



**Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A. C.**

**DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN
RECUBRIMIENTO PARA CARNE DE BOVINO A BASE
DE QUITOSANO Y PROPÓLEOS CON PROPIEDADES
ANTIOXIDANTES Y ANTIMICROBIANAS**

Por:

Edwin Alfredo Avila Espinosa

TESIS APROBADA POR LA


COORDINACION DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Edwin Alfredo Avila Espinosa, le han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dr. Gastón R. Torrescano Urrutia
Director de Tesis



Dra. Armida Sánchez Escalante
Asesor



Dra. Hisila del Carmen Santacruz Ortega
Asesor



Dr. Jaime Lizardi Mendoza
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se de crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al **CONACYT** por la beca otorgada para la realización de mis estudios para obtener el grado de Maestro en Ciencias.

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.**, por la formación profesional a través de los laboratorios e instalaciones utilizadas para mi desarrollo como estudiante profesional.

A mi Director de tesis, **Dr. Gastón R. Torrescano Urrutia** por aceptarme en su equipo de trabajo y darme la oportunidad de iniciar esta etapa de mi vida y poder alcanzar mis metas de superación personal, ya que día a día, su apoyo y confianza fueron elementos clave para llevar a cabo este trabajo; por haberme resuelto en todo momento mis dudas de la mejor forma posible y ofreciendo incondicionalmente su apoyo académico.

A la **Dra. Armida Sánchez Escalante** por su apoyo en el desarrollo de mi tesis, su asesoría en el uso de equipos y materiales de laboratorio, así como en la planta piloto de carnes; sobre todo gracias por tomar esa postura firme e inquebrantable de motivarme a seguir adelante; por aceptar en sus hombros el peso de mis inconformidades y errores, pues siendo sincero conmigo, sé que aún me falta mucho por aprender. También sé que la madre académica que he tenido en los últimos dos años durante mis estudios de maestría me ha hecho entender que en la vida no sólo debemos justificarnos de los problemas, sino también aceptarlos y enmendarlos de ipso facto; y sé que todo ello me ha hecho más independiente como persona y profesional.

Gracias al jefe de la biblioteca **Gerardo Reyna Cádiz** por su valioso apoyo en la obtención de artículos científicos, material bibliográfico y soporte documental.

A **Livier Zavala Cárdenas** por su paciencia y tiempo dedicado en el laboratorio, por su apoyo técnico durante todo el trabajo realizado y su disposición incondicional en todo momento, pues marcó una gran diferencia en las responsabilidades adquiridas en mi tesis.

A los MC **Rey David Vargas Sánchez y Margarita I. Ramírez Rojo** por compartirme parte de su experiencia en el tema de antioxidantes, sobre todo por mostrarme mis errores antes de cometerlos, ganándose mí respeto como personas y profesionales.

A mis compañeros, colegas, y hoy en día amigos, **Eduardo Montaña, Carolina Hernández y Priscilia Saavedra**, por su colaboración en mi tesis, quienes jugaron un papel muy importante en el desarrollo de este proyecto.

DEDICATORIA

A **Dios**, porque sin él no soy nada, gracias por tu amor y por las miles de bendiciones que me has dado, bendito sea tu nombre y a ti sea toda la gloria.

A mis **Padres**, quienes me vieron crecer y jamás me dejaron solo ni en las buenas ni en las malas, por enseñarme los valores necesarios para ser un hombre de bien, por darme el amor único que sólo ellos podrían ofrecerme, por estar al pendiente de mi todo el tiempo, por ser los pilares irrompibles que una persona necesita para poder apoyarse antes de caer, y porque sin ellos yo no estaría. A ellos se les otorgó el poder de darme la vida, al igual que el deber de cuidarme y ayudarme a desarrollar mis capacidades como persona productiva ante una sociedad competitiva.

A mis **Hermanos, Lucely, Ligia, Luis, Rangel, Sergio y Ruby**, quienes me aconsejaron, apoyaron y siguen haciéndolo día a día, para cumplir mis metas, haciendo de mi alguien responsable, con valores firmes y positivos.

A **Livier Zavala Cárdenas** por estar a mi lado todo este tiempo, por apoyarme cuando más lo necesité, por desvelarse nuevamente como en el pasado solía hacerlo, por animarme cuando no me sentía bien, por confiar en mí, por tenerme fe y por estar al pendiente en cada momento. Gracias por marcar mi vida y darme la oportunidad de conocerte como mi apoyo técnico, amiga y novia.

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
Oxidación en Carne Bovino	4
Industria Cárnica y sus Problemas de Contaminación Microbiana	6
Canales de Bovino, su Importancia y Problemas de Contaminación	7
Proliferación de Patógenos por mal Procesado de las Canales	9
Patógenos Presentes en la Carne de Bovino	11
Reducción de la Contaminación de la Canal	14
Agua (Caliente, Clorada o como Vapor)	15
Ácidos Orgánicos y Productos Químicos	17
Inhibición de Microorganismos en la Canal	19
Propóleos y sus Compuestos Fenólicos	21
Propiedades Antioxidantes y Antibacterianas del Propóleos	22
Desarrollo y Caracterización de Recubrimientos	23
Quitosano como Materia Prima para el Control de Patógenos	25
III. HIPOTESIS	29
OBJETIVOS	30
Objetivo General	30
Objetivos Específicos	30
IV. METODOLOGÍA	32
Desarrollo de la Etapa 1	32
Obtención de la Materia Prima	32
Obtención de los Extractos de Propóleos	33
Actividad Antioxidante de los Extractos de Propóleos	33
Inhibición del radical DPPH (%).	33
Fenoles totales	34
Poder reductor.	34
Flavonoides	35

CONTENIDO (Continuación...)

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria.....	36
Preparación del Recubrimiento con Actividad Antioxidante y Antimicrobiana .	36
Determinación de Analitos en el Recubrimiento de Quitosano	37
Absorbancia Específica del Espectro UV-Visible de las Películas.....	37
Determinación del Color en los Recubrimientos Comestibles	38
Propiedades Mecánicas de las Películas	38
Desarrollo de la Etapa 2.....	39
Determinación de Cambios Fisicoquímicos (TBARS, pH y Color).....	40
Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).	40
Determinación de pH.	40
Determinación de color en carne.	41
Análisis de Imagen de los Recubrimientos	41
Calidad Microbiológica.....	42
Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	43
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
Etapa 1.....	44
Análisis de los Recubrimientos por FTIR.....	44
Análisis de las películas de Q y Q+EP en el espectro de absorción UV-Visible	47
Análisis de Color de los Recubrimientos	49
Análisis de Color de las Películas de Q y QP	49
Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante.....	52
Capacidad Antioxidante de los Recubrimientos Comestibles por DPPH.....	55
Pruebas Mecánicas de los Recubrimientos	57
Análisis de Imagen de los Recubrimientos	60
Análisis de la Concentración Mínima Inhibitoria de los Recubrimientos	60
Etapa 2.....	71
Análisis de Color (L^* , a^* , b^* , h y C^*) en Músculos de Bovino.....	71
Evaluación de pH.....	85

CONTENIDO (Continuación...)

Oxidación de Lípidos (TBARS)	88
Mesófilos y Psicrófilos Aerobios	91
VI. CONCLUSIONES.....	99
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	101
VIII. ANEXOS.....	115

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos fenólicos de extractos de propóleos, Q y QP.....	53
Tabla 2. Propiedades mecánicas de Q y QP.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de quitina y quitosano en la naturaleza	28
Figura 2. Longitud vibracional de películas de quitosano y quitosano con propóleos por FTIR	45
Figura 3. Espectro de absorción de películas de quitosano y de quitosano con propóleos por FTIR	48
Figura 4. Color instrumental (L^* , a^* , b^* , C^* y h^*) de los recubrimientos comestibles Q y QP	50
Figura 5. Color instrumental (L^* , a^* , b^* , C^* y h^*) de las películas comestibles Q y QP	51
Figura 6. Capacidad antioxidante del extracto de propóleos y los recubrimientos Q y QP	56
Figura 7. Efecto de diferentes concentraciones extractos de propóleos sobre la cinética de desarrollo de <i>Escherichia coli</i>	62
Figura 8. Efecto de soluciones de quitosano adicionado con extractos de propóleos sobre la cinética de desarrollo de <i>Escherichia coli</i>	63
Figura 9. Efecto de diferentes concentraciones extractos de propóleos sobre la cinética de desarrollo de <i>Salmonella typhi</i>	64
Figura 10. Efecto de soluciones de quitosano adicionado con extractos de propóleos sobre la cinética de desarrollo de <i>Salmonella typhi</i>	65
Figura 11. Efecto de diferentes concentraciones extractos de propóleos sobre la cinética de desarrollo de <i>Listeria innocua</i>	66
Figura 12. Efecto de soluciones de quitosano adicionado con extractos de propóleos sobre la cinética de desarrollo de <i>Listeria innocua</i>	68
Figura 13. Efecto de diferentes concentraciones extractos de propóleos sobre la cinética de desarrollo de <i>Staphylococcus aureus</i>	79
Figura 14. Efecto de soluciones de quitosano adicionado con extractos de propóleos sobre la cinética de desarrollo de <i>Staphylococcus aureus</i>	71

INDICE DE FIGURAS (Continuación...)

Figura 15. Efecto del periodo de almacenamiento sobre el valor de L^* para <i>M. Triceps brachii</i>	72
Figura 16. Efecto del periodo de almacenamiento sobre el valor de L^* para <i>M. Semimembranosus</i>	73
Figura 17. Efecto del periodo de almacenamiento sobre el valor de a^* para <i>M. Triceps brachii</i>	75
Figura 18. Efecto del periodo de almacenamiento sobre el valor de a^* para <i>M. Semimembranosus</i>	76
Figura 19. Efecto del periodo de almacenamiento sobre el valor de b^* para <i>M. Triceps brachii</i>	78
Figura 20. Efecto del periodo de almacenamiento sobre el valor de b^* para <i>M. Semimembranosus</i>	89
Figura 21. Efecto del periodo de almacenamiento sobre el valor de C^* para <i>M. Triceps brachii</i>	81
Figura 22. Efecto del periodo de almacenamiento sobre el valor de C^* para <i>M. Semimembranosus</i>	82
Figura 23. Efecto del periodo de almacenamiento sobre el valor de h^* para <i>M. Triceps brachii</i>	83
Figura 24. Efecto del periodo de almacenamiento sobre el valor de h^* para <i>M. Semimembranosus</i>	84
Figura 25. Efecto del periodo de almacenamiento sobre el valor de pH para <i>M. Triceps brachii</i>	86
Figura 26. Efecto del periodo de almacenamiento sobre el valor de pH para <i>M. Semimembranosus</i>	87
Figura 27. Formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en <i>M. Triceps brachii</i>	99
Figura 28. Formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en <i>M. Semimembranosus</i>	90

INDICE DE FIGURAS (Continuación...)

- Figura 29.** Efecto de soluciones de quitosano adicionado con y sin extractos de propóleos a concentración de 300 µg/mL sobre el desarrollo de mesófilos aerobios aplicado en *M. Triceps brachii*92
- Figura 30.** Efecto de soluciones de quitosano adicionado con y sin extractos de propóleos a concentración de 300 µg/mL sobre el desarrollo de mesófilos aerobios aplicado en *M. Semimembranosus*93
- Figura 31.** Efecto de soluciones de quitosano adicionado con y sin extractos de propóleos a concentración de 300 µg/mL sobre el desarrollo de Psicófilos aerobios aplicado en *M. Triceps brachii*96
- Figura 32.** Efecto de soluciones de quitosano adicionado con y sin extractos de propóleos a concentración de 300 µg/mL sobre el desarrollo de Psicófilos aerobios aplicado en *M. Semimembranosus*97

RESUMEN

Durante la obtención, distribución y deshuese de la carne existe el riesgo de contaminación, pudiendo afectar su calidad. Los extractos de propóleos (EP) han mostrado ser efectivos en la conservación de la calidad de la carne. En este contexto, actualmente existe necesidad de aprovechar estos beneficios para minimizar dicho riesgo. El objetivo del presente estudio fue desarrollar y caracterizar recubrimientos comestibles (RC), a base de quitosano (Q) y con extracto de propóleos (Q+EP), mediante la evaluación por FTIR, UV, propiedades antioxidantes, antimicrobianas y mecánicas, y color. Los RC se aplicaron en dos cortes de carne de bovino, *M. semimembranosus* (S) y *M. triceps brachii* (TB), evaluándose pH, color, oxidación de lípidos (TBARS) y calidad microbiológica, durante 72 h. Los resultados mostraron que mediante FTIR se identificaron compuestos provenientes de Q en los RC, mientras que por UV se confirmó la presencia de EP en el RC. En cuanto a propiedades antioxidantes, el contenido de flavonoides y fenoles totales de Q+EP fue 23.06 y 90.53 mg/g, respectivamente, contenidos menores ($p < 0.05$) a EP, que presentó valores de 30.53 y 109.44 mg/g, respectivamente; además, Q+EP presentó mayor inhibición de radicales libres (DPPH) que Q y EP; sin embargo, EP presentó mejor ($p < 0.05$) poder reductor que los RC. En las propiedades mecánicas, Q+EP mostró menor porcentaje ($p < 0.05$) de elongación que Q. En relación al color de los RC, el valor L^* de Q+EP disminuyó por la adición del EP, no existiendo variación en a^* para ambos RC; mientras que b^* fue mayor ($p < 0.05$) para Q+EP. En las propiedades antimicrobianas, EP mostró mayor inhibición ($p < 0.05$) frente a *Escherichia coli* que Q; no obstante, Q+EP presentó mayor acción inhibitoria. Para *Salmonella typhi*, el efecto fue mayor ($p < 0.05$) con EP que Q y Q+EP. Referente a *Listeria innocua*, la inhibición fue mayor ($p < 0.05$) con Q+EP que con EP y Q, aunque Q+EP fue similar a Q. Adicionalmente, para *Staphylococcus aureus*, Q+EP exhibió un efecto mayor ($p < 0.05$) que EP y Q. La aplicación de los RC (Q y Q+EP) en carne, tuvo efecto ($p < 0.05$) en el pH, reduciendo su valor en ambos músculos. Los resultados de color mostraron que los valores de L^* y a^* se mantuvieron en

ambos músculos; no obstante los valores de TBARS fueron bajos ($p < 0.05$) respecto al control. Para ambos músculos el control presentó mayor ($p < 0.05$) desarrollo de UFC/g que los RC. Por todo lo anterior, el recubrimiento Q+EP muestra el mayor potencial de aplicación para preservar la calidad en carne fresca de bovino.

Palabras clave: quitosano, propóleos, recubrimientos comestibles, antioxidantes, antimicrobianos

ABSTRACT

During production, distribution and deboning of meat there is a risk of contamination, which can affect its quality. Propolis extracts (EP) have been shown to be effective preserving meat quality. In this context, there is a need to take advantage of these benefits to minimize this risk. The aim of this study was to develop and characterize edible coatings (RC), based on chitosan (Q) and propolis extract (Q+EP), by evaluating FTIR, UV, antioxidant, antimicrobial and mechanical properties, and color. The RC was applied in two cuts of beef, *M. semimembranosus* (S) and *M. triceps brachii* (TB) to evaluate pH, color, lipid oxidation (TBARS) and microbiological quality, for 72 h. With regard to FTIR, results showed identification of Q compounds on RC, meanwhile UV evaluation confirmed EP on RC. As with antioxidant properties, flavonoid and phenol total contents for Q+EP were 23.06 and 90.53 mg/g, respectively, which resulted lower ($p < 0.05$) to the values found in EP: 30.53 and 109.44 mg/g, respectively; additionally, Q+EP showed greater free radical scavenger (DDPH) than Q and EP; however, EP presented better ($p < 0.05$) reduction potential than RC. Results on mechanical properties showed that Q+EP had a lower elongation value ($p < 0.05$) than Q. With regard to color of RC, L^* value from Q+EP decreased by addition of EP, with no variation in a^* for both RC, while b^* was greater ($p < 0.05$) for Q+EP. Antimicrobial properties showed EP had greater inhibition ($p < 0.05$) for *E. coli* than Q; however, Q+EP resulted with an increased inhibitory action. Effects on *S. typhi* were greater ($p < 0.05$) with EP than with Q or Q+EP. For *L. innocua* inhibition was greater ($p < 0.05$) with Q+EP than with EP or Q, with no difference between Q+EP and Q. Results on *S. aureus* showed Q+EP had a greater effect ($p < 0.05$) than EP or Q. Addition of Q and Q+EP to beef meat had an effect ($p < 0.05$) on pH by decreasing its value on both meat cuts. Effects on color showed that values of L^* and a^* were maintained for both meat cuts; however, TBARS values were lower ($p < 0.05$) than the control. In both muscle types, control showed greater ($p < 0.05$) growth of CFU/g than RC. These results suggest that Q+EP coating has the greatest potential for application to preserve quality in fresh beef.

Keywords: chitosan, propolis, edible coatings, antioxidants, antimicrobials

I. INTRODUCCIÓN

El concepto general de carne, se refiere a todo lo que proviene del músculo del animal que ha pasado por cambios fisicoquímicos denominados “*postmortem*”. La definición de calidad de la carne, aplicada a vacunos, se establece como “el conjunto de atributos o cualidades, que debe tener la carne de vacuno, apreciadas y demandadas por los consumidores, en la compra de este alimento” (Téllez, 2005). Sin embargo, de todos los alimentos, la carne fresca tiene una vida de anaquel menos duradera, por su velocidad de oxidación y por ser considerado un medio rico en nutrientes, que presenta las condiciones favorables para el desarrollo de los microorganismos. Además, su pH es ideal para que la mayoría de éstos sobrevivan (Lawrie, 1998). Lo anterior ha contribuido para que se presenten enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) producidas por bacterias patógenas, tales como *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*, entre otras, por el consumo de productos contaminados con las mismas (Caballero, 2008).

Por lo anterior, reciben especial importancia los alimentos de origen animal, como la carne y los productos cárnicos, por lo que es probable que un alto porcentaje de estos microorganismos, sean el resultado de la contaminación que se produce en el rastro (Jouve, 1990; Rosset *et al.*, 2002; Nouichi y Hamdi, 2009). Las ETA son definidas como cualquier síndrome originado por la ingestión de productos alimenticios y agua que contengan agentes causales en cantidades tales, que afectan la salud del consumidor a escala individual o grupo.

Por otro lado, entre las causas de deterioro asociadas a las conservación de la carne fresca, se encuentra la pérdida del color rojo brillante y la formación de un color pardo no deseable, a causa de un mecanismo oxidativo, además del incremento de aroma que se transforma paulatinamente en un olor desagradable; debido por una parte a la acción de enzimas tanto endógenas como procedentes de microorganismos, así como de los procesos oxidativos de los lípidos. Actualmente existen varios metodos para la conservación de los productos de origen cárnico, entre estos se encuentran la refrigeración, congelación, envasado, compuestos antioxidantes, uso de sistemas de iluminación, etc. (Sánchez-Escalante *et al.*, 2007). Sin embargo, las nuevas tecnologías han dado paso a otros sistemas de conservación de este tipo de productos, como es el uso de recubrimientos a partir de polisacáridos con propiedades antimicrobianas.

Un recubrimiento comestible es un material de envoltura muy delgado empleado en la industria de alimentos, que se puede ingerir debido a que proviene de polímeros biodegradables que ayudan a incrementar la calidad y la vida útil de los alimentos. Dentro de los biopolímeros utilizados se encuentra el quitosano, un compuesto polimérico obtenido a través de la hidrólisis alcalina de la quitina a elevadas temperaturas, el cual es considerado un polímero de origen animal de estructura similar a la celulosa y que se encuentra distribuido ampliamente en la naturaleza (Bankova *et al.*, 1998). En consecuencia, la demanda de los consumidores por mejorar la calidad y seguridad de los productos alimenticios, ha dado lugar a la investigación, elaboración y aplicación de recubrimientos comestibles con la incorporación de compuestos fenólicos de origen natural con potencial antimicrobiano y antioxidante (Vodnar, 2012).

El propóleo es un producto apícola rico en compuestos antioxidantes, y ha sido usado con diversas finalidades, entre ellas la medicinal (anticancerígenas, antimicrobianas, antioxidantes, entre otras) (Bankova *et al.*, 1998). Sin embargo, en la actualidad se ha reportado que posee varias propiedades farmacológicas, lo que ha permitido su empleo en la medicina humana alternativa, cosmetología,

agrícola, medicina veterinaria y ciencias alimentarias, con lo cual se ha incrementado su uso como una materia prima para la industria farmacéutica, así como alimentaria (Río, 2006). En la industria de alimentos de origen animal, debido a la problemática derivada por factores que afectan su conservación, por su carácter perecedero, surge el interés por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas, ya que sus compuestos ofrecen un potencial importante para la aplicación en alimentos con posibles beneficios adicionales para la salud (Esquivias *et al.*, 2008). Entre algunos de los usos propuestos para este material se encuentra su aplicación en la conservación de productos cárnicos congelados (Farré *et al.*, 2004).

Las propiedades biológicas del propóleo dependen de factores como la zona geográfica en la que se obtienen, la flora predominante, el entorno ecológico, el origen de las especies vegetales en las que se extraen resinas, la raza de la abejas, la distribución de sus compuestos químicos así como la estación del año en la que fueron elaborados (Katircioğlu y Mercan, 2006).

La contaminación bacteriana en la canal de ganado bovino durante el proceso de sacrificio, es un factor muy importante que determina la vida de anaquel de la carne. El quitosano es un biopolímero utilizado en la industria alimentaria con propiedades antibacterianas intrínsecas y, adicionalmente, éste puede ser reforzado con extracto de propóleos, los cuales poseen características inhibitorias de patógenos. Así, surge la necesidad de estudiar su aplicación en la carne fresca, ya que su aplicación no ha sido ampliamente investigada.

Por todo lo anterior, el objetivo de este estudio fue desarrollar y caracterizar un recubrimiento a base de quitosano y extractos de propóleos con propiedades antioxidantes y antimicrobianas para utilizarse como recubrimiento en carne de bovino.

II. ANTECEDENTES

Oxidación en Carne Bovino

La carne se vuelve susceptible al deterioro oxidativo debido a las altas concentraciones de lípidos insaturados, pigmentos hemo, catalizadores metálicos y una amplia gama de agentes oxidantes en el tejido muscular. El deterioro oxidativo en la carne, independientemente de la procedencia de especie, se manifiesta en forma de decoloración, cambio de sabor, presencia de compuestos tóxicos, una vida útil disminuida así como de una pérdida de nutrientes (Falowo *et al.*, 2014). Las grasas están compuestas de carbono, hidrógeno y oxígeno; estos elementos se encuentran formando parte de la estructura de los triglicéridos que a su vez constituyen gran parte de las grasas animales, jugando un papel importante en la palatabilidad en los productos cárnicos debido a que contribuyen a la jugosidad y sabor (Romero *et al.*, 2011). Los lípidos se encuentran ampliamente distribuidos tanto en el espacio intra y extracelular de la carne como triglicéridos, fosfolípidos y esteroides. Son químicamente inestables y por consecuencia propensos a la oxidación, especialmente durante el manejo y almacenamiento *post-mortem* (Chaijan, 2008).

Se ha demostrado que la oxidación de lípidos y proteínas en la carne es la principal causa no microbiana del deterioro de la calidad de la misma. Esto se debe a que las grasas y las proteínas son fácilmente susceptibles a daños oxidativos debido al rápido agotamiento de los antioxidantes endógenos después del sacrificio.

Sin embargo, también se ha encontrado que existen otros factores que influyen o promueven la oxidación en la carne como la raza, especie y músculo del animal (Falowo *et al.*, 2014). La rancidez de origen bacteriano afecta a los productos cárnicos cuando se almacenan demasiado tiempo y sin protección. La oxidación de los lípidos es producida por una reacción en cadena que consta de tres pasos (iniciación, propagación y terminación) con la producción de radicales libres. La velocidad y extensión de la oxidación de lípidos está influenciada por una serie de factores que incluyen el contenido de hierro, la distribución de ácidos grasos insaturados, el pH y los niveles de antioxidantes (Falowo *et al.*, 2014).

Por lo tanto oxidación de los lípidos constituye una de las principales causas de alteración de la carne y los productos cárnicos durante su procesado y almacenamiento en la que intervienen factores tanto endógenos como exógenos (Falowo, 2014). La oxidación afecta las diferentes características que contribuyen a la calidad de la carne, tales como sabor, color, textura, valor nutritivo y aromas anormales. La hidrólisis de las grasas se inicia por la acción de las lipasas de origen microbiano o del propio organismo animal produciendo enranciamiento (Romero y Estrada, 2011). La oxidación microbiana de las grasas se facilita si antes ha tenido lugar una hidrólisis parcial. Determinados microorganismos son capaces de formar metilcetónas, que son las que provocan el denominado enranciamiento perfumado o cetónico, a partir de los ácidos grasos libres. Con esta oxidación aparecen olores y sabores a rancio, se altera el color y la textura, descende el valor nutritivo al perderse algunas vitaminas y ácidos grasos poliinsaturados (Romero y Estrada, 2011).

Industria Cárnica y sus Problemas de Contaminación Microbiana

La cadena de suministros de la industria alimentaria comprende desde la producción del alimento, su transformación, distribución, compra, consumo y la disposición final de los residuos generados en cada una de estos subsistemas (Álvarez-Chávez *et al.*, 2011, Uicab-Brito y Castro, 2003). Sin duda, en la industria cárnica, la supervivencia de los agentes patógenos después de una sanitización de las áreas donde se lleva a cabo el procesado de la carne, puede aumentar la tolerancia de los microorganismos al calor, ácido, y desinfectantes utilizados, dando como resultado la proliferación de microorganismos resistentes que pueden contaminar los productos y tener resistencia a tratamientos posteriores (Samelis *et al.*, 2001).

México, como en muchos países involucrados en el mercado de la carne, genera muchos subproductos durante la obtención de productos cárnicos, siendo esto una de las principales causas de contaminación ambiental; por lo cual, se considera a los rastros como uno de los lugares donde se produce y acumula gran cantidad de estos desechos (Stopforth *et al.*, 2003).

La posibilidad de realizar un mal procesado de la carne, generando una mayor contaminación microbiana sobre los productos cárnicos es elevada, ya que el uso inadecuado de materiales como cuchillos, pinzas, sierras, entre otros objetos punzocortantes, o cualquier utensilio que se encuentre en contacto con la superficie de un producto cárnico, podrían ser fuente de contaminación por patógenos (Caballero, 2008).

La operación de desinfección en las plantas de proceso (rastros u otras instalaciones de procesamiento de carnes), puede no ser suficientemente efectivo, dejando a su paso residuos que pueden actuar como vehículos para la contaminación con patógenos en los productos cárnicos (Samelis *et al.*, 2001). Por ello, las empresas productoras de carne en canal de bovino, como son los

rastros Tipo Inspección Federal (TIF), consideran de suma importancia la realización de buenas prácticas de manufactura, entre las que se encuentran la aplicación de procedimientos como el sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (HACCP, por sus siglas en inglés) para evitar problemas de proliferación bacteriana; sin embargo, aún con estas medidas no se es suficiente para evitar una contaminación en su totalidad.

Canales de Bovino, su Importancia y Problemas de Contaminación

La definición del concepto de canal de bovino más acertada se refiere al cuerpo del animal sacrificado, desangrado y sin piel, abierto a lo largo de la línea media del pecho y abdomen a la cola; separado de la cabeza al nivel de la articulación occipitoatloidea; de las extremidades anteriores al nivel de la articulación carpometacarpiana y de las posteriores al nivel de la tarsometatarsiana; con o sin la presencia de cola, amputada ésta a la altura de la segunda vértebra caudal; sin vísceras cavitarias (excepto los riñones), quedando el diafragma adherido, sin genitales ni ubre (NMX-FF-078-SCFI-2002).

En México el conocimiento de la calidad de las canales ha dado lugar a su clasificación, la cual se rige por esta misma norma (NMX-FF-078-SCFI-2002). Esta clasificación tiene cobertura nacional y se instrumenta en las plantas TIF registrados en la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) que operan bajo condiciones de sanidad e higiene establecidas en la norma oficial mexicana NOM-08-ZOO-1998 (Aguirre *et al.*, 2009).

Por otro lado, la norma NOM-194-SSA1-2004 tiene por objeto establecer las especificaciones sanitarias que deben cumplir los establecimientos que se dedican a la práctica de sacrificio y faenado de animales de abasto para el consumo humano, su almacenamiento, transporte y expendio, así como las

especificaciones sanitarias que deben cumplir los productos. Lo anterior ha coadyuvado a que disminuya la aparición de ETA causadas por bacterias que surgen a menudo por el consumo de productos contaminados, especialmente los de origen animal como la carne. Probablemente un porcentaje muy elevado de estos gérmenes son el resultado de la contaminación que se produce en el rastro (Jouve, 1990; Rosset *et al.*, 2002; Nouichi y Hamdi, 2009), ya que una inspección veterinaria convencional no tiene la capacidad de detectar la presencia de estas bacterias en las canales, que ante los ojos humanos son aparentemente inocuas (Brown *et al.* 2000; Nouichi y Hamdi 2009).

Por lo anterior es posible pensar que la contaminación de los equipos, materiales y el manejo de la carne por los trabajadores (manos sin cubrir), pueden transferir las bacterias patógenas a las canales (Nouichi y Hamdi, 2009). El proceso de obtención de la carne, debido a sus diferentes etapas, favorece la contaminación microbiana, dando como resultado una calidad del producto final indeseable, afectando su posterior comercialización. A consecuencia de esto, las ETA siguen siendo responsables de los altos niveles de morbilidad y mortalidad en la población general. Los centros para el control y la prevención de enfermedades estiman que, sólo en los Estados Unidos de Norteamérica (E.U.A.), reportaron aproximadamente 76 millones de casos de ETA, resultando en 5,000 defunciones y 325,000 hospitalizaciones cada año. En 2011, ese país invirtió \$152,000 millones en atender pacientes debido a ETA (Loretz, Stephan y Zewiefel, 2011).

Información publicada en 2010 sobre la aparición de patógenos, en carne bovina, hacen referencia principalmente a *Salmonella*, en la cual se presentaron 554 casos, solo en la Unión Europea (UE), presentando un aumento del 12.0% con respecto al 2009. Por otro lado, en la misma fecha también se encontró *Campylobacter* y *Listeria monocytogenes* en carne cruda y lista para consumir de bovino (Sava-Buncic *et al.*, 2014).

La transferencia de microorganismos patógenos a los seres humanos que se lleva a través ETA por el consumo de carne de vacuno, es por medio de la contaminación cruzada que se da durante la producción y manipulación de las canales. El control efectivo de los agentes infecciosos transmitidos por la carne requiere el enfoque hacia las buenas prácticas de producción y buenas prácticas de higiene en las canales de bovino (Buncic, 2006). Por tal motivo, para realizar una reducción en los riesgos de contaminación microbiana en la canal, la industria cárnica realiza una limpieza y desinfección en las áreas relacionadas con el manejo y manipulación de canales y de la carne, incorporando a ello con una cadena de frío ininterrumpida (Sava-Buncic *et al.*, 2014).

