

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Envases
Aditivados con Nanopartículas de MgO y Extracto de Tallo de
Yuca (*Yucca baccata*)**

TESIS PROFESIONAL

Para obtener el Título de

QUÍMICO EN ALIMENTOS

Lizeth Amelia Quintana Romero

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Hermosillo, Sonora, 1 de febrero del 2017

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de **Lizeth Amelia Quintana Romero** la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de **Lic. Químico en Alimentos**.

Atentamente:

Dra. Herlinda Soto Valdez

Directora

Dra. Abril Zoraida Graciano Verdugo

Secretaria

M. en C. Dalila Fernanda Canizales Rodríguez

Vocal

Dra. Cinthia Jhovanna Pérez Martínez

Suplente

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora, por permitirme realizar mis estudios y a todos mis profesores a lo largo de la carrera, a quienes les debo mis conocimientos, gracias por su paciencia y enseñanza.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) por abrirme sus puertas y permitirme realizar mi tesis profesional de licenciatura, mis prácticas profesionales y mi servicio social.

Gracias a mi directora de tesis, la Dra. Herlinda Soto Valdez, por su tiempo, paciencia, conocimiento y sobre todo por la confianza que tuvo en mí.

A mis maestras sinodales, la Dra. Abril Zoraida Graciano Verdugo, la M. en C. Dalila Fernanda Canizales Rodríguez y a la Dra. Cinthia Jhovanna Pérez Martínez, por su tiempo dedicado, porque gracias a ellas se logró finalizar el presente trabajo.

A todos los integrantes del Laboratorio de Envases, principalmente a M. en C. Elizabeth Peralta por todo su apoyo y ayuda en el laboratorio. Gracias a todas por brindarme su amistad.

A mis compañeros de carrera: Adrian, Daniela, Román, Rocío y a todos los QA's porque no solo fueron personas compartiendo un salón de clases conmigo, se convirtieron en grandes amigos y sé que esta amistad durara por mucho tiempo. ¡Los quiero QA's!

A mi familia: padres, hermano, tata Lupe, abuelos, tíos, primos, sobrinos, etc., porque a pesar de los problemas que nos da la vida, estamos unidos y nos brindamos un apoyo incondicional.

Por último, quiero agradecer a Dios por darme una familia hermosa, buena salud y la posibilidad de estar aquí hoy.

DEDICATORIA

Les dedico este trabajo a mi papá Inginio, a mi mamá Angélica y a mi hermano Erick por apoyarme siempre, por su amor incondicional, valores, fuerza y ayudarme a mejorar en todos los aspectos de mi vida porque gracias a ustedes pude terminar felizmente este capítulo de mi vida, todo lo que soy y llegaré a ser es gracias a ustedes, ¡Los amo!

A Adrian porque su presencia ha sido fundamental para poder terminar este proyecto, ha sido amigo, compañero inseparable, fuente de sabiduría, de calma y de consejos en todo momento, por su apoyo constante y su amor.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
LISTA DE TABLAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
RESUMEN	12
INTRODUCCIÓN	13
OBJETIVOS.....	16
Objetivo General	16
Objetivos Específicos	16
ANTECEDENTES.....	17
Causas del Deterioro de los Alimentos.....	17
Oxígeno	17
Enzimas	17
Humedad	18
Luz.....	18
Temperatura	18
Contaminación Microbiana	18
Deterioro de la Carne	20
Color de la Carne y Factores que lo Afectan	22
pH de la Carne y Factores que lo Afectan	25
Acidez de la Carne y Factores que lo Afectan.....	26
Microorganismos en la Carne y Factores que lo Afectan	27
Métodos de Conservación de los Alimentos	28

Envases	30
Polímeros para la Fabricación de Envases	32
Poliamida (PA).....	33
Poliétileno de Baja Densidad (PEBD)	35
Permeabilidad de los Polímeros	36
Envases Antimicrobianos	37
Agentes Antimicrobianos.....	40
Agentes Antimicrobianos Inorgánicos	40
Nanopartículas de Oxido de Magnesio (MgO)	41
Agentes Antimicrobianos Orgánicos	43
Yuca (<i>Yucca baccata</i>).....	45
METODOLOGÍA	47
Caracterización de las Películas.....	47
Medición de Espesor	47
Análisis de Color.....	47
Análisis de Transparencia.....	48
Obtención de la Carne	48
Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de las Películas con Nanoaditivos Inorgánicos ...	48
Envasado de la Carne	48
Análisis Microbiológico.....	49
Acidez Titulable	50
Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de las Películas con aditivo orgánico	51
Envasado de la carne	51
Análisis Microbiológico.....	52
Medición de pH	52
Análisis de Color de la Carne	52
Análisis Estadísticos.....	53

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
Caracterización de las Películas con Nanoaditivos Inorgánico y Orgánico	54
Medición de Espesor	54
Análisis de Color.....	55
Análisis de Transparencia.....	57
Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de las Películas con Nanoaditivos Inorgánicos ...	60
Determinación de Color en la Carne Contendida en las Películas Aditivadas con Nanopartículas de MgO.....	62
Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de las Películas con aditivo orgánico	65
Análisis de pH.....	66
Determinación de Color en la Carne Contendida en las Películas Aditivadas con ETY	67
CONCLUSIONES	70
RECOMENDACIONES	71
BIBLIOGRAFÍA.....	72
ANEXOS.....	80
Anexo 1. Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994	80
Anexo 2. Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994	91
Anexo 3. Cálculos para modificar los mL gastados de NaOH a mEq.....	103

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Microrganismos y temperatura de crecimiento adecuada.	19
2.	Plásticos utilizados en envases para alimentos.	32
3.	Permeabilidad de materiales plásticos.	36
4.	Plantas utilizadas como saborizantes en alimentos y con actividad antimicrobiana.	43
5.	Espesor de películas utilizadas en este trabajo y sus testigos expresadas en mils (milésima parte de una pulgada).	53
6.	Diferencia total de color (ΔE) de películas de PA y PEBD.	56
7.	Cantidad de bacterias mesófilas aerobias expresado en UFC/g en carne molida de res almacenada por cinco días a 4°C en dos distintos tratamientos.	59
8.	Acidez titulable en carne molida de res almacenada por 5 días a 4°C en dos distintos tratamientos.	61
9.	Cantidad de bacterias mesófilas aerobias expresado en UFC/g en carne molida de res almacenada por 10 días a 4°C en contacto con las películas de PEBD con ETY.	64
10.	Cambios de pH en carne molida de res almacenada por 10 días a 4°C.	66

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Diferentes formas y reacciones de la mioglobina en la carne (Adaptado de Mancini y Hunt, 2005).	22
2. Escala de color en arreglo de vectores en tres ejes donde L (luminosidad) va de claro a oscuro, a* va de verde a rojo y b* va de azul a amarillo (Tapp et al., 2011).	23
3. Disminución del pH de la carne después del sacrificio, normal, pálida-suave-exudativa (PSE), oscura-firme-seca (DFD) (Adaptado Pasachoa, 2010).	25
4. Sistemas de conservación de los alimentos.	28
5. Molécula de PA66	33
6. Moléculas ramificadas de PEBD.	35
7. Posible manera de construir un envase antimicrobiano. A) Envase antimicrobiano de liberación. B) Envase antimicrobiano con recubrimiento convencional. C) Envase antimicrobiano inmovilizador. D) Uso de antimicrobiano en charolas. E) Bolsas con antimicrobianos. F) Películas comestibles. (Han, 2005).	38
8. Diseño del experimento de evaluación de la actividad antimicrobiana de dos envases aditivados con 3% nanopartículas de MgO.	48
9. Determinación de CTBMA en cada muestreo del alimento en contacto con las bolsas testigo y con nanopartículas MgO.	49
10. Diseño del experimento de evaluación de la actividad antimicrobiana de un envase aditivado con 5% de ETY.	50
11. Película de PA con nanopartículas de MgO. Testigo de Poliamida (T-PA), Poliamida con nanopartículas de MgO (PA + MgO).	54
12. Películas de PEBD con nanopartículas de MgO. Testigo de la película de polietileno de baja densidad con MgO (T-PEBD MgO), Polietileno de baja densidad con MgO (PEBD + MgO).	55
13. Películas de PEBD con ETY. Testigo de la película de polietileno de baja densidad con extracto de tallo de yuca (T-PEBD ETY), Polietileno de baja densidad con extracto de tallo de tuca (PEBD + ETY).	55

14.	Transmitancia de las películas de PA aditivadas con nanopartículas de MgO.	57
15.	Transmitancia de las películas de PEBD con nanopartículas de MgO.	58
16.	Transmitancia de las películas de PEBD con ETY.	58
17.	Color de la carne (a*) almacenada en películas de PEBD con MgO durante 8 días a 4 °C.	62
18.	Color de la carne (a*) almacenada en películas de PEBD con nanopartículas de MgO a 4 °C los días 0, 2, 5 y 8 (de izquierda a derecha en la fotografía).	62
19.	Color de la carne (a*) almacenada en películas de PA con MgO por 8 días a 4 °C.	63
20.	Color de la carne (a*) almacenada en películas de PA con MgO a 4 °C los días 0, 3, 5 y 8 (de izquierda a derecha en la fotografía).	63
21.	Color de la carne (a*) almacenada en películas de PEBD con ETY por 10 días a 4°C.	67
22.	Color de la carne (a*) almacenada en películas con ETY y testigo los días 0, 2, 6 y 8 (de izquierda a derecha en la fotografía).	68

RESUMEN

Actualmente los microorganismos son una de las principales causas de deterioro de los alimentos debido a esto, la industria alimentaria se ha enfocado en desarrollar nuevos envases antimicrobianos. En este trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de tres películas, dos aditivadas con un compuesto inorgánico (poliamida con 3% de nanopartículas de MgO y polietileno de baja densidad con 3% de nanopartículas de MgO) y una con un compuesto orgánico (polietileno de baja densidad con 5% extracto de tallo de yuca). El trabajo experimental se dividió en dos partes, en la primera de ellas se evaluó el efecto antimicrobiano de las películas con el aditivo inorgánico y en la segunda, se evaluó la película con el aditivo orgánico. Previamente a la evaluación antimicrobiana, se caracterizaron las películas midiéndoles espesor, color y transparencia. En ambos experimentos se elaboraron bolsas con las películas y se emplearon para el envasado de pulpa de res (*semimembranosus*) molida. La carne envasada en contacto con las películas con el aditivo inorgánico (CAI) se almacenó durante 5 días, mientras que la carne envasada con el aditivo orgánico (CAO) por 10 días. Para ambos experimentos, las películas se almacenaron a 4°C y se determinó la cuenta total de bacterias mesófilas aerobias y color (a^*) de la carne envasada. Adicionalmente, para el experimento de las películas con la CAI se evaluó la acidez titulable de la carne y en el caso de las películas con el CAO, el pH. Los resultados de la caracterización de las tres películas expresaron que la adición de los aditivos causó un aumento en su espesor, y el color de las películas no presentó una diferencia significativa ($p>0.05$) entre cada película y su testigo. Respecto a la transparencia de las películas se observó que la adición del compuesto disminuyó su valor, por lo tanto, las películas aditivadas permiten el paso de la luz en menor cantidad que las películas testigo. En el análisis de la cuenta total de bacterias mesófilas de la CAI, la carne en contacto con la película de poliamida presentó mayor crecimiento que su testigo ($p<0.05$), mientras que en acidez titulable no existió diferencia ($p>0.05$); la carne en contacto con la película de polietileno tuvo un crecimiento de bacterias similar al de su testigo ($p>0.05$), y expresó 6.21% menos acidez que su testigo. Por otra parte, en el análisis de la cuenta total de bacterias mesófilas de la CAO, al término del almacenamiento las películas testigo tuvieron 5.13 veces mayor crecimiento de bacterias que la carne de las películas con extracto, resultando, además, con un pH 5.97 y 5.35, respectivamente. En el análisis de color, se demostró que ningún aditivo causó efecto en el color de la carne. Se encontró que las películas con nanopartículas de MgO no presentan actividad antimicrobiana contra el crecimiento de bacterias mesófilas aerobias, mientras que la película con extracto de tallo de yuca, mostró resultados más favorables, pudiendo ser útil en envases para carne de res.

INTRODUCCIÓN

Existe una gran pérdida de alimentos en el mundo, en Estados Unidos se estima que alrededor del 40 % de los alimentos procesados se deteriora y gran parte de este deterioro es causado por microorganismos, en el caso de los cereales, granos y leguminosas es alrededor del 10% de pérdida por microorganismos, y en vegetales y frutas es del 50% (Sperber y Doyle, 2009).

La carne fresca está considerada como un alimento altamente perecedero debido a su composición y a su alto valor de actividad de agua (A_w), por lo tanto, en la carne se puede desarrollar una gran variedad de microorganismos. A pesar de que el músculo como tal, es prácticamente estéril, sin los cuidados necesarios la carne puede ser muy susceptible a la contaminación y ofrece las condiciones necesarias para que la mayoría de los microorganismos se multipliquen rápidamente, especialmente a temperaturas por encima de la de refrigeración, provocando pérdidas de calidad y/o problemas de salud pública (López, et al., 2013).

Existen muchas formas de conservar los alimentos, algunas son por los cambios de temperatura como la refrigeración o congelación, o también por métodos químicos como la salazón y ahumado. En los últimos años gran parte de las investigaciones se ha enfocado en la forma de aumentar el tiempo de vida útil de los alimentos, buscando nuevas formas de conservación o mejorando las que ya existen. Una técnica que ha tenido mucho desarrollo es la conservación a través del envase ya sea, envasado al vacío, con atmósfera modificada o agregándole alguna sustancia al envase para que alargue la vida útil del alimento.

Los envases juegan un papel importante en la calidad de los productos alimenticios al proporcionar protección contra el medio ambiente y residuos químicos y físicos. Esta protección puede ser tan simple como la prevención de la rotura del producto, estos avances han permitido el acceso a muchos alimentos durante todo el año que de otro modo no podría ser preservado (Risch, 2009). La utilización de los envases tiene como meta mantener en las mejores condiciones al alimento tanto en su almacenamiento como en su transporte, además tiene la importante función de extender la vida de anaquel del producto evitando condiciones que lleguen a dañar al alimento, como el oxígeno, humedad, luz, contaminantes químicos, microorganismos deteriorativos, entre otros. Por estas acciones que ayudan a preservar el alimento, la demanda de los consumidores y del mercado por los envases activos se ha hecho cada vez mayor (Suppakul et al., 2003).

Los envases activos son el sistema de envasado que posee atributos más allá de las propiedades de barrera básicas, que se consiguen mediante la adición de ingredientes activos en el sistema de envasado y/o el uso de polímeros activamente funcionales. Los envases antimicrobianos son una de las muchas aplicaciones de los envases activos (Han y Rooney, 2002). Cuando el sistema de envasado adquiere actividad antimicrobiana, este limita o impide el crecimiento microbiano mediante la ampliación del período de demora y la reducción de la tasa de crecimiento o disminuye el recuento de microorganismos vivos (Han, 2000).

Las contaminaciones microbianas, incluyendo la presencia de hongos en muchos productos alimenticios son la razón más limitante por la que muchos productos no pueden mantenerse durante largos períodos (Gutiérrez, 2009). Por lo tanto, hay una necesidad de desarrollar agentes antimicrobianos eficaces para garantizar la seguridad de los alimentos y extender la vida útil, estos agentes se pueden clasificar como orgánicos e inorgánicos, los dos tipos tienen grandes ventajas al usarse. Los agentes más comunes son los orgánicos.

Los agentes antimicrobianos orgánicos se conocen como agentes naturales y se obtienen principalmente de hierbas, plantas, y especias. Uno de sus principales problemas es su dificultad de extracción, purificación, estabilización e incorporación de dichos antimicrobianos al alimento sin afectar su calidad sensorial y seguridad (Rodríguez, 2008), un ejemplo de planta de la cual se puede extraer sus compuestos para usarlos como agente antimicrobiano es la yuca (*Yucca baccata*).

La yuca (*Yucca baccata*) es una planta proveniente de la familia de las agaváceas, se puede encontrar en el desierto de California, Utah, Texas, Sonora y Chihuahua. El principal uso que se le da a esta planta es de jardinería, pero en los últimos años se les ha encontrado otros usos para darle un valor agregado a dicha planta, por ejemplo, como alimento, para elaborar cuerdas y canastas y también como detergentes debido a que contiene tubérculos muy ricos en saponinas (Quihui-Cota, et al. 2014).

Los antimicrobianos continúan estando entre los aditivos alimentarios más importantes. Actualmente, debido a la demanda por parte del consumidor de productos frescos mínimamente tratados, ha aumentado el interés por los antimicrobianos de origen natural que puedan extraerse para ser utilizados con el fin de prolongar la vida útil y la seguridad para el consumidor (Rodríguez, 2008). Pero a pesar de esa demanda por los agentes naturales desde hace

algunos años, el uso de agentes antimicrobianos inorgánicos en aplicaciones no alimentarias como en la desinfección de material en los laboratorios y en los hospitales ha atraído mucho interés para el control de microorganismos, (Okouchi et al., 1995; Wilczynski, 2000).

La ventaja clave de los agentes antimicrobianos inorgánicos, en comparación con sus contrapartes orgánicas, es la estabilidad química que presentan en tratamientos con altas temperaturas. También han demostrado tener una mayor eficacia inhibiendo el crecimiento microbiano en comparación con otros compuestos (Hewitt et al., 2001; Fu et al., 2005; Makhluaf et al., 2005). En la literatura se han reportado una serie de estudios en los años 1995, 1998, 1999 y 2000 donde se evaluó la actividad antibacteriana de 26 polvos cerámicos, y encontraron que MgO, CaO y ZnO exhibieron actividades antibacterianas altas, además de ser seguros para el consumo humano (Tony y Yiping, 2011).

En particular el MgO tiene la ventaja de que no es tóxico si se consume, ya que se puede utilizar como un suplemento dietario en forma de MgO y MgOH, puede soportar altas temperaturas, es de bajo costo y sobre todo que tiene una alta actividad antimicrobiana. El Mg es muy importante para que el cuerpo humano cumpla con muchas de sus funciones biológicas vitales como regular la presión arterial. En la industria de alimentos el Mg también tiene un papel importante, ya que se puede utilizar como un agente de control de pH en productos lácteos y en la fabricación de productos enlatados. En la medicina en MgO es utilizado como un antiácido para aliviar problemas estomacales, también se usa como agente desintoxicante y para la regeneración ósea (Bertinetti et al., 2009; Boubeta et al., 2010).

Otro factor que influye en su alto nivel antimicrobiano es el tamaño de partícula ya que a medida que el tamaño de partícula disminuye, aumenta su área de contacto y por lo tanto permite una mayor interacción de las partículas (Nel et al., 2006). El caso más activo sería a nivel de nanopartícula.

En el presente estudio se caracterizaron tres películas, una que fue aditivada con un compuesto orgánico extraído del tallo de yuca (*Yucca baccata*) y las otras dos aditivadas con nanopartículas de MgO que es un compuesto inorgánico, después se elaboraron envases en forma de bolsas y se evaluó su efecto antimicrobiano al envasarse carne molida de res.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la actividad antimicrobiana de nanopartículas inorgánicas y extracto de tallo de yuca (*Yucca baccata*) utilizadas como aditivos en la formulación de materiales de envase.

Objetivos Específicos

- Caracterizar películas aditivadas con nanopartículas de MgO y extracto de tallo de yuca (*Yucca baccata*).
- Evaluar la actividad antimicrobiana de las películas de poliamida y polietileno de baja densidad aditivadas con nanopartículas de MgO en carne de res.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de la película de polietileno de baja densidad aditivada con extracto de tallo de yuca (*Yucca baccata*) en carne de res.
- Evaluar el efecto de las películas aditivadas con nanopartículas de MgO y extracto de tallo de yuca (*Yucca baccata*) en el color de la carne de res.

ANTECEDENTES

Causas del Deterioro de los Alimentos

Los alimentos son productos perecederos, con un periodo de conservación limitado que varía en función del producto y que pueden medianamente largo. Los alimentos como el pescado, la carne, la leche, el pan o los vegetales tienen una vida útil corta y limitada, en cambio, otros productos pueden conservarse durante más tiempo, aunque esto no quiere decir que se mantengan sin deteriorarse. El alimento empieza a deteriorarse en el momento de su recolección o sacrificio del animal. Este proceso puede definirse como un cambio indeseable en su estado normal. Algunos de estos cambios se detectan a través del olfato, el gusto o la vista, aunque en ocasiones son inapreciables a los sentidos (Chavarrías, 2012).

El deterioro de los alimentos se debe a una manipulación y almacenamiento inadecuados, aunque en este proceso también influyen otros aspectos, como por ejemplo los microorganismos patógenos, virus, mohos y levaduras presentes en el alimento y que están relacionados con este proceso deteriorativo, es importante mencionar también que hay ciertas condiciones que aceleran esta descomposición, como la luz, el oxígeno, la temperatura y la humedad, entre otros (Chavarrías, 2012).

Oxígeno

El oxígeno, esencial para la vida, puede tener efectos perjudiciales para las grasas, los colorantes, las vitaminas y otros componentes alimentarios. En general, el oxígeno puede proporcionar las condiciones para que crezcan microorganismos o causar la oxidación (Chavarrías, 2012).

Enzimas

Ciertas enzimas están presentes de forma natural en los alimentos (enzimas oxidantes). Estas aceleran las reacciones químicas entre el oxígeno y el alimento, lo que lleva a su descomposición. En el caso de la carne el deterioro se da principalmente por dos enzimas, endógenas (propias del músculo) y exógenas (debido a microorganismos y relacionado con el mal manejo de los alimentos (Chavarrías, 2012).

Humedad

La cantidad de agua en un alimento influye en la apariencia, textura y sabor. En los productos frescos, el contenido de agua puede llegar al 70% o más del peso total. Incluso los alimentos secos, como la harina o los cereales, contienen cierta actividad de agua (A_w), un aspecto que afecta en gran medida al deterioro de los alimentos, si no se conservan de forma adecuada. Para controlar este riesgo, se recurre a procesos como la deshidratación (eliminar cierto porcentaje de agua), la congelación (cambiar de estado líquido a sólido) o el uso de aditivos como la sal y el azúcar (Chavarrías, 2012).

Luz

Casi todos los alimentos están expuestos a la luz a partir de fuentes naturales o artificiales. Esta exposición puede dar lugar a cambios en el color del alimento, en el sabor o en pérdidas de vitamina. En la mayoría de productos sólidos, la luz penetra en la capa exterior, por lo que el deterioro se produce en esta parte. En los líquidos, en cambio, la penetración suele ser mayor. La sensibilidad a la luz depende de factores como su intensidad, el tipo de luz, la distancia entre la fuente de luz y el alimento, la duración de la exposición o la concentración de oxígeno en el producto y la temperatura (Chavarrías, 2012).

Temperatura

Cuando la temperatura no se controla de forma adecuada, el riesgo de que un alimento se descomponga es mayor. Cada tipo de microorganismo tiene una temperatura óptima de crecimiento. Al estar en su temperatura óptima, las bacterias pueden duplicar su número cada 20 o 30 minutos (Chavarrías, 2012).

