrevivencia de la misma. Se puede llevar en la membrana celular o la pared celular, en la síntesis de proteínas, en su genética y en la síntesis de enzimas. Esto puede causar daños irreparables a la célula. A su vez los antimicrobianos tienen varios sitios de acción dentro de la célula, y según la concentración pueden causar inhibición o inactivación de los microorganismos Fig 3.

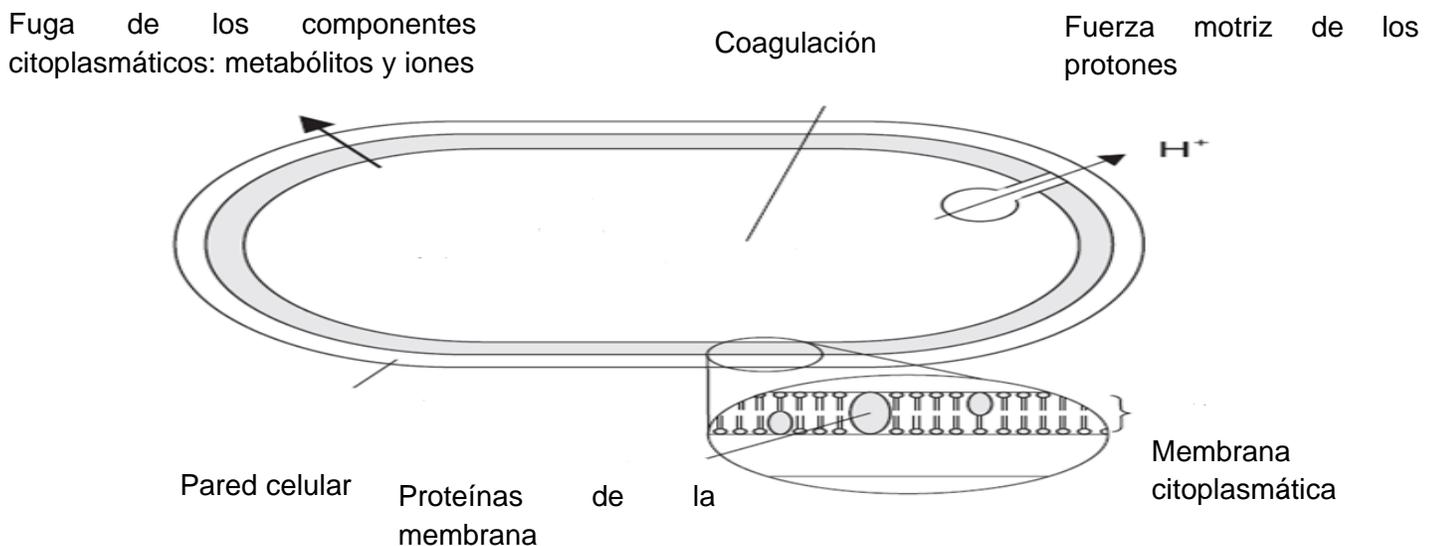


Fig. 3. Sitios de acción de los antimicrobianos en la célula bacteriana

Los aceites esenciales pueden interferir en la producción de energía y en la síntesis de componentes esenciales, la mayoría de los compuestos fenólicos

---

atravesan la membrana celular para interactuar con las enzimas y proteínas estructurales, afectando las actividades intracelulares. Según Juven et al. (1994) los antimicrobianos tienen efecto hasta una determinada concentración como se demostró al utilizar extractos de tomillo a diferentes concentraciones para tratar de inhibir la *Salmonella typhi*, y encontraron que había una concentración crítica donde el extracto tenía efecto, y a concentraciones menores no había presentado actividad. Se ha demostrado que las sustancias que constituyen los metabolitos secundarios sensibilizan la membrana celular, y saturan los sitios de importancia en el funcionamiento de la célula, intervienen en las reacciones enzimáticas y la generación de energía, provocando el colapso de la membrana celular. Se han aislado moléculas consideradas responsables de la inhibición sobre los microorganismos, pero se ha demostrado que en conjunto el efecto sinérgico de los metabolitos da mejores resultados.

### **2.1.1 Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana**

Existen diversos métodos que se utilizan para evaluar la efectividad de los agentes antimicrobianos, estos permiten medir la actividad sobre los microorganismos, sean de naturaleza sintética o natural. Sin embargo estos datos pueden no ser tan efectivos debido a que existen muchos factores que pueden interferir en la reacción que puede dar un microorganismo (T, pH, Aw, naturaleza del mismo, y los nutrientes disponibles). Los agentes naturales, el medio de cultivo, el agente o extracto y el microorganismo afectan los resultados (Juven et al., 1994).

**Tabla 4. Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana (Camacho, 2003)**

<b>METODOS</b>	<b>PRUEBAS A REALIZAR EN EL METODO</b>
Evaluación del punto final	Difusión en disco
	Dilución en agar y caldo
	Gradiente en placa
	Pruebas para desinfectantes
Descriptivos	Ensayos turbidimétricos
	Curvas de inhibición o muerte
Métodos aplicados	Punto final

#### **2.1.1.1 Prueba Kick Bauer (Difusión en placa)**

Una de las técnicas más utilizadas para realizar las evaluaciones microbiológicas en bacterias es la difusión en placa, debido a que ofrece muchas ventajas, utiliza un medio selectivo y enriquecido de asimilación rápida para el microorganismo lo que disminuye el tiempo de incubación y permite realizar la evaluación en corto tiempo, los ensayos de susceptibilidad son utilizados para reforzar el tratamiento de procesos infecciosos en los alimentos, debido a que la identidad de un microorganismo no es suficiente para predecir de forma confiable la vulnerabilidad frente a los antimicrobianos, sobre todo en microorganismos capaces de mostrar resistencia, sus mecanismos de defensa son principalmente la producción de enzimas que inactivan al antimicrobiano o modifican su acción (García, 1999).

##### **2.1.1.1.1 Fundamentos de la prueba**

La prueba de difusión en agar es usada cotidianamente para el estudio in vitro de bacterias de rápido crecimiento y algunas bacterias patógenas. Una suspensión de la bacteria en estudio se inocula sobre la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton. Posteriormente se colocan sobre la superficie del agar discos de papel de filtro impregnados con cantidades estandarizadas de agentes antimicrobianos. Luego del período de incubación se mide el diámetro de la zona

de inhibición alrededor de los discos. El tamaño de la zona de inhibición es inversamente proporcional a la concentración inhibitoria mínima (MIC) de la bacteria como se muestra en la fig. 4 y mediante el uso de tablas de referencia se prepara un reporte cualitativo "sensible, intermedio o resistente" (Castillo, 2005).



Fig. 4. Zona de inhibición por el método difusión en disco (Castillo, 2005).

## 2.2 Efecto sinérgico de los agentes antimicrobianos

Las mezclas de los agentes antimicrobianos se realizan porque algunos microorganismos pueden ser resistentes a la inhibición y/o eliminación por dosis convencionales de un solo agente, pero al exponerlo a una mezcla de estos aditivos se puede aumentar su eficiencia (Eliopoulos et al., 1991; Hayes et al., 1993). Por otra parte algunos agentes tienen un cierto límite de concentración debido a que en altas dosis tienen efectos nocivos para la salud, por lo tanto, es necesario determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y mantener el alimento fuera del alcance de patógenos sin poner en riesgo la salud de los consumidores.

### **2.2.1 Películas comestibles**

El empaque destinado a los alimentos debe preservar y proteger los alimentos, particularmente evitar la deterioración por oxidación o ataque microbiano con la finalidad de conservar sus características y extender la vida útil (Tharantan et al., 2003).

En los 90 comenzó un auge importante referente al uso de empaques biodegradables en el área de los alimentos en Europa, lo cual fue de gran importancia como sistema antimicrobiano (Lacroix et al., 2004). El desarrollo y caracterización de películas y recubrimientos comestibles ofrecen una gran variedad de aplicaciones en la industria alimentaria, en particular en la conservación de frutas y hortalizas frescas, se elaboran a partir de la gran variedad de polisacáridos, proteínas, ceras naturales y resinas, como componentes puros o combinaciones. Los recubrimientos comestibles además de conservar los alimentos al ser una barrera a la migración de oxígeno y humedad del medio, mejoran su apariencia, limitan la pérdida de nutrientes, aromas, humedad del alimento y mantienen íntegra la estructura.

Bosquez (2006), probó con éxito la conservación de frutas y legumbres mediante una película comestible a base de goma de mezquite y cera de candelilla, con sorbitol como plastificante, la técnica ha sido usada con éxito en quesos madurados. González (2007) desarrolló una película, basada en la técnica de Krochta (1994) que utiliza hidrocoloides plastificados con glicerol como base, esta película ha sido probada en queso cheddar, logrando mantener sus características sensoriales por mayor tiempo además de alargar la vida útil del queso.

A su vez Palmu (2005) realizó una película a base de gluten para la conservación de frambuesas, logrando alargar su vida útil durante 16 días, un lapso mucho mayor al que tendría el fruto en condiciones normales.

Las películas comestibles son un gran avance en cuanto al control de la interacción del alimento con su entorno, reducen la complejidad de la selección de

empaque para los productos alimenticios, solo basta con conocer las características de los alimentos para, elegir el material que constituirá la película, (Del valle et al, 2005) realizó pruebas sobre películas derivadas de *Opuntia ficus indica*, un cactus para su uso en la conservación de frambuesas, obteniendo buenos resultados en cuanto a la preservación de las características sensoriales, color, olor, firmeza, que son determinantes en la calidad de este fruto; a su vez el uso de películas ha sido introducido a la gastronomía moderna sobre todo en la confitería donde se utilizan para evitar la pérdida de características funcionales de alimentos que contienen alcohol en su interior como los chocolates (Villagomez, 2006), el uso de películas comestibles en la industria ha venido a solucionar problemas en cuanto al mejoramiento de características de los alimentos y su uso en conjunción con aceites esenciales o extractos vegetales, aumenta la vida de anaquel, debido a su actividad antimicrobiana y evitando las reacciones deteriorativas.

## **CAPITULO III**

### **METODOLOGIA**

#### **3.1 Obtención de extractos vegetales**

##### **3.1.1 Materia prima**

Las especies vegetales, fueron colectadas en la región mixe de Santa María Huitepec, San Juan Bautista Cuicatlán y Matías Romero Avendaño, Oaxaca; teniendo como característica principal su uso como planta medicinal o condimento alimenticio.

Las hojas de las plantas seleccionadas se desprendieron de los tallos, se distribuyeron en charolas metálicas y se colocaron a la sombra a temperatura ambiente aproximadamente 25 °C, hasta una humedad de 7%. Posteriormente se almacenan en bolsas de papel, a temperatura ambiente hasta su uso.

##### **3.1.2 Descripción de los procedimientos**

La metodología se divide en tres grandes bloques, la extracción (por solventes e hidrodestilación), la evaluación microbiológica y la caracterización de la película comestible.

###### **3.1.2.1 Extracción de principios activos**

###### **a) Extracción por solventes (mezcla hidroalcoholica)**

Las muestras de plantas deshidratadas son molidas hasta un tamaño moderadamente grueso. Se toman 20g de muestra y se pone en contacto con 100 mL de la solución alcohólica al (80% etanol – 20% agua) a temperatura ambiente durante 24 h. El extracto es filtrado en un Millipore con una membrana de nylon de 0.45 micras (U68) bajo una temperatura de 23 ° C (Muñoz, 2009).

Los filtrados se concentraron por Rotavapor (RE52) (YAMATO). Posteriormente, se conservan a una temperatura de 4°C hasta su uso

## b) Hidrodestilación

Las muestras de plantas deshidratadas son molidas hasta un tamaño moderadamente grueso y las frescas son fragmentadas en tamaños pequeños uniformes. Se toman 30 g de muestra y se ponen en contacto con 1L agua a 85°C en un equipo destilador de columna lateral. El aceite esencial es deshidratado con sulfato de sodio anhidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se conservan a 4°C hasta su uso (Gutiérrez, 2008).

Cada una de las especies vegetales son sometidas a extracciones mediante los métodos planteados, las plantas aromáticas serán sometidas a hidrodestilación, para la obtención de su aceite esencial. Las plantas aromáticas y no aromáticas se sometieron a una extracción con solventes, tabla 6.

**Tabla 5. Selección del método de extracción**

Plantas	Métodos de Extracción	
	Hidrodestilación	Solventes (Etanol-Agua)
<i>Walteria indica</i>	-	Si
<i>Tecoma stans</i>	-	Si
<i>Oenothera rosea</i>	-	Si
<i>Clinopodium laevigatum</i>	Si	Si
<i>Litsea glaucescens</i>	Si	Si
<i>Verbascum gnaphalium</i>	-	Si
<i>Pimpinella anisum</i>	Si	Si
<i>Persea americana</i>	Si	Si
<i>Salvia elegans</i>	Si	Si
<i>Janiperus communis</i>	Si	Si

## 3.2 Evaluación microbiológica

### 3.2.1 Evaluación microbiológica de los extractos vegetales extraídos

La evaluación microbiológica se realizó de acuerdo a la técnica de difusión en placa recomendada por la asociación médica internacional y que a continuación se detalla.

**Microorganismos:** *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, los cultivos deben ser activados de 18 a 24 h antes en medio solido, después se inoculan en los tubos conteniendo solución de NaCl al 0.85%, y se compara turbidez con estándar de Mc-Farland 0.5, que representa  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL (Unidades formadoras de colonias por mililitro).

#### a) Descripción del procedimiento

Las placas conteniendo agar Muller-Hinton y los discos para ser impregnados con el extracto a concentraciones definidas se llevan a temperatura ambiente, en una solución salina (0.85% NaCl) se suspenden ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL) de las bacterias, esta suspensión se inocula en las placas petri de 90mm de diámetro y 4mm de espesor de agar Muller-Hinton (24mL), se introduce la torunda de algodón en la suspensión y se rota contra las paredes internas del tubo con la finalidad de remover el exceso del inóculo, posteriormente se inocula con la torunda la superficie de la placa en tres direcciones, rotando la placa aproximadamente  $60^\circ$  entre las inoculaciones, se deja secar durante 3 min. Todo el procedimiento no debe durar más de 15 min. Posteriormente se impregnan los discos con el extracto a evaluar, se deja secar y posteriormente aplicar en la superficie del medio inoculado con unas pinzas, no se deben colocar más de 6 discos en cada placa y la distancia entre cada disco no debe ser menor de 25 mm, como se muestra en la figura 5.

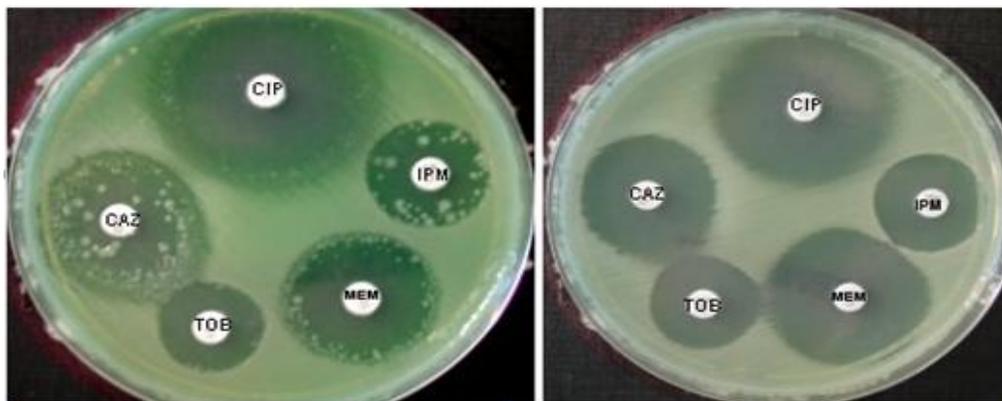


Fig. 5. Ubicación de los filtros impregnados con antimicrobianos.