Proliferación de Patógenos por mal Procesado de las Canales

El acceso a alimentos inocuos es de vital importancia, debido a que por este medio se presentan las ETA, debido principalmente al consumo de los mismos en mal estado, dando como resultado numerosos reportes de contaminación en los productos, e intoxicación de personas por su ingestión (Joint, 2004). Por consiguiente, la importancia por eliminar factores o fuentes de contaminación en la carne es de vital importancia, iniciando desde el parámetro base por el cual da comienzo el proceso de faenado del animal, para su posterior transformación *postmortem* de músculo a carne (Joint, 2004). Durante el faenado de los bovinos se toman dos criterios de suma importancia para evitar la contaminación; esto es, la manera en que son retiradas la piel y las vísceras, las cuales son fuentes potenciales de contaminación de las canales por la presencia de bacterias patógenas. Por consiguiente, los principales objetivos en el faenado higiénico y en el manejo de canales son (Ronquillo Padilla, 2009):

- Prevenir la contaminación de las partes comestibles de la canal, esto es suciedad de los cueros o pieles, y del contenido de los órganos internos;

- Inhibir el crecimiento microbiano en las superficies de la canal o de la carne;
- Eliminar cualquier canal o porción de la misma que se estime no apto para el consumo humano.

El proceso de sacrificio del ganado productor de carne implica la garantía de que la canal se encuentra inocua. Por lo tanto, para asegurar la seguridad alimentaria durante el proceso de faenado es necesario minimizar la contaminación bacteriana de la canal, o reducir la que se ha producido (Marull y Carmanchahi, 2008). La herramienta principal en la reducción de la contaminación bacteriana de las canales de vacuno es el empleo de procedimientos eficaces de prevención sanitaria durante el procesado del animal vivo a carne en canal. Por esta razón los operarios deben tener buen conocimiento, entender y utilizar las prácticas estandarizadas utilizadas en el sacrificio (Pérez-Chabela *et al.*, 2008). Sin embargo, no importa lo cuidadosa que pueda ser una planta procesadora de canales bovinas, es inevitable que las bacterias contaminen la canal, algunos de los cuales podrían ser potencialmente patógenos tales como *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* o *S. typhi* (Michanie, 2003). Por lo tanto, la aplicación de "intervenciones" a las canales durante y después del procedimiento de sacrificio es prioritario para eliminar o inactivar eficazmente la contaminación bacteriana, y así mejorar la seguridad de la carne.

Estas "intervenciones" en la canal incluyen recorte, limpieza con aspiradora de vapor, lavado de la canal; enjuague con agua caliente y con ácidos orgánicos y pasteurización por vapor (Caballero, 2008). Además, se ha demostrado que el proceso de almacenamiento en frío de las canales y posterior refrigerado de la carne, causa una disminución en el número de bacterias. Actualmente se reporta que las pequeñas, medianas y grandes plantas de sacrificio están probando o usando una amplia variedad de intervenciones para evitar riesgos de contaminación bacteriana sobre la superficie de las canales (Foods, 1991).

Patógenos Presentes en la Carne de Bovino

La industria cárnica está en constante mejora de la calidad de sus productos alimenticios, esto se debe a que entre sus intereses para esta gran empresa está la seguridad alimentaria, siendo que la preocupación hoy en día de los consumidores es la influencia que el alimentación tenga sobre su salud (Sánchez *et al.*, 2011). Los trastornos gastrointestinales se deben a diversas causas, entre ellas destacan la ingestión excesiva de alimentos, carencias nutritivas, envenenamientos químicos por plantas, animales tóxicos, toxinas producidas por bacterias e infecciones causadas por microorganismos. Cabe mencionar que las ETA son más recurrentes por problemas bacterianos reportados a nivel global (Caballero, 2008).

Siendo los principales entre los microorganismos Gram positivos y Gram negativos *S. typhi*, *E. coli*, *Campylobacter*, *Clostridium perfringens*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, entre otras. Sin embargo, las diferencias en el contenido de nutrientes entre las especies cárnicas determina la superioridad de sobrevivencia de los microorganismos entre sus demás competidores, causando ETA (Pérez Chabela *et al.*, 2008). En relación a esto, la vida de anaquel de la carne depende de la cantidad de bacterias al inicio del almacenamiento, el cual generalmente se lleva a cabo a temperaturas entre 0 y 7 °C, aunque existen estudios que mencionan que las predominantes son las bacterias del género *pseudomona* (Treviño López *et al.*, 2009).

En las dos últimas décadas, algunos de los microorganismos reconocidos como patógenos importantes, como *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7, han adquirido un papel muy importante en el tema de la seguridad alimentaria, puesto que hoy en día son motivo de preocupación para muchos productores de alimentos. Entre estas, *Listeria* ha sido reconocida como patógeno para el ser humano desde 1929, y actualmente se ha establecido como

“cero tolerancia en países como E.U. y Canadá; mientras que *E. coli* O157:H7 introdujo el sistema de Análisis de Peligros y puntos Críticos de Control por sus siglas en inglés (HACCP) en la industria de la carne a partir de 1993 en los Estados Unidos (Rivera, 2006; Machanie, 2003).

A principios de la década de los 80 del siglo XX, *L. monocytogenes* se manifestó como un patógeno emergente para alimentos. No es difícil comprender que la conservación y la industrialización de los alimentos trajeron como consecuencia algunos cambios que dieron lugar a brotes masivos por *Listeria* en lugar de casos esporádicos (Michanie, 2004). Este microorganismo es una bacteria ampliamente difundida en la naturaleza, y su presencia en los alimentos está determinada por su extensa distribución en el ambiente (tierra, agua hervida, materia fecal, vegetación, ensilados y entorno de la producción de alimentos), lo que confiere una importante oportunidad para contaminarlos y causar enfermedades como listeriosis, la cual es considerada como una enfermedad de transmisión alimentaria (Stopforth *et al.*, 2003).

Este microorganismo tiene la facultad de adherirse a la superficie de alimentos como la carne, formando biopelículas para protegerse de la acción de los tratamientos antimicrobianos, puede crecer a temperaturas entre 1 y 45°C, tiene la habilidad de soportar temperaturas de refrigeración y es capaz de desarrollarse a pH de 4.4 a 9.6, así mismo crece en concentraciones altas de cloruro de sodio (Muños, 2011). En Estados Unidos los brotes de ETA producidos por este microorganismo, los alimentos han sido pollo, salami, jamones cocidos, jamones curados, hamburguesas, carne de pavo, embutidos y carne de bovino.

Por otro lado, *Escherichia coli* es una bacteria que habita comúnmente en el intestino del hombre y otros mamíferos, desempeñando un papel importante en la fisiología del intestino (Michanie, 2003). Por ser un habitante regular y normal en el aparato digestivo, en el estómago de las personas, se usa desde hace un siglo como “el mejor” indicador de contaminación de materia fecal en los

alimentos (Michanie, 2003). Recientemente en la década de los 40's, durante el siglo pasado, se descubrió que algunas diarreas en niños se producían por algunos serotipos de *E. coli*. De acuerdo a sus grupos estos pueden ser *E. coli* enteropatógenos (ECEP), enteroinvasivos (ECEI), productoras de toxinas parecidas a *Shigella* (ECST), enterotóxicos (ECET), de adherencia difusa (ECDA), enteroadherentes o enteroagregativas (ECEA). Particularmente *E. coli* O157:H7 pertenece a las productoras de toxinas y los enterotóxicos, son también conocidas como las causantes de la “diarrea de los viajeros” (Ramos y Díaz, 2011). Este microorganismo a estado involucrado en brotes de ETA en carne picada insuficientemente cocida, hamburguesas, roast beef, jugo de manzana no pasteurizado, vegetales crudos, quesos, leche cruda y carne cruda de bovino entre otros, siendo la bacteria que a partir de un brote que produjo 700 enfermos, 4 muertos y una pérdida de 10 millones de dólares en 1993 en E. U. A., consecuencia del consumos de hamburguesas poco cocidas en la cadena de comidas rápidas “Jack in the Box” se implementó el sistema HACCP con énfasis en la industria cárnica (Rivera, 2006; Machanie, 2003).

De acuerdo a estadísticas reportadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades de transmisión alimentaria son de 300 a 350 veces más frecuentes de lo indicado en reportes anteriores (Reuben *et al.*, 2003). Entre los principales patógenos además *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 están *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus*. Lo anterior nos indica que los productos animales asociados a las ETA es la carne, que contribuyen al desarrollo de agentes patógenos como *Salmonella typhi*, causante de cuadros de enteritis, septicemia, aborto en animales y fiebre tifoidea en humanos. Para varios países la ausencia de esta bacteria forma parte de muchas normas alimentarias de productos de venta comercial, destacando entre ellos la carne de pollo y de bovino, la incidencia de *Salmonella spp* en plantas de procesamiento de carne no es significativa, sin embargo la calidad sanitaria del producto puede verse afectada después de su procesamiento (Reuben *et al.*, 2003).

La vigilancia de este patógeno en todas las etapas de la cadena de procesamiento de alimentos, constituye un elemento importante para el mercado internacional, lo anterior para proteger la salud que los consumidores exigen de que sus productos se encuentren libres de este patógeno (Yañez *et al.*, 2011). Se ha hecho grandes esfuerzos en materia de prevención de enfermedades transmitidas por alimentos por parte de las industrias y de las entidades encargadas del control. Ya que países como Estados Unidos, Canadá y Colombia tienen establecido dentro de su legislación cero tolerancia para este patógeno (Yañez, 2011).

Otro agente patógeno causante de ETA de importancia para la industria alimentaria es *Staphylococcus aureus*, siendo este un microorganismo que posee características particulares de virulencia y resistencia a los antibióticos. Desde hace muchos años se le ha reconocido como uno de los principales patógenos que afecta al ser humano. Este microorganismo es una bacteria Gram-positiva, forma parte de la familia *Micrococaceae* género *staphylococcus* el cual contiene 30 especies diferentes. Es un anaerobio facultativo, pero crece mejor en condiciones aerobias (Bustos-Martínez *et al.*, 2006).

Reducción de la Contaminación de la Canal

Con el enfoque moderno de la inspección de la carne de vacuno, es decir, la clasificación de los lotes de animales destinados al faenado en función de riesgos que suponen un peligro para la salud pública como fuente de ETA, se realiza una inspección en la cadena cárnica como parte de la inspección *antemorten* y *postmortem*. En los sistemas para detectar la contaminación microbiana en las plantas de sacrificio, la contaminación fecal es la principal fuente de contaminación a la que hay que erradicar y poner más énfasis. Esta contaminación se asocia con la utilización de cuchillos a través de la piel de la canal o por salpicaduras de material fecal durante el desollado y eviscerado

(Buncic *et al.*, 2013; Baird *et al.*, 2006). Algunas medidas utilizadas para lograr una reducción de microorganismos sobre la superficie de las canales son: a) realizar un lavado con agua caliente, b) efectuar un aspirado con vapor, c) pasteurización por vapor, d) uso de ácidos orgánicos, cloro, clorito sódico acidificado o polifosfatos, los cuales se aplican de forma rutinaria en la industria de la carne (Gill y Landers, 2003). En un estudio realizado en cuatro plantas de carne en Estados Unidos, se demostró que la utilización de agua caliente y la pasteurización con vapor de agua eran muy eficaces cuando los niveles de contaminación eran muy altos, sin embargo, estas son operaciones que pueden resultar muy costosas (Buncic *et al.*, 2013).

Entre los métodos utilizados para la descontaminación en la canal de bovino, se encuentran:

Agua (Caliente, Clorada o como Vapor)

El lavado con agua se utiliza de forma rutinaria en las plantas de procesamiento de canales para la eliminación de contaminantes visibles, tales como partículas del suelo, pelos, excrementos u otros desechos. Cada vez se utiliza más frecuentemente en el faenado, que las canales sean lavadas previo y después de la evisceración, con agua fría o caliente al final del sacrificio (Loretz, Stephan y Zweifel, 2011). De acuerdo a Huffman, (2002), USDA-FSIS reconoce que existe evidencia científica significativa para concluir que el agua caliente (≥ 74 °C) produce un efecto de desinfección en las canales productoras de carne. Estudios llevados a cabo en varios tipos de carne en diferentes condiciones, han reportado una reducción de 1-3 UFC de recuentos bacterianos, así como en la prevalencia de patógenos por la utilización de agua a diferentes temperaturas. Otro estudio realizado en una sección de lavado de canales de vacuno durante la cadena de proceso, la utilización de agua caliente a 74 °C durante 5 s redujo el conteo de mesófilos aerobios y enterobacterias a 2.7 UFC y redujo la prevalencia de *E. coli*

O157:H7 en un 81% (Hugas y Tsigarida, 2008). Este efecto está asociado a la temperatura del agua y al tipo de tejido animal de la carne.

La eficacia del tratamiento con agua caliente como descontaminante depende de factores operativos (temperatura del agua, presión, forma de aplicación, tiempo, y del tipo de planta de procesamiento) y de factores relacionados con el producto mismo (lotes de los animales, tejido de la carne, carga microbiana inicial, tiempo de exposición a la contaminación entre otros) (Hugas y Tsigarida, 2008). Una alternativa con agua caliente es su aplicación como vapor, puesto que para realizar el cambio de estado de líquido a gaseoso se manejan temperaturas de aproximadamente 100 °C, dando como resultado la utilización de una mayor capacidad de calor que la misma cantidad de agua a esa temperatura y por lo tanto con capacidad de penetrar cavidades y grietas (James *et al.*, 2007). Para lograr una eficacia en un sistema de descontaminación basado con calor por vapor, se necesita calentar rápidamente la superficie por encima de 70 °C, temperatura considerada como óptima para inhibir a los patógenos rápidamente; y a su vez debe reducirse rápidamente la temperatura para evitar el calentamiento de los músculos y la desnaturalización de las proteínas, es decir evitar la cocción de la carne (James *et al.*, 2007).

Otro tratamiento que se usa muy frecuentemente en las plantas de sacrificio para la descontaminación de canales durante su procesamiento es el agua clorada. El cloro es un agente desinfectante común utilizado en equipos, utensilios y suministros de agua y es el tratamiento de descontaminación química del agua más utilizada en carne de vacuno. Este tratamiento ha demostrado reducir recuentos totales y bacterias patógenas tales como *salmonella* y *E. coli O157:H7* (Sofos y Smith, 1998). Investigadores de USDA-ARS en College Station, Texas informaron que la administración oral de clorato de sodio reduce las concentraciones intestinales de *E. coli O157:H7* y *Salmonella Typhimurium* en cerdos infectados experimentalmente y en cerdos no expuestos (Huffman, 2002).

Por otra parte, en un estudio realizado en aves, mostró que una concentración entre 20 y 50 ppm de agua clorada aplicada en tres puntos de su procesamiento (desplumado, evisceración y retiro del cuello) redujo recuentos de aerobios, *coliformes* totales y *E. coli* a 0.4 UFC, así como de *Salmonella* entre un 20-25% (Hugas y Tsigarida, 2008). En Estados Unidos de Norteamérica el tratamiento para el agua, previo a su utilización es utilizando cloro a una concentración de 0.2 ppm. Estudios realizados utilizando cloro reportan que el agua a concentración de 1.1 ppm, inactivó 7 cepas de *E. coli* O157:H7 provocando una reducción a 4 UFC/mL (Huffman, 2002). Sin embargo, la posibilidad de que permanezcan residuos en la carne hace que los consumidores vean como mejor opción realizar métodos físicos como la descontaminación con vapor (James *et al.*, 2007).

Ácidos Orgánicos y Productos Químicos

Los descontaminantes químicos utilizados con mayor frecuencia son soluciones de ácidos orgánicos, ya que organizaciones como la USDA-FSIS (1996), han aprobado el uso de soluciones de ácidos orgánicos tales como ácido acético, láctico y cítrico en concentraciones que van desde el 1.5 a 2.5% para aplicarse en canales de bovino. Los ácidos orgánicos se aplican normalmente en forma de enjuague o baño en toda la superficie de la canal (Huffman, 2002). El ácido acético es un ácido monocarboxílico con un olor y sabor acre, es altamente soluble en agua y es generalmente reconocido como seguro (GRAS), y es el más sobresaliente en el uso de ácidos orgánicos, ya que se ha demostrado que reduce la población de bacterias aerobias, así como de facultativas como *coliformes*, *E. coli* y *E. coli* O157:H7. Dependiendo de su concentración, también puede disminuir poblaciones (UFC/cm²) bacterianas como *Salmonella typhi* (Maní-López, García y López-Malo, 2012).

Estudios realizados por otros investigadores han demostrado la efectividad del ácido acético para descontaminar carne y productos cárnicos (res, cerdo y aves de corral). Se ha demostrado que la utilización de ácido acético al 0.1% a 52 °C para lavar canales de aves de corral disminuye las UFC de *S. typhimurium* y *Campylobacter jejuni* de 0.5 a 1.5. Sin embargo, en otras investigaciones utilizando *S. typhimurium* inoculado sobre la superficie de carne de res y utilizando ácido acético al 2%, tuvo poco éxito, ya que solo se redujo de 0.5 a 0.8 UFC/cm². (Maní-López, García y López-Malo, 2012).

Por otra parte, se ha demostrado que tratamientos con ácido láctico reduce bacterias aerobias, *coliformes* y *E. coli* dependiendo de su concentración, reduciendo también la población de *E. coli* O157:H7 y *S. Typhi* (Baird *et al.*, 2006). Hugas y Tsigarida, (2008) mencionan que la utilización de ácido láctico al 2% y a una temperatura de 42 °C demostró reducir mesófilos aerobios en 1.6 UFC, enterobacterias a 1.0 UFC y *E. coli* O157:H7 en un 35%. También la utilización de ácido láctico al 2% a temperatura de 37 °C durante 30-90 s redujo las UFC de *Salmonella* pero no *L. monocytogenes* en la piel de cerdo, lo anterior se atribuye a que las Gram-positivas son más resistentes al ácido láctico que las Gram-negativas.

Tratamientos con cloruro de cetilpiridinio han demostrado de igual forma reducir bacterias anaerobias, *coliformes* y *E. coli*. La actividad bacteriana de otros productos químicos tales como cloro, agua electrolizada, etanol, alcohol isopropilico, H₂O₂, ozono, hidróxido de sodio o metasilicato de sodio se han investigado para la descontaminación de canales de ganado bovino.

Las reducciones de microorganismos varían dependiendo de las condiciones de elaboración como modo de aplicación, concentración, tiempo de exposición o nivel de contaminación (Baird *et al.*, 2006; Antic *et al.*, 2010). El sistema HACCP puede ser de utilidad en el control de los puntos donde puede ocurrir la contaminación de la canal. Tales como máquinas de desollado y evisceración, corte de la canal entre otros. Pero se requiere este sistema en todas las etapas

de la cadena alimentaria generando costos adicionales a las operaciones de proceso para la obtención de carne. Por ellos las investigaciones futuras deben centrarse en el desarrollo de métodos de aplicación de bajo costos y sin afecciones al medio ambiente, dirigidos a combatir patógenos como *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi* (Carvalho *et al.*, 2010).

Inhibición de Microorganismos en la Canal

En el caso de *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *Salmonella typhi*, las personas vulnerables o propensas a padecer enfermedades debido a la falta de defensas (inmunosuprimidos) para contrarrestar la acción de estos microorganismos, deben evitar el consumo de alimentos conservados por tiempo prolongado en refrigeración (Ramos *et al.*, 2011). Entre las medidas recomendadas por Ramos (2011), las cuales tratan de evitar la contaminación de las bacterias a la carne, durante su almacenamiento, podemos mencionar las estrategias de control de patógenos las cuales son:

- a) Evitar el acceso de los microorganismos a los alimentos utilizando objetos contaminados.
- b) Inhibir el desarrollo de microorganismos utilizando agentes antimicrobianos.
- c) Inactivar a los microorganismos alterando sus condiciones del entorno.

En lo referente a la industria de la carne, Ramos (2011) recomienda:

- Limpieza profunda de los animales que ingresan, minimizando la materia fecal sobre los mismos.
- Mejorar el diseño higiénico de los equipos utilizados en el rastro, para evitar que se formen nichos de microorganismos.
- Evitar la contaminación intestinal durante la evisceración. Tomar acciones correctivas si se produce la contaminación.

- Asegurar el enfriamiento rápido de las canales.
- Modificar las prácticas de los operarios cuando sea necesario para la garantizar la inocuidad de los productos elaborados.
- Establecer procesos de desinfección para eliminar microorganismos durante el envasado del alimento, por ej. pasteurización, irradiación, etc.
- Usar aditivos o conservadores que retarden el desarrollo de los microorganismos.
- Establecer secciones bien separadas, con el fin de aislar la manufactura de productos cocidos de los crudos.
- Extremar la higiene en las salas de fileteado y de envasado.
- Mantener los equipos de proceso siempre limpios y usar prácticas que minimicen la contaminación entre los cortes.

Es necesario tener un control de todos estos **procesos** para asegurar la calidad de los productos cárnicos destinados para los consumidores. Las bacterias que colonizan las superficies de canales pueden contaminarlas directamente a través del ambiente del procesado, y pueden sobrevivir incluso, al tratamiento de limpieza y desinfección que se realice en la planta. Sin bien, la limpieza y desinfección es una etapa primordial para alcanzar canales inocuas y salubres, su vigilancia y control mediante técnicas tradicionales y rápidas como las de conteo rápido de microorganismos (colorimétricas o por ADN, etc.), entre otras, se convierte en la única vía para verificar su eficacia y asegurar las condiciones higiénico sanitarias adecuadas para el procesado y manipulación de las canales (Fuster, 2006).

Otros métodos para disminuir la población de microorganismos en la carne y productos cárnicos son:

1. Retiro de humedad para disminuir la actividad de agua.

2. Disminución o aumento de la temperatura para productos cárnicos en refrigeración o cocción.
3. Manejo de películas con materiales poliméricos sintéticos o naturales.
4. Manejo de empaques con atmosferas modificadas
5. Utilización de recubrimientos con materiales poliméricos de origen natural.
6. Utilización de extractos naturales con características antimicrobianas
7. Aplicación de recubrimientos comestibles.

Propóleos y sus Compuestos Fenólicos

El interés del hombre por el aprovechamiento de los productos naturales, se ha convertido en la actualidad en una opción irremplazable para satisfacer las carencias en nutrimentos, o para ser empleados en el tratamiento de diversas enfermedades (Amoros *et al.*, 1994). Entre los productos de origen natural el propóleo es conocido desde tiempos inmemorables y ha sido ampliamente utilizado por diferentes culturas para diversas finalidades, entre ellas las medicinales y alimenticias (Farré *et al.*, 2004). Este compuesto es una sustancia resinosa, balsámica, gomosa, de consistencia viscosa y color verde pardo, castaño o incluso negro, sabor acre, frecuentemente amargo y olor agradable y dulce. Su color y composición dependen en gran medida de su origen botánico y del tipo de abeja que lo produzca, las abejas (*Apis mellifera*), lo utilizan para sellar, cubrir y proteger el interior de su colmena contra posibles depredadores (Río-Martínez, 2013). Sus componentes flavonoides, junto con los ácidos fenólicos y sus ésteres, generalmente atribuidos al nombre de “compuestos fenólicos” están formados por un anillo aromático unido por lo menos a un grupo oxhidrilo formando ácidos fenólicos como el caféico, ferúlico, cumárico y cinámico, comunes en los vegetales con estructuras complejas y sencillas como el ácido benzoico (Farré *et al.*, 2004).

Estos compuestos son considerados hoy en día los principales componentes bioactivos del propóleo. Pero estudios recientes por mencionar en los últimos 50 años han evidenciado numerosas propiedades farmacológicas, entre otras: antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatoria, analgésica, cicatrizante e inmunomoduladoras (Río-Martínez, 2013). Lo anterior ha permitido que su empleo en la medicina humana alternativa, cosmetología y medicina veterinaria se incremente considerablemente haciendo del propóleo una materia prima valiosa para la industria farmacéutica, de cosméticos y de alimentos (Katircioğlu y Mercan, 2006). Debido a que estos compuestos tienen importantes propiedades antioxidantes, ya que minimizan la peroxidación lipídica y el efecto de los radicales libres, contribuyendo de esta manera a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares de las personas. Actualmente, se han caracterizado del propóleo, diferentes tipos de flavonoides comprendidos en este compuesto tales como flavonoles, flavanonas, flavonas, catequinas, antocianinas e isoflavonoides (Río-Martínez, 2013).

Propiedades Antioxidantes y Antibacterianas del Propóleo

Las propiedades antioxidantes del propóleo tienen un especial interés en la industria de alimentos, ya que ofrecen un importante potencial de aplicaciones, con la ventaja de que sus residuos pueden ser benéficos para la salud humana (Bedascarrasbure *et al.*, 2004). Lo anterior es debido a sus compuestos fenólicos, ya que contribuyen significativamente a la inmunidad en el sistema biológico de las personas (Katircioğlu y Mercan, 2006). Los estudios realizados sobre la actividad antioxidante de estos compuestos ha sido ampliamente reconocida, su actividad y espectro de acción dependen de su composición química que se ve influenciada por factores tales como la región geográfica de donde se obtienen, la flora existente y la estación del año en que fueron recolectados (Katircioğlu y Mercan, 2006). Aunado a esto, la tipificación de los compuestos fenólicos y de otros químicos en propóleo, es importante para obtener un mejor conocimiento

sobre la química de este compuesto, particularmente como un agente antioxidante. Por otra parte, el conocimiento de sus flavonoides y el contenido de los compuestos fenólicos en diversos climas, podría ser un indicador potencial de su calidad biológica antioxidante (Bedascarrasbure *et al.*, 2004).

El propóleo es utilizado para producir apiterápicos de uso humano y animal, debido a sus propiedades biológicas. Las propiedades antimicrobianas de esta resina pueden ser atribuidas, principalmente, a los flavonoides, como la pinocembrina, galangina, pinobanskina y al éter bencil del éster fenetil de ácido caféico, el cual es un componente activo del propóleo que ejerce una gran variedad de cambios biológicos en diversos sistemas, como las respuestas inmunomoduladoras, antiinflamatorias, y antimutogénicas (Bedascarrasbure *et al.*, 2004), así como el ácido cumárico y éter del ácido caféico (Amoros *et al.* 1994). Es de resaltar que la presencia en el propóleo de compuestos con estas actividades, pueden variar de una región a otra, ya que su presencia se asocia en parte a las resinas que las abejas recogen de las plantas presentes en el entorno (Esquivias *et al.*, 2008). En los últimos años se han realizado innumerables investigaciones acerca de los productos provenientes de las abejas y sus potenciales benéficos para la salud humana.

Desarrollo y Caracterización de Recubrimientos

La preocupación sobre los recursos naturales limitados como los combustibles, ha intensificado el interés por desarrollar empaques y recubrimientos basados en plásticos biodegradables (Maher y Entsar, 2013). Las películas y recubrimientos ofrecen algunas ventajas tales como comestibilidad, apariencia estética, propiedades de barrera, no son tóxicos, no contaminantes y tienen bajo costo,

además las películas y los recubrimientos tienen acción antimicrobiana por si mismas (Vásconez *et al.*, 2009). Asimismo, actúan como agentes antioxidantes o antimicrobianos por si mismos o con la incorporación de aditivos naturales. Dado que la mayor contaminación microbiana está en la superficie de los alimentos listos para el consumo, la aplicación de los compuestos antimicrobianos puede ser una opción prometedora para este tipo de productos (Gou *et al.*, 2013).

Recientemente se han llevado a cabo investigaciones para desarrollar y aplicar películas, así como recubrimientos con polímeros de procedencia biológica a partir de desechos de alimentos. La utilización de cada uno de estos varía dependiendo de su aplicación, los recubrimientos se aplican por inmersión, con brocha o por aspersión en la superficie de los alimentos y las películas formadas son matrices en forma de capa que se utilizan para recubrir la superficie como envases o empaques (Gou *et al.*, 2013). Estos materiales por lo general son almidones, derivados de celulosa, quitina y quitosano, gomas, proteínas y lípidos. Dichos materiales ofrecen la posibilidad de obtener películas delgadas y recubrimientos para cubrir los alimentos frescos o procesados para extender su vida útil (Maher y Entsar, 2013).

Los polímeros de procedencia natural más usados en la industria alimentaria para la elaboración de películas y recubrimientos son proteínas, lípidos y carbohidratos o la combinación entre estos, sin embargo, a consecuencia de que existe una continua actividad química y física en la interface entre el empaque y el alimento, es necesario que las películas cumplan ciertas propiedades que garanticen la preservación del alimento empacado (Sánchez *et al.*, 2014). Entre las propiedades de mayor importancia se encuentran las físicas, térmicas, de permeación y las mecánicas (Guilbert, Gontard y Gorris, 1996). Por otra parte, para mejorar las propiedades mecánicas de las películas y los recubrimientos se les incluyen agentes antioxidantes y antimicrobianos para formar empaques activos como son los compuestos fenólicos y aceites esenciales (Espitia *et al.*,

2014). La mayoría de los polisacáridos naturales utilizados como recubrimiento en alimentos están la pectina, dextrina, agar, agarosa, carrageninas y celulosa son de naturaleza ácidas. Por otra parte, un biopolímero últimamente muy utilizado, es el quitosano, el cual es de naturaleza básica (Shukla *et al.*, 2013).

Este biopolímero presenta propiedades especiales como viscosidad, solubilidad, capacidad para formar películas y recubrimientos, también tiene el potencial de unirse a células microbianas y de mamíferos. Croiser y Jerome (2013), describen las propiedades del quitosano entre las que se encuentran la actividad antibacteriana, antifúngica, que puede ser fácilmente biodegradable en residuos no tóxicos y su velocidad de degradación está relacionada con el grado de desacetilación. Sudheesh *et al.* (2013), mencionan que el quitosano es un polímero que tiene inmensas posibilidades estructurales para la química y la modificación mecánica para generar nuevas propiedades y funciones en diferentes campos, entre ellos la alimentaria. Hace referencia a que el quitosano es biocompatible, biodegradable, biorenovable y no tóxico, es un producto natural derivado de la quitina, es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa, este se deriva de exoesqueletos de insectos, crustáceos, moluscos, crustáceos y las paredes celulares de hongos. Es conocido por ser degradado en los vertebrados predominantemente por enzimas bacterianas en el colon, se ha demostrado que una variedad de microorganismos en el tracto digestivo de los humanos degrada la quitina y el quitosano (Dash *et al.*, 2011).

