



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



LIC. EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA-ALIMENTOS

TESIS:

Desarrollo y evaluación del efecto de películas comestibles adicionadas con antimicrobianos de origen natural en un empaque activo para alimentos mínimamente procesados por fase de vapor

“Tesis presentada como requisito para obtener el título de:
Licenciado en Químico Farmacobiólogo”

PRESENTA

p.Q.F.B. URBINA VÁZQUEZ EDGAR

D.C. Raúl Ávila-Sosa Sánchez

Director de Tesis

D.C. Carlos Enrique Ochoa Velasco

Co-director de Tesis

INDICE

1	Introducción.....	1
2	Antecedentes.....	2
2.1	Deterioro de los Alimentos.....	2
2.2	Importancia de la Conservación.....	4
2.3	Nuevas Tecnologías de Conservación.....	5
2.4	Alimentos Mínimamente Procesados.....	6
2.5	Empaque Activo.....	7
2.6	Películas Comestibles.....	9
2.7	Antimicrobianos de Origen Natural.....	11
2.8	Antimicrobianos en Fase de Vapor.....	14
3	Justificación.....	18
4	Objetivos.....	19
4.1	Objetivo General.....	19
4.2	Objetivos Particulares.....	19
5	Diagrama de Trabajo.....	20
6	Material y Métodos.....	21
7	Metodología.....	22
7.1	Empaque Activo.....	22
7.2	Firmeza.....	22
7.3	Clorofila.....	23
7.4	Análisis Sensorial.....	23
7.5	Análisis Estadístico.....	23
8	Resultados y Discusión.....	24
8.1	Efecto antimicrobiano.....	24

8.2	Características de calidad.....	26
8.2.1	Clorofila.....	26
8.2.2	Firmeza.....	27
8.2.3	Análisis sensorial.....	28
9	Conclusiones.....	30
10	Sugerencias.....	31
11	Bibliografía.....	32
12	Anexo.....	40

Índice de figuras

Figura 1 Historia de la conservación de los alimentos	5
Figura 2 Mecanismo de acción de los aceites esenciales.....	14
Figura 3 Reducción de carga microbiana de BHA	24
Figura 4 Reducción de carga microbiana de coliformes totales.....	25
Figura 5 Reducción de carga microbiana de hongos y levaduras.....	26
Figura 6 Concentración de clorofila presente en las ensaladas de los empaques activos de un periodo de 15 días	27
Figura 7 Milímetros de penetración presente en las ensaladas de los empaques activos de un periodo de 15 días	27
Figura 8 Características sensoriales evaluadas.....	28

Índice de tablas

Tabla 1. Aplicación y tecnología de empaques activos	8
Tabla 2. Propiedades funcionales de las películas comestibles.....	9
Tabla 3. Algunas especies, hierba y condimentos evaluados como posibles antimicrobianos.....	11
Tabla 4. Principales Componentes volátiles de aceites esenciales de especias y plantas encontradas comúnmente.....	13
Tabla 5. Principales compuestos volátiles.....	16
Tabla 6. Métodos y referencias	21
Tabla 7. Equipos.....	21

RESUMEN

El consumo de alimentos frescos está tomando una gran demanda, no obstante la obtención de los mismos se ha tornado un poco complicada debido a que la mayor parte de alimentos que se encuentran están industrializados perdiendo así algunas de sus propiedades y utilizando conservadores sintéticos, los consumidores hoy en día no solo quieren un alimento fresco si no que esté libre de conservadores sintéticos. Los empaques activos se están utilizando como alternativa de conservación de los alimentos y como objetivo de este trabajo se tiene el desarrollo de un empaque activo que tenga un conservador de origen natural el cual mantenga al alimento inocuo y fresco para el consumidor. En el desarrollo de dicho empaque se llevaron a cabo diferentes análisis. Durante el análisis microbiológico se llevó a cabo agregando antimicrobianos naturales en diferentes concentraciones para la observación de la actividad de estos sobre diferentes grupos de microorganismos entre los que están las bacterias mesofilicas aerobias, coliformes totales, hongos y levaduras. En el análisis características de calidad se hicieron diferentes pruebas entre las cuales se encuentra la clorofila, la firmeza y un análisis sensorial, el análisis sensorial se evaluó mediante una escala hedónica. Todos los análisis se sometieron a un análisis estadístico de ANOVA y tukey para ver si había diferencias significativas entre estos. Los empaques activos dieron una disminución del crecimiento microbiológico teniendo al alimento inocuo sin verse alteradas la mayoría de las propiedades de los alimentos mínimamente procesados que fueron utilizados, teniendo solo mejoramiento en las características de olor y sabor del alimento en algunos de los empaques con antimicrobianos naturales (Aceite esencial de orégano y aceite esencial de canela), mientras que con otros (timol y carvacrol) no se vieron afectados de manera significativa pero aun dando todos los empaques un alto agrado a los consumidores.

1. INTRODUCCIÓN

Recientemente el consumo de alimentos frescos está tomando una gran demanda; no obstante, la obtención de los mismos se ha tornado un poco complicada debido a que la mayor parte de alimentos se industrializan, perdiendo así algunas de sus propiedades, además, los consumidores hoy en día no solo quieren un alimento fresco si no que esté libre de conservadores sintéticos (Paseiro y cols.,2010). En los últimos años se han desarrollado nuevas tecnologías de conservación, éstas no solamente dejan a un lado los conservadores sintéticos, si no de igual manera se ven alteradas las propiedades de los alimentos, una de las nuevas tecnologías que no altera de manera significativa son las atmosferas modificadas entre las que resaltan los empaques activos (Rodríguez-Sauceda y col.,2014). Estos empaques son definidos como un sistema que interactúa positivamente con el alimento extendiendo la vida en anaquel y manteniendo su calidad nutricional; no obstante, muchos aditivos que se agregan a este método de conservación siguen siendo sintéticos (Ozdemir y Floros, 2010; Martínez-Tenorio y López-Malo, 2011). Hoy en día se conocen una gran variedad de conservadores de origen natural entre los que resaltan los aceites esenciales, los cuales han sido últimamente estudiados ampliamente debido a su naturaleza dando con ello resultados positivos; sin embargo, la aplicación de estos en la industria alimentaria ha sido mínima ya que por contacto directo puede alterar nutrimental y sensorialmente a los alimentos, estos aceites en la actualidad no solo se han estudiado por contacto directo sino también por fase de vapor dando así resultados favorables “*in vitro*” (García-García y Palou, 2008; Reyes y col., 2012). Las películas comestibles se han utilizado para la conservación de los alimentos, pero a comparación de los demás métodos estas no tienen contacto directo con el alimento, estas películas sirven como vehículo de diferentes aditivos tales como antimicrobianos, antioxidantes, saborizantes entre otros (Kester y Fennema, 1986; Arredondo, 2012). Por lo anterior, este trabajo pretende el desarrollo y evaluación del efecto de películas comestibles adicionadas con antimicrobianos de origen natural por fase de vapor en un empaque activo para alimentos mínimamente procesados.

2. ANTECEDENTES

2.1 Deterioro de los Alimentos

El deterioro de los alimentos es la principal forma de pérdida de calidad de los alimentos, esto se ve día con día en diferentes partes, desde lugares de cosecha hasta supermercados o centrales de abasto. Existen diferentes causas por las cuales se pierde la calidad del alimento que conlleva a el deterioro del mismo, entre las causas están las físicas, bioquímicas y microbiológicas. Entre el deterioro físico se encuentra el daño directo al alimento como lo pueden ser por golpes, cortes, ruptura, deshidratación o pérdida de la integridad del mismo, estos mismos pueden ayudar para afección bioquímica y microbiológica del alimento dando así el deterioro de los tres modos. Otro de los modos de deterioro es el bioquímico el cual se lleva a cabo a reacciones enzimáticas y no enzimáticas, y por último el deterioro microbiológico que se lleva a cabo por diferentes microorganismos (Bello, 2000).

El deterioro físico se considera desde la cosecha ya que con ello se puede ocasionar daños negligentes a los alimentos, provocando rupturas o cortes del mismo, ocasionando pérdida de agua, aceleración del proceso normal de modificaciones del mismo y propician la contaminación del mismo con microorganismos patógenos. La mayoría de los daños fisiológicos se ocasionan durante el traslado de los alimentos desde el lugar de cosecha hasta los grandes supermercados, una de las razones del mal trato de los alimentos es debido a que en ocasiones no se lleva a cabo una correcta forma de empacamiento y a una mala forma de manejo del mismo por las personas que los manipulan hasta el mal acomodamiento del alimento (FAO,1993).

El deterioro bioquímico, está dividido en dos partes que es el pardeamiento enzimático y el pardeamiento no enzimático, el primero como lo dice esta mediado a través de las enzimas y el segundo a través de reacciones químicas (Bello, 2000).

El pardeamiento enzimático es denominado así por la transformación enzimática en presencia de oxígeno de los compuestos fenólicos presentes en los alimentos, dando así un cambio de la coloración del mismo y perdiendo con esto la calidad. Este tipo de pardeamiento se lleva a cabo principalmente por la enzima polifenoloxidasas, esta realiza una oxidación del polifenol a una quinona, mientras si es un monofenol se llevará a cabo una reacción de hidroxilación con la enzima monofenolasa para obtener un difenol y este pueda ser oxidado en una quinona. Las siguientes reacciones a partir de las quinonas están dadas ya que estas son muy inestables, son potentes oxidantes y fuertemente electrofilas, debido a esto se lleva a cabo múltiples reacciones de oxidación, adición y polimerización, estas hacen la formación de las melaninas (pigmentos) (Gonzales y col., 2009; Hernández, 2009; Jeantet y col., 2013).

En el pardeamiento no enzimático se encuentran tres diferentes reacciones, la reacción de Maillard, oxidación de ácido ascórbico y la caramelización. Este pardeamiento es responsable de la formación de diferentes compuestos con coloraciones marrones, sustancias volátiles y sápidas que condicionan la calidad sensorial de los alimentos (Jeantet y col., 2013).

Una de las principales causas del pardeamiento no enzimático es la reacción de Maillard, está dada por un mecanismo muy complejo y se puede describir en cuatro diferentes sucesiones:

- I. Reacción de condensación del grupo amino y carbonilo
- II. Reagrupamiento de Amadori y de Heyns
- III. Descomposición de cetosaminas
- IV. Reacciones de polimerización

El deterioro microbiológico es ocasionado por los microorganismos los cuales debido a las propiedades de los alimentos tienen los factores necesarios para el crecimiento, no obstante hay microorganismos que pertenecen a la microbiota del alimento, estos no conllevan al deterioro del mismo. Existen diferentes microorganismos que causan no solamente deterioro del alimento sino también enfermedades en los consumidores, estos pueden ser introducidos al alimento de

diversas formas tales como rupturas dadas en la cosecha y traslado del alimento, los manipuladores, el lugar de almacenaje y el agua con que se traten. Los alimentos siendo ricos en proteínas, carbohidratos y con alto contenido de humedad son aptos para el crecimiento de los microorganismos en especial bacterias patógenas, el problema del deterioro microbiológico es que ocasiona grandes pérdidas de alimentos, no obstante provocando enfermedades en los consumidores, la mayoría de los procesos que se llevan a cabo a los alimentos permiten que el mismo quede libre de microorganismos (Bello, 2000).