### b) Lectura en placa

Como se observa en la fig. 5, la lectura se realiza sobre una placa negra pero bien iluminada (luz directa a 45°C), con el fondo hacia arriba y la tapa hacia abajo, con la regla milimétrica se mide el diámetro de inhibición y se interpreta de acuerdo al grafico 6.

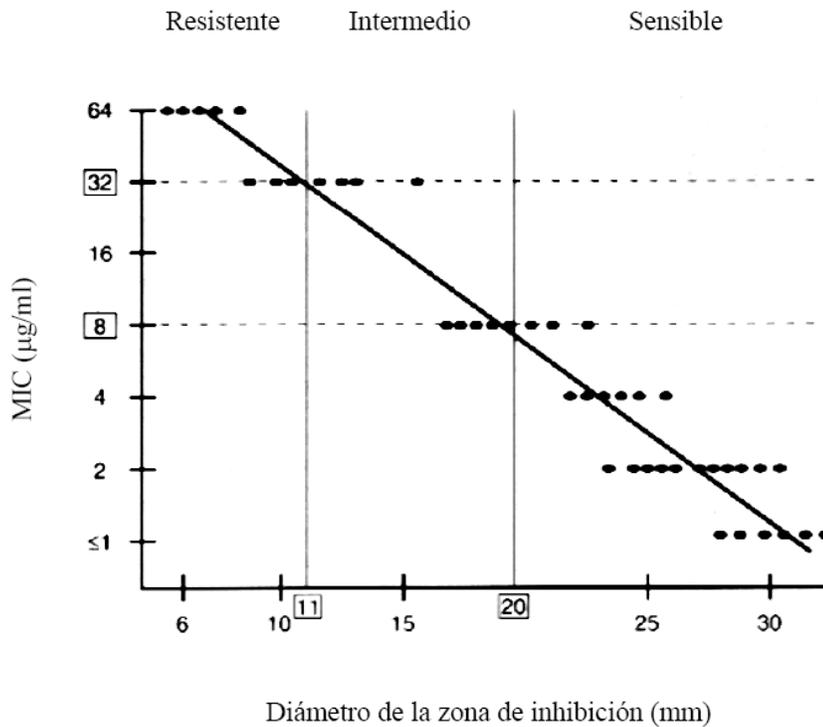


Fig. 6. Gráfico para interpretación de resultados microbiológicos (Camacho, 2009).

#### 3.2.1. Evaluación microbiológica de las películas emulsionadas

La evaluación microbiológica de las películas emulsionadas se realizó mediante la técnica de difusión en placa descrita en el punto 3.2.1.

#### 3.2.3 Evaluación microbiológica del quesoillo con recubrimiento emulsionado

La evaluación microbiológica del quesoillo con cubierta de película emulsionada se realizó de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-121-SSA1-1994, presentada en el anexo A.

### **3.3 Elaboración y caracterización de películas comestibles emulsionadas**

#### **a) Caseínato de sodio**

Se preparó una solución acuosa de caseinato de sodio al 10%, agregando el caseinato de manera gradual al agua con agitación constante durante tres horas a temperatura de refrigeración. Se adicionaron también 4 g de glicerol, cuando ya se haya disuelto el caseinato (Schou et al., 2005). Se forman emulsiones en equipo ultraturrax marca Silverson L4RT con rango de operación de hasta 15,000 rpm, los aceites esenciales a evaluar se dispersaron con agitación constante durante 5 min a 6700 rpm y se desgasifica a vacío

#### **b) Alginato de sodio**

Se preparó una solución al 2%, de alginato de sodio en agua destilada, calentando a 70 °C con parrilla magnetizada con agitación constante, hasta que la solución sea totalmente transparente. Se añadió entonces 1.5 g de glicerol/100g de solución de alginato. Se forman emulsiones con los aceites esenciales a evaluar; se dispersa con agitación durante 5 min a 10000 rpm y se desgasifica a vacío (Rojas-Grau et al., 2007)

Se determina la tensión superficial de las soluciones bases para determinar la cantidad de surfactante a utilizar mediante la utilización de un tensiómetro manual y arillo de platino marca Fisher Scientific (surface tensiometer 21).

#### **3.3.1 Estabilidad de las emulsiones**

Para determinar la estabilidad de las emulsiones se realiza una cinética de tamaño de glóbulo en equipo MasterSizer 2000, Malvern Instrument, en rango de 0 a 10,000 micras durante 24 h, con lecturas periódicas cada hora.

### 3.3.2 Formación de las películas

Cuando se logra la estabilidad de la emulsión se vierte en moldes rectangulares de 17 cm de largo por 7 cm de ancho, a razón de 33 ml por molde, se dejan enfriar a temperatura ambiente, durante 24 h, para el caso del caseínato y 36 h, para el alginato, se retiran del molde y se equilibran a una humedad relativa de entre (54-60)%, debido a que esta es la humedad del queso, como se muestra en la Fig 7.

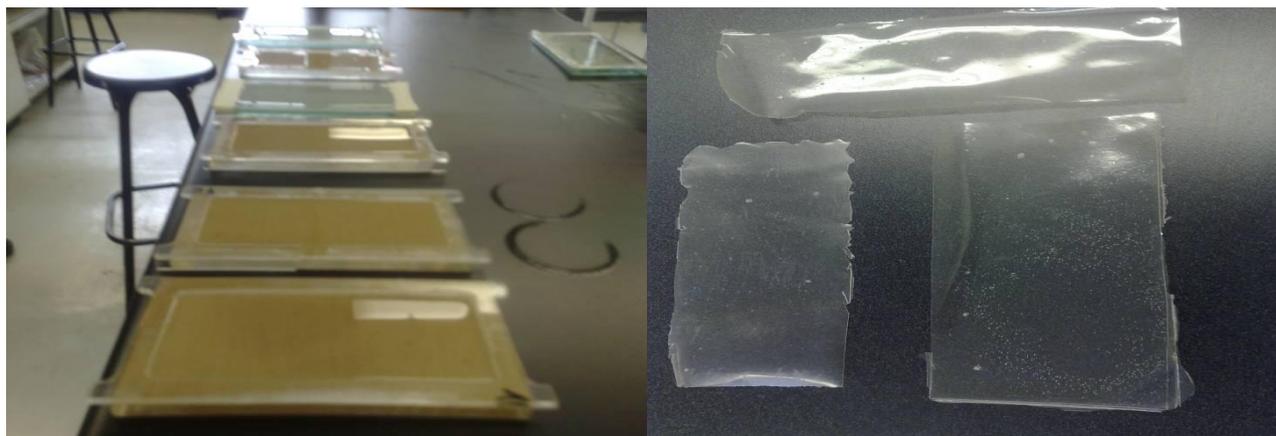


Fig 7. Formación de películas emulsionadas

### 3.3.3 Medición del ángulo de contacto

La hidrofobicidad y la capacidad de humectación se medirá a través del ángulo de contacto, técnica consiste en depositar una gota de agua en la superficie de la película comestible a evaluar con un medidor de ángulo de contacto tipo Tanteq Half-Angle Technique US Patent # S, 268733 (Karbowski et, al., 2006).

### 3.3.4 Determinación de color

Para la medición del color, se mide la reflexión con un colorímetro portátil Minolta Cm 2500d, empleando la escala de color CIELAB, las muestras son colocadas sobre la placa estandarizada del equipo ( $L^*=100$ ), se mide las coordenadas ( $L^*,a^*,b^*$ ) usando como referencia al iluminante 65/observador  $10^\circ$ , las medidas se realizaron en el lado opuesto al expuesto al ambiente durante el secado de la película.

El espacio CIELAB permite especificar estímulos de color en un espacio tridimensional. Se basa en la teoría de la percepción de colores opuestos que establece que un color no puede ser verde y rojo, ni azul y amarillo al mismo tiempo. El eje  $L^*$  representa la luminosidad y va de 0 (negro) a 100 (blanco). Las otras dos coordenadas representan la cromaticidad  $a^*$  y  $b^*$ , representan la variación entre lo rojizo-verdoso y amarillento-azulado respectivamente es decir un valor  $a^*$  positivo va hacia el rojo y un valor de  $a^*$  negativo hacia el verde de igual forma un valor  $b^*$  positivo es hacia el amarillo y un  $b^*$  negativo va hacia el azul, en el caso de que las tres coordenadas son igual a 0 se refiere a que son acromaticos.

### **3.3.5 Propiedades mecánicas**

Las películas se cortan en tiras de manera uniforme de entre 25.4 de ancho por 75mm de largo, se pesan y se equilibran a la humedad relativa del quesillo (58%), mediante soluciones saturadas de cloruro de sodio durante 10 días con la finalidad de no obtener películas con diferente humedad, se mide el espesor de películas con la ayuda de un micrómetro manual en partes diferentes y se saca un promedio, posteriormente son analizados en el texturometro (TA-XT Plus Texturer Analyzer), se opera en modo de tensión a temperatura ambiente y velocidad de cruceta de 60mm/min., medir la resistencia a la tensión ( $\sigma^{max}$ ), el % de estiramiento a la rotura ( $\% \epsilon_{rot}$ ) y el modulo de Young, calculado mediante las ecuaciones descritas en el anexo B (Kristo et al., 2008).

### **3.3.6 Determinación de permeabilidad al agua**

Para la determinación de la permeabilidad al vapor de agua se determina por el método recomendado por la (ASTM E96, 1980 and McHugh et al., 1993), para películas hidrofílicas utilizando un gradiente de humedad de 0-100% hr y a una temperatura de 25 °C, se utilizan células circulares de metacrilato, con un radio interno de 2.54 cm y 1.1 cm de profundidad, en su interior de colocan 6 mL de agua destilada y se fija por encima la película dejando un espacio de aire por

debajo de la película, una cara es expuesta a la humedad relativa máxima, a continuación se introducen en la cabina desecante conteniendo sílica gel para garantizar la humedad mínima en el interior, de esta forma se dan las condiciones para la transferencia de vapor de agua de la cara interna a la externa de la película, en el interior de la cabina se coloca un ventilador que genera una corriente de aire continua a través de toda la cabina a una velocidad superior de 2.5 m/s para mantener las mismas condiciones en toda la cabina, se mide la variación de peso de las células con respecto al tiempo cada 2 horas a partir de alcanzar el estado estacionario.

Se utiliza la ley de Fick y de Henry, para calcular la permeabilidad de las películas al vapor de agua, para ello, es necesario calcular la transmisión al vapor al agua (WVTR) y permeación, las ecuaciones se describen en el anexo C.



Fig 8. Microscopio de barrido electrónico

### 3.3.7 Caracterización morfológica de las películas

La microestructura de las películas se observara mediante un escaneo en microscopio electrónico de barrido (SEM) (JEOL-JSM-6390LV Jeol LTD, Akishima, Japón) con voltaje de aceleración de 20 kV (Fig 8). a  $5 \times 10 \text{mm}^2$ , la película se fijo a

ángulo de  $90^\circ$  y  $180^\circ$ , en sección frontal y transversal, se recubrieron con una fina capa de oro usando un evaporador (Sputering Jeol-JFC-1100, Jeol LTD.K,Akishima, Japon) durante 120 segundos y se aplicó una corriente de 40 mA (Phan The, et al., 2009).

Posteriormente a la caracterización de las películas se realizara la evaluación microbiológica; de acuerdo a la técnica de difusión en disco planteada en la sección anterior.

### 3.4 Diseño experimental

**Tabla 6. Nomenclatura del diseño experimental sección evaluación microbiológica de extractos vegetales**

Plantas	Concentraciones (g/mL)	Bacterias
1: Laurel	1: 0.03	A: <i>Stafilococcus aureus</i>
2: Aguacatillo	2: 0.9	B: <i>Escherichia coli</i>
3: Hierba del monte	3: 0.02	C: <i>Salmonella Thypi</i>
4: Tronadora	4: 1.8	
5: Anís		
6: Gordolobo		
7: Hierba del cáncer		
8: Salvia		
9: Hierba del borracho		
10: Enebro		

El diseño experimental para la evaluación de los extractos vegetales es de tipo jerárquico factorial con factores cruzados, para ambos tipos de extractos (etanólicos y aceites esenciales), son evaluados 6 aceites esenciales en dos concentraciones, sobre tres bacterias por triplicado lo que nos representa 108 experimentos y para los 10 extractos en dos concentraciones sobre las mismas tres bacterias por triplicado nos da 180 experimentos, es decir para esta sección son 288 experimentos, a los cuales se les realizara una prueba ANOVA, con la finalidad de evaluar cual de los extractos tiene mayor significancia estadística en cuanto a su inhibición sobre los microorganismos evaluados y determinar su

actividad antimicrobiana y a su vez determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), mediante el grafico de la Fig. 6 y tablas estandarizadas que maneja la técnica Kick Bauer.

**Tabla 7. Diseño experimental para los extractos etanólicos**

Extractos Etanólicos																				
	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
Concentración	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Bacterias A	11A	12A	21A	22A	31A	32A	41A	42A	51A	52 <sup>a</sup>	61A	62A	71A	72A	81A	82A	91A	92A	101A	102A
B	11B	12B	21B	22B	31B	32B	41B	42B	51B	52B	61B	62B	71B	72B	81B	82B	91B	92B	101B	102B
C	11C	12C	21C	22C	31C	32C	41C	42C	51C	52C	61C	62C	71C	72C	81C	82C	91C	92C	101C	102C

**Tabla 8. Diseño experimental para los aceites esenciales**

Aceites esenciales												
	1		2		3		4		5		6	
Concentración	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4
Bacterias A	13A	14A	23A	24A	33A	34A	43A	44A	53A	54 <sup>a</sup>	63A	64A
B	13B	14B	23B	24B	33B	34B	43B	44B	53B	54B	63B	64B
C	13C	14C	23C	24C	33C	34C	43C	44C	53C	54C	63C	64C

**Tabla 9. Nomenclatura del diseño experimental sección evaluación microbiológica de películas emulsionadas**

Plantas	Concentraciones (g/mL)	Bacterias
P: Película de alginato	5: 3.5	A: <i>Stafilococcus aureus</i>
Pa: Alginato/laurel	6: 5	B: <i>Escherichia coli</i>
Pb: Alginato/aguacatillo		C: <i>Salmonella Thypi</i>
Pc: Película de Caseinato		
Pd: Caseinato/laurel		
Pe: Caseinato/aguacatillo		

**Tabla 10. Diseño experimental para la evaluación microbiológica de las películas comestibles**

Películas Aceites esenciales												
	P		Pa		Pb		Pc		Pd		Pe	
Concentración	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6
Bacterias A	P5A	P6A	Pa5A	Pa6A	Pb5A	Pb6A	Pc5A	Pc6A	Pd5A	Pd6A	Pe5A	Pe6A
B	P5B	P6B	Pa5B	Pa6B	Pb5B	Pb6B	Pc5B	Pc6B	Pd5B	Pd6B	Pe5B	Pe6B
C	P5C	P6C	Pa5C	Pa6C	Pb5C	Pb6C	Pc5C	Pc6C	Pd5C	Pd6C	Pe5C	Pe6C

El diseño experimental para la caracterización de las películas emulsionadas es de tipo jerárquico factorial con factores cruzados, para las 6 películas formadas con 2 concentraciones sobre tres bacterias, sobre tres bacterias por triplicado lo que nos representa 108 experimentos, a los cuales se les realizara una prueba ANOVA, con la finalidad de evaluar cual de las películas tiene mayor significancia estadística en cuanto a su inhibición sobre los microorganismos evaluados y determinar su actividad antimicrobiana.