Quitosano como Materia Prima para el Control de Patógenos

En la industria cárnica se utilizan una amplia variedad de empaques, una de ellas son las películas plásticas, las cuales son estructuras independientes que envuelven al alimento con la finalidad de prevenir el deterioro, alargar su vida de anaquel y proteger al producto contra daños mecánicos, además de facilitar la distribución y comercialización (Sánchez *et al.*, 2014). Los materiales más utilizados para elaborar películas de empaque son polímeros a base de petroquímicos por sus grandes ventajas como disponibilidad, bajo costo y

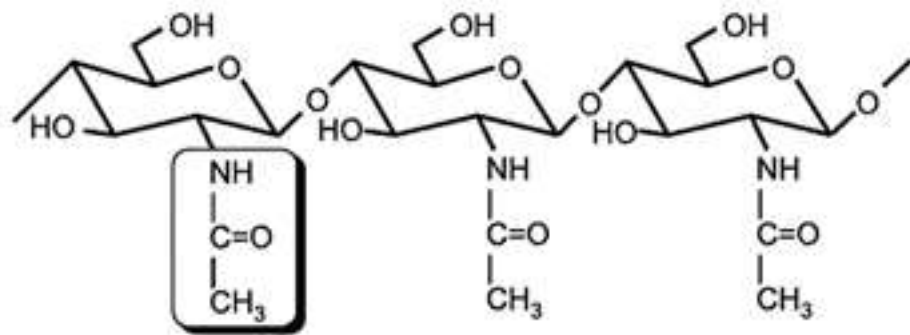
propiedades funcionales adecuadas para la preservación del alimento. Pero estos materiales no son biodegradables, ocasionando un serio problema ambiental. Por tal motivo surge la necesidad de realizar estudios en el campo de películas y recubrimientos biodegradables, comestibles, con propiedades antimicrobianas y sin repercusiones toxicas para los humanos (Alves, Mail, Beléia y Grossman, 2007).

El quitosano, a través de varios estudios, ha sido reconocido y utilizado en la industria alimentaria, farmacéutica y biomédica para algunas aplicaciones (Lou *et al.*, 2011). Debido a su bioactividad, el quitosano es un polímero formado por monómeros los cuales se encuentran unidos por enlaces β (1-4), es el segundo compuesto más abundante de la naturaleza y deriva a partir de la desacetilación de la quitina presente en el exoesqueleto de los artrópodos y zooplancton marino formando parte de la pared celular de algunas familias de hongos y levaduras ver (Figura 1). Se utiliza con frecuencia en la producción de mezclas de polímeros puesto que puede mejorar la flexibilidad y ductilidad de la mezcla de compuestos de carácter rígido. Este componente tiene muchas propiedades atractivas tales como excelente solubilidad en un medio acuoso, baja toxicidad, biocompatibilidad y la flexibilidad de la cadena; además, es indigerible pero es rápidamente excretado del cuerpo a través de los riñones. Este biopolímero derivado de la desacetilación de la quitina, ha sido bien documentado por su actividad antibacteriana (Liu *et al.*, 2012).

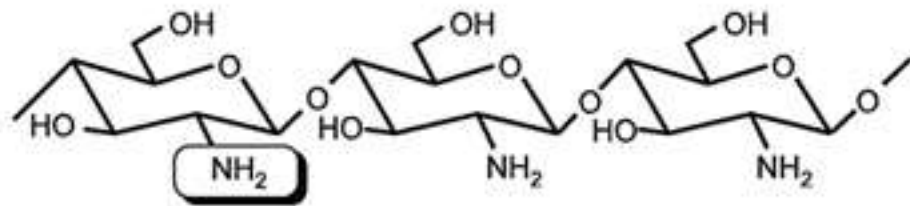
El mecanismo de acción antimicrobiana del quitosano y sus derivados son aún desconocidos. Sin embargo, en la actualidad existen varios mecanismos que han sido propuestos. El más aceptable es la interacción entre las cargas positivas de este compuesto y las cargas de las membranas celulares lo que resulta en la pérdida de componentes intracelulares (Muzzarelli, 2009). No obstante, hay poca información disponible sobre el efecto y el modo de acción del quitosano sobre el mecanismo de resistencia de los microorganismos como bacterias con relación en plantas y humanos (Xu *et al.*, 2011). Y a pesar de sus propiedades

antimicrobianas únicas, la aplicación de quitosano como conservante de alimentos u otros usos están limitados por su insolubilidad a pH neutro o básico.

Por lo tanto, se han realizado estudios e investigaciones aplicadas al desarrollo de procedimientos adecuados para la preparación de recubrimientos con derivados funcionales a partir de compuestos de quitosano, con el propósito de aumentar su efectividad contra la inhibición de microorganismos patógenos como los ya mencionados anteriormente (Samelis *et al.*, 2001).



Quitina



Quitosano

Figura 1. Estructura de quitina y quitosano en la naturaleza.

III. HIPOTESIS

La incorporación de extractos de propóleos en un recubrimiento de quitosano genera capacidad antioxidante e incrementa su potencial antimicrobiano, extendiendo la vida útil en carne de bovino.

OBJETIVOS

Objetivo General

Desarrollar y caracterizar un recubrimiento a base de quitosano y extractos de propóleos con propiedades antioxidantes y antimicrobianas para utilizarse como recubrimiento en carne de bovino.

Objetivos Específicos

1. Establecer las condiciones de elaboración de un extracto de propóleos miscible en solución de quitosano.
2. Analizar la composición de compuestos fenólicos en el recubrimiento a base de quitosano y extracto de propóleos por FTIR, así como determinar sus propiedades fisicoquímicas (pH, espesor y color).
3. Evaluar las propiedades mecánicas (espesor de la película, módulo elástico, esfuerzo máximo y elongación máxima) del recubrimiento comestible a base de quitosano y extracto de propóleos.
4. Determinar la capacidad antioxidante (DPPH, poder reductor, fenoles totales, flavonoides) y antimicrobiana (CMI) del recubrimiento comestible a base de quitosano y propóleos.

- 5 Evaluar el efecto de la aplicación del recubrimiento comestible de quitosano y con extracto de propóleos sobre las características fisicoquímicas (TBARS, pH y color) y microbiológicas (psicrótrofos mesófilos aerobios) en dos músculos de bovino (*M. Triceps brachii* y *M. semimembranosus*), durante su almacenamiento a 2°C por 72 h.

IV. METODOLOGÍA

Para la realización de este trabajo, este se dividió en dos etapas:

a) Etapa 1 consistió en la caracterización de los recubrimientos y b) Etapa 2 la aplicación de los mismos.

Desarrollo de la Etapa 1

Obtención de la Materia Prima

El quitosano utilizado fue del tipo comercial de la marca Sigma, con grado de acetilación del 75%, soluble en ácido acético con densidad de 0.15-0.3 g/cm³ a partir de desechos de camarón. El propóleo utilizado fue recolectado en Pueblo de Álamos, municipio de Ures, Sonora (29°07' 129"N), y procesado en el Laboratorio de Investigación de la Carne y Productos Cárnicos de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal (CTAOA) del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD), almacenándose en una cámara de congelación a -20 °C hasta su utilización. Las piezas de carne de ganado bovino utilizadas en este experimento fueron obtenidas de una planta TIF de la localidad, proviniendo éstas de dos músculos, uno del cuarto trasero M. *Semimembranosus* (S) y otro ubicado en el cuarto delantero M. *Tríceps brachii* (TB), ambos fueron almacenados a 0 ± 2 °C, previamente empacados al vacío hasta su utilización, en un tiempo no mayor a 48 h *postmortem*.

Obtención de los Extractos de Propóleos

Los compuestos bioactivos de propóleos fueron obtenidos mediante la técnica de extracción etanólica propuesta por Hernández (2007) con algunas modificaciones, lo cual consistió en utilizar 238 g de propóleos en 500 ml de etanol grado analítico, colocados en un matraz Erlenmeyer, los cuales se agitaron en placa por 48 h; posteriormente se filtró en papel Whatman #1 y los residuos del filtrado se añadieron nuevamente al matraz, se agregaron 50 ml de etanol nuevo y se agitaron por 24 horas. El producto se filtró con el mismo tipo de papel y el sobre nadante se depositó en un frasco ámbar para su almacenamiento en refrigeración, para posteriormente realizar una concentración. Finalmente se eliminó el solvente en un evaporador rotatorio (Büchi RE 121), con bomba vacío Master Cool modelo B-97 a temperatura constante (35 °C). El rendimiento de los extractos de propóleos se determinó en base a la cantidad de propóleos inicial y la cantidad de extracto obtenido. El extracto concentrado se liofilizó y se mantuvo en congelación de -20 °C hasta su utilización.

Actividad Antioxidante de los Extractos de Propóleos

La medición de la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de propóleos se realizó mediante las técnicas de fenoles totales, flavonoides, (%) inhibición del radical DPPH, y poder reductor (Valencia *et al.*, 2012).

Para optimizar la presentación de estas cuatro metodologías, se detalla de forma puntual cada una de estas:

Inhibición del radical DPPH (%). Para medir el porcentaje de inhibición del radical DPPH, inicialmente se disolvieron 5 mg del reactivo 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl en 25 mL de etanol, posteriormente se agitó para homogenizar la

solución, quedando sus valores de absorbancia entre 0.9 y 1.0, de no ser así, la absorbancia se ajustó añadiendo soluto al solvente. Se realizaron diluciones del extracto a concentraciones 100, 50, 25 y 12.5 µg/mL de muestra en etanol grado reactivo, en microtubos, por triplicado se agregaron 50 µL de cada una de las concentraciones, paralelamente se tomó como estandar de comparación una muestra de 5 mg/mL de ácido ascórbico en una mezcla de agua y etanol 7:3 (v/v), la cual fue homogenizada durante 2 min, seguidamente se adicionó 50 µL, nuevamente se homogenizo y se procedió a incubar a baño María durante 20 min a 50 °C. Las absorbancias fueron obtenidas a 517 nm en un espectrofotómetro (Genesys 5, Thermo Scientific).de UV-visible.

Fenoles totales. Para llevar a cabo su análisis, se realizaron diluciones para una curva de equivalencia, para lo cual se usaron concentraciones desde 1000 µg/mL hasta 0 µg/mL de ácido gálico en etanol. Las muestras de propóleos se analizaron a una concentración de 5 mg/mL de etanol. Se tomaron 50 µL de cada muestra y se agregaron a microtubos, seguidamente se adicionó a cada tubo 400 µL de agua destilada y 200 µL al 0.25 N de reactivo Folin-Ciocalteu, se homogenizo durante un minuto, posteriormente fueron adicionados 300 µL al 5% de carbonato de sodio y por último 400 µL de agua destilada, a continuación se procedió a incubar durante 60 min a obscuridad total y posteriormente se determinó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro (Genesys 5, Thermo Scientific) de UV-visible. Los resultados de las concentraciones fueron expresados como mg equivalente de ácido gálico por gramo de extracto.

Poder reductor. Para determinar el poder reductor, se procedió a realizar diluciones de 100, 50, 25 y 12.5 µg/mL de Q así como de Q+EP, paralelamente se midió 5 mg/mL de ácido ascórbico en una mezcla agua-etanol 7:3 (v/v) homogenizado durante 2 min. Se agregaron 100 µL de cada muestra en microtubos por triplicado, se agregó 300 µL de fosfato de sodio dibásico a pH 6.6,

se homogenizaron y se adicionaron 300 μ L al 1% de ferrocianuro de potasio, se homogenizó de nuevo y se dejó incubar a baño María por 20 min a 50 °C. Una vez finalizado la incubación, se agregó a cada tubo 300 μ L al 10% de ácido tricloroacético (TCA), se homogenizó durante un minuto y se procedió a centrifugar a 6000 revoluciones por minuto durante 5 min, finalizado el centrifugado se tomaron 500 μ L del sobrenadante y se transfirieron a nuevos microtubos, se agregaron 250 μ L de agua destilada y 250 μ L al 0.1% de cloruro férrico, nuevamente se homogenizo y se dejó reposar durante 5 minutos. Posteriormente se determinó la absorbancia a 700 nm en un espectrofotómetro (Genesys 5, Thermo Scientific) de UV-visible. Los resultados de las concentraciones fueron expresados como absorbancias.

Flavonoides. Para la determinación de Flavonoides, se realizaron diluciones para la realización de una curva de equivalencia, en la que usaron concentraciones desde 1000 hasta 0 μ g/mL de rutina en etanol. Las muestras de Q y Q+EP fueron diluidas y se analizaron a una concentración de 5 mg/mL de etanol. Fueron agregados 50 μ L a cada muestra en microtubos por triplicado, posteriormente se añadieron 650 μ L de metanol, se homogenizó en un vortex (Vortex mixer, Thermo) durante 30 s, posteriormente se adicionó 50 μ L al 2.5% de cloruro de aluminio, se homogenizó nuevamente, el cual se preparó con 0.125 g de cloruro de aluminio y con 4.875 mL de metanol grado reactivo, fue sonicado (brandosn) durante 5 min. Una vez añadido del cloruro de aluminio fue homogenizado por 30 s en un vortex, posteriormente se agregaron 650 μ L de metanol grado reactivo; se homogenizo nuevamente en un vortex por un tiempo de 30 s, los tubos fueron puestos en condiciones de obscuridad por un tiempo de 30 min para incubarlos y posteriormente leer a una absorbancia de 412 nm en un espectrofotómetro (Genesys 5, Thermo Scientific).

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria

Para la actividad antimicrobiana de los RC de quitosano y Q+EP, se utilizaron 4 cepas de microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213B, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella typhi* ATCC14028, proporcionadas por el Laboratorio de Lácteos de CIAD. La metodología utilizada fue la mínima inhibitoria (CMI) utilizando el método de difusión en microplaca propuesto por la National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003). Las cepas bacterianas fueron pre-enriquecidas en agar BHI hasta lograr una densidad óptica igual a la lectura del estándar de 0.5 de Mcfarland y posteriormente cultivadas en microplacas e incubadas a 35 ± 2 °C por 48 h, realizando un monitoreo a la hora 0, 6, 12, 18, 24 y 48 de incubación. Una vez desarrollado el crecimiento bacteriano, se agregaron, a las placas, alícuotas de cada concentración de extracto de propóleos en solución de quitosano a las concentraciones de: 400, 200, 100 y 50 µg/ml. La actividad antimicrobiana fue determinada por medición de densidad óptica a 620 nm (DO_{620}) en un lector de microplacas Ops MR (Dinex Technologies, Chantilly, USA).

Preparación del Recubrimiento con Actividad Antioxidante y Antimicrobiana a base de Quitosano y Propóleos

El recubrimiento a base de quitosano y con extractos de propóleos se obtuvo siguiendo la metodología propuesta por Arayra (2010), con algunas modificaciones, la cual consistió en pesar 1 g de quitosano al 75 % de desacetilación (Sigma Referencia 448877) aforado en 100 ml de ácido acético a una concentración de 0.3 M. La solución de quitosano al 1 % (p/v) se obtuvo por agitación durante 6 horas a temperatura ambiente. Una vez disuelto el Q 1% (p/v) se procedió a incorporar una solución madre del extracto de propóleos hasta alcanzar una concentración de 0.3 mg/ml obteniendo una lectura de pH a 4.7, dicha incorporación fue mediante una hora en agitación para su homogenización.

Los recubrimientos comestibles (RC) obtenidos fueron quitosano (Q) y quitosano con extractos de propóleos (Q+EP). Para la formación de películas a partir de las soluciones previamente elaboradas, estas fueron hechas tomando 20 mL de Q así como de Q+EP y fueron vertidas en cajas Petri dejando a secar a temperatura ambiente y en condiciones de luz natural.

Determinación de Analitos en el Recubrimiento de Quitosano con Propóleos

Una vez elaborado los recubrimientos se procedió a su análisis por la metodología de infrarrojo por FTIR tomando muestras representativas de forma aleatoria con dimensiones de 1 x 2 cm, la obtención de los espectros se realizó en forma de películas. Los espectros se obtuvieron por el promedio de 16 barridos en la región de 400 a 4000 cm^{-1} en un espectrofotómetro FTIR modelo Spectrum GX (Perkin Elmer, Shelton, CT, USA).

Absorbancia Específica del Espectro UV-Visible de las Películas

La caracterización de las películas de quitosano y de quitosano con propóleos, se realizó mediante la técnica de UV-Vis, para lo cual se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento que se describe a continuación: se obtuvieron muestras representativas de cada una de las películas, con dimensiones de 1 X 3 cm, a las cuales previamente se les determinó el espesor, con un micrómetro modelo MDC-1SB (Mitotuyo Digimagic, Kawasaki, Japón). Posteriormente, se colocó la película en un espectrofotómetro modelo Lambda 20 (Perkin Elmer, Shelton, CT, USA), donde se obtuvo el espectro de absorción electrónica en el rango de 190 a 1100 nm. Una vez realizado esto, se calculó la absorbancia específica (ϵ) de los extractos de propóleos analizados de acuerdo a la metodología reportada por Miyataka *et al.* (1997), y posteriormente se calculó la concentración del propóleos

presente en las películas, utilizando la ecuación de Lambert-Beer, siendo esta la siguiente:

$$A = (\epsilon) (b) (c) \dots \dots \dots (1)$$

Donde (A) es la absorbancia máxima, (ϵ) el coeficiente de absorción específica, (b) la distancia recorrida por el haz de luz en cm y (c) es la concentración en mg.

Determinación del Color en los Recubrimientos Comestibles

Para la determinación del color de los RC, se utilizó un espectrofotómetro de reflectancia marca Minolta modelo CM508D, previamente calibrado. La medición de los recubrimientos Q y Q+EP se realizó registrando los parámetros CIE (Comisión Internacional de l'Eclairage, 1978) L*(luminosidad), a*(índice de rojo), b* (índice de amarillo), C*(chroma) y h* (hue), que consistió en utilizar celdas de cuarzo translucidas con dimensiones de 10x20x30 mm, en la cual se vertieron las soluciones de Q y Q+EP, posteriormente se procedió a tomar las mediciones colocando las celdas que contenían el recubrimiento en el sensor y dirigiéndolo al aire, evitando con diagonal ascendente a contra luz cualquier superficie debajo de las celdas que interfiera con la medición. Se realizaron 10 mediciones por muestra. El iluminante que se utilizó fue el A/10.

Propiedades Mecánicas de las Películas Formadas con la Solución de Quitosano y Propóleos

La medición de las propiedades mecánicas de los recubrimientos se realizó de forma instrumental, determinando las propiedades de tensión y elongación utilizando un analizador de textura TA-XT2 (Texture Technologies Co., Scardale, NY. USA) de acuerdo a la norma ASTM-D-882-91. El accesorio utilizado en la evaluación de estas propiedades está conformado por un par de mordazas, una

móvil y otra fija, que sujetan a la muestra, donde una celda registra la fuerza aplicada en un panel de control. Previo a la medición, las muestras se ajustaron a un espesor de 0.519 ± 0.085 mm mediante un micrómetro marca Mitutoyo Digimagic modelo MDC-1SB (Kawasaki, Japón). Las muestras se cortaron en tiras de forma similar a la de una cinta adhesiva, con dimensiones de 6x1 cm. Las condiciones bajo las cuales se realizó esta prueba fueron utilizando una carga de 20 g y una velocidad de cabezal de 10 mm/s. Con esta prueba se determinaron límite y módulo de elasticidad, esfuerzo máximo de tensión y esfuerzos al corte, así como los porcentajes de elongación de las diferentes películas.

Desarrollo de la Etapa 2

Para la aplicación de los recubrimientos y analizar posteriormente los cambios fisicoquímicos presentados en muestras de carne, se aplicaron de forma estratégica en dos músculos:

- El primero localizado en el cuarto trasero de la canal de bovino siendo este el M. *Semimembranosus* y el otro músculo M. *Tríceps brachii* (con hueso) ubicado en el cuarto delantero de la canal, ambos músculos fueron de 48 h *post-mortem*; para una mejor ubicación de cada musculo ver anexo 1.
- Los recubrimientos Q y Q+EP se adicionaron en volúmenes de 25 mL a cada músculo (con dimensiones de 1.5x6x8 cm por pieza de carne) por inmersión durante 5 minutos, posteriormente se secaron al aire durante 48 horas y almacenados en un cuarto refrigerado a 0 ± 2 °C.
- El tiempo 0 fue considerado a las 48 h *postmortem* y las muestras se almacenaron por 72 h. En total fueron 32 muestras de carne, distribuidas en 16 por músculo. Los análisis realizados se llevaron a cabo cada 24 h, siendo estos: pH, color, TBARS.

Determinación de Cambios Fisicoquímicos (TBARS, pH y Color)

Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para conocer los niveles de oxidación de los lípidos en los músculos analizados y a los que se les aplicaron los RC, se realizó la cuantificación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) a lo largo del almacenamiento, siguiendo la metodología descrita por (Pfalzgraf, Frigg, y Steinhart, 1995). Mediante esta técnica se determinó los productos secundarios de la oxidación lipídica (compuestos de malonaldehído (MA)). Se tomaron las unidades experimentales a las dimensiones anteriormente mencionadas, tomando la zona superficial a no más de 0.5 cm de profundidad de cada lado de las piezas de carne previo a la homogenización. Esta determinación consistió en homogenizar 10 g de muestra con 20 mL de ácido tricloroacético al 10% por 60 s (11000 rpm) empleando un homeginzador (Ultraturax marca IKA, modelo T25). El homogenizado se centrifugó por 20 min a 5 °C en una centrifuga (Beckham, Modelo J2-21) a 4300 rpm. El sobrenadante se filtró a través de papel filtro Whatman #1. Posteriormente se tomaron 2 mL del sobrenadante y se mezclaron con un vortex con 2 mL de TBA 20 mM. Los tubos se colocaron en Baño María a una temperatura de 97 °C por 20 min; posteriormente se enfriaron a temperatura ambiente para tomar lectura de absorbancia a 531 nm en un espectrofotómetro (Perkin Elmer, USA) de UV-visible. Las concentraciones de TBARS fueron expresadas con unidades mg MA/Kg muestra.

Determinación de pH. La determinación del pH se realizó siguiendo la metodología descrita por Torrescano *et al.*, (2003), utilizando un potenciómetro modelo 211 Hanna Instruments, que tenía acoplado un electrodo de vidrio previamente calibrando. Las muestras de músculo, previamente adquiridas en el análisis de TBARS, fueron trituradas y homogenizadas utilizando un homogeneizador ultraturax modelo T25 (marca IKA), donde a 5 g de carne se le

adicionó 45 ml de agua destilada, procediendo a homogenizar a 9500 rpm durante 20 a 30 segundos, Las mediciones se realizaron por triplicado, el pH de cada medida corresponde al valor promedio de las tres lecturas.

Determinación de color en carne. La medición del color de las piezas de carne con el RC, fueron analizadas utilizando un espectrofotómetro de reflectancia marca Minolta modelo CM508D, previamente calibrado. La medición de los recubrimientos Q y Q+EP se realizó registrando los parámetros CIE (Comisión Internacional de l`Eclairage, 1978) L*(luminosidad), a*(índice de rojo), b* (índice de amarillo), C*(chroma) y h* (hue). Se realizaron 10 mediciones en la superficie de cada muestra, cuidando no medir secciones con grasa para evitar interferencias en los valores obtenidos por pieza cárnica.

Análisis de Imagen de los Recubrimientos

El análisis de imagen es una técnica que se basa en la adquisición y digitalización de una imagen captada mediante la toma de una cámara a la cual se le adapta un objetivo óptico (microscopio).

Las mediciones se realizaron en base a la técnica de tinción con azul de toluidina de acuerdo a Torrescano-Urrutia (2002), con algunas modificaciones, utilizando un microscopio digital (DIGI Microscope UM6, China), a una potencia de 40X. La metodología consintió en preparar una solución de azul de toluidina al 0.05%, para posteriormente tomar muestras con dimensiones de 3x4x6 cm de cada músculo recubierto con Q y Q+EP y teñirlas sumergiéndolas en la solución durante 20 min para permitir una mejor fijación. Una vez teñidas se realizaron cortes transversales de 5 mm de espesor para su medición en el microscopio digital.

El análisis del espesor del recubrimiento, en mm, una vez cortadas las muestras, fue determinado obteniendo una imagen a 40X en formato TIFF y utilizando un software especializado en análisis de imagen del mismo proveedor.

Calidad Microbiológica

La calidad microbiológica (Log_{10} UFC/g) de las piezas de carne con los RC del experimento fue evaluada utilizando cuenta total de mesófilos y psicrótrofos de acuerdo a la NOM-110-SSA1-1994. Se prepararon diluciones decimales de las muestras (1×10^1 - 1×10^5) con buffer de fosfatos y se inocularon tomando con una micropipeta de 100 a 1000 μL , 1 mL de cada tubo y depositándolo en cajas Petri estériles, tomando las medidas de seguridad como lo marca dicha norma, utilizando como medio de cultivo agar para el recuento en placa (PCA) a temperatura de 40 ± 1 °C, las cajas se homogenizaron rotándolas cuidadosamente hasta lograr una distribución uniforme; una vez solidificado el agar, las cajas se invirtieron y se incubaron a 35 °C por 48 horas para los microorganismos mesófilos y 5 °C durante 10 días para los psicrótrofos. Por último para el cálculo numérico de los microorganismos presentes en las muestras se contaron las placas con crecimientos de 20 a 200 colonias y los resultados serán expresados como Log_{10} UFC/g.

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

El análisis estadístico fue un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 4x2, donde el factor (1) serán los tratamientos (control, extracto, quitosano, y quitosano con propóleos y el factor (2) serán los tipos de músculos (M. *Triceps brachii* y M. *Semimembranosus*); se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y en caso de haber diferencias, se realizó una comparación de medias Tukey-Kramer a un nivel de confiabilidad ($p < 0.05$) tomando en cuenta que las variables de respuesta fueron UFC, TBARS, color, capacidad antioxidante y pH. Esto fue realizado a través del programa estadístico NCSS (2007).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa 1

Análisis de los Recubrimientos por FTIR

La caracterización de Q y Q+EP se realizó mediante espectroscopia de infrarrojo (IR) en la región comprendida entre 400-4000 cm^{-1} . Estos espectros fueron obtenidos en un espectrofotómetro con transformadas de Fourier. En la Figura 2, se muestran los espectros de IR de las películas de Q y Q+EP. En el espectro se observan los picos de absorción correspondientes a quitina, conformados por los enlaces C-O y C=O y el grupo amina, los cuales presentan valores de 1088, 1639 y 1640 cm^{-1} , respectivamente; indicando que aún se encuentran grupos acetilo en los recubrimientos. En la misma figura también se observan bandas de absorción del grupo OH en la región de 3500 a 2500 cm^{-1} , además del estiramiento C-O primario y secundario, que se puede apreciar en las bandas 1154 y 1260 cm^{-1} . En el espectro de Q+EP estas bandas se encuentran más marcadas, lo cual muy probablemente se atribuya a la presencia de propóleos. Por otro lado, en el espectro de Q se observan las bandas de los grupos funcionales característicos de esta molécula; igualmente, es evidente la presencia del grupo amino a 1614 cm^{-1} , observándose una mejor definición en las bandas de los grupos OH a 3412 y N-H a 2996 cm^{-1} , los cuales se relacionan con el espectro de la quitina, y a su vez asociado al tipo de desacetilación al que fue sometida. Adicionalmente se aprecian las bandas de los grupos C-H a 2960 cm^{-1} y piranósico, a 1088 cm^{-1} .

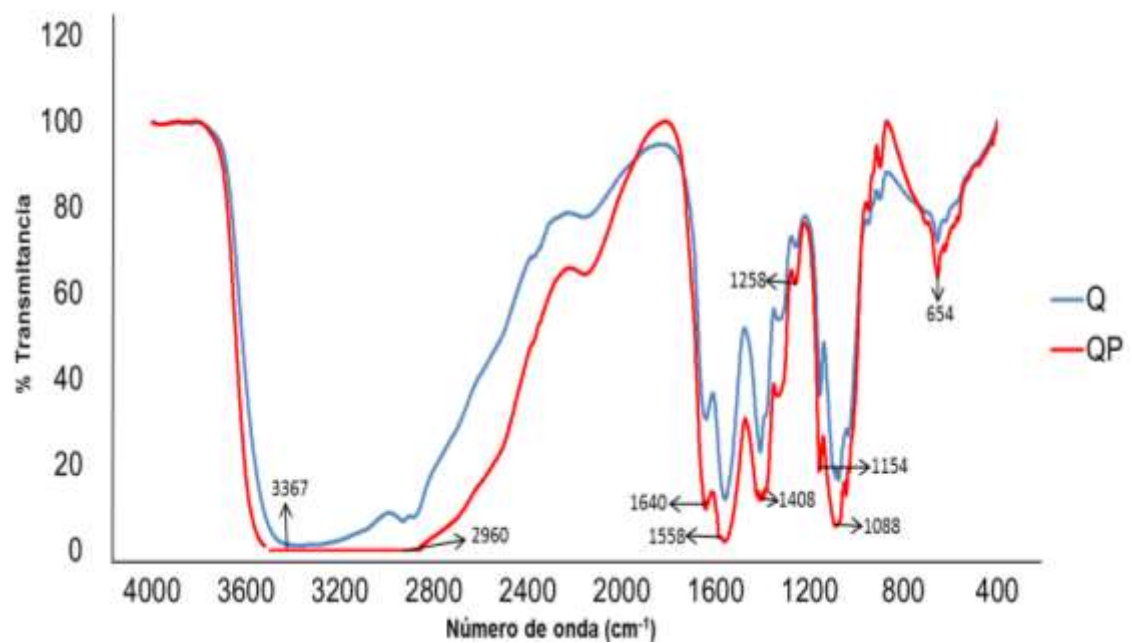


Figura 2. Longitud vibracional de películas de quitosano y quitosano con extractos de propóleos por FTIR.

Los resultados concuerdan con lo reportado por Hernández *et al.* (2009), quienes realizaron la obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón, obtenidos como subproductos de restaurantes de mariscos. Los resultados muestran los grupos C-O-C a 1014 cm^{-1} y piranósico a 1070 cm^{-1} . También se aprecia la banda del grupo OH a 3434 cm^{-1} , mientras que la banda correspondiente al grupo amina se encontró muy bien definida por el proceso químico al que fue sometida. Baltodano *et al.* (2009) realizaron un estudio para la obtención, caracterización y diseño de un ungüento a base de quitosano con efecto cicatrizante. Los resultados mostraron la presencia de un grupo carbonilo a un espectro vibracional que representa una banda a 1650 cm^{-1} , y una vibración secundaria del grupo amino con una banda a 1603.95 cm^{-1} ; ambos característicos de la presencia de quitina. En el espectro también se observa una banda a 3315.75 cm^{-1} , atribuido al grupo OH, y otra a 1636.33 , debido a la presencia del grupo amino primario, siendo ambos característicos a la presencia de quitosano; resultados que coinciden con los de este estudio.

Por otra parte, Vodnar (2012), realizó un estudio desarrollando películas antimicrobianas a base de quitosano incorporando compuestos bioactivos de té verde y negro (2 y 4%) para la inhibición del crecimiento de *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 en steak de pierna de cerdo. Al igual que en el presente estudio, la identificación de los compuestos bioactivos incorporados en las películas de quitosano se realizó por FTIR. Los resultados son similares a los de esta investigación, ya que el espectro de IR de las películas con y sin adición de extractos de té verde y negro muestra que los grupos OH que aparecen en la banda a 3327 cm^{-1} , indicaron las uniones intermoleculares del quitosano. La banda a 2897 cm^{-1} , correspondió al C-H, mientras que la banda a 1336 cm^{-1} correspondió al OH del agua.