2.2 Importancia de la conservación

A lo largo de la historia desde el primer hombre primitivo se ha visto en la necesidad de la obtención de alimentos, no obstante, las oportunidades de obtenerlos eran muy pocas lo cual lo orilló a la caza, los alimentos los consumía en el estado como lo obtenía y durante su evolución empezaron a cocinarlos (Aguilar, 2012).

En el año 3000a.c. se considera que los Sumerios fueron los primeros criadores de ganado, al igual se les asocia la conservación por salazón en carnes y pescado. Tiempo después surgieron otros métodos de conservación tales como la conservación en aceite, el ahumado, el secado al sol, las fermentaciones naturales, la agregación de azúcar y sal para la disminución de la actividad de agua (Jay, 2002).

No fue hasta 1809 que Nicolás Appert desarrolló un método de conservación de alimentos el cual evitaba el deterioro por más tiempo, durante el desarrollo de este método de conservación observó que en los alimentos calentados en un envase sellado en ausencia de aire, se evitaba el deterioro por mayor tiempo. Permitiéndole así llegar a la conclusión en que la limpieza e higiene en la preparación y el manejo de los alimentos era necesario para la preservación del alimento al igual que un sellado hermético (Luengo, 1999).

En el siglo XIX fueron perfeccionando las técnicas de conservación e inventando nuevas tecnologías que sustituían los métodos caseros de conservación por

métodos industrializados de conservación, estos métodos empezaron desde los trabajos de Pasteur (Figura 1) (Bello, 2000).

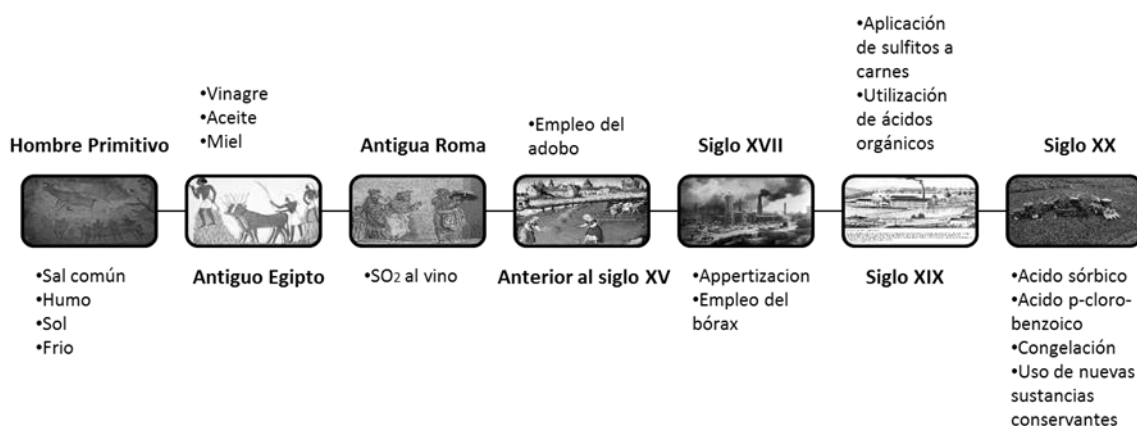


Fig. 1. Historia de la conservación de los alimentos (Jay,2002)

Desde entonces el reto de la industria alimentaria es evitar el riesgo microbiológico que ocasiona deterioro de los alimentos, así como pérdidas y daños a la salud de los consumidores. La inocuidad de los alimentos se puede garantizar con la constante vigilancia de los mismos obteniendo con ello alimentos sanos, seguros y cumpliendo con las expectativas del consumidor (Rodríguez-Sauceda y col, 2014).

Hoy en día el consumidor no solamente valora la vida útil del alimento sino también la calidad del mismo, esto ha llevado a cambiar el tratamiento térmico que modificaba algunas propiedades del alimento bajando la calidad de este sustituyéndolo por otros no térmicos, estos métodos no térmicos han sido utilizados durante tiempo atrás, pero en han alcanzado gran interés en los últimos años (Instituto de Tecnología Medellín, 2004).

2.3 Nuevas tecnologías de conservación

El principal propósito de la conservación de los alimentos es la inactivación de los microorganismos sin alterar las propiedades del alimento, la mayoría de los métodos de conservación de los alimentos tienden a cumplir su propósito de mantener inocuo al alimento, pero teniendo como consecuencia la alteración de las propiedades del mismo. En las nuevas tecnologías de conservación el

propósito es tener la inactivación o destrucción de los microorganismos sin alterar las propiedades del alimento, teniendo como propósito el mantener el alimento con sus propiedades lo más parecido a lo natural, más nutritivos y fáciles de manipular, todo esto las nuevas tecnologías lo pueden llevar a cabo sin necesidad de la utilización de tratamientos térmicos intensos, estos métodos nuevos empleados son la Alta Presión Hidrostática, y el Campo Eléctrico Pulsado, así como también los sistemas de envasado y modificación de la atmósfera, entre otras (Rodríguez, 2005).

Los sistemas de envasado y modificación de la atmósfera, no solo evitan el tratamiento térmico sino ayudan a mantener al alimento con propiedades parecidas a las naturales, a este tipo de envasado se les denomina envases activos y envases inteligentes, estos dos métodos no son lo mismo debido a que los envases inteligentes monitorean al alimento o su entorno para asegurar la calidad tanto en el transporte como en el almacenamiento del mismo, mientras que en el envase activo el entorno del mismo se ve modificado con la adición de compuestos activos para mantener su tiempo de vida útil prolongado y se mantenga lo más fresco posible (Paseiro Losada y col., 2010).

2.4 Alimentos mínimamente procesados

En la actualidad los hábitos alimenticios se han cambiado por el escaso tiempo que se tiene para la preparación de comidas equilibradas, debido a este estilo la demanda de alimentos frescos, naturales, saludables y dispuestos para consumirse ha visto en aumento. Estos alimentos son denominados alimentos mínimamente procesados debido a que se lleva a cabo un lavado, desinfectado y cortado. Los alimentos mínimamente procesados no solo tienen la característica de verse frescos sino también al no tener un amplio procesamiento mantienen los nutrientes tal y como si estuviese fresco. La demanda de este tipo de alimentos ha provocado que se lleven a cabo diferentes métodos emergentes para ampliar el tiempo de frescura del mismo, las industrias llevan a cabo desarrollos de tecnologías emergentes para garantizar la calidad sensorial y nutritiva, pero al igual la seguridad alimentaria. (Artes-Hernández y col., 2009).

Los alimentos mínimamente procesados o de cuarta gamma están formados esencialmente de verduras y frutas las cuales solo conllevan un proceso de lavado, desinfectado, cortado y envasado. Cada uno de los procesos mencionados se tiene que llevar a cabo operaciones para su fabricación y evitando así contaminación por entrecruzamiento (Jeantet y col;2013).

Una de las primeras etapas es el prelavado, esta nos ayuda a eliminar la suciedad y agentes físicos extraños, los residuos de plaguicidas y una ligera cantidad de microorganismos deterioradores de la calidad del alimento. El siguiente paso es la etapa de recorte, en esta especialmente en ensaladas se eliminan partes no comestibles, así como tallos y partes de hojas exteriores (Gil y col., 2005).

Al haber prelavado y eliminado de partes indeseables al alimento, se lleva a cabo el proceso de corte, lavado y desinfectado. El Corte se lleva a cabo con un cuchillo de acero inoxidable y de buen filo para realizar un correcto corte y así evitando la activación de factores de pardeamiento del alimento, seguido del proceso de corte inmediatamente se lleva a cabo el lavado para así también los residuos celulares se eliminen del alimento y evitando el pardeamiento enzimático (Jeantet y col. 2013; Gil y col. 2005).

Entre los métodos desarrollados para mantener la frescura de los alimentos mínimamente procesados se encuentran la elaboración de diferentes empaques al igual que implementar atmosferas modificadas o en su caso en la implementación de un empaque activo (Patiño y col.,2012).

2.5 Empaque activo

Un empaque activo en definición es un sistema el cual interactúa el envase, el producto y el ambiente conjuntamente de manera positiva. En los últimos años este método ha tomado una gran importancia, debido a que de ser pasivo pasó a ser activo, ya que los materiales que hacían que los consideraban pasivos solo controlaban el paso del aire y la humedad con el alimento. Hoy en día se han añadido ciertos tipos de compuestos los cuales lo hacen activos para el producto, estos compuestos se pueden añadir dentro del empaque con la ayuda de una

película comestible. Los compuestos que se pueden añadir son agentes antioxidantes, antimicrobianos, enzimas, sabores entre otros (Ahvenainen, 2003; Yam y col, 2005; Arredondo, 2012).

Estos empaques su principal función es alargar la vida útil del alimento, debido a que conllevan un aditivo que desempeña acciones específicas hacia el alimento retrasando el proceso de maduración, oxidación, respiración, microbiológicos, entre otros (Ahvenainen, 2003; Sierra y col., 2011).

Los envases activos se clasifican en diferentes grupos (Tabla 1), en los que sobresalen dos de ellos, estos grupos son los absorbentes o eliminadores y liberadores o emisores, el grupo de absorbentes son aquellos que absorben sustancias químicas del interior del envase, esto implica que el sistema activo del envase absorberá oxígeno, etileno, agua, componentes que originan olores y sabores desagradables. El grupo de empaques liberadores o emisores son aquellos que liberan sustancias químicas al interior del envase, esto implica que al material activo se le colocara diferentes tipos de componentes para que sean liberados dentro del empaque, las sustancias que se pueden ser agregadas son antioxidantes, antimicrobianos, aromatizantes, saborizantes, colorantes, entre otros. Comercialmente también se pueden encontrar a los empaques activos clasificados como sistemas independientes y sistemas integrados en el propio envase. (Paisero y col, 2010)

Tabla1. Aplicación y tecnologías de envases activos (Kerry y col, 2006)

Aplicación	Elementos
Absorber/Expulsar	Oxígeno, dióxido de carbono, humedad, etileno, sabores, contaminantes.
Liberar/Emitir	Etanol, dióxido de carbono, antioxidantes, preservantes, dióxido de azufre, sabores y pesticidas.
Remover	Lactosa y colesterol
Control de temperatura	Aislantes, envase autocalentante, envase cocinante, susceptible de microondas y envase termosensible
Control microbiano	UV y superficies de envase tratada

2.6 Películas Comestibles

Una película comestible es definida como una capa delgada de material comestible, la cual es formada por una solución formadora de película, esta solución formadora de película se encuentra elaborada por proteínas, polisacáridos y/o lípidos. Está a diferencia de un recubrimiento comestible esta aplicada en una superficie plana sin tener contacto directo con el alimento. Entre las funciones de la aplicación de una película comestible es mejorar la calidad de un alimento al igual que extender la vida de anaquel del mismo. Las propiedades funcionales de la película comestible (Tabla 2) están dadas por el material con las que se elaboran, por lo general se elaboran con polímero, solvente y un plastificante, también se le pueden agregar otras sustancias las cuales pueden enriquecer sus propiedades funcionales (Avila-Sosa y col., 2008; Arredondo, 2012).