## CAPITULO IV

### 4. RESULTADOS

#### 4.1 Selección de plantas con potencial antimicrobiano

Los habitantes de las comunidades emplean una serie de preparados a base de Plantas con fines medicinales, para tratar distintas infecciones, sin conocer a plenitud su efectividad de los recursos vegetales con que cuentan, este estudio pretende probar la actividad microbiana de los extractos obtenidos de las especies vegetales y fundamentar su uso.

A través de entrevistas en campo, en tres poblaciones del estado de Oaxaca, México, fueron seleccionadas 10 especies vegetales, utilizadas en la medicina tradicional para aliviar infecciones estomacales, respiratorias, tratamiento de diabetes, hipertensión y uso como condimento en alimentos (tabla 2). Las plantas seleccionadas fueron *Walteria indica* (Sterculiaceae), *Tecoma stans* (Bignoniaceae), *Oenothera roseae* (Onagraceae), *Clinopodium laevigatum* (Lamiaceae), *Litsea glaucens* (Lauraceae), *Verbascum phlomoides* (Escrofulalaceae), *Pimpinella anisun* (Umbellifereae), *Persea americana* (Lamiaceae), *Salvia elegans* (Labiataeae), *Janiperus communis* (Cupressaceae).



##### 4.1.1 *Walteria indica* L. (Sterculiaceae)

Su uso dentro de la medicina tradicional es para aliviar molestias estomacales, espasmos y diarrea, es conocida comúnmente como tapacola o hierba de monte, es un arbusto de hasta 1 m de alto con tallos densamente estrellados, pubescentes, sus hojas están dispuesta en

espiral y pueden ser ovadas, elípticas oblongas, con márgenes serrulados o crenados y tomentosas en ambas superficies. La inflorescencia es una cima glomérulo, sésil o pedunculada que nacen en las axilas de las hojas. Las flores

---

tienen cáliz pubescentes, 5 a 6 pétalos amarillos, 5 estambres y estilos laterales. Los frutos son obovoides con el ápice truncado (Salazar, 2006).



#### 4.1.2 *Tecoma stans* (Bignoniaceae)

Llamada tronadora, es utilizada para el tratamiento de la diabetes, es una planta perennifolia de porte arbustivo o arbóreo. Sus hojas son compuestas y están formadas por 7 folíolos lanceolados de 4 a 10 cm de largo y de márgenes aserrados. Las inflorescencias nacen del extremo de las ramas y contienen numerosas flores. Las flores tienen forma de embudo; presentan cáliz corto y corola amarilla, miden de 3.5 a 5 cm de largo. Los frutos son cápsulas lineares de 10 a 20 cm de largo. Las semillas son planas y aladas (Salazar, 2006).



#### 4.1.3 *Oenothera rosea* (Onagraceae)

Es conocida como hierba del cáncer, es utilizada para aliviar lesiones, erecta o ascendente, de 10-15 cm de alto, ramificada en la base, más o menos estrigulosa. Hojas oblongoovadas o elípticas, atenuadas en la base sobre el peciolo, enteras o sinuado - denticuladas. Flores dispuestas en la axila de las hojas formando grupos racemiformes. Hiparito estriguloso. Pétalos rosados o lilacinos, anchamente obovados, de 5-10 mm de longitud (Salazar, 2006).



#### 4.1.4 *Clinopodium laevigatum* (Lamiaceae)

Llamada comúnmente como hierba del borracho, utilizada para aliviar problemas estomacales, resaca alcohólica y condimento alimenticio, es un arbusto alargado, con tallos

erectos, hojas alargadas, flores naranjas a rojas (Rojas, 2009).



#### 4.1.5 *Litsea glaucescens* (Laureaceae)

Conocida como laurel, usada como condimento y en contra de la bronquitis, es un árbol perennifolio, con tallos erectos de corteza oscura, hojas enteras alternas lanceoladas, coriáceas y brillantes, de margen ondulado, flores unisexuales, amarillentas y reunidas en umbelas axilares, con pedúnculo corto, fruto es una baya de color negro.

#### 4.1.6 *Verbascum Gnaphalium* (Escrophulariaceae)



Llamado gordolobo, utilizada para aliviar resfriado, tos, expectorante, es robusta de hasta 2m, algodonoso, hojas basales en roseta pecioladas grandes y oval-crenuladas, las hojas caulinares más pequeñas, sésiles y algo decurrentes, flores amarillas en glomérulos densos reunidos en racimos alargados de gran

tamaño, fruto en capsula granuloso.

#### 4.1.7 *Pimpinella anisum* (Umbellifereae)



conocido comúnmente como anís, es usado como saborizante y digestivo, es una planta perenne de hasta 50 cm, con tallos erectos, pubescentes, redondeados y estriados, que nacen de una gran raíz leñosa; hojas pecioladas, de 2-5 cm de longitud, flores blancas de unos 3 mm de largo reunidas en

umbelas, largamente pedunculadas, con cinco pétalos; frutos en diaquenio, aromáticos y provistos de 5 surcos.



#### **4.1.8 *Persea americana* (Lauracea)**

Llamado aguacatillo usado como condimento y en el alivio de problemas gastrointestinales, planta leñosa de elevado porte, hojas coriáceas y semillas dicotiledoneas, sus flores presentan panículos axilares o terminales, están constituidos por un eje central ramificado del que surgen largos pedicelos que, en un extremo terminan con una pequeña flor trímera (Rojas, 2009).



#### **4.1.9 *Salvia elegans* (Lamiacea)**

Las flores son usadas como colorante labial, se han reportado principalmente actividad antioxidante aunque trabajos realizados en Turquía prueban que tiene uso en la medicina tradicional de esa región, es un arbusto de hasta 70 cm de alto, tallos en gran número, hojas pecioladas, oblongadas o lanceoladas, flores el color rojo agrupadas en espigas de verticilos separados (Rojas, 2009).



#### **4.1.10 *Juniperus communis* (Cupresáceas)**

Conocido comúnmente como enebro, es utilizado como aromatizante y tiene uso medicinal contra enfermedades respiratorias, es un arbusto perenne de hasta 7 m, tallos numerosos de corteza marrón rojiza que se cuartea en láminas delgadas con mucha facilidad, hojas

verde oscuras punzantes con una banda blanca por detrás, en verticilos de tres. Flores masculinas y femeninas en arboles distintos. Las flores masculinas son de color amarillo y crecen en las axilas de las hojas. Fruto en gálbulo, verde durante el primer año; azulado-oscuro durante la madurez que se produce al cabo de dos o tres años.

#### 4.2 Humedad de las plantas a extraer

La determinación de humedad es un factor importante en la calidad de las sustancias a extraer, debido a que pone de manifiesto el contenido de materia seca que contiene tanto los extractos como los aceites esenciales, por este motivo se determinó la humedad de las especies a extraer y se representan en la tabla 12.

**Tabla 11. Porcentaje de humedad de las especies vegetales seleccionadas**

<b>Especie vegetal</b>	<b>(W<sub>BS</sub>) %humedad</b>
<i>Walteria indica</i>	7.8
<i>Tecoma stans</i>	7.9
<i>Oenothera rosea</i>	10.1
<i>Clinopodium laevigatum</i>	7.2
<i>Litsea gaucescens</i>	9.1
<i>Verbascum gnaphalium</i>	8.9
<i>Pimpinella anisum</i>	11.6
<i>Persea americana</i>	6.0
<i>Salvia elegans</i>	12.6
<i>Janiperus communis</i>	6.9

#### 4.3 Rendimientos de las extracciones

El rendimiento de las extracciones es importante porque determina la rentabilidad de una especie vegetal como fuente de principios activos con potencial antimicrobiano, por esta razón se determinó los rendimientos de cada especie vegetal y se reportan en la tabla 13. Los rendimientos obtenidos son bajos para el caso de los aceites esenciales pero concuerda con los obtenidos por Lira et al., (2009) y Rojas (2009), que evaluaron algunas de la especies vegetales

seleccionadas en este trabajo, sin embargo, están dentro del margen normal de obtención que va desde 0.2 al 5%.

**Tabla 12. Rendimientos de las extracciones por ambos métodos**

Especie vegetal	Rendimiento (%)	
	Aceite Esencial	Extracto Etanólico
<i>Walteria indica</i>	-	1.2347
<i>Tecoma stans</i>	-	3.6689
<i>Oenothera rosea</i>	-	3.5515
<i>Clinopodium laevigatum</i>	1.5535	3.2438
<i>Litsea glaucescens</i>	1.9852	3.8924
<i>Verbascum gnaphalium</i>	-	0.6980
<i>Pimpinella anisum</i>	0.3153	3.2879
<i>Persea americana</i>	0.2913	2.9657
<i>Salvia elegans</i>	2.2315	3.8924
<i>Janiperus communis</i>	0.2393	2.6766

#### 4.4 Evaluación microbiológica de los extractos obtenidos

La evaluación microbiológica manifestó casi nula actividad sobre las bacterias evaluadas por parte de los extractos etanólicos. A pesar de que se ha demostrado que los extractos obtenidos con mezclas orgánicas (etanol-agua) preservan mejor los extractos, y desnaturalizan enzimas que degradan compuestos biológicamente activos, únicamente dos extractos mostraron actividad el anís sobre el *Staphylococcus aureus* y el *Escherichia coli* y la salvia sobre el *Staphylococcus aureus*, en concentración de 1.8 g/mL, el resto no presentó actividad sobre las bacterias como se observa en la Tabla 12.

El aceite esencial del anís (*Pimpinella anisum*) y salvia (*Salvia elegans*) en concentración de (0.9 g/mL), mostraron inhibición media sobre las tres bacterias. En cambio el laurel (*Litsea glaucescens*) y el aguacatillo en concentración de (0.03 g/mL) tienen la misma inhibición y alta en (0.9 g/mL). El aceite esencial de otras plantas como el anís (*Pimpinella anisum*), Enebro (*Janiperus communis*) y la Salvia (*Salvia elegans*) mostraron baja inhibición en concentración de (0.9 g/mL), como se observa en la Tabla 13, sin embargo estadísticamente solo el aguacatillo

(*Persea americana*) tiene actividad antimicrobiana significativa y factor que tiene incidencia sobre la inhibición es la concentración.

Algunos trabajos hacen alusión hacia la actividad antimicrobiana de extractos sobre patógenos pero utilizando el método soxhlet en la extracción y principalmente otro solvente, por ejemplo Bakkali, 2008 constato que estos son más efectivos sobre hongos y en nuestro caso la prueba se realizo sobre bacterias, a su vez Castillo, et al, 2009 evaluaron extractos de hierbas medicinales mexicanas obtenidas por el método soxhlet con solvente metanol sobre la bacteria *Helicobacter pilory*, microorganismo causante de ulceras gástricas obteniendo como resultado la efectividad de la hierba del cáncer, pero no de la tronadora; lo que concuerda con el presente estudio.

Skaltsa et al., 2003 determinó que los principales compuestos en los extractos etanolicos son aldehídos y alcoholes como el linalol. Se le atribuye acción microbiana sobre hongos y levaduras pero no sobre bacterias lo que explica la casi nula actividad de estos extractos sobre las bacterias evaluadas.

**Tabla 13. Diámetros de inhibición mostrados por los extractos etanólicos sobre microorganismos patógenos evaluados**

Especies vegetales	Concentración	Extractos Etanólicos		
		Diámetros de inhibición (mm)		
		<i>Estaphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella thypi</i>
<i>Litsea glaucescens</i> (Laurel)	1	-	-	-
	2	-	-	-
<i>Persea americana</i> (Aguacatillo)	1	-	-	-
	2	-	-	-
<i>Walteria indica</i> (Hierba del monte)	1	-	-	-
	2	-	-	-
<i>Tecoma stans</i> (Tronadora)	1	-	-	-
	2	-	-	-
<i>Pimpinella anisum</i> (Anis)	1	-	-	-
	2	10 ± 2.86	8 ± 2.86	-
<i>Verbascum gnaphalium</i> (Gordolobo)	1	-	-	-
	2	-	-	-
<i>Oenothera rosea</i> (Hierba del cancer)	1	-	-	-
	2	-	-	-
<i>Salvia elegans</i> (Salvia)	1	-	-	-
	2	8 ± 2.86	-	-
<i>Clinopodium laevigatum</i> (Hierba del borracho)	1	-	-	-
	2	-	-	-
<i>Janiperus communis</i> (Enebro)	1	-	-	-
	2	-	-	-
Antibióticos	Ampicilina	22	22	16
	Gentamicina	14	14	12

**Tabla 14. Diámetros de inhibición de los aceites esenciales sobre los microorganismos patógenos evaluados**

Especies vegetales	Concentración	Aceites esenciales		
		<i>Estaphylococcus aureus</i>	Diámetros de inhibición (mm)	
			<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella thypi</i>
<i>Litsea glaucescens</i> (Laurel)	3	8 ± 2.86	-	8 ± 2.86
	4	12 ± 2.86	10 ± 2.86	11 ± 2.86
<i>Persea americana</i> (Aguacatillo)	3	8 ± 2.86	6 ± 2.86	-
	4	17 ± 2.86	14 ± 2.86	-
<i>Pimpinella anisum</i> (Anís)	3	6 ± 2.86	-	-
	4	11 ± 2.86	-	6 ± 2.86
<i>Salvia elegans</i> (Salvia)	3	-	-	-
	4	8 ± 2.86	-	-
<i>Clinopodium laevigatum</i> (Hierba del borracho)	3	-	-	-
	4	-	-	-
<i>Janiperus communis</i> (Enebro)	3	4 ± 2.86	-	4 ± 2.86
	4	8 ± 2.86	-	6 ± 2.86
Antibióticos	Ampicilina	22	22	16
	Gentamicina	14	14	12

Los aceites esenciales están compuestos básicamente de terpenos y terpenoides que tiene una base lipídica. Esta característica permite una mejor interacción con los componentes de las células microbianas permitiendo la acción sobre las partes vitales de la misma, limitando el desarrollo del microorganismo (Juven et al., 1994).

Se determino la concentración mínima inhibitoria (CMI), siendo el aguacatillo y el laurel los que tiene la mejor incidencia sobre los microorganismos a concentraciones bajas, la importancia de realizar esta determinación radicó en optimizar el uso de los extractos, ya que concentraciones elevadas pueden tener alguna alteración sobre las propiedades y características del alimento, pero principalmente evitar excederse en su uso innecesariamente.

**Tabla 15. Concentración mínima inhibitoria de los extractos etanolicos y aceites esenciales sobre los microorganismos patógenos evaluados.**

Tipo de extracto	Especies vegetales	CMI* Sobre cada bacterias en (g/mL)		
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonela typhi</i>
Extracto etanólico	<i>Pimpinella anisum</i> (Anis)	5	5	-
	<i>Salvia elegans</i> (Salvia)	-	5	-
Aceite esencial	<i>Litsea glaucescens</i> (Laurel)	3.2	-	5
	<i>Persea americana</i> (Aguacatillo)	1.6	4	3.5
	<i>Pimpinella anisum</i> (Anis)	5	-	-
	<i>Salvia elegans</i> (Salvia)	5	-	-
	<i>Janiperus communis</i> (Enebro)	> 5	-	-

CMI\*: Concentración mínima inhibitoria

Los halos de inhibición se observan en la Fig 9, de acuerdo a lo determinado por la técnica de difusión en disco los aceites esenciales, muestran mejores efectos inhibitorios sobre el *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella Thypi*.

- a) Comportamiento de los extractos frente al *Staphylococcus aureus*, b) *Escherichia coli*, c) *Salmonella typhi*.