Análisis de las películas de Q y Q+EP en el espectro de absorción UV-Vis

En la Figura 3 se muestran los espectros de absorción de las películas de Q y Q+EP. El espectro de la película de Q no muestra el pico de absorción característico de compuestos fenólicos, lo que coincide con lo reportado por Sionkowska *et al.* (2012), quienes determinaron la influencia de la irradiación de UV en las propiedades de las películas de quitosano con queratina. En sus resultados encontraron que las películas de quitosano no presentaron picos de absorción para compuestos fenólicos, comportamiento similar a lo obtenido en nuestro estudio. Por otro lado, al analizar la película de Q+EP se puede apreciar un pico bien definido centrado a 293 nm y un hombro a 247 nm, obteniendo una concentración de extractos de propóleos de 0.6 mg en las películas, atribuyendo la concentración más alta a lo esperado, muy probablemente debido a la deshidratación durante la formación de las películas. La posición y la forma de los picos de absorción también coinciden con los reportado por Martínez *et al.* (2012), quienes realizaron un estudio para caracterizar propóleos provenientes del municipio de Caldas (Antioquia, Colombia). En sus resultados presentaron la caracterización por UV-Vis de extractos de propóleos etanólicos, encontrando que dichos extractos presentaron máximos de absorción a las longitudes de onda de 296 y 280 nm, atribuidos a la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides. Al comparar los resultados obtenidos en la película de Q+EP, éstos indican que es posible que en la película se encuentran presentes compuestos de tipo fenólicos y/o flavonoides.

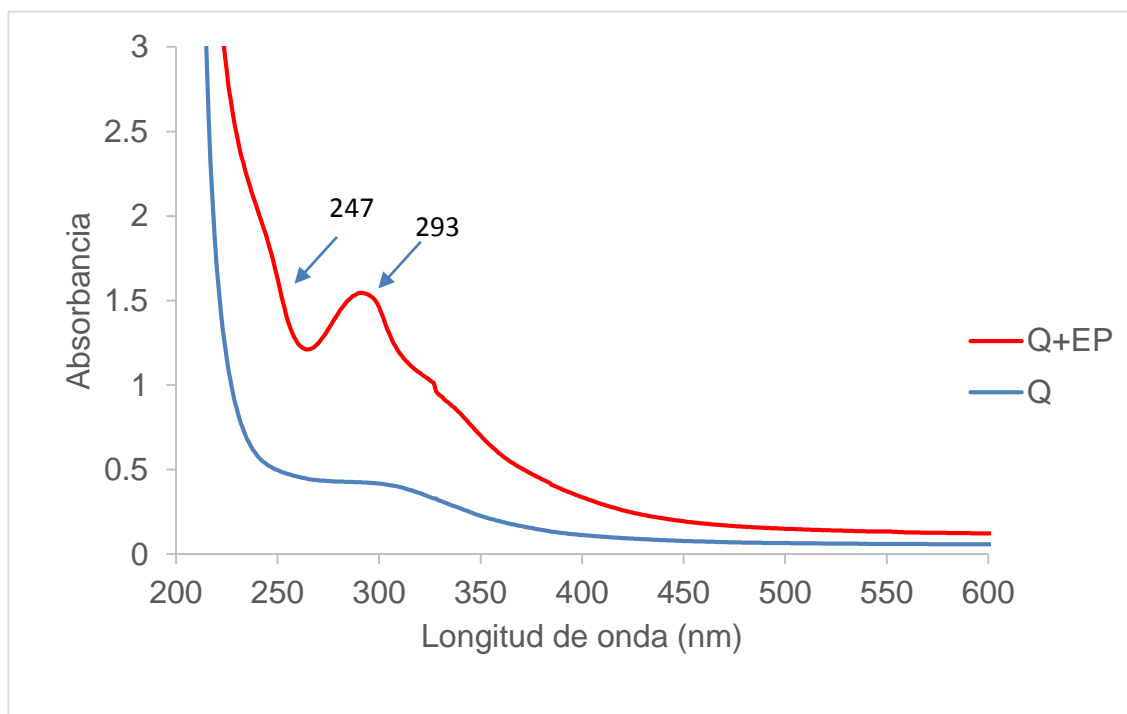


Figura 3. Espectro de absorción de películas de quitosano y de quitosano con extractos de propóleos por UV-Vis.

Análisis de Color de los Recubrimientos Previo a la Formación de Películas

Los resultados de los análisis de color realizados a los recubrimientos se muestran en la Figura 4, observándose que el valor L^* de Q+EP fue significativamente ($p < 0.05$) menor que el de Q (66.25 ± 0.17 y 64.51 ± 0.22 , respectivamente), lo anterior es quizá debido a la incorporación del propóleos en el recubrimiento, representando una menor luminosidad entre uno y otro. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el valor a^* , por lo que el índice de rojo tanto en Q como en Q+EP fueron iguales con valores de 0.05 ± 0.01 y 0.05 ± 0.01 , respectivamente. Otro parámetro de color evaluado fue el valor b^* , el cual fue mayor en Q+EP (4.70 ± 0.13), que fue significativamente diferente ($p < 0.05$) a Q (2.24 ± 0.08), indicando un tono más amarillo en el recubrimiento incorporado con propóleos. El mismo comportamiento se presentó en el valor de C^* o saturación del color, ya que los valores obtenidos en Q+EP y Q presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$), mostrando valores de 4.70 ± 0.13 y 2.25 ± 0.08 , respectivamente. Finalmente, respecto a hue, tanto para el Q como para Q+EP no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$), cuyos valores fueron 88.28 ± 0.65 y 88.13 ± 0.75 , respectivamente.

Análisis de Color de las Películas de Q y QP

Los resultados de los análisis de color realizados a las películas se muestran en la Figura 5, observándose que el valor L^* de Q+EP fue significativamente ($p < 0.05$) menor que el de Q (86.55 ± 2.61 y 92.96 ± 2.05 , respectivamente). Lo anterior es quizá debido a la incorporación del propóleos en la película, mostrando una menor luminosidad entre uno y otro. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el valor a^* , por lo que el índice de rojo tanto en Q como en Q+EP fue igual, con valores de 0.07 ± 0.07 y

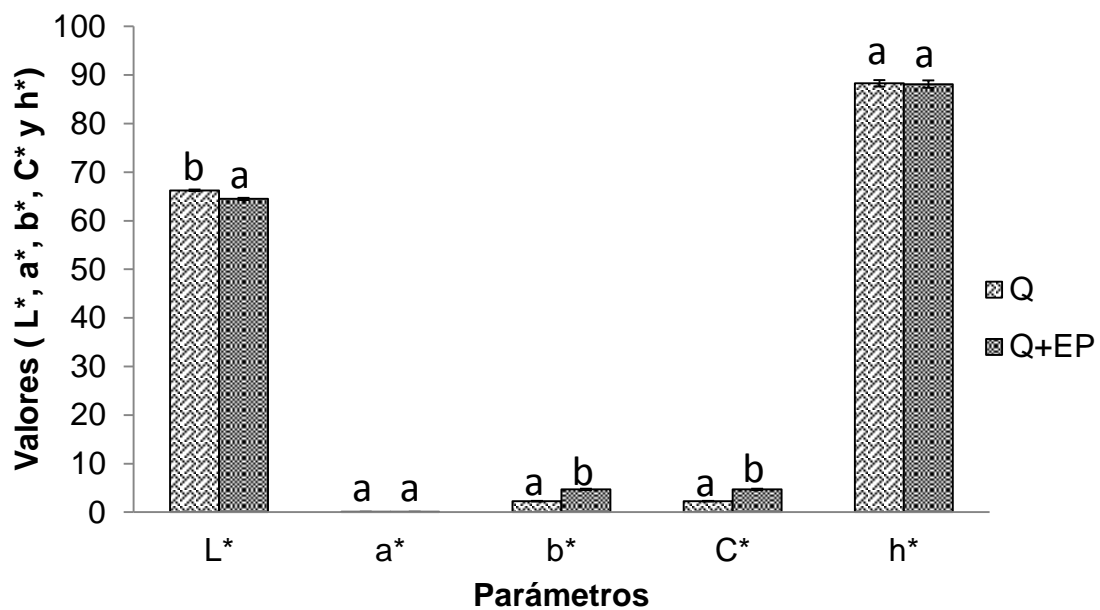


Figura 4. Color instrumental (L^* , a^* , b^* , C^* y h^*) de los recubrimientos comestibles Q y Q+EP. *Literales distintas son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).*

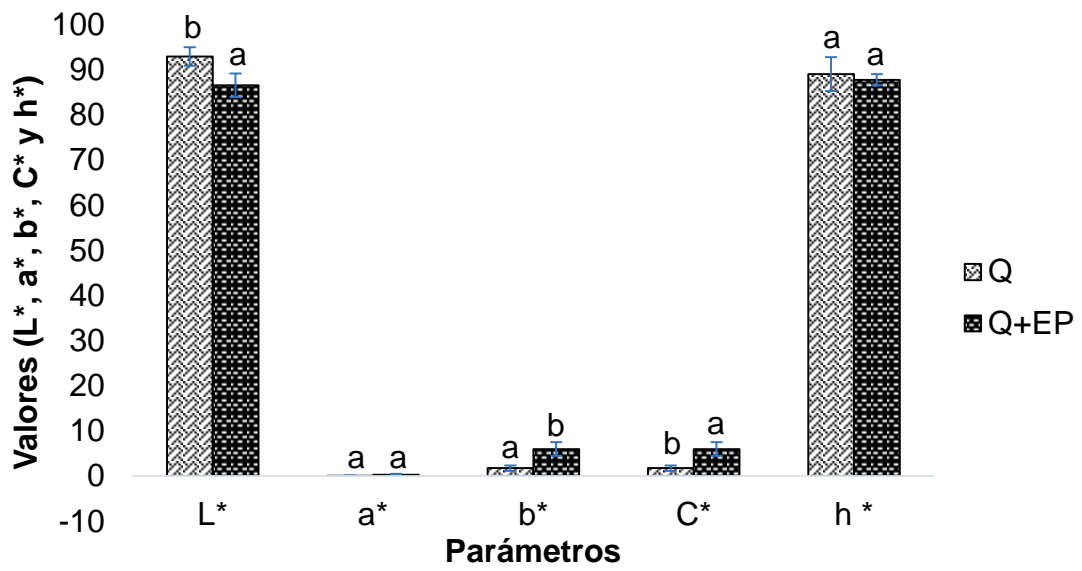


Figura 5. Color instrumental (L^* , a^* , b^* , C^* y h^*) de las películas comestibles Q y Q+EP. *Literales distintas son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).*

0.25±0.19, respectivamente. Otro parámetro de color evaluado fue el valor b^* , el cual fue mayor en Q+EP (5.94±1.52) que en Q (1.74±0.61), los cuales fueron significativamente diferentes ($p<0.05$), indicando un tono más amarillo en la película a la que se incorporó el extracto de propóleos. El mismo comportamiento se presentó en el valor de C, o saturación del color, ya que los valores obtenidos para Q+EP y Q presentaron diferencias significativas ($p<0.05$), mostrando valores de 5.95±1.52 y 1.74±0.60, respectivamente. Finalmente, respecto a hue, tanto para Q como para Q+EP no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$), cuyos valores fueron 89.01±3.76 y 87.77±1.24, respectivamente.

Los resultados de este estudio presentan un comportamiento similar a los reportados por Zamudio-Flores (2008), quien realizó una caracterización estructural de películas de quitosano adicionadas con almidón de plátano doblemente modificado mediante una oxidación y una posterior acetilación, a distintas concentraciones. Los resultados encontrados por este autor muestran que los valores de la película de Q, son similares a los de esta investigación, siendo estos los valores L^* de 97.25±1.40, a^* 0.12±0.011, b^* 6.45±0.145, C^* de 6.45±1.331 y para h^* obtuvo un valor de 88.93±1.531. Respecto a la adición de un material como el almidón oxidado, este tendió a impartir un color diferente en la película formada, al igual como sucedió en este estudio, disminuyendo los valores de L^* y h , por efecto de la adición del extracto de propóleos.

Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante de los Extractos de Propóleos y Recubrimientos

En la Tabla 1, se muestran los resultados del análisis de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante para el extracto y recubrimientos, observando diferencias ($p<0.05$) en el contenido de fenoles totales entre EP y Q+EP, con

Tabla1. Compuestos fenólicos de extractos de propóleos, Q+EP en Q y Q.

Compuestos	EP (mg/g)	EP en RC de Q (mg/g)	RC de Q (mg/g)	Vit. C (0.1 mg/ml)
Fenoles totales ¹	109.44 ± 0.15 c	90.53 ± 1.34 b	2.56 ± 0.76 a	ND
Flavonoides ²	30.53 ± 0.40 c	23.06 ± 0.53 b	ND	ND
Poder reductor ³	1.20 ± 0.02 d	1.07 ± 0.01 c	0.312 ± 0.00 a	0.98 ± 0.02 b

1 Expresado como mg equivalente de ácido gálico por gramo de extracto.

2 Expresado como mg equivalente de rutina por gramo de extracto.

3 Expresado como abs (700 nm).

ND= No detectado

valores de 109.44 ± 0.15 y 90.53 ± 1.34 mg/g, respectivamente. También se observa que en Q se obtuvo un valor más bajo (2.56 ± 0.76 mg/g), resultados expresados como mg de ácido gálico por gramo de extracto. En la misma tabla, se puede notar que el contenido de flavonoides tuvo diferencias significativas ($p < 0.05$) para EP y Q+EP obteniendo valores de 30.53 ± 0.40 y 23.06 ± 0.53 mg eq de rutina/g de extracto, respectivamente, apreciándose también que no hubo para el recubrimiento Q. Finalmente, en cuanto a los resultados de poder reductor, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) para EP, Q+EP y Q, con valores de 1.20 ± 0.02 , 1.07 ± 0.01 y 0.312 ± 0.0 , respectivamente. Los resultados de poder reductor son expresados como absorbancia (abs).

Los resultados de este estudio no coinciden con lo reportado por Jug *et al.* (2014), quienes estudiaron la actividad antioxidante, la capacidad quelante y antimicrobiana de extractos de propóleos obtenidos por diferentes métodos de extracción, a partir soluciones acuosas y etanólicas a diferentes porcentajes, así como varias temperaturas y condiciones de pH. En sus resultados obtuvieron cantidades de fenoles totales y flavonoides equivalentes al doble de lo obtenido en nuestros resultados, atribuyendo esto a la variación del porcentaje del solvente, al igual que al tipo de componentes presentes en el propóleos. Por otro lado, Valencia *et al.* (2012), realizaron un estudio para evaluar la composición química y actividad biológica de los propóleos en diferentes estaciones del año en el estado de Sonora, México. En sus resultados encontraron un contenido de fenoles totales y flavonoides mayor a lo obtenido en nuestro estudio, determinando que el contenido de compuestos fenólicos en los extractos de propóleos depende además del método de extracción, de la estación del año en la que son recolectados.

Capacidad Antioxidante de los Recubrimientos Comestibles por DPPH

En la Figura 6, se muestran los resultados de los análisis realizados para determinar la capacidad antioxidante del extracto de propóleos al igual que para los recubrimientos de Q y Q+EP mediante la técnica de DPPH, en esta se puede observar que a las concentraciones de propóleos utilizadas, todas presentaron actividad para captar el radical libre. En la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$, tanto para EP como Q+EP, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$), con porcentajes de 68.55 ± 2.16 y 75.99 ± 0.796 , respectivamente. También se puede apreciar diferencia significativa ($p < 0.05$) en la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ para EP y Q+EP, con porcentajes de 61.18 ± 1.02 y 64.15 ± 1.40 , respectivamente. Sin embargo, a la concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ de EP y Q+EP, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$), presentándose porcentajes de 55.82 ± 1.4 y 56.77 ± 0.88 , respectivamente. Finalmente, en lo referente a la concentración de 12.5 $\mu\text{g/mL}$, en EP y Q+EP no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$). Además, el Q mostró un porcentaje de 50.26 ± 2.93 , lo cual indica que por sí solo tiene actividad para captar al radical libre, aunque en menor escala.

A pesar de que los resultados obtenidos en nuestro estudio no coinciden con lo reportado por Valencia *et al.* (2012), en sus resultados establecieron que a mayor concentración de extractos de propóleos, mayor es el porcentaje de inhibición al radical libre, comportamiento similar a lo obtenido en nuestro trabajo. Sin embargo, estos resultados no coinciden con lo reportado por Navarro-Navarro *et al.* (2012), quienes determinaron la actividad antioxidante de extractos metanólicos de propóleos colectados en Magdalena de Kino y Sonoyta, en el estado de Sonora. En sus resultados observaron que los extractos de propóleos de Magdalena de Kino y de Sonoyta presentan una escasa a moderada actividad antioxidante, mientras que en nuestros resultados observamos una actividad antioxidante más alta.

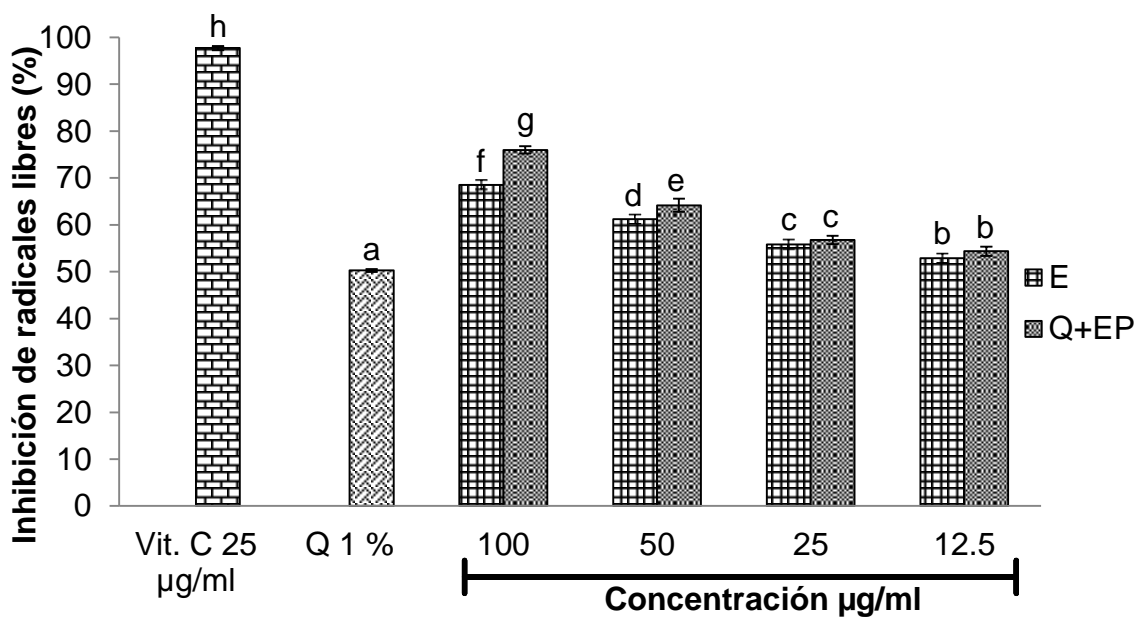


Figura 6. Capacidad antioxidante del extracto de propóleos y los recubrimientos Q y Q+EP por la técnica de DPPH. *Literales distintas son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).*

Pruebas Mecánicas de los Recubrimientos

Las propiedades mecánicas son importantes para películas comestibles, porque una resistencia mecánica adecuada garantiza la integridad de la película. En la Tabla 2, se incluyen los resultados de los análisis de las pruebas mecánicas realizadas a los RC, en las que se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el módulo elástico (también conocido como módulo de Young) entre Q y Q+EP, con valores de $1,995 \pm 3.65$ y $1,666 \pm 6.13$ Mpa, respectivamente, dejando en claro que al incorporar extractos de propóleos a la matriz de quitosano, éste provoca que sea menos elástico. También se observa que para el esfuerzo máximo no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre Q y Q+EP, con valores de 48.86 ± 2.55 y 41.43 ± 8.78 Mpa, respectivamente. Finalmente, respecto a la elongación máxima no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre Q y Q+EP obteniendo valores de 4.72 ± 1.34 y 5.65 ± 1.39 %, respectivamente.

Los resultados no coinciden con lo reportado por Martínez-Camacho *et al.* (2010), quienes realizaron un estudio con películas de quitosano, en el que evaluaron las propiedades térmicas, estructurales, antifúngica y mecánicas. En sus resultados correspondientes a la evaluación de propiedades mecánicas encontraron que la adición de sorbitol aumentó significativamente ($p < 0.05$) el módulo elástico con respecto a las películas control, siendo que para las películas control a su vez se encuentra un módulo de Young mayor a lo obtenido en este estudio. Sin embargo, los resultados son consistentes con lo reportado por Srinivasa *et al.* (2007), quienes observaron que las películas de quitosano eran más flexibles que las películas de quitosano plastificado con glicerol y polietilenglicol. En su estudio obtuvieron un módulo elástico similar a lo reportado en este estudio, no obstante los resultados de este estudio también difieren de lo reportado por Sun *et al.* (2014), quienes estudiaron las propiedades mecánicas de películas de quitosano al 1% con ácido gálico a distintas concentraciones.

Tabla 2. Propiedades mecánicas de Q y Q+EP.

Recubrimiento	Módulo elástico (Mpa)	Esfuerzo máx. (Mpa)	Elongación máx. (%)
Q	1,995.67 ± 3.65	48.86 ± 2.55	4.72 ± 1.34
Q+EP	1,666.65 ± 6.13	41.43 ± 8.78	5.65 ± 1.39

En sus resultados encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos, atribuyendo esto a la adición del ácido gálico, resultando que la concentración más baja dio el mayor esfuerzo máximo entre las películas, lo que podría atribuirse a la formación de enlaces de hidrógeno entre el grupo amino de quitosano y los grupos OH del ácido gálico, pudiendo ser el caso de esta investigación, que los grupos hidroxilos presentes provengan de los compuestos fenólicos del propóleo y reaccionen con los grupos amino del quitosano. Sin embargo, cuando la concentración de ácido gálico añadida fue aumentando el esfuerzo máximo fue disminuyendo, con lo que se especula que el ácido gálico no se dispersó homogéneamente, provocando una ruptura más rápida, determinando que este interactuaba con quitosano y afectó la formación de la estructura de la película. Lo que podría relacionarse con este estudio debido a que a pesar de que no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el esfuerzo máximo, fue notorio un descenso de éste al momento de adicionar extractos de propóleos a las películas de Q, pudiendo también ser debido a que no se llevó a cabo una distribución homogénea del compuesto en la solución.

Leceta *et al.* (2013), realizaron una caracterización y análisis antimicrobiano de películas a base de quitosano y determinaron las propiedades mecánicas de películas a distintas concentraciones de glicerol. En sus resultados encontraron que la concentración de glicerol afecta las propiedades mecánicas, ya que conforme la concentración fue aumentando la elongación máxima también aumentaba con diferencias significativas ($p < 0.05$), atribuyéndose al efecto de plastificación. Resultados que son similares a este estudio debido a que a pesar de que la concentración de propóleos no varió, la adición del extracto de propóleos a la matriz de quitosano provocó una disminución del esfuerzo máximo. Estos autores mencionan que una comparación con otras películas de quitosano es complicada, puesto que es necesario considerar el grado de desacetilación de la molécula, pesos moleculares, concentración de quitosano y del plastificante, así como la preparación de la película y las condiciones en las que fueron realizadas las pruebas. Sin embargo, en este estudio el esfuerzo

máximo y la elongación máxima fueron mayores en quitosano con 0% de glicerol contrastado con los tratamientos.

Análisis de Imagen de los Recubrimientos

En el Anexo 2, se muestran fotografías del análisis de imagen del recubrimiento a base de quitosano aplicado por inmersión, en el cual se muestra el espesor de los recubrimientos desarrollados en este estudio, que fue de 0.022 ± 0.006 mm. Este resultado difiere de lo reportado por Abugoch *et al.* (2011), quienes elaboraron películas a base de quinoa y quitosano con propiedades mecánicas y de barrera sin la utilización de plastificantes. En sus resultados encontraron un espesor menor al obtenido en el presente estudio, haciendo mención que el espesor de las películas y recubrimientos (por inmersión) depende de la naturaleza y composición del biopolímero utilizado. Por su parte Martíns *et al.* (2012), encontraron que diferentes concentraciones de quitosano aplicados como hidrocoloides generaron valores menores en relación al grosor del recubrimiento obtenido en este estudio. Sin embargo, nuestros resultados coinciden con lo reportado por Martínez-Camacho *et al.* (2010), quienes lograron obtener recubrimientos con un grosor de 0.03 ± 0.01 mm, a concentraciones de quitosano de 0.2 a 2%, estableciendo que la variación depende de la concentración de quitosano utilizada, así como del grado de desacetilación, lo cual podría estar relacionado con los resultados de este estudio.

Análisis de la Concentración Mínima Inhibitoria de los Recubrimientos

Con el fin de determinar la actividad antibacteriana, se evaluó el efecto de Q, EP y Q+EP sobre el crecimiento de dos bacterias Gram negativas (*E. coli* y *Salmonella typhi*) y dos bacterias Gram positivas (*Listeria innocua* y *Staphylococcus aureus*). En la Figura 7 se observa que el EP (400 µg/mL)

demonstró una fuerte actividad antibacteriana frente a *E. coli*, en contraste con Q a las demás concentraciones utilizadas. El recubrimiento Q+EP a 400 µg/mL fue el que tuvo un mejor efecto inhibitorio, mientras que para 200 y 100 µg/mL se observó un comportamiento similar como se observa en la Figura 8.

Los resultados no concuerdan con lo reportado por Navarro-Navarro *et al.* (2012), quienes determinaron la actividad antibacteriana (sobre dos bacterias Gram negativas y una Gram positiva) de extractos metanólicos de propóleos de Magdalena de Kino y Sonoyta, en el estado de Sonora. En sus resultados se encontró que los extractos de propóleos recolectados en Sonoyta no presentaron un efecto de inhibición sobre el desarrollo de *E. coli*. Esto puede atribuirse a la región en la que fue recolectado el propóleos, y a la época del año, debido a que el muestreo se realizó en la primavera mientras que en este estudio fue en otoño.

En la Figura 9, se muestra el comportamiento de *Salmonella typhi*, donde el EP a 400 µg/mL tiene un mejor efecto inhibitorio; sin embargo, EP 200 µg/mL mantiene un comportamiento similar hasta las 24 h. Mientras que EP 100 y 50 µg/mL ejercen un efecto inhibitorio muy parecido durante las siguientes 24 h. Todas estas concentraciones tuvieron DO menor, lo que se traduce en una capacidad de inhibición de microorganismos mayor, comparado con Q. Por otro lado, en la Figura 10, también se puede observar que para Q+EP a 400, 200 y 100 µg/mL, tuvieron un efecto de inhibición similar durante todo el periodo de incubación. Dejando en claro que el extracto de propóleos tiene un efecto mayor que el quitosano para inhibir a las bacterias Gram negativas. En la Figura 11, se observa el desarrollo de *Listeria innocua*, en donde Q demostró una mayor capacidad de inhibición en contraste con todas las concentraciones de EP utilizadas; sin embargo, EP 400 µg/mL tuvo un comportamiento similar a Q durante 24 h.

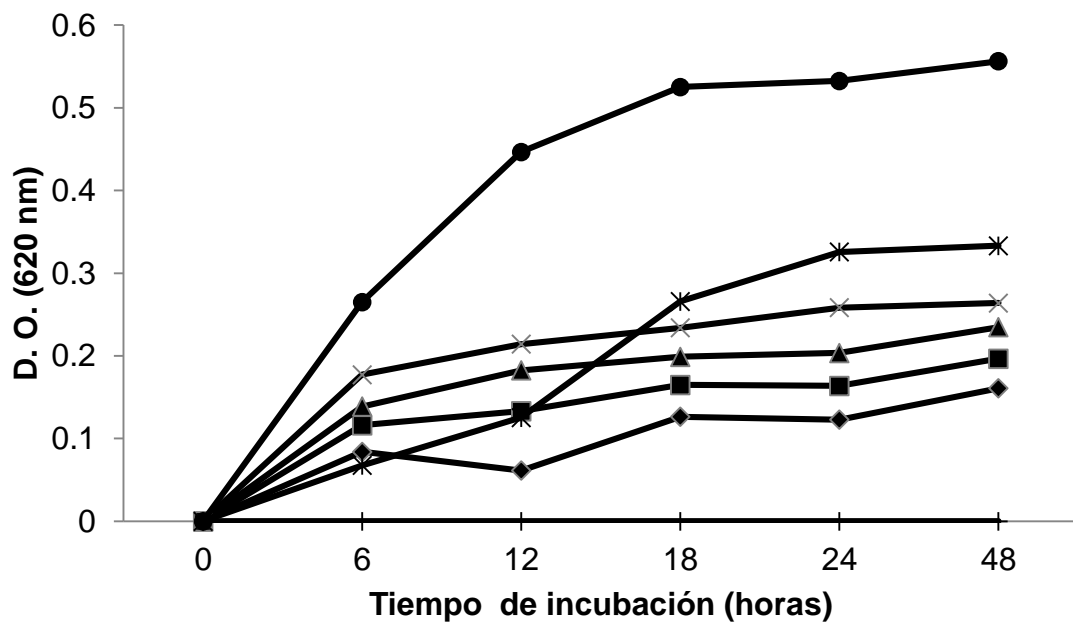


Figura 7. Efecto de diferentes concentraciones EP: 400 µg/mL (◆), 200 µg/mL (■), 100 µg/mL (▲), 50 µg/mL (x), quitosano (Q) 1 % (✱), BHI µg/mL (●) y Gentamicina (+) sobre la cinética de desarrollo de *Escherichia coli*.

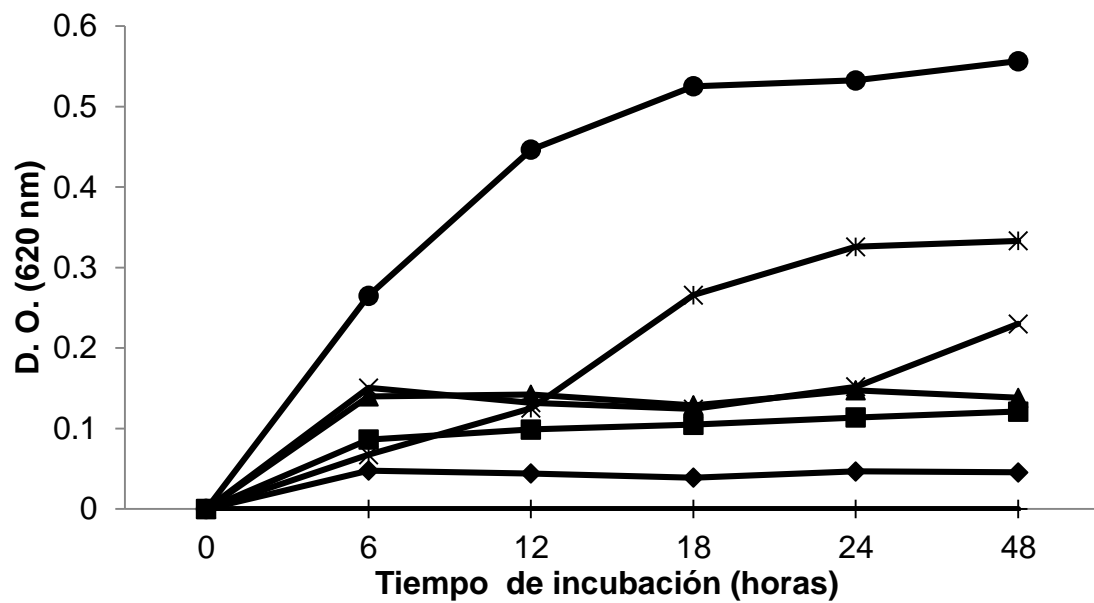


Figura 8. Efecto de soluciones de Q adicionadas con EP a diferentes concentraciones: 400 µg/mL (◆), 200 µg/mL (■), 100 µg/mL (▲), 50 µg/mL (x), quitosano (Q) 1 % (Ж), BHI µg/mL (●) y Gentamicina (+) sobre la cinética de desarrollo de *Escherichia coli*.