Tabla 2. Propiedades funcionales de las películas comestibles (Kester y Fennema, 1986)

<ul style="list-style-type: none">• Reducir la pérdida de humedad• Sensorialmente aceptable• Reducir el transporte de gases• Servir como vehículo de aditivos (antimicrobianos, antioxidantes, sabores, olores)• Evitar o reducir el deterioro microbiano

Entre los aditivos que se le pueden agregar a las películas comestibles se encuentran los antioxidantes, antimicrobianos, modificadores del sabor y olor del alimento. Debido al crecimiento de hongos, levaduras y bacterias durante el almacenamiento del alimento o su distribución los cuales afectan la integridad y calidad del mismo, se ha utilizado la agregación de antimicrobianos a las películas comestibles, la agregación de estas debe tener compatibilidad y facilidad de liberación de la película comestible o dado el caso la formulación de la película comestible tendrá que ser adecuada para la agregación de los diferentes antimicrobiano (Arredondo, 2012).

Las películas comestibles deben tener diferentes funciones, como ser una barrera selectiva, evitar la oxidación de lípidos y la pérdida de compuestos volátiles, responsables del aroma y de sabores de ciertos alimentos (Espino, 2010).

Existen diferentes materiales para la formación de las películas comestibles entre las que se encuentran las proteínas, polisacáridos y lípidos. Entre las proteínas se encuentran la gelatina, el colágeno y algunas proteínas de origen vegetal. Los polisacáridos son celulosa, carrageninas, gomas, pectina, almidón y alginato, en los lípidos están las ceras, triglicéridos y algunos ácidos grasos (Nanda y Nayak, 2009).

Los polisacáridos son muy utilizados en la industria alimentaria, estos se obtienen principalmente de vegetales, algas y microorganismos (Khan y col., 2007). Estos al ser utilizados para la formación de películas comestibles, se obtienen películas transparentes que presentan propiedades mecánicas moderadas, sin embargo, debido a su solubilidad al agua y la permeabilidad al vapor de agua se limite su uso (Vargas y col., 2008; Campos y col., 2011). Sin embargo, se pueden mejorar estas condiciones al adicionar compuestos hidrofóbicos pero debido a su naturaleza es necesario la adición de surfactantes y así mejorar la resistencia al vapor de agua de las películas formadas con polisacáridos, no obstante se incrementa la opacidad de las películas resultantes (Dominguez y Jimenez-Munguia, 2012).

Los plastificantes son necesarios para la formación de las películas comestibles, estos al ser adicionados mejoran las propiedades mecánicas de las mismas. Existen diferentes plastificantes para la formación de películas comestibles como lo son el glicerol, polietilenglicol, sorbitol y algunos azucres, entre otros. Estos al ser usados reducen los enlaces intermoleculares entre las cadenas de polímeros, estos mismos modifican las propiedades mecánicas produciendo películas más flexibles (Campos y col.,2011).

Entre las propiedades mecánicas ideales para describir el comportamiento de las películas comestibles elaboradas con polisacáridos esta la fuerza tensil, la elongación y la fuerza de corte (Espinoza y col., 2011). Brindle y Krochta (2008)

observaron que el aumentar el valor de la fuerza tensil, el porcentaje de elongación disminuye y viceversa.

Otra propiedad importante es la barrera contra la humedad, debido a que se busca disminuir la transferencia de humedad entre el producto y el medio (Qui-Ping y Wen-Shui, 2008). No obstante, al igual que requiere una barrera contra la humedad se necesita tener una barrera a gases, principalmente oxígeno y dióxido de carbono, para así evitar reacciones de oxidación causadas por el oxígeno (Fontes, 2011).

2.7 Antimicrobianos de origen natural

Durante mucho tiempo la utilización de diferentes conservadores o antimicrobianos sintéticos ha sido de gran ayuda, hoy en día la sociedad se ha vuelto más exigente debido a que no solamente quiere un producto fresco si no también que esté libre de conservadores químicos, debido a que no solamente cambia las propiedades del alimento, si no también son causantes de diferentes enfermedades. Hoy en día se está llevando a cabo el cambio de los conservadores sintéticos por conservadores o antimicrobianos naturales, debido a que los antimicrobianos naturales tienen la misma función que los antimicrobianos sintéticos, pero sin alterar las propiedades de los alimentos. Existen diferentes tipos de antimicrobianos naturales que pueden ser de origen animal, vegetal y microbiano. El grupo de origen vegetal incluye compuestos fenólicos provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores; ácidos orgánicos y fitoalexinas (Superior de Gastronomía, 2011).

Tabla 3. Algunas especias, hierbas y condimentos evaluados como posibles antimicrobianos (Rosas-Gallo y López-Malo, 2011)

Albahaca (Basil)	<i>Ocimum basilicum</i>
Laurel (Bay)	<i>Laurus nobilis</i>
Cilantro (Coriander)	<i>Coriandrum sativum</i>
Canela (Cinnamon)	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>
Clavo (Clove)	<i>Syzygium aromaticum</i>
Comino (Cumin)	<i>Cuminum cyminum</i>
Eneldo (Dill)	<i>Anethum graveolens</i>
Hinojo (Fennel)	<i>Foeniculum vulgare</i>
Ajo (Garlic)	<i>Athum sativum</i>
Jengibre (Ginger)	<i>Zingiber officinale</i>
Te-limón (Lemongrass)	<i>Cymbopogon citratus</i>
Mejorana (Marjoram)	<i>Origanum majorana</i>
Menta (Mint)	<i>Mentha vulgaris, M. spicata</i>
Mostaza (Mustard)	<i>Brassica hirta, B. juncea, B. nigra</i>
Cebolla (Onion)	<i>Allium cepa</i>
Orégano (Oregano)	<i>Origanum vulgare</i>
Perejil (Parsley)	<i>Petroselinum crispum</i>
Pimienta (Pepper)	<i>Piper nigrum</i>
Romero (Rosemary)	<i>Rosmarinus officinalis</i>
Tomillo (Thyme)	<i>Thymusvulgare</i>
Vainilla (Vanilla)	<i>Vanilla planifolia, V. pompona, V. tahilensis</i>

Entre los antimicrobianos naturales de origen vegetal se tienen a los aceites esenciales, con ellos se han realizado diferentes estudios para ver su función bacteriostática, fungiestática y fungicida en diferentes concentraciones, dando con ello un gran resultado con diferentes tipos de hongos y bacterias patógenas siendo una de las grandes alternativas de antimicrobianos naturales para ser utilizados en la conservación de los alimentos (Soriano del Castillo, 2007).

Los aceites esenciales son una mezcla compleja de compuestos volátiles y se destaca por su olor, que evoca la fragancia de la planta, fruta o madera, de la que proviene. Estos se han utilizado en diferentes industrias tales como la farmacéutica, cosmética y alimentaria. En la industria alimentaria se han utilizado en diferentes alimentos como modificadores de olor y sabor (Stashenko; 2009).

Entre los compuestos volátiles que conforman a los aceites esenciales se tienen los fenoles, aldehídos, alcoholes, alcoholes sesquiterpenos, cetonas, ésteres e hidrocarburos (Reyes y col, 2012).

Tabla 4. Principales Componentes volátiles de aceites esenciales de especias y plantas encontradas comúnmente. (Reyes y col., 2012)

Nombre común	Nombre científico	Componente mayoritario	Composición aproximada(%)
Cilantro	<i>Coriandrum sativum (seeds)</i>	Linalol E-2-decanal	70% -
Canela	<i>Cinnamomum zeylandicum</i>	Trans-cinamaldehído	65%
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol Timol Y-Terpineno p-cimeno	traza 80% traza 64% 2-52% traza 52%
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	α-pineno Acetato de bornilo Alcanfor 1,8 cineol	2-25% 0-17% 2-14% 3-89%
Salvia	<i>Salvia officinalis L.</i>	Alcanfor α-pineno β-pineno 1,8 cineol α-tujona	6-15% 4-5% 2-10% 6-14% 20-42%
Clavo	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol Acetato de eugenilo	75-85% 8-15%
Tomillo	<i>Thymus vulgare</i>	Timol Carvacrol Y-Terpineno p-cimeno	10-64% 2-11% 2-31% 10-56%

Katayama y Nagail (1960) encontraron que el eugenol, carvacrol, timol y borneol son los compuestos activos de algunos aceites esenciales, dado a que son compuestos fenólicos concluyeron que la presencia de un grupo hidroxilo aumenta la actividad antimicrobiana.

Los aceites esenciales se han empezado a utilizar en la industria alimentaria como antimicrobianos, teniendo como inconveniencia alteraciones sensoriales, así como pérdida de la calidad del mismo si se aplican de manera directa (fase líquida) al alimento. Otra alternativa es emplear a los aceites esenciales por contacto en fase de vapor, en la cual no tendrá contacto directamente con el alimento si no

simplemente sus compuestos volátiles, teniendo la actividad antimicrobiana y disminuyendo los inconvenientes (Reyes y col, 2012; Olivares y López, 2013).

El mecanismo de acción de los aceites esenciales sobre los microorganismos es debido al carácter hidrofóbico y lipofílico de los monoterpenos y compuestos fenólicos. Este mecanismo empieza con la degradación de la pared celular, ocasionando un daño a la membrana citoplasmática y a las proteínas de membrana, teniendo así la salida de contenido citoplasmático y favoreciendo el flujo de protones dando así la muerte de los microorganismos. (Gómez y López-Malo, 2009; Raybaudi, 2007).

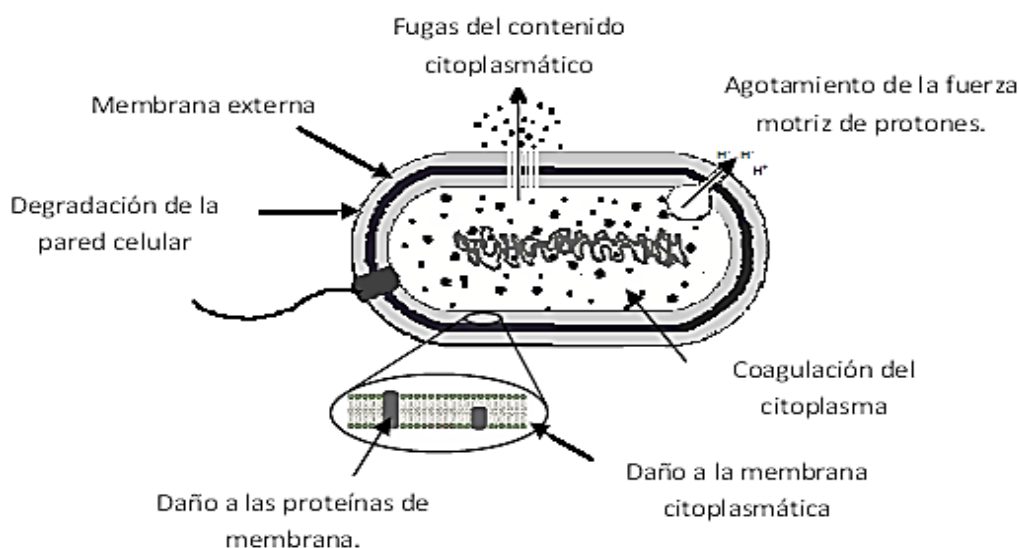


Figura 2. Mecanismos de acción de los aceites esenciales. (Raybaudi, 2007)

2.8 Antimicrobianos en Fase de Vapor

En la conservación de alimentos se han usado un amplio rango de componentes antimicrobianos en materiales de envasado para el control patogénico transmitido por alimentos. (Sung y col.,2013; Otoni y col.,2016)

Estos antimicrobianos pueden ser de naturaleza no volátil y volátil. Los antimicrobianos no volátiles incluyen bacteriocinas, enzimas, ácidos orgánicos, óxidos metálicos nanométricos y más recientemente bacteriófagos. Por otra parte, los antimicrobianos volátiles o fase de vapor son fácilmente relacionados en una

forma gaseosa para ser introducido al espacio dentro de un empaque cerrado, desarrollando sistemas de empaquetamiento antimicrobiano (Otoni y col.,2016).