Contaminación Microbiana

Las alteraciones de los alimentos dependen de sus propias características, de su microbiota presente y del ambiente que rodea al alimento. Dependiendo de estas condiciones se desarrollarán diferentes microorganismos, algunos de los cuales pueden causar alteración o deterioro. Tales microorganismos pueden estar presentes en la materia prima o tener acceso al

alimento en alguna etapa del proceso de transformación; es difícil evitar su presencia y una vez contaminado el alimento, si se mantiene por periodos largos bajo condiciones adecuadas para la multiplicación microbiana, finalmente será inaceptable para el consumidor (Downs y Ito, 2001).

Para crecer, los microorganismos requieren de disponibilidad de nutrientes adecuados, condiciones gaseosas apropiadas, temperatura y pH, suficiente agua libre y ausencia de sustancias inhibitorias. Si alguno de estos factores no se encuentra en el rango necesario, la velocidad de crecimiento disminuirá. Existen muchos tipos de microorganismos con diferentes requerimientos, de tal forma que un alimento puede ser propicio para que se desarrolle cierto microorganismo, pero no para otros. Por lo general la microbiota de los alimentos es compleja y la predominancia de un grupo de microorganismos dependerá de la mayor o menor adaptación al medio, en comparación de los demás (Downs y Ito, 2001).

La vida de anaquel de un producto depende principalmente de dos factores que son, la concentración inicial de microorganismos deteriorativos y las condiciones de almacenamiento. Para evitar pérdidas del producto e incrementar su vida útil será necesario evitar la contaminación de la materia prima y del producto y usar métodos convenientes de conservación (Roberts y Greenwood, 2003). Una vez que se presenta la contaminación de los alimentos y si existen condiciones propicias para que se dé el crecimiento de los microorganismos, éstos pueden causar que el alimento se vuelva inaceptable debido a muchas razones microbiológicas. Los microorganismos pueden (Roberts y Greenwood, 2003).

- Producir compuestos con mal olor, por ejemplo, aminas y sulfuros en carne o trimetilamina en pescados.
- Alterar la apariencia de los alimentos por cambios de color o decoloración.
- Modificar la consistencia haciendo los alimentos visiblemente viscosos o con desarrollo micelial.
- Provocar cambios en la textura, tales como reblandecimiento de las verduras debido a enzimas pectinolíticas, o leche hilante por contaminación con microorganismos esporulados.

Los procedimientos que involucran higiene, así como los procesos de conservación para controlar microorganismos tóxicos infecciosos son, en la mayoría de los casos, igualmente aplicables para el control de los microorganismos de alteración o deterioro. Un factor que es muy importante cuidar es la temperatura, ya que cada microorganismo tiene una temperatura de crecimiento adecuada. Hay varios tipos de microorganismos en función de sus temperaturas de crecimiento mínima, máxima y óptima (Tabla 1) (Jay et al., 2005).

Tabla 1. Microorganismos y temperatura de crecimiento adecuada.

Tipo de microorganismo	Temperatura mínima	Temperatura óptima	Temperatura máxima
Psicrófilo	-5 +5	12 - 15	15 - 20
Psicrótrofo	-5 +5	25 - 30	30 - 35
Mesófilo	5 – 15	30 - 45	35 - 47
Termófilo	40 – 45	55 - 75	60 - 90

Fuente: Jay et al., 2005

Deterioro de la Carne

El deterioro de los alimentos se produce por diversos cambios, principalmente en respuesta al crecimiento y metabolismo de microorganismos, la exposición, la cantidad y tipo de luz que recibe la carne, la oxidación de lípidos y pigmentos, etc. Lo interesante es que la gran mayoría de los cambios son normalmente percibidos por el consumidor mediante el uso de sus sentidos (vista, olfato, gusto, tacto y oído). Cuando el consumidor rechaza el producto, porque considera que sus características lo hacen inaceptable o porque pone en riesgo su salud, se dice que ha llegado al final de su vida de anaquel o vida útil.

En términos generales, los factores que más influencia tienen sobre la vida de anaquel de la carne fresca y los productos cárnicos son: calidad del producto (pH, color, capacidad de retener agua, etc.), carga bacteriana inicial, temperatura, tiempo de almacenamiento y atmósfera en que es contenida la carne (Restrepo y Montoya, 2010). Cualquier falla en el control de alguno de estos factores, puede ser parcialmente compensada por el riguroso control

de otro factor; la vida de anaquel óptima pudiera solamente ser alcanzada al controlar todos los factores en conjunto.

La calidad de la carne es un término complejo, muy ligado en algunos consumidores a la cantidad de grasa presente en el corte; sin embargo, el término va más allá y comprende aspectos nutricionales, sensoriales, tecnológicos y sanitarios, entre otros; siendo el foco central, las características organolépticas de aroma, color, sabor, jugosidad, suavidad que son los de mayor influencia en la experiencia por parte de los consumidores. No existe un valor absoluto, sino que es la suma de atributos que se conocen cuando el producto se consume (Brondum et al., 2000; Hui et al., 2006).

Un factor muy importante que se debe de tener en cuenta es el tipo de músculo a utilizar, dado que no todos los músculos son iguales, en función de factores fisiológicos que alteren las características de los músculos, considerando, por ejemplo, la proporción entre los tipos de fibras musculares (blancas, rojas, mixtas, etc.) que comprenden a un músculo específico; la función y carga de trabajo que realiza; su tamaño y localización, etc. (Brondum et al., 2000; Hui et al., 2006).

Por otro lado, en la industria existen diversos protocolos para recibir la materia prima (carne) que se va a utilizar. La materia prima con adecuada calificación de calidad y adecuado procesamiento, tendrá una larga vida en anaquel; entre las características a considerar claves en la adecuada aceptación de materia prima cárnica se encuentran (López et al., 2013):

- El color (primer indicio de calidad y frescura del producto).
- El grado de maduración (se encuentra relacionado con la estabilidad de las fibras musculares).
- La capacidad de retención de agua (es un indicativo de lo sucedido desde transportación del animal, pasando por la matanza y enfriamiento, relacionado con la estabilidad de las fibras musculares y con la velocidad y amplitud de la caída del pH de la carne después del sacrificio).
- La carga microbiana inicial (la cual estará relacionada con todo el proceso de sacrificio y faenado, lavado de canales y mantenimiento de la cadena de frío).

Una de las mejores prácticas para poder controlar la vida de anaquel, consiste en realizar análisis microbiológicos a la materia prima (las canales o cortes primarios), que parte de la premisa de que una baja carga microbiana inicial, es la clave para una larga vida de anaquel.

Color de la Carne y Factores que lo Afectan

El color que percibimos en la carne es el resultado de una fuente de luz que puede variar en color (blanca, roja, luz de día, etc.), que interactúa con pigmentos que tienen la capacidad de absorber fracciones de luz, de modo que lo que se refleja es el color que nosotros percibimos mediante la retina (Mancini y Hunt, 2005), que es un detector que comunica los estímulos al cerebro quien percibe e interpreta lo que la muestra refleja (la luz que no fue absorbida por la muestra). El color y la apariencia de la carne se encuentran dentro de los principales atributos de calidad que influyen en la decisión de compra del consumidor. De hecho, para los consumidores mexicanos, es el principal referente al momento de seleccionar un corte de carne. Estos juicios son muy variados entre consumidores, se basan en ideas preconcebidas y experiencias personales, que resultan en que consideremos una carne como segura, fresca, jugosa o inadecuada para su consumo.

Intuitivamente, el consumidor es capaz de percibir los cambios en el color, los cuales pueden estar asociados a alteraciones químicas a nivel superficial, a la composición química del alimento, a la creación de nuevos compuestos en la superficie, al desarrollo microbiano, o simplemente a modificaciones en el contenido de agua (poca o alta capacidad de retención de agua; o deshidratación de la carne por congelamiento).

El principal pigmento de la carne, es la mioglobina, la cual cambia de color en función de su estado de oxidación. Así, el color de la carne no es fijo y se puede modificar por la interconversión de las tres diferentes formas de la molécula de mioglobina (Figura 1). Al realizar un corte transversal a las fibras musculares, la mioglobina interactúa principalmente con los gases de la atmósfera, ya sea oxígeno, monóxido o dióxido de carbono, lo que puede resultar en diferentes porciones de las diferentes especies de mioglobina (Mancini y Hunt, 2005).

En la carne, al igual que otros materiales no metálicos, al incidir un rayo de luz en su superficie se produce una reflexión difusa, esa reflexión es lo que se define como el color. Así, al incidir una luz blanca sobre una sustancia, ciertas longitudes de onda que componen esa luz

blanca, serán absorbidas por la muestra, el color estará formado por la combinación de aquellas longitudes de onda que no fueron absorbidas por la substancia. El color percibido ha sido definido por CIE (Comisión Internationale de L'Éclairage) como el atributo visual que se compone de una combinación cualquiera de componentes cromáticos y acromáticos (Alberti et al., 2005).

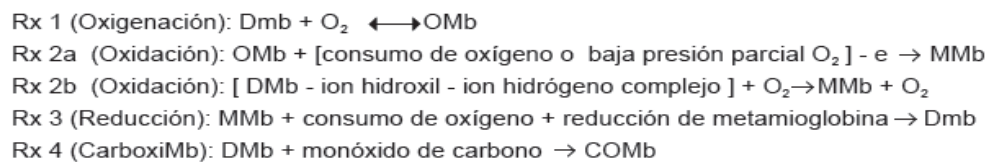
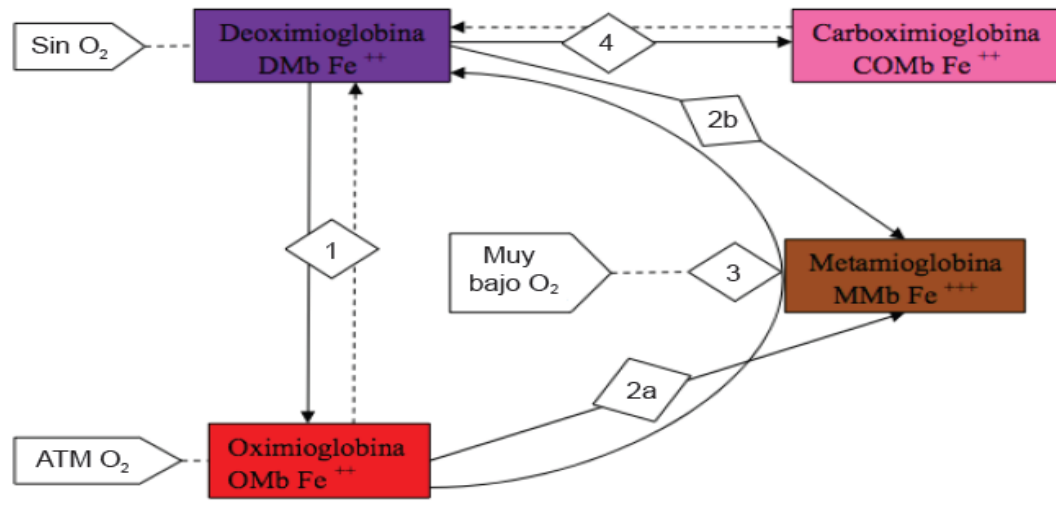


Figura 1. Diferentes formas y reacciones de la mioglobina en la carne (Adaptado de Mancini y Hunt, 2005).

A pesar de que se tienen años trabajando con la medición de color, a nivel mundial y entre la comunidad científica, existe mucha discrepancia sobre la metodología a utilizar para medir el color. Esto ha creado que exista poca repetitividad entre laboratorios e incluso entre experimentos. Es por lo tanto forzoso que se haga un esfuerzo por reportar con la mayor precisión posible, la metodología empleada en cada medición (Tapp et al., 2011). La apreciación del color se puede hacer, tanto de forma visual, como de forma instrumental, mediante el uso de métodos colorimétricos.

Los métodos visuales, se basan en el uso de estándares de color, de los cuales existen múltiples versiones, siendo probablemente los más conocidos los desarrollados por la AMSA (American Meat Science Association), así como las escalas japonesas. Estos sistemas son muy prácticos y se utilizan mucho en la industria. Sin embargo, muchas veces se requieren de mediciones más precisas y objetivas. En este caso, es importante recurrir a métodos colorimétricos específicos. Para que se pueda generar el color, deben de existir primero una fuente de luz, una superficie que se ilumine y un detector que perciba e interprete lo que la muestra refleja (la luz que no fue absorbida por la muestra). En la apreciación visual, el receptor es la retina que manda a analizar las señales al cerebro donde se produce una versión subjetiva sobre la percepción del color. Para evitar esa subjetividad, y poder producir información que sea entendible y reproducible de forma universal, se utilizan tres características físicas que definen al color (Tapp et al., 2011).

El espacio de color Hunter L, a, b se basa en un esquema de vectores que se representan de forma tridimensional, y que están basados en la teoría de los colores opuestos. La integran los parámetros L, a y b. L se refiere a la luminosidad y se ubica verticalmente, tomando valores de 100 (blanco) y 0 (negro); mientras que a y b, ubicados horizontalmente, no tienen límites, pero sí valores positivos o negativos. La escala de a se mueve de los valores positivos (rojo +) a los negativos (verde -); mientras que la escala de b va del amarillo (+) al azul (-), tal como se muestra en la Figura 2. Todos los colores que se pueden percibir visualmente se pueden mostrar en este espacio rectangular de color (Tapp et al., 2011).

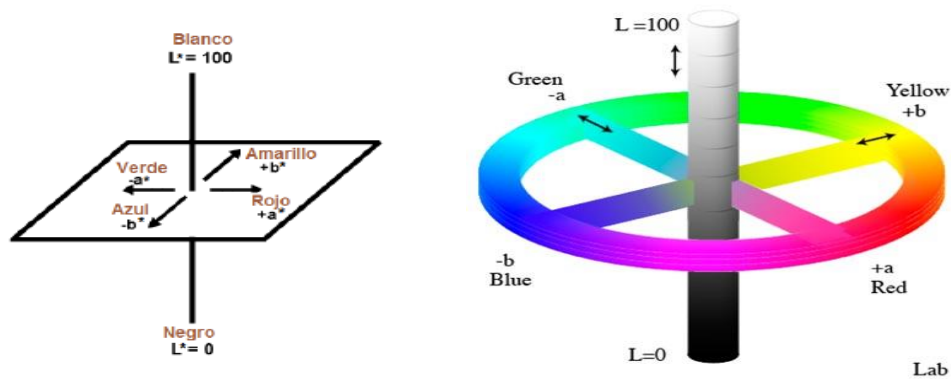


Figura 2. Escala de color en arreglo de vectores en tres ejes, donde L (luminosidad) va de claro a oscuro, a^* va de verde a rojo y b^* va de azul a amarillo (Tapp et al., 2011).

pH de la Carne y Factores que lo Afectan

El pH es uno de los principales parámetros a considerar para verificar la calidad de la carne, porque afecta varias de sus cualidades (color, capacidad de retención de agua, etc.). El pH es definido como el logaritmo negativo de la concentración de protones. Tiene una escala entre 0 y 14. Un valor de pH por debajo de 7 es considerado como ácido, y por encima de un valor de 7 se considera alcalino o también denominado básico (Pasachoa, 2010).

El pH del músculo de animales sanos y vivos es de alrededor de 5.5. Este valor disminuye tras la muerte del animal, principalmente, debido a la degradación del glucógeno a ácido láctico, una reacción en la que el músculo trata de producir energía en ausencia de oxígeno. Esta reacción, depende de la actividad de una serie de enzimas que son sensibles a la temperatura, por lo que es relevante considerar la temperatura del músculo al momento de hacer la medición del pH (Pasachoa, 2010).

La variación en los valores de pH, se da por un sinnúmero de factores, algunos de ellos son intrínsecos al animal (genética, metabolismo, susceptibilidad al estrés, etc.), pero normalmente los factores más relevantes tienen que ver con el ambiente en que se manejó el animal y su canal durante las 24 h previas y posteriores al faenado. Previo al faenado, el manejo es un factor clave, ya que un exceso de estrés provocará la sobreproducción de adrenalina, que tiende a promover la degradación de glucógeno y, por ende, favorece la caída abrupta del pH (acidificación). Luego del faenado, una mala refrigeración de la canal, con temperaturas elevadas, promoverá también una rápida caída del pH. Dependiendo de la velocidad de la disminución del pH post-mortem y del pH final alcanzado por la carne, se distinguen diferentes tipos de carne, como se muestran en la siguiente Figura (Pasachoa, 2010).

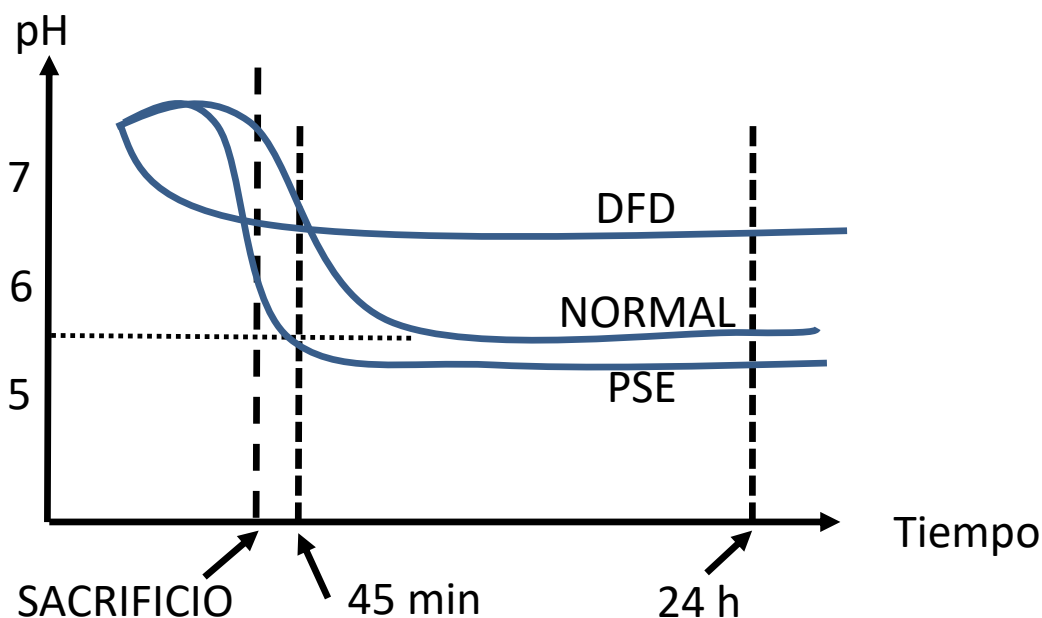


Figura 3. Disminución del pH de la carne después del sacrificio, normal, pálida-suave-exudativa (PSE), oscura-firme-seca (DFD) (Adaptado Pasachoa, 2010).

Acidez de la Carne y Factores que lo Afectan

La acidez de una sustancia se puede determinar por métodos volumétricos. Esta medición se realiza mediante una titulación, la cual implica siempre tres agentes o medios: el titulante, el titulado (analito) y el indicador. Cuando un ácido y una base reaccionan, se produce una reacción; la cual se puede observar con un indicador. Un ejemplo de indicador, el más común, es la fenolftaleína ($C_{20} H_{14} O_4$), que vira (cambia) de color a rosa cuando se encuentra presente una reacción ácido-base (Castillo, 2014).

El agente titulante es una base, y el agente titulado es el ácido o la sustancia que contiene el ácido. A nivel industrial, se consideran dos tipos de acidez. Se tiene la acidez natural y la acidez desarrollada. La acidez natural se debe a la composición natural del alimento o sustancia. La acidez desarrollada se debe a la acidificación de la sustancia ya sea por procesos térmicos, enzimáticos o microbiológicos. La que posee importancia en el aspecto tecnológico

es la desarrollada. Esta suele determinar la sanidad industrial de las sustancias para obtener productos secundarios (Castillo, 2014).

En estado natural, la mayoría de los alimentos, como la carne, pescados y productos vegetales, son ligeramente ácidos. La mayoría de las frutas son bastante ácidas y solo algunos alimentos, como la clara de huevo, por ejemplo, son alcalinos. La acidez puede ser un factor básico en la conservación de los alimentos (Castillo, 2014).

Microorganismos en la Carne y Factores que lo Afectan

La carne fresca por su contenido nutricional y su alto valor de A_w está considerada dentro del grupo de los alimentos altamente perecederos, al igual que la mayoría de los productos elaborados con ella; sin embargo, de acuerdo a sus características particulares, el tipo de microorganismos presentes puede variar. A pesar de que el músculo como tal, es prácticamente estéril, los alimentos preparados con base en carne son muy susceptibles a la contaminación y ofrecen las condiciones necesarias para el crecimiento de microorganismos involucrados en daños y enfermedades de origen alimentario (Restrepo et al., 2001).

Después del sacrificio y de la evisceración del animal, la carne conserva las características microbianas generales que tenía previo al sacrificio. La superficie del animal está contaminada por microorganismos provenientes del suelo, el aire y el agua, mientras que el músculo esquelético está prácticamente libre de ellos. Ahora bien, existe un número extremadamente alto de microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal de los animales, y es de esperarse que algunos de ellos puedan encontrar el camino a la superficie de las canales durante el proceso de evisceración; adicionalmente, algunos animales aparentemente sanos pueden albergar microorganismos en hígado, riñones, nódulos linfáticos y bazo, los cuales pueden llegar al músculo esquelético vía sistema circulatorio, generalmente se encuentran en el músculo en muy bajas cantidades (Restrepo et al., 2001).

Debido a la gran variedad de fuentes de contaminación, los tipos de microorganismos que suelen encontrarse en las carnes son muchos y muy variables. La contaminación de canales de bovino y porcino después del sacrificio y enfriamiento, es variable y puede ser constituida de 10^1 - 10^5 unidades formadoras de colonias (UFC) de mesófilos aerobios, dependiendo de la canal, sitio de la canal y lugar de donde provenga. Entre las muchas

bacterias que pueden encontrarse como contaminantes de la carne, las más importantes son las de los géneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Sarcina*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Proteus*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Salmonella* y *Streptomyces* (Restrepo et al., 2001).

La contaminación se incrementa en carnes picadas porque ellas generalmente provienen de recortes sumamente manipulados, en los cuales existe una gran área superficial y las condiciones para el crecimiento y desarrollo de microorganismos, principalmente los psicrótrofos aeróbicos, son mayores, ocasionando grandes deterioros. Los factores que influyen en el crecimiento de los microorganismos en las carnes son la A_w , el potencial de óxido-reducción (Eh), el pH, las necesidades nutritivas y la temperatura (Restrepo et al., 2001).

Métodos de Conservación de los Alimentos

Algunas teorías evolucionistas consideran que el consumo de alimentos ricos en proteína, energía y minerales, como lo son las carnes, fue uno de los factores clave que permitió la evolución del cerebro humano. Pero el tener acceso frecuente a esta carne, muchas veces era imposible de no contar con métodos que ayudaran a preservarla por algún tiempo (Davies, 1995). Esta necesidad, promovió el desarrollo de métodos de conservación como la salazón (en seco o salmuera), el ahumado (en frío o caliente), etcétera, los cuales disminuyen el contenido de agua de los alimentos y modifican su percepción sensorial. Gracias a esto, la A_w del alimento disponible para los microorganismos se reduce hasta tal punto, que los microorganismos quedan inactivos o mueren (Marth, 1998).