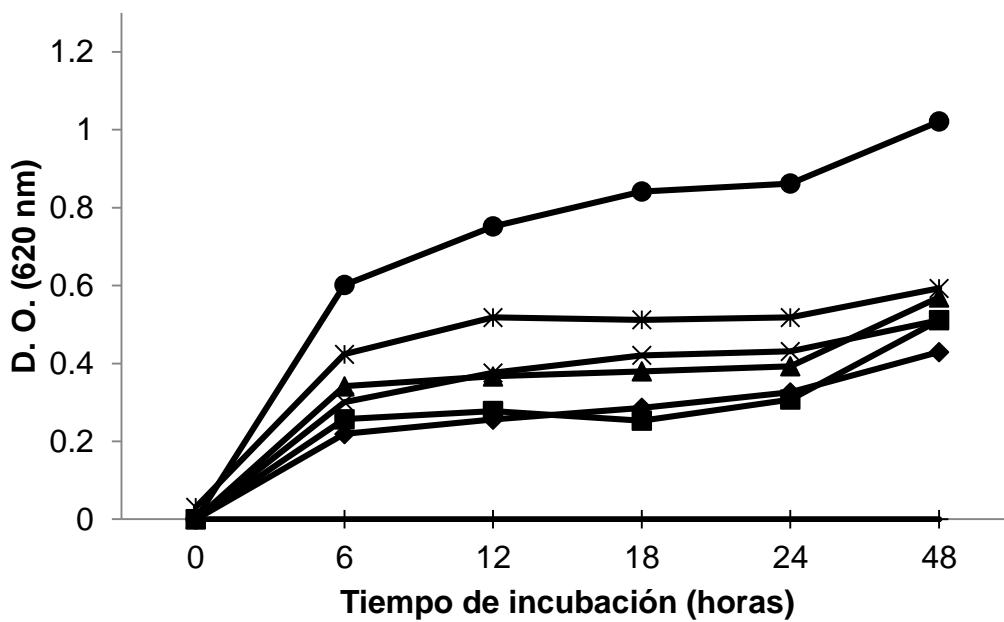


Figura 9. Efecto de diferentes concentraciones de EP: 400 µg/mL (◆), 200 µg/mL (■), 100 µg/mL (▲), 50 µg/mL (x), quitosano (Q) 1 % (Ж), BHI µg/mL (●) y Gentamicina (+) sobre la cinética de desarrollo de *Salmonella typhi*.

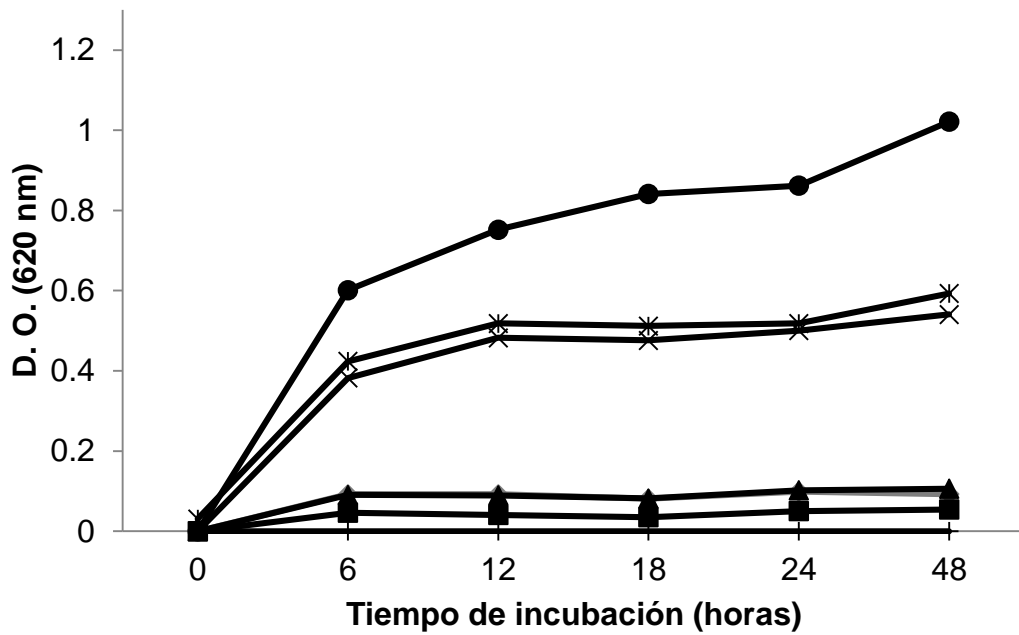


Figura 10. Efecto de soluciones de Q adicionadas con EP a diferentes concentraciones: 400 $\mu\text{g/mL}$ (◆), 200 $\mu\text{g/mL}$ (■), 100 $\mu\text{g/mL}$ (▲), 50 $\mu\text{g/mL}$ (x), quitosano (Q) 1 % (Ж), BHI $\mu\text{g/mL}$ (●) y Gentamicina (+) sobre la cinética de desarrollo de *Salmonella typhi*.

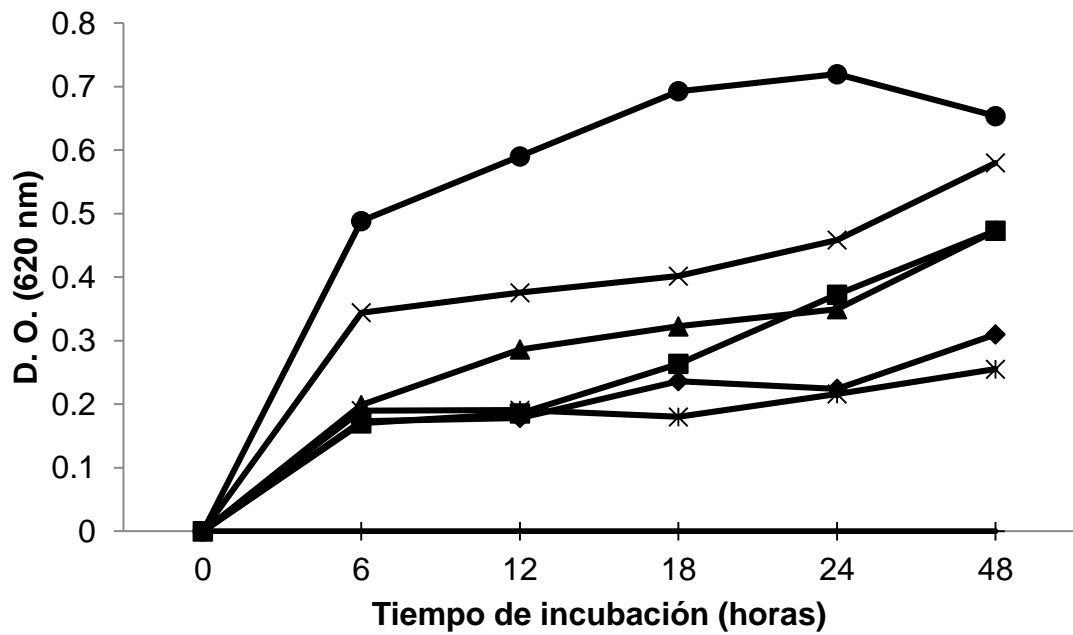


Figura 11. Efecto de diferentes concentraciones EP: 400 µg/mL (◆), 200 µg/mL (■), 100 µg/mL (▲), 50 µg/mL (x), quitosano (Q) 1% (Ж), BHI µg/mL (●) y Gentamicina (+) sobre la cinética de desarrollo de *Listeria innocua*.

En la misma figura se observa que EP a 100 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tuvieron el mismo comportamiento de inhibición entre las primeras 24 y 48 h. En la Figura 12, en el caso Q+EP 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, este fue el que presentó un mejor efecto inhibitorio mientras que Q+EP 200, 100 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se comportaron de manera similar, resaltando que todas las concentraciones de quitosano con extractos de propóleos tuvieron mejor efecto inhibitorio en el desarrollo de *Listeria innocua*, a diferencia de las concentraciones de EP. Finalmente para el desarrollo de *S. aureus*, como se observa en las Figuras 13 y 14, el EP 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mostró un efecto de inhibición mayor para este microorganismo; sin embargo, EP 200 tuvo un comportamiento similar durante 24 h en el periodo de incubación, observándose también que las concentraciones de Q+EP a 200, 100 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ impidieron el crecimiento de la cepa desde el inicio de la incubación, mientras que Q+EP 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue el que tuvo el mayor porcentaje de inhibición de todas las concentraciones utilizadas.

Hasta el momento, es posible apreciar que el quitosano ejerce un porcentaje de inhibición mayor sobre algunas bacterias Gram positivas, que a las pertenecientes a las Gram negativas. Estos datos en este estudio coinciden con lo reportado por Navarro-Navarro *et al.* (2012), quienes investigaron el desarrollo de *S. aureus*, *E. coli* y *Vibrio cholerae* frente a extractos metanólicos de propóleos en dos regiones de Sonora. En sus resultados encontraron que el propóleos colectado en la región de Magdalena de Kino tuvo efecto inhibitorio sobre bacterias Gram-negativas, comportamiento similar a lo que se obtuvo en este estudio. Sin embargo, los resultados no coinciden con lo reportado por Vodnar (2012), quien realizó un estudio para estimar el grado de inhibición de *Listeria monocytogenes* a partir de películas de quitosano incorporando extracto de Té verde y negro. En sus resultados se observó que Q no muestra un efecto inhibitorio a lo largo del periodo de incubación; sin embargo, quitosano con 2 % de té verde es suficiente para ejercer un efecto inhibitorio sobre *L. monocytogenes*.

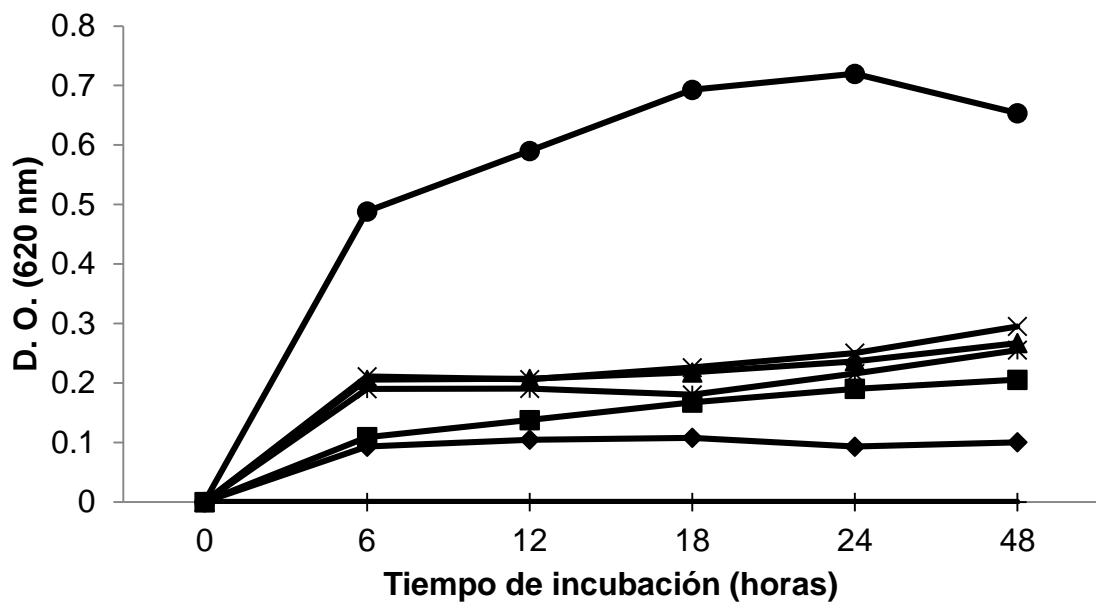


Figura 12. Efecto de soluciones de Q adicionadas con EP a diferentes concentraciones: 400 µg/mL (◆), 200 µg/mL (■), 100 µg/mL (▲), 50 µg/mL (x), quitosano (Q) 1 % (Ж), BHI µg/mL (●) y Gentamicina (+) sobre la cinética de desarrollo de *Listeria innocua*.

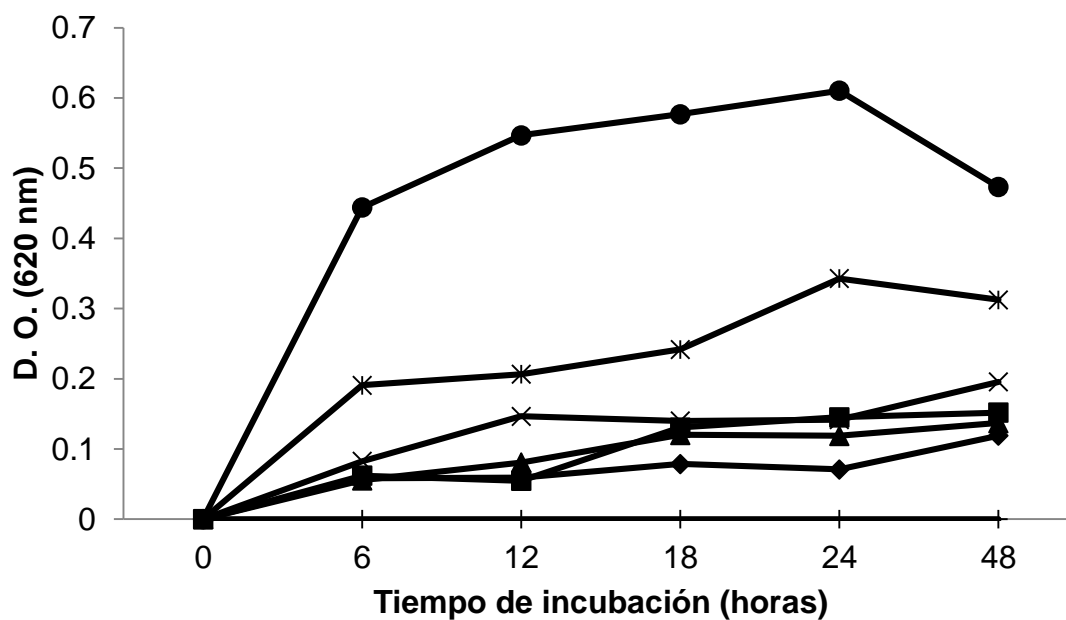


Figura 13. Efecto de diferentes concentraciones EP: 400 µg/mL (◆), 200 µg/mL (■), 100 µg/mL (▲), 50 µg/mL (x), quitosano (Q) 1% (Ж), BHI µg/mL (●) y Gentamicina (+) sobre la cinética de desarrollo de *Staphylococcus aureus*.

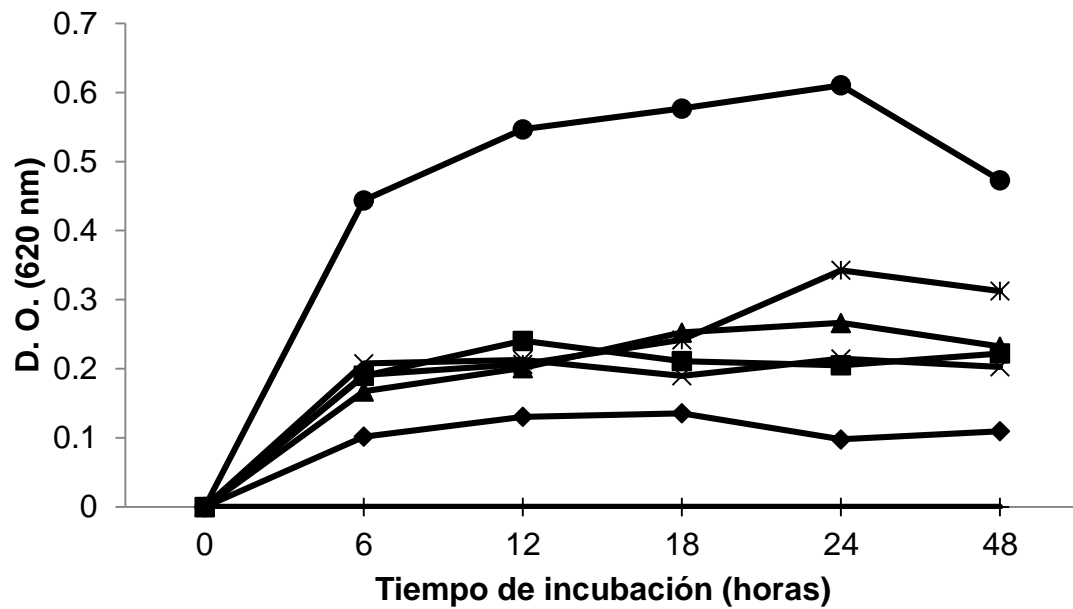


Figura 14. Efecto de soluciones de Q adicionadas con EP a diferentes concentraciones: 400 µg/mL (◆), 200 µg/mL (■), 100 µg/mL (▲), 50 µg/mL (x), quitosano (Q) 1 % (Ж), BHI µg/mL (●) y Gentamicina (+) sobre la cinética de desarrollo de *Staphylococcus aureus*.

Esto puede deberse a que a pesar de que los dos microorganismos pertenecen a la familia de las Gram positivas tienen metabolismo diferente, que hacen que reaccionen de distinta manera frente a quitosano. Velázquez *et al.* (2007), observaron que *Listeria monocytogenes* se inhibe a partir de concentraciones de 200 µg/mL, resultados que coinciden con los propóleos colectados en Caborca y Ures durante su estudio, similar a lo que se obtuvo en este estudio.

Etapa 2

Análisis de Color (L*, a*, b*, h y C*) en Músculos de Bovino

En la Figura 15 se observan los resultados obtenidos del análisis de color realizado a las muestras del músculo TB, con y sin recubrimiento de quitosano durante 0, 24, 48 y 72 h de almacenamiento. Los valores de L* (luminosidad) para los diferentes tratamientos (C, EP, Q y Q+EP) aplicados al M. TB indican que no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto al tiempo de almacenamiento; sin embargo, se puede apreciar una disminución de la luminosidad conforme aumenta el tiempo de conservación.

Los resultados del análisis de color del músculo S se muestra en la Figura 16, observándose que los valores obtenidos de L* presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos C, EP, Q y Q+EP a las 0 y 24 h, a la vez, apreciándose una disminución de la luminosidad conforme aumenta el tiempo de almacenamiento, y una estabilización del color del músculo entre las 48 y 72 h. Los resultados del análisis por tratamiento a lo largo del almacenamiento, muestran diferencias significativas ($p < 0.05$), observándose una disminución del

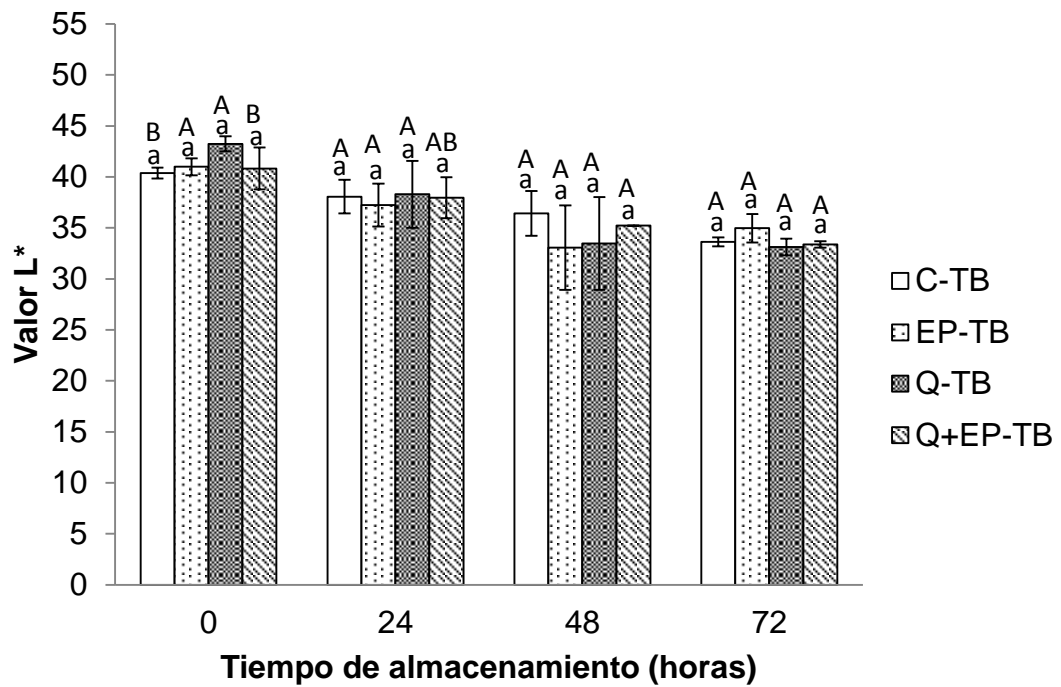


Figura 15. Efecto del periodo de almacenamiento sobre el valor de L* para *M. Triceps brachii* en carne de bovino. Literales distintas son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$): minúsculas indican entre tratamientos el mismo día de almacenamiento; y mayúsculas, por tratamientos a lo largo del almacenamiento.

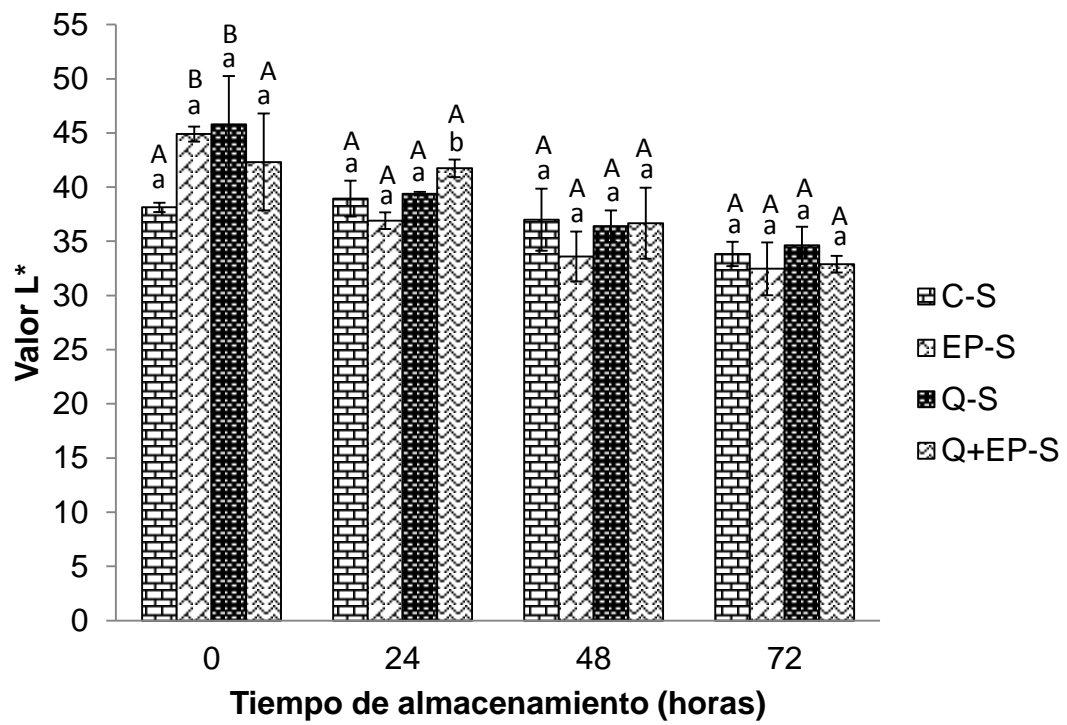


Figura 16. Efecto del periodo de almacenamiento sobre el valor de L* para *M. Semimembranosus* en carne de bovino. *Literales distintas son estadísticamente diferentes (p<0.05): minúsculas indican entre tratamientos el mismo día de almacenamiento; y mayúsculas, por tratamientos a lo largo del almacenamiento.*

valor de L^* en cada uno de ellos de forma independiente. Cabe mencionar que a pesar del descenso en los valores, estos son similares a los reportados por Torrescano *et al.* (2010), quienes realizaron un estudio sobre la caracterización de canales y de carne de bovino de animales engordados en la zona centro de Sonora.

Ruiz *et al.* (2003), realizaron un estudio para determinar los cambios en las características de calidad de la carne de bovino durante los primeros 6 días *post-mortem*. A pesar de que sus resultados no coinciden con los obtenidos al principio de nuestro estudio, estos son similares a lo obtenido durante el período de almacenamiento. Estos autores mencionan que el color varía conforme avanza el periodo de almacenamiento, pudiendo esto estar relacionado con el presente estudio. Nuestros resultados no coinciden con lo reportado por Park *et al.* (2010), quienes desarrollaron películas de polietileno de baja densidad adicionadas con quitosano a diferentes concentraciones para determinar la vida útil de carnes rojas frescas. En sus resultados encontraron que al aumentar la concentración de Q disminuía el valor de L^* ; por el contrario en este estudio aun cuando se utilizó una sola concentración de Q los valores de L^* no cambiaron.

El valor a^* representa la oposición visual rojo-verde ($a^*>0$, rojo; $a^*<0$, verde); así en las Figuras 17 y 18, se observa que a través del periodo de almacenamiento se existe una disminución de dicho valor, para los músculos S y TB, siendo más evidente a las 72 h, en contraste con el inicio del almacenamiento; encontrándose diferencias significativas ($p<0.05$) en cada uno de ellos. Los resultados a las 72 h muestran que en todos los tratamientos se mantuvo el color rojo, a pesar de las diferencias, por lo que la presencia ya sea con extracto o con quitosano con propóleos no influyó de manera negativa en la preservación del color de los dos músculos. Los valores de a^* se encuentran dentro de los valores reportados por Albertí *et al.* (2005), indicando que a pesar del recubrimiento hay un mantenimiento del color rojo en los dos músculos.

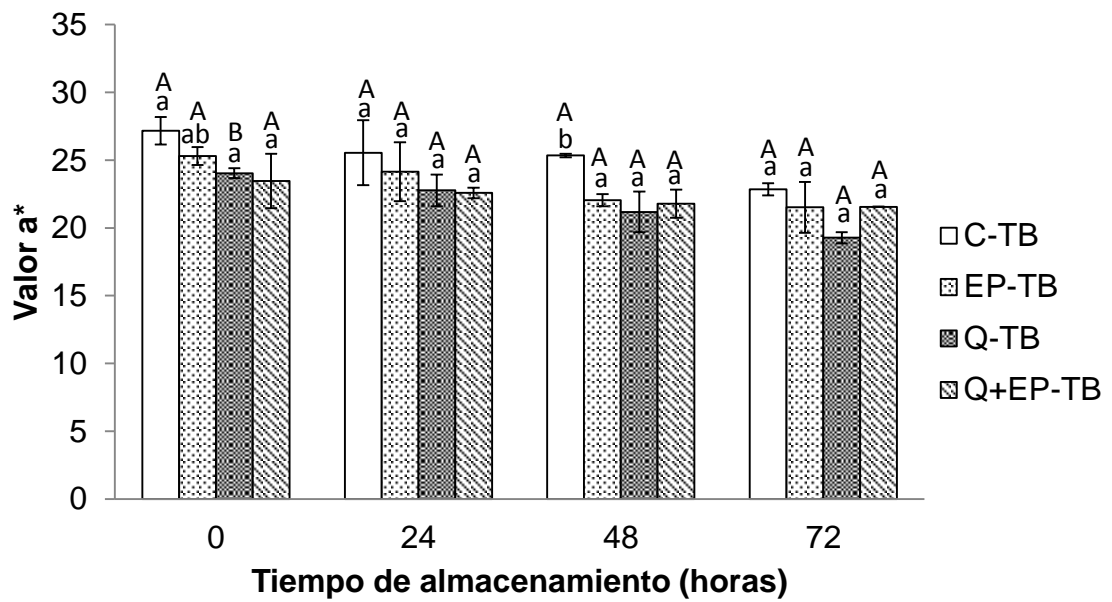


Figura 17. Efecto del periodo de almacenamiento sobre el valor de a^* para *M. Triceps brachii* en carne de bovino. Literales distintas son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$): minúsculas indican entre tratamientos el mismo día de almacenamiento; y mayúsculas, por tratamientos a lo largo del almacenamiento.

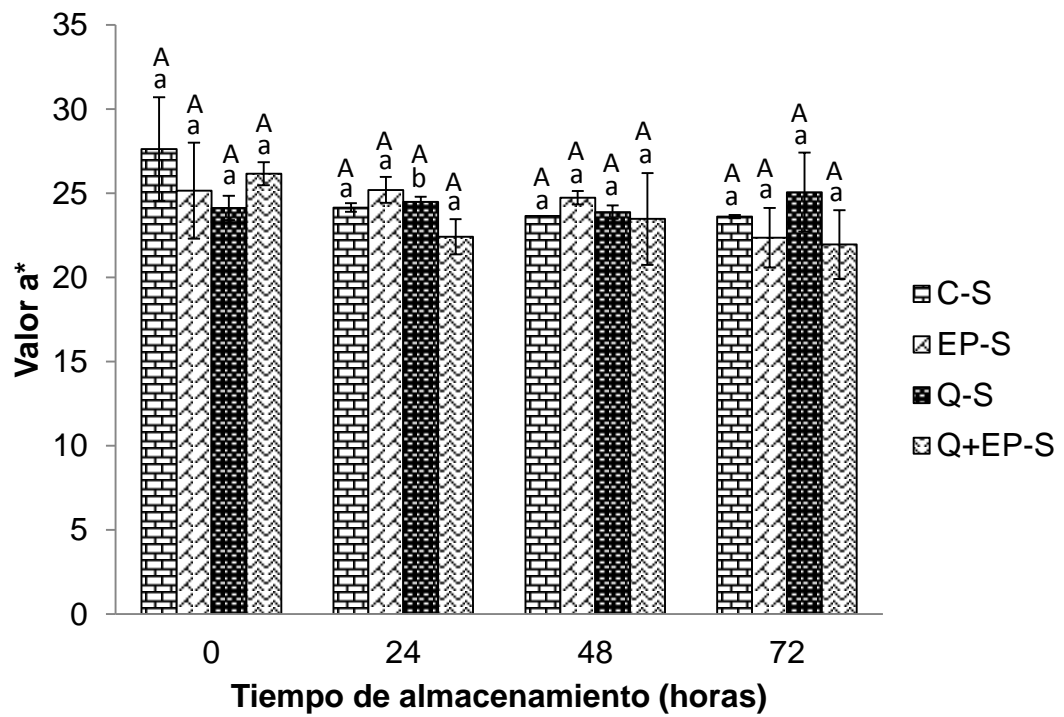


Figura 18. Efecto del periodo de almacenamiento sobre el valor de a^* para *M. Semimembranosus* en carne de bovino. Literales distintas son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$): minúsculas indican entre tratamientos el mismo día de almacenamiento; y mayúsculas, por tratamientos a lo largo del almacenamiento.

