



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**LIC. QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**TESIS**

**INHIBICIÓN DE *Staphylococcus aureus* Y *Bacillus cereus* POR CONTACTO DE VAPOR EN PELÍCULAS COMESTIBLES A BASE DE ALMIDÓN**

**PARA OBTENER EL TITULO DE  
LIC. QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA:**

**PQ.F.B. ALEJANDRA JUAREZ ROJAS**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**D.C. RAUL AVILA SOSA SANCHEZ**

**ASESOR DE TESIS:**

**M.C ROSA MARIA DAVILA MARQUEZ**

**ABRIL 2015**

## INDICE

RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	7
2. JUSTIFICACIÓN	8
3. OBJETIVOS	9
3.1 Objetivo general	9
3.2 Objetivos particulares	9
4. MARCO TEÓRICO	10
4.1 Deterioro de alimentos	10
4.2 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's)	11
4.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	14
4.4 <i>Bacillus cereus</i>	15
4.5 Métodos de conservación de alimentos	16
4.6 Antimicrobianos naturales	17
4.6.1 Aceites esenciales	18
4.6.2 Carvacrol	20
4.6.3 Cinamaldehido	21
4.6.4 Eugenol	21
4.6.5 Timol	22
4.7 Películas comestibles	24
4.8 Contacto por vapor	26
5. DIAGRAMA DE TRABAJO	28
6. MATERIALES Y MÉTODOS	29
6.1 Material	29
6.2 Material biológico	29
6.3 Equipos	29
6.4 Métodos	30
7. METODOLOGÍA	31
7.1 Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Bacillus cereus</i>	31
7.2 Elaboración de películas comestibles a base de almidón adicionadas con antimicrobianos naturales	31
7.3 Evaluación de la inhibición bacteriana	31
7.4 Elaboración de mezclas binarias	32

7.5 Elaboración de películas comestibles adicionadas con las mezclas binarias	32
7.6 Determinación del índice FIC	32
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
8.1 Evaluación de los antimicrobianos en películas comestibles	34
8.2 Evaluación de las mezclas binarias	34
8.3 Determinación del índice FIC	37
9. CONCLUSIONES	41
10. SUGERENCIAS	42
11. BIBLIOGRAFIA	43

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales géneros bacterianos en los alimentos	12
Tabla 2. Aceites esenciales y sus componentes con actividad antimicrobiana	18
Tabla 3. Principales componentes de los aceites esenciales	19
Tabla 4. Equipos utilizados	28
Tabla 5: Determinaciones y técnicas utilizadas	29
Tabla 6. Elaboración de mezclas binarias	31
Tabla 7: Valores del índice FIC para determinar el efecto de las mezclas binarias	32
Tabla 8. Concentraciones mínimas inhibitorias de los antimicrobianos naturales para <i>B. cereus</i> y <i>S. aureus</i>	33
Tabla 9. Evaluación de la inhibición de <i>B. cereus</i> y <i>S. aureus</i> en mezclas binarias de carvacrol y cinamaldehido	34
Tabla 10. Evaluación de la inhibición de <i>B. cereus</i> y <i>S. aureus</i> en mezclas binarias de carvacrol y timol	34
Tabla 11. Evaluación de la inhibición de <i>B. cereus</i> y <i>S. aureus</i> en mezclas binarias de cinamaldehido y timol	35
Tabla 12. Índice FIC para <i>B. cereus</i> en mezcla de carvacrol y cinamaldehido	36
Tabla 13. Índice FIC para <i>B. cereus</i> en mezcla de carvacrol y timol	36
Tabla 14. Índice FIC para <i>B. cereus</i> en mezcla de cinamaldehido y timol	36

Tabla 15. Índice FIC de mezclas binarias de carvacrol y cinamaldehido para *S. aureus* 37

Tabla 16. Índice FIC de mezclas binarias de carvacrol y timol para *S. aureus* 37

Tabla 17. Índice FIC de mezclas binarias de cinamaldehido y timol para *S. aureus* 38

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales técnicas de conservación de alimentos	17
Figura 2. Estructura química del carvacrol	20
Figura 3. Estructura química del cinamaldehido	21
Figura 4. Estructura química del eugenol	22
Figura 5. Estructura química del timol	23

## RESUMEN

Las películas comestibles son una nueva forma de poder preservar los alimentos, y al ser adicionadas con agentes antimicrobianos de origen natural, prolongarán aun más la vida de anaquel, y serán útiles para prevenir las ETA's.

El objetivo de este trabajo fue realizar películas comestibles de almidón adicionadas con carvacrol, cinamaldehido, eugenol, y timol, para evaluar la inhibición de bacterias Gram positivas como *B. cereus* y *S. aureus*, que son de los principales microorganismos que originan ETA's.

Las películas se realizaron formando una solución homogénea compuesta por almidón, sorbitol e hidróxido de sodio. A esta solución se le adicionó el antimicrobiano a diferentes concentraciones para después dejarlas secar en cajas petri. Una de las propiedades que caracterizan a los antimicrobianos utilizados, es que son compuestos fenólicos y volátiles, por lo que se aprovechó esta propiedad para inhibir los microorganismos, por medio de los vapores originados por la volatilización, en un entorno cerrado a pH 5, ya que a este pH tienen un mayor efecto antimicrobiano. La evaluación del efecto de las películas fue de forma cualitativa con la finalidad de obtener la concentración mínima con efecto bactericida. También se evaluó el efecto de mezclas binarias realizadas con los antimicrobianos que presentaron efectos bactericidas.

En los resultados obtenidos en este trabajo, las dos bacterias presentaron efecto bactericida a concentraciones iguales, teniendo como resultados, carvacrol 700 mg/L; cinamaldehido 600 mg/L; eugenol > 3000 mg/L y timol 700 mg/L.

En la evaluación de las mezclas binarias para *Bacillus cereus* se realizaron 16 combinaciones de las cuales solo en una mezcla de cinamaldehido con timol se obtuvo efecto sinérgico y el resto presento efecto aditivo. En el caso de *Staphylococcus aureus* se evaluaron 9 mezclas, en las cuales no se obtuvo ninguna mezcla con efecto sinérgico, sin embargo en la mayoría se obtuvo efecto aditivo.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) constituyen un importante problema de salud pública, con implicaciones sociales, económicas, políticas y culturales. Las ETA's causan principalmente trastornos en el tubo intestinal, con dolores abdominales, diarrea y vómito. Estas enfermedades son causadas por la ingestión de alimentos que contienen cantidades considerables de bacterias patógenas o de productos tóxicos (Bravo-Martínez, 2004). Por lo que, para conservar un alimento pueden emplearse métodos de destrucción de microorganismos o bien métodos que crean un ambiente desfavorable para el crecimiento de estos microorganismos (Cervera, 2003).

Una de los métodos más importantes que emplea la tecnología alimentaria en la prolongación de la vida útil de los alimentos es el uso de conservadores. Los cuales son sustancias de distinta composición que actúan inhibiendo la acción o el desarrollo y crecimiento de los agentes que deterioran los alimentos. Los conservadores se diferencian, según su naturaleza en químicos y biológicos. Los químicos, son ácidos, sales, u otros compuestos puros o mezclados con otras sales. Los biológicos, pueden proceder de varias fuentes, pueden ser de origen vegetal como los extractos de semillas y frutas; y aceites esenciales (Santos, 2004).

Los aceites esenciales son una mezcla de sustancias químicas aromáticas que al poseer propiedades antimicrobianas, en los últimos años se ha investigado una forma de aplicación de estas sustancias, y uno de los métodos alternativos es la incorporación de estos agentes antimicrobianos a películas comestibles (Soliva y Martin, 2001; Zekaria, 2010).

Las películas comestibles son definidas como una capa delgada formada sobre un alimento. Su función principal es controlar la pérdida de humedad y mantener la permeabilidad a gases, y al ser adicionadas con antimicrobianos representa una buena alternativa a este problema, ya que se mantendrá la integridad del alimento y se podrá disminuir la carga de microorganismos patógenos que puedan estar presentes (Ayranci y Tunc, 2001).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

El uso de películas comestibles a base de almidón se ha convertido en una forma innovadora y económica de poder proteger y mejorar la calidad de algunos alimentos, que al tener una gran cantidad de nutrientes son susceptibles a que se desarrolle una mayor carga de microorganismos patógenos, haciendo más rápida la descomposición del producto, causando algunas enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Por lo que las películas comestibles, al ser adicionadas con agentes antimicrobianos de origen natural nos permitirán aumentar la vida útil de los productos y la reducción de microorganismos patógenos, para poder así mejorar la seguridad alimentaria de los consumidores.

Algunos de los antimicrobianos naturales son compuestos volátiles, y gracias a esta característica son una posible alternativa para inhibir el crecimiento de microorganismos por contacto indirecto mediante su volatilización.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general:**

- Evaluar la inhibición por contacto de vapor de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* por películas comestibles de almidón adicionadas con carvacrol, cinamaldehído, eugenol y/o timol.

#### **3.2 Objetivos particulares:**

- Elaborar películas comestibles de almidón adicionadas con carvacrol, cinamaldehído, eugenol y timol a pH de 5.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) por contacto de vapor de películas comestibles de almidón adicionadas con carvacrol, cinamaldehído, eugenol y timol en *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*.
- Realizar películas comestibles de almidón con mezclas binarias de los antimicrobianos utilizados en la concentración mínima inhibitoria (CMI).
- Evaluar la inhibición por contacto de vapor de las películas comestibles de almidón adicionadas con mezclas binarias de carvacrol, cinamaldehído, eugenol y/o timol sobre *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*.