Los sistemas de conservación de los alimentos son aquellos que evitan que las alteraciones antes mencionadas puedan llegar a producirse. La figura 4 expone de forma sintética los principales sistemas de conservación empleados en alimentos.

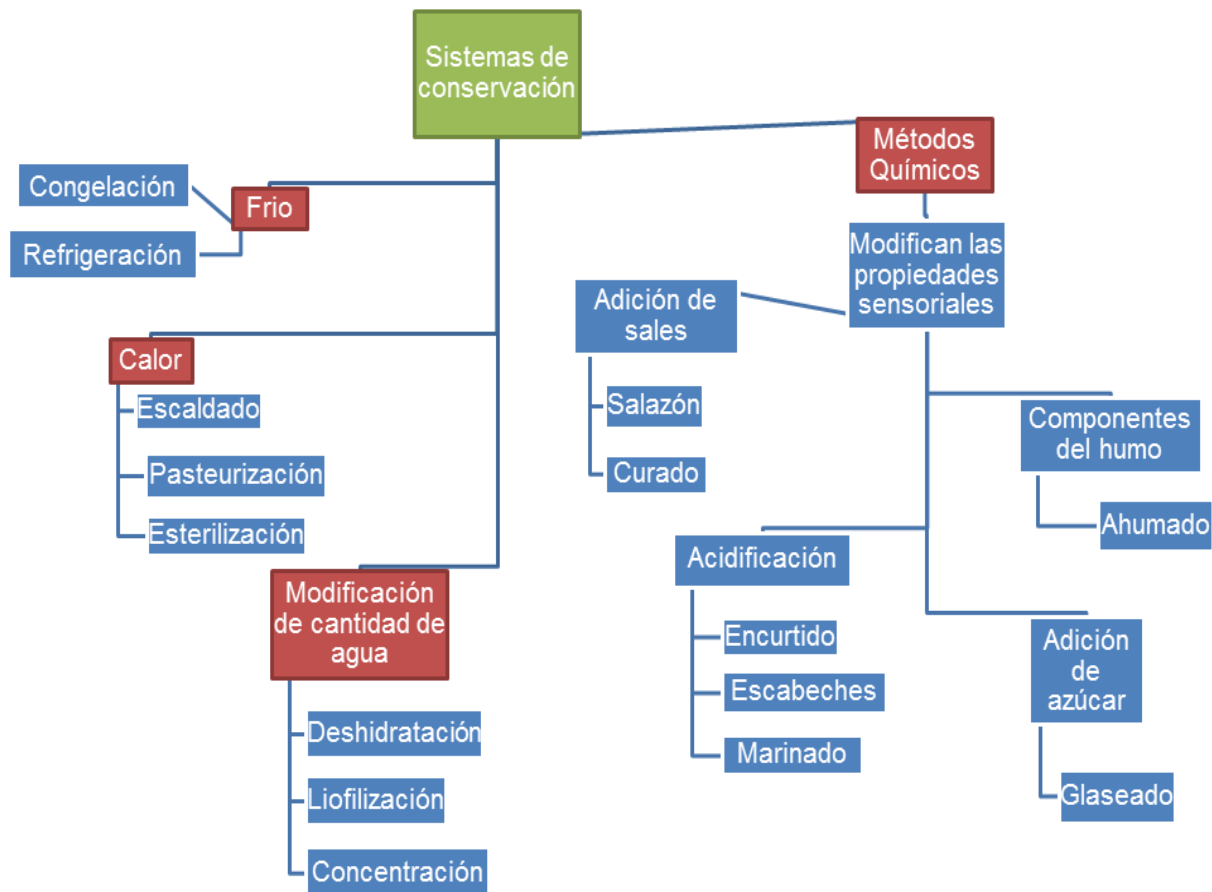


Figura 4. Sistemas de conservación de los alimentos.

Otros métodos que limitan el desarrollo de bacterias y hongos, es la adición de nitratos, compuestos bactericidas del humo, o los presentes en algunas plantas o semillas (albahaca, orégano, pimienta, etc.). La fermentación es igualmente un método tradicional, que favorece la conservación de alimentos (los embutidos fermentados), donde por competencia, o por la producción de compuestos derivados de su metabolismo (por ejemplo, el ácido láctico o ciertas bacteriocinas) grupos de microorganismos excluyen el crecimiento de otros (Aberle, 2002).

Desde finales del siglo XIX, el principal método de preservación de la carne a largo plazo, ha sido la congelación a -20°C ; mientras que, para períodos de tiempo cortos, se prefiere la refrigeración a temperaturas entre 0 y 4°C . El mantenimiento de la cadena de frío se hace para salvaguardar la seguridad de los consumidores y la protección de la salud pública (Eilert, 2005).

Esto se logra por la desaceleración de reacciones enzimáticas propias de la misma carne, así como por la reducción del daño microbiano y/o contaminación biológica, puesto que la temperatura baja, reduce la replicación de la mayoría de los microorganismos, quienes son los responsables de la aparición del limo superficial, desarrollo de olores desagradables, así como de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS), ya sea por la presencia particular de algunas de las bacterias como *Salmonella*, o de toxinas microbianas derivadas de su metabolismo como las producidas por *Staphylococcus aureus* (Arinder y Borch, 1999). El efecto de la temperatura de almacenamiento es tan importante, que puede resultar en modificaciones en la vida útil de producto. Se ha encontrado que la vida útil tiene una reducción considerable a medida que aumenta la temperatura.

Los sistemas de comercialización y venta de alimentos han experimentado grandes cambios en las últimas décadas. Las razones para ello son muy variadas y diversas. La seguridad y calidad es lo que mueve fuertemente al mundo alimentario en estos momentos. Los alimentos deben ser lo más seguros posible desde el punto de vista higiénico y de la salud, pero al mismo tiempo, deben poseer la máxima calidad sensorial, y conservarla el mayor tiempo que sea viable.

Es por ello que en los últimos años la industria alimentaria se ha enfocado en la investigación de nuevas técnicas para mantener los alimentos lo menos procesados posible, pero intentando aumentar su vida de anaquel, una de las principales técnicas empleadas son los envases, debido a que cumplen una serie de funciones importantes para conservar la calidad de los alimentos, como es el contener al alimento, ayuda a su transportación y su conservación, entre otras.

Envases

En la actualidad existen diversas formas de envasar la carne o productos cárnicos. Esto es el resultado de una constante evolución de las tecnologías de envasado, que busca mejorar su función principal: “contener y preservar”. Diversos grupos de investigación en colaboración con la industria de envases, se han dado a la tarea de resolver los problemas de productores y procesadores de carne. En esta búsqueda de mejores y nuevas tecnologías, al igual que sucedió con el uso de la refrigeración y la congelación, la industria de la carne fue de las

primeras en aplicar las tecnologías de envasado con atmósferas modificadas (EAM) para incrementar la duración de sus productos (Brody, 2001; Brody, 2003).

La elección de una tecnología de envasado u otra viene condicionada por la apariencia y tamaño que se desee presentar al consumidor, el valor del producto, el tipo de carne y las condiciones bioquímicas; por ejemplo, cuando el pH final de la carne es bajo, el riesgo de desarrollo microbiano es menor; entonces, puede optarse por el vacío convencional o el vacío mediante termoformado conocido como "segunda piel". En cambio, en carnes con pH más altos se recomienda el uso de EAM que contengan dióxido de carbono por su acción antimicrobiana, ya que la carne con pH alto es un medio favorable del desarrollo bacteriano y, por ende, al desarrollo de malos olores en los envases al vacío (García y Gago, 2006).

La industria y consumidores exigen que el envase cumpla totalmente las funciones de proteger al alimento en su integridad, calidad y frescura, así como que estén libres de cualquier riesgo para el usuario (Rokka et al., 2004). Con el fin de otorgar esta seguridad y coadyuvar a elevar su desempeño, se han innovado y desarrollado los envases activos e inteligentes (Restrepo y Montoya, 2010, Suppakul et al., 2003):

- Envase activo (EA), aquellos donde se cambian las condiciones del envase o del medio con el fin de extender la vida de anaquel, incrementar la seguridad sanitaria y mantener las propiedades sensoriales, mientras conservan la calidad del alimento, en este tipo de envases, el envase libera compuestos o le otorga condiciones al alimento para preservarlo. Pueden existir envases con liberadores de gases, antioxidantes y antimicrobianos (Suppakul et al., 2003).
- Envase inteligente (EI), se encarga de monitorear las condiciones en las que se encuentra el alimento envasado con el fin de proveer información al consumidor acerca de su calidad durante las etapas de almacenamiento, transporte y exhibición para venta; funcionan mediante etiquetas indicadoras del estado del alimento y envase (Suppakul et al., 2003).

En la selección de EA están involucradas varias características del alimento, que pueden jugar un importante papel en la evaluación de la vida de anaquel (Suppakul et al., 2003, Coma, 2006), tales como: procesos fisiológicos (maduración), procesos químicos (oxidación), procesos físicos (deshidratación), aspectos microbiológicos (descomposición por microorganismos) e infestación (por insectos). Los sistemas se pueden clasificar como "absorbedores" que

remueven los compuestos indeseables (oxígeno, exceso de agua, etileno, dióxido de carbono, etc.) y “liberadores” que adicionan compuestos al alimento envasado (dióxido de carbono, antioxidantes, antimicrobianos, etc.).

Por otro lado, si bien existen muchos tipos de EI, sólo unos pocos se encuentran en el mercado. Entre ellos tenemos (Brody, 2001; Brody, 2003; Coma, 2006, Restrepo y Montoya, 2010):

- Indicadores tiempo-temperatura, que muestran una dependencia tiempo-temperatura medible, a través de un cambio irreversible en el dispositivo asociado a un cambio de calidad del producto, son etiquetas internas del envase que monitorean el factor temperatura con el tiempo.
- Indicadores de fuga (Leak-indicators-LI), aportan información sobre la composición del espacio libre del sistema producto-envase y de la integridad del envase, indicando la pérdida de presión o la absorción de oxígeno, usan azul de metileno como indicador.
- Indicadores de grado de frescura, basados en la detección de compuestos volátiles producidos durante la alteración de alimentos (dióxido de carbono, aminas, amoníaco y sulfuro de hidrógeno).
- Indicadores de desarrollo bacteriano, los cuales se activan por el consumo de algún nutriente, o si la población de microorganismos rebasa los niveles permitidos.

Existen otros sistemas indicadores como son los de color, de golpes y de autenticidad. Recientemente, se han diseñado envases inteligentes que incorporan en las películas infinidad de moléculas que al estar en presencia de agentes deteriorantes en el producto, generan una señal visual que alerta al consumidor (Gobantes et al., 2001 y García y Gago, 2006).

Polímeros para la Fabricación de Envases

Varios polímeros son usados en la fabricación de envases y embalajes, la elección de los mismos dependerá principalmente del mercado en el que va a ser comercializado, en la compatibilidad con el producto a contener, del sistema de transporte del producto, los aspectos

socioeconómicos, los aspectos relativos al medioambiente, la seguridad del sistema de envases y embalajes (Luckwu, 2013).

Los principalmente materiales plásticos utilizados en la fabricación de envases para alimentos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Plásticos utilizados en envases para alimentos.

Nombre	Abreviaciones comunes (Por sus siglas en ingles)
Polietileno (Baja y alta densidad)	PE (LDPE y HDPE)
Polipropileno	PP
Polietileno	PET
Etilén vinil acetato	EVA
Poliámidas	PA
Poliestireno	PS
Etilén vinil alcohol	EVOH
Acetato de polivinilo	PVA
Cloruro de polivinilo	PVC
Estirenos	S

Fuente: Luckwu, 2013.

Poliámida (PA)

La PA es un polímero termoplástico semicristalino con excepcionales propiedades que lo hacen apto para múltiples aplicaciones. Son conocidas sus excelentes propiedades mecánicas, en cuanto a módulo elástico, resistencia al impacto, a la fatiga y a la abrasión, que lo hacen insustituible en sectores como automotriz. Si definimos los principales sectores de aplicación de la PA se podría resumir en: automotriz, eléctrico/electrónico, textil y envase alimentario (Benedito, 2012).

Las ventajas de la PA no se quedan solamente en sus propiedades mecánicas. No hay que olvidar toda una serie de ventajas y características que las hacen extremadamente

interesantes en otros campos, como el que nos ocupa: films. El envase alimentario, como bien es sabido, exige una serie de propiedades no alcanzables para cualquier polímero. La estructura (Figura 5) claramente estabilizada de las poliamidas por la formación de puentes de hidrógeno, su carácter polar y su morfología semicristalina justifican las excelentes propiedades adecuadas para envase alimentario (Benedito, 2012).

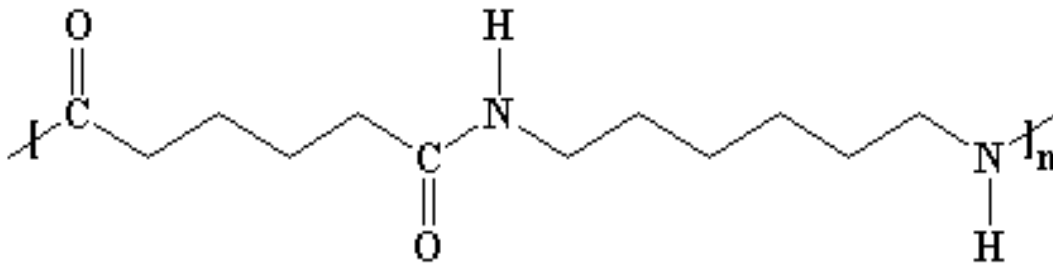


Figura 5. Molécula de PA66.

Las principales características que hacen viable la utilización de la PA en envases para alimentos son: (Benedito, 2012).

- Excepcional resistencia a la tracción y dureza.
- Gran barrera al oxígeno y a aromas/olores. Permeabilidad al vapor de agua.
- Resistencia al rayado y a la fisuración.
- Resistencia química a las grasas, aceites, disolventes y alimentos ácidos.
- Gran transparencia y capacidad de imprimación.
- Gran resistencia a la deformación por temperatura (posibilidad de ser usado en hornos convencionales y microondas). Capaz de recibir diferentes tratamientos de esterilización.
- Resistencia a las bajas temperaturas.

- Reciclable e incinerable sin la producción de sustancias perjudiciales.

En cuanto a los tipos de poliamidas utilizadas en films o láminas para envase cabe destacar fundamentalmente la PA6, PA66, PA 612 y los copolímeros de PA 6/66. Entre ellas, la PA66 mantiene un adecuado equilibrio entre resistencia mecánica, rigidez, resistencia a la temperatura, química, y al desgaste. Es la más utilizada en la fabricación de envases, indudablemente. Sin embargo, la PA6 es más fácil de procesar (menores temperaturas), presenta menor módulo elástico, menor contracción y elevadas propiedades ópticas, así como resistencia al impacto. Comparado con éstas, la PA612 presenta el mejor de los módulos elásticos, así como rigidez. Debido a la menor cantidad de grupos amina, la absorción de humedad es menor, así como alta resistencia química y a la abrasión (Benedito, 2012).

Polietileno de Baja Densidad (PEBD)

El polietileno es químicamente el polímero más simple. Se representa con su unidad repetitiva. Es uno de los plásticos más comunes, debido a su alta producción mundial. Es químicamente inerte, es el termoplástico más usado actualmente, se trata de un plástico barato que puede moldearse a casi cualquier forma, extruirse para hacer fibras o soplar para formar películas delgadas. El polietileno pertenece al grupo de polímeros denominados poliolefinas (Figura 6). Estas provienen de hidrocarburos simples, compuestos por átomos de carbono e hidrógeno y con dobles enlaces (Quino, 2013).

Los productos hechos de polietileno van desde materiales de construcción y aislantes eléctricos hasta materiales de envase. El polietileno se clasifica por su: densidad, contenido de monómeros, peso molecular, distribución del peso molecular, índice de fluidez y modificación. El polietileno más utilizado en la industria es el PEBD. El PEBD tiene una estructura ramificada, parcialmente cristalina y es termoplástico, es fabricado bajo altas condiciones de presión y temperatura mediante un proceso de polimerización por radicales libres. La polimerización del etileno bajo estas condiciones produce un polímero ramificado que es en realidad una mezcla de largas moléculas con columnas vertebrales de diferentes longitudes y cadenas ramificadas a los lados (Quino, 2013).

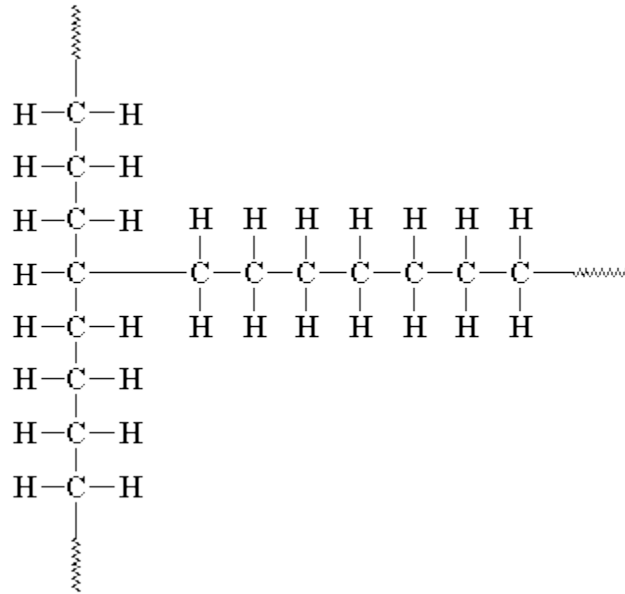


Figura 6. Moléculas ramificadas de PEBD.

El mayor uso del PEBD es en el sector del envase y empaque: bolsas, botellas compresibles para pulverizar fármacos, envase industrial, laminaciones, película para forro, película encogible y estirable, aislante para cables y conductores, tubería conduit, película para invernadero, tubería de riego y sistemas de irrigación (Quino, 2013).

Permeabilidad de los Polímeros

El término cristalino es del dominio de la fisicoquímica, no tiene nada que ver con la transparencia y se refiere al arreglo de átomos o moléculas de un cuerpo sólido en una configuración regular, uniforme (cristal elemental) que se repite en toda la masa y es propia de cada sustancia. En el polietileno como en otros plásticos, se sabe que tiene un componente amorfo, es en esta parte donde tiene lugar el fenómeno de la permeabilidad, esta condición de amorfo/cristalino del material se mide en porcentaje de cristalinidad, mientras mayor sea este, la densidad será mayor y menor la permeabilidad a los gases y vapor de agua, ya que existen menos espacios en las zonas cristalinas (Delgado, 2009).

Las zonas amorfas por su arreglo al azar, contiene huecos que se abren y cierran debido al movimiento natural de las moléculas, cuya magnitud depende de la temperatura y permiten el

paso de átomos o moléculas de los fluidos permeantes. Los factores que regulan el flujo de la permeabilidad son entre otros, el tamaño de su molécula y la volatilidad. En la tabla 3 podemos ver la permeabilidad de las películas plásticas más comunes (Delgado, 2009).

Tabla 3. Permeabilidad de materiales plásticos.

Material	CO₂ (cm³/24h/100)	O₂ (in²/mil)
LDPE	1967	445
HDPE	345	111
PVC sin aditivos	970	5-20
BOPP		150
PET		4.8-9
PA Nylon 6	160	0.02
PVDC	4	0.02
EOVH		0.01-1.15
EVA		515-545
Ionómero	226-484	
PTFE	16	6

Fuente: Modificado de Delgado, 2009

En esta tabla se puede comparar la permeabilidad del PEBD y la PA y se puede apreciar que el polietileno permite mayor cantidad de flujo tanto del oxígeno como del bióxido de carbono (Delgado, 2009).

Envases Antimicrobianos

En la actualidad los envases tienen un rol muy importante en la conservación, protección y comercialización de los alimentos, es por ello que se han desarrollado nuevas tecnologías que puedan cubrir ciertas funciones que antes no se consideraban como parte del envase, un ejemplo de esto son los envases activos, los cuales son capaces de tener una serie de interacciones con el producto extendiendo la vida de anaquel, manteniendo su calidad y mejorando la seguridad y atributos sensoriales. Los envases con agentes antimicrobianos son un tipo de envase activo con una funcionalidad específica en cuanto a la inhibición o reducción

del crecimiento microbiano. Se pueden clasificar dependiendo de su función y el tipo de antimicrobiano añadido. Este tipo de envases se puede aplicar para cualquier tipo de alimentos como los cárnicos, lácteos o productos de panificación (Sun Lee et al., 2008).

Los envases con antimicrobianos son un tipo de envase activo en el que el producto, el envase y el ambiente interactúan entre sí para reducir o retardar el crecimiento microbiano con el fin de prolongar la vida de anaquel, manteniendo la calidad y seguridad del producto (Sun Lee et al., 2008).

Los envases antimicrobianos pueden ser efectivos para reducir las dificultades que trae consigo la adición de los agentes antimicrobianos directamente en el producto, incluyendo pérdida de actividad por lixiviación y reacciones con otros compuestos como lípidos y proteínas, resultando una actividad antimicrobiana más extensa durante toda la cadena de distribución (Jokan et al., 2009). Comparado con los objetivos convencionales de un envase de alimentos, los envases activos con antimicrobianos específicamente diseñados para controlar el crecimiento de los microorganismos que afectan directamente a la estabilidad del alimento, es por ello que las principales funciones que un envase antimicrobiano debe cumplir son: inocuidad de los alimentos, mantenimiento de la calidad y extensión de la vida de anaquel del producto (Ahvenainen, 2003).

Cuando los agentes antimicrobianos se añaden como parte de la estructura del envase, además de la protección de barrera básica que brindan los envases, también se pueden alcanzar las siguientes tres propiedades: liberación, absorción e inmovilización. Los envases antimicrobianos que tiene la función de liberar, permiten la migración de los agentes antimicrobianos del envase hacia el alimento o hacia el espacio de cabeza de los envases e inhiben así el crecimiento microbiano. Los sistemas de absorción remueven los factores esenciales para el crecimiento de los microorganismos e inhiben este. Los sistemas de inmovilización no liberan agentes antimicrobianos, pero suprimen el crecimiento microbiano en la superficie de contacto con el alimento, estos sistemas pueden ser menos efectivos en alimentos sólidos que alimentos líquidos debido a que existe menor posibilidad de que todo el alimento este en contacto con el envase (Ahvenainen, 2003).

Los agentes antimicrobianos pueden ser incorporados de manera directa en los materiales de envase en forma de películas, recubrimientos, hojas, charolas y contenedores, o

en los espacios disponibles en forma de insertos en las bolsas (Han, 2005). La figura 7 muestra las diferentes posibilidades de incorporar los agentes antimicrobianos en los envases. Las figuras A, B y E es la manera en que los antimicrobianos se liberan del envase hacia el alimento con pequeñas variaciones entre ellos (con o sin recubrimiento y directamente en una bolsa), las figuras C y D son sistemas inmobilizadores en donde la superficie del alimento esta con contacto con el antimicrobiano y finalmente la figura F son los agentes antimicrobianos en películas listas para consumirse.