Po otra parte, los resultados no concuerdan con los obtenidos por Torrescano *et al.* (2003). Quienes evaluaron 14 muestras de musculo de bovino sin cocinar, encontrando que para el músculo S se obtuvo un valor de a^* de 14.2, mientras que para TB fue 14.8, atribuyendo estos valores más bajos a la edad de los animales al sacrificio, indicando que todos fueron terneras y en consecuencia se obtuvo una carne más rosada. Sin embargo, los resultados son similares a los reportados por Madrid (2007), quien determino el color en el músculo S en muestras obtenidas a partir de ganado bovino producido en la región centro del estado de Sonora, obteniendo valores para a^* de 20.31, el cual es más parecido a lo encontrado en este estudio. Por su parte, Palearí *et al.* (1998) realizaron un estudio en la que compararon el color de la carne de avestruz con la de bovino, utilizando músculos del cuarto trasero, encontrando valores de a^* en carne de bovino de 21.77, valores más cercanos a lo que se obtuvieron en la presente investigación.

Otro de los parámetros evaluados fue el índice de amarillo (valor b^*), cuyos resultados se muestran en las Figuras 19 y 20, donde se visualiza que el músculo TB adicionado con Q disminuyó su valor a lo largo de su almacenamiento, principalmente en las primeras 24 h. Respecto al músculo S, la tendencia de este parámetro fue muy diferente ya que este parámetro si mostró disminución ($p < 0.05$) a través del tiempo de conservación, particularmente el tratamiento Control y el adicionado con EP. La disminución de los valores de b^* de todos los tratamientos, a lo largo del periodo de almacenamiento, fue más evidente a las 72 h, tiempo en el cual se presentaron las mayores diferencias ($p < 0.05$), particularmente el adicionado con EP. Madrid (2007), encontró valores de S en un rango de 15.23 a 17.52 valores similares a los obtenidos en este estudio. Entre los tratamientos Q aplicado en TB fue el que tuvo un efecto menos positivo, ya que disminuyó a través del tiempo. Respecto a los resultados reportados por Torrescano *et al.* (2003) para TB y S, estos autores obtuvieron valores de 13.7 y 13.8, respectivamente, siendo estos más bajos que los obtenidos en este estudio.

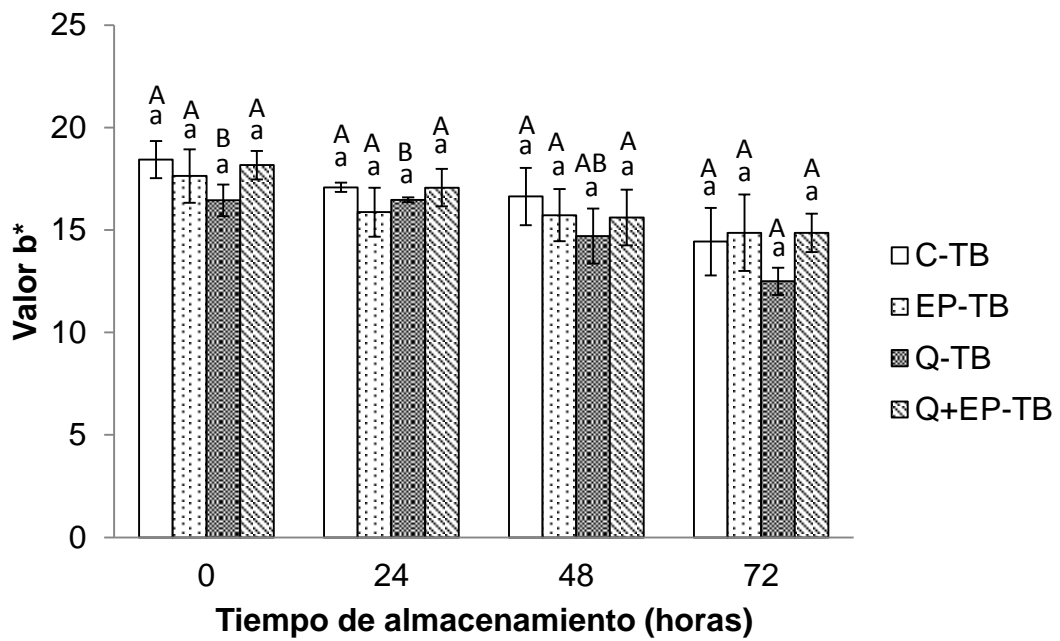


Figura 19. Efecto del periodo de almacenamiento sobre el valor de b^* para *M. Triceps brachii* en carne de bovino. Literales distintas son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$): minúsculas indican entre tratamientos el mismo día de almacenamiento; y mayúsculas, por tratamientos a lo largo del almacenamiento.

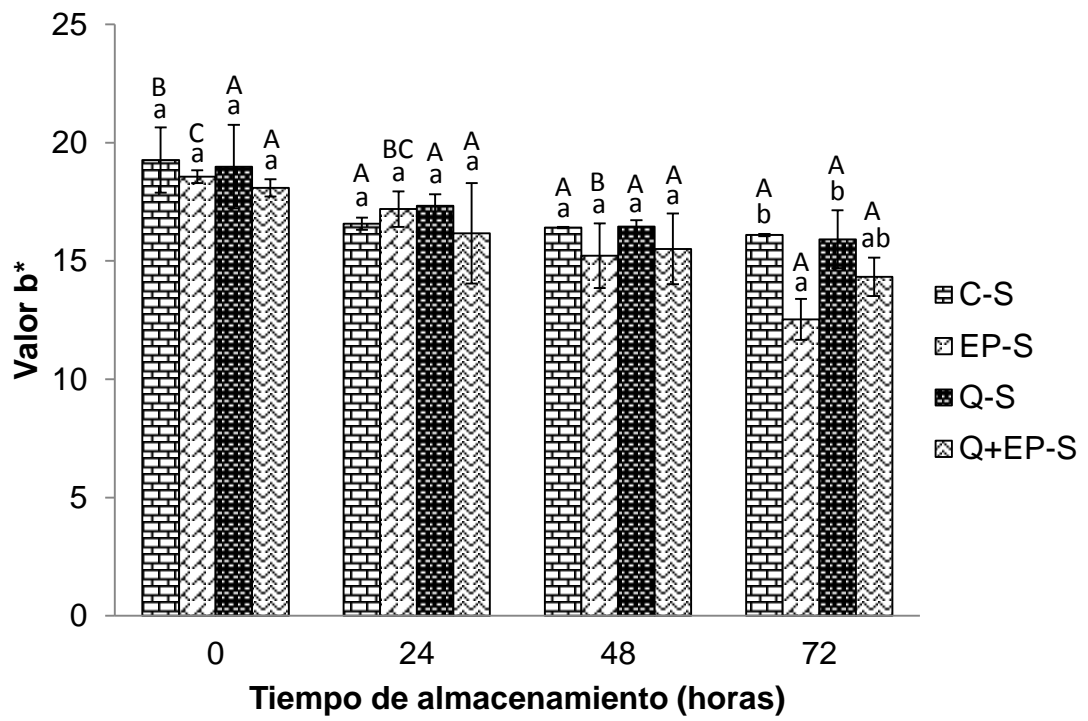


Figura 20. Efecto del periodo de almacenamiento sobre el valor de b* para *M. Semimembranosus* en carne de bovino. Literales distintas son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$): minúsculas indican entre tratamientos el mismo día de almacenamiento; y mayúsculas, por tratamientos a lo largo del almacenamiento.

Los resultados no coinciden con lo reportado por Ruiz *et al.* (2003), quienes en su estudio obtuvieron valores de b^* menores a los obtenidos en nuestro trabajo, esto puede ser debido al tipo de animales y por tipo de iluminante utilizado durante los experimentales puesto que en nuestro estudio utilizamos el iluminante A10 mientras que estos autores el D65. Tampoco coinciden con los reportados por Stanišić *et al.* (2012), que indicaron valores mucho más bajos que los de este estudio, los cuales se encontraban en 6.69 y 6.61 para los músculos *L. dorsi* y *G. medius*, respectivamente.

Los resultados de croma o saturación del color se muestran en las Figuras 21 y 22, observándose que para TB se presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$), durante las primeras 24 h en el tratamiento Q, siendo éste el único que presentó cambios durante el período del almacenamiento. Por otro lado, para el músculo S, los cambios se manifestaron principalmente con EP a lo largo de tiempo del almacenamiento. Madrid (2007), reportó valores de C^* para S en un rango de 22.80 hasta 26.85, valores similares a los obtenidos a las 72 horas en este estudio. Pero nuestros resultados difieren de los encontrados por Torrescano *et al.* (2003), quienes obtuvieron valores de a^* y b^* , los cuales fueron utilizados para el cálculo de este parámetro de color, obteniéndose valores de 20.61 y 20.23 para S y TB, respectivamente, los cuales son considerados más bajos que los de este estudio.

El valor hue o ángulo de matiz está relacionado con el estado que guardan los pigmentos en el músculo, y a medida que se pierde gradualmente el color, los valores de este parámetro se incrementan (Franco *et al.*, 2008). Los valores de C^* y h^* pueden estar relacionados con la oxidación en los músculos, puesto que se calculan a partir a^* y b^* . Los resultados correspondientes a los valores de h^* para los músculos TB y S, se incluyen en las Figuras 23 y 24, mostrándose el comportamiento de este parámetro a lo largo del período de almacenamiento. Para ambos músculos no se presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) durante el todo el periodo de almacenamiento. Torrescano-Urrutia *et al.* (2003),

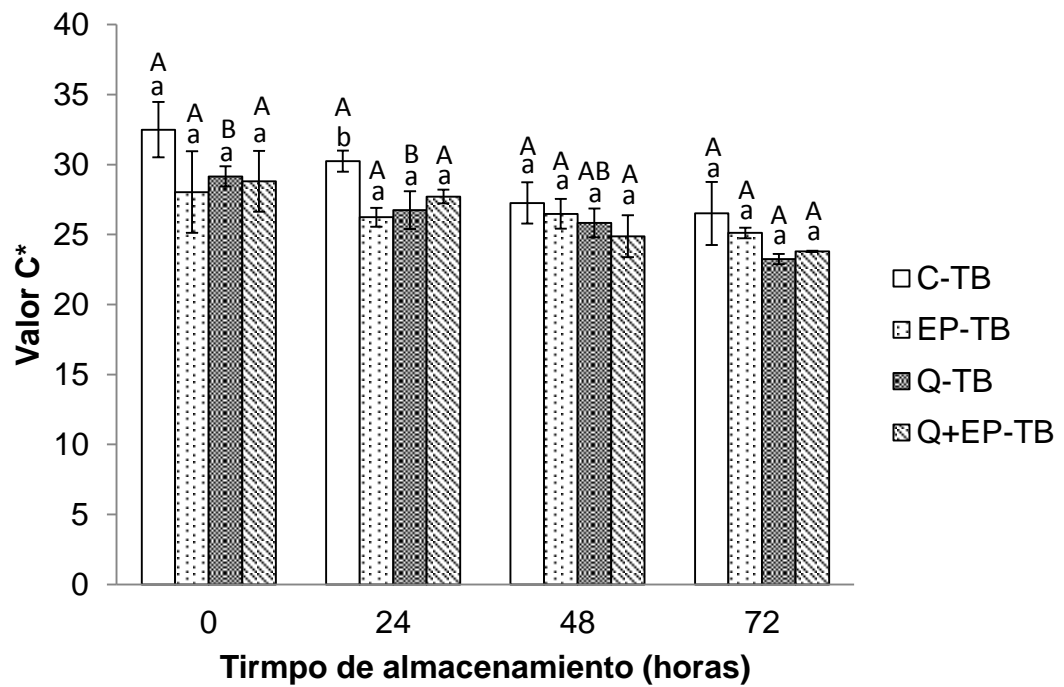


Figura 21. Efecto del periodo de almacenamiento sobre el valor de C* para *M. Triceps brachii* en carne de bovino. Literales distintas son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$): minúsculas indican entre tratamientos el mismo día de almacenamiento; y mayúsculas, por tratamientos a lo largo del almacenamiento.

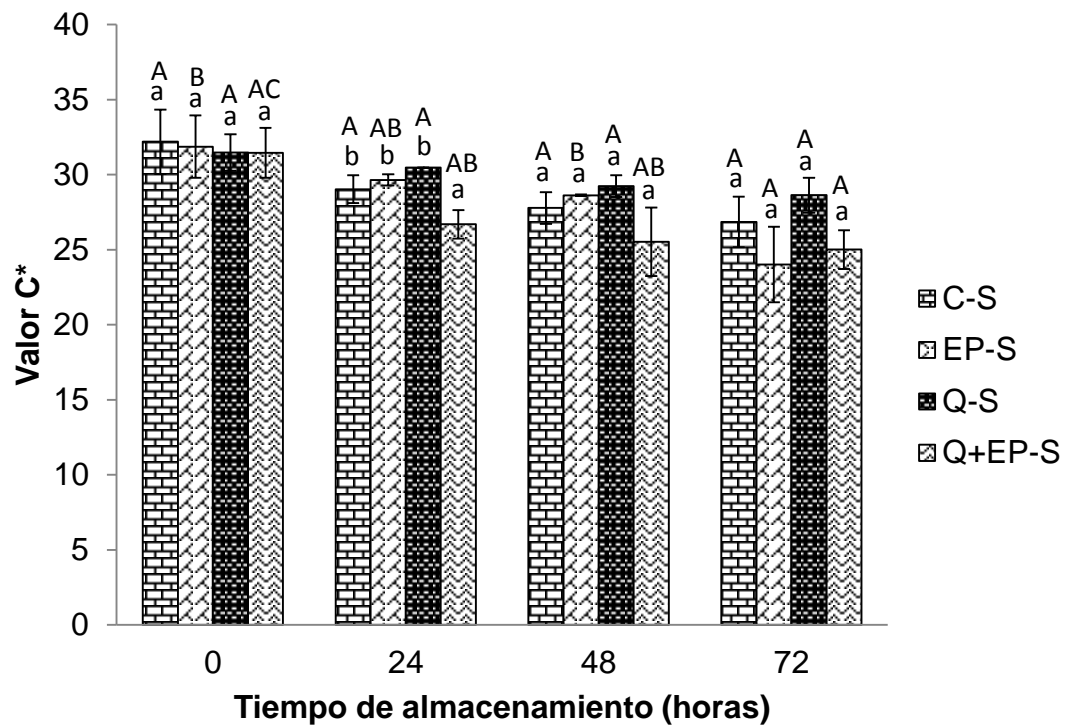


Figura 22. Efecto del periodo de almacenamiento sobre el valor de C* para *M. Semimembranosus* en carne de bovino. Literales distintas son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$): minúsculas indican entre tratamientos el mismo día de almacenamiento; y mayúsculas, por tratamientos a lo largo del almacenamiento.

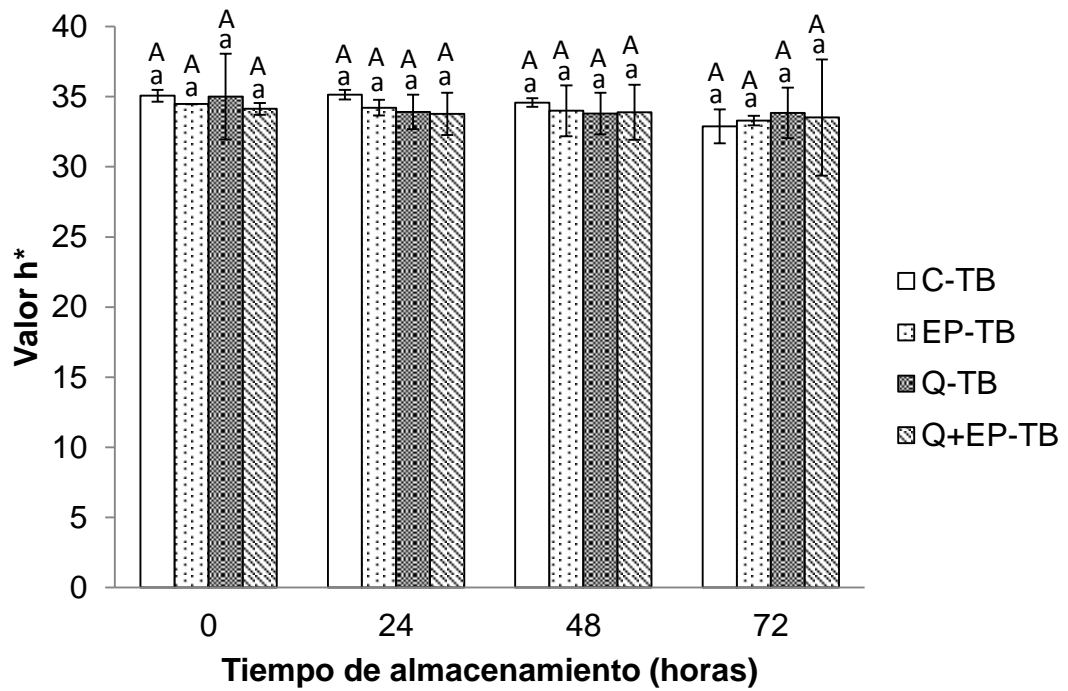


Figura 23. Efecto del periodo de almacenamiento sobre el valor de h^* para *M. Triceps brachii* en carne de bovino. Literales distintas son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$): minúsculas indican entre tratamientos el mismo día de almacenamiento; y mayúsculas, por tratamientos a lo largo del almacenamiento.

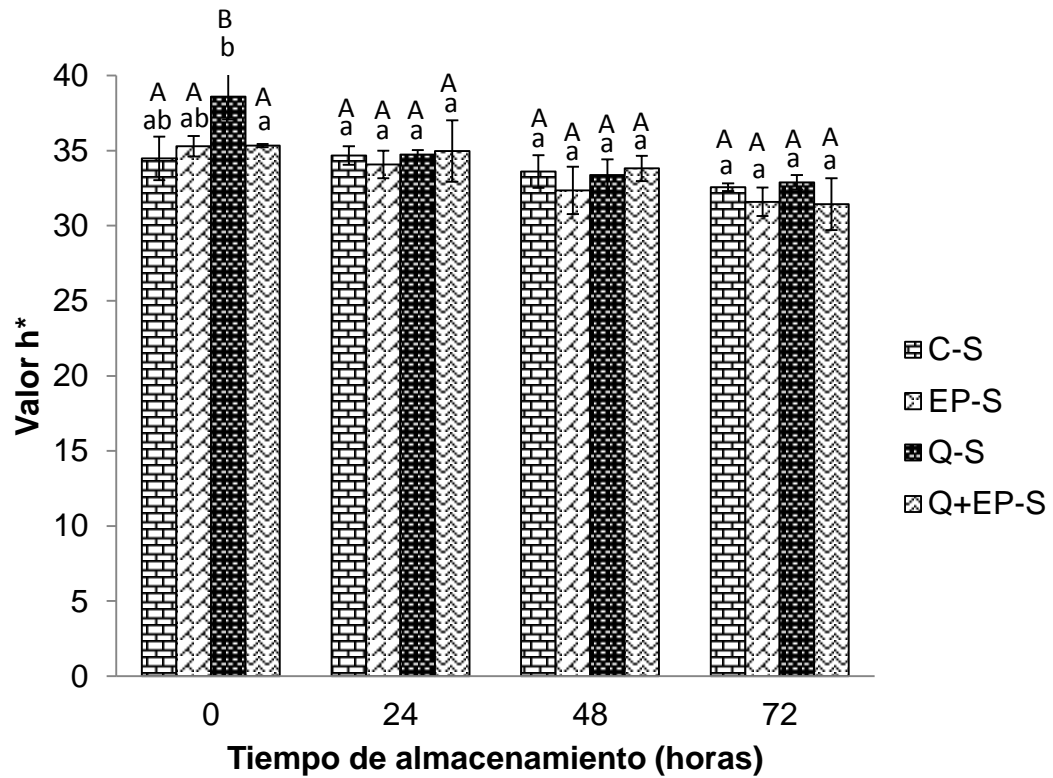


Figura 24. Efecto del periodo de almacenamiento sobre el valor de h^* para *M. Semimembranosus* en carne de bovino. Literales distintas son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$): minúsculas indican entre tratamientos el mismo día de almacenamiento; y mayúsculas, por tratamientos a lo largo del almacenamiento.

reportaron valores de h^* de 41.65 para el músculo S, resultado que no coincide con lo obtenido en nuestra investigación, ya que los valores del presente estudio son menores. Sin embargo, Madrid (2007), reporta valores para S que van de 39.02 a 41.93, los cuales también son menores a los encontrados, los cuales tampoco coinciden con los resultados de esta investigación.

Evaluación de pH

El valor de pH es considerado un factor importante de la calidad de la carne. En las Figuras 25 y 26 se muestran los valores de pH para cada uno de los músculos (TB y S) y tratamientos empleados, así como su evolución a lo largo del tiempo de almacenamiento. Para el caso del músculo TB, se puede apreciar que tuvo un pH de inicio de 5.7, mientras que para el músculo S, este presentó un pH de 5.5, manteniéndose estos a lo largo del tiempo de almacenamiento durante las 72 h que duró el almacenamiento; estos valores de pH se pueden considerar como normales, ya que el pH muscular a las 48 h *postmortem* alcanza valores de 5.5 a 5.7 (Lawrie, 1998), valores que coinciden con este experimento. Por otra parte, se puede apreciar que como consecuencia de la aplicación de los recubrimientos de Q y Q+EP en la carne, se observa que hay un descenso en los valores de pH en los dos músculos, por debajo de 5.4, aunque sin presentar diferencias ($p > 0.05$) durante el tiempo que duró el experimento; lo cual se puede atribuir a la naturaleza ácida del recubrimiento (se utilizó ácido acético al 0.3 M para la fabricación del recubrimiento). Además, la variación de pH en cada músculo puede deberse a las características que cada uno de estos presenta, ya que S es un músculo constituido por fibras de contracción rápida (tipo por lo tanto tiende a generar mayor lactato por la cantidad de fibras rojas presentes en este músculo (Ryu y Kim, 2005).

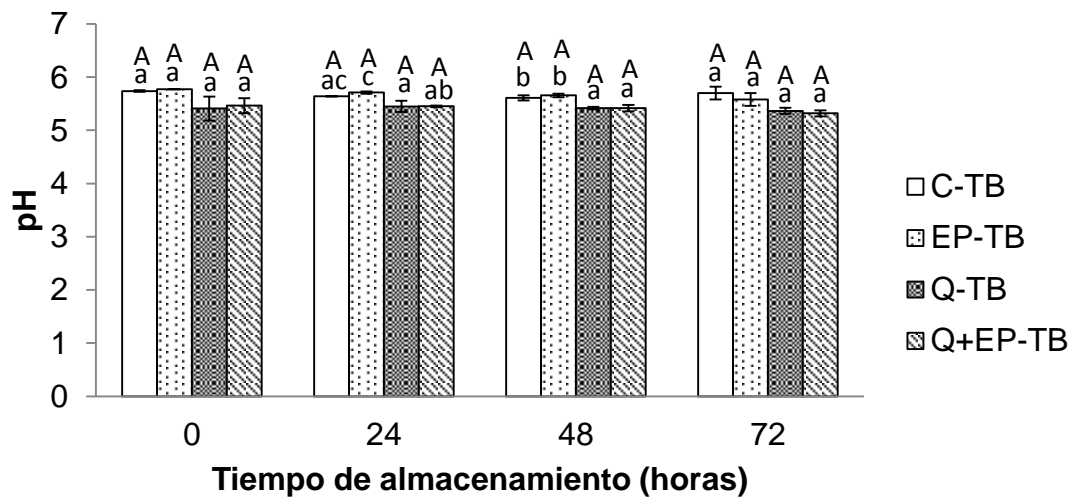


Figura 25. Efecto del periodo de almacenamiento sobre el valor de pH para *M. Triceps brachii* en carne de bovino. Literales distintas son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$): minúsculas indican entre tratamientos el mismo día de almacenamiento; y mayúsculas, por tratamientos a lo largo del almacenamiento.

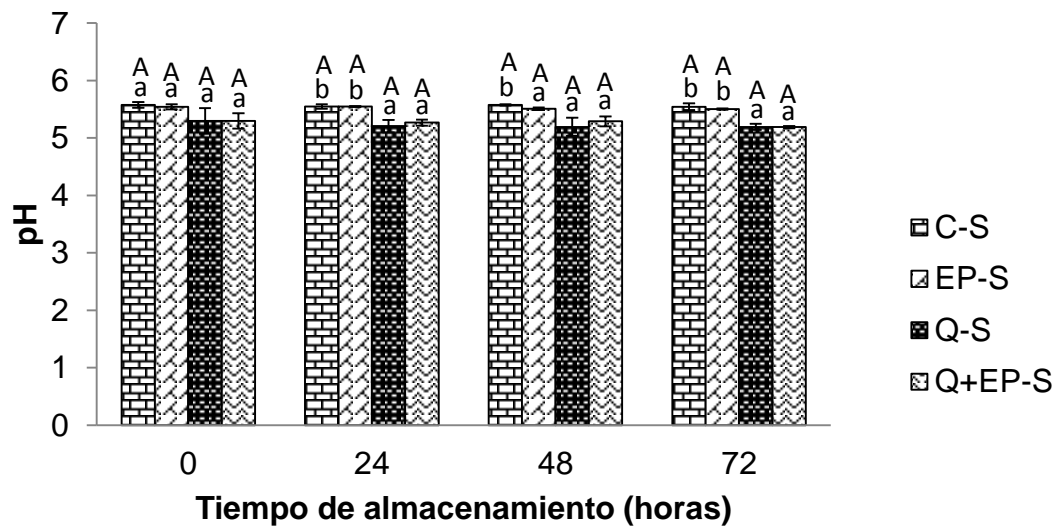


Figura 26. Efecto del periodo de almacenamiento sobre el valor de pH para *M. Semimembranosus* en carne de bovino. Literales distintas son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$): minúsculas indican entre tratamientos el mismo día de almacenamiento; y mayúsculas, por tratamientos a lo largo del almacenamiento.

El pH final de la carne, es consecuencia del agotamiento de las reservas de glucógeno después del sacrificio, lo cual afecta la calidad de la carne; un pH alto en la carne de bovino es más susceptible a la descomposición bacteriana (Silvia *et al.*, 1999). Los resultados de pH para el tratamiento control correspondiente al músculo S coinciden con lo reportado por Torrescano *et al.* (2003), quienes obtuvieron valores de 5.5; sin embargo, difieren sus resultados en TB con respecto a nuestro estudio ya que reportan un valor de 5.5. Madrid (2007), reportó valores para músculo S de bovino en un rango de 5.59 a 5.60, valores similares a lo obtenido en este trabajo.

Oxidación de Lípidos (TBARS)

Los resultados obtenidos respecto al grado de oxidación de los lípidos se reportan en base a la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), los cuales se muestran en las Figuras 27 y 28, donde se puede observar que la muestra Q+EP es la que presentó menor oxidación ($p < 0.05$) con respecto a EP y Q. Sin embargo, la muestra control, al final del periodo de almacenamiento, alcanzó valores similares a Q, seguido por el tratamiento con EP. Por otro lado, se puede visualizar que el recubrimiento Q, por si solo promueve la oxidación puesto que existe una tendencia significativa ($p < 0.05$) al aumento de la concentración de malonaldehído (MA) durante todo el periodo de almacenamiento ($p < 0.05$), además de que mantuvo los valores más altos de MA, en ambos músculos, como se puede observar en ambas Figuras. Cabe mencionar que a pesar de las diferencias estadísticas, los valores reportados no son indicativos de una carne en mal estado, puesto que para que una carne se considere oxidada, los valores de MA deben ser ≥ 0.6 mg MA/Kg (Greene y Cumuze, 1982).

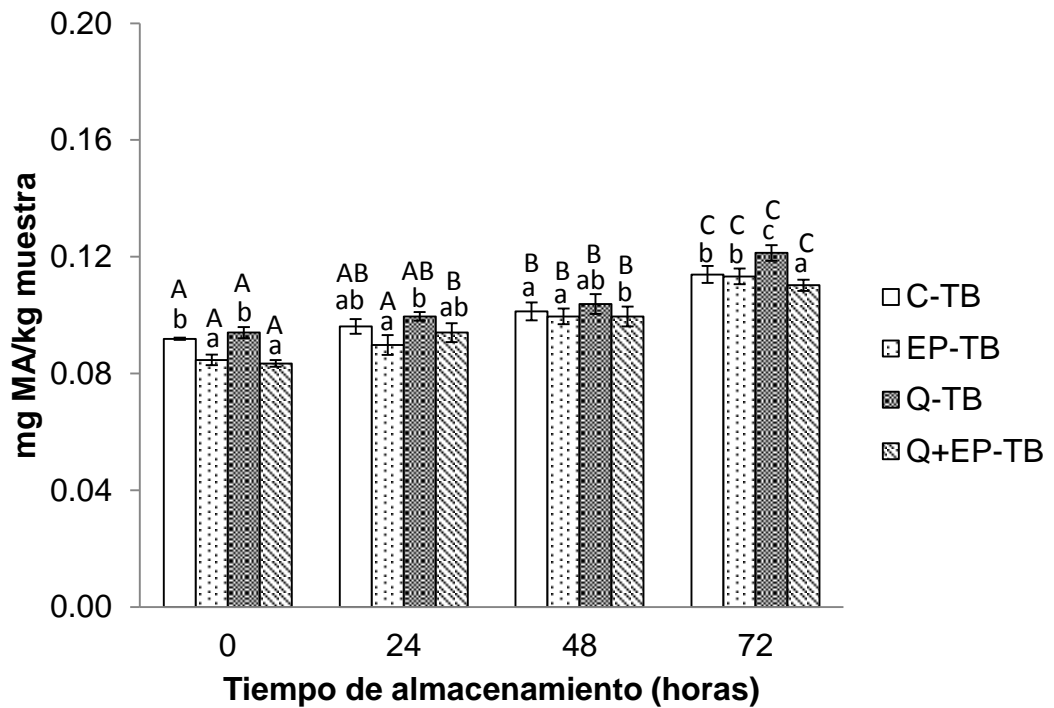


Figura 27. Formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en *M. Triceps brachii* de carne de bovino almacenado en refrigeración durante 72 horas. Literales distintas son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$): minúsculas indican entre tratamientos el mismo día de almacenamiento; y mayúsculas, por tratamientos a lo largo del almacenamiento.