De acuerdo con Pereira de Abreu y col. (2012), la principal ventaja del uso de antimicrobianos volátiles es que estos no necesitan contacto directo entre el alimento y el material de empaquetamiento. Otra de las ventajas se debe a que los componentes son dispersados y no tiende a afectar las propiedades organolépticas de un alimento. Estos antimicrobianos pueden alcanzar casi cualquier alimento contenido en un empaque (Goñi y col.,2009; Lair y Phillips,2011).

Unos de los antimicrobianos distinguidos por su naturaleza volátil son los aceites esenciales, estos son sustancias biológicas producidas por plantas como metabolito secundario, la volatilidad de los aceites esenciales es debido al alto contenido de constituyentes aromáticos de bajo peso molecular, la composición de los aceites esenciales varía de acuerdo de la planta que se extrae (Burt,2004; Atarés y Chiralt, 2016; Bajpoi y col.,2016).

Los principales compuestos volátiles (Tabla 5) de estos aceites derivan de un grupo de terpenoides, sesquiterpenos y posiblemente diterpenos, los cuales a su vez contienen diferentes grupos de hidrocarburos, ácidos, alcoholes, aldeidos, esterres, éteres y cetonas (Reyes y col.,2012).

Tabla 5. Principales compuestos volátiles. (Reyes y col.,2012)

Grupo químico funcional	Componentes
Fenoles	Carvacrol
	Timol
	Eugenol
Aldehídos	Citral
	Citronela
	Benzaldehído
	Perilaldehído
Alcoholes	Cimanaldehído
	Terpenos
	Borneol
	Mentol
	Geraniol
	Linalol
Alcoholes sesquiterpenos	Feniletanol
	Farnecol
Cetonas	Cedrol
	Alcanfor
Esteres	Carvona
	Anetol
Esteres y Oxidos	Etil acetato
	Metil timol
	Anetol
Hidrocarburos	Cineol
	Careno
	Limoneno

La generación de vapores de aceites esenciales se basa en la creación de una atmósfera a una cierta temperatura, o en un microambiente dado por los mismos aceites (López y col.,2005).

Los vapores de los aceites esenciales tienen una efectividad contra bacterias y hongos, sin embargo, se ha demostrado que el efecto de cada aceite esencial varía de acuerdo a sus grupos funcionales que contienen, no obstante, estos vapores tienen mayor efecto antifúngico que antibacteriano, teniendo así que utilizar una concentración menor para efectos antifúngicos que antibacterianos. En diversas investigaciones se ha llegado a la conclusión que entre más ricos los

aceites esenciales en compuestos fenólicos tendrá mayor potencia antimicrobiana (Reyes y col.,2012).

Asimismo, Inouye y col. (2006) obtuvieron que la actividad antimicrobiana se reduce de acuerdo a un orden de componentes principales: fenoles>alcoholes>cetonas>éteres>óxidos.

La actividad antimicrobiana de aceites esenciales es atribuida en su mayoría a los compuestos fenólicos (timol, carvacrol, eugenol), presentes en concentraciones de hasta un 85% (Bajpai y col.,2012). Estos perjudican sistemas enzimáticos bacteriales, material genético y la bicapa fosfolipídica de la membrana celular (Abdollahzadeh y col, 2014).

Los posibles modos de acción de compuestos fenólicos han sido reportados en diferentes artículos. Sin embargo, esos mecanismos tienden a no ser elucidados completamente. Prindle y Wright (1977) mencionan que el efecto de compuestos fenólicos es dependiente de la concentración. Una baja concentración de fenoles afecta la actividad enzimática, especialmente de aquellas enzimas asociadas con la producción de energía, mientras que a mayor concentración de fenoles causan desnaturalización de proteínas. El efecto de antioxidantes fenolíticos en el crecimiento microbial y producción de toxinas podría ser el resultado de la habilidad de los compuestos fenolíticos de alterar la permeabilidad celular microbial, permitiendo la pérdida de macromoléculas del interior. Este podría además interactuar con proteínas de membrana, causando una deformación en la estructura y funcionalidad (Fung y col,1977).

3. JUSTIFICACION

La conservación de los alimentos es una de las áreas en las cuales ayuda a que el alimento tenga un mayor tiempo de vida en anaquel, no obstante, mucho de los métodos de conservación lleva consigo algunas alteraciones a los alimentos sensorial y nutrimentalmente. En la actualidad se está llevando a cabo muchos cambios en los métodos de conservación e inventando nuevos métodos sustituyendo a aquellos que suelen causarles modificaciones importantes a las propiedades del alimento.

El desarrollo de empaques activos es uno de los métodos de conservación que va tomando importancia debido al amplio potencial de aplicación, estos empaques no solo permiten que el alimento no tenga un constante paso de oxígeno y de humedad si no también se puede llevar a cabo una adición de diferentes compuestos tales como antimicrobianos que permitan la disminución de la carga microbiológica para evitar el deterioro del mismo.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

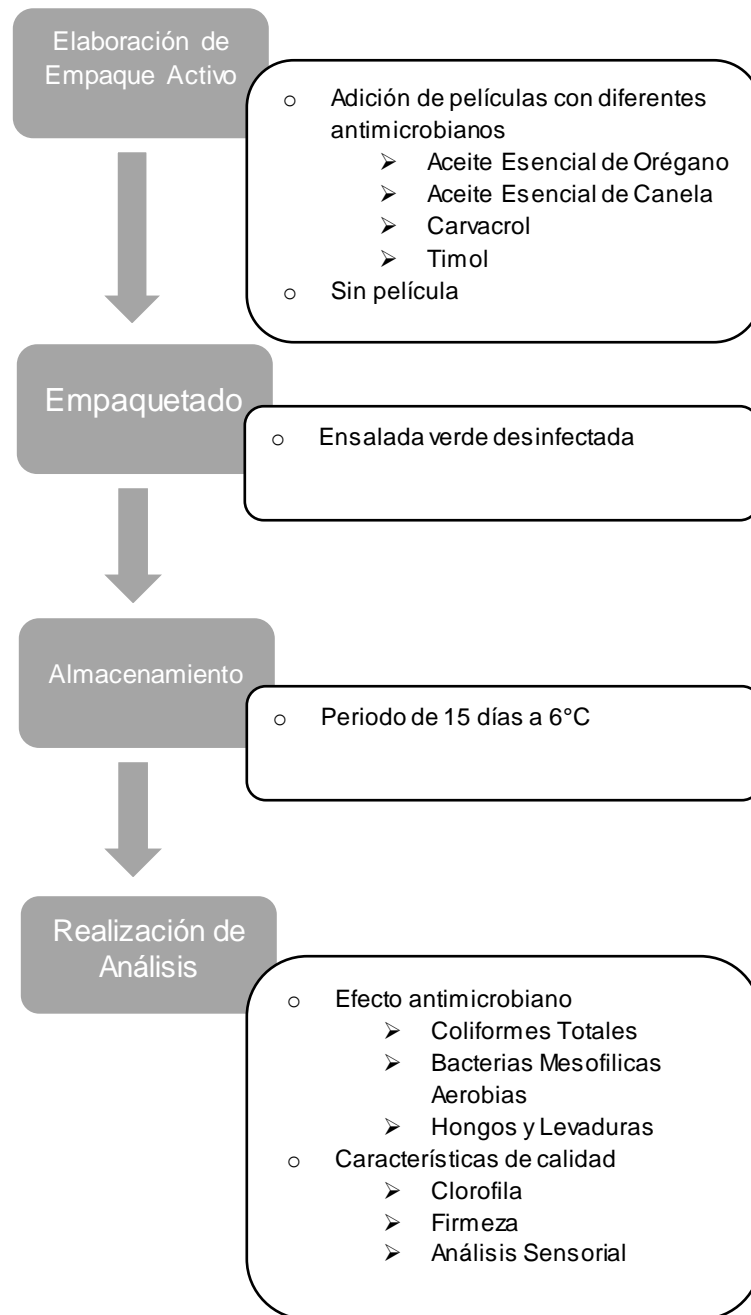
Desarrollar y evaluar el efecto de películas comestibles adicionadas con antimicrobianos de origen natural en un empaque activo para alimentos mínimamente procesados por fase de vapor.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

Elaborar un empaque activo con películas comestibles de almidón adicionadas con antimicrobianos de origen natural (timol, carvacrol, aceite esencial de orégano y canela).

Evaluar el efecto de antimicrobianos de origen naturales por contacto en fase de vapor sobre alimentos mínimamente procesados (ensalada verde) contenidos en un empaque activo.

5. DIAGRAMA DE TRABAJO



6. MATERIAL Y MÉTODOS

- Material de vidrio: el necesario para realizar cada determinación.
- Material biológico: Lechugas y Espinacas en buen estado.
- Reactivos: los necesarios para cada determinación grado analítico, microbiológico o grado alimenticio.

Tabla 6. Métodos y Referencias

Determinación	Técnica	Referencia
Bacterias Mesofilicas Aerobias	Conteo en placa	NMX-F-253-1977
Hongos y Levaduras	Conteo en placa	NMX-F-255-1978
Clorofila	Fotometría	Martínez-Sánchez y col.,2006
Coliformes Totales	Número más probable	NOM-112-SSA1-1994
Análisis sensorial	Propiedades físicas y químicas	Stone y Sidel;2004

Tabla 6. Equipos

Equipo	Marca	Modelo
Penetrómetro	Humboldt	H-1200
Fotómetro	Leitz	M
Batidora	Oster	2523
Deshidratador	Excalibur	8250
Campana de Flujo Laminar	ESEVE	CFLV-104

7. METODOLOGÍA

7.1 Empaque Activo

Se realizó una solución formadora de película la cual estaba compuesta de 5% de almidón, 2% de glicerol e hidróxido de sodio (0.125N) y ácido fosfórico (85%). Para la obtención de la solución formadora de película se calentó agua a temperatura aproximadamente de 30°C, teniendo el agua calentada se procedió a colocarla en un vaso de precipitado y añadiendo el hidróxido de sodio para obtener una concentración de 0.125N, teniendo homogenizado el hidróxido de sodio y con agitación constante se agregó el almidón poco a poco hasta la obtención de una mezcla homogénea, posteriormente se agregó el glicerol y se ajustó el pH de la solución formadora de película a 5-6 con ácido fosfórico. De la solución formadora de película se separaron 20 ml en diferentes vasos de precipitados para que se añadieran los diferentes antimicrobianos (aceite esencial de orégano al 1%, 2% y 4%; aceite esencial de canela al 1%, 2% y 4%; timol a 5000ppm y 10000ppm; carvacrol a 10000ppm y 15000ppm). En un empaque rígido de cierre hermético se le colocó alrededor de 3 ml de la solución formadora de película con sus respectivos antimicrobianos a la tapa del empaque y con un deshidratador se dejó secar durante 3-5 minutos hasta la formación de la película comestible, este procedimiento se llevó a cabo 3 veces para la formación de capas. Ya teniendo los empaques preparados, se procedió al lavado, desinfectado y cortado de las lechugas y espinacas que conformaron la ensalada verde en una proporción de 70% y 30% respectivamente, de la ensalada verde preparada se tomaron 32 g y se colocaron en cada uno de los empaques, posteriormente se tomaron las tapas que contenían las películas comestibles procediendo al cierre hermético de cada empaque, procediendo a su almacenamiento en refrigeración a una temperatura de 6°C durante un periodo de 15 días. Se realizaron los análisis microbiológicos cada tercer día de acuerdo a las Normas: NMX-F-253-1977, NMX-F-255-1978 y NOM-112-SSA1-1994. Para las características de calidad se realizaron las pruebas de firmeza y clorofila cada tercer día, mientras para el análisis sensorial se realizó cada 6 días.