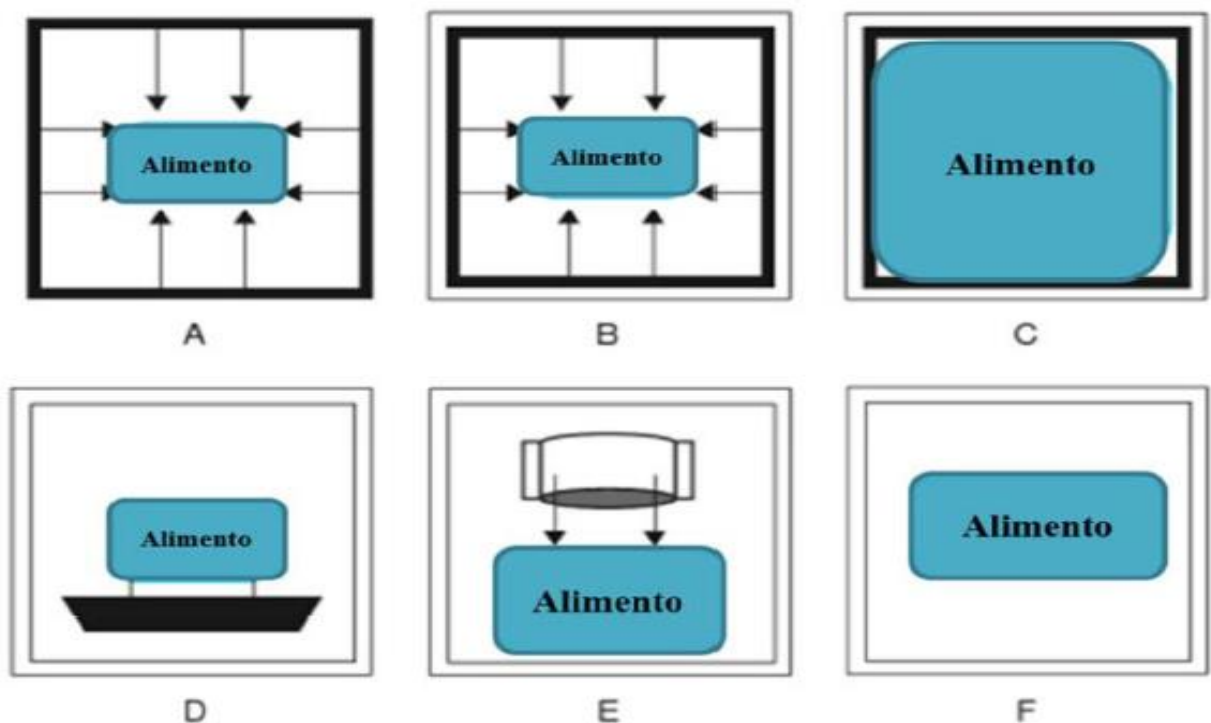


Figura 7. Posible manera de construir un envase antimicrobiano. A) Envase antimicrobiano de liberación. B) Envase antimicrobiano con recubrimiento convencional. C) Envase antimicrobiano inmobilizador. D) Uso de antimicrobiano en charolas. E) Bolsas con antimicrobianos. F) Películas comestibles. (Han, 2005).

Agentes Antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos tienen diferentes propiedades y afectan a diferentes microorganismos, es por ello que se tienen que caracterizar los mecanismos de acción de los agentes antimicrobianos y clasificar para cada tipo de microorganismos. Ejemplo de criterios para su clasificación: requerimiento de oxígeno (aerobio y anaerobio), composición celular (Gram positivos y Gram negativos), etapas de crecimiento (esporas y células vegetales) y temperatura óptima de crecimiento (termófilos, psicrófilos, psicótrofos, mesófilos). Además de las características microbianas, el mecanismo de acción antimicrobiano de los agentes es muy importante para entender su eficacia, así como sus limitaciones. Algunos agentes antimicrobianos inhiben el metabolismo esencial de los microorganismos mientras que otros alteran la estructura de las paredes de las células (Ahvenainen, 2003).

Los agentes antimicrobianos pueden ser bien compuestos sintéticos que se adicionan intencionalmente a los alimentos o compuestos naturales que son sustancias de origen biológico (también denominadas antimicrobianos naturales), que pueden usarse comercialmente como aditivos para conservar alimentos, además de mostrar propiedades antimicrobianas en los sistemas biológicos donde se encontraban originalmente (López-Malo, 2000).

Agentes Antimicrobianos Inorgánicos

Desde hace algunos años, el uso de agentes antimicrobianos inorgánicos en aplicaciones en la industria alimentarias ha atraído mucho interés para el control de microorganismos. Las investigaciones de los últimos años han demostrado que los agentes antimicrobianos inorgánicos tienen ventajas claves en comparación con los agentes orgánicos. Las ventajas principales de los agentes inorgánicos son su estabilidad química aún en altas temperaturas. También han demostrado tener una mayor eficacia inhibiendo el crecimiento microbiano en comparación con otros compuestos (Hewitt et al., 2001; Makhluף et al., 2005). En la tabla 3 se muestra ejemplos de agentes antimicrobianos inorgánicos.

Tabla 3. Agentes químicos inorgánicos con actividad antimicrobiana.

Agente inorgánico antimicrobiano	Ejemplo
Sales minerales	Cobre
	Zinc
	Plata
	Mercurio
Ácidos	Ácido Bórico
	Ácido Acético
Álcalis	Hidróxido de sodio
	Óxido de calcio
Oxidantes	Agua oxigenada
	Iodo
Halogenados	Cloro

Fuente: Makhluf et al., 2005

Las principales ventajas de los agentes antibacterianos inorgánicos, en comparación con los agentes antibacterianos orgánicos, son la estabilidad mejorada bajo condiciones de procesamiento severas. Actualmente, algunos de los materiales antibacterianos inorgánicos, en particular óxidos de metales inorgánicos, tales como TiO_2 , ZnO, MgO y CaO, se han estudiado. Entre los óxidos de metal inorgánico estudiados, ZnO, MgO y CaO son de particular interés debido a que no sólo son estables bajo condiciones de procesos a altas temperaturas, pero también considerados generalmente como materiales seguros para los seres humanos (Makhluf et al., 2005).

Nanopartículas de Óxido de Magnesio (MgO)

La nanotecnología puede definirse como la tecnología basada en el estudio y la manipulación de la materia en un rango de dimensiones muy pequeño, la nanoescala, la cual en el lenguaje de la nanociencia se define usualmente entre 1 y 100 nm. Para tener una idea de las dimensiones a las que se hace referencia en nanotecnología se debe considerar que, una esfera con un diámetro de 20 nm es mucho más grande que un átomo, una molécula, el ADN o

una proteína, sin embargo, esa misma esfera es mucho más pequeña que un virus promedio, una bacteria o que el núcleo de una célula humana (Hullmann 2006; Frejo et al., 2011).

La importancia de la nanotecnología radica en que las propiedades químicas y físicas de la materia a nivel nanométrico difieren de las propiedades de la materia a escalas mayores, ya que a medida que el tamaño de partícula disminuye, aumenta su área de contacto y por lo tanto permite una mayor interacción de las partículas (Nel et al., 2006). El caso más activo sería a nivel nanopartícula.

De acuerdo con el reciente informe conjunto entre la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para los Alimentos y Agricultura (FAO, Food and Agriculture Organization), emitido en el 2011, la industria y la ciencia han reconocido el potencial de la nanotecnología en la producción de alimentos y en el sector agropecuario. Sin embargo, debido a los conocimientos limitados que se tienen de los efectos de estas aplicaciones sobre la salud humana, las partes interesadas reconocen la necesidad de considerar oportunamente las consecuencias de la tecnología para garantizar la inocuidad de los alimentos (OMS y FAO 2011; Maynard y Warheit 2011).

Recientemente, la nanociencia y la nanotecnología ha estado al frente de una revolución tecnológica en el mundo, que se ocupa de los materiales con novedosos y mejorados significativamente las propiedades físicas, químicas y biológicas (Wani y Shah, 2012). En este sentido, las nanopartículas son reconocidas como agentes antibacterianos debido a sus propiedades de tamaño, la estructura y la superficie. Por lo tanto, la nanotecnología ofrece una manera de mejorar la actividad de los agentes antibacterianos inorgánicos. Las nanopartículas de óxido de metal, tal como ZnO, MgO y CaO han sido investigados como agentes antibacterianos inorgánicos (Tang et al., 2012).

El MgO es ampliamente utilizado para la catálisis, la remediación de residuos tóxicos y la acción antibacteriana debido a los defectos superficiales bien definidos de su estructura, que incluye iones de bajo coordinado y vacantes. El MgO puede absorber algunos gases orgánicos y residuos iónicos (Di et al., 2012).

Algunas de las ventajas de utilizar las nanopartículas de MgO son que este compuesto no es tóxico si se consume, ya que se puede utilizar como un suplemento dietario en forma de

MgO y MgOH, puede soportar altas temperaturas, es de bajo costo y sobre todo que tiene una alta actividad antimicrobiana. El Mg es muy importante para que el cuerpo humano cumpla con muchas de sus funciones biológicas vitales como regular la presión arterial. Recientemente, las nanopartículas de MgO se han mostrado prometedoras para su aplicación en el tratamiento de tumores (Bertinetti et al., 2009; Boubeta et al., 2010).

Las nanopartículas MgO también tienen un potencial considerable como un agente antimicrobiano. Zhen y Bin (2014), demostraron que las nanopartículas de MgO tienen una buena actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *E. coli*, de igual forma contra hongos como *A. niger*. Además, reportaron que las nanopartículas de MgO tienen una mayor actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas.

Las propiedades antimicrobianas del MgO se mejoran aún más cuando las partículas de MgO se hacen más pequeñas debido a que el área de contacto entre las moléculas de este compuesto y de las bacterias es mayor (Di et al., 2012).

Agentes Antimicrobianos Orgánicos

El principal objetivo del procesamiento de alimentos es proveer bienestar al ser humano por medio de alimentos seguros, nutricionalmente adecuados y cubrir las expectativas de sabor, aroma, apariencia y mayor comodidad. Es por esto el deseo de la sociedad moderna de consumir alimentos frescos, por lo que ha incrementado la popularidad de los alimentos “mínimamente o parcialmente procesados”. Este tipo de alimentos siguen los pasos mínimos de preparación, tratando de cambiar lo menos posible las cualidades de “alimento fresco” en la medida que sea posible, pero al mismo tiempo haciéndolo un alimento seguro y con una vida de anaquel suficiente para su transporte hasta el consumidor (Alzamora, 1997).

Muchos alimentos contienen compuestos naturales con actividad antimicrobiana. En estado natural, estos compuestos pueden desempeñar el papel de prolongadores de la vida útil de los alimentos. Incluso muchos de ellos han sido estudiados por su potencial como antimicrobianos alimentarios directos. El uso de aditivos alimentarios de origen natural implica el aislamiento, purificación, estabilización e incorporación de dichos compuestos a los alimentos con fines antimicrobianos, sin que ello afecte negativamente a las características sensoriales, nutritivas y a su garantía sanitaria. Esto tiene que lograrse manteniendo los costos de

formulación, procesamiento o comercialización. Los sistemas antimicrobianos naturales pueden clasificarse por su origen (Beuchat, 2001):

- Origen animal, incluye proteínas, enzimas líticas tales como lisozima, hidrolasas tales como lipasas y proteasas y polisacáridos como el quitosán.
- Origen vegetal, incluye compuestos fenólicos provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores, ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas.
- Origen microbiano, incluye compuestos producidos por microorganismos.

Día a día se está aumentando el uso de antimicrobianos naturales en la Unión Europea, los cuales refuerzan la seguridad en los alimentos y prolongan la vida útil de estos frente a las bacterias, hongos y virus. El apio, la almendra, el café y el arándano contienen antimicrobianos naturales que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos (Beuchat, 2001).

Muchas hierbas y “especias” (Tabla 4) contienen aceites esenciales que son antimicrobianos: se menciona que cerca de 80 productos de origen vegetal contiene alto niveles de antimicrobianos con uso potencial en alimentos, por ejemplo: clavo, ajo, cebolla, salvia, romero, cilantro, perejil, orégano, mostaza y vainilla entre otros (Ismaiel y Pierson, 1990).

Tabla 4. Plantas utilizadas como saborizantes en alimentos y con actividad antimicrobiana.

Plantas utilizadas como saborizantes y con actividad antimicrobiana			
Ajedrea	Canela	Eneldo	Perejil
Ajo	Cardamomo	Jengibre	Pimienta
Albahaca	Cebollines	Laurel	Romero
Alcaravea	Cilantro	Menta	Té limón
Anís	Clavo	Mostaza	Tomillo
Azafrán	Comino	Nuez moscada	Vainilla

Fuente: López-Malo, 2000

Desde la antigüedad, la gente ha utilizado las plantas para el tratamiento de enfermedades infecciosas comunes, y algunos de ellos se han integrado como una cura para diversas patologías. Yuca (*Yucca baccata*) fue una de las plantas que se utilizaron como un importante recurso natural por los indios del sudoeste de Estados Unidos, México y América Latina desde hace miles de años contra la artritis, fiebre, dolores de cabeza, úlceras, y la apendicitis (Quihui-Cota, et al. 2014).

Yuca (*Yucca baccata*)

Las plantas pertenecientes al género yuca son aproximadamente 40 especies. La yuca es una planta perenne, suculenta, arbustiva y de hojas ascendentes. Su fruto puede ser carnoso o seco, siendo consumido de diversas formas por los pueblos indígenas (Guillot D. y Van der Meer, 2009).

La yuca (*Yucca baccata*) es una planta proveniente de la familia de las agaváceas, se puede encontrar en el desierto de California, Utah, Texas, Sonora y Chihuahua. Desde 1930 se utiliza el jugo de esta planta como conservador de alimentos de forma artesanal (Groen, 2014). La palabra *baccata* significa “fructificaron”, haciendo referencia a los grandes frutos de la planta. Estas plantas florecen aproximadamente, una vez al año entre abril y mayo (Smith, 2004).

El principal uso que se le da en la actualidad a esta planta es de jardinería, pero en los últimos años en los lugares de origen se les ha encontrado otros usos para darle un valor agregado a dicha planta, por ejemplo, como alimento, material para elaborar cuerdas y canastas y también como detergentes debido a que contiene tubérculos muy ricos en saponinas (Quihui-Cota, et al. 2014).

En el estudio realizado por Quihui-cota et al., (2014) se encontró que un extracto proveniente del tallo de *Yucca baccata* está constituido principalmente por alcaloides, saponinas y demás compuestos involucrados con la actividad antimicrobiana, además demostró que el extracto tenía actividad antiparasitaria.

Las saponinas son compuestos que constituyen parte de las defensas naturales de las plantas (Apablaza et al.,2002). Son sustancias de sabor amargo localizadas principalmente en el epispermo de granos, en tallos y otras partes de plantas como quinoa o la yuca (Lonzano et

al.,2012). El mecanismo de la actividad antimicrobiana de las saponinas no se ha logrado descifrar por completo. Sin embargo, existen mecanismos propuestos como el de la lisis celular, debido a su estructura química que es capaz de interactuar con los lípidos de la membrana, creando poros, (Jie-Lun et al.,2012 y Pereo, 2015). Las bacterias Gram positivas, aparentemente, son inhibidas eficazmente mientras que las Gram negativas son poco afectadas.

La actividad antimicrobiana de las saponinas depende de la aglicona y los azúcares unidos a está. Uno de los mecanismos de acción propuestos para el efecto inhibitorio de las saponinas es debido a su capacidad surfactante, es capaz de interactuar con los lípidos de las membranas celulares (colesterol en las eucariotas), volviéndola porosa y provocando la lisis celular. Para el caso de las procariontas, como las bacterias Gram negativas, el mecanismo de acción propuesto es la interacción de las saponinas con los lípidos que se encuentran presentes en la pared celular, formando parte de los lipopolisacáridos. Estas interacciones lípido-saponina ocasionan la lisis celular (Arabski et al., 2012).

METODOLOGÍA

Las películas aditivadas con un compuesto inorgánico (Nanoaditivos Inorgánicos) fueron proporcionadas por el Laboratorio de Envases del Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo A. C. (CIAD). Las películas fueron procesadas en un extrusor-soplo con 3% de nanopartículas de MgO en polvo (No. CAS 1309-48-4, pureza al 99%, de US Research Nanomaterials, Inc. (Houston, TX. EUA) con resinas de PA (Ultramid) y de PEBD (Certene, Muehlstein).

Las películas aditivadas con un extracto orgánico (tallo de *Yucca baccata*) fueron proporcionadas por el Laboratorio de Nutrición del Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo A. C. (CIAD). Las películas fueron procesadas en un extrusor-soplo con 5% del extracto de tallo de yuca (ETY) en polvo fino de color café. Utilizando una resina de PEBD (Certene, Muehlstein).

Para las pruebas antimicrobianas se usó el agar Triptona-Extracto de levadura (Difco-Sparks, EUA) como medio de cultivo y para hacer las diluciones se usó agua peptonada (buffer) al 0.1 %.

Caracterización de las Películas

Medición de Espesor

El espesor de las películas se evaluó con un micrómetro (DTT E.J., Cady y CO), realizando 30 mediciones en cada película, reportándose en mils (milésima parte de una pulgada).

Análisis de Color

Se midió el color a las películas aditivadas (PA y PEBD), en 20 puntos diferentes de la superficie de la película, con el colorímetro (KONICA MINOLTA, modelo CR-300, Chiyoda, Japón), usando las variables L^* , a^* y b^* donde L^* indicará la luminosidad, a^* y b^* son las coordenadas de cromaticidad. El parámetro a^* toma valores positivos para tonos rojizos y valores negativos para tonos verdes mientras que para b^* las tonalidades amarillas dan valores positivos y los tonos azules, negativos. Se utilizó un fondo blanco para realizar las mediciones

en las películas, el cambio de color de las películas se corrigió restando el valor del fondo blanco empleado, obteniendo así las diferencias de las variables L^* , a^* y b^* (ΔL^* , Δa^* y Δb^*) que correspondieron al color de las películas.

Estos valores se utilizaron para calcular la diferencia total de color (ΔE) usando la fórmula; $\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{0.5}$. Los valores de ΔL^* , Δa^* y Δb^* , se calcularon con la diferencia entre las películas aditivadas y las películas testigos.

Análisis de Transparencia

Se evaluó la transparencia de las películas aditivadas (PA y PEBD) realizando un barrido en el espectro UV Visible en el espectrofotómetro (Varian Cary 50 Bio, Mulgrave, Victoria Australia). Se registraron los datos de transmitancia a longitudes de onda de 200 hasta 800 nm. Se cortó la película de un tamaño aproximado al de una celda (1 x 4 cm), y se utilizó como blanco las películas testigos.

Obtención de la Carne

Se adquirió pulpa larga de res molida (*semimembranosus*) de un comercio local de la ciudad de Hermosillo, Sonora. La pieza de carne se molió en tres ocasiones en un molino industrial propio de la sucursal para asegurar su homogenización. Se colocó en una hielera y fue transportada al Laboratorio de Envases (CIAD).

Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de las Películas con Nanoaditivos Inorgánicos

Envasado de la Carne

Se fabricaron bolsas por cada película procesada (PA testigo, PA + MgO, PEBD testigo, PEBD + MgO). Las medidas de las bolsas de PA fue de 23 x 4 cm y las de PEBD 18 x 5.5 cm. Se le agregaron 100 gr de carne a cada bolsa y se sellaron cuidando de que la película estuviera en contacto directo con el alimento. Se almacenaron a una temperatura de 4 ± 2 °C por 5 días. La Figura 8 muestra el plan del muestreo ambos días.

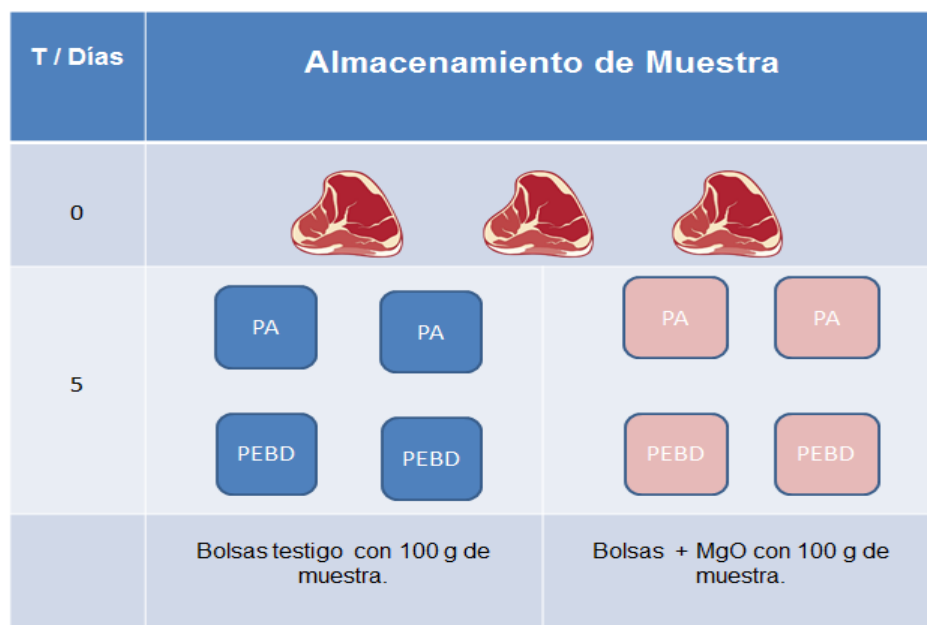


Figura 8. Diseño del experimento de evaluación de la actividad antimicrobiana de dos envases aditivados con 3% nanopartículas de MgO.

Análisis Microbiológico

Durante el almacenamiento se monitoreó la cuenta total de bacterias mesófilas aerobias (CTBMA). Para la preparación y dilución de la muestra se usó la técnica establecida en la NOM-110-SSA1-1994 y para la CTBMA se usó la NOM-092-SSA1-1994. Se tomaron muestras el día 0 antes de envasar y posteriormente el día 5. El análisis de la carne contenida en cada bolsa se hizo por triplicado. La Figura 9 muestra el diagrama de cómo se realizó el análisis microbiológico.

Los resultados se reportaron en UFC/g para cada muestra de carne contenida en las bolsas. Se compararon los resultados del alimento envasado en las bolsas testigos y bolsas con el aditivo antimicrobiano inorgánico.