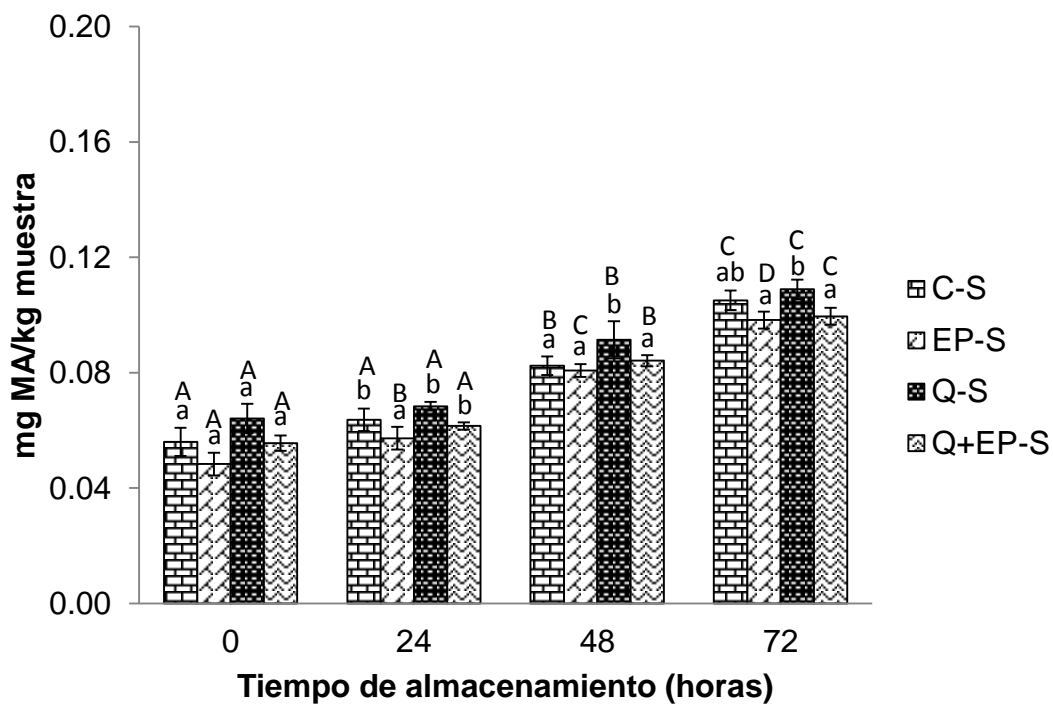


Figura 28. Formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en *M. Semimembranosus* de carne de bovino almacenado en refrigeración durante 72 horas. *Literales distintas son estadísticamente diferentes (P<0.05): minúsculas indican entre tratamientos el mismo día de almacenamiento; y mayúsculas, por tratamientos a lo largo del almacenamiento.*

Los resultados señalan que EP ejerce un efecto antioxidante en el caso del músculo S, pero es Q+EP quien mejor se comporta en el músculo TB, ya que a lo largo del almacenamiento muestra los valores más bajos de MA con respecto a EP y Q. Con respecto al control, este se mantuvo dentro de los límites normales durante el tiempo que duró el experimento, pero con tendencia al incremento en la concentración de MA. Estos resultados difieren de los reportados por Schreiber *et al.* (2013), quienes realizaron un estudio de la actividad antioxidante del quitosano con ácido gálico injertado en un material multifuncional para envasado de alimentos (cacahuates). En sus resultados reportan que con el uso del envase con quitosano y ácido gálico se obtuvieron valores más bajos de MA, debido a la presencia del antioxidante primario en la estructura de la película, aunque con valores muy similares a la película de quitosano sin ácido gálico. Por otra parte, Kumar *et al.* (2014) en un estudio comparativo de quitosano, EDTA, eugenol y aceite de menta para medir la capacidad antioxidante y antimicrobiana en tiras de pollo, encontraron que los valores de TBARS eran más bajos en las tiras de pollo con eugenol mientras que con quitosano se observaron valores más altos, comportamiento similar a lo que obtuvimos en nuestro estudio.

Mesófilos y Psicrófilos Aerobios

Los resultados del análisis microbiológico de las soluciones de quitosano con y sin extractos de propóleos aplicado en dos músculos de bovino durante un período de almacenamiento de 72 h se muestran en las Figuras 29 y 30. Respecto al crecimiento de mesófilos aerobios en el músculo TB, es posible apreciar que el tratamiento control a las cero horas, presentó una concentración de 1×10^4 UFC/g de muestra, finalizando a las 72 h con 2×10^4 UFC/g, existiendo diferencias ($p < 0.05$); el tratamiento EP mostró un recuento inicial de 7×10^3 UFC/g de muestra y alcanzó un total de 2×10^4 UFC/g de muestra. Por otro lado, los tratamientos Q y Q+EP mostraron un crecimiento más lento a lo largo del

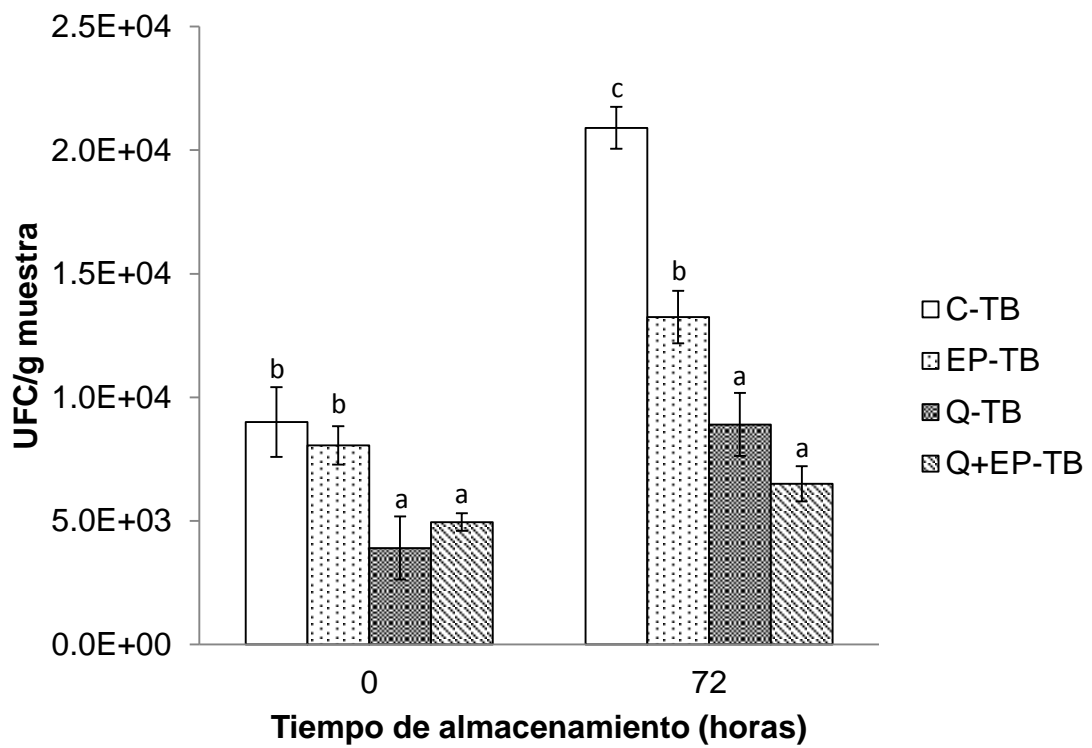


Figura 29. Efecto de soluciones de quitosano adicionado con y sin extractos de propóleos a concentración de 300 µg/mL sobre el desarrollo de mesófilos aerobios aplicado en *M. Triceps brachii*. Literales distintas son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) por día de almacenamiento.

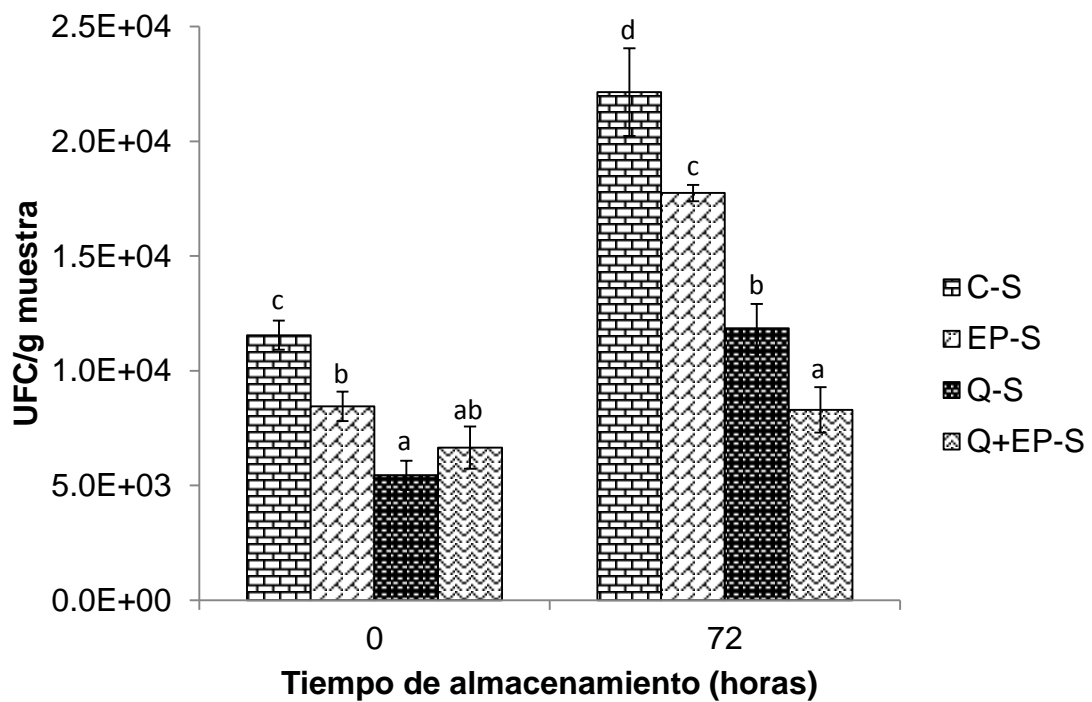


Figura 30. Efecto de soluciones de quitosano adicionado con y sin extractos de propóleos a concentración de 300 µg/mL sobre el desarrollo de mesófilos aerobios aplicado en *M. Semimembranosus*. Literales distintas son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) por día de almacenamiento.

período de almacenamiento, siendo el tratamiento Q+EP el que presentó mejores resultados en relación a la inhibición del crecimiento de microorganismos a las 72 h, al tener un recuento en placa final de 7×10^3 UFC/g de muestra con diferencias ($p < 0.05$) respecto a Q y al control.

Los tratamientos aplicados al músculo S (Figura 29), presentaron un comportamiento muy similar al músculo anterior, mostrando que el tratamiento control presentó un mayor recuento ($p < 0.05$) en placa con una concentración final de 2.7×10^4 UFC/g a las 72 h. El recubrimiento con Q+EP fue el tratamiento que presentó mejores resultados durante el periodo de incubación, retrasando el desarrollo de estos microorganismos. Los músculos recubiertos con quitosano generalmente mostraron recuentos microbianos más bajos en ambos músculos, cuando se compara con los tratamientos sin recubrimiento del polisacárido, pero al incorporar el propóleo, este mejoró su efectividad antimicrobiana.

Además, teniendo en cuenta que los valores de pH de los tratamientos Q y Q+EP oscilaron entre 5.5 y 5.4 durante el periodo de almacenamiento de 72 h, es evidente que la inhibición es más fuerte en las muestras con revestimiento de quitosano. Con respecto a estos resultados, existen varios reportes de investigación en los que se ha establecido que los polifenoles participan en la actividad antimicrobiana; partiendo de esto, es posible atribuir este efecto a la composición del propóleo incluido en el recubrimiento, ya que el tratamiento con mayor efecto para retrasar el crecimiento de microorganismos fue Q+EP. En un estudio reciente, Yu-Yue *et al.* (2013), investigaron el efecto de la utilización de un recubrimiento de quitosano adicionado con extractos de té en carne de cerdo para alargar su vida útil; sus resultados muestran que al desarrollar un recubrimiento con Q y quitosano con compuestos de té, pudieron retrasar el crecimiento bacteriano durante el periodo de almacenamiento, comportamiento similar al observado en este estudio.

Las bacterias psicrófilas son los principales microorganismos responsables del deterioro de carne de res almacenada aeróbicamente a temperatura de refrigeración. En este estudio se observó que el tratamiento control mostró mayor ($p < 0.05$) número de UFC/g, tanto para TB como para S, respectivamente (Figuras 31 y 32). También se observa que en los dos músculos al aplicar los los recubrimientos Q y Q+EP, ambos mostraron un recuento más bajo de microorganismos, en contraste con el tratamiento control.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Seyed *et al.* (2010), estudio donde analizaron el efecto de recubrimientos de quitosano con aceite de canela con el propósito de evaluar la calidad de carne de trucha en refrigeración. En sus resultados encontraron que las muestras control mostraron mayor recuento de UFC/g, comparado con los tratamientos de quitosano y quitosano con aceite de canela, presentando diferencias significativas ($p < 0.05$), resultando que el tratamiento con mayor efecto de inhibición fue el quitosano con aceite de canela. Lo anterior probablemente es debido al contenido de β -cariofilenos, linalol así como otros terpenos, donde estudios previos han demostrado que son los que le confieren propiedades antimicrobianas. El comportamiento es similar a lo observado en este estudio al aplicar propóleos.

Por otro lado, Sánchez-González *et al.* (2010), observaron las propiedades físicas y antimicrobianas de películas de quitosano con la incorporación de diferentes concentraciones de aceite esencial del árbol de Té. Entre los análisis realizados se midió la efectividad antimicrobiana de las películas contra *Listeria monocytogenes* y *Penicillium italicum*; en sus resultados reportaron una actividad antimicrobiana significativa contra *L. monocytogenes*, aunque limitada contra *P. italicum*. También señalaron que, para *L. monocytogenes* en particular, la reducción de compuestos volátiles durante el proceso de secado de las películas, así como el tiempo que implica llevar a cabo los experimentos provoca una pérdida de eficacia antimicrobiana de la película. Lo anterior exhibe su potencial como conservador en los alimentos, especialmente en el

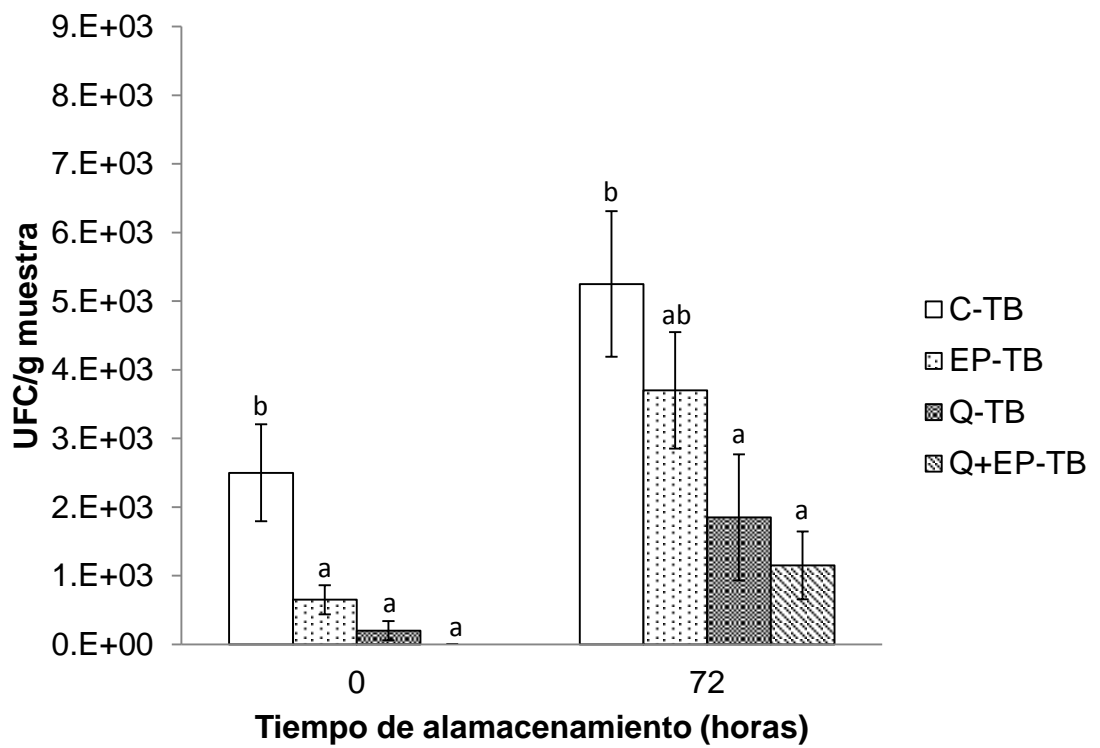


Figura 31. Efecto de soluciones de quitosano adicionado con y sin extractos de propóleos a concentración de 300 µg/mL sobre el desarrollo de Psicrófilos aerobios aplicado en *M. Triceps brachii*. Literales distintas son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) por día de almacenamiento.

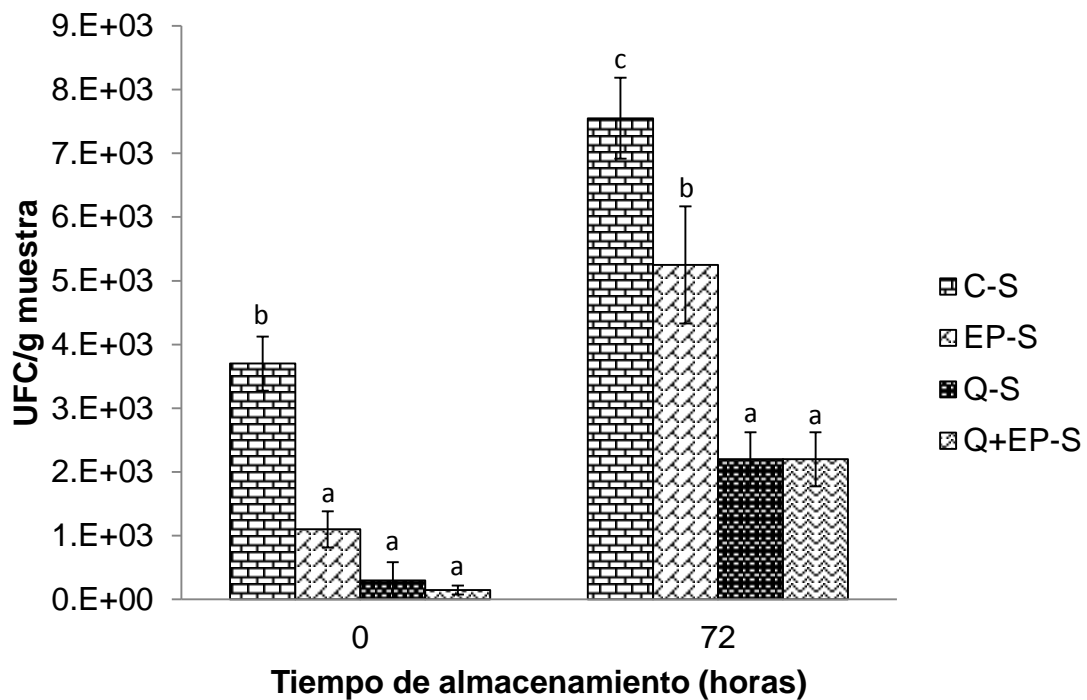


Figura 32. Efecto de soluciones de quitosano adicionado con y sin extractos de propóleos a concentración de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre el desarrollo de Psicofilos aerobios aplicado en *M. Semimembranosus*. Literales distintas son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) por día de almacenamiento.

campo de la conservación de la carne. En base a lo anterior, se puede señalar que la combinación de quitosano y propóleos podría aumentar de manera positiva el efecto de la capacidad antibacteriana en la carne de bovino, como se demuestra en este estudio.

VI. CONCLUSIONES

- Los resultados del análisis de FTIR confirmó la presencia de quitosano; sin embargo, en el espectro de UV-visible se confirmó la presencia de los extractos de propóleos en los recubrimientos desarrollados.
- La composición del extracto de propóleos presentó un contenido mayor de fenoles totales y de flavonoides, que los recubrimientos de quitosano y de quitosano con extractos de propóleos, presentando este último, valores intermedios de estos compuestos, indicando que durante el desarrollo del recubrimiento se mantiene una cantidad importante de estos compuestos.
- El recubrimiento de quitosano con extracto de propóleos fue el tratamiento que presentó mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH.
- El recubrimiento Q+EP mostró menor módulo elástico que el Q, y no se encontraron diferencias en elongación y esfuerzo máximo a la rotura.
- La adición del extracto de propóleos en el desarrollo de recubrimientos a base de quitosano disminuyó el valor L^* , e incrementó el valor de b^* .
- El recubrimiento Q+EP mostró mayor inhibición del crecimiento de *E. coli*, *L. innocua* y *S. aureus* que Q, mostrando que la adición del extracto de propóleos en el desarrollo de recubrimientos a base de quitosano aumenta la capacidad antimicrobiana contra estos microorganismos.

- La aplicación de los recubrimientos de quitosano y quitosano con extracto de propóleos en la carne, provocó un descenso en el pH de ambos músculos durante el almacenamiento en refrigeración, pero sin afectar el color.
- El recubrimiento Q+EP retardó la formación de MA indicando una menor oxidación de los lípidos, respecto al tratamiento control en ambos músculos, pero Q, por sí solo, aumentó la formación de TBARS, aunque no de manera significativa.
- El recubrimiento Q+EP retardó más efectivamente el desarrollo de microorganismos, tanto mesófilos como psicrófilos, durante el almacenamiento en refrigeración de ambos músculos de bovino, en comparación con el control y el recubrimiento Q.
- La combinación de quitosano y extracto de propóleos permite el desarrollo de recubrimientos con capacidad antioxidante y antimicrobiana para su aplicación en carne fresca de bovino.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abugoch, L.E., Tapia, C., Villamán, M.C., Yazdani-Pedram, M., y Díaz-Dosque, M. (2011). Characterization of quinoa protein–chitosan blend edible films. *Food Hydrocolloids*, 25 (5): 879-886.
- Albertí, P., Panea, B., Ripoll, G., Sañudo, C., Olleta, J.L., Hegueruela, I., Campo, M.M. y Sierra, X. (2000). Medición del color. En: Estandarización de las metodologías para evaluar la calidad del producto (animal vivo, canal, carne y grasa) en los rumiantes. Eds. V. Cañeque y C. Sañudo. p. 216 – 224.
- Álvarez-Chávez, C., Flores-Soto, A. y Pérez-Ríos R. (2009). Análisis de ciclo de vida de la carne bovino en Sonora: Etapa de Sacrificio. International Workshop Advances in Cleaner Production, p. 1-10.
- Alves, V.D., Mali, S., Beléia, A., y Grossmann, M.V. E. (2007). Effect of glycerol and amylose enrichment on cassava starch film properties. *Journal of Food Engineering*, 78(3): 941-946.
- Amoros, M., Lurton, E., Boustie, J. y Girre, I., (1994). Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. *Journal of Natural Products* 57(5): 644-647
- Antic, D., Blagojevic, B., Ducic, M., Nastasijevic, I., Mitrovic, R., y Buncic, S. (2010). Distribution of microflora on cattle hides and its transmission to meat via direct contact. *Food Control*, 21(7): 1025-1029.

- Baird, B.E., Lucia, L.M., Acuff, G.R., Harris, K.B., y Savell, J.W. (2006). Beef hide antimicrobial interventions as a means of reducing Bacterial Contamination. *Meat science*, 73(2): 245-248.
- Bankova V. (2009). Review: chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*. 1(2): 23–28.
- Baltodano T.L.C. y Yaipen C.J.E. (2009). Obtención, caracterización y diseño de una forma farmacéutica semisólida (ungüento) a base de quitosano con efecto cicatrizante. 6 (2): 77-85
- Bedascarrasbure, E., Maldonado, L., Álvarez, A., y Rodríguez, E. (2004). Contenido de fenoles y flavonoides del propóleos Argentino. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 23: 369-372.
- Brown, M.H., Gill, C.O., Hollingsworth, J., Nickelson li, R., Seward, S., Sheridan, J.J., y Zink, D. (2000). The role of microbiological testing in systems for assuring the safety of beef. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1): 7-16.
- Buncic, S., Nychas, G.J., Lee, M.R., Koutsoumanis, K., Hébraud, M., Desvaux, M., y Antic, D. (2013). Microbial pathogen control in the beef chain: Recent Research Advances. *Meat Science*, 97(3): 288-297.
- Bustos-Martínez, J.A., Hamdan-Partida, A., y Gutiérrez-Cárdenas, M. (2006). Reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev Biomed*, 17: 287-305.
- Caballero-Torres, A.E. (2008). Temas de Higiene de los Alimentos. Editorial Ciencias Médicas, La Habana, Cuba, 210-215.

- Carvalho, C.M., Gannon, B.W., Halfhide, D.E., Santos, S.B., Hayes, C.M., Roe, J.M., y Azeredo, J. (2010). The in vivo efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens. *BMC Microbiology*, 10(1): 232.
- Chaijan, M. (2008). Review: lipid and myoglobin oxidations in muscle foods *Songklanakarin. Journal of Science and Technology*, 30: 47-53.
- CIE. (1978). Recommendations of uniform color spaces-color difference equations psychometric color terms. Commission internationale de l'Eclairage, Paris. Supplement nod. 2 to CIE Publication No. 15 (E-1.3.1) 1971-(TC-1.3).
- Croisier, F., y Jérôme, C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49(4): 780-792.
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R.M., y Chiellini, E. (2011). Chitosan A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 36(8): 981-1014.
- Espitia, P.J.P., Du, W.X., Avena-Bustillos, R.D.J., Soares, N.D.F.F., y McHugh, T. H. (2014). Edible films from pectin: physical-mechanical and antimicrobial properties-a review. *Food Hydrocolloids*, 35: 287-296.
- Esquivias, T.d.J.A., Pacheco, M.d.L.C, y Lerena, M.S.M. (2008). Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de propóleos recolectados de apiarios del Estado de Jalisco, México.
- Falowo, A.B., Fayemi, P.O., y Muchenje, V. (2014). Natural antioxidants against lipid protein oxidative deterioration in meat and meat products: A Review. *Food Research International*, 64: 171-181.
- Farré, R., Frasquet, I., y Sánchez, A. (2004). El própolis y la salud. *Ars Pharmaceutica* 45(1): 21-43.

- Flores, T.G. y Herrera, R.A.R. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud pública de México*, 47(5): 388-390.
- Foods, I.C.O. (1991). El sistema de análisis de riesgos y puntos críticos: Su aplicación a las industrias de alimentos, Editorial Acribia Zaragoza, España.
- Franco, J., Feed, O., Bianchi, G., Garibotto, G., Ballesteros, F., Nan, F. y Bentancur, O. (2008). Parámetros de calidad de carne en cinco músculos de novillos Holando durante la maduración postmortem I. Calidad Instrumental. *Agrociencia*, 12(1): 61-68.
- Fuster, N., y Valls, N. (2007). Importancia del control higiénico de las superficies alimentarias mediante técnicas rápidas y tradicionales para evitar y/o minimizar las contaminaciones cruzadas.
- Gill, C.O. y Landers, C. (2003). Microbiological effects of carcass decontaminating treatments at four beef packing plants. *Meat Science*, 65(3): 1005-1011.
- Gou, M., Jin, T.Z., Wang, L., Scullen J., Sommers H. (2013). Antimicrobial films and coating for inactivation of *Listeria innocua* on ready-to-eat deli turkey meat. *Food Control*, (40): 64-70.
- Greene, B.A. y Cumuze, T.H. (1982). Relationship between TBA numbers and inexperienced panelists' assessments of oxidized flavor in cooked beef. *J Food Science*, 47: 52-8.
- Hernández, C.H. E., Almanza, Á.O., Flores A. y Ramos C.E. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y vacío* 22, (3): 57-60.
- Huffman, R.D. (2002). Current and future technologies for the decontamination of carcasses and fresh meat. *Meat Science*, 62(3): 285-294.

- Hugas, M., y Tsigarida, E. (2008). Pros and cons of carcass decontamination: The role of the European Food Safety Authority. *Meat Science*, 78(1): 43-52.
- James, C., James, S.J., Hannay, N., Purnell, G., Barbedo-Pinto, C., Yaman, H. y Corry, J.E. (2007). Decontamination of poultry carcasses using steam or hot water in combination with rapid cooling, chilling or freezing of carcass surfaces. *International Journal of Food Microbiology*, 114(2): 195-203.
- Joint, F. (2004). Codex Alimentarius Commission: Procedural Manual.
- Jouve, J. (1990). Microbiologie alimentaire et filière viande. *Viandes et Produits Carnés*, 11: 213-207.
- Jug, M., Končić, M. Z., y Kosalec, I. (2014). Modulation of antioxidant, chelating and antimicrobial activity of poplar chemo-type propolis by extraction procures. *LWT-Food Science and Technology*, 57(2): 530-537.
- Katircioğlu, H. y Mercan N. (2006). Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different regions. *Afr J Biotechnol*, 5: 1151-1153.
- Lawrie, R. (1998). The eating quality of meat. *Meat Science*, 4: 300-362.
- Leceta, I., Guerrero, P., Ibarburu, I., Dueñas, M. T., y De la Caba, K. (2013). Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. *Journal of Food Engineering*, 116 (4): 889-899.
- Liu, Y., Chen, W., y Kim, H.I. (2012). Antibacterial activity of pH-sensitive genipin cross-linked chitosan/poly (ethylene glycol)/silver nanocomposites. *Polymers for Advanced Technologies*, 23(1): 8-14.

- Loretz, M., Stephan, R., y Zweifel, C. (2011). Antibacterial activity of decontamination treatments for cattle hides and beef carcasses. *Food Control*, 22(3): 347-359.
- Lou, M.M. y Zhu, B. (2011). Antibacterial activity and mechanism of action of chitosan solutions against apricot fruit rot pathogen *Burkholderia Seminalis*. *Carbohydrate Research* 346(11): 1294-1301.
- Madrid, J.A. (2007). Composición y factores de calidad de la carne de bovino producida en la región centro del estado de Sonora. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Departamento de Agricultura y Ganadería. Hermosillo, Sonora, México.
- Maher, Z. E, y Entsar S. A (2013). Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 33(4): 1819-1841.
- Martínez, J., García, C., Durango, D., y Gil, J. (2012). Caracterización de propóleos provenientes del municipio de Caldas obtenido por dos métodos de recolección. *Revista MVZ Córdoba*, 17(1): 2861-2869.
- Mani-López, E., García, H.S., y López-Malo, A. (2012). Organic acids as antimicrobials to control Salmonella in meat and poultry products. *Food Research International*, 45(2): 713-721.
- Martínez-Camacho, A.P., Cortez-Rocha, M.O., Ezquerro-Brauer, J.M., Graciano-Verdugo, A.Z., Rodríguez-Félix, F., Castillo-Ortega, M.M., y Plascencia-Jatomea, M. (2010). Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*, 82(2): 305-315.
- Martins, J.T., Cerqueira, M.A. y Vicente, A.A. (2012). Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids*, 27(1): 220-227.