7.2 Firmeza

Para la determinación de firmeza de la ensalada verde se utilizó un penetrómetro universal. Se colocó el empaque con la ensalada en la base del penetrómetro de ahí se ajustó para que quedara a una distancia adecuada la punta del penetrómetro, la punta utilizada en la prueba es cónica y colocando un peso de 50 gr de presión en el émbolo, posteriormente se ajustó el penetrómetro a 0 mm y 400 mm de penetración, se procedió a dejar caer la punta, ya teniendo la punta en la ensalada se tomó lectura de los milímetros de penetración que se obtuvieron, el procedimiento se realizó por duplicado.

7.3 Clorofila

Se colocó 1 g de muestra de la ensalada verde en proporción de lechuga (70%) y espinaca (30%) del empaque activo y se procedió a cortar debidamente en trozos muy pequeños colocándolos en un tubo de ensaye, este procedimiento se llevó a cabo para cada una de las ensaladas que fueron añadidas en los diferentes empaques activos, a cada uno de los tubos de ensaye se le añadió 9 ml de alcohol etílico al 90%, dejando reposar durante 24 horas en un lugar oscuro, transcurrido el tiempo se llevó a cabo la lectura en un fotómetro a 640 nm, calibrándolo a 100% de transmitancia con un blanco de alcohol etílico al 90%, después se procedió a colocar una alícuota de 1ml de cada muestra en tubos del fotómetro, se colocó el tubo con la alícuota en el fotómetro midiendo la transmitancia obtenida, en cada cambio de tubo con alícuota se volvía a calibrar el fotómetro a 100% de transmitancia, el procedimiento se realizó por duplicado.

7.4 Análisis Sensorial

Se pesó 1 g de ensalada de cada empaque en un recipiente muestreador, cada gramo en su debido recipiente, a cada recipiente se le asignó un número al azar. Se dio a un grupo de 50 evaluadores no entrenados cada muestra de los diferentes empaques y la evaluación fue calificada utilizando una boleta con una escala verbal, escriturada y bipolar de 5 puntos, a cada persona se le dio 5

recipientes con ensalada y se les dio una boleta donde calificaron la apariencia, el color, el olor y el sabor de las ensaladas (Anexo 1).

7.5 Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con la ayuda de la prueba de Tukey con un 95% de confianza para determinar si existe una diferencia significativa con la ayuda del programa Minitab 16.1.0.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Efecto Antimicrobiano

La carga microbiana en un alimento fresco es un indicativo de las buenas prácticas higiénicas que se realizaron y en lo consiguiente para el consumo. En la figura 3 se presentan los resultados de la disminución en ciclos logarítmicos de las Bacterias Mesofílicas Aerobias (BMA) en los diferentes empaques activos realizados, dando así que el aceite esencial de orégano al 2% y 4% en fase de vapor presentan una mayor disminución en ciclos logarítmicos presentando igual diferencias significativas con respecto a los demás empaques, no obstante, los demás empaques presentan una disminución entre de 1-1.5 ciclos logarítmicos.

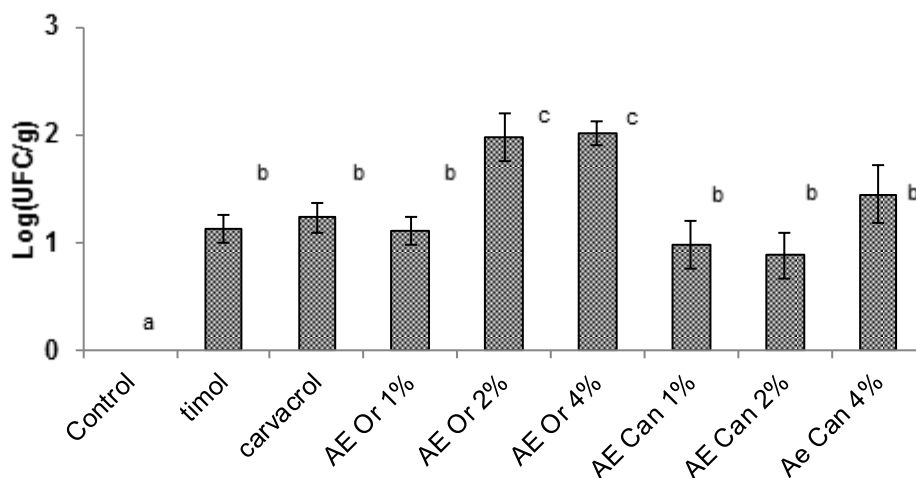


Figura 3. Reducción de carga microbiana (en ciclos logarítmicos) de Bacterias Mesofílicas Aerobias Las letras diferentes en cada columna representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

En el caso de las coliformes totales la disminución mayoritaria en ciclos logarítmicos se tuvo con los empaques con AE Or al 2% y 4% en fase de vapor, teniendo diferencias significativas con respecto a los demás empaques, no obstante, en los demás empaques con antimicrobiano presentan una disminución entre 0.25-0.75 ciclos logarítmicos (Figura 4). Lambert y col. (2001), Campomanes (2003) y García (2005) afirman que los componentes que se encuentran en los aceites esenciales tienen un efecto sinérgico para inhibir diversos tipos de

microorganismos. Flores y col (2005) asegura que el aceite esencial de orégano al 3% inhibe totalmente el crecimiento de bacterias patógenas, por otro lado, Albado (2001) afirma que el aceite esencial de orégano posee propiedades antimicrobiales, debido a sus aceites volátiles que son sumamente activos contra las bacterias patógenas, sin embargo, Sivropoulou y col. (1996) evaluó los componentes aislados del aceite esencial de orégano resultando que el carvacrol y timol poseen los niveles más altos de actividad contra microorganismos.

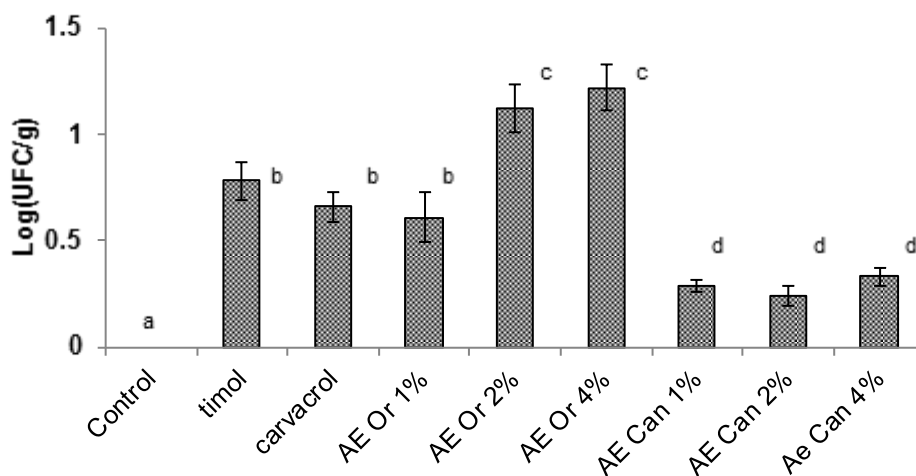


Figura 4. Reducción de carga microbiana (en ciclos logarítmicos) de Coliformes Totales en. Las letras diferentes en cada columna representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Para los Hongos y Levaduras (Figura 5) la disminución de ciclos logarítmicos no sobrepasó a 1 obteniéndolo con el empaque con carvacrol a 10000 ppm, no obstante, en este empaque no se obtuvieron diferencias significativas con respecto a los demás. La disminución de los otros empaques se mantuvo entre 0.3-0.8 ciclos logarítmicos, en lo cual no hubo una gran diferencia con respecto al de mayor disminución. Para López y col (2007) el aceite esencial de orégano tiene más efectividad antifúngica que el aceite esencial de canela, no obstante García y col. (2006) puntualizó que la dosis mínima fungicida para el aceite esencial de orégano fue de 1000 ppm y 2000 ppm para el aceite esencial de canela, sin embargo, Barrera y García (2008) observaron que el carvacrol y timol inhibieron totalmente el crecimiento micelial.

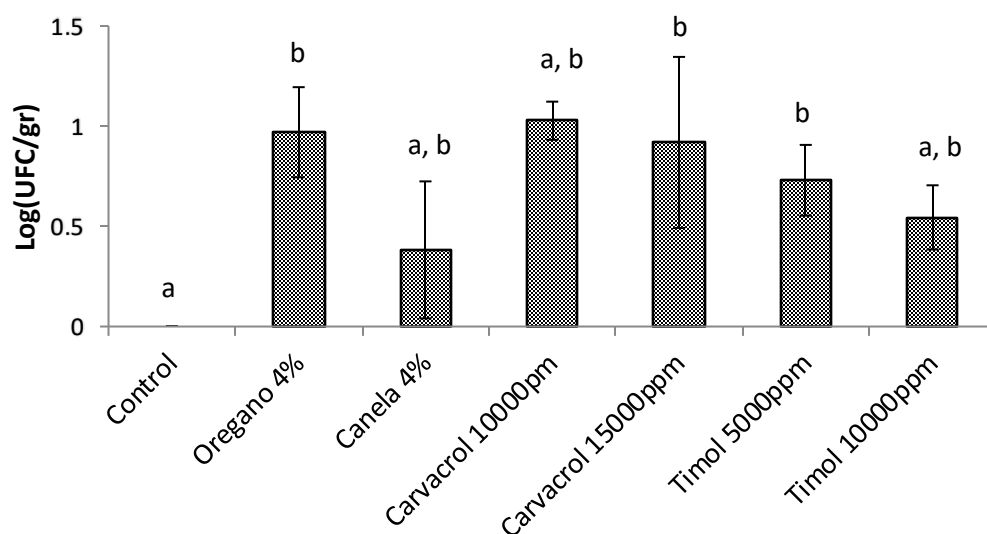


Figura 5. Reducción de carga microbiana (en ciclos logarítmicos) de Hongos y Levaduras. Las letras diferentes en cada columna representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

8.2 Características de calidad

8.2.1 Clorofila

Durante la senescencia de los tejidos verdes de los vegetales hay pérdida de clorofila debido a diferentes factores, entre ellos, la actividad de la clorofilasa, la magnesio desquelasa y el bajo pH todo esto dependiendo del tejido, al igual que debido a un daño a un tejido verde vulnerable tal como la lechuga (hojas), provoca la pérdida de clorofila comenzando desde el punto de corte (Ihl y col; 2003). León A. y col (2007) observaron que la lechuga troceada a ser expuesta al agua presenta una disminución de clorofila.