## **4. MARCO TEÓRICO**

### **4.1 Deterioro de alimentos**

Todos los alimentos que proceden de las plantas o de algunos animales, son de naturaleza biológica. Después de un tiempo, en condiciones de ambiente natural, sufren una serie de deterioro que modifican las características originales del alimento, provocando cambios de aspecto, olor y sabor, llegan a producir su alteración nutritiva y sanitaria, obligando a desecharlos (Silla Santos, 2004).

El grado de deterioro puede ser muy rápido o relativamente lento. Algunos alimentos presentan un proceso de deterioro que puede ser muy lento como es el caso de las semillas o frutos secos; o extremadamente rápido, lo que impide que puedan ser utilizados como alimentos pocas horas después. El deterioro puede tener un origen intrínseco, es decir, esencial del propio alimento y su respuesta metabólica. Pero también puede tener un origen extrínseco, ya sea éste de causa física, química o biológica (Salas-Salvado y col, 2005).

El deterioro físico se asocia a cambios ocurridos en el alimento, como, por ejemplo, golpes y cortes (los cuales pueden inducir deterioro bioquímico) ruptura o pérdida de la integridad, deshidratación superficial por mal empaque y quemado del frío en vegetales, ganancia de humedad (que puede inducir al deterioro biológico), transferencia de olores entre productos, pérdida de peso por deshidratación, quemado por exceso de cocción y daños causados por plagas (Santos, 2004).

El deterioro químico se manifiesta especialmente durante los procesos de almacenamiento de los alimentos. Entre los cambios más notables se encuentran: el pardeamiento no enzimático o reacción de Maillard, que consiste en una serie de reacciones complejas entre azúcares y compuestos nitrogenados, las cuales generan pigmentos marrones, en general el calor y la desecación lo favorecen. Otro de los cambios es el enranciamiento de lípidos, que se produce por reacciones de hidrólisis y oxidación, ocurre la formación de compuestos volátiles, que dan olores y gustos característicos. El enranciamiento depende de la estructura de los lípidos, siendo más frecuente en grasas insaturadas (Salas-Salvado y col, 2005).

El deterioro de alimentos más importante son los del tipo biológico, en donde se pueden clasificar en los de origen intrínseco (enzimas), y los extrínsecos (microorganismos). En el deterioro intrínseco generalmente las enzimas sobreviven a los propios organismos, pudiendo incluso aumentar su actividad, algunas enzimas cambian la textura de los alimentos, pero pueden acabar provocando su descomposición. El deterioro de origen extrínseco es causado por microorganismos como bacterias, hongos y levaduras. Estos microorganismos consumen los nutrientes presentes en el alimento, multiplicándose y produciendo diversas sustancias como consecuencia de su metabolismo, las cuales pueden ser tóxicas para el ser humano. Ello se manifiesta, algunas veces, por la generación de malos olores, sabores, cambios de color y textura por lo que el deterioro por microorganismos es de especial importancia desde el punto de vista de salud pública, ya que ellos originan la mayoría de las ETA's (Salas-Salvado, 2005, Barreiro y col, 1994).

#### **4.2 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's)**

Las ETA's son infecciones ocasionadas por distintas bacterias, hongos y parásitos, y constituyen un importante problema de salud pública debido al incremento en su ocurrencia. También se considera ETA's a las intoxicaciones causadas por contaminantes químicos como metales pesados y compuestos orgánicos; sin embargo, las causas más frecuentes de intoxicación de origen alimentario son por microorganismos (Chin, 2001, Armada y Oliver, 2007).

Todos los alimentos se contaminan con microorganismos, la mayoría de los cuales están en la superficie de los alimentos. Los principales microorganismos que se encuentran en los alimentos son las bacterias; las cuales se pueden clasificar en dos clases: bacterias contaminantes, que reducen el valor nutritivo y hacen incomedible al alimento; y bacterias patógenas, que producen enfermedades al ser humano (Granados, 1984). En la tabla 1 se mencionan las principales bacterias patógenas que se pueden encontrar en los alimentos.

Tabla1: Principales géneros bacterianos en los alimentos

<b>Tipo de bacteria</b>	<b>Género</b>
Gram negativos: Bacilo microaerofilos espirales o curvos	<i>Campylobacter</i>
Gram negativos: Aerobios de forma bacilar a cocacea	<i>Brucella, Flavobacterium, Moraxella, Pseudomonas</i>
Gram negativos: Bacilos anaerobios facultativos	<i>Aeromonas, Enterobacter, Escherichia, Proteus, Salmonella, Serratia, Shigella, Vibrio, Yersinia</i>
Gram positivos: Cocos	<i>Staphylococcus</i>
Gram positivos: Bacilos formadores de endosporas	<i>Bacillus, Clostridium</i>
Gram positivos: Bacilos regulares no esporulados	<i>Lactobacillus, Listeria</i>

(Escriche y Domenech, 2006)

Algunos factores que pueden beneficiar el crecimiento de microorganismos patógenos y por lo tanto ocasionar ETA's son (Bravo-Martinez, 2004):

- 1) Calentar, cocinar o mantener los alimentos incorrectamente
- 2) No refrigerar los alimentos de forma adecuada
- 3) Personas infectadas que lleven mala higiene en casa o en donde trabajan
- 4) Preparar alimentos sin el debido cuidado, con un día o más por adelantado, antes de servirse
- 5) Agregar ingredientes crudos o contaminados a los alimentos sin cocinar
- 6) Dejar que los alimentos pasen demasiado tiempo a temperaturas inadecuadas
- 7) No recalentar los alimentos a temperaturas que maten las bacterias
- 8) Permitir la contaminación cruzada por alimentos crudos
- 9) Equipo mal lavado o mal desinfectado, o personas que manejan incorrectamente los alimentos
- 10) Deficiente desinfección de legumbres, frutas y verduras

Es muy importante recalcar e insistir que las ETA's se pueden prevenir, y son provocadas generalmente por descuido y malos hábitos de higiene.

Según el mecanismo de acción de los microorganismos patógenos sobre los alimentos, las enfermedades alimentarias se clasifican en (Armada y Oliver, 2007):

- Infecciones alimentarias: se producen cuando se consumen alimentos que contienen microorganismos patógenos. Estos colonizan el tracto digestivo y causan una lesión tisular.
- Infestaciones alimentarias: son causadas por formas parasitarias.
- Intoxicaciones alimentarias: son resultado directo de la ingestión de alimentos que contienen toxinas producidas durante el crecimiento microbiano en los alimentos.
- Toxiinfecciones alimentarias: son una combinación de las dos anteriores, de modo que se ingiere alimentos con microorganismos patógenos que posteriormente desarrollan toxinas en el organismo.

Una vez que los alimentos contaminados microbiológicamente son ingeridos, existe una fase que precede a la aparición de los primeros síntomas, el periodo de incubación oscila entre horas y días. Los síntomas producidos dependen de la clase de microorganismo involucrado en la enfermedad. Las enfermedades de origen alimentario se diagnostican por los síntomas y de pruebas de laboratorio específicas que logran identificar al microorganismo causante. Las enfermedades microbianas de origen alimentario pueden dar lugar a brotes, que se producen cuando un grupo de personas consume un alimento contaminado y dos o más de ellas contraen la misma enfermedad. Con frecuencia, en un brote concurren una serie de circunstancias relacionadas con la manipulación y conservación del alimento involucrado. Algunos casos de enfermedades microbianas de origen alimentario no son brotes reconocidos sino casos individuales o esporádicos (Pascual, 2005).

La mayoría de las infecciones transmitidas por alimentos se deben a especies bacterianas del género *Salmonella*, *Campylobacter* y *Escherichia coli*. Además de enfermedades infecciosas, también existen otras ocasionadas por la presencia de toxinas producidas por algunos microorganismos al crecer en un alimento, como es el caso de las especies bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* y *Bacillus cereus* (Pascual, 2005).

### 4.3 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* son cocos Gram positivos, de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, que se agrupan de forma irregular (racimo de uvas). Son bacterias inmóviles, no forman esporas, no poseen cápsula, son catalasa positiva, coagulasa positiva y DNasa positiva. En los medios de cultivo crecen de 18 a 24 horas de incubación formando colonias pequeñas de 1 a 3 mm de diámetro, las colonias son lisas, elevadas, brillantes y de bordes enteros, presentan una consistencia cremosa, con una coloración amarillenta o dorada. En agar sangre presenta un halo de  $\beta$ -hemólisis alrededor de la colonia. Son bacterias muy resistentes al calor y la desecación que pueden crecer en medios con elevada salinidad (Pahissa, 2009).

*Staphylococcus aureus* es un importante patógeno que causa una gran variedad de síndromes clínicos, dentro de las principales están las intoxicaciones alimentarias debido a la producción de enterotoxinas que son estables a temperaturas de ebullición, la cual se excreta en los alimentos antes de que estos sean consumidos; el tiempo de incubación es muy corto, de dos a cuatro horas después de la ingestión y los síntomas suelen durar poco tiempo (Koneman y Allen, 2008; Ingraham J; Ingraham C; 1998). Los síntomas que suelen presentarse en esta intoxicación son: vómito, diarrea, espasmos abdominales y náuseas (Gil, 2010).

La mayoría de las intoxicaciones tiene su origen durante la elaboración de un alimento o su almacenamiento, así, los *Staphylococcus aureus* suelen contaminar los alimentos a partir de las personas que los preparan, ya que se encuentran habitualmente en mucosa o en la piel. El 25 - 40 % de la población es portadora asintomática de *Staphylococcus aureus* (Gil, 2010).

Algunos de los alimentos ligados a intoxicaciones por *Staphylococcus aureus* son carnes, aves, pescados y mariscos, salsas, pasteles, ensaladas, huevo, leche y derivados. Debido a que la enterotoxina es termoestable, la cocción de los alimentos no va a eliminar la toxina (Mencias y Mayero, 2000).

Las medidas preventivas constituyen la vía principal para controlar la intoxicación, ya que el tratamiento con antibióticos no tiene ninguna utilidad debido a que los síntomas están causados por la toxina y no por el desarrollo del microorganismo.

Por otro lado, las medidas preventivas son fáciles de ejecutar, ya que un cuidadoso lavado de manos puede evitar la transmisión del *Staphylococcus* a los alimentos (Ingraham J e Ingraham C, 1998).

#### **4.4 *Bacillus cereus***

*Bacillus cereus* es una bacteria perteneciente a la familia de las *Bacillaceae*. Son microorganismos de forma bacilar y miden aproximadamente de 1-1.2 por 3-5  $\mu\text{m}$ . Son esporulados, y normalmente móvil por flagelos peritricos, aunque existen variantes inmóviles. Las colonias crecidas en agar tienen aspecto mate y escarchado. Esta bacteria es anaerobia facultativa, Gram positiva, catalasa positiva. Es un microorganismo ubicuitario, abundante en la naturaleza. Se encuentra frecuentemente en el suelo, polvo, vegetales, cereales, harinas, especias, plantas y en algunos alimentos crudos o procesados. En condiciones normales y cuando su número es limitado, no se considera patógeno; sin embargo, es capaz de producir enfermedades en el hombre si concurren ciertas condiciones (Forbes, 2009).

Al igual que *S. aureus*; *Bacillus cereus* puede causar intoxicaciones alimentarias. Los síndromes producidos por *B. cereus* se debe a dos tipos distintos de toxinas (Pascual A. M y Calderon V, 2000):

- Toxina diarreica
- Toxina emética

La toxina diarreica, es una molécula proteica que se elabora en la fase exponencial del crecimiento. Se libera en los alimentos o en el intestino delgado. Se puede inactivar por la exposición a 56 °C durante 30 minutos, es sensible a la acción de ácidos y álcalis. La toxina emética es un pequeño péptido con peso molecular inferior a 5000 Dalton. Es resistente al calor (120 °C durante 90 minutos), a los ácidos, álcalis y enzimas proteolíticas. Se produce en la fase estacionaria del crecimiento. Por sus características, esta toxina es la que con más frecuencia se ve involucrada en casos de intoxicación (Koneman y Allen, 2008).

En el síndrome diarreico, los síntomas se presentan entre las 8 – 16 horas. Se manifiesta clínicamente con diarrea acuosa profusa, dolor abdominal, nauseas, rara vez vómitos y tenesmo rectal. Los síntomas desaparecen, normalmente, antes de 24

horas. En el síndrome emético los síntomas se presentan entre los 30 minutos y las 6 horas que siguen a la ingestión del alimento. Van acompañados principalmente de náuseas y vómitos, con o sin diarrea o dolor abdominal (Pascual A. M y Calderón V, 2000).

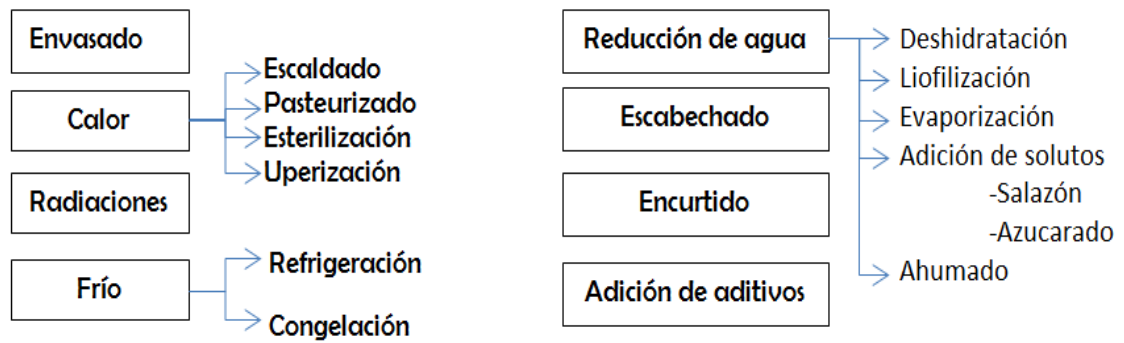
Las intoxicaciones asociadas con *B. cereus* puede evitarse mediante la cocción suficiente de los alimentos, sobre todo las carnes y con un almacenamiento refrigerado correcto (Koneman y Allen, 2008).

#### **4.5 Métodos de conservación de alimentos**

Como ya se menciona anteriormente las razones del deterioro de los alimentos son diversas. Por un lado, se pueden contaminar por microorganismos procedentes del exterior; por otro lado, la acción de diferentes factores físicos y químicos pueden alterar la estructura química, y ocasionar pérdidas de sabor, textura y coloración natural e incluso del valor nutritivo (Armada y Oliver, 2007).

La conservación de alimentos se basa en la manipulación de las condiciones ambientales para disminuir o eliminar el crecimiento de microorganismos. Diversos métodos de conservación, permiten aumentar la vida útil de los alimentos, disminuyendo la carga de microorganismos presentes (López-Barreras, 2007; Gil, 2010)

Los métodos de conservación pueden dividirse en dos grupos: físicos y químicos: Los métodos físicos modifican menos el valor nutritivo y la calidad sensorial del alimento. Los métodos químicos se logran por la adición de sustancias que producen una transformación química del producto; bajo esta denominación a veces se incluye el uso de aditivos alimentarios que es, en rigor, un recurso tecnológico para mejorar la estabilidad y conservación de los alimentos más que un método de conservación propiamente dicho (Hernández, 1999).



(Armada y Oliver, 2007).

Figura 1: Principales técnicas de conservación de alimentos

Como se puede observar en la figura 1 se muestran las principales técnicas de conservación aplicadas en la industria alimentaria. Sin embargo en los últimos años la técnica mas utilizada es la adición de aditivos. Los aditivos se encuentran hoy en día en prácticamente todos los alimentos y se añaden no sólo para evitar la descomposición por el crecimiento microbiano, sino también para mantener las condiciones físico-químicas y evitar la oxidación (Morcillo y col, 2013).

Los aditivos pueden ser sintéticos y naturales. Los aditivos sintéticos son estructuras químicas sintetizadas en el laboratorio. En la mayoría de los países sólo se pueden utilizar como aditivos alimentarios los compuestos que hayan sido comprobados de modo exhaustivo hasta demostrar su seguridad. Los aditivos naturales son sustancias químicas contenidas en las especias, o en aceites esenciales con una actividad multifuncional no limitada a su acción conservadora (Bello-Gutiérrez, 2000; Morcillo y col, 2013).

#### 4.6 Antimicrobianos naturales

La presión pública para la disminución del uso de sustancias de origen sintético en la industria alimentaria ha llevado a la búsqueda de antimicrobianos alternativos de origen natural, tales como los extractos de plantas. Los principales agentes naturales antimicrobianos son los aceites esenciales de las hierbas aromáticas y especias (Ayala-Zavala y col, 2005; Soriano del Castillo, 2007).

Los antimicrobianos naturales, constituyen cada vez una nueva forma de garantizar alimentos seguros, manteniendo inalterables la calidad del alimento. Estos antimicrobianos pueden ser compuestos sintéticos adicionados de manera intencional o de ocurrencia natural que pueden ser utilizados comercialmente como aditivos para la preservación de los alimentos (Bauchet y Golden, 1989).

Los antimicrobianos de origen natural pueden clasificarse por su origen: 1) Animal, que incluyen proteínas, enzimas líticas tales como lisozima, hidrolasas como lipasa y proteasa; 2) Microbiano; 3) Vegetal, que incluye los extractos de plantas y aceites esenciales (Rodríguez, 2011):

#### 4.6.1 Aceites esenciales

Los aceites esenciales de las plantas aromáticas son una mezcla compleja de muchos componentes. En muchos de ellos se han encontrado entre 100 y 150 compuestos y en algunos más de 300. Estas sustancias aromáticas se encuentran concentradas en diferentes partes de la planta: hojas, raíz, flores, tallo y semillas. Estos aceites son compuestos volátiles, insolubles en agua y poseen propiedades terapéuticas; tienen aplicación en aromaterapia, cosméticos, perfumes y el área farmacéutica. (Olaya y Méndez, 2003; Primo, 2007). En la tabla 2 se muestran algunos de los principales aceites esenciales.

Tabla 2: Aceites esenciales y sus componentes con actividad antimicrobiana

Nombre científico	Nombre común	Parte	Componente
Cinnamon	Canela	Hojas	Carvacrol
Origanum	Oregano	Hojas	Carvacrol
Syzygium aromaticum	Clavo	Corteza Hojas	Eugenol
Thymus vulgaris	Tomollo	Flor Hoja	Timol
Eucalyptus globulus	Eucalipto	Hoja	Cineol

(Zekaria, 2010)

Los aceites esenciales derivados de plantas son conocidos por su elevada actividad antimicrobiana contra un amplio rango de bacterias y hongos; sobre todo sobre bacterias Gram positivas; además de potenciar la actividad antioxidante de los propios productos tratados. Estos compuestos pueden ser letales para las células microbianas o simplemente servir como inhibidores de la producción de metabolitos. La acción de los antimicrobianos dependen de gran medida del pH, cuanto más ácido es un alimento, más activo es contra los microorganismos (Bello-Gutiérrez, 2000; Rodríguez, 2011).

La función conservadora que los aceites esenciales tienen se debe a la composición que poseen, estos están caracterizados por dos o tres componentes mayoritarios, usualmente oxigenados, con una concentración entre el 20 y 70% comparados con el resto de los componentes que están presentes en mucho menor proporción, algunos de estos aceites están constituidos por monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos (Rodríguez, 2011; Guarnizo y col, 2009).

En la tabla 3 se mencionan algunos de los principales componentes de los aceites esenciales, el cual el grupo de los fenoles posee el coeficiente antibacteriano más elevado, luego siguen los otros grupos moleculares. Dentro del grupo de los fenoles los que presentan mayor actividad antimicrobiana es el carvacrol, timol y eugenol. El siguiente grupo con mayor actividad son los derivados del finilpropano en el cual destaca el aldehído cinámico (Romero, 2004).

Tabla 3: Principales componentes de los aceites esenciales

	Propiedades	Nombre común	Principio activo
Fenoles	Estimulantes, bactericidas, fungicidas, inmunomodulantes	Tomillo, mejorana, orégano, albahaca, clavo de olor	Timol, carvacrol, eugenol, mentol, borneol
Derivados del fenilpropano	Estimulantes, antisepticos, antiespasmódicos	Canela, clavo, albahaca, anis, nuez moscada	Aldehído cinámico, metileugenol, anetol, miristicina
Cetonas	Citofilactico, mucolitico, cicatrizante	Menta, romero	Pinocarvona, verbenona, pulegona, mentona, carvona
Aldehídos	Sedantes, antisepticos	Te limón, citronela, palmarosa	Neral, geranial
Alcoholes (monoterpénicos, sesquiterpénicos)	Energetizantes, antimicrobianos, antivirales, diureticos	Lavanda, palo de rosa, eucalipto, cedro	Linalol, citronelol, mentol, cedro, santolol, nerolidol
Esteres	Sedantes, antiespasmódicos, antifúngicos	Manzanilla, lavanda, salvia	Acetato de camazuleno,

(Romero, 2004)

#### 4.6.2 Carvacrol

El carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) es un compuesto fenólico presente en el aceite esencial del orégano (60-70%) y del tomillo (45%). Es un líquido incoloro, ligeramente soluble en agua y soluble en etanol y éter. Es una sustancia con actividad antibacteriana, antifúngica, antihelmíntica, insecticida, analgésico y antioxidante. Actualmente es empleado como desinfectante y como conservador de comida, no tiene riesgos tóxicos a largo plazo, sus efectos citotóxicos son la razón por la cual funciona como un agente antimicrobiano y antiséptico. En la figura 2 se muestra la estructura química del carvacrol (Yagasaki y col, 2004; Ahmad y Aqil, 2009; Amadio y col, 2011).

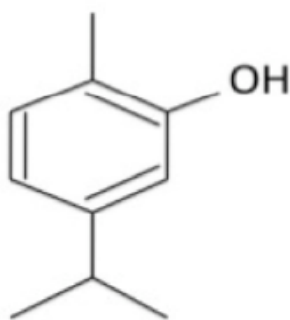


Figura 2: Estructura química del carvacrol

El carvacrol en su mecanismo de acción es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias, permitiendo la salida de liposacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática. Cuando la concentración de carvacrol aumenta, mayor cantidad de este componente es acumulado en la membrana y por consiguiente el daño a la membrana es mayor (García, 2008).

#### 4.6.3 Cinamaldehido

El aceite esencial de la canela consiste en un 60 a 75 % de cinamaldehido el cual es el responsable de brindarle su sabor y olor característico. El cinamaldehido es un hipotensor, espasmolítico e incrementa el flujo sanguíneo; presenta actividad antifúngica, antibacteriana y antiviral (Fonnegra y Jiménez, 2007).

El cinamaldehido tiene fórmula molecular  $C_9H_8O$  y masa molecular 136.2 g/mol, en la figura 3 se muestra la estructura química del cinamaldehido; este se encuentra presente en la naturaleza, y está compuesto por un aldehído insaturado unido a un grupo fenil; por ello se debe su aromaticidad. A temperatura ambiente es un líquido aceitoso de color amarillo pálido, y presenta baja solubilidad en agua, siendo muy soluble en aceites.

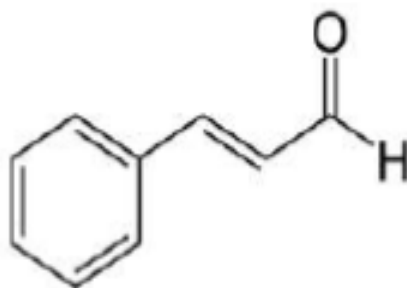


Figura 3: Estructura química del cinamaldehido

#### 4.6.4 Eugenol

Eugenol con formula  $C_{10}H_{12}O_2$  es un derivado fenólico que se encuentra del 80 – 85 % en el aceite esencial del clavo de olor, puede extraerse también de pimienta, hojas de laurel, canela y alcanfor. Es de consistencia líquida aceitosa con aroma característico, es poco soluble en agua y soluble en alcohol (González, 2002).

Este compuesto es usado como agente aromático en una gran variedad de productos farmacéuticos y alimenticios, pero su principal aplicación es como componente de cementos dentales en combinación del óxido de zinc. Además presenta actividad antimicrobiana frente a diversos microorganismos y cierta actividad antiagregante y antipirética. En la figura 4 se muestra la estructura química del eugenol (Rojo, 2008).

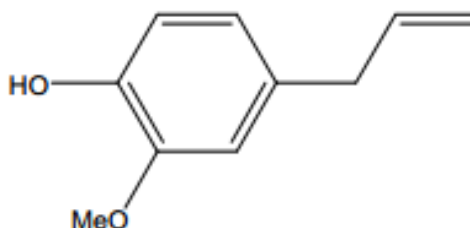


Figura 4: Estructura química del eugenol

#### 4.6.5 Timol

El timol (2-isopropil-5-metilfenol) es un componente químico, el cual su estructura es similar a la del carvacrol cambiando únicamente la posición del grupo hidroxilo por lo que son isómeros, en la figura 5 se muestra la estructura química. Pertenece a la

familia de los compuestos fenólicos monoterpénicos con capacidad insecticida, bactericida, fungicida y nematocida. Este es el componente principal del tomillo se encuentra en un porcentaje mayor del 50%; siendo mayor su proporción que la del carvacrol. Es una sustancia cristalina incolora con olor característico (Ardila y col, 2009).

El timol al igual que el carvacrol tiene efectos antioxidantes y efectos antimutagénicos. Por su sabor agradable se usa en la formulación de enjuagues bucales y pastas dentales (Ortega y col, 2011).

El timol es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias, permitiendo la salida de polisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana. Su efecto inhibitorio es mayor a pH ácido, ya que a valores bajos de pH el agente antimicrobiano no está disociado, logrando unir mejor las partes hidrofobias de las proteínas y, por lo tanto, facilitando la disolución de la fase lipídica de la membrana (García-García, 2008).

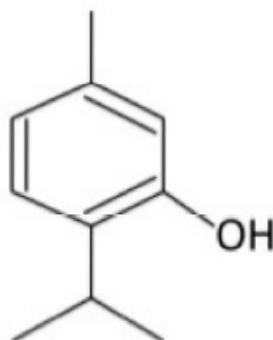


Figura 5: Estructura química del timol

Una característica de los antimicrobianos anteriormente mencionados es que son hidrofóbicos, por lo que para que se pueda emplear en alimentos, deberán de estar en un medio el cual les permita realizar su función. Una de las formas innovadoras y económicas es el uso de películas comestibles. Al estar contenido en la película permite la liberación controlada del agente antimicrobiano, prolongando su actuación al transporte y al almacenamiento de los alimentos (Quintavalla y Vicini, 2002).

## 4.7 Películas comestibles

Las películas comestibles se definen como una matriz preformada, delgada que se dispone sobre una superficie alimentaria o ubicada entre los componentes del mismo, para mejorar la calidad y aumentar la vida útil. Representa una alternativa de empaque sin costos ambientales y sin efectos adversos sobre la salud (Guilbert, 1996; Miranda y col, 2004).

El recubrimiento con materiales comestibles para conservar la calidad y extender la vida de anaquel de las frutas es una práctica que data de siglos. En la actualidad, el empleo de películas comestibles se ha intensificado como una medida de conservación de frutas. La función principal de las películas es controlar la pérdida de humedad y el intercambio respiratorio por permeabilidad de gases (Ulloa y col, 2007)

Otras funciones de las películas comestibles son: reducir la migración de aceites y grasas, reducir el transporte de solutos, mejorar las propiedades mecánicas y de manejo de los alimentos, proveer integridad estructural a los alimentos, retener los componentes volátiles y contener aditivos (Quintero y col, 2010).

Las películas que sean comestibles han de cumplir con una serie de características:

- No ser tóxicas para la salud humana
- Que las propiedades sensoriales sean compatibles con la propia naturaleza sensorial del alimento
- Buena adhesión a la superficie del alimento
- Bajo costo de materia prima
- Facilidad de fabricación y facilidad de aplicación.
- Estabilidad bioquímica, físico-química y microbiológica

Las películas están formadas por tres componentes principales: polímero, solvente y plastificante. El polímero es el componente mayoritario de la película; el solvente debe ser un compuesto adecuado e inocuo para los alimentos, generalmente se limita al uso de agua a diferentes valores de pH para poder solubilizar el polímero; el plastificante es el componente que se encuentra en menor proporción en la formulación sin embargo es importante para poder emulsificar fases que no son miscibles, además de proporcionar flexibilidad y resistencia, los principales

plastificantes utilizados en alimentos son el sorbitol, glicerol y manitol (López-Malo y col, 2008)

Las propiedades que ofrecen las películas, dependen de los componentes mayoritarios de los cuales estén elaborados. Los componentes utilizados para la preparación de películas se puede clasificar en tres (Bourtoom, 2008):

- Hidrocoloides, tales como proteínas y polisacáridos
- Lípidos, como ácidos grasos, acilglicerol y ceras
- Films compuestos

Los hidrocoloides se caracterizan por su facilidad para adquirirlos por lo que son una buena solución para formar películas. Son de naturaleza hidrofílica por lo que no son una buena barrera para el vapor de agua. Por el contrario, se presentan como una buena barrera para los gases como etileno, O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> y también para lípidos. El intercambio gaseoso hace que se prolongue la vida útil de los alimentos, como en el caso de las frutas y verduras, en las que si consigue un retraso de la madurez (Ortin, 2011).

Las películas elaboradas de lípidos se suelen utilizar con la finalidad de aportar hidrofobicidad a la superficie y hacer una barrera efectiva frente a la humedad, además también se utilizan como soporte de aditivos liposolubles y protección contra la abrasión de frutas durante el transporte. La baja polaridad de los compuestos lipídicos y su capacidad para formar una red molecular densa tras un enfriamiento, explican las excelentes propiedades como barrera contra la humedad (Soliva y Martin, 2001)

Los films compuestos son una mezcla de hidrocoloides y lípidos, buscando complementariedad. Se obtienen generalmente por emulsión o por superposición de capas (Ortin, 2011).

Últimamente se ha incrementado el interés por el desarrollo de películas a base de almidón, debido al bajo costo que éste representa y su alta disponibilidad. Las películas hechas de almidón tienen características equiparables a las hechas de polímeros sintéticos, tales como ser transparentes, inodoras, semipermeables y resistentes al oxígeno, las cuales mezcladas con algún plastificante forman películas

resistentes y duraderas con buenas características organolépticas. Es importante que las películas comestibles no sean totalmente limitantes en el intercambio de gases ya que ello puede provocar ciertos desordenes fisiológicos (Ulloa y col, 2007).

Debido a que una de las funciones de las películas comestibles es el intercambio de gases, tienen la capacidad de incorporar agentes antimicrobianos, los cuales van a extender la vida de anaquel y reducir el riesgo de crecimiento de microorganismos patógenos en la superficie de los alimentos. Cuando se elaboran películas comestibles adicionadas con antimicrobianos se espera que tengan la capacidad de migrar hacia la superficie del alimento o permanecer retenida en la película. Ambos fenómenos determinan la efectividad antimicrobiana de la película y se presenta en antimicrobianos sintéticos como naturales. La difusión de estos está influenciada por el tipo de polímero, plastificante, proceso de elaboración, características del alimento, propiedades hidrofílicas de la película, tiempo de almacenamiento y condiciones de temperatura (López-Malo, 2008).

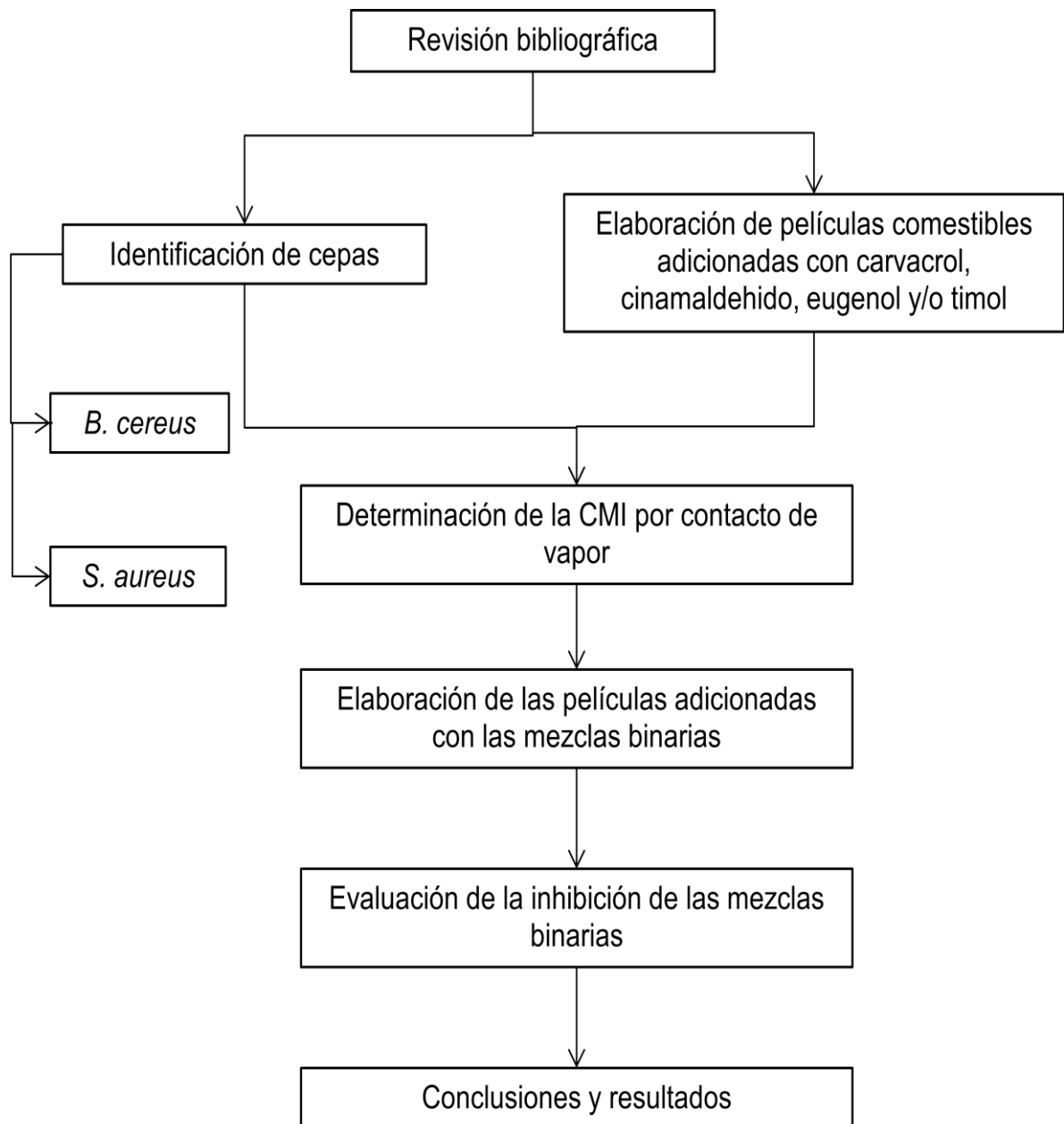
#### **4.8 Contacto por vapor**

Los componentes activos de los aceites esenciales se caracterizan por ser compuestos fenólicos. Estos constituyentes activos de los aceites son normalmente compuestos volátiles e hidrofóbicos, por lo tanto utilizando estas características se está estudiando la inhibición de microorganismos por fase de vapor (Rodríguez Saucedo, 2011).

Los compuestos fenólicos y/o antimicrobianos naturales tienen efecto sobre los hongos, levaduras y bacterias. Actúan desnaturalizando las proteínas de las células y causando daño a la membrana celular. Estos compuestos pueden ser bactericidas o bacteriostáticos, dependiendo de la concentración en que se utilicen. Se han publicado algunos estudios con respecto a la inhibición de microorganismos por aceites esenciales por fase de vapor. La generación de vapores de los componentes de los aceites esenciales se basa en la creación de una atmósfera a una cierta temperatura, o un microambiente. Hasta el momento no se ha encontrado una metodología estándar para evaluar la inhibición microbiana por medio del contacto con vapores, sin embargo existen algunos métodos reportados (Ávila-Sosa y col, 2011, Reyes-Jurado, 2012).

- Uso de cajas invertidas: el cual consiste en colocar los agares inoculados con el microorganismo de forma separada de los aceites esenciales disueltos en acetato de etilo u otro solvente; sobre papel filtro y manteniendo la temperatura controlada. Debido a que la volatilización de los antimicrobianos es rápida, se recomienda para bacterias, las cuales tienen mayor velocidad de crecimiento.
- Creación de una atmosfera a partir de aceites esenciales: en el cual el agar inoculado y los aceites esenciales se colocan por separado en un entorno sellado, de tal manera que los vapores generados en el microambiente entran en contacto con el microorganismo generando zonas de inhibición.

## 5. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Material

- Material de vidrio y reactivos de grado analítico necesarios para cada determinación.
- Medios de Cultivo (los necesarios para cada cepa y para realizar cada una de las pruebas)

### 6.2 Material Biológico

- Cepas obtenidas del cepario de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP
  - *Staphylococcus aureus*
  - *Bacillus cereus*

### 6.3 Equipos

En la tabla 4 se incluyen el equipo utilizado, así como la marca y el modelo.

Tabla 4: Equipos utilizados.

<b>EQUIPO</b>	<b>MARCA</b>	<b>MODELO</b>
Balanza	Ac ADAM	AQT 600
Autoclave	AESA	CV 30
Microscopio óptico	Carl. Zeiss	1061-030 40X
Estufa del cultivo	BG.	E-41
Estufa de secado	BG.	E-41
Campana de flujo laminar	Eseve	CFI V-102

## 6.4 Métodos

Tabla 5: Determinaciones y técnicas utilizadas.

<b>Determinación</b>	<b>Técnica</b>	<b>Referencia</b>
Confirmación de las cepas <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Bacillus cereus</i>	Siembra en agar selectivo y tinción de Gram	Forbes y col, 2009
Elaboración de películas comestibles	Vaciado en placa	Ávila-Sosa y col, 2011
Determinación de CMI por contacto de vapor	Técnica de la placa invertida	Ávila-Sosa y col, 2011
Elaboración de mezclas binarias	Mezclas por tablero de ajedrez	Davidson, 2005

## **7. METODOLOGÍA**

### **7.1 Identificación de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus***

Las cepas se obtuvieron del cepario de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP. A cada una se le hizo las pruebas necesarias para corroborar que eran las cepas adecuadas.

Las pruebas que se realizaron para identificar a *Staphylococcus aureus* fue la siembra en agar sal y manitol, agar sangre y posteriormente su tinción de Gram.

Para la identificación de *Bacillus cereus* se sembró en agar sangre y se realizó la tinción de Gram.

### **7.2 Elaboración de películas comestibles a base de almidón adicionadas con antimicrobianos naturales**

Las películas se realizaron en condiciones estériles, agregando cada uno de los componentes: agua, hidróxido de sodio, almidón y sorbitol, estos componentes se agitaron hasta obtener una mezcla totalmente homogénea. Se adicionó ácido fosfórico hasta ajustar a pH 5. Posteriormente se agregaron los antimicrobianos naturales, en concentraciones definidas, mientras que unas películas no se le adicionó ningún antimicrobiano con la finalidad de utilizarlas como control. Se continuó homogeneizando para que después se vertieran en las tapas de cajas Petri. Las placas se colocaron en una estufa de vacío a 37°C, y se dejaron ahí aproximadamente 24 horas para su secado. Las concentraciones que se utilizaron fueron: 250, 300, 400, 500, 600 y 700 mg/L para carvacrol, cinamaldehído y timol; en el caso de eugenol las concentraciones que se utilizaron fueron: 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500 y 3000 mg/L.

### **7.3 Evaluación de la inhibición bacteriana**

Para poder evaluar la inhibición bacteriana se inoculó una colonia de cada cepa en un tubo con caldo Todd-Hewitt y se incubó a 37°C por 24 horas. Transcurrido este tiempo se midió la turbidez y se estandarizó a 0.5 en la escala de McFarland. Se sembraron placas de agar nutritivo con 200 µl del caldo Todd-Hewitt previamente inoculado. Las placas inoculadas, se taparon con las placas que contienen las

películas con su respectivo antimicrobiano. Al estar en un entorno sellado, los antimicrobianos se volatilizaron, haciendo contacto indirecto con el agar inoculado, y generando la fase por vapor. Las placas ya inoculadas se dejaron incubar a 37°C por 24 horas y se comparó el crecimiento bacteriano entre las placas con películas adicionadas con el antimicrobiano y los controles.

#### 7.4 Elaboración de mezclas binarias

Una vez que se determinó la CMI para cada antimicrobiano, se realizaron las mezclas binarias correspondientes, tomando como ejemplo el modelo de tablero de ajedrez. En la tabla 6 se muestra el ejemplo de cómo se realizaron las mezclas binarias.

Tabla 6: Elaboración de mezclas binarias

		Antimicrobiano		
		$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{3}{4}$
Antimicrobiano	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4} / \frac{1}{4}$	$\frac{1}{2} / \frac{1}{4}$	$\frac{3}{4} / \frac{1}{4}$
	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4} / \frac{1}{2}$	$\frac{1}{2} / \frac{1}{2}$	$\frac{3}{4} / \frac{1}{2}$
	$\frac{3}{4}$	$\frac{1}{4} / \frac{3}{4}$	$\frac{1}{2} / \frac{3}{4}$	$\frac{3}{4} / \frac{3}{4}$

#### 7.5 Elaboración de películas comestibles adicionadas con las mezclas binarias

Las películas se elaboraron de la misma manera como se describió anteriormente y se adicionó la mezcla binaria correspondiente para cada concentración. Posteriormente se evaluó la inhibición de las mezclas binarias de la misma forma descrita para cada una de las mezclas

#### 7.6 Determinación del índice FIC (Concentración Fraccional Inhibitoria)

De los resultados obtenidos en la evaluación de las mezclas binarias se calculó el índice de FIC.

El índice de FIC se determina a cada una de las mezclas para indicar el efecto aditivo, sinérgico y antagónico con la ecuación de Davidson y Parish (Santiesteban-Lopez y col, 2007).

$$FIC_A = CMI_{COMPUESTO A EN PRESENCIA DE B} / CMI_{COMPUESTO A INDIVIDUAL} \quad (1)$$

$$FIC_B = CMI_{COMPUESTO B EN PRESENCIA DE A} / CMI_{COMPUESTO B INDIVIDUAL} \quad (2)$$

Ya calculado el FIC por separado, posteriormente se calcula el índice FIC:

$$\text{Índice FIC} = FIC_A + FIC_B \quad (3)$$

Los datos obtenidos para cada mezcla, se compararon con la tabla 7.

Tabla 7: Valores del índice FIC para determinar el efecto de las mezclas binarias

<b>Rango de índice</b>	<b>Efecto</b>
<0.90	Sinérgico
0.90 – 1.3	Aditivo
>1.3	Antagónico

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Evaluación de los antimicrobianos en películas comestibles

La determinación de las CMI para este trabajo, consistió en la observación del crecimiento o inhibición de los microorganismos en placas petri con agar nutritivo previamente inoculado.

Las CMI obtenidas para *B. cereus* y *S. aureus* se pueden apreciar en la tabla 8. Se puede observar que el efecto bactericida para ambos microorganismos, se presentó en las mismas concentraciones originadas por carvacrol, cinamaldehido y timol. Sin embargo eugenol inhibe a concentraciones mayores de 3000 mg/L para las dos bacterias, siendo el antimicrobiano menos efectivo. Por otro lado el cinamaldehido es el más eficaz de los cuatro estudiados ya que inhibió a 600 mg/L.

Las concentraciones obtenidas son mayores a los reportados por Falcone y colaboradores (2005) y Rodríguez Saucedo (2011), esto debido a que proponen diversos métodos para evaluar la eficacia de los antimicrobianos, exponiéndolos a contacto directo con los microorganismos, por lo tanto se presenta una mayor interacción entre ellos y por ende una menor concentración para poder tener un efecto inhibitorio.

Tabla 8. Concentraciones mínimas inhibitorias de los antimicrobianos naturales para *B. cereus* y *S. aureus*

CMI mg/L		
Antimicrobiano	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>
Carvacrol	700	700
Cinamaldehido	600	600
Eugenol	>3000	>3000
Timol	700	700

### 8.2 Evaluación de las mezclas binarias

Ya que para *B. cereus* y *S. aureus* se obtuvieron las mismas concentraciones inhibitorias, se realizaron las mismas mezclas binarias para estos microorganismos.

En la tabla 9 se puede observar las mezclas binarias que se realizaron con carvacrol y cinamaldehído. Para *B. cereus* se puede apreciar que de las nueve mezclas realizadas, en dos se obtuvo un efecto bacteriostático y en cinco de las mezclas se obtuvo un efecto bactericida, mientras que dos de estas mezclas no presentó ningún efecto ya que hubo crecimiento.

En el caso de *S. aureus* se puede observar que de las nueve mezclas binarias hechas con carvacrol y cinamaldehído, la mayoría presentó efecto bacteriostático y solo tres de esas mezclas presentaron el efecto bactericida.

Tabla 9. Evaluación de la inhibición de *B. cereus* y *S. aureus* en mezclas binarias de carvacrol y cinamaldehído

<i>B. cereus</i>					<i>S. aureus</i>				
Cinamaldehído	Carvacrol				Cinamaldehído	Carvacrol			
	mg/L	175	350	525		mg/L	175	350	525
	150	2	2	0		150	2	2	1
	300	1	1	0		300	1	1	0
	450	0	0	0		450	1	0	0

O: Bactericida                      1: Bacteriostático                      2: Creció

En la tabla 10 se muestran las mezclas binarias realizadas con carvacrol y timol, estas mezclas para *B. cereus* se puede decir que tienen menor efecto antimicrobiano, ya que de las nueve mezclas realizadas solo se obtuvo el efecto bactericida en cuatro, en comparación con la mezcla de carvacrol y cinamaldehído donde se obtuvieron cinco mezclas con este efecto.

Para *S. aureus* se puede apreciar que dos mezclas presentaron efecto bacteriostático, tres mezclas con efecto bactericida y cuatro mezclas en las que hubo crecimiento.

Tabla 10. Evaluación de la inhibición de *B. cereus* y *S. aureus* en mezcla binaria de carvacrol y timol

<i>B. cereus</i>					<i>S. aureus</i>				
Timol	Carvacrol				Timol	Carvacrol			
	mg/L	175	350	525		mg/L	175	350	525
	175	2	2	0		175	2	2	2
	350	2	1	0		350	2	1	0
	525	1	0	0		525	1	0	0

O: Bactericida                      1: Bacteriostático                      2: Creció

La tabla 11 muestra las mezclas realizadas con cinamaldehído y timol para *B. cereus*, se observa que con la combinación de estos dos antimicrobianos se obtiene siete mezclas con efecto bactericida, y dos mezclas en las cuales hubo crecimiento. Por lo tanto se puede decir que esta mezcla fue la más efectiva.

En el caso de *S. aureus* se puede observar que solo tres mezclas presentaron efecto bactericida, tres con efecto bacteriostático y tres mezclas con crecimiento.

Tabla 11. Evaluación de la inhibición de *B. cereus* y *S. aureus* en mezclas binarias de cinamaldehído y timol

<i>B. cereus</i>				<i>S. aureus</i>					
Timol	Cinamaldehído			Timol	Cinamaldehído				
	mg/L	150	300		450	mg/L	150	300	450
	175	2	0		0	175	2	2	1
	350	2	0		0	350	2	1	0
	525	0	0		0	525	1	0	0

O: Bactericida                      1: Bacteriostático                      2: Creció

Si se comparan las dos bacterias estudiadas, la que presenta menor resistencia es *B. cereus*; en la cual se esperaba menor efecto inhibitorio de las mezclas, ya que un mecanismo de resistencia que presenta esta bacteria es la formación de esporas, sin embargo, de todas las mezclas que se realizaron para este microorganismo la que tuvo mayor efecto fueron las películas adicionadas con cinamaldehído y timol esto coincide con lo reportado por Garcia-Garcia (2008), donde menciona que el timol puede inhibir algunos de los diferentes procesos involucrados en la transición de espora a célula, como la germinación, crecimiento y multiplicación.

Para *S. aureus*, de las veintisiete mezclas realizadas, solo inhibió en nueve mezclas, por lo cual los antimicrobianos utilizados en las películas no se volatilizaron lo suficiente como para poder inhibir en más mezclas, esto se puede deber a que los antimicrobianos no se difundieron bien en el entorno que se formó, según Ávila-Sosa y col. (2008) menciona que la difusión de los antimicrobianos en las películas está influenciada por el tipo de polímero, plastificante y proceso de elaboración; las propiedades hidrofílicas de la película; las condiciones de temperatura y tiempo de almacenamiento.

Goñi y col. (2009) reportaron las concentraciones obtenidas de la inhibición de la mezcla de cinamaldehído y aceite esencial de clavo en cuatro bacterias Gram

positivas, obteniendo que *B. cereus* es más sensible que las otras tres bacterias estudiadas. A pesar de que no hay muchos reportes del estudio de la inhibición en mezclas de antimicrobianos para estos dos microorganismos, otros autores como López y col. (2007) reportan las concentraciones mínimas inhibitorias del cinamaldehido, carvacrol y timol en fase de vapor para las bacterias estudiadas, obteniendo que *S. aureus* se inhibe a concentraciones mayores que las obtenidas por *B. cereus*.

### 8.3 Determinación del índice FIC

#### *B. cereus*

En las tablas 12, 13 y 14 se muestran los índices FIC para las mezclas en las cuales obtuvieron efecto bactericida.

Tabla 12. Índice FIC para *B. cereus* en mezcla de carvacrol y cinamaldehido

Cinamaldehido mg/L	Carvacrol mg/L		
	175	350	525
150	-	-	1
300	-	-	1.25
450	1	1.25	1.5

Tabla 13. Índice FIC para *B. cereus* en mezcla de carvacrol y timol

Timol mg/L	Carvacrol mg/L		
	175	350	525
175	-	-	1
350	-	-	1.25
525	-	1.25	1.5

Tabla 14. Índice FIC para *B. cereus* en mezcla de cinamaldehido y timol

Timol mg/L	Cinamaldehido mg/L		
	150	300	450
175	-	0.75	1
350	-	1	1.25
525	1	1.25	1.5

De acuerdo a los criterios de Davidson y Parish, en las mezclas evaluadas para *B. cereus*, se obtuvo una mezcla con efecto sinérgico, la cual fue la combinación de cinamaldehído 300 mg/L con timol 175 mg/L; doce mezclas con efecto aditivo, que ocurre cuando la actividad antimicrobiana de un compuesto no mejora ni se reduce en presencia de otro agente; tres mezclas con efecto antagónico, esto ocurre cuando la actividad antimicrobiana de un compuesto se reduce con la presencia del segundo agente.

Por lo tanto se puede decir que la película con la mezcla de cinamaldehído 300 mg/L con timol 175 mg/L es la ideal para poder inhibir a *B. cereus*, ya que presenta un efecto sinérgico, en el cual el efecto observado en combinación es mayor a la suma de los efectos observados con los dos agentes de manera independiente, por lo cual se va a obtener el efecto bactericida deseado utilizando concentraciones pequeñas de antimicrobiano.

### ***S. aureus***

En las tablas 15, 16 y 17 se muestran el índice de FIC para cada una de las mezclas binarias con efecto bactericida

Tabla 15. Índice FIC de mezclas binarias de carvacrol y cinamaldehído para *S. aureus*

Cinamaldehído mg/L	Carvacrol mg/L		
	175	350	525
150	-	-	-
300	-	-	1.25
450	-	1.25	1.5

Tabla 16. Índice FIC de mezclas binarias de carvacrol y timol para *S. aureus*

Timol mg/L	Carvacrol mg/L		
	175	350	525
175	-	-	-
350	-	-	1.25
525	-	1.25	1.5

Tabla 17. Índice FIC de mezclas binarias de cinamaldehido y timol para *S. aureus*

Timol mg/L	Cinamaldehido mg/L		
	150	300	450
175	-	-	-
350	-	-	1.25
525	-	1.25	1.5

Para *S. aureus* de las mezclas evaluadas, no se obtuvieron efectos sinérgico, que era el efecto que se esperaba, ya que el efecto observado en combinación es mayor a la suma de los efectos observados con los agentes de manera independiente, por lo que al realizar las películas se emplearían menores concentraciones de ambos antimicrobianos lo cual podría economizar la elaboración de las películas y aun así se obtendría la inhibición total de la bacteria. En cambio, se obtuvieron seis mezclas con efecto aditivo, que se presenta cuando los antimicrobianos empleados cumplen con su función por separado; y en tres de las mezclas evaluadas obtuvieron efecto antagónico. Por lo que se cumple con lo reportado por Monzón y col (2001), “no necesariamente los agentes que son buenos inhibidores en forma individual o mezclados en ciertas concentraciones, lo son mezclados con otros agentes o favorecen situaciones sinérgicas”.

Como ya se mencionó anteriormente Goñi y col. (2009) y López y col. (2007), reportan las concentraciones mínimas inhibitorias para antimicrobianos a base de vapor para bacterias Gram positivas y Gram negativas, sin embargo la técnica utilizada es diferente a la empleada a este proyecto. La técnica que utilizan consiste en humedecer un disco de papel filtro de 10 mm de diámetro con éter etílico y el antimicrobiano a utilizar, este se coloca en la tapa de la placa y se sella usando cinta adhesiva, para generar la fase de vapor. A pesar de que son técnicas diferentes, en ambas se obtuvieron resultados con concentraciones menores de inhibición para *B. cereus* a comparación de *S. aureus*.

A pesar de que para las dos bacterias estudiadas se obtuvieron CMI iguales, en la evaluación de las películas con las mezclas binarias se obtuvieron diferentes resultados para ambas bacterias, esto se puede deber a los diferentes mecanismos de defensa que presentan a los antimicrobianos.

Por lo que si se desea inhibir a los dos microorganismos, las películas que se utilizarían, serían las que estén adicionadas con las mezclas en las cuales se obtuvieron efectos aditivos para *S. aureus*; ya que las concentraciones utilizadas en las películas con esas mezclas binarias, también se obtuvieron efectos aditivos para *B. cereus* por lo que cualquiera de esas mezclas es capaz de poder inhibir el crecimiento de las dos bacterias.

Reyes-Jurado (2012) menciona que las bacterias Gram negativas presentan mayor susceptibilidad que las bacterias Gram positivas. El hecho de que las Gram positivas sean más resistentes, se debe a la estructura y composición de la pared celular. La pared celular de las bacterias Gram negativas son delgadas y ricas en lípidos, mientras que las Gram positivas contienen una pared celular con ácidos teicoicos que las hacen más resistentes.

## 9. CONCLUSIONES

La evaluación de la inhibición de *B. cereus* y *S. aureus* por contacto de vapor en películas comestibles a base de almidón, mostró que al no haber un contacto directo del antimicrobiano con el microorganismo, se tuvo que utilizar concentraciones más elevadas de antimicrobianos para obtener el efecto bactericida. Presentando iguales CMI para ambas bacterias, carvacrol 700 mg/L, cinamaldehído 600 mg/L, y timol 700 mg/L.

En las películas con mezclas binarias, se utilizaron concentraciones menores a la obtenida en la CMI, por lo que al determinar qué tipo de actividad presentaban de acuerdo al índice de FIC, se pudo apreciar que para *B. cereus* la mezcla idónea a utilizar es la de cinamaldehído 300 mg/L con timol 175 mg/L, ya que presentó efecto sinérgico. En cambio para *S. aureus*, las mezclas evaluadas presentaron actividad aditiva, por lo que cualquier mezcla con este efecto es ideal a utilizar, ya que aun así se utilizarán concentraciones pequeñas de los antimicrobianos obteniendo el efecto deseado.

## 10. SUGERENCIAS

- Evaluar el efecto bactericida de las películas comestibles adicionadas con los antimicrobianos en diferentes bacterias Gram positivas causantes de deterioro de alimentos.
- Evaluar el efecto bactericida de las películas comestibles in vivo.
- Determinar los costos de las películas comestibles adicionadas con los antimicrobianos y con las mezclas binarias.
- Evaluar el efecto bactericida de otros antimicrobianos sobre *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*.

## 11. BIBLIOGRAFIA

Ahmad, I; Aquil, F. 2009. New Strategies Combating Bacterial Infection. República Federal de Alemania. Editorial. WILEY – BLACKWELL.

Amadio, C., Medina, R., Dediol, C., Zimmermann, M., Miralles, S. 2011. Aceite esencial de orégano: un potencial aditivo alimentario. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. 43: 237 – 245.

Ardila, Q. M., Vargas, A. A., Pérez C. J., Mejía G. L. 2009. Ensayo Preliminar de la actividad antibacteriana de extracto de *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia caryophyllata*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris* frente a *Clostridium perfringens*. Biosalud. 8: 47 – 57.

Armada, D. L. y Oliver, C. R. 2007. Manipulación de alimentos. La importancia de la higiene en la elaboración y servicio de comida. 2ª edición. España. Editorial. Ideaspropias. Pág. 49 – 86

Ávila-Sosa, R., Palou E., Jiménez M.T., Nevárez-Moorillón G., Navarro Cruz, A., López-Malo, A. 2011. Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. International Journal of Food Microbiology. 153: 66 – 72

Ayala-Zavala, J.F., Wang, S.Y., Wang, C.Y., González-Aguilar, G.A. 2005. Methyl jasmonate in conduction with ethanol treatment increases antioxidant capacity, volatile compounds and postharvest life of strawberry fruit.

Barreiro, J. A., Mendoza, S., Sandoval, A. 1994. Higiene y saneamiento en la preparación y servicio de alimentos

Bauchet, L.R. y Golden, D.A. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. Food Technol. 43(1): 134 – 142.

Bello-Gutiérrez, J. 2000. Ciencia Bromatológica: Principios Generales de los Alimentos. España. Editorial. Diaz de Santos. Pág. 449 – 460

Bourtoom, T. 2008. Edible Films and Coatings: Characteristics and properties. *International Food Research Journal*. 15: 237 – 248

Bravo-Martínez, F. 2004. El manejo higiénico de los alimentos. Guía para la obtención del distintivo H. México. Editorial. Limusa. Pág. 13 – 18

.

Chin, J. 2001. El control de las enfermedades transmisibles. Washington DC. Publicación científica y técnica. No. 581. Pág. 383 – 386.

Davidson, M. 2005. Antimicrobials in food. U.S: CRC Taylor & Francis Group.

Escrache, I. y Domenech, E. M. 2006. Gestión del Autocontrol en la Industria Agroalimentaria. Valencia. Universidad Politécnica de Valencia.

Fonnegra, G. R; Jiménez, R. S. 2007. Plantas Medicinales Aprobadas en Colombia. 2ª Edición. Colombia. Editorial. Universidad de Antioquia. Pág. 76 – 78

Forbes, B., Sahm, D. F., Weissfeld, A. S. 2009. Diagnóstico Microbiológico. 12ª Edición. Argentina. Editorial. Panamericana. Pág. 254 – 286.

García – García, R.M. 2008. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. México.

Gil, A. 2010. Tratado de Nutrición. Tomo II Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos. 2ª Edición. Editorial. Panamericana.

González, E. 2002. Eugenol: Propiedades Farmacológicas y Toxicológicas. Ventajas y Desventajas de su Uso. *Revista Cubana de Estomatología*. 39 (2): 139 – 156.

Goñi, P., Lopez, P. Sanchez, C., Gomez-Lus, R., Becerril, R., Nerin, C. 2009. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*. 116. 982-989.

Granados, R. J. 1984. Química avanzada Nuffield. Ciencia de la alimentación. España. Editorial. Reverté

Guarnizo A., Martínez, P. N., y otro autor. 2009. Experimentos de Química Orgánica con Enfoque en Ciencias de la Vida. Colombia. Editorial. Elizcom.

Guilbert, S. 1996. Technology and application of edible protective films. G. Barbosa-Cánovas, y J. S. Welti-Chanes (Eds). Food Preservation by moisture control, Fundamentals and applications. Isopow Practicum II, N.Y. EE.UU.

Hernández, M. 1999. Tratado de nutrición. Madrid. Editorial. Díaz de Santos.

Ingraham, J. L., Ingraham, C. A. 1998. Introducción a la Microbiología. España. Editorial. Reverte.

Koneman, E. W., Allen, S. 2008. Koneman. Diagnóstico Microbiológico. 6ª Edición. Argentina. Editorial. Panamericana. Pág. 593 – 630.

López-Barreras, F. 2007. Preelaboración y Conservación de Alimentos. España. Editorial. Libros en Red. Pág. 29 – 32.

López-Malo, A. 2008. Aplicación de sustancias antimicrobianas a películas y recubrimientos comestibles. México.

Lopez, P., Sanchez, C., Batlle, R., Nerin, C. 2007. Vapor-phase activities of cinnamon thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganism. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55. 4348-4356

Mencias, E., Mayero, L. M. 2000. Manual de Toxicología Básica. Madrid. Editorial. Díaz de Santos.

Miranda, S. P., Cárdenas, G., López, D. 2004. Comportamiento de películas de quitosán compuesto en un modelo de almacenamiento de aguacate. Revista Sociedad Química Mexicana. 47: 331 – 336.

Monzon, A. 2001. Produccion, uso y control de calidad de hongos entomopatogenos en Nicaragua. Costa Rica. (63): 95-103.

Morcillo, G., Cortes, E., García, J. L. 2013. Biotecnología y Alimentación. Madrid. Cuadernos de la UNED

Olaya, J. M. y Méndez, J. 2003. Guía de plantas y productos medicinales. Bogotá. Revista Serie Ciencia y Tecnología.

Ortega, N. M., Robles, B. M., Acedo, F. E., González, L. A., Morales, T. A., Vazquez, M. L. 2011. Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano (*Lippia palmeri* S. WATS). Revista Fitotecnia Mexicana. 34: 11 – 17.

Otin, J. M. 2011. Estudio de la difusión del carvacrol y el eugenol desde las películas de proteínas de suero lácteo a diferentes simulantes alimentarios. Tesis. Universidad Pública de Navarra.

Pahissa, A. 2009. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. España. Editorial. ICG Marge,SL. Pág. 15 – 31.

Pascual, A. M. y Calderón, V. 2000. Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas. España. Editorial. Díaz de Santos. Pág. 93 – 103.

Pascual, A. M. 2005. Enfermedades de Origen Alimentario. Su prevención. España. Editorial. Díaz de Santos. Pág. 141 – 165.

Primo, Y. 2007. Química orgánica básica y aplicada. De la molécula a la industria. Barcelona. Editorial. Reverté

Quintavalla, S. y Vicini, L. 2002 Antimicrobial food packaging in meeat industry. Meat Science

Quintero, C. J., Falguera, V., Muñoz, H. 2010. Películas y Recubrimientos Comestibles: Importancia y Tendencias Recientes en la Cadena Hortofruticola. Revista Tumbaga. 5: 93 – 118.

Reyes-Jurado, F., Palou, E y Lopez-Malo, A. 2012. Vapores de aceites esenciales: alternativa de antimicrobianos naturales.

Rodríguez, S. 2011. Uso de Agentes Antimicrobianos Naturales en la Conservación de Frutas y Hortalizas. Revista Ra Ximhai. 7: 157 – 159.

Rojo, L. 2008. Derivados poliméricos de eugenol para aplicaciones biomédicas. Madrid. Tesis de Doctorado.

Romero, M. D. 2004. Plantas aromáticas. Buenos Aires. Editorial. Kier

Salas Salvado, J., García, Lorda, P., Sánchez, J.M. 2005. La alimentación y la nutrición a través de la historia. Barcelona. Editorial. Glosa

Santiesteban-Lopez, A., Palou, E., López-Malo A. 2007. Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected a(w) and pH. Journal of Applied Microbiology, 102(2), 486-497.

Santos, M. H. 2004. Dieta mediterránea y alimentos funcionales. Seguridad alimentaria. Valencia. Editorial de la UPV

Soriano del Castillo, J. M. 2007. Micotoxinas en Alimentos. España. Editorial. Díaz de Santos. Pág. 82 – 83.

Ulloa, J. A., Ramírez, J. C, Romero, J. E., Rosas, P. 2007. Frutas Auto estabilizadas en el Envase por la Tecnología de Obstáculos. México. Pág. 53 - 58

Yagasaki, K., Miura, Y., Makoto, H., Nomura, Y. 2004. Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects. Volumen 13. Dordrecht, Holanda. Editorial. Kluwer Academic Publisher. Pág. 207 – 208.

Zekaria, D. 2010. Los aceites esenciales una alternativa a los antimicrobianos. Laboratorios Calier