- Marull, C.A. y Carmanchahi, P.D. (2008). Protocolo de Buenas Prácticas de Manejo de Guanacos (*Lama guanicoe*) Silvestres. Sitio Argentino de Producción Animal, 1-10.
- Michanie, S. (2003). *Escherichia Coli* 0157: H7 la bacteria que disparó el HACCP en la industria de la carne. *Ganados y Carnes*, 4(17): 40-42.
- Michanie, S. (2004). *Listeria monocytogenes*, la bacteria emergente de los 80. *Ganados y Carnes*, 4(18): 34-37.
- Miyataka, H., Nishiki, M., Matsumoto, H., Fujimoto, M.M. y Satoh T. (1997). Evaluation of propolis. I. Evaluation of Brazil and Chile propolis by enzymatic and physico-chemical methods. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 20 (5): 496-501.
- Muñoz, A.I., Vargas, M., Otero, L., Díaz, G., y Guzmán, V. (2011). Presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, procedentes de plazas de mercado y delicatessen de supermercados de cadena, Bogotá, DC, 2002-2008. *Biomédica*, 31(3): 428-39.
- Muzzarelli, R.A. (2009). Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers*, 77(1): 1-9.
- Navarro-Navarro, M., Lugo-Sepúlveda, R.E., García-Moraga M., Rosa-López, R., Robles-Zepeda, R.E., Ruiz-Bustos, E., y Velázquez Contreras, C.A., (2012). Actividad antibacteriana y antioxidante de extractos metanólicos de propóleos de Magdalena de Kino y Sonoyta, Sonora. *Biotecnia*, 14(3): 9-15.
- NCCLS National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, Pa, USA (2003). Documents M7-A6 and 100-S13: NCCLS, 20 (2).
- NOM. (2002). NMX-FF-078-2002. Productos pecuarios-Carne de bovino en canal.

NOM. (1994). NOM-008-ZOO-1994. Especificaciones zoosanitarias para la construcción y equipamiento de establecimientos para el sacrificio de animales domésticos.

NOM. (1994). NOM-110-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

NOM. (2004). NOM-194-SSA1-2004. Norma Oficial Mexicana. Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos. México, D.F. Secretaría de Salud 18.

Nouichi, S. y T. M. Hamdi (2009). Superficial bacterial contamination of ovine and bovine carcasses at El-Harrach slaughterhouse (Algeria). *European Journal of Scientific Research* 38(3): 474-485.

Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H., y Hosseini, S. M.H. (2010). Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, 120(1): 193-198.

Park, S.I., Marsh, K.S., y Dawson, P. (2010). Application of chitosan-incorporated LDPE film to sliced fresh red meats for shelf life extension. *Meat science*, 85(3): 493-499.

Parrilla, M.C., Vázquez, J.L., Saldate, E.O., y Nava, L.M. (1993). Brotes de toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario. *Salud Pública de México*, 35(5): 456-463.

- Peleari, M.A., Camisasca, S., Beretta, G., Renon, P., Corsico, P., Bertolo, G. y Crivelli, G. (1998). Ostrich meat: physico-chemical characteristics and comparison with turkey and bovine meat. *Meat Science*, 48(3): 205-210.
- Pérez-Chabela, M.L., Guerrero, I., y Ponce, E. (2008). Detección de microorganismos patógenos e indicadores en carne de bovino que se expende en supermercados de la Ciudad de México. *Nacameh*, 2(2): 188-194.
- Pfalzgraf, A., Frigg, M. y Steinhart, H. (1995). Alpha-Tocopherol Contents and Lipid Oxidation in Pork Muscle and Adipose Tissue during Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(5): 1339-1342.
- Ramos, M.E.S., y Díaz, C.G. (2011). Identificación de *Escherichia coli* O157: H7 en muestras de heces de pacientes con enfermedad diarreica aguda y en muestras de carne comercializadas en supermercados de San Salvador, El Salvador. *Minera Revista en Línea CIC-UES*, 2(1): 28-34.
- Reuben, A.H. Treminio, M.L. Arias, y Chaves, C. (2003). Presencia de *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.* en alimentos de origen animal en Costa Rica. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 53: 389-392.
- Río-Martínez, P.I. (2006). Actividad biocida de un propolis chileno frente a *Porphyromonas gingivalis*: estudio in vitro. Trabajo de Investigación, para titulación de cirujano dentista, 120 páginas.
- Rivera P.F., Wesley, I., Hurd, S., Simoes, D., Sosa, A. y Rivera Pirela, S.E. (2006). Determinación Microbiológica y Molecular de *Listeria spp.* y *Listeria monocytogenes* en Cerdas a nivel de una planta beneficiadora en EUA. *Revista Científica*, 16(3): 297-307.

- Romero, B.L., Estrada, B.Y., Guzmán, C.L.D., Pedraza, D. B.A., y Matiz M.G.A. (2011). Elaboración de una película comestible a base de colágeno incorporado con nisina como agente antimicrobiano para reducir la pérdida de humedad y oxidación de las grasas en filetes de carne de cerdo en refrigeración. Doctoral dissertation, Universidad de Cartagena.
- Rosset, P., Beaufort, A., Cornu, M. y Poumeyrol, G. (2002). La chaîne du froid Agroalimentaire. *Cahier de Nutrition et de Diététique*, 37(2): 124-130.
- Ruiz de Huidobro, F., Miguel, E., Onega, E. y Blázquez, B. (2003). Changes in meat quality characteristics of bovine meat during the first 6 days post mortem. *Meat Science*, 65(4): 1439-1446.
- Ryu, Y.C. y Kim, B.C. (2005). The relationship between muscle fiber characteristics, *postmortem* metabolic rate, and meat quality of pig *longissimus dorsi* muscle. *Meat Science*, 71: 351-357.
- Sanchis, M.S., Otero, M.M., García, E.S., Romero, P.S. y Narro, C.G. (2011) Caracterización del color y relación con el pH de pechuga de pollo durante el procesado de las canales en matadero. XLVIII Simposio Científico de Agricultura, Santiago de Compostela, España.
- Samelis, J., Sofos, J.N., Kendall, J., Smith, A. y Gracy, C. (2001). Fate of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella Typhimurium* DT 104, and *Listeria monocytogenes* in fresh meat decontamination fluids at 4 and 10C. *Journal of Food Protection*, 64(7): 950-957.
- Sánchez-Aldana, D., Contreras-Esquivel, J.C., Nevárez-Moorillón, G.V. y Aguilar, C.N. (2014). Caracterización de películas comestibles a base de extractos pépticos y aceite esencial de limón Mexicano. *CyTA Journal of Food*, 13(1): 17-25.
- Sánchez-Escalante, A., Urrutia, G.R.T., Arriola, J.P.C., Méndez, N.F.G., y Watanabe, G.H. (2008). Sistemas combinados de conservación para

prolongar la vida útil de la carne y los productos cárnicos. *Nacameh*, 2(2): 124-159.

Sánchez-González, L., González-Martínez, C., Chiralt, A. y Cháfer, M. (2010). Physical and antimicrobial properties of chitosan–tea tree essential oil composite films. *Journal of Food Engineering*, 98(4): 443-452.

Schreiber, S.B., Bozell, J., Hayes, G. y Zivanovic, S. (2013). Introduction of primary antioxidant activity to chitosan for application as a multifunctional food packaging material. *Food Hydrocolloids*, 33.2: 207-214.

Shukla, S.K., Mishra, A.K., Arotiba, O.A. y Mamba, B.B. (2013). Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art. Review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59: 46-58.

Sionkowska, A., Skopinska-Wisniewska, J., Planecka, A. y Kozłowska, J. (2010). The influence of UV irradiation on the properties of chitosan films containing keratin. *Polymer Degradation and Stability*, 95(12): 2486-2491.

Sofos, J.N. y Smith, G.C. (1998). Nonacid meat decontamination technologies: Model studies and commercial applications. *International Journal of Food Microbiology*, 44(3): 171-188.

Srinivasa, P.C., Ramesh, M.N., y Tharanathan, R.N. (2007). Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 21(7): 1113-1122.

Stanišić N., Petričević M., Živković D., Petrović M.M., Ostojić-Andrić D., Aleksić S. y Stajić S. 2012. Changes of physical-chemical properties of beef during 14 days of chilling. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 28 (1): 77-85.

Standard, A.S.T.M. (2011). D882 Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. *ASTM International, West Conshohocken, PA*, doi: 10.1520-10.

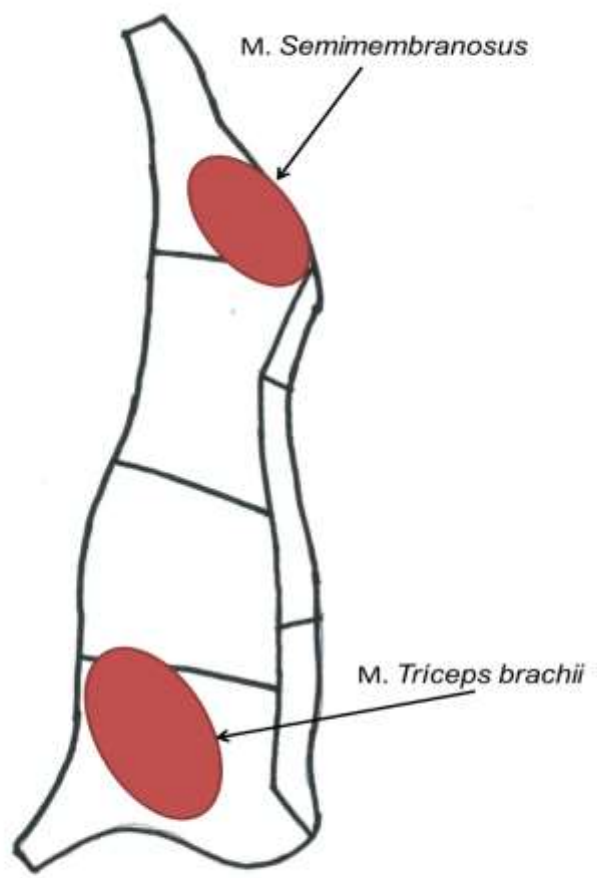
- Stopforth, J., Samelis, J., Sofos, J.N., Kendall, P.A. y Smith, G.C. (2003). "Influence of organic acid concentration on survival of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 in beef carcass wash water and on model equipment surfaces. *Food Microbiology*, 20(6): 651-660.
- Sun, X., Wang, Z., Kadouh, H., y Zhou, K. (2014). The antimicrobial, mechanical, physical and structural properties of chitosan-gallic acid films. *Food Science and Technology*, 57(1): 83-89.
- Téllez Villena, J. (2005). "Calidad de carne de vacunos." *Alimentos Perú*. 4(23): 46-47.
- Torrescano-Urrutia, G.R., Sánchez-Escalante, A., Palma-Vazquez, G.M., Paz-Pellat, R. y Pardo-Guzmán, D.A. (2010). Caracterización de canales y de carne de bovino de animales engordados en la zona centro de Sonora. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 1(2): 157-168.
- Torrescano, G., Sánchez-Escalante, A., Giménez, B., Roncales, P. y Beltran, J.A. (2003). Shear values of raw samples of fourteen bovine muscles and their relation to muscle collage characteristics. *Meat Science*, 64: 1:85-91.
- Torrescano-Urrutia, G.R. (2002). Caracterización de las propiedades químicas y estructurales de más importantes del tejido conjuntivo intramuscular de vacuno y su relación con la dureza de la carne. Tesis de Doctorado. Universidad de Zaragoza, España.
- Treviño-López, R. y Mata-Tijerina, V. (2009). Detection of *Escherichia coli* O157: H7 in fresh meat using multiplex PCR. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 10(2).
- Uicab-Brito, L. y Castro, C.S. (2003). Uso del contenido ruminal y algunos residuos de la industria cárnica en la elaboración de composta. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 2(2): 45-63.

- USDA-FSIS. (1996). Pathogen Reduction, Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems. Final Rule. *Federal Register*, 61; 28805-38855.
- Valencia, D., Alday, E., Robles-Zepeda, R., Garibay-Escobar, A., Gálvez-Ruiz, J. C., Salas-Reyes, M. y Velázquez, C. (2012). Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chemistry*, 131(2): 645-651.
- Vásquez, M.B., Flores, S.K., Campos, C.A., Alvarado, J., y Gerschenson, L.N. (2009). Antimicrobial activity and physical properties of chitosan–tapioca starch based edible films and coatings. *Food Research International*, 42(7), 762-769.
- Velázquez, C., Navarro, M., Acosta, A., Angulo, A., Dominguez, Z., Robles, R. and y Hernández, J. (2007). Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonora propolis. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5): 1747-1756.
- Vodnar, D. C. (2012). Inhibition of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 on ham steak by tea bioactive compounds incorporated into chitosan-coated plastic films. *Chemistry Central Journal*, 6(1): 1-6.
- Xu, T., y Xin, M. (2011). Synthesis, characterization, and antibacterial activity of no quaternary ammonium chitosan. *Carbohydrate Research*, 346(15): 2445-2450.
- Yáñez, E., Máttar, S., y Durango, A. (2011). Determinación de *Salmonella spp.* por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba. *Infection*, 12(4): 246-254.
- Yu-Yue, Q., Ji-Yi, Y., Hong-Bo, L., Sha-Sha, W., Jing-Ynag, y Xing-Chao, Y. (2013). Effect of chitosan film incorporated with tea polyphenol on quality and shelf life of pork meat patties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61: 312-316.

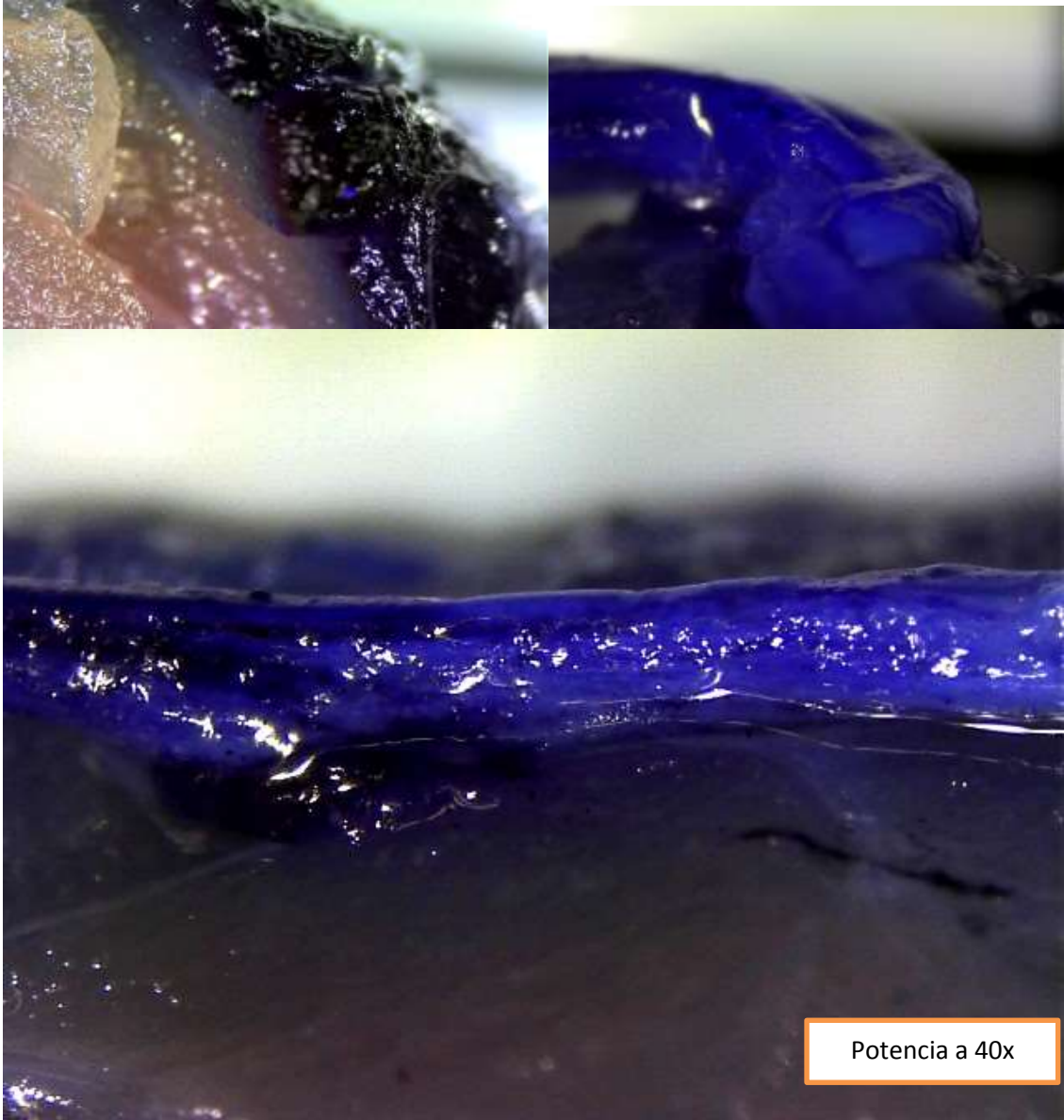
Zamudio Flores, P.B. (2009). Caracterización estructural de películas elaboradas con almidón modificado de plátano y con quitosano. Tesis Doctoral. Insituto Politécnico Nacional, Mexico.

VIII. ANEXOS

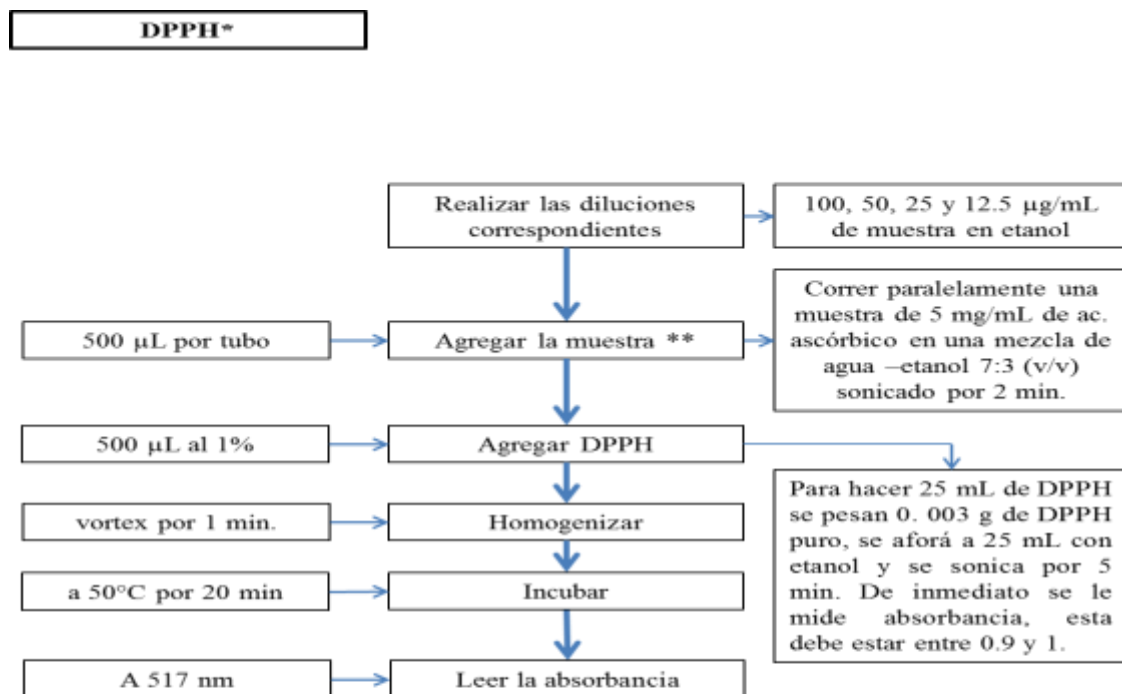
Anexo 1. Ubicación en la canal de bovino de músculos utilizados como unidad experimental.



Anexo 2. Imagen digitalizada mostrando el espesor del recubrimiento de quitosano sobre carne de bovino.



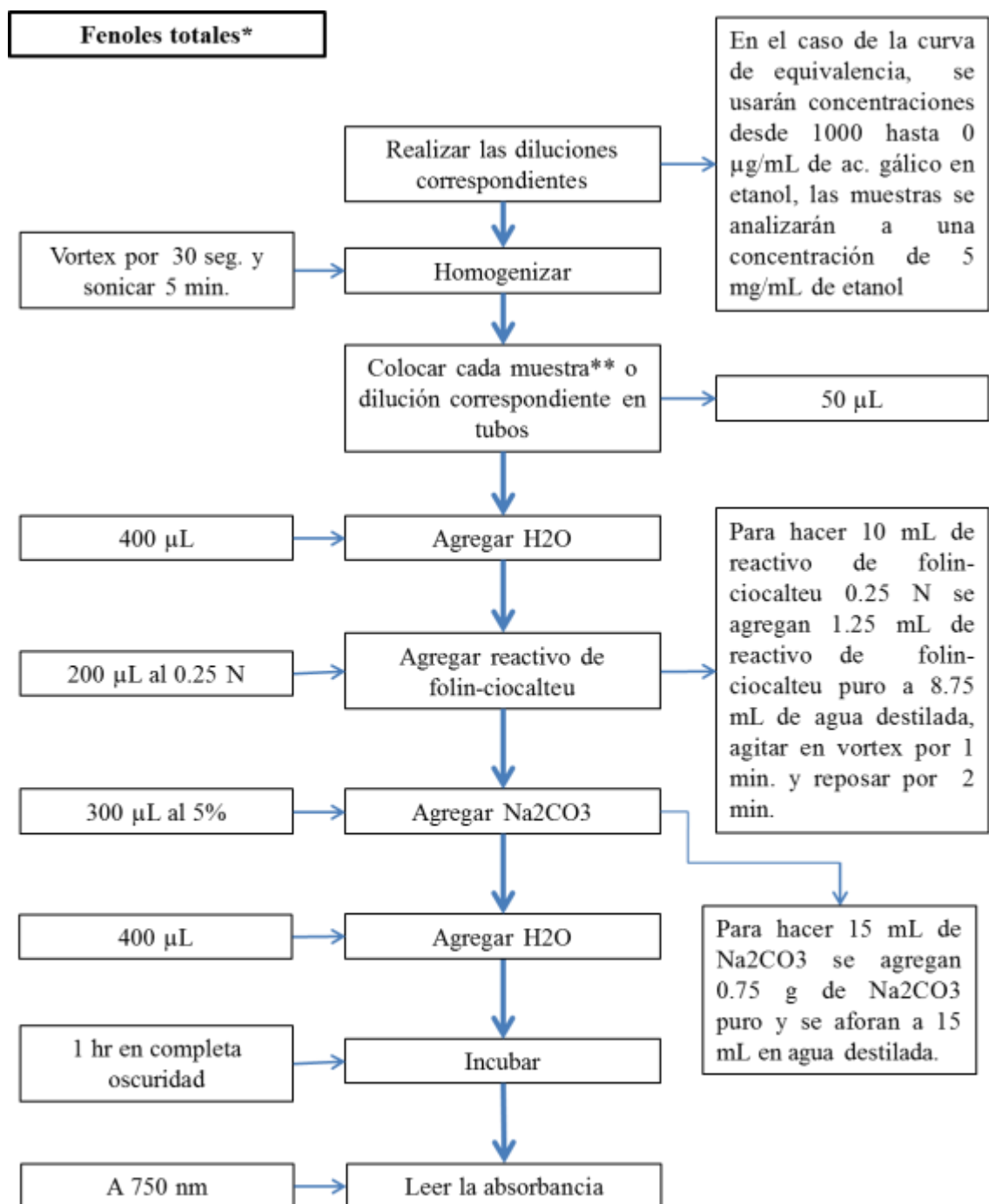
Anexo 3. Metodología para el análisis de la capacidad inhibitoria del radical DPPH.



* La técnica debe realizarse en condiciones de oscuridad

**medir un blanco de reactivos con etanol

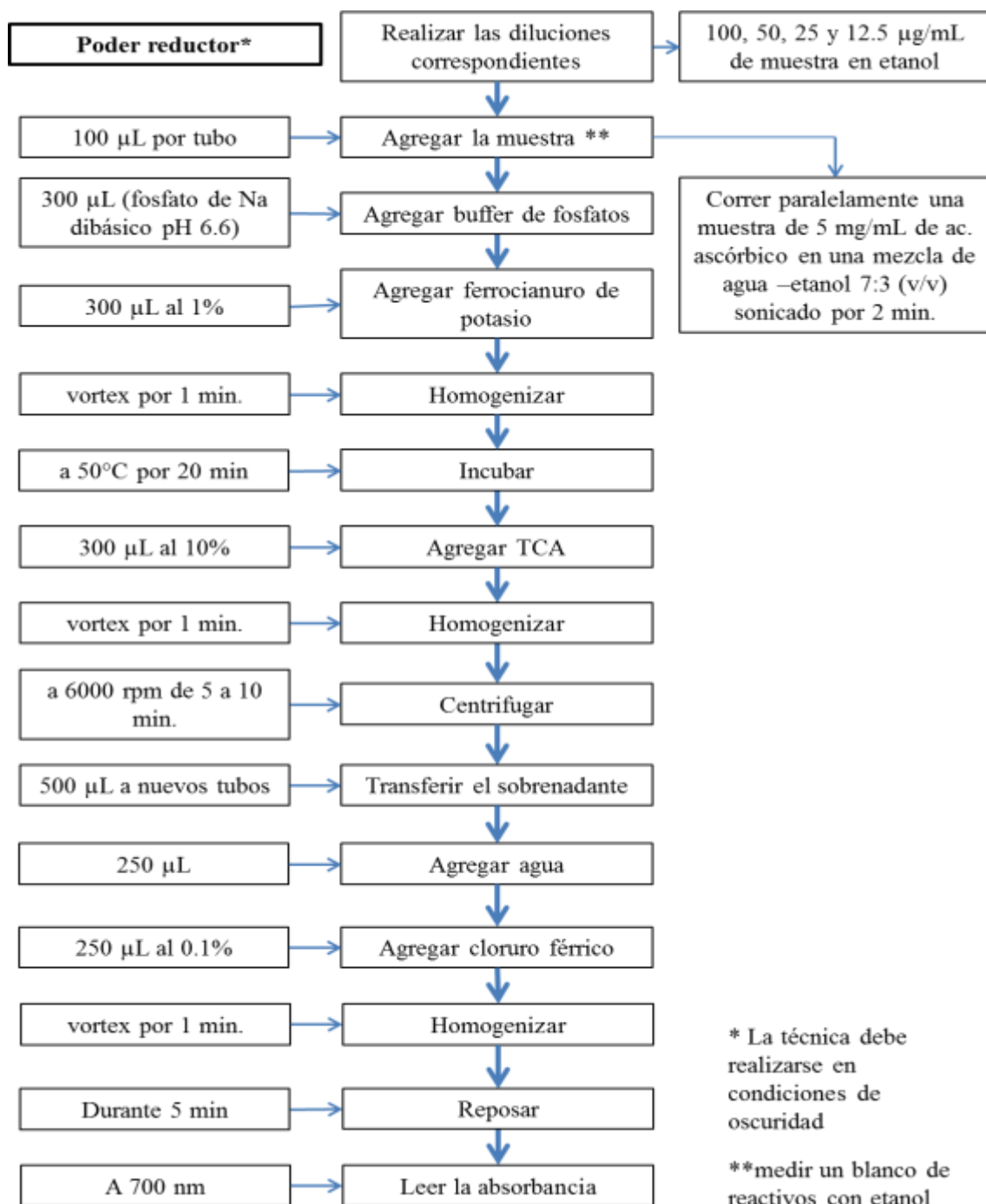
Anexo 4. Metodología para el análisis del contenido de fenoles totales.



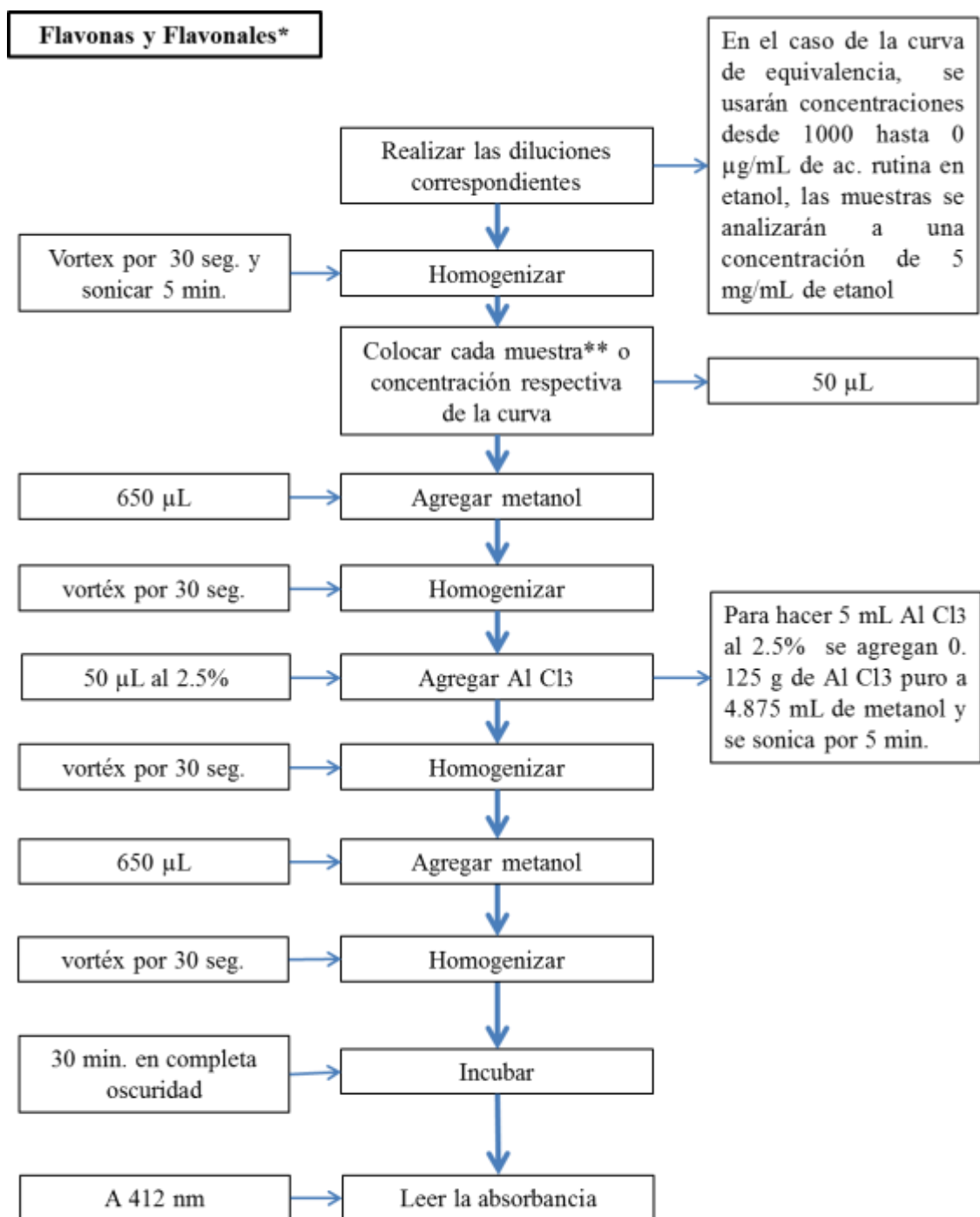
* La técnica debe realizarse en condiciones de oscuridad

**medir un blanco de reactivos con etanol

Anexo 5. Metodología para la evaluación del poder reductor.



Anexo 6. Metodología para el análisis del contenido de flavonoides.



* La técnica debe realizarse en condiciones de oscuridad
 **medir un blanco de reactivos con etanol

Anexo 7. Esquema utilizado para el análisis microbiológico de la carne.