En la Figura 6 la concentración de clorofila de las ensaladas de los empaques con carvacrol (10000 ppm y 15000 ppm) y timol (5000 ppm y 10000 ppm) se observaron diferencias de 0.05 mg/g en su disminución con respecto a la concentración del día 0; por lo contrario, las ensaladas contenidas en los empaques con aceite esencial de orégano 4% (AE Or 4%) y aceite esencial de canela 4% (AE Can 4%) se observaron disminuciones de 0.2 mg/g de la clorofila.

Para Ke y Solveit (1989) el desarrollo de pardeamiento se ha asociado íntimamente con la síntesis de fenilpropanoides por parte del enzima fenilalanina amino-liasa (PAL) y posterior oxidación por la enzima polifenoloxidasasa (PPO). Cantos y col (2001) sugirieron que el pardeamiento enzimático de lechuga fresca cortada puede ser inducido por una mínima actividad de las enzimas oxidativas PPO y PCD. Además, un contenido mínimo de componentes fenólicos sintetizados por PAL podría ser suficiente como sustratos en la reacción de oxidación. Por otro lado, el aceite esencial de orégano tiene un alto contenido de compuestos fenólicos y al estar en una concentración elevada podría actuar como sustrato de la enzima polifenoloxidasasa. Contrera (2002) menciona que el aceite esencial de orégano tiene una alta actividad antioxidante protegiendo así a células del daño oxidativo y Lozano (2004) comprueba que los compuestos químicos del aceite esencial de orégano responsables de su poder antioxidante son el carvacrol y timol.

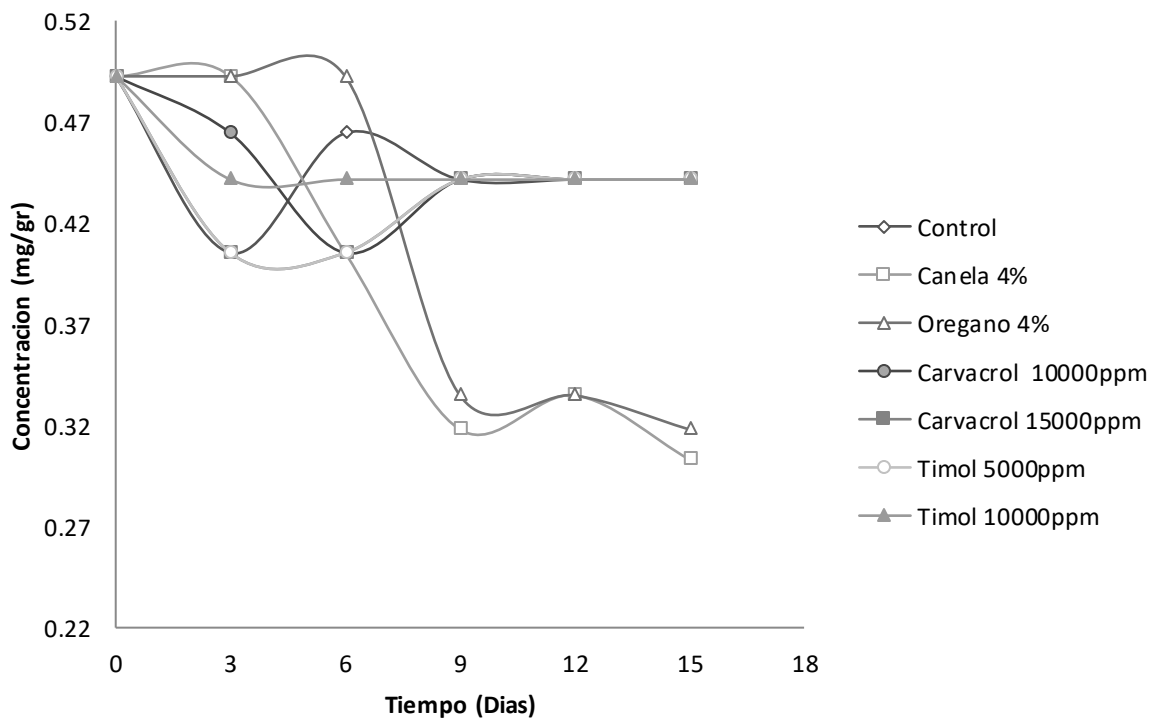


Figura 6. Concentración de clorofila presente en las ensaladas de los empaques activos en un periodo de 15 días.

8.2.2 Firmeza

En la figura 7 se muestra que hay una ligera disminución en la firmeza de la ensalada verde, teniendo que el empaque con carvacrol 10000 ppm mantuvo su firmeza prácticamente como al inicio, mientras que el empaque con timol 5000 ppm solo tuvo una pequeña diferencia con respecto al empaque con carvacrol 10000 ppm, por otro lado los empaques con carvacrol 15000 ppm y timol 10000 ppm si tuvieron una disminución considerable con respecto a la inicial, en cambio, los empaques con aceite esencial de canela al 4% y con aceite esencial de orégano al 4% perdieron completamente su firmeza al igual que la ensalada que contenía el empaque control. Stahl y Sies (2002) mencionan que un daño provocado en el tejido de la lechuga desencadena una señal de estrés originada por peróxido de hidrogeno en el apoplasto de la célula, la producción de este mismo compuesto induce una mayor síntesis en el plasmalema celular mediante NADH-oxidasa, que aumenta la generación de radicales hidroxilo capaces de incrementar la peroxidación lipídica y el deterioro de la membrana celular, por otra parte, Acedo (2010) relaciona que la pérdida de humedad provocada por un daño mecánico aumenta la susceptibilidad al deterioro, causando un aspecto lánguido en los vegetales.

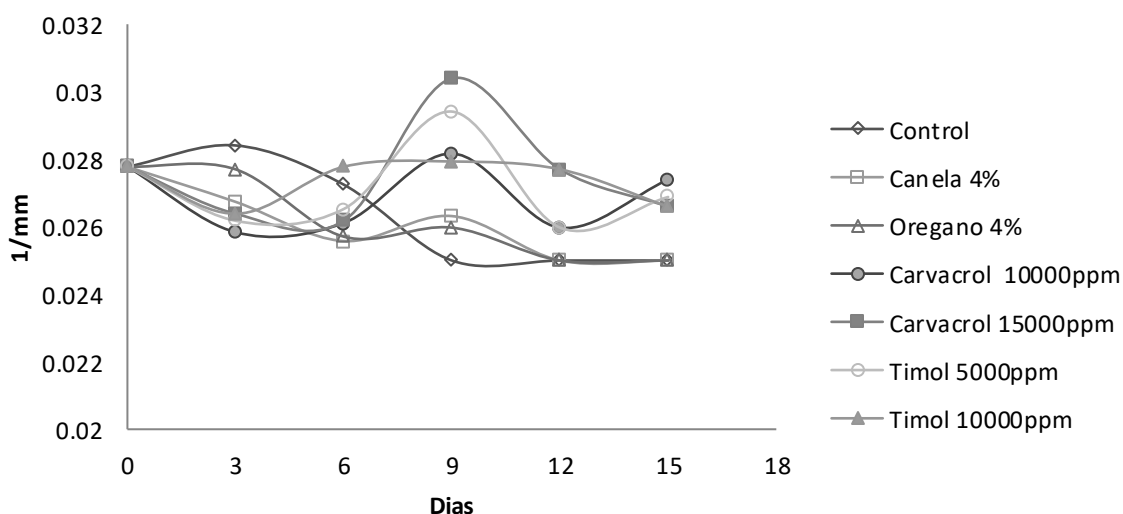


Figura 7. Milímetros de penetración presente en las ensaladas de los empaques activos en un periodo de 15 días.

8.2.3 Análisis sensorial

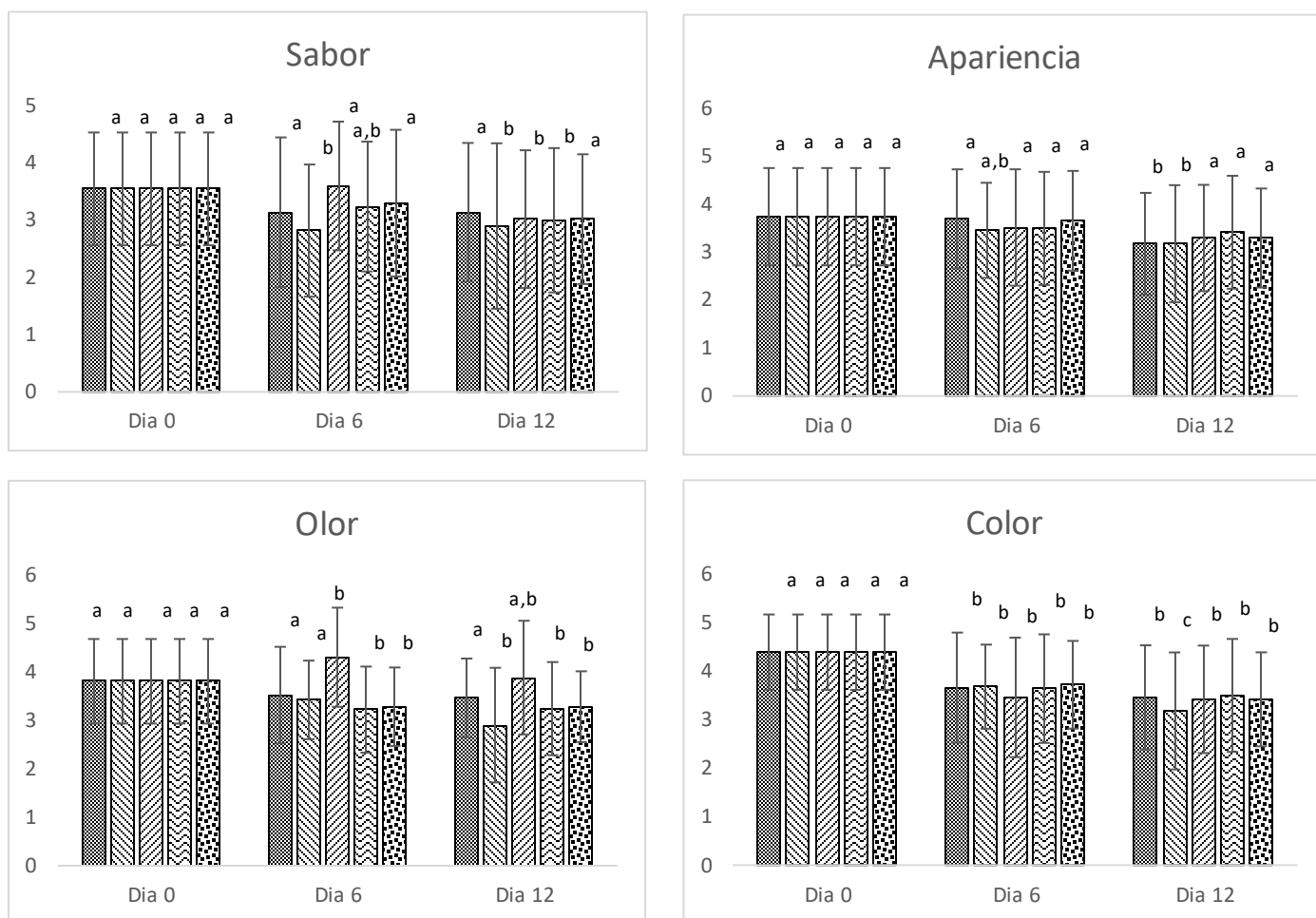







Figura 8. Características sensoriales de las ensaladas evaluadas contenidas en los empaques activos donde  Control,  Aceite esencial de orégano al 1%,  Aceite esencial de canela al 2%,  Timol a 10000 ppm y  Carvacrol a 10000 ppm.