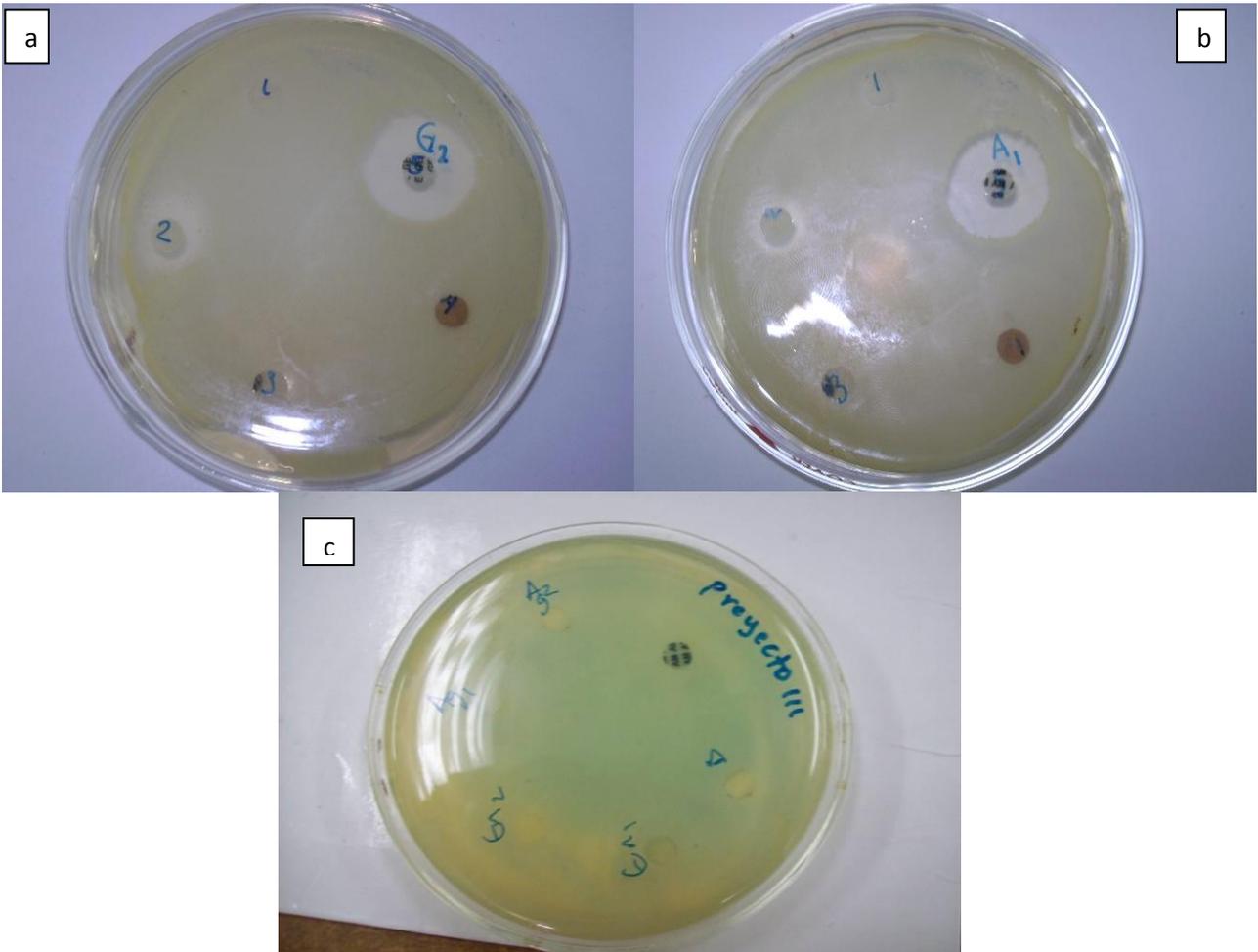


Fig. 9. Halos de inhibición de los extractos evaluados

#### 4.5 Películas emulsionadas

Se denominan fenómenos superficiales a los fenómenos físicos en que intervienen de forma fundamental las moléculas en las superficies de separación de dos sustancias no miscibles; razón por la cual se determinó la tensión superficial de las soluciones base de las películas a emulsionar, de esta forma se determina la fuerza a vencer para formar una emulsión estable, permitiendo que la cohesión de entre las moléculas que constituyen las soluciones, con este procedimiento determinamos también la cantidad de emulsificante que garantice la formación de la emulsión, en la Fig. 10, observamos la tensión superficial de las soluciones

bases de las películas a evaluar, se percibe que en ambos casos se tiene una tensión superficial baja, lo que nos permitió determinar una concentración pequeña del surfactante y tomando además como referencia a (Ponce et al., 2009), que utilizó Tween 80 al 0.2%, para la estabilización de la emulsión.

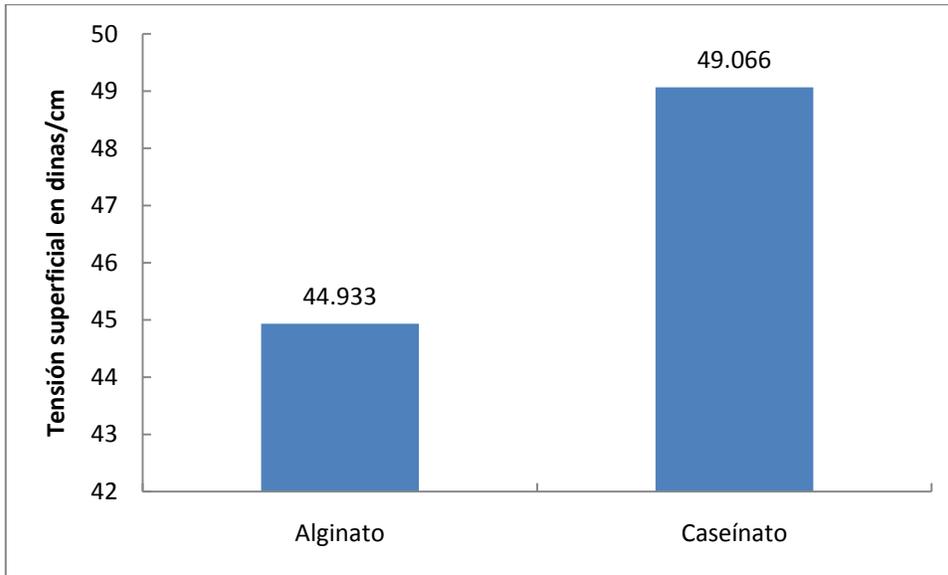


Fig 10. Tensiones superficiales de las soluciones bases

#### 4.6 Tamaño de partícula



Para lograr la estabilidad de las emulsiones que conforman las películas a evaluar se determinaron los tamaños de partículas y su dispersión durante 24h. Así como plantear las condiciones ideales para la formación de la emulsión Fig. 11, en el caso del alginato, se mantiene estable en un rango de (0.2 – 100

micras) como se observa en la Fig 12., esto a 10000 rpm durante 10min., a temperatura menor de 30°C. Sin embargo RavisHunker et al., 2009 logró

estabilizar emulsiones de soluciones de pectina y aceite esencial de oregano y romero mediante dispersión de entre (16000 – 20000) rpm, durante 10 min, lo que nos permitiría bajar el tamaño de partícula obtenido, pero no se cuenta con un homogenizador de mayor potencia, motivo por el cual se mantuvieron las condiciones antes mencionadas. En el caso de la emulsión de caseinato se logro un tamaño de partícula de entre (6 – 26) micras a 6700 rpm durante 5 min, obteniendose una emulsión estable durante mas de 24 h Fig 13. Al elevar las revoluciones e incrementar el tiempo la emulsión sufría rompimiento aproximadamente en 5 h.

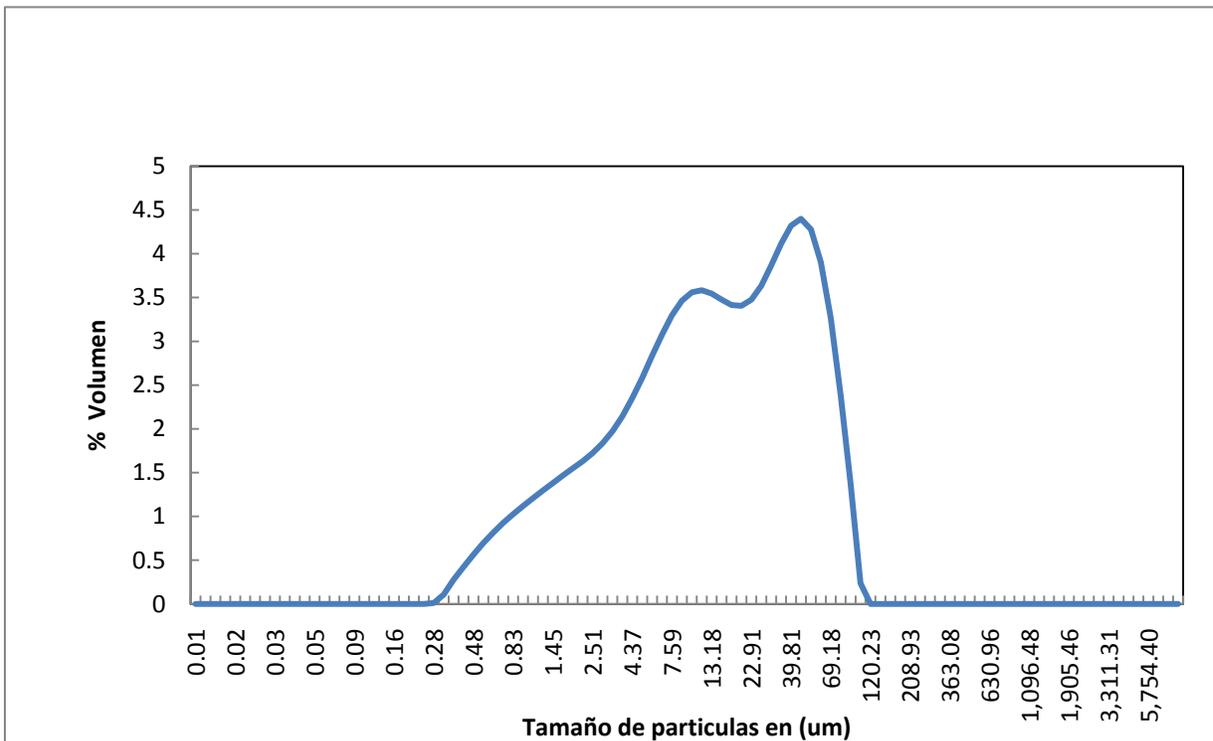


Fig 12. Tamaño de partícula representativa de la emulsión de alginato

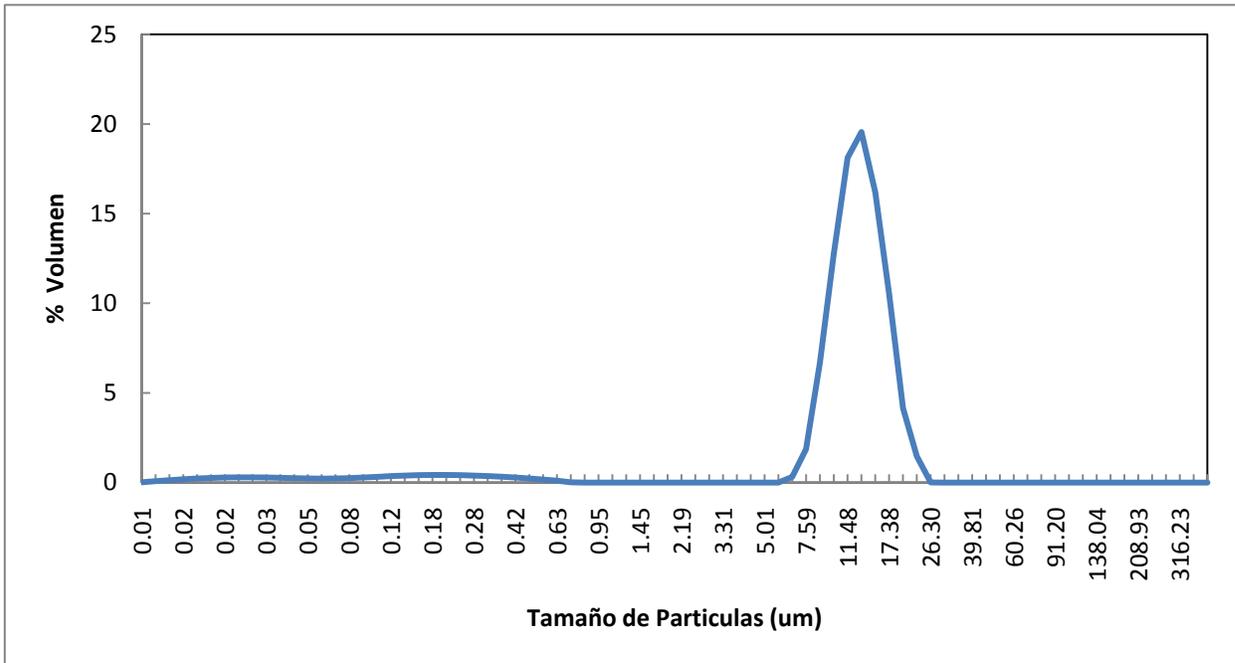


Fig 13. Tamaño de partícula representativa de la emulsión de caseinato

Se observó al microscopio las emulsiones con la finalidad de determinar la estabilidad de la emulsión a través del tiempo, la emulsión de alginato se muestra en la Fig 14 A) donde se representa la estabilidad durante 6 h, aunque con un elevado tamaño de partícula lo que se corroboró en la lectura en el mastersizer, a la vez se muestra en el inciso Fig 14 B) que la distribución en la película es uniforme con algunas aglomeraciones aisladas del aceite esencial. Para el caso del caseinato se representa en la Fig 15 A) una emulsión estable durante las mismas 6 h pero con un tamaño de partícula mucho menor y una mejor distribución del aceite esencial en la película Fig 15 B).