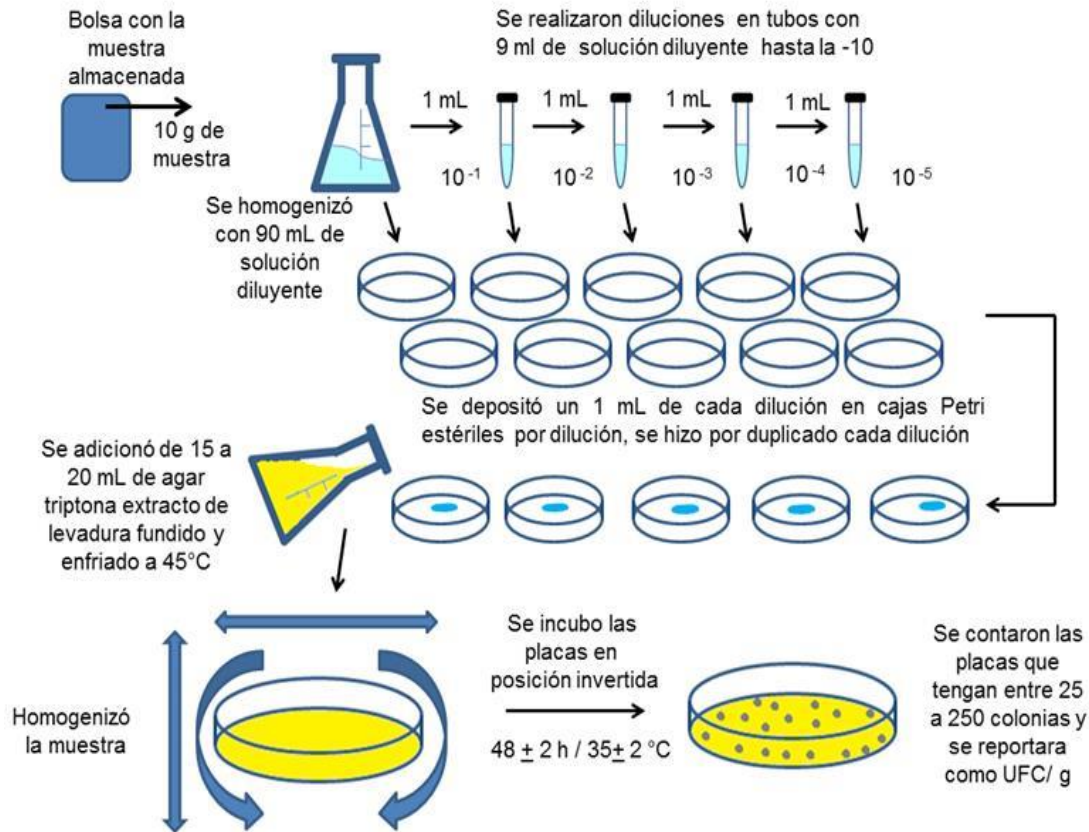


Figura 9. Determinación de CTBMA en cada muestreo del alimento en contacto con las bolsas testigo y con nanopartículas MgO.

Acidez Titulable

Se tomaron 10 g de carne de las mismas bolsas a las que se les analizó CTBMA, los cuales se licuaron por un minuto en 200 mL de agua destilada, posteriormente se filtró para retirar el tejido conectivo, el filtrado se aforó a 250 mL con agua destilada, se tomó una alícuota de 25 mL y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 125 mL, se le adicionaron 75 mL de agua destilada y tres gotas de fenolftaleína, esto se tituló con NaOH 0.1 N hasta el vire a un color rosa. También se tituló un blanco con 100 ml de agua destilada y tres gotas de fenolftaleína. Los resultados se expresaron en mL de NaOH gastado. Para obtener una comparación con estudios previos se realizó la conversión de los mililitros gastados de NaOH a mEq se utilizó la siguiente fórmula.

$$mEq = \frac{mg}{\text{Peso atómico}} \times \text{valencia}$$

Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de las Películas con aditivo orgánico

Envasado de la carne

Se elaboraron 12 bolsas por cada película procesada, las medidas de las bolsas testigo fue de 8.5 x 7 cm y las de las bolsas con ETY fue de 10 x 6 cm, donde se le agregaron 50 gr de alimento a cada bolsa, se sellaron cuidando que toda la película estuviera en contacto directo con la carne, a cada bolsa se le hizo un orificio de 500 μ m de diámetro en la parte central de la bolsa para que el oxígeno fluyera de igual manera en todas las bolsas. Se almacenaron a una temperatura de 4 ± 2 °C, tomándose los muestreos los días 0, 3, 6, 8 y 10 de la carne envasada en ambas películas (PEBD testigo y PEBD + Yuca) para la determinación de CTBMA. En el día 0 se tomó la muestra previa al envasado, el resto de los días del muestreo se realizó por triplicado (3 bolsas). El análisis de cada bolsa se hizo por duplicado. La Figura 10 explica el plan del muestreo por los 10 días.


























T / Días	Almacenamiento de Muestra					
0						
3						
6						
8						
10						
	Bolsas testigo PEBD con 50 g de muestra.			Bolsas PEBD + ETY con 50 g de muestra.		

Figura 10. Diseño del experimento de evaluación de la actividad antimicrobiana de un envase aditivado con 5% de ETY.

Análisis Microbiológico

Durante el almacenamiento se monitoreó la CTBMA utilizando las mismas normas que se mencionaron en la sección del análisis del envase con nanoaditivo inorgánico, la figura 9 muestra el diagrama de cómo se realizó el análisis microbiológico. Los resultados se expresaron en UFC/g.

Para los resultados de microbiología se comparó las UFC/g por separado para cada película. Estos datos resultaron de las cuentas del alimento envasado en las bolsas testigos y bolsas con el aditivo antimicrobiano orgánico.

Medición de pH

Se tomaron 2 g de muestra de las mismas bolsas a las que se les realizó el análisis de CTBMA, se le agregaron 18 mL de agua destilada, y se colocaron en una placa de agitación y en movimiento, a esta solución se le midió el potencial de hidrógeno (pH) con un potenciómetro (Mettler Toledo five Easy FE20, Schwerzenbach, Suiza).

Los resultados se graficaron contra los días de almacenamiento, estos datos fueron el resultado del promedio de las tres mediciones que se les realizó a la muestra de carne de cada envase los días 0, 3, 6, 8 y 10 de almacenamiento.

Análisis de Color de la Carne

Durante el almacenamiento se midió color (a^*) en las muestras de carne del envase (PA y PEBD) por triplicado con el colorímetro (KONICA MINOLTA, modelo CR-300, Chiyoda, Japón), en 10 puntos diferentes de la superficie de la carne, diariamente 8 días para el caso de las películas con el aditivo inorgánico y 10 días en el caso del aditivo orgánico. Los resultados de los 10 puntos se promediaron y se graficaron contra los días de almacenamiento para cada réplica. Se analizó el comportamiento y las diferencias de las bolsas con aditivo y sus testigos para concluir si hubo efecto de las bolsas con el agente antimicrobiano orgánico en el color de la carne.

Análisis Estadísticos

Los variables respuesta evaluados en la caracterización de las películas fueron:

- Espesor donde se promediaron 30 repeticiones por película evaluada.
- Diferencia total del color de las películas donde se promediaron 20 repeticiones por película evaluada.
- Transparencia donde se promediaron 10 repeticiones por película evaluada.

En la evaluación de la actividad antimicrobiana de las películas con nanoaditivos inorgánicos, se elaboró el análisis por triplicado y se compararon las UFC/g de la película testigo con las aditivadas con el compuesto antimicrobiano inorgánico, y en el caso de la acidez titulable, se compararon los mL de NaOH gastados por la carne almacenada en las películas testigos contra los mL gastados por la carne almacenada en las películas aditivadas con las nanopartículas de MgO.

En la evaluación de la actividad antimicrobiana de las películas con aditivo orgánico, se elaboró el análisis por triplicado y se compararon las UFC/g de la película testigo con las adicionadas con el compuesto antimicrobiano orgánico, y en el caso de la medición de pH se compararon el pH de la carne almacenada en las películas testigos con el pH de la carne almacenada en las películas aditivadas con el ETY.

Para el análisis de color, se utilizó un triplicado de cada película, determinando el promedio de 30 repeticiones por película cada día de almacenamiento, y se comparó el color de la carne (a) de las películas testigo con la carne de las películas aditivadas para cada día de almacenamiento.

En todos los casos se realizó un análisis de varianza ($p < 0.05$) donde se comparó cada una de las películas con sus respectivos testigos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de las Películas con Nanoaditivos Inorgánico y Orgánico

Medición de Espesor

Los resultados de espesor de las tres películas con sus testigos se muestran en la tabla 5, donde se aprecia que la adición de los aditivos provoca un aumento en el espesor de las tres películas. En el caso de las películas de PA se sobrestimó el espesor debido a que en el momento que fueron procesadas las películas no lograron una buena homogenización y las películas quedaron con aglomeraciones, las películas de PEBD con MgO al ser comparadas con las películas de PA tuvieron una menor cantidad de aglomeraciones, por lo que se puede concluir que se tuvo una mejor homogenización al fabricarlas.

Tabla 5. Espesor de películas utilizadas en este trabajo y sus testigos expresadas en mils (milésima parte de una pulgada).

Película	Espesor (mils)
PA + MgO	7.64 ± 1.24
T-PA	4.04 ± 1.11
PEBD + MgO	1.18 ± 0.27
T-PEBD MgO	0.98 ± 0.09
PEBD + ETY	1.63 ± 0.27
T-PEBD ETY	1.35 ± 0.25

Es importante conocer el espesor de las películas para poder estimar la transmisión del oxígeno que entra al envase, Graciano et al. (2006) reportaron que una película de PEBD con un espesor de 1 mil tiene una velocidad de transmisión al oxígeno de 8,128 cm³/m² día, calculando según el espesor de las películas de PEBD con ETY, la película con el aditivo debió tener una velocidad de transmisión al oxígeno de 4,987 cm³/m² día, mientras que la del testigo fue de 6,021 cm³/m² día, Considerando la diferencia y el efecto que esta podría tener en el crecimiento de bacterias aeróbicas, se realizó un orificio en la parte central de cada bolsa. Cabe

señalar que, en el experimento anterior, en el que se utilizaron las bolsas con aditivo inorgánico no se tomó la precaución de homologar los niveles de oxígeno dentro de los envases activos y sus testigos.

Análisis de Color

Se pudo apreciar que mediante inspección visual el color de las películas fue muy parecido entre los diferentes tratamientos, como se muestra en las Figuras 11 ,12 y 13. El color objetivo y la diferencia de color de las películas se muestran en Tabla 6.

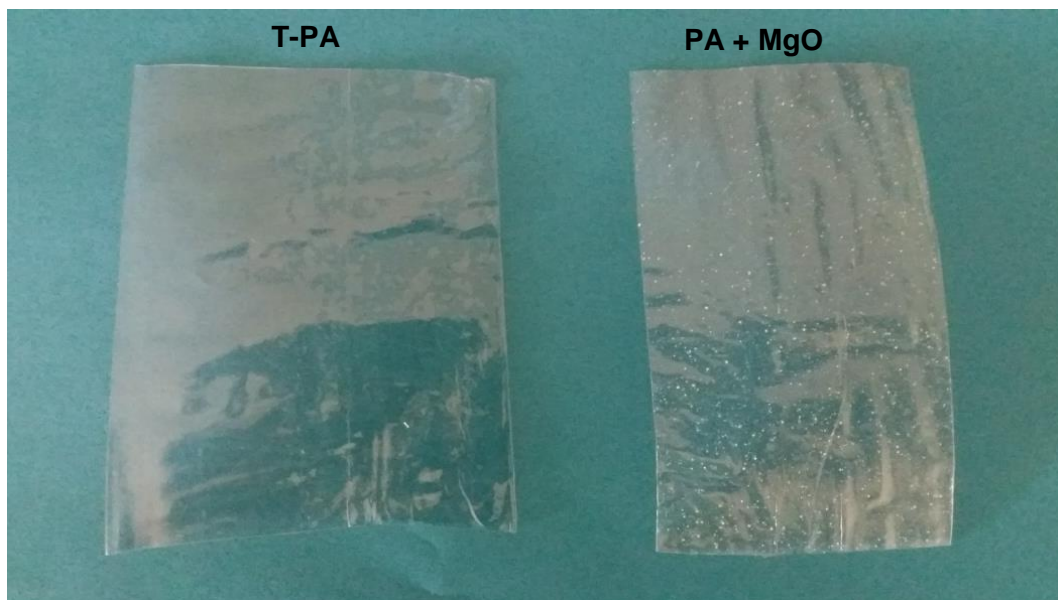


Figura 11. Testigo de la película de Poliamida (T-PA) y película de poliamida con nanopartículas de MgO (PA + MgO).

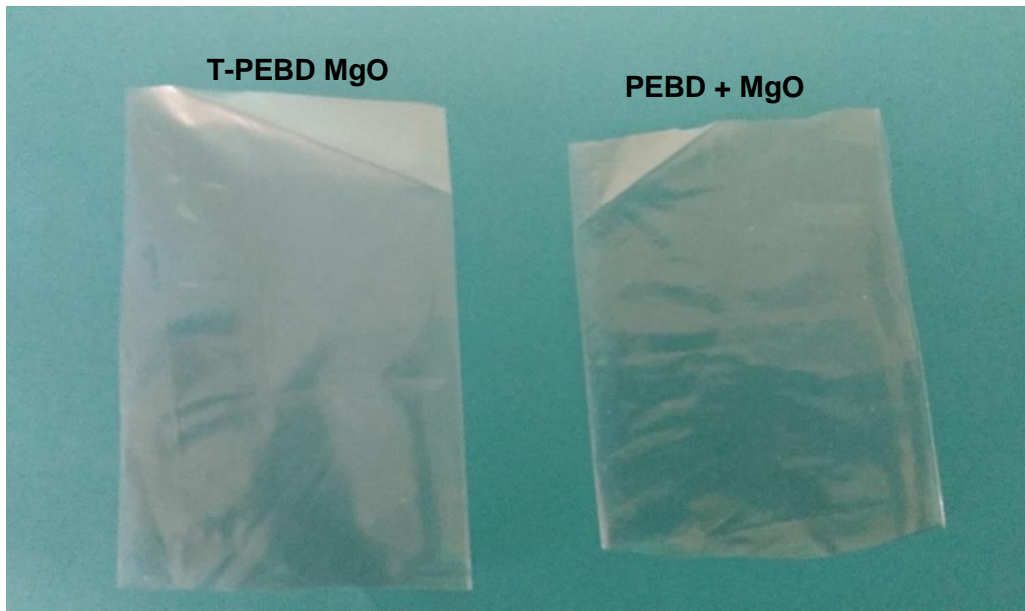


Figura 12. Testigo de la película de polietileno de baja densidad con MgO (T-PEBD MgO), película polietileno de baja densidad con nanopartículas MgO (PEBD + MgO).



Figura 13. Testigo de la película de polietileno de baja densidad con extracto de tallo de yuca (T-PEBD ETY), Polietileno de baja densidad con extracto de tallo de yuca (PEBD + ETY).

Tabla 6. Diferencia total de color (ΔE) de películas de PA y PEBD.

Película	L*	a*	b*	ΔE
PA + MgO	0.76 \pm 0.48	0.07 \pm 0.10	-0.25 \pm 0.08	0.31
T-PA	0.99 \pm 0.48	-0.07 \pm 0.10	-0.12 \pm 0.06	-
PEBD + MgO	0.53 \pm 0.16	-0.03 \pm 0.06	-0.10 \pm 0.04	0.23
T-PEBD MgO	0.47 \pm 0.17	-0.09 \pm 0.04	0.11 \pm 0.04	-
PEBD + ETY	2.83 \pm 0.53	0.46 \pm 0.10	-5.55 \pm 0.82	6.16
T-PEBD ETY	0.57 \pm 0.24	-0.05 \pm 0.06	0.16 \pm 0.05	-

En el caso de las películas con MgO las dos tuvieron un ΔE muy cercano a 0 que fue similar al resultado que reportó Manzanarez et al. (2011), ellos fabricaron una película de PLA que le adicionaron alfa-tocoferol (amarillo) y tuvieron un ΔE de 0.54. La película con ETY tuvo un ΔE 27 veces mayor comparándolo con el de las películas con MgO, pero comparándolo con los resultados de Colín et al. (2012) donde fabricaron una película PEBD con extracto de cempasúchil (anaranjado) y obtuvieron un ΔE 95.8, se pudo comprender que ΔE obtenido en las películas con ETY no fue tan elevado.

Los valores de a^* indican que los envases con ETY tienen una ligera tonalidad roja, por otra parte, los valores en b^* indicaron una ligera tonalidad azul, sin embargo, los valores encontrados son muy cercanos a cero, que es donde predomina el color gris. De igual forma, estos valores indicaron que las películas, a excepción de la película de PEBD + ETY, fueron transparentes. El valor en L^* indica la capacidad del envase para reflejar la luz, en donde se observó que la película de PEBD + ETY aumento mínimamente la capacidad de reflexión de la luz.

Análisis de Transparencia

Se hizo un barrido de 200 a 800 nm para conocer la cantidad de luz que atravesaba por cada una de las películas elaboradas. En el caso de la PA la película testigo conservó una transmitancia del 80% en la sección visible del espectro electromagnético de 800 a los 300 nm, mientras tanto que la película de PA con MgO tuvo una transmitancia del 50% de los 800 a los 380 nm (Figura 14).

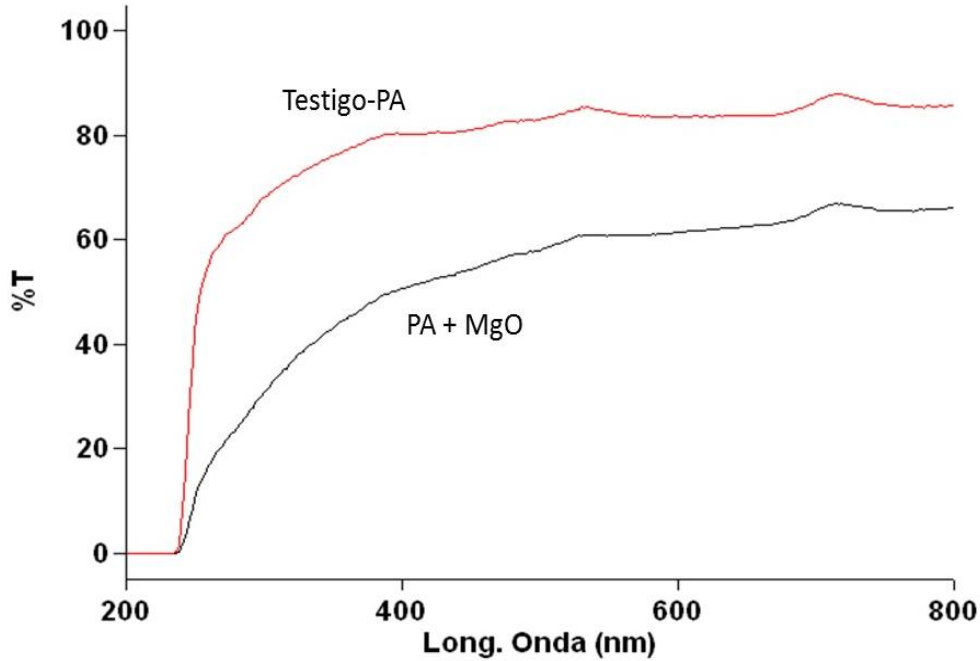


Figura 14. Transmitancia de las películas de PA aditivadas con nanopartículas de MgO

Para el caso de las películas de PEBD con MgO tuvieron un resultado similar, el testigo mantuvo una transmitancia del 80 % desde los 800 a los 220 nm, mientras que la película aditivada con MgO tuvo alrededor del 70 % desde los 800 a los 220 nm (Figura 15). En el caso de las películas de PEBD con ETY también expresaron resultados similares, la película testigo tuvo un resultado de 80 % de transmitancia desde los 800 a 250 nm, mientras con la película con ETY tuvo una transmitancia del 50% a los 400 nm y aumentó hasta un 65% al llegar a los 800 nm (Figura 16).

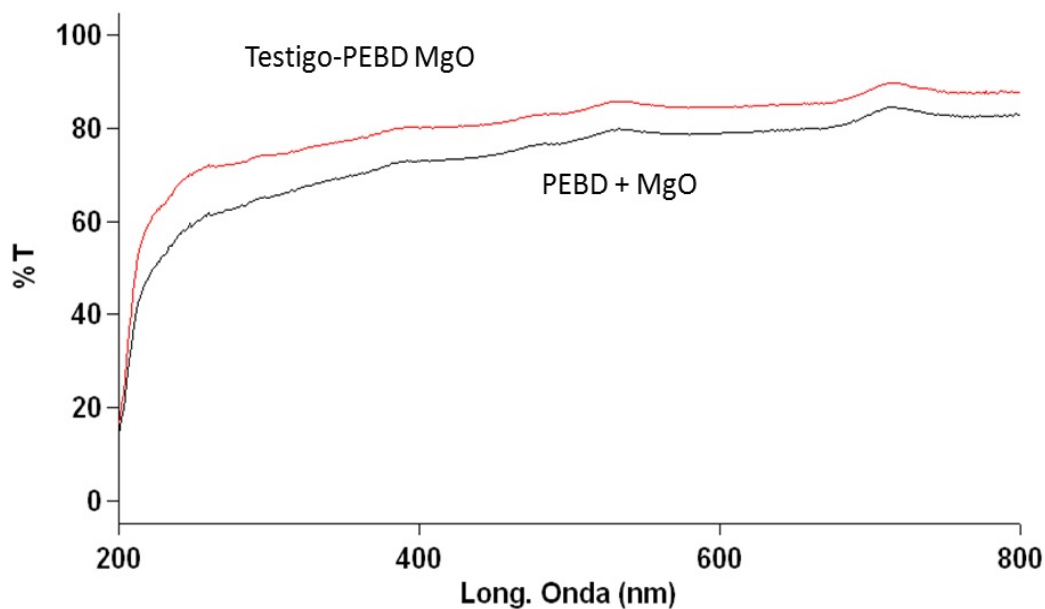


Figura 15. Transmitancia de las películas de PEBD con NPs de MgO.

Como se puede observar en el caso de las tres películas la adición del compuesto ha contribuido a la disminución del porcentaje de transmitancia, por lo tanto, las películas aditivadas permiten el paso de la luz en menor cantidad que las películas testigo.

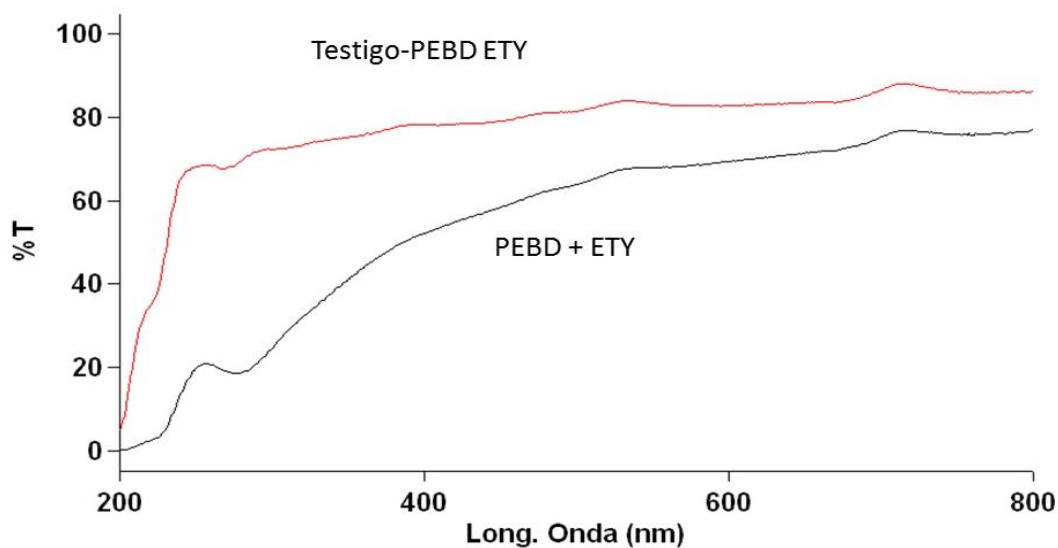


Figura 16. Transmitancia de las películas de PEBD con ETY.

La mayor afectación de los aditivos en la transparencia se observó en la región ultravioleta, lo cual puede considerarse conveniente porque es la radiación que más afecta negativamente a los componentes de los alimentos.

Estos resultados concuerdan con Colin et. al., 2012, en donde se evaluó la capacidad del paso de la luz de envases fabricados de polietileno con un extracto de Marigold (*Tagetes erecta*), obteniendo, de igual forma que en el presente trabajo, una disminución en el porcentaje de transmitancia debido a la adición del aditivo.

Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de las Películas con Nanoaditivos Inorgánicos

La evaluación de la actividad antimicrobiana de las películas se muestra en la tabla 7 que contiene los resultados de CTBMA obtenidas en la carne envasada en las películas con nanoaditivo inorgánico. La cantidad inicial de bacterias de la carne (tiempo 0) arrojó resultado de 51 000 ± 4 000 UFC/g, el cual está dentro de lo permitido por la NOM-034-SSA1-1993, que establece que los límites máximos de mesófilos aerobios para carne de res es de 5 000 000 UFC/g. A los cinco días de almacenamiento a 4°C la carne en contacto con las bolsas de PA testigo y aditivada mostraron 495 000 y 765 000 UFC/g, respectivamente. En cambio, la carne en contacto con las bolsas de PEBD testigo y aditivada alcanzaron niveles de 1600000 y 1550000 UFC/g, respectivamente.

Tabla 7. Cantidad de bacterias mesófilas aerobias expresado en UFC/g en carne molida de res almacenada por cinco días a 4°C en dos distintos tratamientos.

	Tratamiento	UFC/g
Día 0		51 000 ± 4 000
Día 5	PA-Tes	495 000 ± 5 000 ^a
	PA+MgO	765 000 ± 5 000 ^b
	PEBD-Tes	1 600 000 ± 300 000 ^c
	PEBD+MgO	1 550 000 ± 150 000 ^c

*Valores con diferente letra son estadísticamente diferentes (p<0.05)

Estos resultados demuestran que en el caso del tratamiento con PEBD no existe diferencia significativa entre el testigo y el que contiene MgO, pero en el caso de la PA si existió diferencia significativa ($p < 0.05$), donde el resultado de la película con MgO fue mayor que las de la película testigo. Estos resultados pudieron ser debido a varios factores, por ejemplo, las bolsas que contenía MgO es probable que permitiera el paso de oxígeno en una cantidad mayor que la testigo y por ser aeróbicas se reprodujeron a mayor velocidad.

Con la intención de relacionar los resultados de actividad antimicrobiana con la acidez, se determinó la acidez titulable a las mismas muestras que se les determino CTBMA. La carne al tiempo 0 gastó 1.35 ± 0 mL de NaOH 0.086 N por g de muestra. Keeton y Melton (1978) reportaron que ellos gastaban 1.4 mL de NaOH 0.1 N por cada dos gramos de carne, considerando que la normalidad de su NaOH es 1.16 veces más concentrado al que se usó en el presente estudio, aun así, la acidez de la carne utilizada en el presente trabajo fue 1.75 veces más ácida que la de ellos.

En otro estudio hecho por Melton et al. (1982) donde también analizaron la acidez en carne de res, ellos reportaban 1.06 mEq H⁺ por cada 10 g de muestra. El presente trabajo presentó un valor de acidez de 1.15 mEq por cada 10 g de muestra. Comparando este resultado con Melton y col. (1982) la acidez de la carne del presente estudio fue 1.08 veces más ácida, lo cual se puede atribuir a varios factores que influyen en la acidez de la carne como la alimentación del ganado, la raza, la forma en la que se sacrificó el animal y otro factor importante es que parte del músculo se tomó la muestra de carne.

Los resultados para el día 5 se muestran en la tabla 8 donde se puede ver un aumento de acidez 1.4 veces más que el análisis realizado el día 0. Para la carne envasada en bolsas de PA no se ve una diferencia significativa en la acidez de la carne con la que estuvo al contacto, a diferencia de los resultados de microbiología donde se apreció lo contrario y si hubo diferencia en las películas de PA.

Tabla 8. Acidez titulable en carne molida de res almacenada por 5 días a 4°C en dos distintos tratamientos.

	Tratamiento	mL de NaOH 0.086N
Día 0		1.35 ± 0
Día 5	PA-Tes	1.88 ± 0.043 ^a
	PA+MgO	1.88 ± 0.08 ^a
	PEBD-Tes	1.93 ± 0.066 ^b
	PEBD+MgO	1.81 ± 0.015 ^a

*Valores con diferente letra son estadísticamente diferentes (p<0.05)

En el caso de la carne envasada en películas de PEBD se puede ver que la carne que estuvo en contacto con las películas de PEBD con MgO tuvo 6.21 % menos acidez que la carne de las bolsas testigo, donde también se observa lo contrario a los resultados del análisis microbiológico ya que aquí si se aprecia una diferencia significativa (p<0.05) a lo contrario de los resultados microbiologías donde no hubo diferencia en los resultados de las películas de PEBD.

Determinación de Color en la Carne Contendida en las Películas Aditivadas con Nanopartículas de MgO

En la determinación de color en la carne que estuvo en contacto con las películas se encontró que el parámetro a* tuvo un comportamiento similar en la carne envasada en ambas películas que tienen MgO con sus testigos, pero un comportamiento diferente entre las dos películas (PA y PEBD), esto se debió probablemente a la permeabilidad de los polímeros, ya que el PEBD es permeable al oxígeno por lo que la pérdida de color rojo de la carne ocurre de manera normal en películas de PEBD, ya que la oximioglobina (OMb) se oxida a metamioglobina (MMb), en la Figura 17 y 18 se puede apreciar los cambios de color de la carne almacenada en bolsas de PEBD. En la Figura 1 se muestran las reacciones de mioglobina en la carne y los cambios de color.

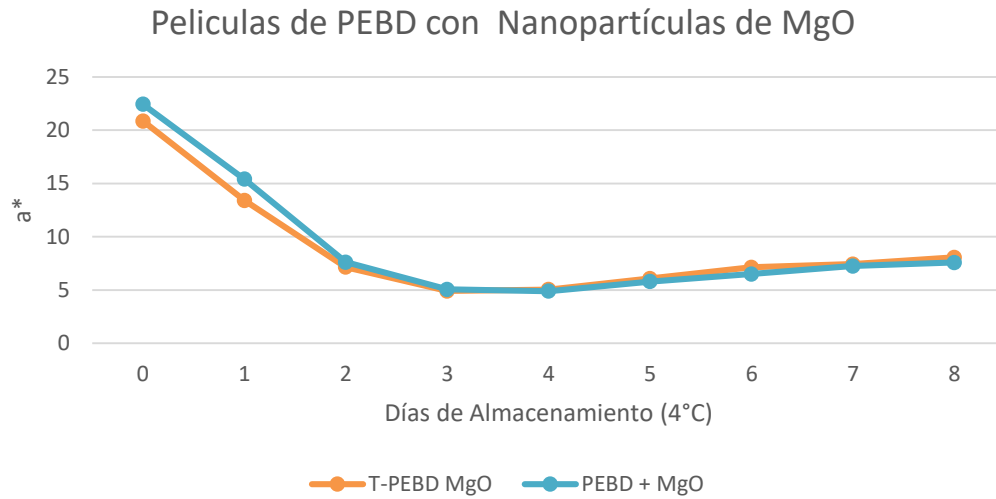


Figura 17. Color de la carne (a^*) almacenada en películas de PEBD con MgO durante 8 días a 4 °C.



Figura 18. Color de la carne (a^*) almacenada en películas de PEBD con nanopartículas de MgO a 4 °C los días 0, 2, 5 y 8 (de izquierda a derecha en la fotografía).

Para el caso de las películas de PA ocurre una desoxigenación rápida de la OMb a deoximioglobina (DMb), en la figura 19 y 20 se puede apreciar el cambio de color rojo a café de

la carne en el lapso de un día, posteriormente se observó como el color rojo fue regresando a la carne, esto debido a que la PA tiene baja velocidad de transmisión al oxígeno cuando está seca, como se ve en la tabla 4, pero con el paso del tiempo la permeabilidad de la PA al oxígeno va incrementando debido a que PA va adquiriendo humedad, por lo que la carne se va oxigenando y regresando a su color inicial.

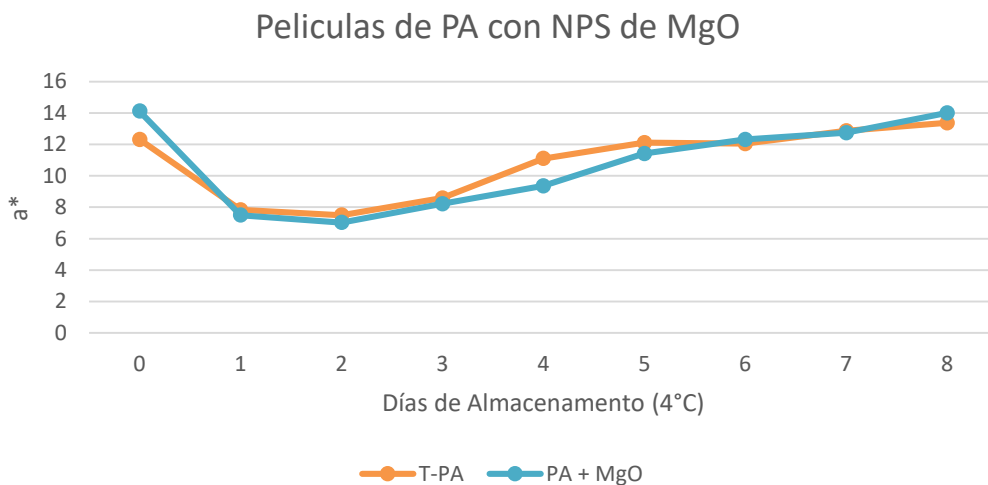


Figura 19. Color de la carne (a*) almacenada en películas de PA con MgO por 8 días a 4 °C.



Figura 20. Color de la carne (a*) almacenada en películas de PA con MgO a 4 °C los días 0, 3, 5 y 8 (de izquierda a derecha en la fotografía).

Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de las Películas con aditivo orgánico

La evaluación de la actividad antimicrobiana de las películas con ETY se muestra en la Tabla 9. La cantidad inicial de bacterias (tiempo 0) fue de $540\ 000 \pm 44\ 000$ UFC/g, el cual está dentro de lo permitido por la norma ya mencionada. El almacenamiento fue durante 10 días. En la tabla se puede apreciar que desde el día tres se presentó una diferencia entre los dos tipos de película donde se observa 1.65 veces más crecimiento de las bacterias mesófilas aerobias en la carne almacenada en las bolsas testigo que en las bolsas fabricadas por la película aditivada con ETY.

En el día 6 del almacenamiento de la carne de las bolsas testigos ya habían pasado los límites de la norma antes mencionada y la cuenta de la carne almacenada en bolsas aditivadas con ETY aún estaban por debajo, pero a pesar de eso los análisis estadísticos demostraron que no existe diferencia significativa entre los dos tratamientos en este día.

Tabla 9. Cantidad de bacterias mesófilas aerobias expresado en UFC/g en carne molida de res almacenada por 10 días a 4°C en contacto con las películas de PEBD con ETY.

Día	UFC/g	
	T-PEBD ETY	PEBD + ETY
0	$540\ 000 \pm 44\ 000$	
3	$4\ 300\ 000 \pm 470\ 000^A$	$2\ 600\ 000 \pm 230\ 000^B$
6	$6\ 800\ 000 \pm 1\ 800\ 000^A$	$4\ 200\ 000 \pm 250\ 000^A$
8	$22\ 000\ 000 \pm 15\ 000\ 000^A$	$4\ 600\ 000 \pm 780\ 000^B$
10	$39\ 000\ 000 \pm 10\ 000\ 000^A$	$7\ 600\ 000 \pm 3\ 900\ 000^B$

*Valores con la misma letra en la fila son estadísticamente iguales ($p < 0.05$)

En cambio, para el día 8 de almacenamiento la carne de las bolsas testigos tenían 4.8 veces mayor crecimiento de bacterias que la carne de las bolsas con ETY y los resultados señalan que en las tres bolsas testigo tenían un coeficiente de variación (C.V.) de 69.4, esto se pudo deber a la alta cantidad bacteriana en ellas y como se fueron desarrollando de una manera distinta. En cambio, los resultados de las bolsas con ETY seguían por debajo de la norma y con un C.V. de 16.9 que es mucho menor comparándolas con los resultados de las

bolsas testigos y los análisis estadísticos demostraron que en el día 8 si existió diferencia entre los dos tratamientos.

Los análisis del día 10 demuestran que la carne de las películas testigos tienen 5.13 veces mayor crecimiento de bacterias que la carne de las bolsas con ETY, también se aprecia que el C.V de las 3 bolsas testigo disminuyo a 25.9, mientras que para las bolsas con ETY el C.V que existió en las 3 bolsas fue mayor que otros días ya que subió hasta 51.8, debido a que la cantidad de bacterias en la carne creció notablemente, tanto que superó la cantidad máxima de UFC/g en la carne de res permitidas por la norma antes mencionada.

Castro y Sarabia, 2015, evaluaron la actividad antimicrobiana en carne molida de un envase de PEBD aditivado con 7.75 % de extracto de té verde, en donde almacenaron la carne a 4°C durante 8 días. La carne envasada en su película aditivada mostró en el día 8 un promedio de 400,000 UFC/g a diferencia de la envasada en su película testigo que tuvo un promedio de 2,700,000 UFC/g, lo que concuerda con nuestros resultados, donde la película aditivada con ETY ejerció un efecto positivo contra el crecimiento de bacterias mesófilas aerobias en carne.

Por otra parte, Gutiérrez, 2016, evaluó la actividad antimicrobiana en pollo de un envase de PEBD aditivado con 5% de extracto de tallo de tuca. El pollo se almacenó a 4°C durante 10 días. El pollo envasado en su película aditivada mostró en el día 10 un promedio de 1,300,000 UFC/g a diferencia de la envasada en su película testigo que tuvo un promedio de 2,830,000 UFC/g, similar a los resultados obtenidos en este estudio, donde la película aditivada con ETY ejerció un efecto positivo contra el crecimiento de bacterias mesófilas aerobias en carne.

Análisis de pH

Se les midió el pH a la carne de cada bolsa a la que se realizó la CTBMA los mismos días, esto con el fin de comparar los resultados de microbiología con la variación del pH de la carne, el día 0 la carne empezó con un pH de 5.35 ± 0.03 . Debido a que se desconoce el tiempo que tenía la carne desde el sacrificio del animal, no se puede hacer una comparación exacta, pero Pasachoa (2010) expresa que el pH de la carne de res se encuentra alrededor de los 5.5 por lo tanto los resultados del día 0 que obtuvimos quedan por debajo de lo reportado por Pasachoa.

En el caso de los demás días el pH de la carne almacenada en las bolsas aditivadas con ETY mostró un menor aumento que las bolsas testigo como se puede observar en la tabla 9. Los resultados de los tratamientos mostraron misma trayectoria, los días tres y seis la carne obtuvo un pH menor que el día inicial, mientras que los días 8 y 10 la carne obtuvo un pH mayor. Vásquez (2009) presentó el mismo comportamiento de resultados en su carne control, Vásquez almacenó su carne por 12 días, donde midió el pH de la carne los días 1, 3, 5, 8, 10 y 12 y sus resultados fueron 5.76 ± 0.02 , 5.73 ± 0.01 , 5.65 ± 0.01 , 5.67 ± 0.04 , 5.70 ± 0.02 , 5.80 ± 0.05 , respectivamente. Los resultados de pH obtenidos en este trabajo son menores comparados que los obtenidos por Vásquez, pero es importante tomar en cuenta que el pH del músculo puede variar dependiendo de muchos factores como es la raza del animal, la alimentación, la forma del sacrificio y principalmente de que músculo que obtenida la carne.

Tabla 10. Cambios de pH en carne molida de res almacenada por 10 días a 4°C

Tiempo(Días) Tratamiento	pH				
	0	3	6	8	10
T-PEBD ETY		5.33 ± 0.03	5.16 ± 0.005	5.51 ± 0.2	5.97 ± 0.07
PEBD + ETY	5.35 ± 0.03	5.29 ± 0.01	5.15 ± 0.08	5.19 ± 0.003	5.35 ± 0.05

Comparando los resultados de pH con los de microbiología, las bolsas que tuvieron una mayor carga microbiana también obtuvieron un pH más elevado. Por lo tanto, se puede expresar que un elevado crecimiento bacteriano puede causar un aumento en el pH de la carne.

Determinación de Color en la Carne Contenida en las Películas Aditivadas con ETY

En la determinación de color de la carne que estuvo en contacto con las películas, se muestra que el parámetro a^* tuvo un comportamiento similar en la película que tiene ETY y su testigo, la Figura 21 muestra la variación de a^* los 10 días de almacenamiento. Con el fin de evitar un error en el color debido a la permeabilidad del oxígeno por el espesor de las películas se le hizo

un pequeño orificio para permitir la penetración del oxígeno en una forma similar tanto en la película testigo como en la aditivada con ETY.

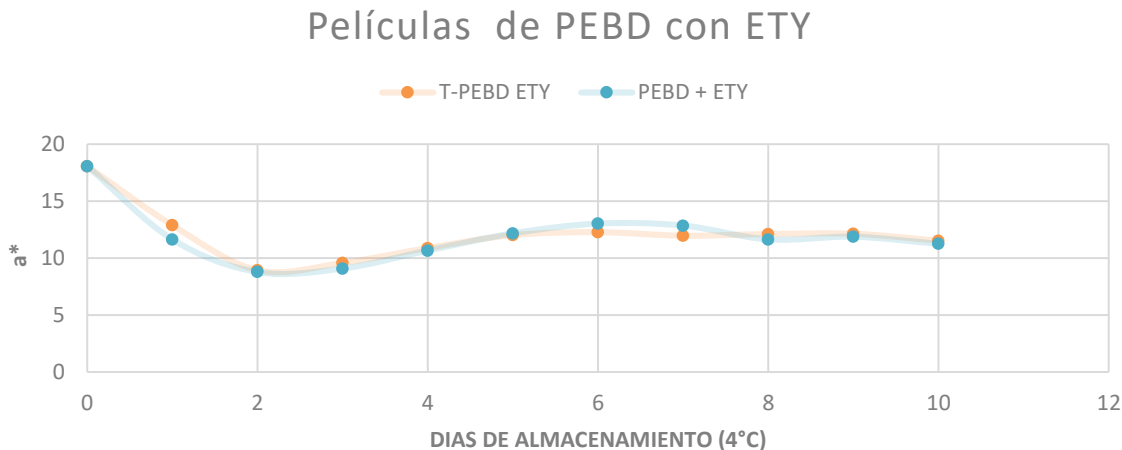


Figura 21. Color de la carne (a^*) almacenada en películas de PEBD con ETY por 10 días a 4°C.

El día 0 la carne inicio con un color rojo intenso esto es porque el músculo tenía una gran concentración de Omb, para el día dos la carne presentó los valores de a^* más bajos de todos los días, se apreciaba un color café marrón debido a que la Omb se oxidó a MMb, después los valores de a^* empezaron a subir constantemente, debido a que la cantidad de oxígeno que estaba en contacto con la carne fue aumentando hasta el día seis y la MMb tuvo una reducción a OMB. Después la carne se tornó a un color café rojizo debido a que la Omb se desoxigeno a DMb, esta reacción ocurrió debido a que la carne se quedó sin oxígeno los 4 días siguientes, los valores de a^* no tuvieron mucha variación y el color de la carne se apreciaba igual. En la figura 22 se puede apreciar el color de la carne a los días 0, 2, 6 y 8.

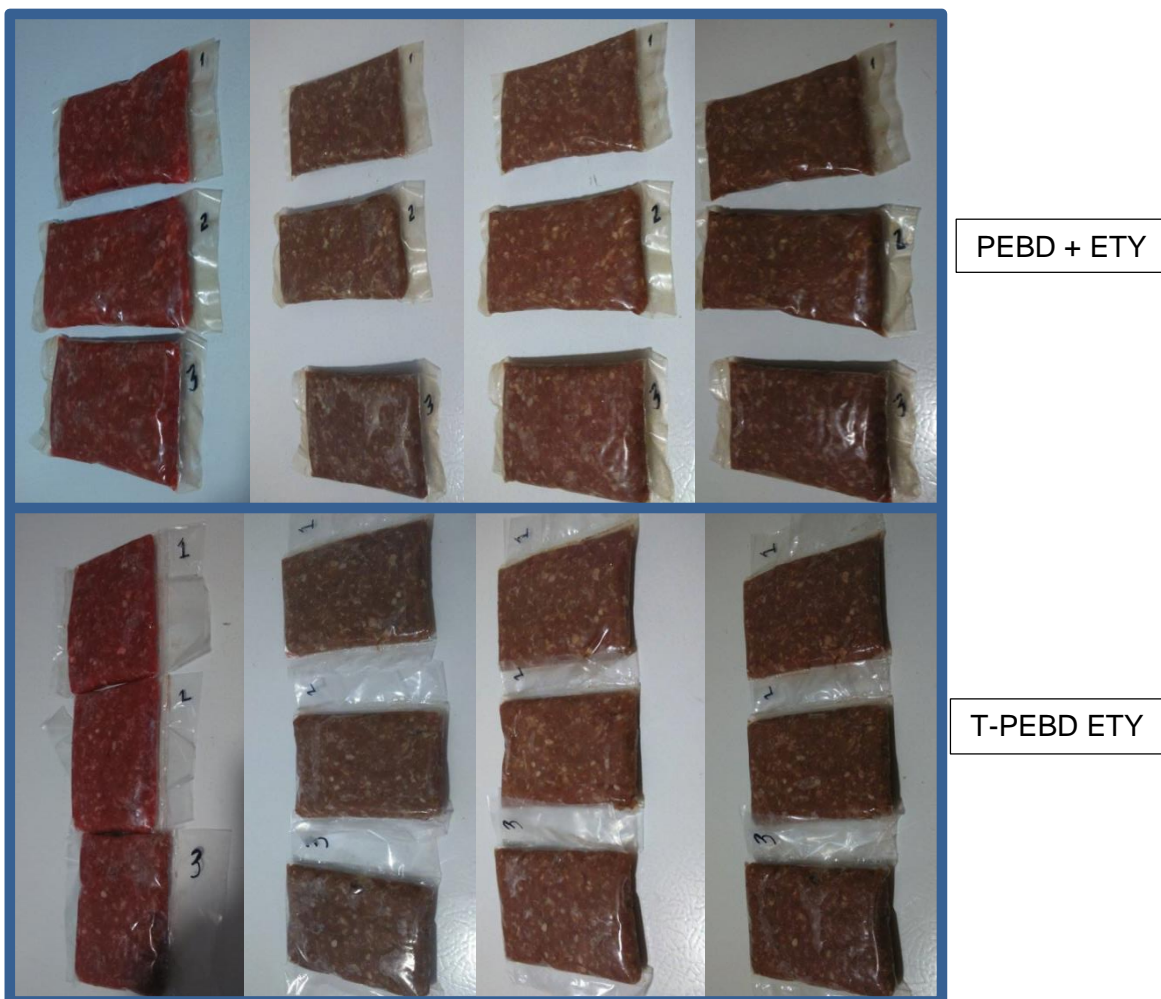


Figura 22. Color de la carne (a^*) almacenada en películas con ETY y testigo los días 0, 2, 6 y 8 (de izquierda a derecha en la fotografía).

CONCLUSIONES

En el presente estudio se realizaron diferentes análisis para evaluar la actividad antimicrobiana de envases aditivados con nanopartículas de MgO y extracto de tallo de yuca (*Yucca Baccata*).

La adición de los aditivos causó un aumento en su espesor provocando una menor permeabilidad al oxígeno; de igual forma, en los resultados de transparencia se observó que en las tres películas, el efecto de la adición del compuesto contribuyó a la disminución del porcentaje de transmitancia, por lo tanto, las películas aditivadas permiten en menor cantidad el paso de la luz que las películas testigos, lo cual podría coadyuvar a la vida útil del alimento.

En cuanto a los resultados de la evaluación de la actividad microbiana de las películas de PA y PEBD aditivados con 3% de nanopartículas de MgO demostraron que no tienen una actividad antimicrobiana suficiente para inhibir los mesófilos aerobios presentes en la carne molida de res.

Para los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de la película de PEBD aditivados con 5% de extracto de tallo de yuca, se observó que posee una actividad antimicrobiana suficiente para inhibir los mesófilos aerobios presentes en la carne molida de res, debido que hasta el día 8 de almacenamiento, la carne envasada en dichas películas tenía una cantidad de bacterias mesófilas aerobias menor a los límites máximos permitidos por la NOM-034-SSA1-1993, que en comparación con la película testigo, a partir del día 6 ésta sobrepasó los límites permitidos.

Por otra parte, la adición de las nanopartículas de MgO y del extracto de tallo de yuca no causaron un cambio significativo en el color de la carne, lo cual favorecería a la apreciación del alimento por parte del consumidor.

RECOMENDACIONES

- Realizar un nuevo experimento en donde la carne sea proveniente directamente de un rastro, donde los filetes obtenidos sean inmediatos al sacrificio del animal, para así asegurar que la carne tenga una cuenta microbiana inicial baja.
- Elaborar un análisis sensorial del alimento cocinado, después de su envasado en las películas con extracto de tallo de yuca (*Yucca baccata*).

BIBLIOGRAFÍA

Aberle ED. 2002. Principles of Meat Science 4ta Edition. Kendall Hunt Publishing Company. Storage and Preservation of Meat. 181 p.

Ahvenainen R. 2003. *Novel Food Packaging Techniques*. CRC Press. Boca Raton, EE. UU. 590 p.

Alberti P, Panea B, Ripoll G, Sañudo C, Olleta JL, Negueruela I. 2005. Medición del color. Estandarización de las metodologías para evaluar la calidad del producto (animal vivo, canal, carne y grasa) en los rumiantes. Madrid, España: MICYT-INIA: *Ganadera*; 3:216-225.

Alzamora SM. 1997. Preservación. Alimentos conservados por factores combinados. Temas en tecnologías de Alimentos. México. CYTED.IPN. 2:45-48.

Apablaza G., Días MJ., San Martín R., Moya E. 2002. Control de oidio de las cucurbitáceas con saponinas presentes en extractos de Quillay (*Quillaja saponaria*). Ciencias e Investigación Agraria. Vol. 29. 83-90 p.

Arabski M., Wasik S., Dworecki K., Kaca W. 2012. Effects of Saponins Against Clinical E.coli Strains and Eukaryotic Cell Line. Journal of Biomedicine and Biotechnology, vol. 2012, 1-6p.

Arinder P, Borch E. 1999. Validation of mathematical models for predicting growth of *Pseudomonas* spp. Predictive microbiology applied to chilled food preservation. Refrigeration Science and Technology Proceedings. 5:185-193.

Benedito A. 2012. Las poliamidas en films para envase alimentario. Interempresas. Disponible en: <http://www.interempresas.net/Plastico/Articulos/98723-Las-poliamicidas-en-films-para-envase-alimentario.html> (Fecha de acceso: 25 de Noviembre de 2016).

Bertinetti L, Drouet C, Combes C, Rey C, Tampieri A, Coluccia S. y Martra G. 2009. Surface characteristics of nanocrystalline apatites: effect of Mg Surface enrichment on morphology, Surface hydration species, and cationic environments. *Langmuir*, 25:5647-5654.

Beuchat LR. 2001. Control of foodborne pathogens and spoilage microorganisms by naturally occurring antimicrobials. *Microbial Food Contamination*. Wilson CL, S Droby. CRC Press. London, UK. 11: 149-169.

Boubeta C, Balcells L, Cristófol R, Sanfeliu C, Rodríguez E, Weissleder R, Piedrafita S, Simeonidis K. y Angelakeris M. 2010. Self-assembled multifunctional Fe/MgO nanospheres for magnetic resonance imaging and hyperthermia. *Nanomedicine*, 6:362-370.

Brody AL. 2001. What's active about intelligent packaging. *Food Technology* 55(6), 75-78.

Brody AL. 2003. Predicting packaged food shelf life. *Food Technology*. 57(4):100-102.

Brondum J, Byrne DV, Back LS, Bertelsen G, Engelsen SB. 2000. Warmedover flavour in porcine meat a combined spectroscopic, sensory and chemometric study. *Meat Sci.*, 54:83-95.

Castillo W. 2014. Determinación de pH y acidez titulable (ác. láctico) en carnes vacunos, caprinos y porcinos. Facultad de ingeniería, arquitectura y urbanismo. Academic Press. 155 p.

Castro R, Sarabia Y. 2015. Fabricación de Películas de PEBD con Extracto de Té Verde y Evaluación de su Capacidad Antimicrobiana. Universidad Tecnología de San Luis Río Colorado. 48,49 p.

Chavarrías M. 2012. Por qué se deterioran los alimentos. EROSKI CONSUMER, el diario del consumidor. Disponible en: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/sociedad-y-consumo/2012/10/24/213789.php> (Fecha de acceso: 26 de Noviembre de 2016).

Coma V. 2006. Perspective for the active packaging of meat products. *Advanced Technologies For Meat Products* (Nollet, L.M. & Toldrá, F. eds.). CRC press, Taylor & Francis Group. Boca Raton. FL. USA. 449- 472 p.

Davies AR. 1995. Advances in modified-atmosphere packaging. Gould, G.W. (Ed.), *New Methods of Food Preservation*. Blackie Academic and Professional, London, 304–320 p.

Delgado N. 2009. Plásticos y conversión Mecánica tecnomaq. Disponible en: http://www.tecnomaq.com.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=25:la-

[permeabilidad-ii-&catid=5:plasticos-y-conversion&Itemid=13](#) (Fecha de acceso: 14 de Noviembre de 2016).

Di D, He Z, Sun Z, Liu J. 2012. A new nano-cryosurgical modality for tumor treatment using biodegradable MgO nanoparticles. *Nanomedicine*. 8:1233-1241.

Downs F, Ito K. 2001. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4th ed. APHA. Washington. 283 p.

Eilert SJ. 2005. New packaging technologies for the 21st century, *Meat Sci.*, 122–127 p.

Frejo M, Díaz M, Lobo M, García J, Capó M. 2011. Nanotoxicología ambiental: retos actuales, *Medicina Balear*; 36-46 p.

Fu G, Vary P, y Lin C. 2005. Anatase TiO₂ nanocomposites for antimicrobial coating. *J. Phys. Chem. B.*, 8889–8898 p.

García E, Gago L. 2006. Informe de vigilancia tecnológica. Tecnologías de envasado en atmosfera protectora". *Circulo de Innovación en Biotecnología*, 12-35 p.

Gobantes I, Gómez R, Choubert G. 2001. Envasado de alimentos. Aspectos técnicos del envasado al vacío y bajo atmósfera protectora. *Alimentación, equipos y tecnología*, 75-80 p.

Graciano-Verdugo AZ, Peralta E, Soto-Valdez H. 2006. Permeabilidad y Vida Útil de los Alimentos. *AlimenPack.*, 15-19p.

Gutiérrez G. 2016. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de un Extracto de Tallo de *Yucca baccata* y su Uso Potencial como Conservador en Homogenizado de Pollo. Maestría, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.

Gutiérrez L, Escudero A, Batlle R, Nerín C. 2009. Effect of mixed antimicrobial agents and flavors in active packaging films. *J. Agric. Food Chem*, 57:8564-8571.

Han J. 2005. *Innovations in food packaging*. El servier Academic Press. London, UK. 517 p.

Han J. 2000. 'Antimicrobial food packaging'. *Food Technol*, 54:56-65.

Han J, Rooney M, 2002. Personal communications. Active Food Packaging Workshop, Annual Conference of the Canadian Institute of Food Science and Technology (CIFST), May 26, 2002.

Hewitt, C., Bellara, S., Andreani, A., Nebe-von-Caron, G., Mcfarlane, C. 2001 An evaluation of the antibacterial action of ceramic powder slurries using multiparameter flow cytometry. *Biotechnol Lett*. 23:667–675 p.

Hui YH, Guerrero LI, Rosmini RM. 2006. Ciencia y Tecnología de la Carne. The economic development of nanotechnology – An indicator based analysis, European Commission, Unit "Nano S&T - Convergent Science and Technologies, Alemania.

Ismaiel A, Pierson M. 1990. Inhibitory of growth and germination of *C. Botulinum* 33A, 40B Y 1623E by essential oil of apices. *J. Food Sci*. 55(6):1676.

Jay JM, Loessner MJ, Goleen DA. 2005. *Modern Food Microbiology* 7th ed. Springer Science and Business Media, USA.

Jie-Lun H., Shao-Ping N., Dan-Fei H., Chang L., Ming-Yong X., Yin W. 2012. Antimicrobial activity of saponin-rich fraction from *Camellia oleifera* cake and its effect on cell viability of mouse macrophage Raw 264.7. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Vol. 92. 2442-2449.

Jokan M, Rahamn RA, Ibrahim NA, Abdulah LC y Tan CP. 2009. *Melt Production and antimicrobial efficiency of Low-Density Polyethylene (LDPE)-Silver Nanocomposite Film*. *Food Bioprocess Technol*. 10(1):329-338.

Keeton J, Melton C. 1978. Factors associated with microbial growth in ground beef extended with varying levels of textured soy protein. *Journal of Food Science*. 43(4):1125–1129.

López L, Braña D, Hernández I. 2013. Estimación de la Vida de Anaquel de la Carne. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Libro Técnico No. 11

López-Malo A. 2000. La preservación multiobjetivo de Alimentos: Efecto de Factores Tradicionales y Emergentes en la Respuesta de *Aspergillus flavius*. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires. 20p.

Luckwu R. 2013. Materiales plásticos utilizados. Envases plásticos alimentarios. Química y tecnología de macromoléculas. Escuela de ingenierías industriales. Disponible en: <http://www.eis.uva.es/~macromol/curso13-14/envases/plasticos.html> (Fecha de acceso: 05 de Diciembre de 2016).

Makhluf S, Dror R, Nitzan Y, Abramovich Y, Jelinek R, Gedanken A. 2005. Microwave-assisted synthesis of nanocrystalline MgO and its use as Bactericide. *Adv Funct Mater.* 15:1708–1715.

Mancini R, Hunt M. 2005. Current research in meat color. *Meat Science* 71:100-121.

Manzanarez-López F, Soto-Valdez H, Auras F, Peralta E. 2011. Release of α -Tocopherol from Poly(lactic acid) films, and its effect on the oxidative stability of soybean oil. *Journal of Food Engineering*, doi:10.1016/j.jfoodeng.2010.12.029

Marth E. 1998. Extended shelf life refrigerated foods: Microbiological quality and safety. *Food Technology.* 52(2):57-62.

Maynard A, Warheit M. 2011. The New Toxicology of Sophisticated Materials: Nanotoxicology and Beyond, *Toxicological Sciences*; 109–129 p.

Melton S, Black J, Davis G, Backus W. 1982. Flavor and Selected Chemical Components of Ground Beef from Steers Backgrounded on Pasture and Fed Corn up to 140 Days. *Journal of Food Science.* 47(3):699–704.

Nel A, Xia T, Mañdler L, Li N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science.* 311:622–627.

Norma oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa.

Norma oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y Dilución de la Muestra de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

Okouchi S, Murata R, Sugita H, Moriyoshi Y, Maeda N. 1995. Calorimetric evaluation of the antimicrobial activities of calcined dolomite. *J Antibact Antifungal Agents*. 26:109–114.

OMS y FAO. 2011. Informe Reunión conjunta FAO/OMS de expertos acerca de la aplicación de la nanotecnología en los sectores alimentario y agropecuario: posibles consecuencias para la inocuidad de los alimentos. Roma

Pasachoa J. 2010. Comportamiento de Carne Bovina Madura Empacada en Condiciones de Atmosfera Modificada Procedente de Ganado de Dos Edades. UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE BOGOTÁ.

Pereo D. 2015. Actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata* e identificación de sus fracciones con saponinas. Maestría, Centro de Investigación en Alimentación y desarrollo A. C.

Quihui-Cota L, León-Trujillo R, Astiazarán-García H, Esparza-Romero J, Robles M, Robles-Zepeda R, Canett R, Sánchez-Escalante J. 2014. Marked Antigiardial Activity of *Yucca baccata* Extracts: A Potential Natural Alternative for Treating Protozoan Infections. Hindawi Publishing Corporation. BioMed Research International. Volume 2014, Article ID 823492, 6 p.

Quino I. 2013. Los usos del polietileno de baja densidad ¿sabías que, entre otros, sirve para fabricar bolsas de supermercado, frascos de champu o juguetes?. Disponible en: <http://www.promexico.gob.mx> (Fecha de acceso: 14 de Diciembre de 2016).

Restrepo A, Montoya G. 2010. Implementación y Diseño de Procedimiento para Determinación de vida Útil de Quesos Frescos, Chorizos frescos y Aguas en Bolsa”. Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Tecnologías-Escuela de Química, Tecnología Química. 11-13 p.

Restrepo B, Aguilar M, Melby P, Teale J. 2001. Analysis of the peripheral immune response in patients with neurocysticercosis: evidence for T cell reactivity to parasite glycoprotein and vesicular fluid antigens. *65:366-370*.

Risch S. 2009 Food Packaging History and Innovations. *J. Agric. Food Chem.* 57:8089-8092.

Roberts D, Greenwood M. 2003. *Practical Food Microbiology*. 3rd ed. U.K. Referencias adicionales sobre esporulados 87p.

Rodriguez A, Neriñ C, Batlle R. 2008 New cinnamon-based active paper packaging against *Rhizopus stolonifer* food spoilage. *J. Agric. Food Chem.* 56:6364–6369.

Rokka M, Eerola S, Smolander M, Alakomi HL, Ahvenainen R. 2004. Monitoring of the quality of modified atmosphere packaged broiler chicken cuts stored in different temperature conditions. Biogenic amines as quality-indicating metabolites. *Food Control*, 15:601-607.

Sun Lee D, Yam K, Piergiovanni L. 2008. *Food Packaging Science and technology*. CRC Press. Boca Ratan, EE. UU. 650.

Sperber W, Doyle M. 2009. *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*. Food Microbiology and Food Safety. Springer 3:4.

Suppakul P, Miltz J, Sonneveld K, Bigger SW. 2003. Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *Journal of Food Science: Concise Reviews and Hypotheses in Food Science*, 68(2):408-420.

Vásquez S, Suárez H, Montoya O. 2009. Evaluación de bacteriocinas como medio protector para la biopreservación de la carne de baja refrigeración. *Rev Chil Nutr.* Vol. 36. N°3 5p.

Tang Z, Fang X, Zhang Z, Zhou T, Zhang X, Shi L. 2012. Nano MgO as antibacterial agent: Preparation and characteristics. *Brazilian Journal of Chemical Engineering.* 29:775-781.

Tapp W, Yancey J, Apple J. 2011. How is the instrumental color of meat measured? *Meat Sci*, 89:1-5.

Tony J, Yiping H. 2011. Antibacterial activities of magnesium oxide (MgO) nanoparticles against foodborne pathogens. *J Nanopart Res.* 13:6877–6885.

Wani A, Shah M. 2012. A unique and profound effect of MgO and ZnO nanoparticles on some plant pathogenic fungi. *Journal of Applied Pharmaceutical Science,* 2:40-44.

Wilczynski M. 2000. Anti-microbial porcelain enamels. *Ceram Eng Sci Proc.* 21:81–83.

Zhen-Xing T, Bin-Feng L. 2014. MgO nanoparticles as antibacterial agent: preparation and activity. *Brazilian Journal of Chemical Engineering.* Vol. 31. 3:591-601.

ANEXOS

Anexo 1. Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994

Norma oficial mexicana nom-110-ssa1-1994, bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

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

Jose Meljem Moctezuma, Director General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, por acuerdo del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 38 fracción II, 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 8o. fracción IV y 13 fracción I del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud.

PREFACIO

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

SECRETARIA DE SALUD

Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios

Laboratorio Nacional de Salud Pública

SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y PESCA

Instituto Nacional de la Pesca

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

INDUSTRIAS VINICOLAS PEDRO DOMECH, S.A. DE C.V.

JUGOS DEL VALLE, S.A. DE C.V.

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

SIGMA ALIMENTOS, S.A. DE C.V.

SOCIEDAD MEXICANA DE NORMALIZACION Y CERTIFICACION, S.C.

NORMEX

INDICE

0. INTRODUCCION
1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION
2. FUNDAMENTO
3. REFERENCIAS
4. DEFINICIONES
5. SIMBOLOS Y ABREVIATURAS
6. REACTIVOS Y MATERIALES
7. APARATOS E INSTRUMENTOS
8. PROCEDIMIENTO
9. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES
10. BIBLIOGRAFIA
11. OBSERVANCIA DE LA NORMA
12. VIGENCIA

0. Introducción

Esta norma está orientada a proporcionar las guías generales para la preparación de diluciones para el examen microbiológico de alimentos. En vista de la gran cantidad de productos en este campo de aplicación, estas guías pueden ser inapropiadas para todos ellos en forma detallada y para otros requerirse otros métodos diferentes. Sin embargo, en todos los casos donde sea posible se recomienda apegarse a estas guías y modificarse únicamente cuando sea necesario.

La dilución primaria tiene por objeto obtener una distribución lo más uniforme posible de los microorganismos contenidos en la muestra destinada para el análisis.

La preparación de diluciones decimales adicionales, si son necesarias, tiene como objetivo reducir el número de microorganismos por unidad de volumen, para permitir, después de la incubación, la observación de la prueba en el caso de tubos o matraces y la cuenta de colonias en el caso de placas.

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece el procedimiento para la preparación de diluciones para el análisis microbiológico de productos alimenticios.

1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el territorio nacional para las personas físicas o morales que se dedican a efectuar este método en alimentos nacionales o de importación, para fines oficiales.

2. Fundamento

Se basa en la preparación de diluciones primarias, para obtener una distribución lo más uniforme posible de los microorganismos presentes en la porción de muestra.

3. Referencias

Esta norma se complementa con lo siguiente:

NOM-109-SSA1-1994 Procedimientos para la toma, Manejo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.*

4. Definiciones

Para fines de esta norma se entiende por:

4.1 Dilución primaria, es la solución, suspensión o emulsión obtenida después de pesar o medir una cantidad del producto bajo examen y mezclarla con una cantidad de nueve veces en proporción de diluyente.

4.2 Diluciones decimales adicionales, las suspensiones o soluciones obtenidas al mezclar un determinado volumen de la dilución primaria con un volumen de nueve veces un diluyente y que por repetición de esta operación con cada dilución así preparada, se obtiene la serie de diluciones decimales adecuadas para la inoculación de medios de cultivo.

5. Símbolos y abreviaturas

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

cm centímetro

mm milímetro

g gramos

ml mililitro

l litro

pH potencial de hidrógeno

N normal

°C grado Celsius

% por ciento

h hora

6. Reactivos y materiales

6.1 Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico. Cuando se indique agua debe entenderse como agua destilada.

6.1.1 Preparación de reactivos

6.1.1.1 Solución de hidróxido de sodio 1,0 N

FORMULA

INGREDIENTES CANTIDADES

Hidróxido de sodio 4,0 g

Agua 100,0 ml

Preparación:

Disolver el hidróxido de sodio y llevar a 100 ml con agua.

6.1.1.2 Soluciones diluyentes

6.1.1.2.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada).

FORMULA

INGREDIENTES CANTIDADES

Fosfato de sodio monobásico 34,0 g

Agua 1,0 l

Preparación:

Disolver el fosfato en 500 ml de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1,0 N.

Llevar a un litro con agua.

Esterilizar durante 15 minutos a $121^{\circ} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.

Conservar en refrigeración (solución concentrada).

Tomar 1,25 ml de la solución concentrada y llevar a un litro con agua (solución de trabajo).

Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera.

Esterilizar a $121^{\circ} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos.

Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deberán ser iguales a los iniciales.

6.1.1.2.2 Agua peptonada

FORMULA

INGREDIENTES CANTIDADES

Peptona 1,0 g

Cloruro de sodio 8,5 g

Agua 1,0 l

Preparación:

Disolver los componentes en un litro de agua.

Ajustar el pH a $7 \pm 0,1$ con hidróxido de sodio 1,0 N.

Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml o en cualquier volumen múltiplo de nueve según se requiera.

Esterilizar a $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos.

Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deberán ser iguales a los iniciales.

Si este diluyente no es usado inmediatamente, almacenar en lugar oscuro a una temperatura entre 0 a 5°C por un tiempo no mayor de un mes, en condiciones tales que no alteren su volumen o composición.

6.2 Materiales

Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 ml (o si es necesario de 1 ml y 2 ml), con tapón de algodón. Las pipetas pueden ser graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.

Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.

Tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca.

Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.

Todo el material e instrumentos que tengan contacto con las muestras bajo estudio deberán esterilizarse mediante:

Horno, durante 2 h a 170 a 175°C o 1 h a 180°C o

Autoclave, durante 15 minutos como mínimo a $121 \pm 1,0^\circ\text{C}$.

El material de vidrio puede sustituirse por material desechable que cumpla con las especificaciones deseadas. No debe usarse material de vidrio dañado por esterilización repetida y éste debe ser químicamente inerte.

7. Aparatos e instrumentos

Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170°C.

Autoclave con termómetro y manómetro, calibrada con termómetro de máximas y mínimas.

Baño de agua con control de temperatura y circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de 0,1°C y que mantenga la temperatura a $45 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Licuada de una o dos velocidades controladas por un reóstato o bien un homogeneizador peristáltico (Stomacher).

Vasos para licuadora con tapa esterilizables o bolsas estériles para homogeneizador peristáltico.

Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g.

8. Procedimiento

8.1 Preparación de la dilución primaria.

8.1.1 A partir de muestras líquidas:

Para muestras líquidas no viscosas (agua, leche, refrescos, etc.) en las cuales la distribución de microorganismos es homogénea o fácilmente homogeneizable por medios mecánicos (agitación, etc.).

Para muestras congeladas de un alimento originalmente líquido o licuable, fundir por completo en baño de agua de 40 a 45°C un tiempo máximo de 15 minutos y homogeneizar agitando vigorosamente.

Para la parte líquida de una muestra heterogénea la cual sea considerada suficientemente representativa de la muestra total (por ejemplo la fase acuosa de grasas animales y vegetales).

8.1.1.1 Agitar la muestra manualmente con 25 movimientos de arriba a abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo de 7 segundos. Tomar 1 ml de la muestra y diluir con 9 ml del diluyente el cual debe encontrarse a una temperatura similar a ésta, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente.

8.1.1.2 Siempre que la cantidad de muestra lo permita, tomar alícuotas mayores, por ejemplo volúmenes de 10 u 11 ml, diluidos con 90 o 99 ml, de la misma forma que se describió anteriormente

8.1.2 A partir de muestras sólidas o semisólidas.

Las muestras sólidas y semisólidas congeladas, deben descongelarse en refrigeración de 4 a 8°C durante 18 horas y no más de 24 horas antes de proceder a su análisis.

8.1.2.1 Pesar una cantidad de 10 u 11 g de la muestra por analizar en un recipiente o bolsa plástica estériles de tamaño adecuado.

8.1.2.2 Adicionar un volumen de 90 a 99 ml del diluyente llevado a una temperatura similar a la de la muestra.

8.1.2.3 Operar la licuadora o el homogeneizador peristáltico de 1 a 2 minutos hasta obtener una suspensión completa y homogénea según se indique en la técnica correspondiente para cada alimento. Aún en los equipos más lentos, este tiempo no debe exceder de 2,5 minutos.

8.1.2.4 Permitir que las partículas grandes se sedimenten, y transferir la cantidad deseada tomando de las capas superiores de la suspensión.

Cuando la dilución primaria es muy viscosa o pegajosa, adicionar más diluyente, lo cual debe tomarse en cuenta para las operaciones subsecuentes o expresión de resultados.

El homogeneizador peristáltico (Stomacher) puede no ser adecuado para algunos productos (por ejemplo, aquellos con partículas agudas o constituyentes que no se dispersen fácilmente). Debe ser utilizado sólo cuando exista evidencia (publicada o por ensayos comparativos) de que los resultados obtenidos no difieren significativamente con aquellos obtenidos con licuadora.

8.2 Preparación de las diluciones decimales adicionales.

8.2.1 Transferir 1 ml o un múltiplo, por ejemplo, 10 u 11 ml de la dilución primaria 1 + 9 (10-1), en otro recipiente conteniendo nueve veces el volumen del diluyente estéril a la temperatura apropiada, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente.

8.2.2 Mezclar cuidadosamente cada botella de diluyente siempre de la misma manera que se describe en 8.1.1.1.

8.2.3 La selección de las diluciones que se vayan a preparar y de aquellas que se van a inocular, dependen del número esperado de microorganismos en la muestra, con base a los resultados de análisis previos y de la información que se obtenga del personal de inspección que la haya colectado. En ausencia total de información, trabajar con las diluciones de la primera a la sexta.

8.2.4 Utilizar pipetas diferentes para cada dilución inoculando simultáneamente las cajas que se hayan seleccionado. El volumen que se transfiera nunca debe ser menor al 10% de la capacidad total de la pipeta.

8.2.5 Si la pipeta es terminal y se transfiere un volumen de líquido equivalente a su capacidad total, escurrir aplicando la punta de la pipeta una sola vez en una área de la caja Petri sin líquido.

8.2.6 Mientras se afora el líquido de la pipeta, la punta de ésta debe apoyarse en el interior del cuello del frasco y mantenerla en posición vertical, para lo cual este último debe inclinarse lo necesario.

En estudios donde se busca la presencia o ausencia de una determinada especie de microorganismos en 0,1 ml o 0,1 g, no es necesario preparar diluciones mayores.

El criterio para seleccionar las diluciones a preparar de acuerdo con el número de microorganismos esperado es:

Para la técnica del número más probable utilizar tres tubos: donde sea posible demostrar el microorganismo en 10 ml de la dilución más alta.

Para la técnica de cuenta en placa, considerar aquellas en las que se puedan contar de 25 a 250 colonias en un mínimo de una de tres diluciones en el método de cuenta de bacterias aerobias en placa. En el caso de otros grupos microbianos, considerar el número especificado de colonias en la Norma Oficial Mexicana correspondiente.

8.3 Duración del procedimiento.

En general, las diluciones de la muestra deben ser preparadas inmediatamente antes del análisis y éstas deben ser usadas para inocular el medio de cultivo dentro de los 20 minutos posteriores a su preparación.

9. Concordancia con normas internacionales

Esta norma es técnicamente equivalente a la Norma ISO 6887-1983 (E) Microbiology General guidance for the preparation of dilutions for microbiological examination. International Organization for Standardization.

10. Bibliografía

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

10.2 Secretaría de Salud. 1984. Ley General de Salud. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.

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

10.4 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. NOM-008-SCFI-1993. Norma Oficial Mexicana. Sistema General de Unidades de Medida.

10.5 Norma ISO 6887-1983 (E). Microbiology General guidance for the preparation of dilutions for microbiological examination. International Organization for Standardization.

10.6 NORMA-Z-013/02. 1981. Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas. (Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.)

10.7 Bacteriological Analytical Manual. 1984. Food and Drugs Administration FDA. Bureau of Foods. Division of Microbiology. 6a. Ed. Washington, D.C.

10.8 Vanderzant F., Carland S., y Don F. 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association. Washington, D.C.

11. Observancia de la norma

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

12. Vigencia

La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor con su carácter de obligatorio a los 30 días siguientes a partir de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 10 de mayo de 1995.- El Director General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, José Meljem Moctezuma.- Rúbrica.

Anexo 2. Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-092-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA.

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

JOSE MELJEM MOCTEZUMA, Director General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, por acuerdo del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 38, fracción II, 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 194 fracción I de la Ley General de Salud; 2o. fracción III, 34, 37, 40 y demás aplicables del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios; 8o. fracción IV y 13 fracción I del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud.

En la elaboración de la presente Norma participaron los siguientes organismos e instituciones:

SECRETARIA DE SALUD

Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios
Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica. INDRE
Laboratorio Nacional de Salud Pública

SECRETARIA DE PESCA (AHORA: SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y PESCA)

Instituto Nacional de la Pesca

INDUSTRIAS VINICOLAS PEDRO DOMECCQ, S.A. DE C.V.

JUGOS DEL VALLE, S.A. DE C.V.

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

SIGMA ALIMENTOS, S.A. DE C.V.

SOCIEDAD MEXICANA DE NORMALIZACION Y CERTIFICACION, S.C.

NORMEX

INDICE

0					INTRODUCCION
1	OBJETIVO	Y	CAMPO	DE	APLICACION
2					FUNDAMENTO
3					REFERENCIAS
4					DEFINICIONES
5	SIMBOLOS		Y		ABREVIATURAS
6	REACTIVOS		Y		MATERIALES
7	APARATOS		E		INSTRUMENTOS
8	PREPARACION		DE	LA	MUESTRA
9					PROCEDIMIENTO

10	EXPRESION	DE	RESULTADOS
11	INFORME	DE	LA PRUEBA
12	CONCORDANCIA	CON	NORMAS INTERNACIONALES
13			BIBLIOGRAFIA
14	OBSERVANCIA	DE	LA NORMA
15	VIGENCIA		

0. Introducción

Cuando se requiere investigar el contenido de microorganismos viables en un alimento, la técnica comúnmente utilizada es la cuenta en placa.

En realidad esta técnica no pretende poner en evidencia todos los microorganismos presentes. La variedad de especies y tipos diferenciables por sus necesidades nutricionales, temperatura requerida para su crecimiento, oxígeno disponible, etc., hacen que el número de colonias contadas constituyan una estimación de la cifra realmente presente y la misma refleja si el manejo sanitario del producto ha sido el adecuado.

Por otra parte el recuento de termofílicos, psicofílicos y psicotróficos es importante para predecir la estabilidad del producto bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

Para obtener resultados reproducibles y por lo tanto significativos, es de suma importancia seguir fielmente y controlar cuidadosamente las condiciones.

Esta técnica puede aplicarse para la estimación de microorganismos viables en una amplia variedad de alimentos.

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece el método para estimar la cantidad de microorganismos viables presentes en un alimento, agua potable y agua purificada, por la cuenta de colonias en un medio sólido, incubado aeróbicamente.

1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el Territorio Nacional para las personas físicas o morales que requieran efectuar este método en productos nacionales y de importación, para fines oficiales.

2. Fundamento

El fundamento de la técnica consiste en contar las colonias, que se desarrollan en el medio de elección después de un cierto tiempo y temperatura de incubación, presuponiendo que cada colonia proviene de un microorganismo de la muestra bajo estudio. El método admite numerosas fuentes de variación, algunas de ellas controlables, pero sujetas a la influencia de varios factores.

3. Referencias

Esta Norma se complementa con lo siguiente:

NOM-109-SSA1-1994 Procedimiento para la Toma, Manejo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.*

NOM-110-SSA1-1994 Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

4. Definición

Para fines de esta norma se entiende por:

Unidades Formadoras de Colonias (UFC), término que debe utilizarse para reportar la cuenta de colonias en placa, las cuales pueden surgir de una célula o de un cúmulo de células.

5. Símbolos y abreviaturas

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

g gramo

l litro

ml mililitro

°C grado Celsius

pH potencial de hidrógeno

% por ciento

UFC unidades formadoras de colonias

h hora

6. Reactivos y materiales

6.1 Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan, deben ser grado analítico.

Cuando se indique agua, debe entenderse agua destilada, con pH cercano a la neutralidad.

Medio de Cultivo.

Agar Triptona-Extracto de Levadura (agar para cuenta estándar).

FORMULA

INGREDIENTES CANTIDADES

Extracto de levadura 2,5 g

Triptona 5,0 g

Dextrosa 1,0 g

Agar 15,0 g

Agua 1,0 l

Preparación del medio de cultivo.

Suspender los componentes del medio deshidratado en un litro de agua. Hervir hasta total disolución.

Distribuir en recipientes de vidrio esterilizables de capacidad no mayor de 500 ml, cantidades de aproximadamente la mitad del volumen del mismo. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1,0$ °C, durante 15 minutos. El pH final del medio debe ser $7,0 \pm 0,2$ a 25°C.

Si el medio de cultivo es utilizado inmediatamente, enfriar a $45^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ °C en baño de agua y mantenerlo a esta temperatura hasta antes de su uso. El medio no debe de fundirse más de una vez.

En caso de medios deshidratados seguir las instrucciones del fabricante.

El medio de cultivo anterior es el de uso más generalizado. Para algunos alimentos en particular se requerirá de un medio de cultivo especial que se debe indicar al describir la técnica para ese alimento.

6.2 Materiales

Todo el material que tenga contacto con las muestras o los microorganismos debe estar estéril.

Se requiere, los materiales mencionados en la NOM-110-SSA1-1994, Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

7. Aparatos e instrumentos

Se requiere, además de los mencionados en la NOM-110-SSA1-1994, Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico, los siguientes:

Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 1,0^{\circ}\text{C}$, provista con termómetro calibrado.

Contador de colonias de campo obscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadrículada y lente amplificador.

Registrador mecánico o electrónico.

Microscopio óptico.

Baño de agua con o sin circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de hasta $1,0$ °C y que mantenga la temperatura a $45 \pm 1,0$ °C.

8. Preparación de la muestra

Para la preparación de la muestra seguir la NOM-110-SSA1-1994, Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

9. Procedimiento

9.1 Distribuir las cajas estériles en la mesa de trabajo de manera que la inoculación; la adición de medio de cultivo y homogenización, se puedan realizar cómoda y libremente. Marcar las cajas en sus tapas con los datos pertinentes previamente a su inoculación y correr por duplicado.

9.2 Después de inocular las diluciones de las muestras preparadas según la NOM-110-SSA1-1994, Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico, en las cajas Petri, agregar de 12 a 15 ml del medio preparado, mezclarlo mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio; cuidar que el medio no moje la cubierta de las cajas. Dejar solidificar.

9.3 Incluir una caja sin inóculo por cada lote de medio y diluyente preparado como testigo de esterilidad.

9.4 El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorpora al diluyente hasta que finalmente se adiciona el medio de cultivo a las cajas, no debe exceder de 20 minutos.

9.5 Incubar las cajas en posición invertida (la tapa hacia abajo) por el tiempo y la temperatura que se requieran, según el tipo de alimento y microorganismo de que se trate, véase el cuadro 1.

CUADRO 1

Grupo Bacteriano Temperatura Tiempo de Incubación

Termofílicos aerobios $55 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 48 ± 2 h

Mesofílicos aerobios* $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 48 ± 2 h

Psicrotróficos $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 3 - 5 días

Psicrofílicos $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 7 - 10 días

9.6 En la lectura seleccionar aquellas placas donde aparezcan entre 25 a 250 UFC, para disminuir el error en la cuenta.

9.7 Contar todas las colonias desarrolladas en las placas seleccionadas (excepto las de mohos y levaduras), incluyendo las colonias puntiformes. Hacer uso del microscopio para resolver los casos en los que no se pueden distinguir las colonias de las pequeñas partículas de alimento.

10. Expresión de resultados

10.1 Cálculo del método.

10.1.1 Después de la incubación, contar las placas que se encuentren en el intervalo de 25 a 250 colonias, usando el contador de colonias y el registrador. Las placas de al menos una de tres diluciones deben estar en el intervalo de 25 a 250. Cuando sólo una dilución está en el intervalo apropiado, véase el cuadro 2, ejemplo 1. Calcular la cuenta promedio por gramo o mililitro de dicha dilución y reportar.

10.1.2 Cuando dos diluciones están en el intervalo apropiado, determinar la cuenta promedio dada por cada dilución antes de promediar la cuenta de las dos diluciones para obtener la cuenta en placa por gramo o mililitro, véase el cuadro 2, ejemplo 2.

10.1.3 Con el fin de uniformar los criterios para el reporte de las cuentas en ensayos donde las placas presenten situaciones no contempladas en los ejemplos anteriores, se presentan las siguientes guías:

10.1.3.1 Placas con menos de 25 colonias.- Cuando las placas corridas para la menor dilución muestran cuentas de menos de 25 colonias, contar el número de colonias presentes en dicha dilución, promediar el número de colonias y multiplicar por el factor de dilución para obtener el valor estimado de cuenta en placa. Aclarar en su informe esta situación agregando la leyenda "valor estimado", véase el cuadro 2, ejemplo 3.

10.1.3.2 Placas con más de 250 colonias.- Cuando el número de colonias por placa exceda de 250, contar las colonias en aquellas porciones de la placa que sean representativas de la

distribución de colonias. Contar por ejemplo, una cuarta parte o una mitad del área de la caja y multiplicar el valor obtenido por 4 ó 2, respectivamente. Si solamente pueden contarse algunos cuadros, considerar que el fondo de una caja Petri de 100 mm de diámetro contiene 65 cuadros de la cuadrícula del contador. Aclarar en el informe esta situación agregando la leyenda "valor estimado", véase el cuadro 2, ejemplo 4.

10.1.3.3 Colonias extendidas.- Las colonias extendidas pueden presentarse en las siguientes formas:

10.1.3.3.1 Cadenas de colonias no separadas claramente entre sí, que parecen ser causadas por la desintegración de un cúmulo de bacterias.

10.1.3.3.2 Colonias que se desarrollan en película entre el agar y el fondo de la caja.

10.1.3.3.3 Colonias que se desarrollan en película en la orilla de la caja sobre la superficie del agar.

10.1.3.3.4 Colonias de crecimiento extendido y en algunas ocasiones acompañadas de inhibición del crecimiento, que en conjunto exceden el 50% de la caja o represión del crecimiento que por sí mismo excede el 25% de la superficie de la caja.

10.1.3.3.5 Cuando es necesario contar en cajas que contienen colonias extendidas que no están incluidas en 10.1.3.3.4, contar cualquiera de los tipos 10.1.3.3.1, 10.1.3.3.2 ó 10.1.3.3.3, como provenientes de una sola fuente. En el caso de las colonias del tipo 10.1.3.3.1, si la caja contiene una sola cadena, contar como una sola colonia, si la caja contiene varias cadenas que parecen originarse de fuentes separadas, contar cada cadena como colonia individual. No contar cada colonia de la cadena individualmente. Las colonias del tipo 10.1.3.3.2 y 10.1.3.3.3 generalmente se observan cómo crecimiento diferenciable de otras colonias y se cuentan como tales. Los crecimientos tipo 10.1.3.3.4, reportarlos como crecimiento extendido. En caso de que una dilución se encuentre dentro del rango y otra dilución presente colonias de crecimiento extendido, reportar la dilución en la que se pueden contar las colonias, véase el cuadro 2, ejemplo 5

10.1.4 Placas sin colonias.- Cuando las placas de todas las diluciones no muestran colonias, reportar la cuenta en placa como menor que una vez el valor de la dilución más baja usada, véase el cuadro 2, ejemplo 6.

10.1.5 Placas corridas por duplicado, una con crecimiento dentro del intervalo adecuado y otra con más de 250 colonias.- Cuando una placa tiene entre 25 y 250 colonias y su duplicado más de 250 colonias, contar ambas placas incluyendo la que está fuera del intervalo para determinar la cuenta en placa, véase el cuadro 2, ejemplo 7.

10.1.6 Placas corridas por duplicado, una placa de cada dilución dentro del intervalo de 25 a 250 colonias.- Cuando una placa dentro de diferentes diluciones contiene el número de colonias especificadas en el intervalo, contar el número de colonias de las cuatro placas para calcular la cuenta en placa, véase el cuadro 2, ejemplo 8.

10.1.7 Placas corridas por duplicado, ambas placas de una dilución dentro del intervalo de 25 a 250 y sólo una de la otra dilución dentro del mismo. Contar las cuatro cajas incluyendo aquella con menos de 25 o más de 250 colonias, para calcular la cuenta en placa, véase el cuadro 2, ejemplo 9.

10.1.8 Después de contabilizar las colonias en las placas seleccionadas, multiplicar por la inversa de la dilución para obtener el número de UFC por mililitro o gramo de la muestra. Redondear la cifra obtenida en la cuenta de manera que sólo aparezcan dos dígitos significativos al inicio de esta cifra. Para redondear, elevar el segundo dígito al número inmediato superior cuando el tercer dígito de la derecha sea cinco o mayor (por ejemplo: 128 redondear a 130). Si el tercer dígito es cuatro o menos, reemplazar el tercer dígito con cero y el segundo dígito mantenerlo igual (Por ejemplo: 2417 a 2400):

11. Informe de la prueba

Reportar como: Unidades formadoras de colonias, ___ UFC/g o ml, de bacterias aerobias en placa en agar triptona extracto de levadura o agar para cuenta estándar, incubadas _____ horas a _____ °C.

CUADRO 2

Cálculo de los valores de la cuenta en placa

(Ensayos por duplicado)

Ejemplo Colonias contadas UFC/g o ml

número 1: 100 1: 1000 1: 10000

1 > 250a 178 16 180000

> 250 190 17

2 > 250 220 25 250000

238 28

3 18 2 0 1600b

14 0 0

4 > 250 > 250 512 5000000b

> 250 > 250 495

5 > 250 240 34 290000

> 250 235 crecimiento

extendido

6 0 0 0 < 100c

7 > 250 240 24 250000

> 250 268 19

8 > 250 216 23 280000

> 250 262 42

9 > 250 215 20 230000

> 250 235 26

> 250 275 32 270000

> 250 225 26

12. Concordancia con normas internacionales

Esta Norma no tiene concordancia con normas internacionales.

13. Bibliografía

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

13.2 Secretaría de Salud. 1984. Ley General de Salud. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.

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

13.4 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. NOM-008-SCFI-1993. Norma Oficial Mexicana. Sistema General de Unidades de Medida.

13.5 Bacteriological Analytical Manual. 1984. Food and Drugs Administration FDA. Bureau of Foods. Division of Microbiology. 6a Ed. Washington D.C.

13.6 NORMA-Z-013/02. 1981. Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.

13.7 Tomaszewicz, D. M., et al. 1980. The most suitable number of colonies on plate for counting. Journal of Food Protection. 43: 4.

13.8 Vanderzant F., Carland S., y Don F. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association. Washington, D.C. 1992.

14. Observancia de la norma

La vigilancia del cumplimiento de la presente Norma corresponde a la Secretaría de Salud.

15. Vigencia

La presente Norma Oficial Mexicana, entrará en vigor con carácter de obligatorio a los 30 días siguientes a partir de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 10 de noviembre de 1995.- El Director General, José Meljem Moctezuma.-
Rúbrica.

Anexo 3. Cálculos para modificar los mL gastados de NaOH a mEq

$$mEq = \frac{mg}{Peso\ atómico} \times valencia$$

Lo primero que se realizó fue el cálculo para conocer cuántos mg de OH⁻ tenemos en el 1.35 mL de NaOH 0.086N.

$$1 \text{ mol de NaOH } 40g \left[\begin{array}{l} 23 \text{ g de Na} \\ 16 \text{ g de O} \\ 1 \text{ g de H} \end{array} \right] \quad 17 \text{ g de OH}^- \quad \begin{array}{l} 100\% \text{ ----- } 40 \text{ g NaOH} \\ X \text{ ----- } 17\text{g OH}^- \\ \underline{X = 42.5 \% \text{ es de OH}^-} \end{array}$$

$$1 \text{ mol ----- } 40g \text{ ----- } 1000 \text{ mL} \quad \underline{X = 3.4 \text{ g en } 1000 \text{ mL}}$$

$$0.086 \text{ ----- } X$$

$$3.4 \text{ g ----- } 1000 \text{ mL} \quad \underline{X = 0.00459 \text{ g de NaOH en } 1.35 \text{ mL}}$$

$$X \text{ ----- } 1.35$$

$$0.00459 \text{ g ----- } 100 \% \quad \underline{X = 0.00195075 \text{ g de OH}^- \text{ en } 1.35 \text{ mL}}$$

$$X \text{ ----- } 42.5 \%$$

$$0.00195075 \text{ g ----- } \underline{1.95075 \text{ mg de OH}^- \text{ en } 1.5}$$

Después de conocer los miligramos que teníamos se utilizó la fórmula antes mencionada para conocer los miliequivalentes OH⁻

$$mEq = \frac{mg}{Peso\ atómico} \times valencia$$

$$mEq = \frac{1.95075}{17} \times 1$$

$mEq = 0.11475$ por 1 g de muestra