En la figura 8 se muestran los resultados del análisis sensorial, dando que en la característica del sabor en el día 6 de la ensalada contenida en el empaque con aceite esencial de canela al 2% se mantuvo mostrando que este mismo mejoró su propiedad mientras que los demás empaques disminuyeron, para el día 12 las ensaladas contenidas en los empaques se mantuvieron con respecto al día 6 con excepción de la contenida en el empaque con aceite esencial de canela al que obtuvo disminución. Para la característica de la apariencia en el día 6 se registró una disminución para todas las ensaladas contenidas en los empaques sin tener

diferencias significativas con respecto al día 0, no obstante , para el día 12 hubo una disminución pero manteniéndose sin diferencias significativas las ensaladas contenidas en los empaques con timol 10000 ppm, carvacrol 10000 ppm y con aceite esencial de canela al 2% con respecto al día 0, por otra parte la ensalada contenida en el empaque con aceite esencial de orégano al 2% si obtuvo diferencia significativa con respecto al día 0 pero no con el día 6. En el caso de la característica del olor en el día 6 la ensalada contenida en el empaque con aceite esencial de canela al 2% mejoro en esta característica teniendo diferencias significativas con respecto al día 0, mientras que con los demás empaques se obtuvo una disminución, para el día 12 el empaque con aceite esencial de canela al 2% disminuyo con respecto al día 6 pero aun manteniendo el mejoramiento de la característica y sin tener diferencias significativas con respecto al día 0 y el día 6, no obstante, las ensaladas contenidas en los demás empaques se mantuvieron con respecto al día 6. Por otra parte la característica del color en el día 6 se obtuvo una disminución en todas las ensaladas de los empaques teniendo de igual manera diferencias significativas y para el día 12 se mantuvieron con respecto al día 6 sin tener diferencias significativas con excepción de la contenida en el empaque con aceite esencial de orégano al 2%. Vaca (2013) menciona que hortalizas tratadas con aceite esencial de canela presentan mejoras en las características sensoriales, mientras que la lechuga como la espinaca a los 7 días de almacenamiento bajo refrigeración y al ser evaluadas mediante una escala hedónica debe tener como calificación entre no gustó pero no disgustó y le gustó en sus características.

9. CONCLUSIONES

- Los antimicrobianos colocados en las películas comestibles dentro de los empaques activos mantuvieron a las ensaladas con una carga bacteriana baja, teniendo un efecto bacteriostático los vapores de estos, obteniendo un mayor efecto con la fase de vapor del aceite esencial de orégano.
- Los antimicrobianos colocados en las películas comestibles dentro de los empaques activos mantuvieron a las ensaladas con una carga fungica baja, teniendo un efecto fungiestatico los vapores de estos, obteniendo un mayor efecto el carvacrol a 10000 ppm en fase de vapor.
- El timol (5000 ppm y 10000 ppm) y carvacrol (10000 ppm y 15000 ppm) en fase de vapor a concentraciones bajas mantiene un efecto antioxidante en las células de los vegetales, previniendo así la degradación de la clorofila manteniéndola en un periodo de 15 días tal y como el día 0.
- Las concentraciones de carvacrol 10000 ppm y timol 5000ppm en fase de vapor al ser las más bajas obtuvieron un efecto antioxidante manteniendo la firmeza de la ensalada, no obstante, las ensaladas contenidas en los empaques con los aceites esenciales tuvieron pérdida total de la firmeza.
- Las ensaladas contenidas en los empaques activos con antimicrobianos naturales en fase de vapor a los 6 y 12 días tuvieron una aceptabilidad por los evaluadores no entrenados, teniendo que la ensalada contenida en el empaque con aceite esencial de canela al 2% fue de mayor gusto.

10. SUGERENCIAS

- Realizar un análisis microbiológico específico contra diferentes bacterias deterioradoras de alimentos.
- Medir la cantidad de antimicrobiano en fase de vapor que se encuentra rodeando el alimento en el empaque activo.

11. BIBLIOGRAFIA:

- Acedo A.L. (2010); "Postharvest technology for leafy vegetables"; AVRDC-ADB Postharvest Projects RETA 6208/6378; AVRDC Publication no. 10-7333. AVRDC-The world vegetable center, Taiwan p.67.
- Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., & Hosseini, H. (2014). "Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat"; *Food Control*, 35,177–183.
- Aguilar J. (2012); "Métodos de Conservación de Alimentos"; pág. 12-22; Red Tercer Milenio.
- Ahvenainen R. (2003); "Active and intelligent packaging: An introduction"; *Novel food packaging techniques*, pag. 5-21. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd.
- Albado E. (2001); "Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de Orégano"; Lima: Universidad Nacional Federico Villareal; 165 p.
- Artés-Hernandez F., Aguayo E., Gómez P y Artés F. (2009); "Productos vegetales mínimamente procesados o de la cuarta gama "; *Horticultura Internacional*; No. 69, 2009.
- Arredondo T. (2012); "Diseño de empaques comestibles activos a base de almidón modificado para su posible aplicación en alimentos en fresco"; Facultad de Química; Universidad de Querétaro; Tesis Maestría
- Atarés, L., y Chiralt, A. (2016); "Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging"; *Trends in Food Science & Technology*, 48, 51–62.
- Ávila-Sosa R. y López-Malo A. (2008); "Aplicación de sustancias antimicrobianas a películas y recubrimientos comestibles"; *Temas selectos en Ingeniería en Alimentos 2*: 4-13
- Bajpai, V. K., Baek, K. -H., & Kang, S. C. (2012); "Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review"; *Food Research International*, 45, 722–734.

- Barrera L. y García L. (2008); “Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (*Carica papaya*)”; Revista UDO Agrícola 8 (1): pág. 33-41.
- Bello J. (2000); “Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos”; Ed. Díaz de Santos; pág. 285-288
- Brindle L.P. y Krochta J.M. (2008); “Physical properties of whey protein-hydroxypropylmethylcellulose blend edible films”; Journal of Food Science, 73(9):446-454.
- Burt, S. (2004); “Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods a review”; International Journal of Food Microbiology, 94, 223–253.
- Campomanes M.J. (2003); “Evaluación del efecto de mezclas ternarias y cuaternarias de antimicrobianos sobre *Aspergillus parasiticus*”; Temas selectos de Ingeniería de Alimentos, Vol. 2 No. 1.
- Campos C.A., Gerschenson L.N. y Flores S.K. (2011); Development of edible films and coatings with antimicrobial activity”; Food Bioprocess Technol, 4:849-875.
- Cantos E., Espin J.C. y Tomás-Barberan F.A. (2001); “Effect of wounding on phenolic enzymes in six minimally processed lettuce cultivars upon storage”; J. Agric. Food Chem., 49.322-330.
- Contrera N. (2002); “Evaluación de la actividad antioxidante in vitro de algunos aceites esenciales en el proceso de peroxidación lipídica inducida por la radiación ultravioleta”. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander.
- Dominguez-Courtney M.F. y Jimenez-Munguia M.T. (2012); “Películas comestibles formuladas con polisacáridos: propiedades y aplicaciones”; Temas selectos de ingeniería en alimentos, 6-2:110-121.
- Espino-Diaz M., Ornelas-Paz J., Martinez-Tellez M.A., Santillan C., Barbosa-Canovas G.V., Zamudio-Flores P.B. y Olivas G.L. (2010); “Development and characterization of edible films base don mucilage of opuntia ficus-indica”; Journal of Food Science, 75(6):347-352.

- Espinoza-Herrera N., Pedroza-Islas R., San Martín-Martínez E., Cruz-Orea A. y Tomás S. (2011); “Therma, mechanical and microstructures properties of cellulase derivatives films: a comparative study”; *Food Biophysics*, 6(1):106-114.
- FAO (1993); “Prevención de pérdidas de alimentos postcosecha: frutas, hortalizas, raíces y tubérculos”; Manual, 17-18
- Flores J., Morales J., Delgado E., Gallegos J. y Soto O. (2005); “Empaque con actividad antimicrobiana a partir de aceite esencial de orégano”, XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
- Fontes L.B., Ramos K.K., Sivi T.C. y Queiroz F.C. (2011); “Biodegradable edible films from renewable sources-potential for their application in fried foods”; *American Journal of Food Technology*, 6(7):555-567.
- Fung D. Y. C., Taylor S., y Kahan J. (1977); “Effects of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus*”; *J. Food Safety* 1:39–51.
- García E., Quezada M., Moreno J., Sánchez G., Moreno E. y Pérez M. (2006); “Actividad Antifúngica de Aceites Esenciales de Canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y Orégano (*Origanum vulgare* L.) y su Efecto sobre la Producción de Aflatoxinas en Nuez Pecanera [*Carya illinoensis* (F.A. Wangenh) K. Koch]”, *Revista Mexicana de Fitopatología*, Vol. 24, Núm. 1, pág. 8
- García-García R.M. y Palou-García E. (2008); “Mecanismo de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos”; *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 2-2:41-51.
- García, L.T. (2005); “Evaluación de mezclas de agentes antimicrobianos en sistemas modelo líquidos”; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 49, No. 41.
- Gil Muñoz M.I.; Allende A.; Beltrán Riquelme D.; Selma M.V. (2005); “Nuevas tendencias de procesado y conservación de alimentos vegetales de IV Gama”; Edit. Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación; CTC Alimentación 26, pág. 146-157.