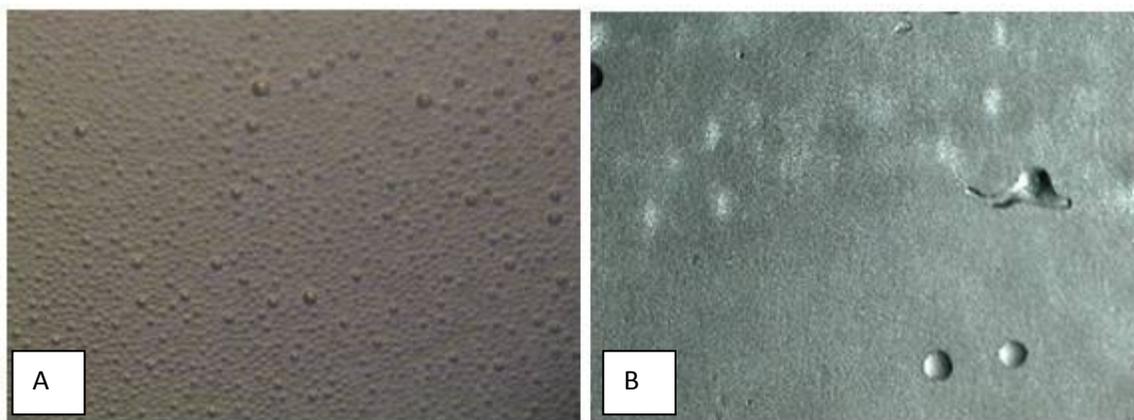


Fig 14. Distribución del aceite esencial en A) emulsión y B) película de alginato

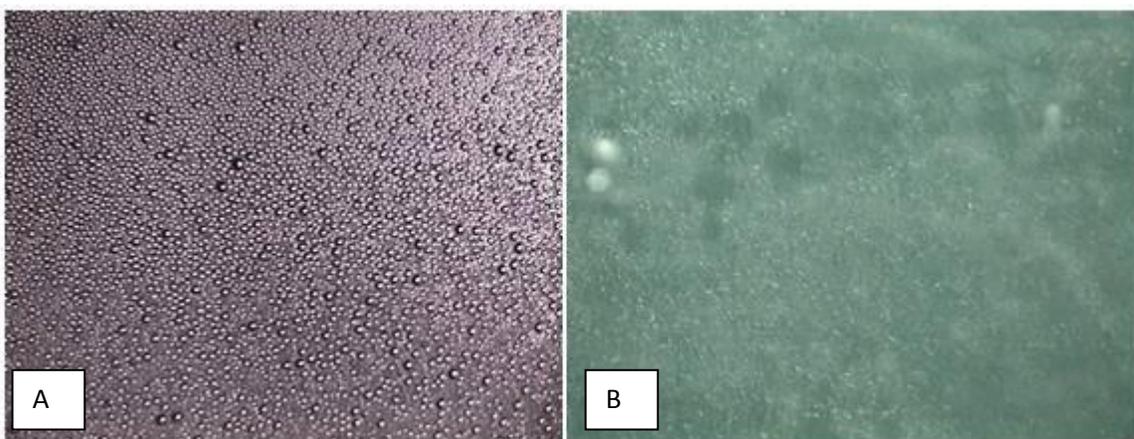


Fig 15. Distribución del aceite esencial en A) emulsión y B) película de caseinato

#### **4.8 Humedad de las películas emulsionadas**

Al exponer las películas a una humedad relativa mayor se esperaba un incremento considerable en la humedad, sin embargo, la humedad de las películas no mostró aumento importante al equilibrarlo de 54-60% de humedad relativa, debido a la humedad promedio de las soluciones en condiciones ambientales normales son de 14% para el alginato y 6% para el caseinato, esto lo observamos claramente en la Fig 16, esto nos indica la estabilidad de las películas a las variaciones de humedad relativa.

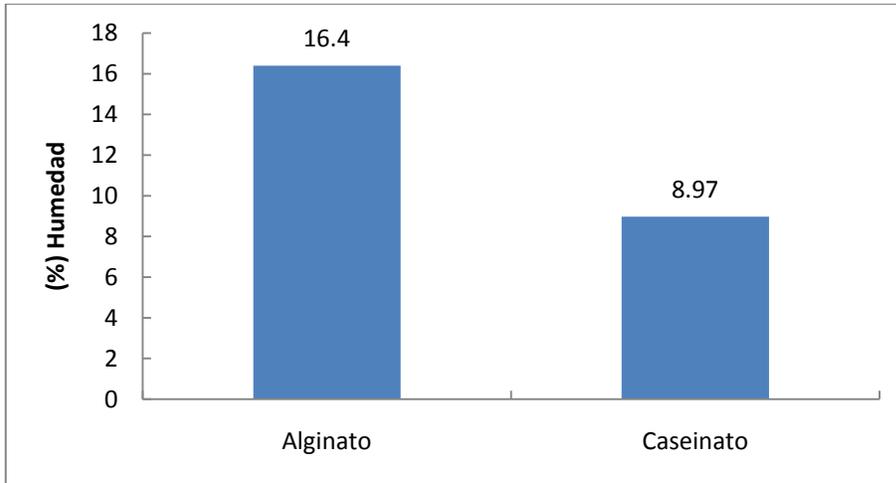


Fig 16. Humedad de las películas después de estabilizarlas a (54-60)%

#### 4.9 Determinación de Color

Se evaluaron tanto las películas emulsionadas como no emulsionadas para poder determinar la influencia del aceite esencial sobre el color de las películas y los resultados se esquematizan en la tabla 17.

Existe una marcada tendencia hacia la transparencia en ambos casos, ligeramente opaco amarillento para el caseinato atribuido a su origen proteico, la influencia del aceite esencial sobre el color es mínimo en ambos casos.

Tabla 16. Índices de color de las películas con y sin emulsionar

Parámetros	Alginato	Alginato/ Laurel	Alginato/ Aguacatillo	Caseinato	Caseinato/ Laurel	Caseinato/ Aguacatillo
L*	-21.48	-20.60	-20.16	-18.95	-19.21	-19.48
a*	-12.94	-13.14	-13.89	-13.68	-13.20	-13.12
b*	-9.69	-9.42	-9.37	-9.42	-11.21	-11.02

#### 4.10 Hidrofobicidad de las películas emulsionadas

La medición del ángulo de contacto refleja tanto la difusión total en líquidos hasta la nula adherencia, un elevado ángulo de contacto refleja hidrofobicidad y un bajo la afinidad por el agua, en el caso de la película emulsionada de caseinato se obtuvo un ángulo de  $41^\circ$  y del alginato fue de  $15^\circ$ , lo que representa una mayor hidrofobicidad en la película del caseinato, sin embargo estudios manifiestan que el ángulo ideal para las películas comestibles no deben ser menor de  $60^\circ$ .

#### 4.11 Propiedades mecánicas

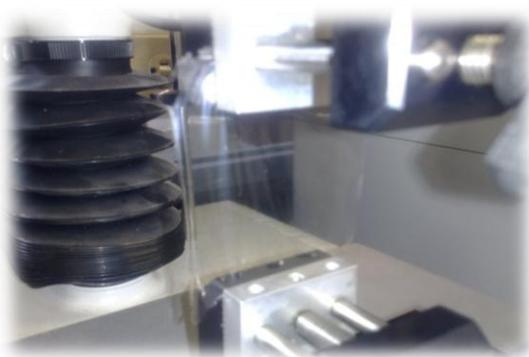


Fig. 17 Pruebas mecánicas a películas

Al realizar la determinación de las propiedades mecánicas a las películas sin emulsionar, observamos que las películas de caseinato mostraron mejores características mecánicas que las de alginato, estas soportan prácticamente el doble de la tensión,

Elongación, representa el 95%, lo que nos habla de su flexibilidad y que contrasta totalmente con el 12% del alginato. El módulo de Young, tan bajo indica que es una película con características apropiadas para su aplicación a un alimento como el quesillo que se forma de hilos flexibles Fig 17.

En el caso de las películas emulsionadas manifestaron disminución en los tres parámetros de la evaluación mecánica, atribuida a los aceites esenciales, estos rodean las estructuras de los componentes bases llámese alginato o caseinato de sodio. Las características polares del alginato no permiten una buena interacción con los aceites esenciales y esto se refleja con la drástica disminución de cada una de sus propiedades mecánicas. El caseinato cuenta con una parte lipofílica y cierto comportamiento emulsionante, característica de las proteínas, de esta forma

tiene una mejor interacción entre sus moléculas estructurales y el aceite esencial, lo que se refleja en sus características mecánicas que se ven menos afectadas que al alginato como se observa en la tabla 18.

**Tabla 17. Propiedades mecánicas que determinan la viabilidad de las películas emulsionadas**

Películas emulsionadas	Propiedades mecánicas		
	Tensión (Mpa)	Parámetros evaluados Elongación (%)	Modulo de Young (Mpa)
Alginato de sodio y <i>Litsea glaucescens</i>	2.7 ± 0.2565	7.14 ± 18.46	37.8 ± 4.75
Alginato de sodio y <i>Persea americana</i>	3.17 ± 0.2565	3.87 ± 18.46	82.03 ± 4.75
Alginato de sodio	4.31 ± 0.2565	12.85 ± 18.46	33.54 ± 4.75
Caseinato de sodio y <i>Litsea glaucescens</i>	6.44 ± 0.2565	27.14 ± 18.46	23.72 ± 4.75
Caseinato de sodio y <i>Persea americana</i>	6.72 ± 0.2565	14.05 ± 18.46	47.68 ± 4.75
Caseinato de sodio	8.85 ± 0.2565	95.71 ± 18.46	9.24 ± 4.75

#### 4.12 Permeabilidad al vapor de agua de películas

Las mezclas usadas para la formación de las películas son de origen diferente, tenemos por un lado al alginato que es un hidrocóide que ha sido mezclado con lípidos como aceites esenciales para aumentar la hidrofobicidad y mejorar sus propiedades como barrera al vapor de agua como los realizados por (Morillon et al., 2002) y de proteínas con lípidos como el caso del caseinato evaluado por (Rhim et al., 2005), estos trabajos tienen por objeto desarrollar películas con propiedades funcionales mejoradas.

Se observó que la pérdida de humedad es muy similar en ambos casos, lo que indica una hidrofobicidad muy semejante ligeramente mayor en el alginato; sin embargo, esta pequeña diferencia en cuanto a la pérdida de agua se manifiesta principalmente en las propiedades mecánicas sobre todo en el módulo de Young,

el cual manifiesta la rigidez y lo quebradizo de la película de alginato, pero en cuanto a la permeabilidad están prácticamente en las mismas condiciones, como se observa en la tabla 17.

**Tabla 18. Permeabilidad de las películas de caseinato y alginato**

Parámetros	Películas			
	Caseinato		Alginato	
	Laurel	Aguacatillo	Laurel	Aguacatillo
WVTR (Transmisión de vapor de agua) (moles/m <sup>2</sup> s)	0.000499	0.000437	0.000412	0.000426
P <sub>A1</sub> (Presión de vapor saturado) (Kpa)	43.18	43.43	43.31	43.37
Permeación (g/hm <sup>2</sup> Kpa)	170.8	170.08	170.23	170.05
<b>Permeabilidad (g mm/h m<sup>2</sup> Kpa)</b>	<b>0.0512</b>	<b>0.0511</b>	<b>0.0511</b>	<b>0.0511</b>

#### 4.13 Morfología de películas emulsionadas

Las micrografías de las películas dan una visión más certera de la estructura, y permiten determinar la distribución del extracto o aceite esencial en ella. Esta se ve afectada por la disposición estructural de los componentes, la dispersión inicial y su desarrollo durante el secado de la película (Phan The et, al., 2009). En el caso del alginato, es un polisacárido lineal, soluble en agua e integrado por compuestos polares, a excepción de los que contienen iones calcio, la distribución del aceite esencial se da principalmente en la superficie, forma una estructura continua muy estrecha en la parte transversal pero sin la presencia de globulos de grasa Fig 18 B), sin embargo, en la superficial se encuentran bien distribuidos y ordenados los glóbulos del aceite, como se muestra en la Fig 18 A), esta distribución induce a que la migración de las moléculas del aceite esencial será rápida pero la mayor concentración se dará en el interior del alimento y la superficie quedara prácticamente protegida solo por la película.

Este tipo de distribución es deseable en alimentos con elevada susceptibilidad al ataque microbiano, porque el flujo del principio activo al alimento es muy rápido se sitúa en zonas favorables para el desarrollo de los microorganismos patógenos evitando propagación.

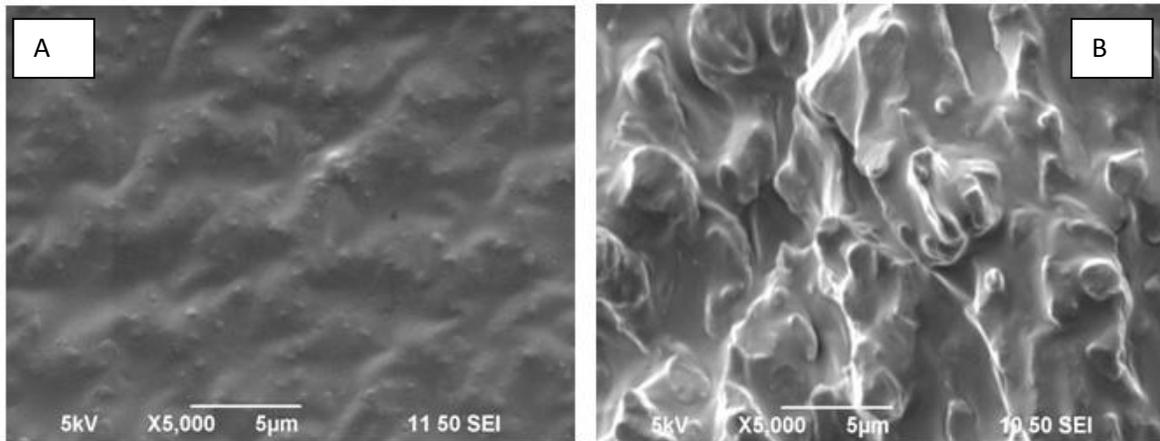


Fig 18. Microestructuras película de alginato

En el caso de la película de caseínato es diferente debido a su naturaleza proteica la cual tiene una parte hidrofílica y otra lipofílica, presenta una mejor distribución en toda la película, se atribuye principalmente a la desnaturalización de la proteína que favorece esta interacción, tiene una superficie ligeramente rugosa con distribución moderada de los glóbulos de aceite Fig 19 A), la parte transversal se observa una distribución laminar ligeramente compacta pero con distribución uniforme de los glóbulos de grasa entre láminas Fig 19 B), presenta una mejor distribución del aceite tanto en parte interna y externa, esta interacción permite que los metabolitos migren de manera gradual al alimento, protegiendo tanto el interior como la superficie, este proceso se conoce como desorción y difusión, es la distribución más deseable y la que garantiza una mayor protección del alimento.

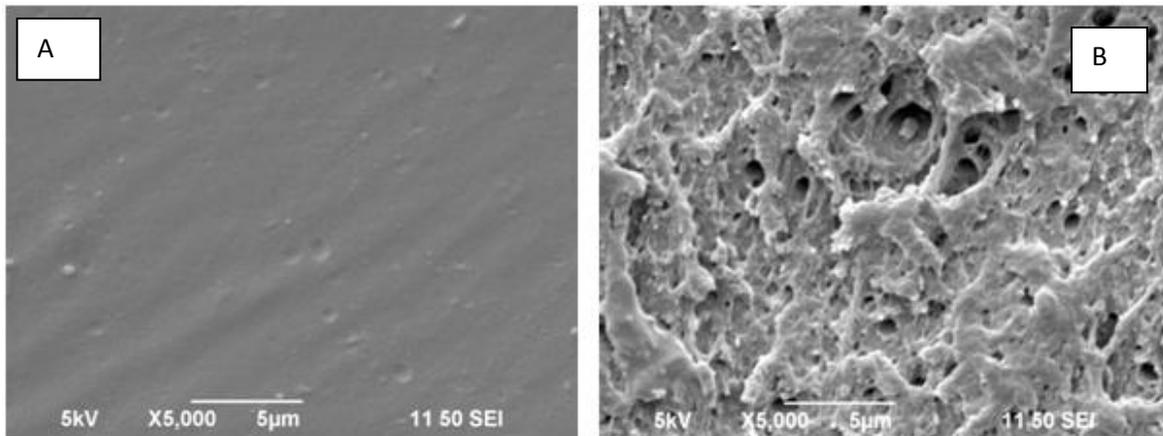


Fig 19. Microestructuras películas Caseínato

#### 4.13 Evaluación microbiológica de películas emulsionadas

La interacción entre los hidrocoloides evaluados y los aceites esenciales manifestaron variabilidad en la actividad antimicrobiana tabla 20. Para el alginato emulsionada con laurel, existe una diferencia significativa en la inhibición sobre el *Staphylococcus aureus* dada por el incremento en la concentración del aceite esencial, sin embargo la concentración no manifiesta ninguna influencia sobre el *Escherichia coli* y la *Salmonella Thypi*, donde los halos de inhibición no tienen incremento alguno. La película de alginato con aguacatillo si presenta la influencia de la concentración sobre *S. aureus* y *E. coli* pero no sobre Salmonella.

**Tabla 19. Evaluación microbiológica de películas**

Especies vegetales	Concentración (ug/mL)	Películas emulsionadas		
		<i>Staphylococcus aureus</i>	Diámetros de inhibición (mm)	
			<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella thypi</i>
Alginato de sodio y <i>Litsea glaucescens</i>	5	8 ± 1.35	10 ± 1.35	12 ± 1.35
	6	12 ± 1.35	10 ± 1.35	11 ± 1.35
Alginato de sodio y <i>Persea americana</i>	5	8 ± 1.35	6 ± 1.35	-
	6	13 ± 1.35	11 ± 1.35	-
Alginato de sodio	-	-	-	-
Caseinato de sodio y <i>Litsea glaucescens</i>	5	10 ± 1.35	8 ± 1.35	-
	6	12 ± 1.35	10 ± 1.35	6 ± 1.35
Caseinato de sodio y <i>Persea americana</i>	5	8 ± 1.35	6 ± 1.35	-
	6	8 ± 1.35	6 ± 1.35	-
Caseinato de sodio	-	-	-	-

El comportamiento de las películas de caseinato emulsionada con laurel es similar al de alginato en cuanto al *Staphylococcus aureus* y *Eschericia coli*, pero presenta muy baja acción sobre la *Salmonella typhi*, en el caso de la película emulsionada con aceite esencial de aguacatillo no manifiesta influencia de la concentración y los halos de inhibición son muy pequeños, lo que representa muy baja actividad antimicrobiana sobre las tres bacterias.

Los resultados obtenidos de la evaluación microbiana de las películas contrastan con los manifestados por los extractos evaluados de forma individual. El aguacatillo manifiesta buena actividad antimicrobiana sobre las bacterias de manera individual pero esta efectividad se ve drásticamente mermada por su interacción con los hidrocoloides. El laurel por el contrario se ve favorablemente influenciado por la conjunción con los compuestos de las películas, es decir existe un sinergismo entre ellos que se refleja en la evaluación microbiológica.

Existen muchos estudios que han investigado la actividad antimicrobiana de las películas conteniendo compuestos vegetales. Sin embargo, la mayoría de estos fueron realizados in vitro. El uso de películas comestibles emulsionadas con antimicrobianos naturales en quesos ofrece las siguientes ventajas. Previene la pérdida de humedad, previene la contaminación cruzada, reduce la oxidación lipídica, evita la pérdida de aromas y la obtención de olores extraños pero principalmente reduce la carga microbiana (Gennadios et al., 1997).



Fig 20. Quesillo con cubierta de película comestible

#### 4.15 Evaluación microbiológica del queso con recubrimiento emulsionado

En general el queso con cubierta de películas comestibles de alginato y caseinato de sodio (Fig 20), emulsionadas con los aceites esenciales de laurel (*Litsea glaucescens*) y aguacatillo (*Persea americana*) evaluadas mostraron muy buen

comportamiento respecto a la inhibición de los microorganismos especificados en

---

la norma NOM-121-SSA1-1994, descrita en el anexo A. No hubo crecimiento de ningún tipo de organismo especificado en la norma durante las primeras tres semanas de almacenamiento e inclusive algunos parámetros como el de hongos, levaduras, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, no fueron detectados sino hasta la cuarta semana en el quesillo con cubierta de alginato y los aceites esenciales de laurel y aguacatillo. Sin embargo, la película de alginato sin aceite esencial dio positivo tanto en *Escherichia coli* como *Salmonella tiphy* en la cuarta semana Tabla 20.

**Tabla 20. Evaluación microbiológica del quesillo con cubierta emulsionada**

Evaluación microbiológica del quesillo después de 4 semanas de aplicación de las películas.					
Película emulsionada	Parámetros evaluados de acuerdo a norma (NOM-121-SSA1-1994)				
	Hongos y Levaduras	<i>Staphylococcus aureus</i>	Coliformes totales	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella tiphy</i>
Alginato de sodio y <i>Litsea glaucescens</i>	<100 UFC	-	<300 UFC	-	+
Alginato de sodio y <i>Persea americana</i>	<100	-	<300	-	+
Alginato de sodio	<100	-	<300	+	+
Caseinato de sodio y <i>Litsea glaucescens</i>	<100	-	<300	-	+
Caseinato de sodio y <i>Persea americana</i>	<100	-	<300	+	+
Caseinato de sodio	<100	-	<300	+	+
Testigo	>300	-	>500	+	+

UFC: Unidades formadoras de colonias

(-) Negativo, (nula presencia del microorganismo)

(+) Positivo, (presencia del microorganismo)

A su vez las películas a base caseínato de sodio emulsionadas con los aceites esenciales antes mencionados dio positivo tanto para la película sin aceite esencial como la que contenía el aceite de aguacatillo, siendo solo la emulsionada con laurel la que logro inhibir el desarrollo de los patógenos hasta la cuarta

semana como se observa en la tabla 20. El testigo tuvo desarrollo de los microorganismos a partir de la segunda semana.

## CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio ponen de manifiesto la enorme fuente de principios activos que existen en la naturaleza, han sido utilizados por los habitantes de las comunidades en medicina tradicional desde épocas milenarias, las plantas nos brindan, la posibilidad de alimentación, curación y también medio de conservación de alimentos. En México y en particular en Oaxaca existe una gran diversidad vegetal a lo largo de las regiones del estado lo que representa una importante área de estudio en el campo de la inhibición microbiana sobre los alimentos.

Los aceites esenciales son una gran alternativa para el control del desarrollo microbiano en los alimentos debido a su constitución de terpenos, monoterpenos, aldehídos y algunos alcoholes.

Los principales compuestos con actividad antimicrobiana son el cineol,  $\alpha$ -pineno, el *p*-cimeno, carvacrol, estragol y thymol presentes en el aceite esencial de las plantas usadas como condimentos (laurel y aguacatillo). Logran interactuar en las partes vitales de las células microbianas, limitan su fuente de energía, intervienen en sus reacciones enzimáticas y saturan su membrana celular hasta colapsarla y causarle de esta forma la muerte. Sin embargo, los compuestos fenólicos que constituyen los extractos etanólicos manifestaron actividad baja o casi nula sobre las bacterias probadas.

La interacción entre los hidrocoloides que conforman las películas comestibles y los aceites esenciales son una alternativa eficiente para la conservación de alimentos con múltiples reacciones bioquímicas en su proceso de elaboración. Previene modificaciones a las características sensoriales y retarda reacciones deteriorativas.

Las propiedades de las películas y recubrimientos comestibles pueden utilizarse en una gran gama de alimentos dándole un valor agregado y al mismo tiempo prolongar su vida útil. La interacción película comestible y aceites esenciales

alargan la vida de útil del quesillo hasta cuatro semanas, lo que representa un incremento de 2 semanas más el alimento en condiciones de consumo. Sin embargo, el sabor se ve influenciado drásticamente, no así el aroma y el color del quesillo, por lo que se recomienda encaminar para trabajos próximos disminuir el efecto sobre el sabor del queso Oaxaca.

Cuando los principios activos llámense agentes antimicrobianos, antioxidantes, y nutrientes se añaden a las películas o recubrimientos comestibles, sus propiedades mecánicas, sensoriales y funcionales, pueden ser dramáticamente afectadas por lo que es necesario encaminar investigaciones hacia el mejoramiento de estas características.

## REFERENCIAS

- Alvarez B. A., Arroyo J., Cantón R., Nombela C., Sanchez P. M., (2000). Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clin. Microbiol Rev.* 13: 167-195.
- Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P., (2006), Chemical composition seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoecheas* L., ssp. *Stoecheas* essential oils from stem/leaves and flowers, *Journal Agriculture Food Chemical*, 54: 4364-4370.
- Bakkali F., Averbeck F., Averbeck D., Idaomar M., (2008), Biological effects of essential oils A- review, *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475.
- Basile, A., Senatore, F., Gargano, R., Sorbo, S., Del Pozzo, Vuotto, M. L., (2006), Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis italica*, Groutet et Burdet essential oils. *Journal Ethnopharmacol*, 107: 240-248.
- Bozquez M., E., (2006), Desarrollos de recubrimientos comestibles formulados con goma de mezquite y cera de candelilla para la conservación de frutas Depto. de Biotecnología, UAM Iztapalapa, Mexico DF., pp. 1-7.
- Braga P., Goetze M., Hermes G. C., (2004), Efeitos de extratos de plantas Silvestres da familia Solanaceae sobre o controle de *Brevicoryne brassicae* em couve (*Brassica oleracea* var. *Acephala*), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil, *Ciencia Rural*, 004: 971-978.
- Burt S., (2004), Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food – a review, *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.
- Camacho A. M., (2003), Actividad biológica en extractos y aceites esenciales, Facultad de Ciencias Experimentales, JAEN España, pp. 1-9.
- Canillac N., Mourey A., (2004), Effects of several environmental factors on the anti- *Listeria monocytogenes* activity of an essential oil of *Picea excelsa*, *International Journal of Food Microbiology*, 92: 95-103.
- Castillo J. I., Gonzalez, V., Aguilar H. J., Martinez G., Linares E., Bye R., Romero I., (2009), Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders, *Journal of ethnopharmacology* 122: 402-405.
-

Chopra I. (2007), The increasing use of silver-based products and antimicrobial agents: a useful development or a concern, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59: 587-590.

Chorianopoulos, N., Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Mitaku, S., Nychas, G. J., Haroutounian, S. A., (2004) Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species; Chemical composition and antibacterial activities against food borne pathogens, *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 52: 8261-8267.

Cowan, M. M., (1999), Plant products as antimicrobial agents clinical, *Mycrobiology Reviews*, no: 564-582.

Cueva E., Eynden V., (2008), Uso de las plantas en la alimentación, Herbario QCA, Quito, Ecuador, pp 67-70.

Del Valle V., Hernandez, M. P., Guarda A., Galloto M.J., (2005), Development of a cactus-mucilage edible coating (*Opuntia ficus indica*) and its application to extend strawberry (*Fragaria ananasa*) shelf life, *Food Chemistry*, 91: 751-756.

Ebrahimi S. N., Hadian J., Mirjalili M. H., Sonboli A., Yousefzadi M., (2008), Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages, *Food Chemistry*, 110: 927-931.

Gennadios A, Hanna M. A., Kurth L. B. (1997), Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: a review. *Food Sci Technol*, 30: 337–350.

González G., M., L., Pérez M., J., A., Pérez P., C., (2007), Evaluación sensorial de queso tipo Cheddar recubierto con un bioempaque elaborado a base de aislado de proteína del suero (WPI) y cera de abeja, Depto. Ingeniería Bioquímica, ITC, Celaya Gto. pp.1-7.

Gutierrez J., Barry C., Bourke P., (2008), The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients, *International Journal of Food Microbiology* 124: 91-97.

Hayes P. R., (1993), Microbiología e Higiene de los alimentos, Departamento de Microbiología, Universidad de Leeds, Uk. pp. 23-55.

Huerta B., Ponsa F., Ordoñez G., Fernández N., Peñalver P., (2005), Estudio de eficacia de aceites esenciales ante una infección experimental de *Salmonella enteritidis* en gallinas ponedoras en producción, *Departamento de sanidad animal, Universidad de Córdoba, Córdoba, España*, pp. 119-124.

Juven, B. J., Kanner, J., Schued, F., Weisslowiez, H., (1994), Factors, that interact with the antimicrobial action of Thyme essential oil and its active constituents, *Journal of Applied Bacteriology*, 76: 626-631.

Karbowiak, T., Debeaufort, F., Champion D., Voilley, A., (2006), Wetting Properties at the surface of iota-carrageenan-based edible films, *Journal of Colloid and Interface Science*, 294: 400-410.

Kristo, E., Biliaderis, C.G., (2006), Physical properties of starch nanocrystal-reinforced pullulan films. *Carbohydrate Polymers*, 68: 146–158.

Krochta J.M., Baldwin, E.A., & Nisperos-Carriedo, M.O., (Eds) (1994), "Edible coatings and films to improve food quality". Basel: *Technomic Publishing Company, Inc.*

Kukic J., Popovic V., Petrovic S., Mucaji P., Ciric A., Stojkovic D., Sokovic M., (2008), Antioxidant and Antimicrobial activity of *Cinara Cardunculus* Extracts, *Food Chemistry*, 107: 861-868.

Lira P. Di Leo, Retta D., Tkacik, E. Ringuélet J. Coussio J.D., van Baren C., Bandoni A.L.(2009), Essential oil and by-products of distillation of bay leaves (*Laurus nobilis* L.) from Argentina. *Industrial Crops and Products*, 30: 259–264.

Masotti, V., Juteau, F., Bessiere, J. M., Vicini, J., (2003) Seasonal and phonological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molineon* and its biological activities, *Journal Agriculture Food Chemical*, 51: 7115-7121.

Matasyoh J. C., Maiyo Z. C., Ngure R. M., (2008), Chemical compositions and antimicrobial activity of the essential oil *Coriandrum sativum*, *Food Chemistry*, pp. 1-11.

McHugh, T. H. y Krochta, J. M. (1994), Sorbitol-versus glycerol-plasticized whey protein edible films: integrated oxygen permeability and tensile property evaluation, *J. Agric. Food Chem.*, 42: 841-845

McMeekin T., Bowman J., McQuestin O., Mellefont L., Ross T., Tamplin M., (2008), The future of predictive microbiology: Strategic research, innovative applications and great expectation , *International Journal of Food Microbiology*, 30: 1-8.

Mohaboubi M., Hagui G., (2008), Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil, *Journal of Ethnopharmacology*, 119: 325-327.

Moreira M. R., Ponce A. G., Del Valle C. E., Roura S. I., (2004), Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen, *LWT*, 38: 565-570.

Muñoz M., Guevara L., Palop A., Tebera J., Fernandez P.S., (2009), Determination of the effect of plant essential oils obtained by supercritical fluid extraction on the growth and viability of *Listeria monocytogenes* in broth and food system using flow cytometry, *LWT*, 42: 220-227.

Mytle, N., Anderson, G. L., Doyle, M. P., Smith, M. A., (2006), Antimicrobial activity of clove (*Suzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on Chicken frankfurters, *Food Control*, 17: 102-107.

Nikolic, M., Terzic A., Jovcic B., Vegovic J., Golic N., Tipisirovic L., (2008), Characterization of lactic acid bacteria isolated from burkuljac, a homemade goats milk cheese, *International Journal of Food Microbiology*, 122: 162-170.

Nychas, G. J. E., Tassou, C. C., Skandamis, P., (2003), Antimicrobials from herbs and spices. In S. M. Roller (Ed), Natural antimicrobials for the minimal processing of food New York; CRC Press, *Wood Head Publishers*, pp. 176-200.

Oke F., Aslim B., Ozturk S., Altundag S., (2008), Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja coneifolia* Ten., *Food Chemistry*, 112: 874-879.

Oms-Oliu G., Soliva-Fortuny R., Bellos O.M., (2008), Using polysaccharide-based edible coatings to enhance quality and antioxidant properties of fresh-cut melon *LWT*, 41: 1862-1870.

Palmu T., P., S., Grosso F., R., C., (2005), Effect of edible wheat gluten-based films and coatings on refrigerated strawberry (*Fragaria ananassa*) quality, *Postharvest Biology and Technology*, 36: 199-208.

Pascual A. M. R., Calderon V., (2000), Microbiología alimentaria (metodología analítica para alimentos y bebidas) Díaz de Santos S. A., 2ª Ed., pp 281-290.

Phan The, D., Debeaufort F., Voilley A., Luu D., (2009), Biopolymer interactions affect the functional properties of edible films based on agar, cassava starch and arabinoxylan blends, *Journals of Food Engineering*, 90: 548-558 .

Ponce A. G., Roura S. I., Del Valle C. E., Moreira M. R., (2008), Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: In vitro and in vivo studies, *Postharvest Biology and Technology*, 49: 294-300.

Ravishankar S., Zhu L., Olsen C. W., McHugh H. T., Friedman M., (2009), Edible apple film wraps containing plant antimicrobials inactivate foodborne pathogens on meat and poultry products, *Food Microbiology and Safety*, 74: 440-445.

Rhim, J.W., Gennadios, A., Weller, C.L., Cezeirat, C., Hanna, M.A., (1998). Soy protein isolate – dialdehyde starch films. *Industrial Crops and Products*, 8: 195–203.

Rojas Graü, M. A., Soliva F. R., Martin B. O., (2009), Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits, *Food Science and Technology*, 20: 438-447.

Rojas M. A., Avena R. J., Olsen C., Friedman M., (2007), Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanicals, barrier and antimicrobial properties of alginate-apple puree edible films, *Journal of Food Engineering*, 81: 634-641.

Rojas O. A., (2009), "Hidrodestilación y caracterización del aceite esencial de plantas medicinales de Santa María Huitepec, Oaxaca, Departamento de Ingeniería del CIIDIR-IPN-Unidad, Oaxaca.

Saavedra M. Martínez M., (2001), Distribución de la familia Fabacea en la zona conurbada de Querétaro, México, Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales.

Salazar A. G., Reyes S. J., Brachet C., Pérez C. J., "Orquídeas y otras plantas nativas de la cañada Cuicatlan, Oaxaca, Mexico". Secretaria Técnica del Instituto de Biología de la UNAM, pp 130-160.

Sambuceti P., Gil P., Sánchez D., (2003), Las plantas Silvestres. Los remedios históricos dermatológicos, Historia de la dermatología, *Ibero-latino americana*, 079: 327-346.

Samir A. M., Abdelgaleil M. A., Abbassy A. S. Belal H., Mona A. A., Rasoul A., (2008), Bioactivity of two major constituents isolated from the essential oil of *Artemisia judaica* L., *Bioresource Technology*, 99: 5947- 5950.

Shan B., Cai Y. Z., Brooks J. D., Corke H., (2007), The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts, *Food Microbiology*, 117: 112-119.

Shapiro H. M., (2003), Practical flow cytometry. Fourth Edition. John Wiley, INC., Publication.

Sharapin N., (2000) Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos, *Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo*, 1ª Ed., pp 27-60.

Skaltsa, H. D., Demetzos, C., Lazari, D., Sokovic, M., (2003), Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* from Greece. *Phytochemistry*, 64: 743-752.

Skovgaard N., Knudsenvej J., (2007), Current topics in food microbiology, *International Journal of Food Microbiology*, 117: 228-230.

Tharanathan, R., 2003, Biodegradable Films and composite coatings: Past, present and future. *Trends Food Science Technology*, 14: 71-78.

Tassou, C. C., Dresinos, E. H., Nychas, G. J. E., (1995), Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria Monocytogenes* in model food systems at 4 and 10°C, *Journal of Applied Bacteriology*, 78: 593-600.

Tzung-Hsun Tsai, Tsung-Hsien Tsai, You-Chia Chien, Chi-Wei Lee, Po-Jung Tsai, (2008), In vitro antimicrobial activities against cariogenic Streptococci and their antioxidant capacities: A comparative study of green tea versus different herbs, *Food Chemistry*, 110: 859-864.

Villagomez Z. D. I., Ugalde V., Fuentes R., E., Pedriza I., R., (2006), Lechos de alginato y carboximetilcelulosa conteniendo tequila y brandy: efecto de la concentración de calcio y el tiempo de residencia, Sección de alimentos, Facultad de estudios superiores Cuautitlán, UNAM.

Villegas A., (1993), Quesos de pasta hilada: El mozzarella y el Oaxaca, Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo.

Wang Y. Ch., Hsu H. W., Liao W. L., (2008), Antibacterial activity *Melastoma candidum* D. Don, *LWT, food and Science and Technology*, 41: 1793-1798.

Yazaki K, (2006), ABC Transporters involved in the transport of plant secondary metabolites, *FEBS Letters*, 580: 1183-1191.

Zepeda L. G., Muñoz S., Perez M. A., 2006, Propiedades antifungicas y antibacterianas de la *Anona muricata* (Estudio en vitro), *Medicina Oral*, 2: 68-73.

## ANEXO A

### **NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-121-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. QUESOS: FRESCOS, MADURADOS Y PROCESADOS. ESPECIFICACIONES SANITARIAS.**

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Salud.

JOSE MELJEM MOCTEZUMA, Director General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, por acuerdo del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 3 fracción XXII, 13, 194 fracción I, 197, 401 BIS, 401 BIS 1, 401 BIS 2 de la Ley General de Salud, 3 fracción XI, 38 fracción II, 40 fracciones I, VI, VIII, XI, XIII, 41, 43, 47 fracción IV, 50 y 53 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 2o. fracción III inciso b), 347, 348 fracción I y demás relativos del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios; 8o. fracción IV y 13 fracción I del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud, y

#### PREFACIO

En la elaboración de la presente norma participaron los siguientes Organismos e Instituciones:

#### SECRETARIA DE SALUD

Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios  
Laboratorio Nacional de Salud Pública

SECRETARIA DE AGRICULTURA Y RECURSOS HIDRAULICOS (AHORA: SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA Y DESARROLLO RURAL)

Dirección General de Desarrollo Pecuario

#### SECRETARIA DE COMERCIO Y FOMENTO INDUSTRIAL

Dirección General de Políticas Comerciales

#### PROCURADURIA FEDERAL DEL CONSUMIDOR

Dirección General de Investigación Tecnológica

#### INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

#### UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
Facultad de Química

CAMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE TRANSFORMACION

CONFEDERACION NACIONAL GANADERA

CREMERIA COVADONGA, S.A.

DISTRIBUIDORA PRODUCTOS DE LECHE "NOCHE BUENA", S.A. DE C.V.

EVAPORADORA MEXICANA, S.A. DE C.V.

INDUSTRIAL PRODUCTOS DE LECHE "NOCHE BUENA", S.A. DE C.V.

LABORATORIO ICCABI, S.A. DE C.V.

LECHE INDUSTRIALIZADA CONASUPO, S.A. DE C.V.

## **INDICE**

0. INTRODUCCION
1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION
2. REFERENCIAS
3. DEFINICIONES
4. SIMBOLOS Y ABREVIATURAS
5. CLASIFICACION
6. DISPOSICIONES SANITARIAS
7. ESPECIFICACIONES SANITARIAS
8. MUESTREO
9. METODOS DE PRUEBA
10. ETIQUETADO
11. ENVASE Y EMBALAJE
12. TRANSPORTE
13. VENTA AL PUBLICO
14. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES
15. BIBLIOGRAFIA
16. OBSERVANCIA DE LA NORMA
17. VIGENCIA

### **0. Introducción**

La presente norma tiene como propósito, establecer las especificaciones sanitarias para los quesos: frescos, madurados y procesados; con el fin de reducir los riesgos de transmisión de enfermedades causadas por alimentos, así como propiciar que se procesen e importen productos de la calidad sanitaria necesaria para garantizar la salud del consumidor y la nutrición.

El logro de estos propósitos será posible mediante el cumplimiento de las disposiciones establecidas en el presente ordenamiento, así como de su vigilancia por parte de la Secretaría de Salud.

## 1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece las especificaciones sanitarias que deben cumplir los Quesos: Frescos, Madurados y Procesados.

1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el Territorio Nacional para las personas físicas o morales que se dedican a su proceso o importación.

## 2. Referencias

Esta norma se complementa con lo siguiente:

NOM-051-SCFI-1994 Etiquetado general para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasadas.\*

NOM-091-SSA1-1994 Leche pasteurizada de vaca. Especificaciones sanitarias.\*

NOM-092-SSA1-1994 Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.\*

NOM-109-SSA1-1994 Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.\*

NOM-110-SSA1-1994 Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

NOM-111-SSA1-1994 Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

NOM-112-SSA1-1994 Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.\*

NOM-113-SSA1-1994 Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

NOM-114-SSA1-1994 Método para la determinación de Salmonella en alimentos.

NOM-115-SSA1-1994 Método para la determinación de Staphylococcus aureus en alimentos.

NOM-117-SSA1-1994 Método de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, hierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrometría de absorción atómica.

NOM-120-SSA1-1994 Prácticas de higiene y sanidad para el proceso de alimentos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas.

NOM-000-SSA1-1995 Determinación de coliformes fecales (presuntiva Escherichia coli) por técnica del número más probable (NMP)\*\*

## 3. Definiciones

Para fines de esta norma se entiende por:

3.1 Aditivos para alimentos, aquellas sustancias que se adicionan directamente a los alimentos y bebidas, durante su elaboración, para proporcionar o intensificar aroma, color o sabor, para mejorar su estabilidad o para su conservación.

3.2 Buenas prácticas de fabricación, conjunto de actividades, procedimientos y normas relacionadas entre sí, destinadas a garantizar que los productos cumplan con las especificaciones de orden sanitario requeridas de y mantengan las especificaciones requeridas para su proceso y uso.

3.3 Envase, todo recipiente destinado a contener un producto y que entra en contacto con el mismo, conservando su integridad física, química y sanitaria.

3.4 Equipo sanitario, equipo diseñado para facilitar las labores de limpieza y saneamiento.

3.5 Etiqueta, todo rótulo, marbete, inscripción, imagen u otra forma descriptiva o gráfica ya sea que esté escrita, impresa, marcada, grabada en relieve hueco gravado y estarcida, adherida o anexa a un envase o empaque.

3.6 Fecha de caducidad, fecha límite en que se considera que un producto preenvasado almacenado en las condiciones sugeridas por el fabricante, reduce o elimina las características sanitarias que debe reunir para su consumo. Después de esta fecha no debe comercializarse ni consumirse.

3.7 Higiene, todas las medidas necesarias para garantizar la sanidad e inocuidad de los productos en todas las fases del proceso de fabricación hasta su consumo final.

3.8 Inocuo, aquello que no hace o causa daño a la salud.

3.9 Leche para consumo humano, producto proveniente de la secreción natural de las glándulas mamarias de las vacas sanas, o de otras especies animales. Se excluye el producto obtenido 15 días antes del parto y 5 días después de éste o cuando tenga calostro.

3.10 Límite máximo, cantidad establecida de aditivos, microorganismos, parásitos, materia extraña, plaguicidas, radionúclidos, biotoxinas, residuos de medicamentos, metales pesados y metaloides que no se deben exceder en un alimento, bebida o materia prima.

3.11 Limpieza, conjunto de procedimientos que tiene por objeto eliminar tierra, residuos, suciedad, polvo, grasa u otras sustancias objetables.

3.12 Materia extraña, aquella sustancia, resto o desecho orgánico o no que se presenta en el producto sea por contaminación o por manejo poco higiénico del mismo durante su elaboración, considerándose entre otros: excretas y pelos de cualquier especie, fragmentos de hueso e insectos, que resultan perjudiciales para la salud.

3.13 Metal pesado o metaloide, aquellos elementos químicos que causan efectos indeseables en el metabolismo aun en concentraciones bajas. Su toxicidad depende de las dosis en que se ingieran, así como de su acumulación en el organismo.

3.14 Métodos de prueba, procedimientos analíticos utilizados en el laboratorio para comprobar que un producto satisface las especificaciones que establece la norma.

3.15 Pasteurización, proceso al que es sometido el producto en una adecuada relación de temperatura y tiempo para destruir la flora bacteriana patógena y la casi totalidad de la flora banal.

3.16 Plaguicidas, sustancia o mezcla de sustancias utilizadas para prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier forma de vida que sea nociva para la salud, los bienes del hombre o el ambiente, excepto la que exista sobre o dentro del ser humano y los protozoarios, virus, bacterias, hongos y otros microorganismos similares sobre o dentro de los animales.

3.17 Proceso, conjunto de actividades relativas a la obtención, elaboración, fabricación, preparación, conservación, mezclado, acondicionamiento, envasado, manipulación, transporte, distribución, almacenamiento y expendio o suministro al público de productos.

3.18 Quesos, productos elaborados con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado.

3.19 Quesos frescos, productos que cumplen en lo general con lo señalado en el punto 3.18 y se caracterizan por ser productos de alto contenido de humedad, sabor suave y no tener corteza, pudiendo o no adicionarle ingredientes opcionales y tener un periodo de vida de anaquel corto, requiriendo condiciones de refrigeración.

3.20 Quesos madurados, alimentos que en lo general cumplen con lo señalado en el punto 3.18 y se caracterizan por ser de pasta dura, semidura o blanda, con o sin corteza; sometidos a un proceso de maduración mediante la adición de microorganismos, bajo condiciones controladas de tiempo, temperatura y humedad, para provocar en ellos cambios bioquímicos y físicos característicos del producto de que se trate, lo que le permite prolongar su vida de anaquel, los cuales pueden o no requerir condiciones de refrigeración.

3.21 Quesos procesados, productos que cumplen en lo general con lo establecido en el punto 3.18 y se caracterizan por ser elaborados con mezclas de quesos, fusión y emulsión con sales fundentes, aditivos para alimentos permitidos e ingredientes opcionales, sometidos a proceso térmico de 70 °C durante 30 segundos o someterse a cualquier otra combinación equivalente o mayor de tiempo y temperatura, lo que le permite prolongar su vida de anaquel.

3.22 Refrigeración, método de conservación físico con el cual se mantiene el producto a una temperatura máxima de 7 °C (280 K).

#### **4. Símbolos y abreviaturas**

Cuando en esta norma se haga referencia a los siguientes símbolos y abreviaturas se entiende por:

BPF buenas prácticas de fabricación

C.I. color index

°C grados Celsius

K grados Kelvin

g gramos

kg kilogramos

L levógiro

máx máximo

&micro;g microgramos

mg miligramos

ml mililitros

NMP número más probable

/ por

% por ciento

UF unidades de fenol

UFC unidades formadoras de colonias

pp. páginas

Cuando en la presente norma se mencione al:

Reglamento, debe entenderse que se trata del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.

## **5. Clasificación**

Los productos objeto de esta norma por su proceso se clasifican en:

### **5.1 Frescos**

5.1.1 Frescales: Panela, Canasto, Sierra, Ranchero, Fresco, Blanco, Enchilado, Adobado.

5.1.2 De pasta cocida: Oaxaca, Asadero, Mozzarella, Del Morral, Adobera.

5.1.3 Acidificados: Cottage, Crema, Doble crema, Petit Suisse, Nuefchatel.

### **5.2 Madurados**

5.2.1 Madurados prensados de pasta dura: Añejo, Parmesano, Cotija, Reggianito.

5.2.2 Madurados prensados: Cheddar, Chester, Chihuahua, Manchego, Brick, Edam, Gouda, Gruyere, Emmental, Cheshire, Holandés, Amsterdam, Butterkase, Coulomiers, Dambo, Erom, Friese, Fynbo, Havarti, Harzer-Kase, Herrgardsost, Huskallsost, Leidse, Maribo, Norvergia, Provolone, Port Salut, Romadur, Saint Paulin, Samsøe, Svecia, Tilsiter, Bola, Jack.

5.2.3 De maduración con mohos: Azul, Cabrales, Camembert, Roquefort, Danablu, Limburgo, Brie.

5.3 Procesados

5.3.1 Fundidos y

5.3.2 Fundidos para untar.

5.4 Otros quesos: frescos, madurados y procesados no considerados, deberán observar lo dispuesto en este ordenamiento.

## **6. Disposiciones sanitarias**

Los productos objeto de esta norma, además de cumplir con lo establecido en el Reglamento, deben ajustarse a las siguientes disposiciones:

6.1 La leche de vaca, cabra o de otras especies animales o sus mezclas deben estar libres de toda sustancia ajena a su composición y ser pasteurizada de acuerdo a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-091-SSA1-1994. Leche pasteurizada de vaca. Especificaciones sanitarias.

6.2 Las presentaciones del producto en porciones pequeñas para la venta a granel podrán ser envasadas previamente en la planta donde se elabora.

## **7. Especificaciones sanitarias**

Los productos objeto de este ordenamiento, deben cumplir con las siguientes especificaciones:

7.1 Organolépticas

7.1.1 Los quesos frescos o frescales son de consistencia desde untable hasta rebanable, de aroma y sabor característico sin olores y sabores ajenos.

7.1.2 Los quesos madurados son de consistencia desde blanda hasta extradura sin aromas y sabores ajenos, pueden presentar o no ojos típicos de fermentación o vetas coloreadas de los mohos empleados para su maduración.

7.1.3 Los quesos procesados en general cumplen con lo señalado en el punto 7.1.1.

7.2 Químicas

Los productos objeto de esta norma no deben rebasar 12 UF/g de fosfatasa residual.

7.3 Microbiológicas

TABLA 1

MICROORGANISMOS FRESCOS MADURADOS PROCESADOS\*

LIMITE MAXIMO

Coliformes fecales (NMP/g) 100 50 \* \_

Staphylococcus aureus (UFC/g) 1000 100 MENOS DE 100

Hongos y levaduras (UFC/g) 500 500+ 100++

Salmonella en 25 g AUSENTE AUSENTE AUSENTE

Listeria monocytogenes en 25 g NEGATIVO NEGATIVO NEGATIVO

Nota: Cuando la Secretaría de Salud, de acuerdo al muestreo y los resultados del análisis microbiológico detecte la presencia de Listeria monocytogenes, ordenará la realización de un plan de trabajo por parte del fabricante o importador para controlar la presencia de dicho microorganismo.

7.4 Metales pesados y metaloides

TABLA 2

Elemento MAXIMO (mg/kg)

Arsénico (As) 0,2

Plomo (Pb) 0,5

7.5 Materia extraña

Los productos objeto de esta norma deben estar exentos de materia extraña.

7.6 Aditivos para alimentos

Cloruro de calcio 0,02% máx

7.6.1 Los productos objeto de esta norma deben contener según corresponda, cultivos inocuos de bacterias y mohos característicos de la variedad del queso de que se trate.

7.6.2 Colorantes

7.6.2.1 En la elaboración de los quesos madurados y procesados objeto de esta norma, se permite el empleo de los siguientes colorantes naturales:

b-caroteno BPF

Clorofila BPF

Oleoresina de paprika BPF

Riboflavina BPF

Achiote o Anatto 10 mg/kg máx

Beta-apo-8'-carotenal 35 mg/kg máx

7.6.2.2 En los quesos Petit Suisse sólo se permite la presencia de colorante orgánicos sintéticos como efecto de transferencia de los ingredientes opcionales.

### 7.6.3 Conservadores

Se permite el empleo de los siguientes conservadores y en los límites que se señalan a continuación:

7.6.3.1 Para los quesos madurados prensados.

Acido sórbico o propiónico o sus sales de sodio o potasio, 0,1% máx

mezclados o individualmente (sólo en la superficie de los quesos).

Natamicina o Pimaricina (sólo en la superficie de los quesos). 0,002% máx

Nitrato de sodio o potasio (sólo para los quesos señalados en el 0,005% máx

punto 5.2.1 dentro de la pasta).

7.6.3.2 Para los quesos procesados:

Acido propiónico y sus sales de sodio o calcio, mezclados o 0,3% máx

individualmente.

Acido sórbico o sus sales de sodio o potasio, mezclados o 0,3% máx

individualmente

Nisina 0,00125% máx

7.6.3.3 Se permite el empleo de peróxido de hidrógeno en la elaboración de los quesos denominados Cheddar en una cantidad máxima de 0,05%.

7.6.3.4 Para los quesos no considerados en los puntos 7.6.3.1 y 7.6.3.2 sólo podrá aceptarse la presencia de ácido sórbico, ácido benzoico o sales de sodio o potasio de los ácidos anteriores, como efecto de transferencia de los ingredientes opcionales.

#### 7.6.4 Acidificantes

7.6.4.1 En la elaboración de los quesos frescos acidificados y quesos procesados se permite el empleo de los siguientes ácidos:

Acético Cítrico Láctico 40 g/kg (solos o mezclados con otros acidificantes, calculados como sustancias anhidras)

Fosfórico 9 g/kg (total de compuestos de fósforo añadidos, calculados como fósforo)

#### 7.6.5 Emulsificantes, Estabilizantes y Espesantes

7.6.5.1 Durante la fabricación de los quesos procesados se permite el empleo de los siguientes:

##### 7.6.5.1.1 Emulsificantes:

Pirofosfato de potasio 9 g/kg (total de fosfatos, calculados como fósforo)

Pirofosfato de sodio

Pirofosfato de calcio

Fosfato de calcio monobásico

Fosfato de sodio tribásico

Fosfato de sodio monobásico

Fosfato de sodio dibásico

Fosfato tribásico de calcio

Hexametfosfato de sodio

Metafosfato de potasio

Tripolifosfato de potasio

Tripolifosfato de sodio

##### 7.6.5.1.2 Estabilizantes

Carbonato cálcico 40 g/kg (solos o mezclados con otros

Citrato de potasio emulsificantes y acidificantes, calculados como

Citrato de sodio sustancias anhidras)

#### 7.6.5.1.3 Espesantes

Agar agar 8 g/kg (solos o mezclados con otros espesantes)

Alginato de amonio

Alginato de potasio

Alginato de propilenglicol

Carboximetil celulosa de sodio

Carragenina

Goma arábica

Goma de algarrobo

Goma de karaya

Goma guar

Grenetina

Pectina

7.6.5.2 Se permite el empleo de la lecitina como emulsificante para la elaboración de los quesos llamados Cottage, sola o mezclada con otros estabilizantes, en una cantidad máxima de 5 g/kg.

7.6.5.3 Se permite el empleo de las siguientes sustancias espesantes en la elaboración de los quesos denominados Cottage (en la mezcla de la crema solos o mezclados con otros espesantes): Acido algínico; alginato de calcio, potasio, propilen glicol o amonio; goma de algarrobo, carragenina, grenetina; goma guar; goma de karaya; carboximetil celulosa, en una cantidad máxima de 5 g/kg y además de caseinato de sodio, o potasio o calcio, solos o mezclados en una cantidad máxima de 30 g/kg.

7.6.5.4 Para los quesos procesados se permite la adición de caseinato de sodio, potasio o calcio solos o mezclados en una cantidad máxima de 30 g/kg.

#### 7.6.6 Saborizantes

En la elaboración de los quesos denominados Petit Suisse se permite el empleo de los saborizantes que contempla el Reglamento, de acuerdo a las BPF, además de los establecidos en el Acuerdo que da a conocer la lista de sustancias sintético artificiales que solas o mezcladas podrán utilizarse para la elaboración de saborizantes o aromatizantes sintético artificiales que se emplean en la industria de Alimentos y bebidas.

#### 7.6.7 Enzimas

En la elaboración de los quesos objeto de esta norma se permite el empleo de las siguientes enzimas de acuerdo a las BPF.

Enzimas de origen microbiano para cuajar la leche derivadas de:

Bacillus cereus

Endothia parasitica

Mucor miehei

Mucor pusillus

Pepsina derivada de estómagos de bovinos y porcinos

Quimosina derivada de la Escherichia coli K12 y Kluyveromices marcianus var lactis

## **8. Muestreo**

El procedimiento de muestreo para los productos objeto de esta norma, debe sujetarse a lo que establece la Ley General de Salud.

## **9. Métodos de prueba**

Para la verificación de las especificaciones sanitarias que se establecen en esta norma, se deben aplicar los métodos de prueba que se señalan en el Apartado de referencias.

## **10. Etiquetado**

La etiqueta de los productos objeto de esta norma, además de cumplir con lo establecido en el Reglamento y la Norma Oficial Mexicana correspondiente, debe sujetarse a lo siguiente:

10.1 Debe figurar la leyenda "Manténgase en refrigeración" o "Consérvese en refrigeración".

10.2 Cuando en la elaboración de los productos objeto de esta norma se emplee leche que no proceda de vaca, se indicará su origen.

10.3 Debe figurar la leyenda "Fecha de caducidad \_\_\_\_\_" (en el espacio en blanco citar la fecha, señalando día y mes).

## **11. Envase y embalaje**

### **11.1 Envase**

Los productos objeto de esta norma se deben envasar en recipientes de tipo sanitario, elaborados con materiales inocuos y resistentes a distintas etapas del proceso, de tal manera que no reaccionen con el producto o alteren las características físicas, químicas y organolépticas.

### **11.2 Embalaje**

Se debe usar material resistente que ofrezca la protección adecuada a los empaques para impedir su deterioro exterior, a la vez que facilite su manipulación, almacenamiento y distribución.

## **12. Transporte**

El transporte foráneo o local de los productos objeto de esta Norma Oficial Mexicana debe ser en vehículos que cuenten con el sistema de refrigeración o material térmico adecuado que conserve los productos a una temperatura máxima de 7 °C.

## **13. Venta al público**

La exhibición y venta de los quesos objeto de esta norma se permite en locales que tengan las condiciones de higiene, limpieza y que cuenten con equipo de refrigeración para conservar el producto a la temperatura máxima de 7 °C.

## **14. Concordancia con normas internacionales**

Esta norma no tiene concordancia con normas internacionales.

## **15. Bibliografía**

15.1 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1992. Ley Federal sobre Metrología y Normalización. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.

15.2 Secretaría de Salud. 1991. Ley General de Salud. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.

15.3 Secretaría de Salud. 1988. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.

15.4 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1993. NOM-008-SCFI-1993 Sistema General de Unidades de Medidas. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.

15.5 Codex Alimentarius. Abridged Version. 1989. FAO/OMS.

15.6 Code of Federal Regulations. 1994. Parts 133. U.S.A.

15.7 Food and Drugs Act and Regulations. 1989. Canada.

15.8 Food Legislation of the UK. 1993. Great Britain.

15.9 Cheese Varieties and Descriptions. 1963. U.S. Department of Agriculture. Agr. Handbook No. 54. U.S.A.

15.10 Summary of Evaluations Performed by the Joint. 1994. FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. U.S.A.

15.11 Ordennance Sur les exigences hygiéniques et microbiologiques relatives aux denrées alimentaires, objets usuels et biens de consommation. 1985. Suiza.

15.12 Ordennance Sur les substances étrangères et les composants dans les denrées alimentaires. 1986. Suiza.

15.13 Alais, Ch. Ciencia de la Leche. 1988. Principios de Técnica Lechera. Ed. C.E.C.S.A. México. pp. 482-487.

15.14 Compairé, F C. 1976. Quesos, Tecnología y Control de Calidad. Ed. Publicaciones de Extensión Agrícola. España.

15.15 Guss, L M. 1988. Los empaques son ventas. Editora Técnica, S.A. pp. 22-31.

15.16 Judkins, F. 1979. La Leche su Producción y Procesos Industriales. Ed. C.E.C.S.A., México. pp. 399-411

15.17 Obrien, L. 1986. Alternative Sweeteners, Ed. Marcel Dekker, Inc. New York, U.S.A. pp. 103-133.

15.18 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1981. NORMA-Z-013/02 Guía para la redacción, estructuración y presentación de las normas oficiales mexicanas. México, D.F.

15.19 Secretaría de Salubridad y Asistencia. 1974. Anteproyecto de Normas Sanitarias. Dirección General de Control Sanitario de Alimentos, Bebidas y Medicamentos. México, D.F.

15.20 Potter, N. 1984. Ciencia de los alimentos. Edutex, S.A. México, D.F. pp. 142-167.

15.21 Santos, M A. 1987. Leche y sus derivados. Ed. Trillas. México, D.F. pp. 177-181.

15.22 Veisseyre, R. 1972. Lactología Técnica. Ed. Acribia. España. pp. 344-347.

15.23 Wan, Dober. 1987. Conservas de productos de origen animal. Editorial Sintet, Barcelona, España. pp. 254-267.

## **16. Observancia de la norma**

La vigilancia en el cumplimiento de la presente norma corresponde a la Secretaría de Salud.

## **17. Vigencia**

La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor con carácter obligatorio a los noventa días siguientes a partir de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 15 de diciembre de 1995.- El Director General, José Meljem Moctezuma.- Rúbrica.

**Fecha de publicación: 23 de febrero de 1996.**

## ANEXO B

### a) Tensión

$$\sigma_{\max} = \frac{F_{\max}}{S}$$

$F_{\max}$ : Fuerza que es capaz de soportar

S: Sección transversal

### b) Porcentaje de elongación

$$\varepsilon_{rot} (\%) = \frac{L_f - L_0}{L_0} \times 100$$

$L_f$ : Longitud después del ensayo

$L_0$ : Longitud inicial

### c) Modulo de Young

$$E = \frac{\sigma_{\max}}{\varepsilon_{rot}}$$

Se evaluara como control una película sin la adición de aceite esencial

## ANEXO C

La WVTR se calcula como el cociente entre la pendiente de la curva (perdida de agua contra tiempo) y el área de la película expuesta, conociendo el espesor, la temperatura y el gradiente de presión.

$$WVTR = \frac{\text{Pérdida de agua}}{\text{Tiempo} \times \text{área}} = \frac{g}{h \times m^2}$$

Si este valor de WVTR lo dividimos entre las presiones parciales de vapor de agua de las dos caras de la película ensayada obtenemos la permeación.

$$\text{Permeación} = \frac{WVTR}{P_{A1} - P_{A2}} = \frac{g}{h \times m^2 \times KPa}$$

La presión parcial de vapor de agua por encima de la película ( $P_{A2}$ ) se considera cero, por la presencia de las sales desecantes y la intensidad de la renovación del aire mediante el ventilador. Por debajo de la película la ASTM E96 asume que  $P_{A1} = P_{A0}$  (Presión de vapor saturado) para películas con muy baja permeabilidad. Sin embargo McHugh et. al., 1993, encontró que para películas hidrofílicas esta aseveración es incorrecta porque impide alcanzar la humedad de equilibrio. Por lo tanto, para conocer  $P_{A1}$ , se debe conocer la humedad relativa exacta debajo de la película y para ello se usa la corrección propuesta por McHugh.

$$P_{A1} = P - (P - P_{A0}) e^{-\frac{WVTR \times R \times T \times Z}{P \times D}}$$

Donde:

$P_{A1}$ : Presión en la superficie interior de la película

$P$ : Presión atmosférica (Pa)

$P_{A0}$ : Presión en la superficie del agua o de vapor saturado (Pa)

$$P_{A0} = 4.84T^2 - 52.24T + 1449.63 \quad (T \text{ en } ^\circ\text{C})$$

WVTR: Flujo de agua en la capa de aire (moles/m<sup>2</sup>s)

R: Constante universal de los gases (8.314 J/Kmol)

T: Temperatura (en °K)

Z: Altura de la capa de aire (m)

D: Difusividad (en m<sup>2</sup>/s) del agua en aire

$$D = 22.441 \times 10^{-13} T^{2.8696} \quad (T \text{ en } ^\circ\text{K})$$

Finalmente, la permeabilidad al vapor de agua (WVP), de una película es calculada mediante la relación:

$$WVP = \text{Permeación} \times \text{espesor} \frac{g \times mm}{KPa \times h \times m^2}$$