- Gómez-Sánchez A.I.; López-Malo A. (2009); “Potencial antimicrobiano de los aceites esencial de oregano (*Origanum vulgare*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*)”; Temas selectos de ingeniería de alimentos; 3-1, 33-45.
- Gonzales G.A., Alvares Parrilla E., de la Rosa C., Olivas I.G. y Ayala Zavala J.F. (2009); “Aspectos nutricionales y sensoriales de vegetales frescos cortados”; Edit. Trillas, Cap. 1, pág. 19-43.
- Goñi P., López P., Sánchez C., Gómez-Lus R., Becerril R. and Nerín C. (2009); “Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils”; Food Chem 116, 982–989.
- Hernández Valdez C.E. (2009); “Acción y efectos de la peroxidasa en alimentos”; Tesis, pág. 14-15.
- Ihl, M., Aravena, L., Scheuermann, E., Uquiche, E., Bifani, V. (2003); “Effect of immersion solutions on shelf-life of minimally processed lettuce”; Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, v. 36, p. 591-599.
- Inouye S., Uchida K. y Abe S. (2006); “Vapor activity of 72 essential oils against a Trichophyton mentagrophytes”; Journal of Infection and Chemotherapy, 12(4):210-216.
- Instituto de Tecnología Alimentaria Medellín, Antioquia. (2004); “Nuevas tecnologías en la conservación de alimentos”; Mundo Alimentario Noviembre – Diciembre.
- Jay J. (2002); “Microbiología moderna de los alimentos”; Edit. Acribia S.A., Edic. 4Cap 1.
- Jeantet R., Croguennec T., Schuck P. y Brulé G. (2013); “Ciencia de los alimentos”; Vol. 1, Estabilización biológica y fisicoquímica; Edit. ACRIBIA, S.A.; Cap. 6, pág. 143-149.
- Katayama, T. y Nagai, I. (1960). “Chemical significance of the volatile components of spices in the food preservative view point”. VI. structure and antibacterial activity of terpenes. Bull. Japan Soc. Sci. Fisheries 26:29–32.
- Ke D. y Saltveit M.E. (1989); “Wound-induced ethylene production, phenolic metabolism and susceptibility to russet spotting in iceberg lettuce”; Physiol, Plant,76,412-418.

- Kerry J.P., O'Grady M.N. y Hogan S.A. (2006); "Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review"; *Meat Science*, 74, 113-130.
- Kester J.J. y Fennema O.R. (1986); "Edible films and coating: a review"; *Food Technology*; 40(12): 47-59
- Khan T., Park J.K. y Kwon J.M. (2007); "Functional biopolymers produced by biochemical technology considering applications in food engineering"; *Korean Journal of chemical Engineering*, 24(5):816-826.
- Lair k. y Phillips C. (2011); "Vapor Phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials?"; *Letters in Applied Microbiology*, 54:169-174.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J. y G.J.E. Nychas (2001); "Estudio de la Concentración Mínima Inhibitoria y el modo de acción del Aceite Esencial de Orégano, Timol y Carvacrol", *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 22, No. 2.
- León A., Frezza D. y Chiesa A. (2007); "Evolución de color en lechuga (*Lactuca Sativa L.*) mantecosa mínimamente procesada: efecto del troceado y la inmersión en cloruro de calcio"; V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones; pag 666.
- Lopez, P., Sanchez, C., Batlle, R. and Nerin, C. (2005); "Solid and vapour-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains"; *J Agric Food Chem* 53, 6939–6946.
- López P., Sánchez C., Batlle R. and Nerin C. (2007); "Vapor-Phase Activities of Cinnamon, Thyme, and Oregano Essential Oils and Key Constituents against Foodborne Microorganisms"; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, pág. 4358-4356
- Lozano, E. (2004). "El orégano: propiedades, Composición, y actividad biológica de sus componentes". México D.F: Universidad Autónoma de Queretano. 98p.
- Luengo L., J. (1999). Nicolás Appert (1752-1841). Antecedentes históricos de la preservación de alimentos. *TecnoVet* , 5 (1) . Recuperado de <http://www.tecnovet.uchile.cl/index.php/RT/article/view/5221/5101>

- Martínez-Sánchez A., Allende A., Bennett R.N., Ferreres F., Gil M.I. (2006); “Microbial, nutritional and sensory quality of rocket leaves as affected by different sanitizers”; Science Direct; Postharvest Biology and Technology 42 (2006) 86–97
- Martínez-Tenorio Y. y López-Malo A. (2011); “Envases activos con agentes antimicrobianos y su aplicación en los alimentos”; Temas selectos de ingeniería de alimentos, 5-2:1-12.
- Nanda R. y Nayak P. (2009); “Edible biodegradable films for packaging applications”; Popular Plastics Food Packaging, 54(2):17-22.
- NMX-F-253-1977; “Cuenta de bacterias mesofílicas aerobias “; Dirección General de Normas
- NMX-F-255-1978; “Método de conteo de hongos y levaduras en alimentos “; Dirección General de Normas
- NOM-112-SSA1-1994; “Determinación de Bacterias Coliformes. Técnica del número más probable “; Diario Oficial de la Federación
- Olivares M.A. y López A. (2013); “Potencial antimicrobiano de mezclas que incluyen aceites esenciales o sus componentes en fase vapor”; Temas selectos de Ingeniería de Alimentos 7:78-86
- Otoni C.G., Espitia P.J.P., Avena-Bustillos R.J. y McHugh T.H. (2016); “Trends in antimicrobial food packaging systems: emitting sachets and absorbent pads”; Food Research International, 83:60-73.
- Ozdemir M. y Floros J.D. (2010); “Active Food Packaging Technologies”; Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 44(3):185-195.
- Paseiro Losada, P., Cacho Palomar J.F., Juárez Iglesias M., Ortega Hernández-Agero T. (2010); “Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los envases activos e inteligentes”; Revista del comité científico; pág. 89-105
- Patiño N.R., Moreno H.M. y Chaparro M.P. (2012); “Efecto de la aplicación de un recubrimiento comestible antimicrobiano y antioxidante a partir de aceite de orégano (*Origanum vulgare*) en la calidad y vida útil de lechuga (*Lactuca sativa* L) mínimamente procesada refrigerada”; Revista de la

Asociacion Colombiana de Ciencia y Tecnologia de Alimentos, Vol. 21, No. 26, 43-59.

- Pereira de Abreu D. A., Cruz J.M., y Paseiro Losada P. (2012); “Active and intelligent packaging for the food industry”; *Food Reviews International*, 28, 146–187.
- Prindle R. F. y Wright E. S. (1977); “Phenolic compounds”; In Block, S. S., Ed., *Disinfection, Sterilization and Preservation*. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Qiu-Ping Z. y Wen-Shui X. (2008); “Physicochemical properties of edible and preservative films from chitosan/cassava starch/gelatin blend plasticized with glicerol”; *Food Technology and Biotechnology*, 46(3):262-269.
- Raybaudi, R. (2007); “Uso de sustancias antimicrobianas naturales en combinación con compuestos estabilizadores de calidad para controlar microorganismos patógenos y extender la vida útil de frutas frescas cortadas”; Universidad de Lleida, tesis doctoral.
- Reyes F., Palou E. y López A. (2012); “Vapores de aceites esenciales: alternativa de antimicrobianos naturales”; *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos* 6:29-39
- Rodríguez, J. J. J. (2005). *Nuevas tecnologías en la conservación de alimentos*. Consumer eroski Julio.
- Rodríguez-Sauceda R., Rojo-Martinez G., Martinez-Ruiz R., Piña-Ruiz H., Ramirez-Valverde B., Vaquera-Huerta H. y Cong-Hermida M. (2014); “Envases inteligentes para la conservación de alimentos”; Universidad Autónoma Indígena de México; Ed. Ra Ximhai; vol. 10, núm. 6, pág. 151-173
- Rosas-Gallo A. y López-Malo A.; “Actividad antimicrobiana de aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*)”; *Temas selectos de tecnología de alimentos*; 5-1, 41-50, 2011.
- Sierra A., Gutiérrez Carranza L.A. y Martínez S. (2011); “Desarrollo de empaques poliméricos apropiados para la comercialización de gulupa en

fresco (*Passiflora edulis* Sims)”; Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia

- Sivropoulou A., Papanikolaou E., Nikolaou C., Kokkini S., Lanaras T. y Arsenakis H. (1996); “Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum assential oils”; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(2), 1202-1205.
- Soriano del Castillo J.M (2007); “Micotoxinas en Alimentos “; Ed. Díaz de Santos; pág. 82.
- Stahl W. y Sies H. (2002); “Carotenoids and protection against solar UV radiation”; *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 15(5):291-6.
- Stashenko E.E. (2009); “Aceites esenciales”; Universidad Industrial de Santander, Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromaticas y Medicinales Tropicales.
- Stone H. y Sidel J. L.; “Sensory Evaluation Practices“ ; 3ra Edic.; Edit. Elsevier Academic Presi; 2004
- Sung, S. Y., Sin, L.T., Tee, T.T., Bee, S.T., Rahmat, A. R., Rahman, W. A. W. A. y Vikhraman, M. (2013); “Antimicrobial agents for food packaging applications”; *Trends in Food Science & Technology*, 33, 110–123.
- Superior de gastronomía (2011); “Antimicrobianos naturales: conservando los alimentos de forma natural “; <http://sgastronomia.blogspot.mx/2011/11/antimicrobianos-naturales-conservando.html>
- Vaca Singaña V. (2013); “Estudio de la aplicación de aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) para optimizar la calidad microbiológica y sensorial de cuatro tipos de hortalizas: col de repollo (*Brassica oleracea var. capitata* cv. bronco), col morada (*Brassica oleracea var. capitata* f. rubra), lechuga iceberg tipo salinas (*Lactuca sativa var. capitata*) y espinaca (*Spinacia oleracea* L.)”, Facultad de ciencia e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato, Tesis Licenciatura.

- Vargas M., Pastor C., Chiralt A., McClements D. y Gonzalez-Martinez C. (2008); "Recent advances in edible coatings for fresh and minimally processed fruits"; *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(6):496-511.
- Yam K., Takhistov P. y Miltz J. (2005); "Intelligent packaging: Concept and applications"; *Journal of Food Science*. 70:1-9

12. ANEXOS

ANEXO 1. Papeleta para la evaluación sensorial.

 EVALUACION SENSORIAL ENSALADA VERDE					
MUESTRO: 43					
INSTRUCCIONES: Degustar la muestra, anotando que tanto le gusta o disgusta el producto, utilizando la escala hedónica, haciendo una anotación en el punto de la escala que mejor describe sus sensaciones.					
NOMBRE:		FECHA:			
SEXO:		EDAD:			
MUESTRA	CALIFICACION	APARIENCIA	COLOR	SABOR	OLOR
365	ME GUSTA MUCHO				
	ME GUSTA LIGERAMENTE				
	NI ME GUSTA NI ME DISGUSTA				
	ME DISGUSTA LIGERAMENTE				
	ME DISGUSTA MUCHO				
723	ME GUSTA MUCHO				
	ME GUSTA LIGERAMENTE				
	NI ME GUSTA NI ME DISGUSTA				
	ME DISGUSTA LIGERAMENTE				
	ME DISGUSTA MUCHO				
298	ME GUSTA MUCHO				
	ME GUSTA LIGERAMENTE				
	NI ME GUSTA NI ME DISGUSTA				
	ME DISGUSTA LIGERAMENTE				
	ME DISGUSTA MUCHO				
72	ME GUSTA MUCHO				
	ME GUSTA LIGERAMENTE				
	NI ME GUSTA NI ME DISGUSTA				
	ME DISGUSTA LIGERAMENTE				
	ME DISGUSTA MUCHO				
246	ME GUSTA MUCHO				
	ME GUSTA LIGERAMENTE				
	NI ME GUSTA NI ME DISGUSTA				
	ME DISGUSTA LIGERAMENTE				
	ME DISGUSTA MUCHO				

OBSERVACIONES: