



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

**DESARROLLO DE UN ENVASE ACTIVO CON
EXTRACTOS VEGETALES ANTIBACTERIANOS
INCORPORADOS EN PELÍCULAS DE POLIETILENO DE
BAJA DENSIDAD**

Por:

Rosa Nitzia Arce Carrillo

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora

Enero de 2015

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la Q.F.B. Rosa Nitzia Arce Carrillo, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



Dra. Herlinda Soto Valdez
Directora de tesis

Dra. Evelia Acedo Félix
Asesora



Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala
Asesor



M.C. Elizabeth Peralta
Asesora

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 dé 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 Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por las facilidades otorgada para la realización del presente trabajo.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD) por haber sido como un segundo hogar durante mi estancia en el posgrado.

A la Dra. Herlinda Soto por todo su apoyo, dedicación y exigencia que ayudaron a enriquecer mi formación personal y profesional.

A la M.C. Elizabeth Peralta por todo su apoyo y amistad durante toda mi estancia en el posgrado. Por todos los consejos compartidos, por ser un gran ejemplo de persona, toda mi admiración y respeto.

A la Q.B. Rosalva Pérez Morales por todo el apoyo técnico durante la realización de los análisis antibacterianos de los extractos y películas plásticas elaboradas.

A la M.C. María del Refugio Robles Burgueño por el apoyo técnico otorgado durante la identificación de los principales compuestos presentes en el extracto de té verde y películas plásticas elaboradas.

A los miembros del comité de tesis, Dra. Evelia Acedo Félix y Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala, por su disponibilidad, comentarios y sugerencias que hicieron posible la culminación de este trabajo.

A todo el personal del laboratorio de Microbiología de Alimentos y Microbiología Molecular por las facilidades otorgadas en el uso de equipos y material.

A todo el personal de la Coordinación de Alimentos de Origen Vegetal , en especial a Judith Fortiz, Jorge Mercado, Pame, Dr. Gustavo González, Dr. Tomás Madera y Dra. Ana María Mendoza Wilson por el préstamo de equipos y material necesarios para la realización de este trabajo.

A mis compañeras de laboratorio Panchita, Citlali, Nora, Enit, Migdalia, Lizeth, Brenda y Cinthya, por todos los momentos compartidos, su apoyo cuando lo necesitaba y sobre todo por su gran amistad.

A mis amigas de toda la vida Tali, Marce, Chío, Paloma, Brenda y Lupis, por estar conmigo a pesar de la distancia y las múltiples ocupaciones de cada una, gracias por darme ánimos y escucharme en los buenos y malos momentos.

A Leo por todo su apoyo incondicional, amistad y cariño, por coincidir en este mundo y poder compartir momentos de calidad.

DEDICATORIA

A Dios por darme la paciencia, serenidad y fortaleza para llevar a feliz término este trabajo.

A mis padres por todo su apoyo y amor incondicional, ustedes son la motivación para seguir adelante.

A mis hermanos, sobrinos y demás familiares, a pesar de la distancia sé que puedo contar con su cariño y apoyo.

A mis amigos que sin importar el tiempo y la distancia, me dan palabras de aliento, consejos y cariño.

INDICE GENERAL

APROBACIÓN	ii
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA	vi
INDICE GENERAL.....	vii
INDICE DE CUADROS.....	ix
INDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	14
ANTECEDENTES.....	16
Actividad Antimicrobiana de Extractos Vegetales.....	16
Constituyentes Químicos de los Extractos Vegetales.....	20
Componentes del Orujo de Uva (<i>Vitis vinífera L.</i>)	22
Componentes del Apio (<i>Apium graveolens</i>).....	24
Componentes del Té Verde y sus Extractos (<i>Camellia sinensis</i>)	26
Susceptibilidad de los Compuestos Fenólicos en Extractos Vegetales a Tratamientos Térmicos.....	28
Propiedades Térmicas de los Polímeros	30
Incorporación de Antimicrobianos Naturales en Películas Plásticas	33
Justificación	37
HIPÓTESIS.....	38
OBJETIVOS.....	39
General.....	39
Específicos	39
MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
Materiales	40
Equipos.....	41
Métodos.....	42
Etapa I.....	42
Concentración del extracto acuoso de apio (EA) y elaboración del ETV	42

INDICE GENERAL (Continuación...)

Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos de orujo de uva, té verde y apio.....	43
Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos mayoritarios presentes en el extracto antibacteriano	43
Etapa II.....	45
Elaboración de las películas de PEBD con el extracto antibacteriano	45
Evaluación de la actividad antibacteriana de la película adicionada con extracto antibacteriano.....	45
Cuantificación de los compuestos fenólicos y flavonoides presentes en la película adicionada con extracto antibacteriano	48
Diseño Experimental y Análisis Estadístico	49
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
Etapa I	51
Actividad Antibacteriana de los Extractos de Orujo de Uva, Apio y Té Verde	51
Compuestos Fenólicos Mayoritarios Presentes en el Extracto de Té Verde	57
Cuantificación de Compuestos Fenólicos por HPLC.....	70
Etapa II	73
Actividad Antibacteriana de la Película de PEBD Adicionada con ET V	73
Compuestos Presentes en la Película de PEBD Adicionada con ETV.....	76
CONCLUSIONES	83
RECOMENDACIONES.....	84
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
APENDICES	101
Abreviaturas	101
Estructuras moleculares de los compuestos fenólicos y flavonoides	103

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Actividad antimicrobiana de extractos naturales contra bacterias Gram positivas	52
Cuadro 2. Actividad antimicrobiana de extractos naturales contra bacterias Gram negativas.....	53
Cuadro 3. Tiempo de retención, características espectrales de masas, identidad y concentración de los compuestos fenólicos presentes en el ETV.....	60
Cuadro 4. Actividad antibacteriana de las películas de PEBD control y adicionadas con ETV en contacto directo contra tres bacterias.....	75
Cuadro 5. Tiempo de retención, características espectrales de masas e identidad de los compuestos fenólicos presentes en la película de PEBD+ETV.	80
Cuadro 6. Efecto del proceso de extrusión en la concentración de cafeína (Cf) en la película.....	82

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pared celular en bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	19
Figura 2. Perfil típico HPLC de polifenoles, con 28 compuestos abundantes en alimentos vegetales.	21
Figura 3. Partes de la uva y principales componentes fenólicos de la semilla y orujo de uva.	23
Figura 4. Partes del apio y principales componentes del aceite esencial.	25
Figura 5. Hojas frescas y secas de Té verde y principales componentes hidrosolubles en las hojas.....	27
Figura 6. Proceso de extrusión soplo de películas plásticas.....	32
Figura 7. Inoculación de la película adicionada con extracto antibacteriano y colocación de la película de cubierta	46
Figura 8. Mecanismo propuesto de la actividad antibacteriana de GEGC.....	56
Figura 9. Cromatograma HPLC-DAD de extracto de té verde (A) y estándar de ácido gálico (AG) (B) a 210 nm.....	58
Figura 10. Cromatogramas HPLC-DAD de extracto de té verde (A) y estándares (B y C) a 275 nm	59
Figura 11. Fragmentación propuesta para el ácido gálico	62
Figura 12. Espectro de masas en modo negativo de GEGC en ETV y estándar.	63
Figura 13. Fragmentación propuesta para galato de epigallocatequina	64
Figura 14. Espectro de masas en modo negativo de epicatequina en el ETV y estándar.....	66
Figura 15. Fragmentación propuesta para epicatequina.....	67

INDICE DE FIGURAS (Continuación...)

Figura 16. Espectro de masas en modo positivo de cafeína en el extracto de té verde (ETV) y estándar.....	68
Figura 17. Fragmentación propuesta de la cafeína.....	69
Figura 18. Películas de polietileno de baja densidad (PEBD) elaboradas	74
Figura 19. Cromatograma HPLC-iones totales (TIC) de películas de PEBD+ETV (A) y control (B), modo negativo.....	78
Figura 20. Cromatograma HPLC-iones totales (TIC) de películas de PEBD+ETV (A) y control (B), modo positivo.	79

RESUMEN

Investigaciones en envases activos muestran que compuestos puros de origen vegetal incorporados a los materiales de envase se degradan por efecto de las temperaturas de procesamiento utilizadas durante la fabricación por extrusión. En este estudio se evaluó la capacidad antibacteriana de tres extractos: té verde (ETV), orujo de uva (EOU) y apio (EA) contra *Escherichia coli*, *Salmonella tiphyrum*, *Salmonella Cholearesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Se seleccionó a ETV para adicionarse en la fabricación de películas de polietileno de baja densidad (PEBD) por presentar actividad antibacteriana contra un mayor rango de bacterias (*L. monocytogenes*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*). Los compuestos identificados en ETV fueron galato de epigallocatequina (GEGC) 133.59 ± 20.18 mg/g, cafeína (Cf) 98.27 ± 12.31 mg/g, epicatequina (EC) 27.96 ± 2.80 mg/g y ácido gálico (AG) 0.58 ± 0.11 mg/g. Se estimó galato de galocatequina (GGC) en un rango de 24.32 – 33.02 mg/g. Se elaboraron dos películas de PEBD adicionada con ETV al 0 y 4.35%. La película con ETV presentó actividad antibacteriana contra *L. monocytogenes* con una reducción del 39.22% del crecimiento en 48 h de contacto. El proceso de extrusión ejerció un efecto significativo en la degradación de los compuestos presentes en el ETV, manteniéndose el 32.91% de la Cf contenida en el ETV agregado al PEBD. No se detectaron las catequinas cuantificadas previamente en el ETV, excepto GEGC en niveles que no fue posible cuantificar. Estas pérdidas afectaron la actividad antibacteriana, efecto que se confirmó por la ausencia de efectividad contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

Palabras clave: actividad antibacteriana, té verde, extracto, envase activo, extrusión, PEBD.

ABSTRACT

Pure natural compounds added to plastic active packaging degrade as a result of the processing temperatures during extrusion. In this study the antibacterial activity of three extracts obtained from green tea (ETV), grape pomace (EOU) and celery (EA) was evaluated against *Escherichia coli*, *Salmonella tiphymurim*, *Salmonella Cholearesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. ETV presented activity against *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *P. aeruginosa* and was selected to be added in the manufacture of films made of low density polyethylene (LDPE). Five compounds were identified and quantified in the ETV: epigallocatechin gallate (GEGC) 133.59 ± 20.18 mg/g, caffeine (Cf) 98.27 ± 12.31 mg/g, epicatechin (EC) 27.96 ± 2.80 mg/g and gallic acid (AG) 0.58 ± 0.11 mg/g. Gallocatechin gallate (GGC) was estimated in the range of 24.32 - 33.02 mg/g. Two films added with 0 (control film) and 4.35% (ETV film) of ETV were manufactured. The ETV film presented antibacterial activity against *L. monocytogenes* with a growth reduction of 39.22% at 48 h of contact. The extrusion process promoted the degradation of the ETV components finding a 32.91% of the Cf added to the ETV film. Catechins previously quantified in the ETV were not detected in the film except EGCG at levels that could not be quantified. These losses affected the antibacterial activity against *S. aureus* and *P. aeruginosa*.

Keywords: antibacterial activity, green tea extract, active packaging, extrusion, LDPE.

INTRODUCCIÓN

Los alimentos son productos perecederos por naturaleza y están expuestos a cambios que pueden incidir en su calidad (pérdida de nutrientes y atributos sensoriales) o conservación (Ortega-Ramirez et al., 2014; Ulloa, 2007). Las reacciones deteriorativas que se llevan a cabo en los alimentos pueden ser de tipo físico, químico, enzimático y biológico, dentro de este último se encuentran las ocasionadas por los insectos y microorganismos (Robertson, 2012). Las alteraciones ocasionadas por los microorganismos hacen a los alimentos inaceptables para su consumo y se asocian como una de las principales causas de enfermedades. El tipo de microorganismos presentes en un alimento en particular está influido por factores intrínsecos y extrínsecos. Los primeros se asocian a la naturaleza del alimento, tales como el pH, actividad de agua y composición. Los factores extrínsecos se asocian a las condiciones del medio donde se encuentra el alimento, dentro de ellos están la temperatura, humedad relativa, así como la presencia y concentración de gases. Para retrasar el deterioro de los alimentos el mayor tiempo posible se recurre a diferentes procesos de conservación (Sivansankar, 2005).

La conservación de un alimento se logra mediante procesos tecnológicos (esterilización, secado, congelación, etc.) o mediante el empleo de aditivos (Carocho et al., 2014; Durán, 2001). La mayoría de los alimentos combinan los procesos tecnológicos con el uso de aditivos para conservar la frescura, mejorar el valor nutricional, optimizar las propiedades sensoriales o mantener la calidad y seguridad. Los aditivos o conservadores de origen natural o artificial, se agregan a los alimentos de manera intencional durante su producción, almacenamiento, envasado o transporte afectando las características de tales

alimentos (Carocho et al., 2014). La incorporación intencional de aditivos a los materiales de envase o espacio de cabeza influyen significativamente en la conservación de los alimentos, estos desarrollos tecnológicos son conocidos como envases activos (Robertson, 2012).

Actualmente la industria alimentaria muestra una tendencia a utilizar los conservadores naturales como respuesta a las exigencias de los consumidores por productos mínimamente procesados y de ser posible sin aditivos o con aditivos naturales (Carocho et al., 2014; Durán, 2001; Ortega-Ramirez et al., 2014). Las concentraciones empleadas en la aplicación directa a los alimentos para lograr su actividad, impacta en sus propiedades organolépticas (Ortega-Ramirez et al., 2014; Siripatrawan y Noipha, 2012). Por tal motivo una alternativa tecnológica es la utilización de envases activos, en los cuales los aditivos antimicrobianos son liberados de manera gradual al alimento. Estos tienen como objetivo prolongar la fase de latencia y disminuir la velocidad de crecimiento de los microorganismos, de tal manera se mantiene la seguridad y prolonga la vida de anaquel del alimento (Carocho et al., 2014; Valdés et al., 2014).

A pesar de que existen diversos estudios donde se ha comprobado la actividad antimicrobiana de aditivos naturales como los aceites esenciales y extractos herbales, sólo algunos se han incorporado en los envases. Debido a que cada resina utilizada en los envases es diferente y existe una gran cantidad de extractos y aceites esenciales antimicrobianos, resulta necesario estudiar su incorporación y posible efecto para la potencial obtención de un envase activo. Por tal motivo el objetivo de este trabajo es evaluar el efecto del proceso de fabricación (extrusión) de una película plástica adicionada con un extracto vegetal sobre su actividad antibacteriana.

ANTECEDENTES

Actividad Antimicrobiana de Extractos Vegetales

El hombre ha utilizado desde la época primitiva, aditivos naturales para preservar alimentos perecederos, siendo los primeros la sal, miel y algunas especias en combinación con procesos como el secado, la fermentación o el ahumado (Amárita, 2004). Existe una gran variedad de especias, frutos y vegetales que poseen compuestos de interés en hojas, semillas, flores y bulbos que les confieren actividad antimicrobiana (Chen et al., 2012; Ignat et al., 2011; Xi, Sullivan et al., 2012). Algunos extractos vegetales poseen actividad antioxidante, antimutagénica, antifúngica y/o antibacteriana. La actividad antibacteriana se debe principalmente al efecto combinado de la absorción de polifenoles en las membranas de las bacterias con la generación de hidroperóxidos, ocasionando la salida del contenido celular (Negi, 2012).

Dentro de los extractos que poseen actividad antimicrobiana reportada se encuentran el de orujo de uva, apio y té verde. El orujo o bagazo de uva es el desecho generado en la producción vinícola y está constituido por el 50% de hollejo o piel, 25% de semillas y 25% de tallos (Jin y Kelly, 2009; Sagdic et al., 2012). Investigaciones atribuyen la actividad antimicrobiana a los compuestos fenólicos presentes en la uva; en la piel se encuentran principalmente taninos condensados, flavanoles, ácidos fenólicos y resveratrol. Por su parte en las semillas y tallos se localiza la mayor parte del contenido fenólico, conformado de catequinas, oligómeros de procianidinas, estilbenos, ácidos fenólicos y rutina (Katalinić et al., 2010; Perumalla y Hettiarachchy, 2011; Xia et al., 2013).

En un estudio *in vitro* el extracto de semilla de uva fue capaz de inhibir el crecimiento de diferentes cepas de *Campylobacter* a partir de una concentración de 20 mg/l. Esta actividad fue atribuida a las catequinas (catequina y epicatequina), proantocianidinas (procianidina B1 y B2) y ácidos fenólicos (ácido caftárico) principales componentes del extracto (Silván et al., 2013). Los mecanismos de acción propuestos para las catequinas y ácidos fenólicos se relacionan con daño en la membrana, afectaciones a la bomba sodio-potasio (ATPasa), unión a proteínas, inhibición de enzimas y alteraciones de ADN (Cheng et al., 2012; Oliveira et al., 2013; Silván et al., 2013; Sivarooban et al., 2008).

Otro de los extractos naturales que ha demostrado tener actividad antimicrobiana es el de apio (*Apium graveolens*). Éste vegetal se consume fresco o cocido y desde la antigüedad se ha utilizado por sus propiedades medicinales y actualmente como saborizante en diversos alimentos (Cásseres, 1980; Martínez et al., 2003). El aceite esencial ha demostrado actividad antibacteriana contra cepas de *S. aureus* aisladas de pollo y cepas de *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* aisladas de carne molida (Misic et al., 2008). En un estudio *in vitro* el aceite esencial de apio demostró actividad inhibitoria contra diversas bacterias (*Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter amnigenus* y *Enterobacter gergoviae*), siendo la más susceptible *Listeria innocua*. Dicha actividad fue atribuida a β -selineno, felandral, limoneno y epiglobulol, principales compuestos identificados en el aceite esencial (Alves-Silva et al., 2013).

Además del aceite esencial, extractos metanólicos de apio han presentado actividad contra hongos (*Candida albicans*, *C. kreussei* y *C. parapsilosis*) y bacterias (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *Enterococcus faecalis*). Esta actividad se ha relacionado con su alto contenido de compuestos fenólicos (340 mg equivalentes de catequina/g (EqC/g de extracto). Aunque se desconocen los mecanismos de acción, los propuestos consisten en ataque a la bicapa de fosfolípidos en la membrana, disrupción de sistemas enzimáticos, oxigenación

de ácidos grasos insaturados, daño de lípidos y proteínas, y distorsión del flujo de electrones (Alves-Silva et al., 2013; Edziri et al., 2012).

Otra fuente natural con actividad antimicrobiana probada es el extracto de té verde (*Camellia sinensis*). El té verde es una bebida tradicional y popular con propiedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatorias y anticarcinogénicas (Perumalla y Hettiarachchy, 2011). La actividad inhibitoria del extracto de té verde contra bacterias Gram positivas (*Staphylococcus*) y negativas (*E. coli*, *Salmonella* y *Klebsiella pneumoniae*) está relacionada con la membrana citoplasmática. Las bacterias Gram negativas poseen una capa delgada de peptidoglucanos unida a lipopolisacáridos, lipoproteínas y fosfolípidos confiriéndole protección, en cambio las Gram positivas poseen varias capas de peptidoglucanos que proporcionan a la pared rigidez y grosor, ver figura 1 (Si et al., 2006; Tortora et al., 2007). Los lipopolisacáridos, lipoproteínas y fosfolípidos también confieren resistencia a las bacterias, estos dificultan la interacción de los antibióticos con los peptidoglucanos evitando la ruptura de la célula.

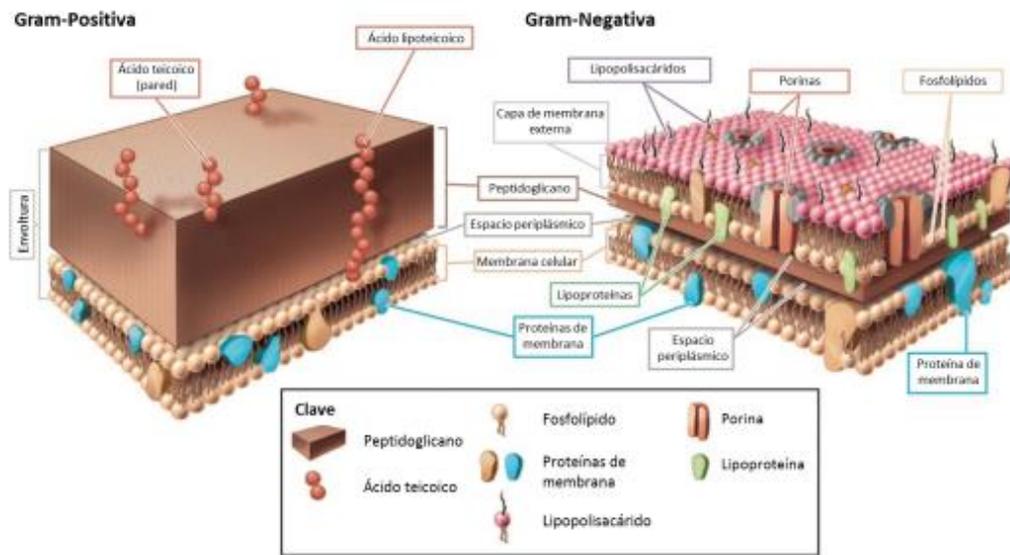


Figura 1. Pared celular en bacterias Gram positivas y Gram negativas. Imagen modificada de <http://microbioenergetica.squarespace.com/bacteriologa/2014/7/21/bacterias-gram-positivas>

La utilización de extractos vegetales dependerá de su efectividad contra microorganismos patógenos o deteriorativos específicos, del alimento donde se desea aplicar el extracto y los efectos que ejerce sobre las características sensoriales del alimento. En ese sentido se desea que el extracto tenga una actividad antimicrobiana contra un amplio rango de microorganismos para no limitar su aplicación, y además no infiera sabores, colores u olores indeseables al alimento sino por el contrario los mejore.

Constituyentes Químicos de los Extractos Vegetales

La dieta del ser humano incluye especias, frutos y vegetales donde se encuentran presentes compuestos bioactivos que les confieren actividad antimicrobiana. Estos compuestos pueden ser agrupados como polifenoles (figura 2), flavonoides, taninos, alcaloides, terpenoides, isotiocianatos, lectinas, polipéptidos, entre otros. Los compuestos fenólicos también denominados como polifenoles, tienen una estructura química que se caracteriza por presentar al menos un anillo aromático con uno o más grupos funcionales hidroxilos (Amárita, 2004; Ignat et al., 2011; Negi, 2012; Sakakibara et al., 2003).

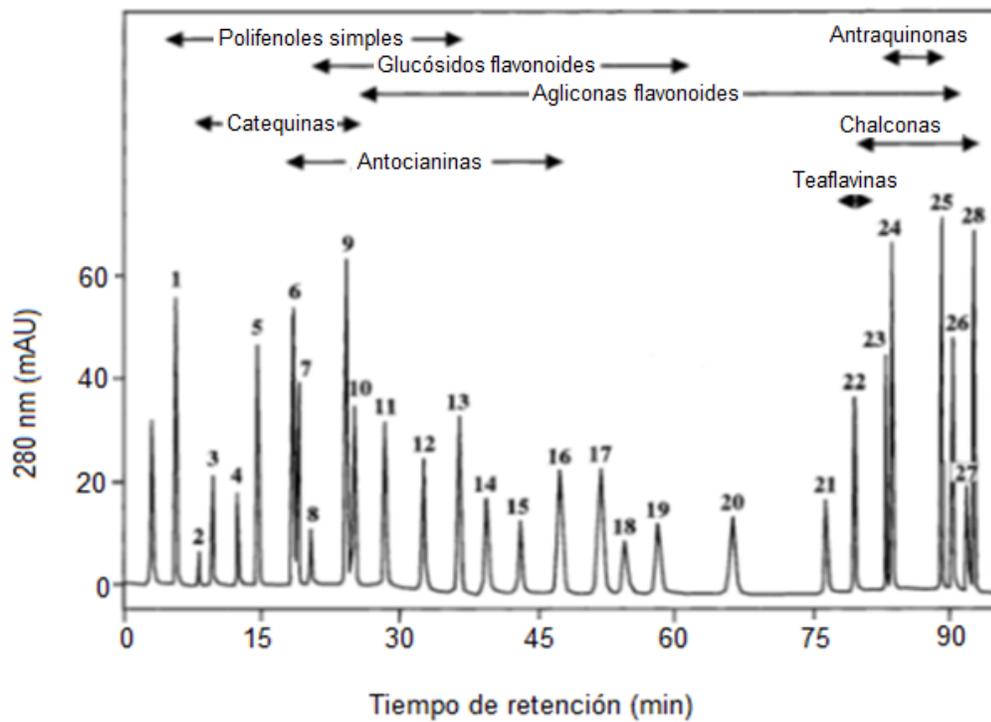


Figura 2. Perfil típico HPLC de polifenoles, con 28 compuestos abundantes en alimentos vegetales. Imagen modificada de Sakakibara et al., (2003).

Componentes del Orujo de Uva (*Vitis vinifera* L.)

El orujo de uva (*Vitis vinifera* L.) es una fuente valiosa de polifenoles naturales, dentro de los que se encuentran los ácidos fenólicos (ácido gálico (AG), 3 y 4- β glucopiranosidos, ácido caftarico, ácidos cis- y trans- coumárico), alcoholes fenólicos (2-hidroxi-5-(2-hidroxietil) fenil- β -glucopiranosido), flavan-3-oles (catequina (C), epicatequina (EC), procianidina B1) y flavonoides (quercetina-3-glucósido y 3-glucurónido, kaemferol 3-glucósido y 3-glucurónido, kaemferol 3-glucósido y 3-galactósido, eucrifina, astilbina y engeletina) (Lu y Yeap Foo, 1999). Los extractos de semillas contienen un 74-78% de proantocianidinas, como la C, EC y epicatequina-3-O-galato (figura 3). El contenido de estos compuestos depende del solvente utilizado para la obtención del extracto. Cheng et al. (2012), realizaron a partir de residuos de uva *Pinot noir* extracciones con acetona, etanol y metanol en proporciones de 1:1 con agua para evaluar el efecto del solvente en el contenido fenólico, actividad antioxidante y antimicrobiana. Como resultado obtuvieron el mayor contenido de fenoles totales utilizando acetona (148.3 mg Equivalente Ácido Gálico (EAG)/g de extracto) comparado con los extractos etanólico (112.5 mg EAG/g) y metanólico 124.2 mg EAG/g).

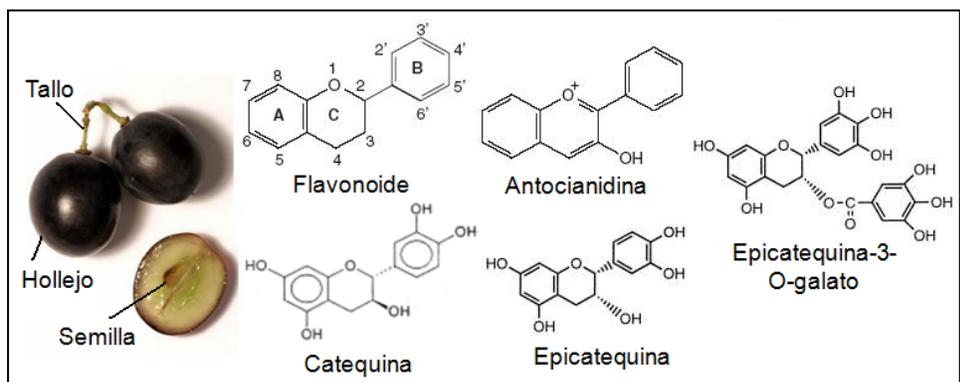


Figura 3. Partes de la uva y principales componentes fenólicos de la semilla y orujo de uva.

Componentes del Apio (*Apium graveolens*)

Para el apio (*Apium graveolens*), se ha reportado un mayor contenido total de fenoles en un extracto con acetona al 70% (69.5 mg EAG/g) que en un extracto etanólico (3.8 mg EAG/g) o acuoso (6.1 mg EAG/g) (Sulaiman et al., 2011). En la extracción de los compuestos bioactivos no sólo influye el tipo de solvente sino también la parte del vegetal empleada. Reportes para extractos etanólicos de apio indican un contenido total de fenoles mayor en hojas (1637.1 mg EAG/100 g) que en las raíces (233.1 mg de EAG/100 g) (Stankevičius et al., 2011). Un comportamiento similar se observó en extractos con acetona, donde se obtuvo un contenido total de fenoles mayor en hojas (16.76 mg/100 g peso fresco) que en los tallos (1.58 mg/100 g peso fresco) (Ji et al., 2011). En el aceite esencial los principales componentes son el limoneno, sedanenolida, sedanolida, β -selineno, felandral, epiglobulol, miristicina, α y β -pineno (figura 4) (Mišić, et al., 2008; Alves-Silva et al. 2013).

Yao et al., (2010) analizaron el contenido total de fenoles, flavonoles y ácidos fenólicos de 11 cultivares de apio. Siendo el cultivar Shengjie el de mayor contenido total de fenoles con 5.02 mg EAG/100 g, flavonoles 169.79 mg/100 g y ácidos fenólicos de 223.49 mg/100 g. Éstos últimos corresponden al ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico y ácido cafeico. Los aceites esenciales de diferentes partes del apio se encuentran conformados por furanosesquiterpenoides (54.1-70.3%), monoterpenos hidrocarbonados (23.1–39.5%) y sesquiterpenos hidrocarbonados (3.2–4.0%). Los furanosesquiterpenoides más abundantes son el curazeno y 1 β -acetoxifuranoeudesm-4(15)-eno. De los monoterpenos hidrocarbonados los más abundantes son el α -pineno y β -felandreno, seguidos del β -pineno y mirceno (Maggi et al., 2012).

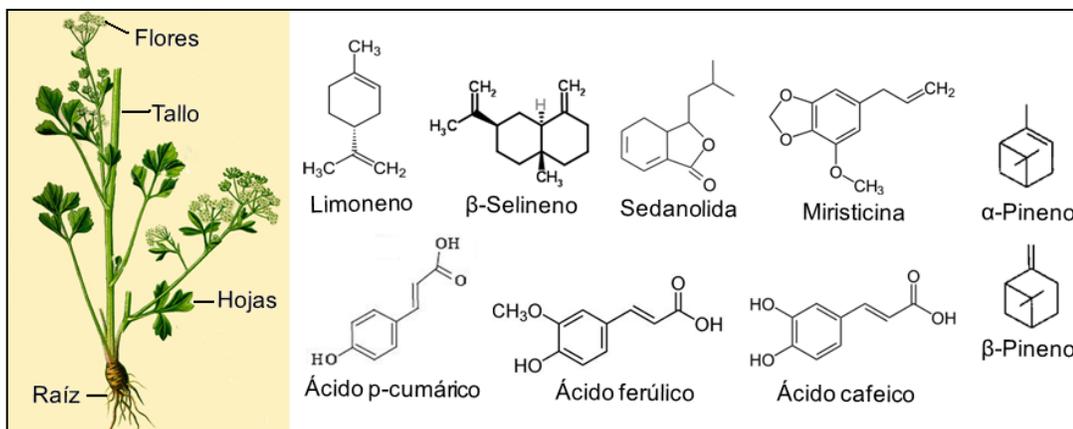


Figura 4. Partes del apio y principales componentes del aceite esencial.

Componentes del Té Verde y sus Extractos (*Camellia sinensis*)

Actualmente, existe una búsqueda de productos con beneficios para la salud, una opción de este tipo de productos es el consumo de té verde (*Camellia sinensis*) con una gran variedad de marcas disponibles. Estos provienen de diversas regiones del mundo, afectando el contenido de polifenoles y otros compuestos, siendo el contenido de fenoles un indicador de la calidad. En una infusión (1 g de té seco/200 ml agua) se ha reportado un contenido total de 1.628 mg de EAG/ ml y un contenido total de flavonoides de 0.32 mg EqC/ml (Muñoz-Velázquez et al., 2012). De los compuestos fenólicos las catequinas son los compuestos más abundantes reportándose al galato de epigallocatequina (GEGC, 120 mg/g peso seco) como mayoritario, seguido de epigallocatequina (EGC, 42.4 mg/g peso seco), galato de epicatequina (GEC, 28.0 mg/g peso seco) y galato de galocatequina (GGC, 7.3 mg/g peso seco) (figura 5) (Belitz et al., 2009; Chen et al., 2010; Rusak et al., 2008).

En el extracto de té verde (ETV) además de las catequinas existen otros compuestos como los alcaloides de purina (xantina), flavonoles O-glicosilados, flavonas C-glicosiladas, proantocianidinas, ácidos fenólicos, terpenoides, ácidos grasos, aceites esenciales y aminoácidos como la teanina (aminoácido más abundante) (Deng y Zhao, 2011; Kiehne y Engelhardt, 1996). Debido a que en un extracto crudo se tiene una gran diversidad de compuestos, la separación en fracciones facilita la identificación de los principales componentes. En el trabajo efectuado por Si et al., (2006) se obtuvieron dos fracciones utilizando una mezcla de hexano/ acetato de etilo/ metanol/ agua, la primera constituida por cafeína (Cf), C, EC y GEGC. Mientras que la segunda fracción sólo estaba conformada por GEC.

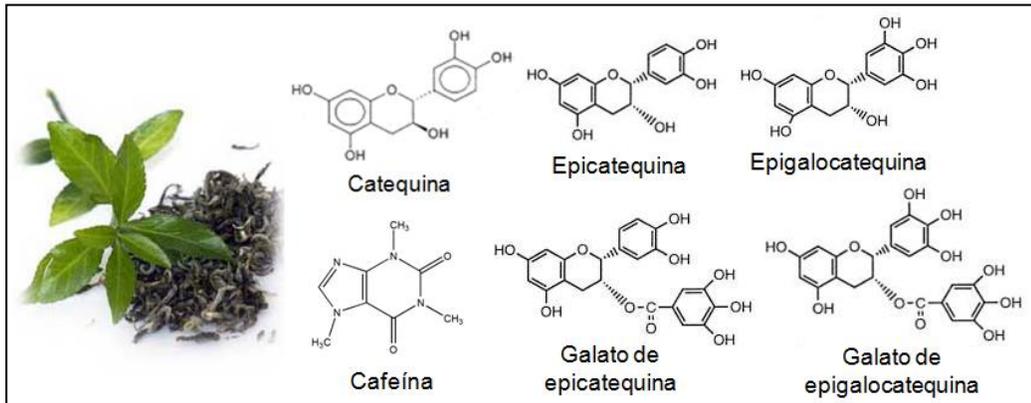


Figura 5. Hojas frescas y secas de Té verde y principales componentes hidrosolubles en las hojas.

Por otra parte Perva-Uzunalić et al., (2006) obtuvieron diferencias en el contenido de los principales componentes del té verde dependiendo del solvente empleado para las extracciones. Sus resultados mostraron un mayor contenido de catequinas (501 g/kg peso seco), flavonoles (16.9 g/kg peso seco) y proantocianidinas (14.7 g/kg peso seco) en extractos metanólicos comparados con extractos acuosos (237 g/kg, 11.4 g/kg y 12.0 g/kg respectivamente).

Susceptibilidad de los Compuestos Fenólicos en Extractos Vegetales a Tratamientos Térmicos

Un grupo importante de compuestos fenólicos presentes en los vegetales son los flavonoides, en su mayoría son hidrosolubles y estables al calor, son susceptibles a cambios físicos, químicos y a tratamientos térmicos excesivos. En los alimentos los ácidos fenólicos representan una tercera parte de los compuestos fenólicos y pueden estar presentes de forma libre o unidos mediante enlaces éster, éter o acetal a varios componentes de las plantas. La aplicación de tratamientos térmicos en extractos ricos en ácidos fenólicos ha incrementado el contenido de ácido *p*-cumárico (de 5.58 a 45.05 $\mu\text{g/g}$). Sin embargo el contenido de ésteres fenólicos como el ácido clorogénico se reduce al aumentar el tiempo y temperatura. Esta disminución se debe a la ruptura del enlace éster como consecuencia del tratamiento térmico (120 °C por 90 min)(Xu et al., 2007).

En el trabajo de Kim et al., (2006), se evaluó el efecto del calentamiento en el contenido de compuestos fenólicos (catequinas) en extractos de semillas de uva. Las semillas se sometieron a diferentes temperaturas (50, 100, 150 y 200 °C) para la obtención de los extractos etanólicos. Los resultados indicaron un incremento de las catequinas y Cf (de 2.32 mg/ml a 3.18 mg/ml), atribuido al rompimiento de enlaces covalentes ocasionado por los tratamientos térmicos.

Por otra parte en cultivos de apio sometidos a procesos de hervido, blanqueado y vapor provocaron pérdidas en el contenido total de fenoles de 37.7%, 47.6% y 1.9% respectivamente. Este mismo comportamiento se observó en los ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido *p*-cumárico) y flavonoles (apigenina, luteolina y kaempferol), compuestos relacionados con la capacidad antioxidante del apio (Yao y Ren, 2011). También compuestos como el limoneno y α -pineno (presentes en aceites esenciales de apio) son susceptibles a tratamientos térmicos drásticos como la pasteurización (Farnworth et al., 2001).

En lo que respecta al té, el contenido de compuestos fenólicos es afectado por el método de producción. Por ejemplo se denomina como té verde al obtenido a partir de hojas de *Camellia sinensis* deshidratadas, trituradas y no fermentadas minimizando su oxidación (Coe et al., 2013). Se han realizado diversos estudios donde se evalúa el efecto que los tratamientos térmicos tienen sobre los compuestos fenólicos del té. Wang et al., (2000) evaluaron el efecto de los tratamientos de vapor o tostado en té verde almacenado 12 días a 50 °C sobre el contenido de flavanoles. Sus resultados mostraron pérdidas del 86% de GEGC, 79% de EGC, 62% de GEC y 57% de EC en las hojas de té tostadas. Esto fue atribuido a que la temperatura y tiempo de procesamiento fue mayor (160–230 °C/ 10-12 min) en el tostado que en el tratamiento con vapor (95-100 °C/ 15-30 s).

La estabilidad de las catequinas en el té verde depende del pH y temperatura, por lo que la degradación y epimerización ocurren simultáneamente durante el procesamiento térmico a altas (100–165 °C) y bajas temperaturas (25–100 °C) (Seto et al., 2008). Las principales catequinas del té verde identificadas como epicatequinas, son compuestos *cis* que pueden ser convertidos en sus epímeros no-epicatequina, siendo esta epimerización reversible. Cuando las temperaturas de procesamiento son superiores a 98 °C la epimerización de no-epi a epicatequinas es más rápida que otras reacciones. Sin embargo, cuando la temperatura está por debajo de 44 °C la reacción de degradación es mayor a las reacciones de epimerización. A temperaturas entre 44–98 °C, la

epimerización de no epi a epicatequinas ocurre rápidamente, seguido de la degradación y después la epimerización de epi a no epicatequinas (Wang et al., 2008).

Se ha analizado la influencia de otros factores además de la temperatura en la estabilidad de las catequinas. En el trabajo realizado por Li et al., (2011) se analizaron los efectos que ejercen variaciones en la humedad relativa (HR) y temperatura en la estabilidad de las catequinas presentes en polvo de té verde como indicador de la vida de anaquel. Reportaron que se mantuvo el 95% de las catequinas en polvo de té verde almacenados por 112 días a una baja HR y temperatura (25 °C y 43 o 58% HR, 35 °C y 43% HR). A pesar de que la velocidad de degradación de las catequinas se reduce conforme disminuye la temperatura y HR, el efecto de la temperatura es mayor. La disminución de la degradación fue atribuida a la limitada difusión y movilidad molecular del sistema sólido (en polvo), haciéndolo más estable en comparación con sistemas de soluciones diluidas.

Todas estas investigaciones permiten inferir que los compuestos fenólicos presentes en extractos vegetales pueden ser degradados y/o sufrir cambios estructurales tras ser sometidos a procesamientos térmicos. Por lo tanto, la concentración de los mismos dependerá de su contenido inicial en el extracto, así como del tiempo y temperatura de exposición. Algunos compuestos fenólicos como las catequinas han demostrado soportar tratamientos térmicos por debajo de los 200 °C, por lo que se consideran una opción para incorporarlos en los materiales de envase.

Propiedades Térmicas de los Polímeros

Un grupo de materiales de envase ampliamente utilizado en los alimentos son los plásticos, que pueden ser definidos como compuestos orgánicos macromoleculares obtenidos de moléculas de bajo peso molecular. A diferencia de las moléculas simples en los polímeros los cambios de estado físico no se

encuentran bien definidos. La transición de estado líquido a gaseoso no sucede debido a que es necesaria una temperatura alta para la completa separación de las moléculas, en su lugar hay una descomposición. El cambio de un polímero de un estado rígido y quebradizo a un estado blando y maleable está determinado por la temperatura de transición vítrea (T_g), característica sólo de los polímeros amorfos. En los polímeros cristalinos, el cambio de un estado sólido a líquido es determinado por la temperatura de fusión (T_m), y se incrementa en función del peso molecular o longitud de las cadenas del polímero (Robertson, 2012). Las T_m y T_g son parámetros que definen los límites de temperatura superior e inferior para diversas aplicaciones, en especial para polímeros semicristalinos.

Dentro de los polímeros semicristalinos utilizados en los envases de alimentos se encuentra el polietileno de baja densidad (PEBD), tiene una cristalinidad variable entre 55-70% confiriéndole la menor T_m (115 °C) (Joerger, 2007; Robertson, 2012). El PEBD es un material resistente, ligeramente translúcido que puede ser extruido por soplo en una película tubular, uno de los principales métodos de procesamiento de los plásticos. La extrusión es el proceso en el cual el material se funde por contacto con las paredes del barril y el calor generado por fricción, es forzado continuamente a través de un dispositivo de formación. Existen dos procesos básicos de extrusión para la fabricación de películas plásticas, uno es el proceso de películas planas y el proceso tubular. En el proceso tubular o película soplada, un tubo delgado es extruido por un dado circular y se sopla aire a través del centro del dado, se infla una burbuja fina y enfría, después se aplana y enrolla (figura 6).

Las películas tubulares tienen las ventajas de presentar generalmente mejores propiedades mecánicas, un proceso de fabricación sencillo, flexible y además de bajo costo. Las propiedades de las películas dependen del polímero utilizado, a mayor densidad menor la flexibilidad y mayor la fragilidad. En cambio a mayor peso molecular, mayor la resistencia a la tensión y menor fragilidad a bajas temperaturas, pero menor transparencia (Robertson, 2012).

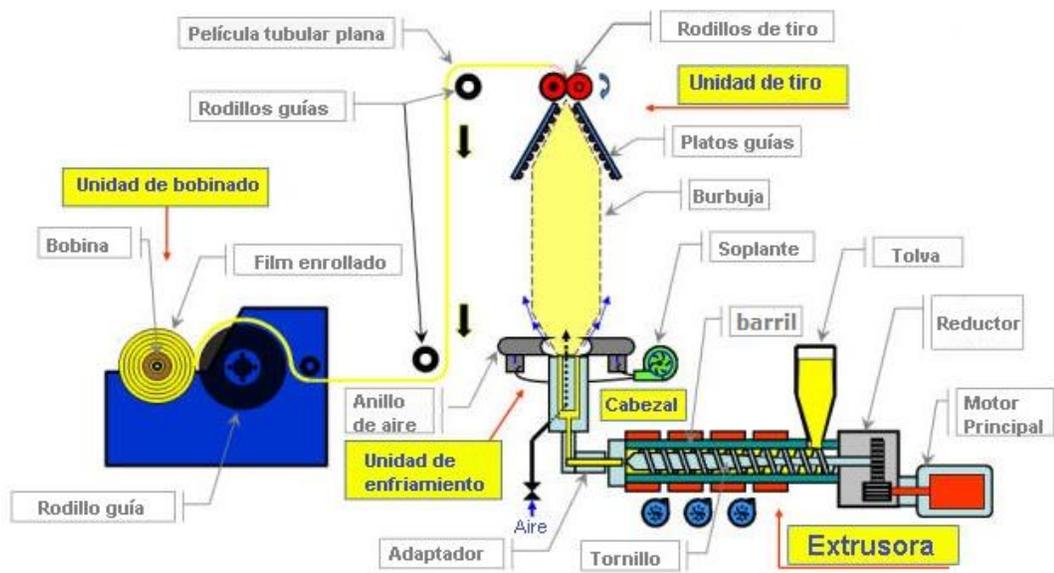


Figura 6. Proceso de extrusión soplo de películas plásticas. Imagen tomada de <http://tecnologiadelosplasticos.blogspot.mx/2012/04/extrusion-de-pelicula-soplada.html>

Incorporación de Antimicrobianos Naturales en Películas Plásticas

Para mejorar algunas propiedades de los polímeros y atenuar o eliminar otras, se incorporan aditivos a las resinas durante su manufactura. Los aditivos utilizados en la industria de los plásticos pueden clasificarse según el tipo de función que ejercen en plastificantes, lubricantes, estabilizantes, retardantes de flama, antioxidantes, pigmentos, entre otros (Murphy, 2001). Existen ocasiones en las cuales estos aditivos son fuente de contaminación química de los alimentos que entran en contacto directo con los plásticos. Por tal motivo su monitoreo forma parte de la seguridad en la interacción envase – alimento (Arvanitoyannis et al., 2009). Este tipo de interacción presenta la alternativa de agregar intencionalmente aditivos no tóxicos y con propiedades benéficas para el alimento al que migren, como son los compuestos de origen vegetal con actividad antimicrobiana.

La contaminación de los alimentos ocurre generalmente después de su procesamiento, por lo cual, los envases desempeñan un papel crucial en su vida de anaquel (Sivaroban et al., 2008). La aplicación directa de los antimicrobianos naturales en altas concentraciones a los alimentos influye en sus propiedades organolépticas, por lo que al incorporarlos en los materiales de envase se pueden disminuir las concentraciones en el alimento para lograr su actividad (Cliff et al., 2012; Siripatrawan y Noipha, 2012). Los envases desempeñan cuatro funciones principales que son contener al alimento, protegerlo de la contaminación, proporcionar una forma conveniente y comunicar información necesaria del producto. Además se han desarrollado envases que liberan de forma controlada antimicrobianos con el objetivo de extender la vida de anaquel de los alimentos, denominados como envases activos (Robertson, 2012).

La incorporación de los antimicrobianos en los envases depende de la estabilidad térmica del agente, características del envase y compatibilidad del agente antimicrobiano con el polímero. Sin embargo, su adición puede ocasionar alteraciones en las características físicas y mecánicas del envase

(Wang et al., 2012). La incorporación puede llevarse a cabo mezclándolos y fundiéndolos (extrusión) con los polímeros o mediante recubrimientos (Perez-Perez et al., 2006; Robertson, 2012). El creciente interés en la incorporación de extractos vegetales antimicrobianos en películas poliméricas se debe a que se pueden tener efectos superiores a los compuestos puros (Wang et al., 2012). En gran parte de los trabajos realizados al respecto, los extractos fueron incorporados a materiales de envase comestibles.

Los materiales de envase comestible deben poseer cierta resistencia mecánica (tensión, elongación, punción), ser solubles en agua, atributos ópticos (color, transparencia) y aceptabilidad de las propiedades organolépticas por el consumidor. En este sentido, la adición de extractos vegetales modifican la transparencia, color y propiedades de las películas, esas alteraciones están relacionadas con la concentración de los compuestos presentes en los extractos (Wang et al., 2012). Siripatrawan y Noipha (2012), envasaron salchichas de cerdo en películas de quitosano adicionadas con ETV (20%) y almacenadas a 4 °C durante 20 días. Reportaron una reducción en el crecimiento de 1.12 log UFC/g en cuenta total, 1.87 log UFC/g para mohos y levaduras, y 0.23 log UFC/g en bacterias ácido lácticas comparadas con salchichas envasadas en películas de quitosano sin extracto. Esto se atribuyó a los polifenoles del extracto, capaces de inhibir la síntesis de ADN y ARN en las células bacterianas, interferir el metabolismo energético e inhibir la función de la membrana citoplásmica.

En el trabajo realizado por Rubilar et al., (2013) se reporta que la incorporación de extracto de semilla de uva (GSE, 34.2%) y carvacrol (3.2%) en películas de quitosano impactó significativamente el color. En los parámetros del color se reporta que la luminosidad (L 88.05) disminuyó y la película adquirió un color rojizo (a 8.18) comparado con el control (L 96.19, a 4.05). Estos cambios en el color fueron atribuidos a las proantocianidinas presentes en el extracto. También se disminuyó la permeabilidad al CO₂ (3.73×10^{-13} g.m/Pa.s.m²) e incrementó la permeabilidad al O₂ (6.20×10^{-13} g.m/Pa.s.m²) y al vapor de agua (2.51×10^{-7} g.m/Pa.s.m²) comparado con el control (4.23×10^{-13} g.m/Pa.s.m²),

5.33×10^{-13} g.m/Pa.s.m² y 2.17×10^{-7} g.m/Pa.s.m², respectivamente). La incorporación del extracto proporcionó sitios hidrofílicos a las moléculas de agua, originando películas menos cristalinas y por lo tanto más permeables. La disminución de la permeabilidad al CO₂ se atribuyó a su baja solubilidad en las películas adicionadas con el GSE y carvacrol. En cambio el incremento en permeabilidad al O₂ fue debido a cambios microestructurales en la película haciéndola más porosa con la adición de GSE y carvacrol.

Dentro de los estudios donde se utilizan polímeros sintéticos se encuentra el realizado por Storia et al. (2012), quienes utilizaron una película de polietileno de alta densidad recubierta de una solución antimicrobiana (0.112 g/ml de nisina, 1% ácido ascórbico, 1% de ácido cítrico y 1% de CaCl₂) con atmósfera modificada (60% O₂ y 40% CO₂). Evaluaron el efecto de la película sobre el crecimiento de bacterias deteriorativas en filetes de carne almacenados a 4 °C por 12 días. Los resultados mostraron que la combinación de la atmósfera modificada con la película antimicrobiana permitió reducir en 3 log UFC/g la cuenta total comparada con carne en condiciones aeróbicas. Por otra parte Ramos et al., (2012), evaluaron la actividad antimicrobiana de una película de polipropileno con timol y carvacrol (4, 6 y 8%) por compresión-moldeo a 190 °C. Reportaron que sólo las películas con 8% de los aditivos presentaron actividad inhibitoria contra *S. aureus* (10⁶ UFC/ml), siendo la película adicionada con timol la de mayor actividad.

Una propiedad ampliamente investigada en los extractos naturales es la actividad antioxidante, que también se ha logrado incorporar en los materiales de envase. Ejemplo de lo anterior es el trabajo realizado por Manzanarez-López et al., (2011), donde adicionaron α -tocoferol (3%) a pellets de ácido poliláctico (PLA) para elaborar películas por extrusión soplo. Con los pellets se obtuvieron filamentos con α -tocoferol (2.58%) y posteriormente procesados para obtener películas. El procesamiento no ocasionó pérdidas significativas del antioxidante, esto pudo ser debido a un tiempo de procesamiento corto (5 min). Las pérdidas del α -tocoferol pudieron deberse a que el tiempo de enfriamiento fue superior (10-15 min) en los filamentos en comparación con las películas (inmediato). De

acuerdo con estos resultados es posible que el procesamiento por extrusión-soplo de polímeros con extractos naturales no ocasione una degradación significativa de sus componentes, sin embargo, es necesario corroborarlo.

Íñiguez-Franco et al., (2012) evaluaron indirectamente el efecto del proceso de fabricación (extrusión) de películas de PLA adicionadas con C (17.60 mg/g) y EC (21.38 mg/g) sobre su actividad antioxidante. Reportan que el procesamiento para la fabricación del envase prácticamente no ocasionó pérdidas de C (12.76 mg/g) y EC (15.03 mg/g). Las pérdidas pudieron deberse a los dos procesos de pelletización y a la adhesión en el tornillo y paredes del extrusor. Este mismo comportamiento podría esperarse en extractos de té verde y uva, en los cuales se ha reportado la presencia de ambos compuestos. En el estudio realizado por Cruz-Zúñiga (2011), se elaboró una película de PLA adicionada con rutina (39.59 mg/g de PLA) mediante extrusión soplo (150 – 160 °C). Los resultados mostraron una pérdida total de 35.19% de la rutina adicionada efecto del procesamiento. Sin embargo, encontraron una remanencia del 14.32% (5.67 mg/g) de rutina y el 23.74% (9.49 mg/g de PLA) de la rutina adicionada fue degradada a isoquercetina y 26.75% (10.59 mg/g de PLA) se degradó a quercetina. Ambos compuestos poseen un potencial antioxidante mayor comparados con la rutina.

A pesar de que existen investigaciones donde se ha obtenido una película antimicrobiana con extractos vegetales, los métodos de elaboración no corresponden a los utilizados a nivel industrial. Por eso es necesario realizar investigaciones para la obtención de envases antimicrobianos elaborados mediante procesos comerciales como la extrusión. Aunque existe evidencia de que el proceso de extrusión puede ejercer un efecto degradativo en los compuestos activos adicionados a las películas, éste puede no ser significativo. Tales pérdidas pueden no afectar la actividad de la película de forma negativa, sino que pueden ser degradados en otros compuestos con un potencial de actividad mayor a la inicial. Sin embargo, este comportamiento se ha observado solamente en compuestos puros y no en extractos naturales donde se tienen diversos compuestos.

Justificación

Existe una gran cantidad de agentes antimicrobianos de origen vegetal que poseen actividad contra bacterias patógenas y deteriorativas de alimentos, su adición puede ser directa o incorporarse en películas comestibles. No obstante, esta adición influye en las propiedades sensoriales de los alimentos o en el caso de las películas comestibles, su método de elaboración no corresponde a los utilizados a nivel industrial limitando su aplicación comercial.

Los procesos industriales de fabricación de envases requieren de altas temperaturas, y es escasa la información sobre el efecto que tienen en la modificación de los componentes de los extractos naturales y en su actividad antimicrobiana. Por tal motivo resulta importante investigar aquellos extractos naturales antimicrobianos que pueden incorporarse a películas plásticas elaboradas por procesos convencionales, posibilitando su aplicación como envase activo en alimentos.

HIPÓTESIS

El proceso de fabricación para la obtención de películas de PEBD por extrusión descompone los principales compuestos fenólicos y flavonoides presentes en extractos vegetales de té verde, orujo de uva o apio, alterando su actividad antibacteriana.

OBJETIVOS

General

Evaluar la capacidad antibacteriana de películas de PEBD adicionadas con extractos de orujo de uva, té verde o apio, obtenidas mediante extrusión-soplo.

Específicos

1. Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos naturales de orujo de uva, té verde o apio contra *Salmonella Choleraesuis*, *S. typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria spp* y *Staphylococcus aureus*.
2. Identificar y cuantificar los compuestos mayoritarios presentes en los extractos naturales con actividad antibacteriana.
3. Elaborar películas de PEBD adicionadas con los extractos naturales para evaluar su actividad antibacteriana.
4. Determinar los compuestos fenólicos y flavonoides mayoritarios presentes en las películas de PEBD activas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se llevó a cabo en dos etapas:

Etapa I.

- a. Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana de los extractos de orujo de uva, té verde y apio.
- b. Identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos y flavonoides mayoritarios presentes en el extracto antibacteriano seleccionado.

Etapa II.

- a. Elaboración por extrusión-soplo de películas de PEBD con el extracto antibacteriano seleccionado y evaluación de su actividad antibacteriana.
- b. Identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos y flavonoides mayoritarios presentes en la película de PEBD con el extracto antibacteriano.

Materiales

Se utilizó EOU proporcionado por Manzanarez-López del Laboratorio de Envases de CIAD, A. C. (Hermosillo, México). El extracto acuoso de apio grado alimenticio se adquirió de Bioextracto S. A. de C. V. (Querétaro, México) y se concentró hasta sequedad. El ETV se elaboró a partir de polvo de té marca Green Tea Lovers (Woodmere, USA). Se utilizó metanol grado reactivo y grado HPLC marca J. T. Baker (Xalostoc, México) como solvente de extracción y fase

móvil, así como ácido fórmico 98-100% y ácido ortofosfórico 85% grado reactivo marca Merck (Darmstadi, Alemania) y agua HPLC MilliQ (Billerica, EUA). Para la fabricación de las películas se empleó PEBD (LBA 253) marca Muehlstein Polymers (Wilton, EUA). Los estándares utilizados para la identificación y cuantificación de los compuestos en el extracto y película fueron AG 97.5%, C \geq 9%, EC \geq 90%, Cf 90–100%, galocatequina \geq 98% (GC), EGC \geq 95%, GGC \geq 98%, GEC \geq 98%, GEGC 95%, isoquercetina 90% (ISQ) y teoflavina \geq 90% (Tf) marca Sigma (St. Louis, EUA).

Para la evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos y películas con los extractos se preparó solución salina con cloruro de sodio grado reactivo marca Faga Lab (Mocorito, México). Como medios de cultivo se utilizó agar tripticasa de soya (TSA), agar Mueller Hinton, agar nutritivo, caldo nutritivo, agar para cuenta en placa y caldo de soya-caseína digerido con lecitina, marca Difco (Sparks, EUA). Para el ajuste de pH de los medios se utilizaron perlas de hidróxido de sodio marca J. T. Baker (Xalostoc, México) y monooleato de sorbitán (Tween 80) marca Sigma (St. Louis, EUA). Las bacterias utilizadas fueron *Listeria monocytogenes* ATCC 7444, *Listeria ivanovii* ATCC 19119, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 *Salmonella Choleraesuis* ATCC 19028, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43896, *Escherichia coli* ATCC 25922 todas proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología del CIAD A. C.

Equipos

Los equipos utilizados en el experimento fueron: balanza analítica Adventure-Pro, Ohaus (Pine Brook, EUA). Rotaevaporador Yamato RE200 (Santa Clara, EUA). Para la obtención del extracto de té verde se utilizó una centrífuga

Beckman Coulter modelo Allegra 64R (Brea, EUA). Para la fabricación de las películas se utilizó un extrusor de 2.5 Kg/h de capacidad con dado de salida circular Beutelspacher (D.F., México) y para medir su espesor se utilizó un micrómetro digital EJ: Cady y Co, modelo DTT (Wheeling, EUA). Para la evaluación de la actividad antibacteriana se utilizó una estufa convencional Riossa modelo EC (Monterrey, México). Para la identificación de los compuestos fenólicos y flavonoides presentes en el extracto y películas adicionadas con el extracto se utilizó un HPLC Agilent, acoplado a un espectrómetro de masas serie 1100 Trap con detector VL y trampa de iones (Walnut Creek, EUA). La cuantificación de los compuestos se realizó por HPLC Varian star, modelo 9012, con inyector Rheodyne, modelo 7125 (Walnut Creek, EUA), acoplado a un detector UV con arreglo de diodos (HPLC-UV-DAD) modelo Varian Prostar 335 (Victoria, Australia) y una estación de trabajo Galaxy. Además un horno Eppendorf, modelo CH-500 (New York, EUA) para controlar la temperatura de la columna.

Métodos

Etapas I

Concentración del extracto acuoso de apio (EA) y elaboración del ETV. El EA se concentró mediante la evaporación del solvente hasta sequedad en un rotaevaporador a 40 °C. El extracto concentrado se almacenó en un frasco ámbar a -20 °C hasta su análisis. El ETV se obtuvo conforme a la metodología de Perva-Uzunalić et al. (2006), con algunas modificaciones. Primero se pesaron 10 g de té verde en polvo y suspendió en 200 ml de metanol, posteriormente se calentó bajo reflujo a 65 °C durante 2 h. Al cabo de este tiempo la suspensión se centrifugó a 1000 rpm (59 g promedio) durante 10 min

a 15 °C y se filtró al vacío con doble papel filtro Whatman No. 2 para eliminar los residuos sólidos. Finalmente se evaporó el solvente hasta sequedad en un rotaevaporador a 40 °C. El extracto obtenido se almacenó en un frasco ámbar a -20 °C hasta su posterior análisis. Se obtuvieron 6.693 g de ETV a partir de 60.044 g de té verde en polvo.

Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos de orujo de uva, té verde y apio. La evaluación de la actividad antibacteriana se realizó por el método de difusión en agar reportado por Prabuseenivasan et al., (2006). Se realizó una solución del EOU (30 mg/ml) en etanol al 60%, EA (50 mg/ml) con agua HPLC y ETV (30 y 50 mg/ml) con metanol absoluto, todas las soluciones se filtraron a través de una membrana con poro 0.22 µm. Como controles para cada una de las soluciones se utilizaron los solventes correspondientes sin los extractos. En las placas de agar Mueller Hinton se hicieron pocillos con una pipeta pasteur estéril sin llegar al fondo (8 mm de diámetro), a continuación se incubaron a 37 °C por 18–24 h como prueba de esterilidad.

Con cada una de las bacterias se prepararon inóculos estandarizados al 0.5 en la escala del nefelómetro de McFarland (10^8 UFC/ml) en solución salina fisiológica estéril. Cada uno de los inóculos se distribuyó masivamente en placas de agar Mueller Hinton con pocillos, no excediendo un periodo de 15 min desde la estandarización del inóculo. Inmediatamente después se depositaron 25 µl de cada solución de los extractos y controles respectivos. Posteriormente las placas se dejaron a temperatura ambiente (≈ 25 °C) durante 1 h y después se incubaron a 37 °C por 18 a 24 h. Para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos se midieron los halos de inhibición en mm con una regla para cada una de las cepas utilizadas.

Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos mayoritarios presentes en el extracto antibacteriano. La identificación de los fenoles y flavonoides

mayoritarios se realizó en el extracto con mayor actividad antibacteriana en un HPLC Agilent serie 1100 equipado con una columna Zorbax 300 SB-C₁₈ Narrow Bore RR 2.1x100 mm 3.5 µm acoplado a un detector UV y a un espectrómetro de masas con detector VL y trampa de iones. Las condiciones utilizadas fueron polaridad negativa y positiva, temperatura de secado de 350 °C, nebulizador de 40 psi, gas de secado de 8 L/min y un voltaje capilar de 105 V. Los compuestos se identificaron en base a su masa molecular. El volumen de muestra del inyector fue de 5 µl. La fase móvil empleada fue metanol: agua acidificada al 1% con ácido fórmico, con gradiente de 5:95 a tiempo 0 min, 12:88 a 0.7 min, 18:82 a 1.1 min, 30:70 a 1.8 min, 100:0 a 3.2 min y 5:95 a 3.3 min. La velocidad de flujo fue de 0.208 ml/min.

Una vez identificados los compuestos en el extracto, se procedió con su cuantificación por HPLC en fase reversa en un equipo Varian modelo 9012, acoplado a un detector UV con arreglo de diodos y una estación de trabajo Galaxy, a longitudes de onda de 205, 210, 260, 275 y 280 nm. Se utilizó una columna Supelco C₁₈ 4.6 x 150 mm 5 µm protegida con una precolumna C₁₈. La temperatura de la columna se controló a 35 °C. El volumen de muestra del inyector fue de 20 µl. La fase móvil empleada para la EC, Cf y GEGC fue metanol: agua acidificada al 1% con ácido ortofosfórico, con gradiente de 5:95 a tiempo 0 min, 12:88 a 24.5 min, 18:82 a 39.5 min, 30:70 a 63.5 min, 100:0 a 110.4 min, 5:95 a 120 min y 5:95 a 140 min. La fase móvil para el AG fue agua: metanol: ácido ortofosfórico (79.9: 20: 0.1%) en condiciones isocráticas por 20 min. La velocidad de flujo fue de 1 ml/min.

La cuantificación se realizó mediante curvas estándar con EC, Cf, GEGC y AG disueltos en etanol al 20%. Las soluciones se prepararon a temperatura ambiente protegidas de la luz. El rango de concentración que se utilizó fue de 2 a 100 µg/ml. La ecuación de la curva de cada compuesto se obtuvo por análisis de regresión lineal graficando la concentración contra el área bajo la curva obtenida en el cromatograma. Las concentraciones de los compuestos fenólicos y alcaloides se reportaron en mg de compuesto/g de extracto. Las concentraciones de los compuestos se recalcularon en base a los sólidos del

extracto (6.69 g de extracto) recuperados del té en polvo (60.04 g) y se reportaron en mg de compuesto/g de té.

Etapa II

Elaboración de las películas de PEBD con el extracto antibacteriano. Las películas se fabricaron en el laboratorio de envases del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), unidad Hermosillo, Sonora de acuerdo al método de Mejía-Félix (2007), con algunas modificaciones. Con pellets de PEBD, se elaboró una película testigo (control) y una película con ETV al 4.35% en un extrusor mono husillo de 2.5 Kg de capacidad provisto de cuatro zonas de calentamiento y con un dado de salida circular. El perfil de temperatura de procesamiento fue de 132, 139, 138 y 137 °C para las zonas I, II, III y IV, respectivamente, con una velocidad de tornillo de 55 rpm y un tiempo de residencia de 10 min. La fabricación de las películas se realizó en ausencia de luz y en condiciones lo más asépticas posibles. Las películas presentaron un espesor final de 17.78 µm, almacenándose a -20 °C en bolsas estériles y con protección de luz.

Evaluación de la actividad antibacteriana de la película adicionada con extracto antibacteriano. La actividad antibacteriana de la película adicionada con el extracto se determinó por el método ISO 22196: 2007. Se recortaron cuadros de las películas control de 40±2 mm x 40±2 mm y cuadros de las películas con los extractos de 50±2 mm x 50±2 mm. Los inóculos de las bacterias se realizaron en caldo nutritivo 1/500 estandarizados a 6×10^5 células/ml. Se colocaron 400 µl del inóculo sobre las películas para ser incubadas a 35 °C con una HR del 90% por 24 y 48 h (figura 7).

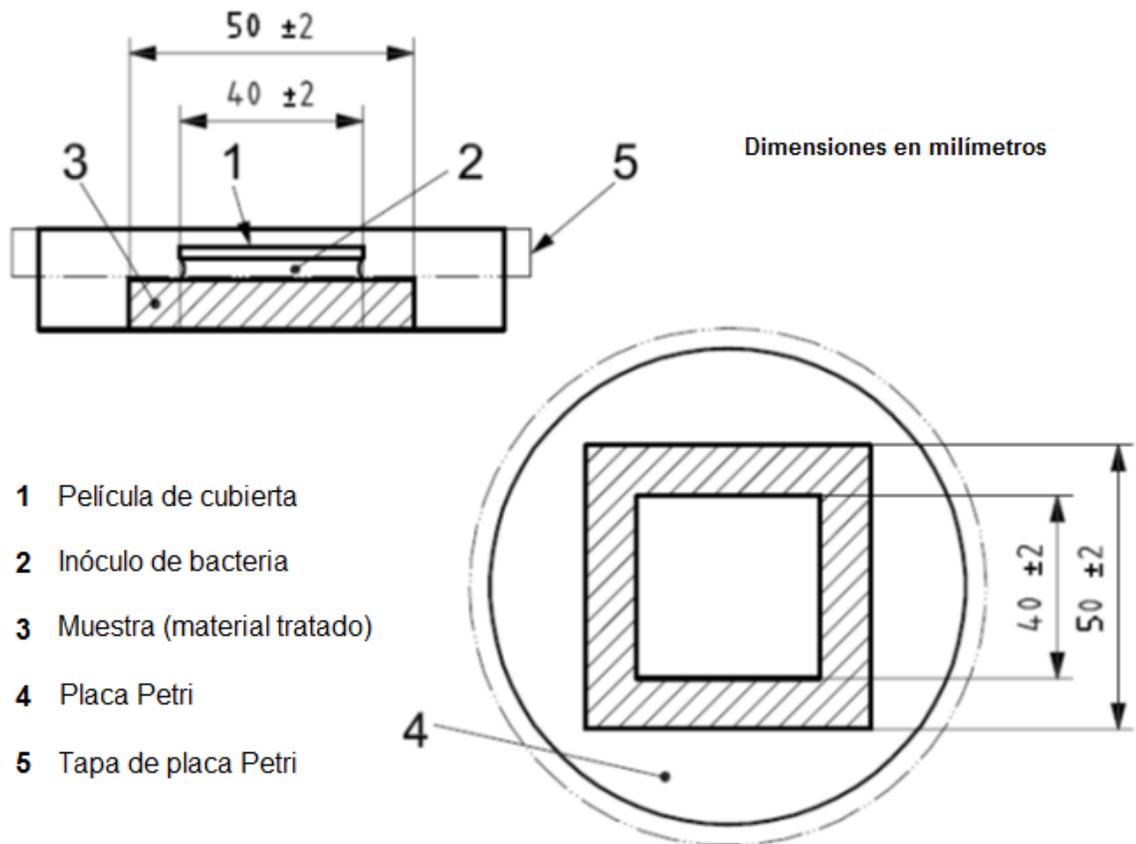


Figura 7. Inoculación de la película adicionada con extracto antibacteriano y colocación de la película de cubierta. Imagen modificada de ISO 22196 (2007).

Transcurrido este periodo se recuperaron las células de cada una de las bacterias de las películas inoculadas, mediante un lavado con 9ml de caldo soya-caseína con lecitina y Tween 80. Se realizaron diluciones seriadas con el caldo del lavado en solución salina fisiológica. De cada una de las diluciones se transfirió 1 ml a placas de Petri estériles. Posteriormente se adicionaron \approx 15 ml de agar para cuenta en placa y se homogenizaron las placas con movimientos circulares. Finalmente las placas se incubaron a 35 °C por 40-48 h, los resultados se expresaron como número de bacterias viables recuperadas por cm^2 de la película, utilizando la ecuación 1:

$$N = (100 \times C \times D \times V) \div A \quad (1)$$

Donde

N: es el número de bacterias viables (UFC) por cm^2 de la película.

C: es el promedio del recuento en placa (duplicados).

D: es el factor de dilución de las placas contabilizadas.

V: es el volumen en ml del caldo soya-caseína con lecitina y Tween 80 agregado a la muestra.

A: es el área de la superficie (mm^2), de la película de cubierta.

Para el cálculo de la actividad antibacteriana se empleó la ecuación 2:

$$R = (U_t - U_o) - (A_t - U_o) = U_t - A_t \quad (2)$$

Donde

R: es la actividad antibacteriana

U_t : es la media del logaritmo común del número de bacterias viables, en UFC/ cm^2 , obtenido de las películas control inmediatamente después de la inoculación.

U_o : es la media del logaritmo común del número de bacterias viables, en UFC/ cm^2 , obtenido de las películas control después de 24 h.

A_t : es la media del logaritmo común del número de bacterias viables, en UFC/ cm^2 , obtenido de las películas adicionadas con los extractos después de 24 h.

Cuantificación de los compuestos fenólicos y flavonoides presentes en la película adicionada con extracto antibacteriano. La identificación de los compuestos remanentes en la película se realizó por comparación de la masa molecular y tiempo de retención de los compuestos detectados en el extracto antibacteriano, utilizando un HPLC Agilent acoplado a un espectrómetro de masas y trampa de iones con la metodología descrita en la etapa I. Una vez identificados los compuestos remanentes, la cuantificación se realizó en un HPLC en fase reversa Varian, acoplado a un detector UV con arreglo de diodos y una estación de trabajo Galaxy, siguiendo la metodología descrita en la etapa I.

Para cuantificar los compuestos remanentes del extracto en la película se realizaron extracciones utilizando 0.6 g de película (0.2 x 0.2 cm) en 20 ml de metanol grado HPLC. Las extracciones se realizaron en ausencia de luz y con agitación constante a 40 °C por 24 h. Al terminar el periodo se separaron las películas del solvente y se repitió la extracción sucesivamente hasta que no se detectaron compuestos. Las extracciones se realizaron por triplicado y se concentraron a sequedad en un rotaevaporador a 25 °C. Cada una de las extracciones concentradas de las películas se suspendieron en 1 ml de metanol acidificado al 1% con ácido fórmico.

La cuantificación de los compuestos se realizó mediante curvas de calibración de los estándares, descritas en la etapa I. Los análisis de regresión lineal se realizaron graficando la concentración de los compuestos contra el área bajo la curva obtenida en el cromatograma. La recuperación analítica de cada componente del extracto remanente en la película se realizó mediante soluciones enriquecidas que contenían piezas de película PEBD control con una concentración conocida del compuesto (1.6 mg). Las extracciones se realizaron mediante la metodología previamente descrita, los resultados obtenidos mostraron una recuperación de cafeína del $87.77 \pm 4.07\%$. La concentración se corrigió con el porcentaje de recuperación y se reportó en mg de compuesto/ g de película.

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Para evaluar el efecto del procesamiento de extrusión en la concentración de cada uno de los compuestos mayoritarios identificados en el extracto antibacteriano, se utilizó un diseño completamente al azar unifactorial con dos niveles (con y sin procesamiento). El nivel sin procesamiento corresponde al ETV y el nivel con procesamiento corresponde a la película de PEBD adicionada con ETV. Para establecer diferencias significativas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) al 95% de confianza, mediante el programa estadístico NCSS (Number Crunching Statistical System) versión 2007. Se utilizó el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde

Y_{ij} : Concentración de cada compuesto identificado antes y después de procesar el PEBD (mg/g de Película)

μ : Media general

T_i : Efecto del procesamiento de extrusión

ε_{ij} : Error aleatorio

Para evaluar el efecto del ETV en la actividad antibacteriana de las películas elaboradas por el proceso de extrusión, se utilizó un diseño completamente al azar unifactorial con dos niveles (con y sin ETV). El nivel sin extracto corresponde a las películas de PEBD control y el nivel con extracto a la película de PEBD adicionada con ETV al 4.35%. Para establecer diferencias significativas se realizó un ANOVA al 95% de confianza, mediante el programa estadístico NCSS versión 2007. Se utilizó el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde

Y_{ij} : Crecimiento bacteriano en las películas (UFC/cm²)

μ : Media general

T_i : Efecto de la adición de extracto de té verde

ε_{ij} : Error aleatorio

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa I

Actividad Antibacteriana de los Extractos de Orujo de Uva, Apio y Té Verde

Los resultados de la actividad antibacteriana de los extractos se presentan en los cuadros 1 y 2. Los controles de los extractos (solventes sin los extractos) no presentaron actividad antibacteriana en ninguna de las bacterias analizadas. Conforme a los datos obtenidos, ninguna de las bacterias probadas fue sensible al EA, es decir no presentaron halos de inhibición. Estos resultados difieren con lo reportado por Edziri et al. (2012), donde un extracto acuoso presentó actividad contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E.coli* (10^6 UFC/ml), con una concentración mínima inhibitoria de 5 mg/ml. La actividad antibacteriana del extracto fue atribuida a los compuestos fenólicos presentes. Aunque la concentración utilizada en nuestro estudio fue 10 veces mayor (50 mg/ml), la ausencia de actividad antibacteriana del extracto puede atribuirse a diferencias en la concentración de los compuestos presentes, así como el método y partes del vegetal utilizados para la obtención del extracto. Debido a que se utilizó un extracto comercial se desconoce la información al respecto.

Cuadro 1. Actividad antimicrobiana de extractos naturales contra bacterias Gram positivas

Bacteria	Diámetros de zonas de inhibición (mm)*			
	EA (50 mg/ml)	ETV (50 mg/ml)	ETV (30 mg/ml)	EOU (30 mg/ml)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Nd	11.33 ± 0.27 ^a	10.00 ± 0.27 ^b	9.50 ± 0.34 ^b
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	Nd	22.00 ± 1.63 ^a	20.00 ± 1.63 ^a	10.00 ± 2.00 ^b
<i>S. epidermidis</i>	Nd	12.66 ± 0.69 ^a	11.33 ± 0.69 ^a	10.00 ± 0.85 ^a
<i>L. monocytogenes</i>	Nd	12.00 ± 1.32 ^a	16.50 ± 1.32 ^a	9.00 ± 1.32 ^a
<i>L. ivanovii</i>	Nd	27.00 ± 1.00 ^a	Nd	11.00 ± 1.00 ^b

EA: Extracto de apio, ETV: Extracto de té verde, EOU: Extracto de orujo de uva, Nd: No detectado. *Valores promedio de 3 repeticiones, letras diferentes en mismo renglón representan diferencias significativas ($p < 0.05$). Pocillos utilizados de 8 mm de diámetro.

Cuadro 2. Actividad antimicrobiana de extractos naturales contra bacterias Gram negativas

Bacteria	Diámetros de zonas de inhibición (mm)*			
	EA (50 mg/ml)	ETV (50 mg/ml)	ETV (30 mg/ml)	EOU (30 mg/ml)
<i>P. aeruginosa</i>	Nd	13.33 ± 0.62 ^a	11.00 ± 0.62 ^a	Nd
<i>E. coli</i>	Nd	Nd	Nd	Nd
<i>E. coli</i> O157:H7	Nd	Nd	Nd	Nd
<i>S. typhimurium</i>	Nd	Nd	Nd	Nd
<i>S. cholerasuis</i>	Nd	Nd	Nd	Nd

EA: Extracto de apio, ETV: Extracto de té verde, EOU: Extracto de orujo de uva, Nd: No detectado.* Valores promedio de 3 repeticiones, letras diferentes en mismo renglón representan diferencias significativas ($p < 0.05$). Pocillos utilizados de 8 mm de diámetro.

El EOU solamente presentó actividad antibacteriana contra las bacterias Gram positivas analizadas. Los diámetros de inhibición obtenidos para *S. aureus* fueron superiores (9.5 y 10 mm) a los publicados por Özkan et al., (2004) para extractos de orujo de uva (al 5%) variedades Emir y Kalecik kalasi (7 y 5.67 mm, respectivamente), considerando que utilizaron pocillo de 4 mm de diámetro. Además otros estudios también reportan un efecto superior del extracto en bacterias Gram positivas (como *S. aureus* y *Bacillus cereus*) comparado con Gram negativas (como *E. coli* y *Salmonella poona*) (Cheng et al., 2012; Serra et al., 2008). También Oliveira et al. (2013), reportaron para un extracto etanólico de orujo de uva (20 mg/ml) la ausencia de halos de inhibición en *E. coli*. La actividad antimicrobiana de los extractos de hollejo de uva se ha relacionado con su contenido total de fenoles (como flavonoides que representan el 74%), ácidos fenólicos (como el ácido gálico) y estilbenos (principalmente astrignina). Sin embargo, este contenido depende de la variedad de uva, lugar de crecimiento, condiciones climáticas, madurez y tiempo de fermentación (Katalinić et al., 2010; Yu y Ahmedna, 2013). La interacción de los compuestos fenólicos se asocia a las características de las membranas celulares de las bacterias contra la que actúen, estas interacciones se ven limitadas por la presencia de peptidoglucanos adosados a la bicapa lipídica (Oliveira et al., 2013).

El ETV presentó una mejor actividad antibacteriana contra *S. aureus* ATCC 6538P en comparación con el EOU, ya que a una misma concentración de 30 mg/ml presentó un mayor halo de inhibición (Cuadro 1). Los resultados obtenidos para *S. aureus* y *S. epidermidis* son similares a lo publicado por Yam et al., (1997). Encontraron que diversas cepas resultaron ser sensibles presentando zonas de inhibición mayores a 10 mm, esta actividad se atribuyó principalmente a la GC, EGC, GEGC, Tf y su 3-galato y 3,3'-digalato presentes en el extracto. Los resultados obtenidos contra *L. monocytogenes* coinciden con lo publicado por Mbata et al. (2008), quienes obtuvieron un diámetro de inhibición de 15 mm para una concentración de 10 mg/ml del extracto. Estos

autores también atribuyen la actividad antimicrobiana a las catequinas y polifenoles que contiene el té verde.

La actividad antimicrobiana del ETV se debe a la interacción de las catequinas con la superficie celular, con ello se inhibe la absorción y eliminación de sustratos, consecuentemente se impide su crecimiento y división celular (Nakayama et al., 2012). En modelos de membranas formadas con fosfatidiletanolamina y fosfatidil-DL-glicerol, se demostró que principalmente el GEGC (seguido de GEC y EC) provoca un alto grado de disrupción y desestabilización de la estructura. En esos modelos se observó que las catequinas galatoaciladas se encontraban inmersas en la capa de los fosfolípidos intercalándose en las cadenas hidrocarbonadas (Caturla, 2003). En la membrana de las bacterias, la GEGC se une a los residuos de arginina en el interior de los canales de porina mediante puentes de hidrógeno. Al bloquear los canales se impide el transporte pasivo de moléculas hidrofílicas (como la glucosa) y por lo tanto inhibe el crecimiento de la bacteria (figura 8) (Nakayama et al., 2013).

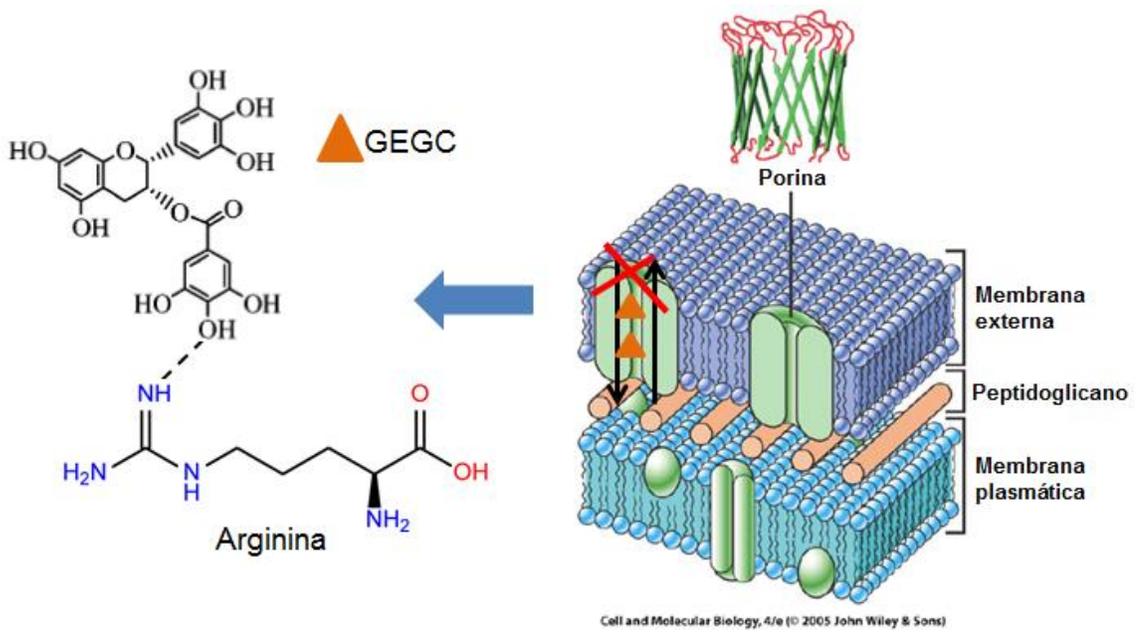


Figura 8. Mecanismo propuesto de la actividad antibacteriana de GEGC.

El ETV fue el único con actividad contra *P. aeruginosa*, sin embargo, no mostró actividad inhibitoria contra *L. ivanovii* a la misma concentración del EOU. *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista que ha demostrado una alta prevalencia en ensaladas a base de vegetales (55.6%) y frutos (66.7%) muestreadas en la India (Viswanathan y Kaur, 2001). Considerando que alimentos no sometidos a tratamientos térmicos pueden ser contaminados con microorganismos patógenos, una opción para disminuir su prevalencia puede ser el envasado en la película plástica adicionada con ETV.

Compuestos Fenólicos Mayoritarios Presentes en el Extracto de Té Verde

La cromatografía líquida acoplada a masas fue el método seleccionado para la identificación de los compuestos. Los cromatogramas HPLC-DAD a 210 y 275 nm, obtenidos para el ETV se muestran en las figuras 9 y 10, respectivamente. Se realizó una comparación de los tiempos de retención (T_R) de los picos con estándares comerciales para su confirmación. Se identificaron 5 compuestos mediante la presencia de iones de moléculas desprotonadas/ protonadas ($[M - H]^- / [M + H]^+$) y los iones de los fragmentos principales (NI/ PI) (cuadro 3).

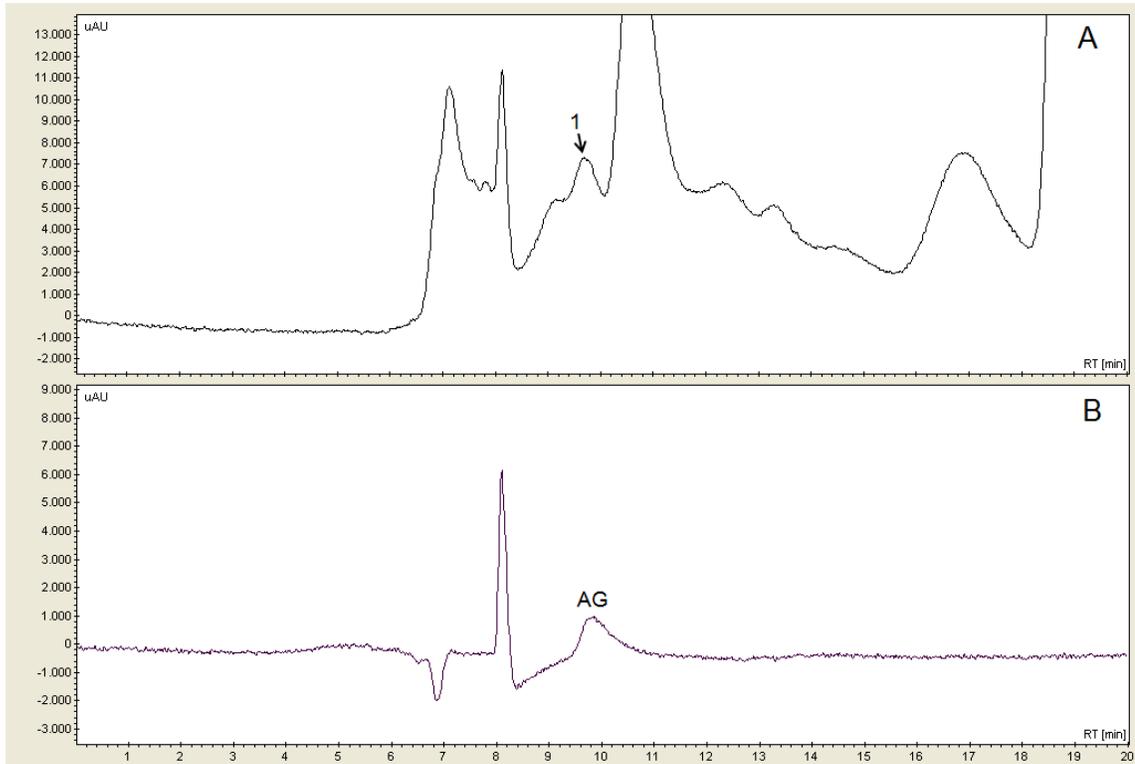


Figura 9. Cromatograma HPLC-DAD de extracto de té verde (A) y estándar de ácido gálico (AG) (B) a 210 nm.

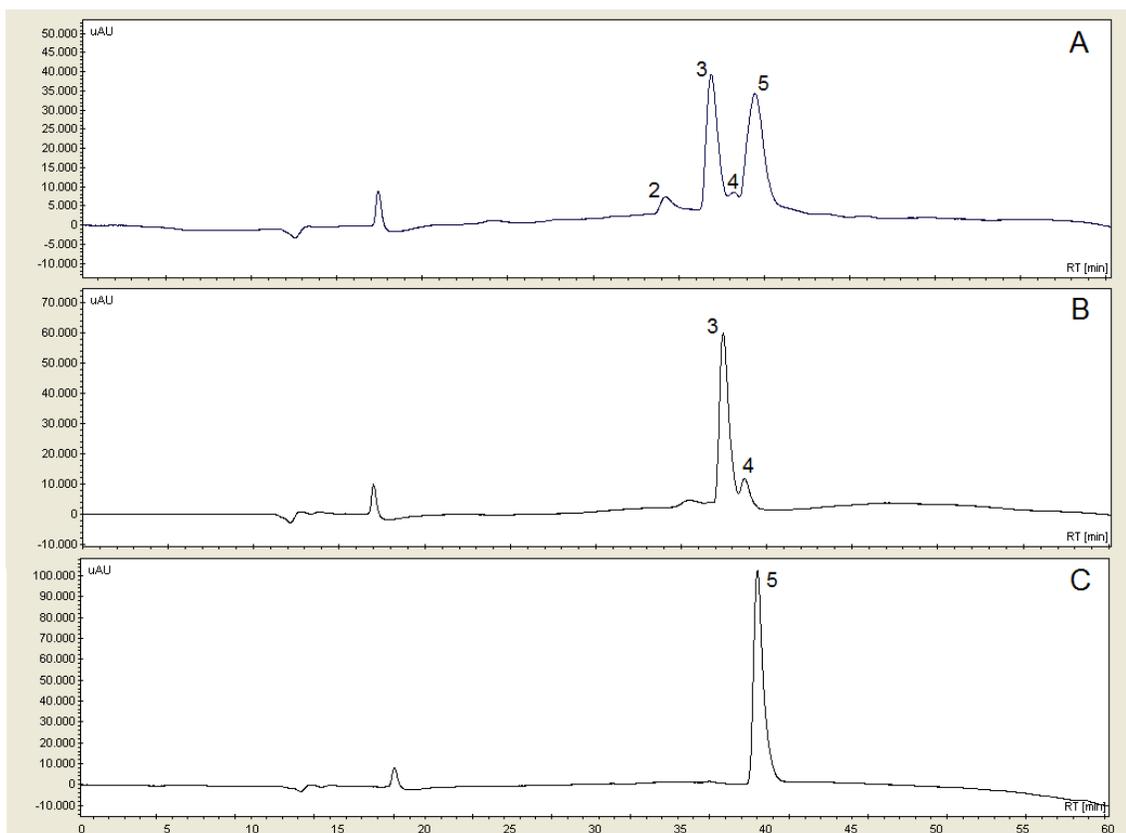


Figura 10. Cromatogramas HPLC-DAD de extracto de té verde (A) y estándares (B y C) a 275 nm. Identificación de picos: (2) Catequinas tipo GGC, (3) GEGC, (4) epicatequina y (5) cafeína.

Cuadro 3. Tiempo de retención, características espectrales de masas, identidad y concentración de los compuestos fenólicos presentes en el ETV.

Pico	T _R (min)	Compuesto	[M - H] ⁻ / [M + H] ⁺ (m/z)	NI/ PI (m/z)	Concentración (mg/g de ETV)*	Concentración (mg/g de té)*
1	9.61	AG	169/ -	-/-	0.58 ± 0.11	0.07 ± 0.01
2	35.95	GGC	457/ -	-/-	24.32 – 33.02	2.71 – 3.68 ^a
3	38.27	GEGC	457/ -	305, 169	133.59 ± 20.18	14.90 ± 2.25
4	39.47	EC	289/ 292	245, 179/-	27.96 ± 2.80	3.12 ± 0.31
5	40.78	Cf	- / 195	-/138, 110	98.27 ± 12.31	10.96 ± 1.37

*: Valores promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. AG: ácido gálico, GGC: galato de galocatequina, GEGC: galato de epigalocatequina, EC: epicatequina, Cf: cafeína. ^a: Estimación del contenido.

La identificación de AG, GEGC, EC, Cf y GGC en el ETV se realizó por comparación de los espectros de masa con sus respectivos estándares y lo reportado en otras investigaciones (Del Rio et al., 2004; Lin et al., 2008; Wang et al., 2008). Para el AG (pico 1) se obtuvo un ion molecular de 169 m/z coincidiendo con lo reportado por Dou et al., (2007), Sánchez-Rabaneda et al., (2003) y Del Rio et al., (2004), quienes reportan un fragmento de 125 m/z correspondiente a la pérdida de CO₂ (figura 11).

Se especula que el pico 2 (T_R 35.95 min) corresponde a GGC, para el que se obtuvo un ion molecular de 457 coincidiendo con lo reportado por Zhang et al., (2011) y (Spáčil et al., 2010).

La presencia de GEGC (pico 3, T_R 38.27 min) se verificó mediante comparación con lo reportado en otras investigaciones (Dou et al., 2007; Zhang et al., 2011), en modo negativo presentó un ion molecular de 457 m/z y fragmentos de 305 m/z (corresponde a EGC) y 169 m/z (pertenece al ácido gálico) (figuras 12 y 13).

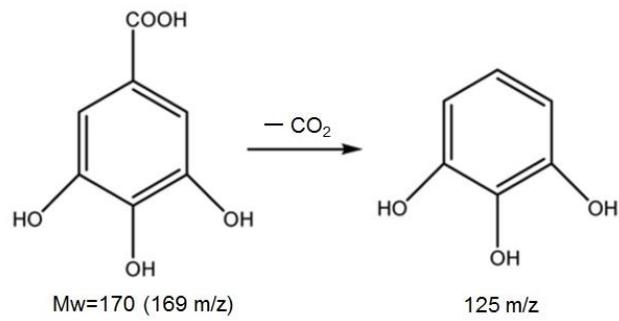


Figura 11. Fragmentación propuesta para el ácido gálico. Imagen modificada de He et al., (2014).

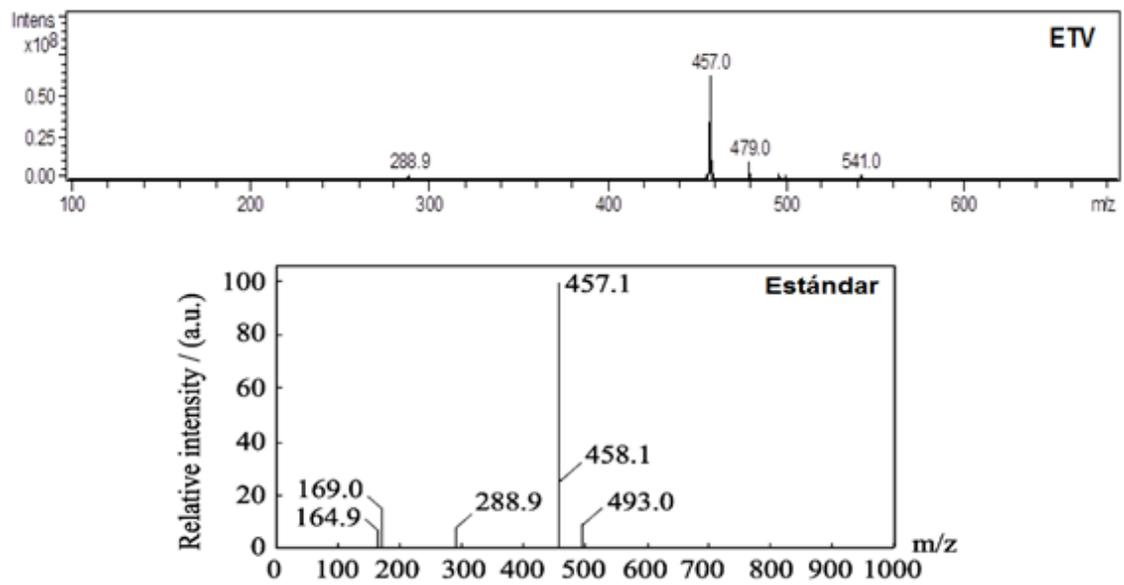


Figura 12. Espectro de masas en modo negativo de GEGC en ETV y estándar. Imagen modificada de Luo, et al., (2012).

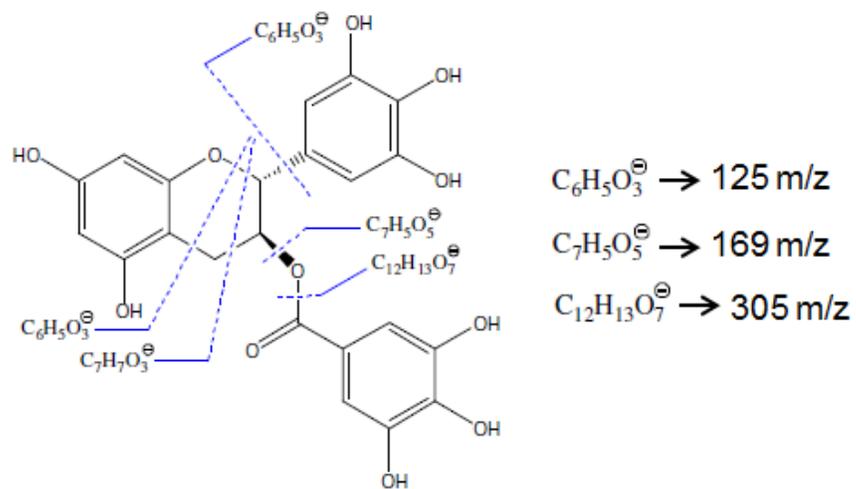


Figura 13. Fragmentación propuesta para galato de epigallocatequina. Imagen modificada de Spáčil et al., (2010).

De igual manera la presencia de EC (pico 4, T_R 39.47 min) se verificó por comparación con lo reportado en otras investigaciones. En modo negativo presentó un ion molecular de 289 m/z y fragmentos de 245 m/z y 149 m/z; también se detectaron fragmentos de otros compuestos (figura 14). De acuerdo con Dou et al., (2007) para el ion molecular de EC se tienen fragmentos de 245 m/z (por pérdida de CO_2), 205 m/z (pérdida de $C_4H_4O_2$), 203 m/z (pérdida de $C_4H_6O_2$) y 137 m/z (pérdida de $C_8H_8O_3$). Sánchez-Rabaneda et al., (2003) indicaron que el fragmento 245 m/z se debe a la pérdida de $C_2H_4O_2$ (figura 15). La presencia de Cf (pico 5, T_R 40.78 min) se confirmó por comparación con el estándar que en modo positivo presentaron un ion molecular de 195 m/z y un fragmento de 138 m/z (figura 16). Castro et al., (2010) reportaron valores similares para Cf en té verde, en modo positivo un ion molecular de 194 m/z y fragmentos de 165, 138 y 108 m/z. De igual manera Pellegrini et al. (2007), obtuvieron en modo positivo un ion molecular de 195 m/z y un fragmento mayoritario de 138 m/z, correspondiente a la pérdida de C_2H_3NO (figura 17).

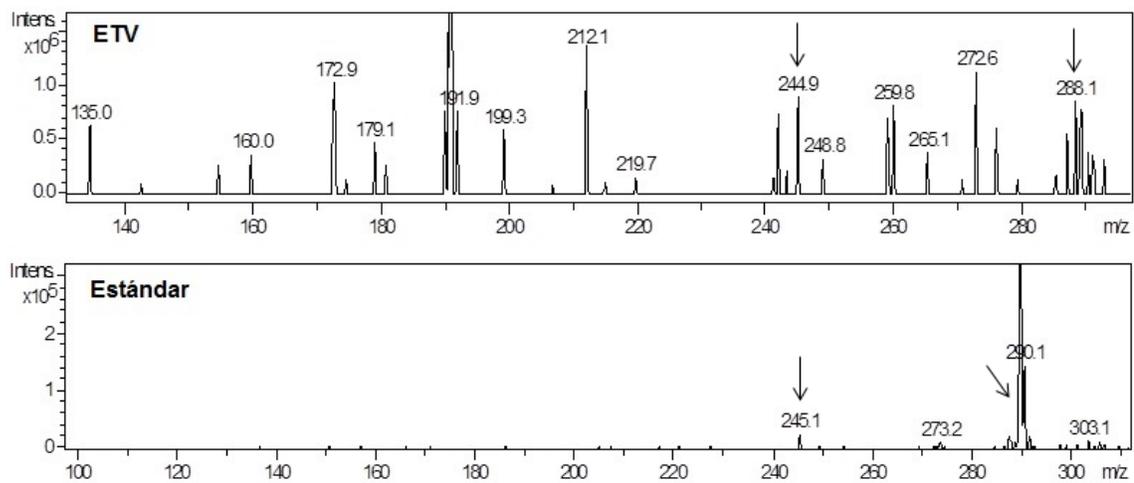


Figura 14. Espectro de masas en modo negativo de epicatequina en el ETV y estándar. Las flechas indican los fragmentos compatibles.

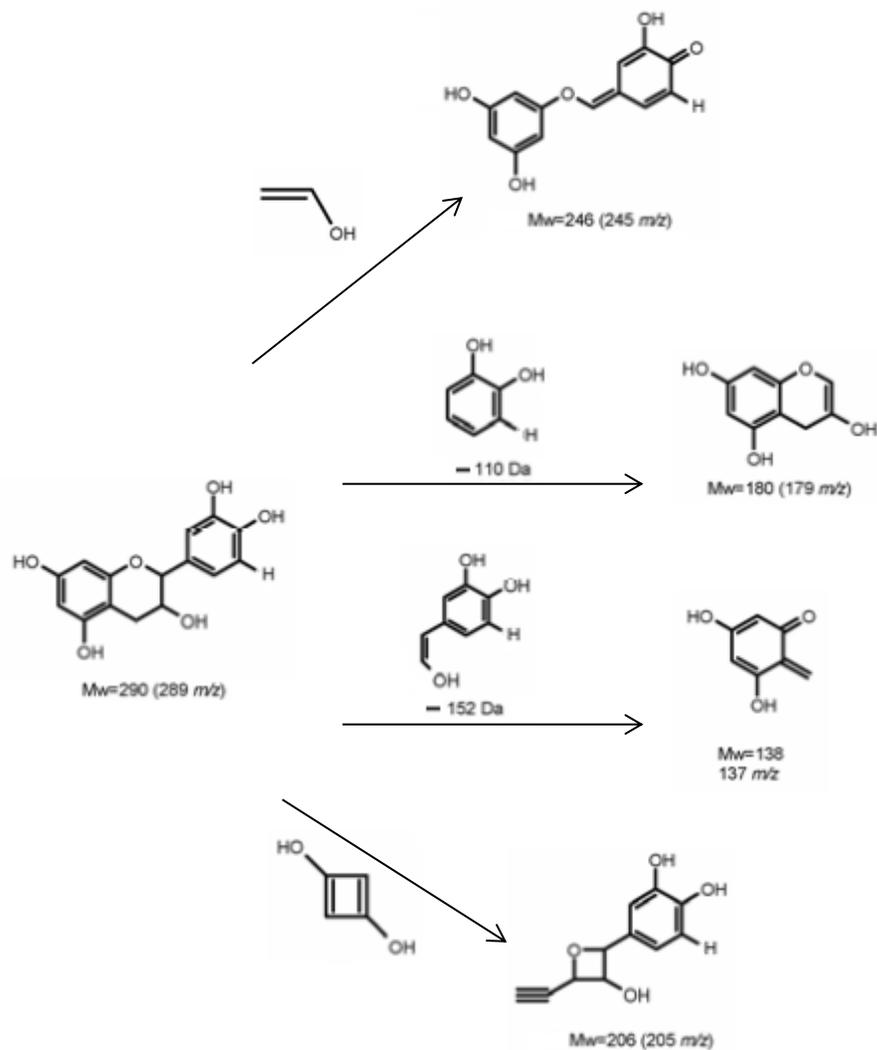


Figura 15. Fragmentación propuesta para epicatequina. Imagen modificada de Callemien y Collin (2008).

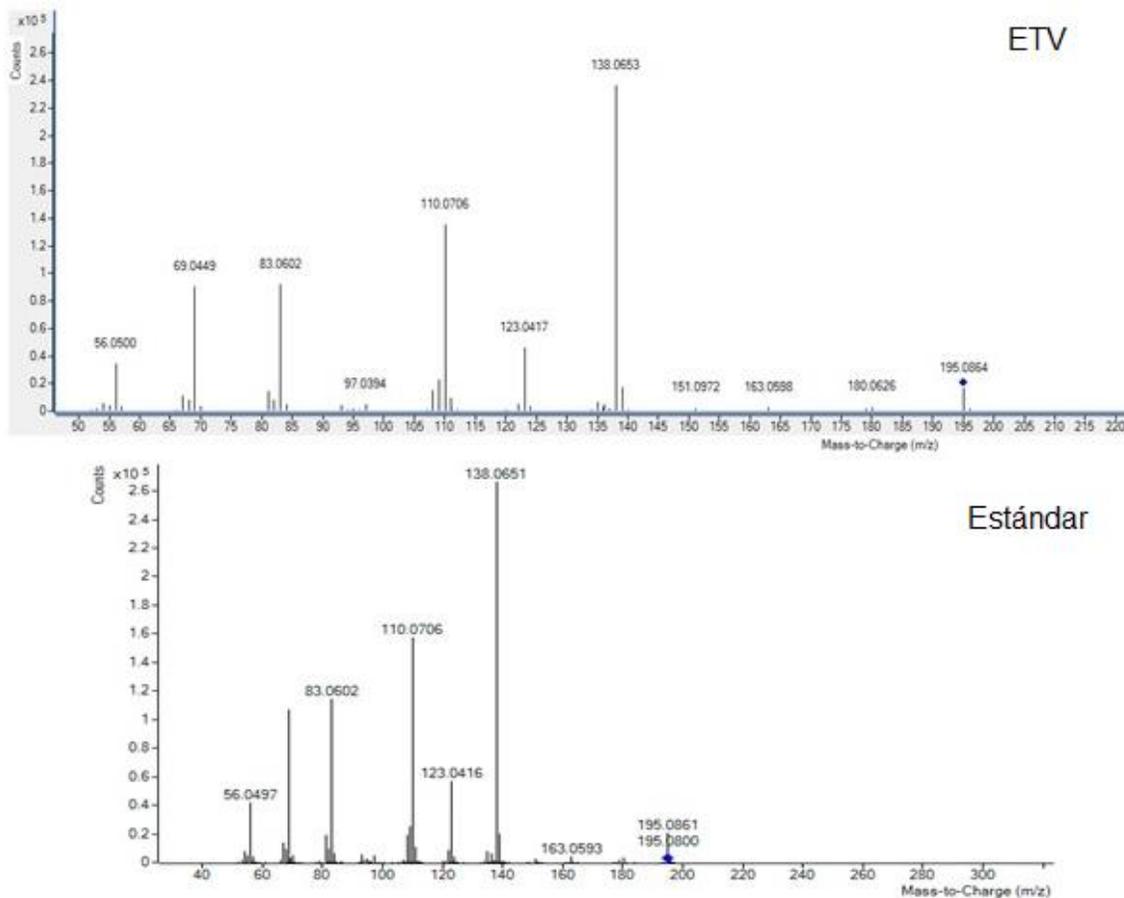


Figura 16. Espectro de masas en modo positivo de cafeína en el extracto de té verde (ETV) y estándar.

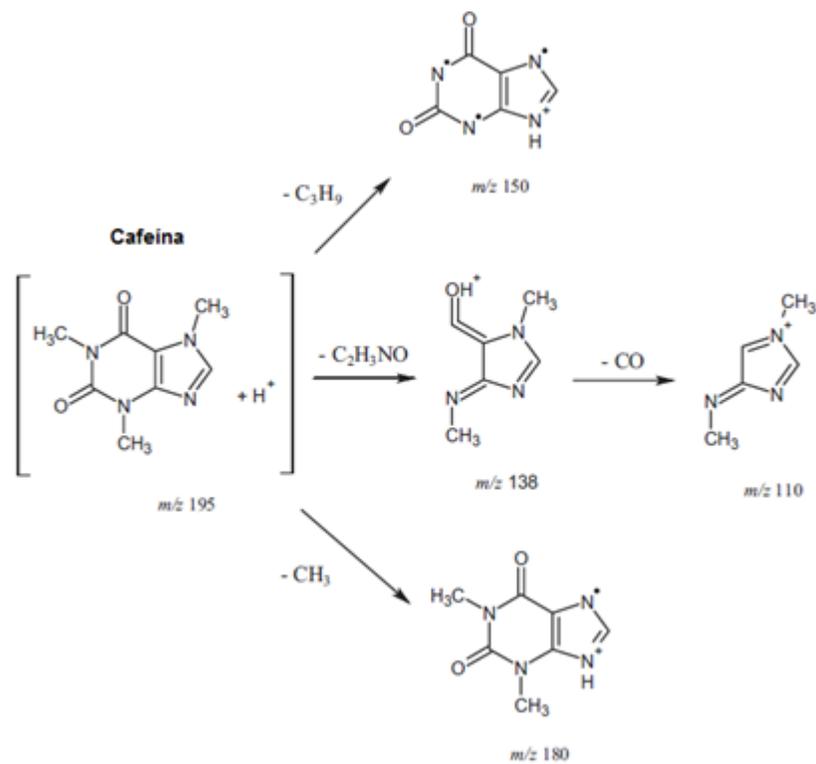


Figura 17. Fragmentación propuesta de la cafeína. Imagen modificada de Pellegrini et al. (2007).

Cuantificación de Compuestos Fenólicos por HPLC

El contenido de los compuestos identificados en el ETV se presentó en el cuadro 3. El orden de los compuestos identificados en el extracto de acuerdo a la concentración cuantificada es GEGC>Cf>GGC>EC>AG.

El ácido fenólico cuantificado es AG (pico 1, T_R 9.61 min), para el que se obtuvo una concentración de 0.58 ± 0.11 mg/g de ETV (0.07 mg/g de té). Los resultados obtenidos son similares a lo reportado por Del Rio et al., (2004) de 0.108 mg/g de té. Se han reportado en otras investigaciones contenidos ligeramente mayores a los encontrados en el presente estudio, Wang et al., (2000) obtuvieron 0.39 y 0.37 mg/g de té, Wu et al., (2012) de 0.59 mg/g de té variedad Ziya y Li et al., (2012) de 0.7 mg/g de té. Por otra parte López de Dicastillo et al., (2013) obtuvieron un contenido superior de 13.7 mg/g de té comparado con los resultados de esta investigación.

Se sospecha que el compuesto identificado por su masa molecular en el extracto puede tratarse de una catequina tipo GGC (pico 2, T_R 35.95 min) debido a la similitud con las catequinas identificadas, para el cual se estimó un contenido de 2.71 a 3.68 mg/g de té. Debido a que no se observó el pico del estándar correspondiente con el método analítico utilizado, la estimación se realizó en base a las curvas de calibración de la EC y GEGC por su semejanza estructural.

De las catequinas presentes en el ETV, la mayoritaria fue el GEGC (pico 3, T_R 38.27 min) con un contenido de 133.59 ± 20.18 mg/g de ETV (14.90 mg/g de té), este comportamiento concuerda con otras investigaciones (Ahmad et al., 2014; Horžić et al., 2009; Komes et al., 2010; Neilson et al., 2006). Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los reportados por El-Shahawi et al., (2012) de 1.01 a 43.3 mg/g de té. Otras investigaciones han reportado contenidos mayores a los obtenidos en este trabajo de 24.5 a 36.1 mg/g (Rahim, Nofrizal, & Saad, 2014); 20.3 a 42.6 mg/g de té (Khokhar et al., 2002), 49.1 a 87.1 mg/g de té (Nishitani y Sagesaka, 2004), 61.3 mg/g de té (Li et al., 2012), 77.1 a 103.5 mg/g de té (Cabrera et al., 2003), 94.6 mg/g de té (Jin et al.,

2014), 144.21 mg/g de té (Zhao et al., 2011) y 145 mg/g de té (Park et al., 2007). Además Pelillo et al., (2004) reportaron un contenido superior de 390.7 mg/g de extracto al obtenido en este trabajo. Ahmad et al., (2014) reportan que el contenido de GEGC y EC es afectado significativamente por el tipo de solvente y tiempo de extracción aplicado, obteniéndose una máxima extracción de catequinas con etanol (174 mg/g de té) comparado con agua y metanol.

Otra de las catequinas cuantificadas en el ETV es la EC, de la que se obtuvo 27.96 ± 2.79 mg/g de ETV (3.12 mg/g de té). Nuestros resultados se encuentran dentro de los valores reportados por El-Shahawi et al., (2012) de 0.577 a 10.2 mg/g de té. Se han reportado contenidos ligeramente mayores en trabajos realizados por Khokhar y Magnusdottir, (2002) de 4.4 a 9.5 mg/g de té; Nishitani y Sagesaka, (2004) 4.3, 4.5 y 9.7 mg/g de té; Park et al., (2007) 6.01 mg/g de té; Jin et al, (2014) 7.9 mg/g de té; Li et al., (2012) 9.0 mg/g de té; Rahim et al., (2014) 5.56 a 9.08 mg/g. Además contenidos mayores han sido publicados por Del Rio et al., (2004) 13.28 mg/g de té; Zhao et al., (2011) 15.40 mg/g de té; Vuong et al., (2013) de 19.5 mg/g de té, Cabrera et al., (2003) 8.1 a 21.2 mg/g de té y López de Dicastillo et al., (2013) de 38.7 mg/g de té. De igual manera Pelillo et al., (2004) obtuvieron un contenido mayor (55.7 mg/g de extracto) de EC al reportado en esta investigación.

En el extracto se obtuvo un contenido de Cf de 98.27 ± 12.31 mg/g de ETV (10.96 mg/g de té). El contenido obtenido es similar a los publicados por Khokhar y Magnusdottir, (2002) de 11.5 a 19.5 mg/g de té. Además este resultado es congruente con lo señalado por Pan et al., (2003) y Jun (2009), quienes obtuvieron una concentración mayor de cafeína utilizado metanol en la extracción comparado con agua, etanol y acetona. Otras investigaciones han reportado valores superiores de Cf como Ölmez y Yilmaz, (2010) 14.6 a 21.4 mg/g de té, Zhang et al., (2011) 20.04 mg/g de té; Rahim et al., (2014) de 20.4 a 38.7 mg/g de té; Cabrera et al., (2003) 25.7 a 38.3 mg/g de té; Li et al., (2012) 46.4 mg/g de té y López de Dicastillo et al., (2013) de 94.5 mg/g de té. De manera contraria Vuong et al., (2013) reportan un contenido menor de Cf, 7.3 mg/g de té denominado como descafeinado. La variedad, integridad, origen de

las hojas y método de procesamiento influyen significativamente en la concentración de la cafeína (Ošťádalová et al., 2014). Estas variaciones también se asocian con la edad de las hojas de té y el solvente utilizado en la obtención del extracto (Komes et al., 2009; Pan et al., 2003).

El contenido de catequinas en los tés se asocia con el proceso de elaboración y con el grado de fermentación, siendo el té verde el de mayor contenido comparado con el oolong y negro. Las catequinas constituyen la mayoría de los sólidos solubles de las hojas de té, no obstante, durante el proceso de extracción pueden estar combinadas con azúcares y proteínas. La degradación de estos compuestos es afectada por la oxidación, las altas temperaturas de procesamiento y condiciones alcalinas (Ahmad et al., 2014). El proceso de elaboración del té verde consiste en someter a las hojas al vapor o asado, lo que impide su fermentación e inactiva a la polifenol oxidasa. Al evitar se lleve a cabo la fermentación no se cataliza la polimerización oxidativa de las catequinas, esta polimerización o condensación provoca cambios conformacionales y modifica sus propiedades (Astill et al., 2001; Ölmez y Yilmaz, 2010; Sharif et al., 2014). Es por ello que el contenido de catequinas, Cf y AG está relacionado con la calidad de las hojas de té y el grado de fermentación durante su manufactura (Cabrera et al., 2003). Otros factores que influyen en su contenido son el estado de madurez de las hojas, el grado de exposición a los rayos solares y la estación del año en la que se colectan las hojas de té (Jin et al., 2014; Lin et al., 2008). Es por todo lo anterior que el contenido de compuestos fenólicos es variable entre las diversas investigaciones realizadas.

Etapa II

Actividad Antibacteriana de la Película de PEBD Adicionada con ET V

El aspecto de las películas elaboradas mediante extrusión se presenta en la figura 18, en la que se observa que la película adicionada con ETV presentó una ligera coloración comparada con la película control, la cual fue transparente. Una vez elaboradas las películas se procedió a evaluar su actividad antibacteriana para determinar su potencial como envase activo.

En el cuadro 4 se muestran los resultados de la actividad antibacteriana de la película adicionada con ETV. Se observó un efecto significativo ($p < 0.05$) de la película adicionada en *L. monocytogenes* comparada con la control con una reducción en el crecimiento del 39.22% en 48 h de contacto. Dicha bacteria resultó ser más sensible a los componentes del té presentes en la película comparado con el resto de las bacterias. En cambio no se observó efecto de la película adicionada con el ETV en el crecimiento de *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

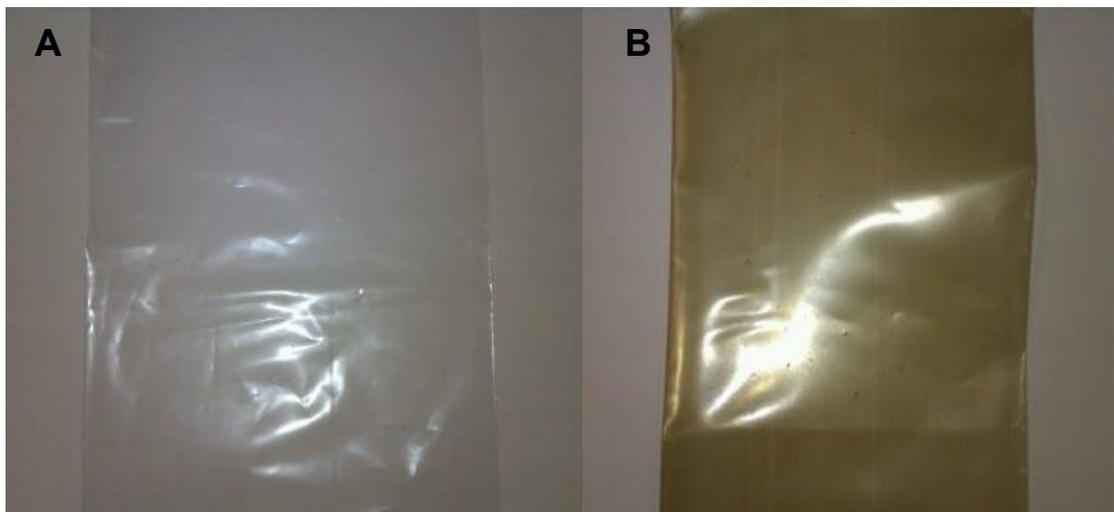


Figura 18. Películas de polietileno de baja densidad (PEBD) elaboradas. A: PEBD control; B: PEBD adicionado con ETV.

Cuadro 4. Actividad antibacteriana de las películas de PEBD control y adicionadas con ETV en contacto directo contra tres bacterias.

Bacteria	Película	Incubación por 24 h (UFC/cm ²) ^b	Actividad antibacteriana R ^c
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	PEBD ^d	6.6x10 ⁵	-0.022
	PEBD+ETV ^e	7.0x10 ⁵	
<i>Staphylococcus aureus</i>	PEBD	9.4x10 ⁵	0.046
	PEBD+ETV	9.3x10 ⁵	
<i>Listeria monocytogenes</i>	PEBD	1.7x10 ⁶	0.263
	PEBD+ETV	9.7x10 ^{5*} f	

^a: Actividad analizada mediante ISO 22196:2007. ^b: Valor promedio de tres piezas independientes. ^c: Valor de R calculado ^d: PEBD, polietileno de baja densidad. ^e: ETV, extracto de té verde. ^f: Incubación por 48 h. Inóculo inicial 3.3x10⁶ UFC/cm². *Diferencias significativas (p<0.05) entre películas para la misma bacteria.

Los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana para *L. monocytogenes* son similares a los reportados por Otero et al., (2014) quienes obtuvieron un valor de R de 0.20, lo que representa una reducción del 38% en el crecimiento de *E. coli* O157:H7 aplicando un recubrimiento de aceite esencial de orégano en una película de polipropileno. A pesar de que no se utilizó el mismo procesamiento para la elaboración de la película activa, el efecto del ETV y el aceite esencial de orégano sobre el crecimiento de una bacteria permite apreciar el envase activo con mayor potencial de aplicación comercial.

L. monocytogenes es causante de listeriosis, enfermedad de baja incidencia pero alta mortalidad (20-30%); por su habilidad de sobrevivir en un amplio rango de condiciones ambientales (temperatura -1.5 a 50 °C, sal y ácido) es considerado un patógeno alimentario importante (Oliveira et al., 2014; Saludes et al., 2015; Shi et al., 2015). Se asocia a diversos alimentos como leche, quesos, embutidos, pescados, mariscos, vegetales crudos y alimentos listos para consumir sin tratamientos térmicos. En los últimos 30 años éstos son considerados los principales alimentos involucrados en brotes de *L. monocytogenes*, con una prevalencia de 2.97 a 25% (Saludes et al., 2015; Shi et al., 2015). Siendo los alimentos no sometidos a tratamientos térmicos los principales vehículos para esta bacteria y la magnitud del riesgo a la salud que representa, la implementación de un envase activo antibacteriano permitirá disminuir los brotes asociados a su consumo.

Compuestos Presentes en la Película de PEBD Adicionada con ETV

Los cromatogramas HPLC-iones totales (TIC) obtenidos para la película de PEBD control y adicionada con ETV en modo negativo y positivo se muestran en las figuras 19 y 20, respectivamente. Para identificar los compuestos provenientes del extracto y del plástico, se realizó una comparación de los

cromatogramas obtenidos para la película PEBD control (sin ETV) con la película PEBD+ETV, comparando los T_R y la presencia de iones de moléculas desprotonadas/ protonadas ($[M - H]^- / [M + H]^+$) y los iones de los fragmentos principales (NI/PI) de los picos (cuadro 5).

Se identificaron 2 compuestos en la película, GEGC (T_R 6.1 min, modo negativo) y Cf (T_R 6.2 min, modo positivo) procedentes del ETV. Además se detectaron 9 compuestos como probables productos de degradación de componentes del extracto, debido a que sus iones moleculares no corresponden a compuestos fenólicos previamente reportados en el té verde, y se intentó identificarlos en este estudio. Considerando que los compuestos fenólicos constituyen el 30% de la composición general de té, el resto corresponde a proteínas, aminoácidos, carbohidratos, pigmentos y minerales (Lin et al., 2003; Belitz et al., 2009). También se detectaron 4 compuestos provenientes del plástico que corresponden a los T_R de: 11.1 y 15.3 min en modo negativo (figura 19), 14.7 y 17.1 min en modo positivo (figura 20). Estos compuestos pueden ser agentes antioxidantes que actúan como protectores contra la deterioración ocasionada por agentes atmosféricos (como gases, radiación, temperatura, agua, entre otros) (Robertson, 2012). Los picos que se observan posteriores a los 17.5 min corresponden al comportamiento de la fase móvil bajo las condiciones del gradiente indicadas en la metodología.

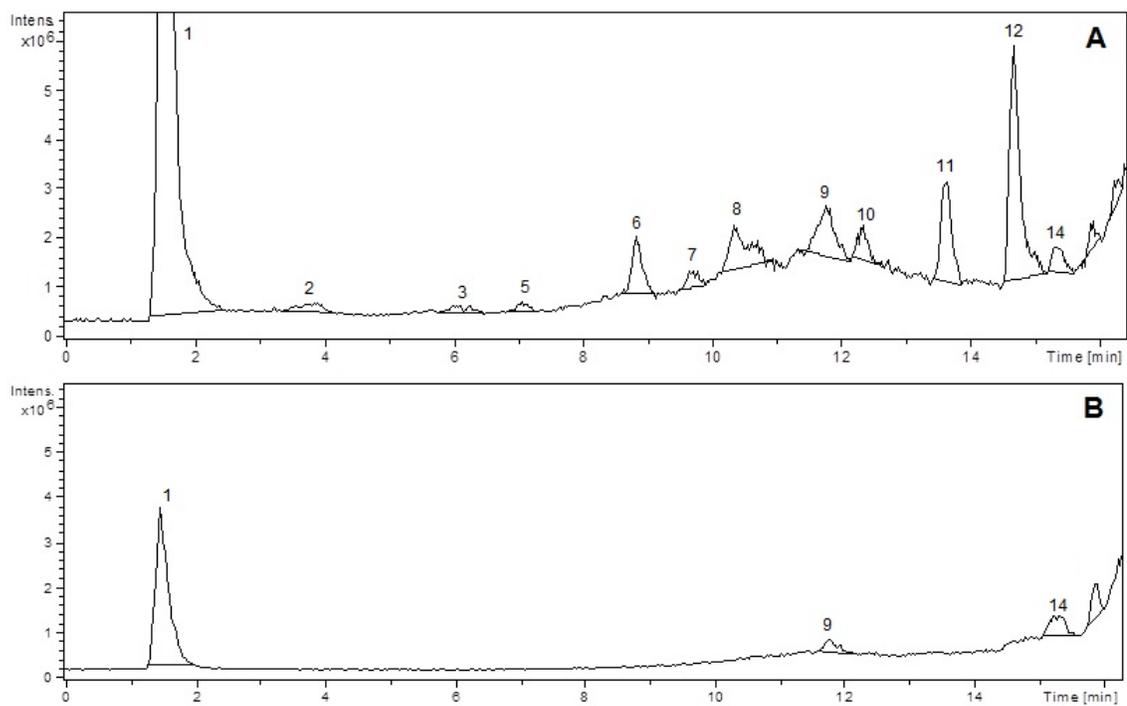


Figura 19. Cromatograma HPLC-iones totales (TIC) de películas de PEBD+ETV (A) y control (B), modo negativo. Identificación de picos: (1,2 y 5 al 14) No identificados, (3) galato de epigalocatequina.

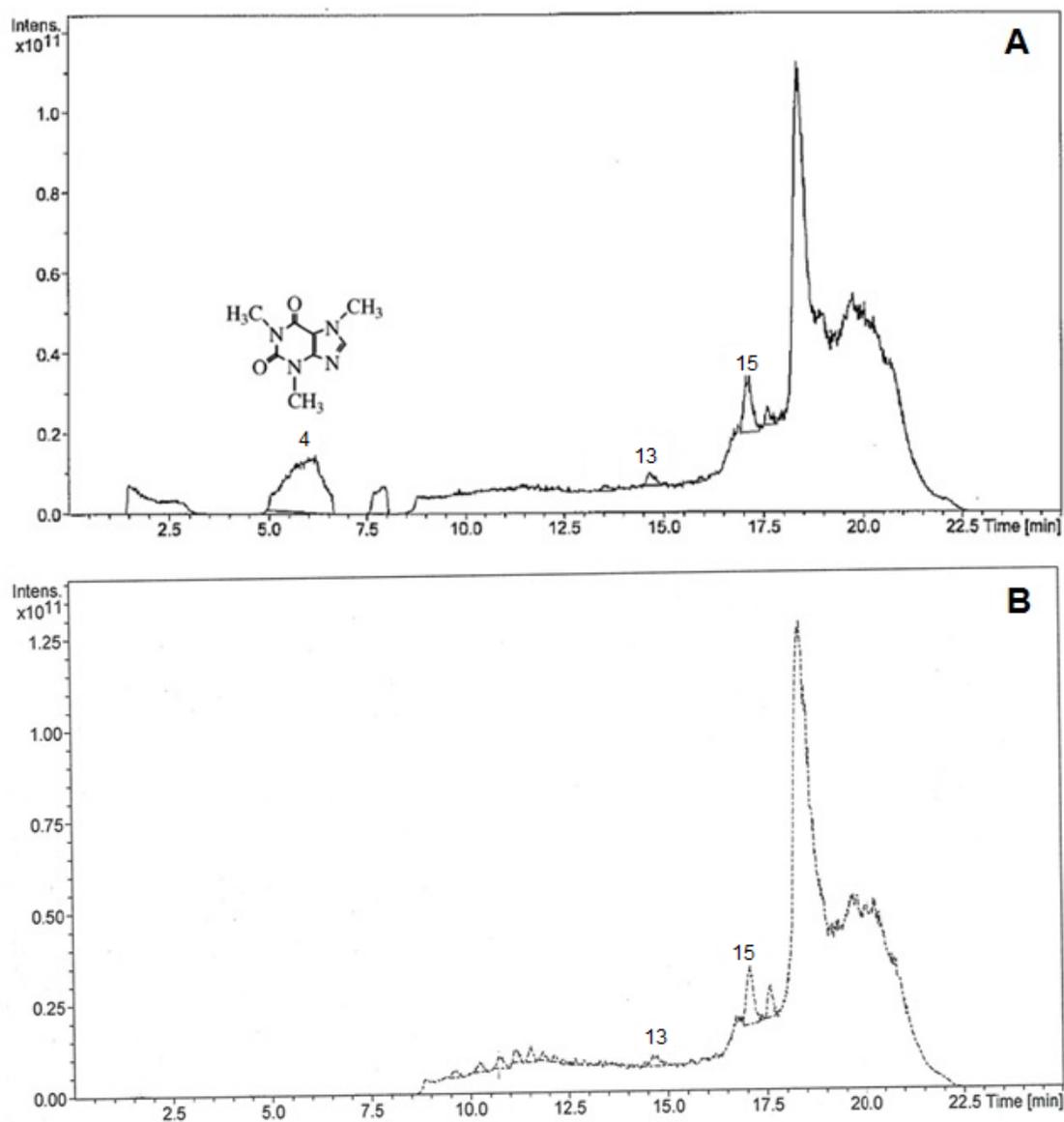


Figura 20. Cromatograma HPLC-iones totales (TIC) de películas de PEBD+ETV (A) y control (B), modo positivo. Identificación de picos: (4) Cafeína, (13 y 15) No identificados.

Cuadro 5. Tiempo de retención, características espectrales de masas e identidad de los compuestos fenólicos presentes en la película de PEBD+ETV.

Pico	T _R (min)	Compuesto	[M - H] ⁻ / [M + H] ⁺ (m/z)	NI/ PI (m/z)
1	1.6	N.i	192/ -	170, 126/-
2	3.8	N.i.	185/ -	126/-
3	6.1	GEGC ^a	457/ -	288, 169/-
4	6.2	Cafeína ^{ab}	- / 195	-/138, 110
5	7.1	N.i.	463/ -	300/ -
6	8.8	N.i.	461/ -	308, 170/-
7	9.7	N.i.	445/ -	291, 170/-
8	10.3	N.i.	483/ -	445, 291/-
9	11.7	Proveniente de PEBD	424/ -	398, 328, 167/-
10	12.3	N.i.	761/ -	608, 320/-
11	13.6	N.i.	304/ 306	181, 152/ 183
12	14.6	N.i.	287/ -	227/ -
13	14.7	Proveniente de PEBD	-/ 557	-/ 247, 122
14	15.3	Proveniente de PEBD	469/ -	314, 223/ -
15	17.1	Proveniente de PEBD	-/ 607	-/ 535, 305, 244

^a Previamente reportado en té verde. ^b Identificado por comparación con estándar. PEBD: Polietileno de baja densidad. N.i.: No identificado. GEGC: galato de epigallocatequina.

De las extracciones realizadas de la película PEBD+ETV se efectuó la cuantificación de Cf, como único compuesto recuperado y corregido por el porcentaje de recuperación. Al igual que en el extracto, presentó un ion molecular de 195 m/z y un fragmento de 138 m/z en modo positivo. A pesar de que se detectó la presencia de GEGC en la película no se obtuvo una concentración suficiente para llevar a cabo su cuantificación. Los compuestos denominados como “no identificados”, podrían tratarse de productos de degradación de componentes del ETV no relacionados con compuestos fenólicos o con Cf. La identidad de estos compuestos se desconoce debido a que sus iones no coinciden con los de los componentes identificados frecuentemente en té verde, tanto en los reportados en este trabajo así como en otras investigaciones publicadas. Además se ha descartado que provengan del PEBD por comparación con la película control.

En el cuadro 6 se muestra el efecto del proceso de extrusión de la película en la concentración de Cf. El contenido de Cf fue de 1.41 ± 0.09 mg/g de PEBD, que corresponde al 32.91% inicialmente adicionada. De lo anterior se observó una disminución del 67.09% de Cf en la película, atribuida a su degradación durante el proceso de extrusión. Este comportamiento es similar al obtenido por Colín-Chávez et al., (2012), quienes reportan una retención de astaxantina del 36.02% en películas de PEBD elaboradas por este mismo proceso. En cambio, Iñiguez-Franco et al., (2012) reportaron valores mayores de retención para C (72.5%) y EC (70.3%) en películas de PLA extruídas en dado plano.

De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que el proceso de extrusión ejerce un efecto significativo en la degradación de los compuestos presentes en el ETV utilizado para la fabricación de la película de PEBD, confirmándose con la ausencia de actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Debido a que se ha reportado actividad antibacteriana de alcaloides de origen vegetal contra bacterias Gram positivas y negativas (Cushnie, et al., 2014), se podría asociar a la Cf presente en la película PEBD+ETV con la reducción del crecimiento de *L. monocytogenes*.

Cuadro 6. Efecto del proceso de extrusión en la concentración de cafeína (Cf) en la película.

Película	ETV adicionado (%)	Cf adicionada (mg/g)	Cf cuantificada en PEBD	
			mg/g	% de retención
PEBD	0	0	0	0
PEBD+ETV	4.35	4.28	1.41±0.09*	32.91

ETV: extracto de té verde PEBD: polietileno de baja densidad. * Valor promedio ± desviación estándar de tres repeticiones.

CONCLUSIONES

Los EOU y ETV presentaron actividad contra *L. monocytogenes* y *S. aureus* spp. Además el ETV también presentó actividad contra *P. aeruginosa*. Por el contrario el EA no presentó actividad contra ninguna de las bacterias analizadas.

Se utilizó el ETV para la fabricación de películas de PEBD por presentar actividad antibacteriana contra un mayor rango de bacterias comparado con el EOU y EA.

En el ETV se identificaron 4 compuestos que conforme a su concentración cuantificada en el extracto corresponden a GEGC>Cf >GGC>EC>AG.

La película de PEBD adicionada con ETV presentó actividad antibacteriana contra *L. monocytogenes* con una reducción del 39.22% del crecimiento en 48 h de contacto.

Se identificaron dos compuestos en la película PEBD+ETV, correspondientes a GEGC en una concentración no cuantificable y Cf con un 32.91% de retención.

El proceso de fabricación por extrusión, para la obtención de una película de PEBD, degradó los compuestos fenólicos presentes en el ETV disminuyendo su espectro de acción antibacteriana.

RECOMENDACIONES

Para verificar el efecto de la Cf en la actividad antibacteriana de la película adicionada con ETV, se recomienda realizar los ensayos de difusión en agar contra *L. monocytogenes*.

Debido a que en los ensayos *in vitro* la película de PEBD adicionada con ETV presentó actividad antibacteriana contra *L. monocytogenes*, se recomienda realizar los ensayos en alimentos. Estos ensayos permitirán estudiar la interacción de los componentes del alimento con la Cf retenida en la película, y con esta información se puede controlar la liberación de la Cf hacia el alimento y consecuentemente disminuir el crecimiento de la bacteria en su superficie.

Otra acción que se puede realizar para lograr actividad antibacteriana de la película activa es la adición de una concentración mayor del extracto (8%) al PEBD, de tal manera se logre una cantidad remanente de las catequinas suficiente para ejercer un efecto positivo para aplicaciones comerciales.

Proceder con la identificación de los compuestos procedentes del PEBD y probables productos de degradación del ETV detectados en la película adicionada con ETV.

Para evitar la degradación de los componentes del extracto por efecto del procesamiento de extrusión se podría disminuir la temperatura y tiempo de residencia. Esto permitirá que compuestos como el GEGC, EC y AG subsistan durante la extrusión y posteriormente al interactuar con el alimento se liberen de manera gradual hacia su superficie.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, R. S., Butt, M. S., Huma, N., Sultan, M. T., Arshad, M. U., Mushtaq, Z., y Saeed, F. (2014). Quantitative and Qualitative Portrait of Green Tea Catechins (Gtc) Through Hplc. *International Journal of Food Properties*, 17(December), 1626–1636. doi:10.1080/10942912.2012.723232
- Alves-Silva, J. M., Dias dos Santos, S. M., Pintado, M. E., Pérez-Álvarez, J. A., Fernández-López, J., y Viuda-Martos, M. (2013). Chemical composition and in vitro antimicrobial, antifungal and antioxidant properties of essential oils obtained from some herbs widely used in Portugal. *Food Control*, 32(2), 371–378. doi:10.1016/j.foodcont.2012.12.022
- Amárita Vega, F. (2004). Aditivos alimentarios: usos y abusos. En Secretaría General Técnica (Ed.), *La Transformación Industrial de la Producción Agropecuaria* (p. 101–103). España: Ministerio de Educación y Ciencia.
- Arvanitoyannis, I. S., y Kotsanopoulos, K. V. (2014). Migration Phenomenon in Food Packaging. Food–Package Interactions, Mechanisms, Types of Migrants, Testing and Relative Legislation — A Review Alcoholic grade. *Food Bioprocess Technology*, 7, 21–36. doi:10.1007/s11947-013-1106-8
- Astill, C., Birch, M. R., Dacombe, C., Humphrey, P. G., y Martin, P. T. (2001). Factors Affecting the Caffeine and Polyphenol Contents of Black and Green Tea Infusions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5340–5347.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., y Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry* (4ta ed., p. 953). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-540-69934-7
- Cabrera, C., Giménez, R., y López, M. C. (2003). Determination of Tea Components with Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4427–4435. doi:10.1021/jf0300801

- Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., y Ferreira, I. C. F. R. (2014). Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 377–399. doi:10.1111/1541-4337.12065
- Cásseres, E. (1980). *Producción de Hortalizas*. (M. de la Cruz, Ed.) (3ra ed., p. 194). San José, Costa Rica: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Retrieved from <http://books.google.com.mx/books?id=thsPAQAAIAAJ&printsec=frontcover&dq=Casseres,+E.+1980&hl=es&sa=X&ei=8YF4U-WZD8mEogTtjoCIDQ&ved=0CCwQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false>
- Castro, J., Pregibon, T., Chumanov, K., y Marcus, R. K. (2010). Determination of catechins and caffeine in proposed green tea standard reference materials by liquid chromatography-particle beam/electron ionization mass spectrometry (LC-PB/EIMS). *Talanta*, 82(5), 1687–95. doi:10.1016/j.talanta.2010.07.054
- Caturla, N. (2003). The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(6), 648–662. doi:10.1016/S0891-5849(02)01366-7
- Chen, J. H., Ren, Y., Seow, J., Liu, T., Bang, W. S., y Yuk, H. G. (2012). Intervention Technologies for Ensuring Microbiological Safety of Meat: Current and Future Trends. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 119–132. doi:10.1111/j.1541-4337.2011.00177.x
- Chen, Y., Jiang, Y., Duan, J., Shi, J., Xue, S., y Kakuda, Y. (2010). Variation in catechin contents in relation to quality of “Huang Zhi Xiang” Oolong tea (*Camellia sinensis*) at various growing altitudes and seasons. *Food Chemistry*, 119(2), 648–652. doi:10.1016/j.foodchem.2009.07.014
- Cheng, V. J., Bekhit, A. E.-D. A., McConnell, M., Mros, S., y Zhao, J. (2012). Effect of extraction solvent, waste fraction and grape variety on the antimicrobial and antioxidant activities of extracts from wine residue from

- cool climate. *Food Chemistry*, 134(1), 474–482. doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.103
- Cliff, M. A., Stanich, K., Edwards, J. E., y Saucier, C. T. (2012). Adding Grape Seed Extract To Wine Affects Astringency and Other Sensory Attributes. *Journal of Food Quality*, 35(4), 263–271. doi:10.1111/j.1745-4557.2012.00448.x
- Coe, S., Fraser, A., y Ryan, L. (2013). Polyphenol Bioaccessibility and Sugar Reducing Capacity of Black, Green, and White Teas. *International Journal of Food Science*, (1), 1–7. doi:0.1155/2013/238216
- Colín-Chávez, C., Soto-Valdez, H., Peralta, E., Lizardi-Mendoza, J., y Balandrán-Quintana, R. R. (2012). Fabrication and Properties of Antioxidant Polyethylene-based Films Containing Marigold (*Tagetes erecta*) Extract and Application on Soybean Oil Stability. *Packaging Technology and Science*, 26(5), 267–280. doi:10.1002/pts
- Cruz-Zúñiga, J. M. (2011). *Difusión de rutina y sus productos de descomposición en una película de ácido poliláctico (PLA) hacia simulantes de alimentos*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, México.
- Cushnie, T. P. T., Cushnie, B., y Lamb, A. J. (2014). Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(5), 377–386. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.06.001
- Del Rio, D., Stewart, A. J., Mullen, W., Burns, J., Lean, M. E. J., Brighenti, F., y Crozier, A. (2004). HPLC-MSn analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 2807–15. doi:10.1021/jf0354848
- Deng, Q., y Zhao, Y. (2011). Antimicrobial Properties of Wine Grape (cv . Merlot) Pomace Extract-Based Films. *Journal of Food Science*, 76(3), 309–317. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02090.x
- Dou, J., Lee, V. S. Y., Tzen, J. T. C., y Lee, M.-R. (2007). Identification and Comparison of Phenolic Compounds in the Preparation of Oolong Tea

- Manufactured by Semifermentation and Drying Processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7462–7468. doi:10.1021/jf0718603
- Durán, L. (2001). Aditivos naturales. *Consejo Superior de Investigaciones Científicas*, 661(Arbor CLXVIII), 87–107. Retrieved from <http://arbor.revistas.csic.es>
- Edziri, H., Ammar, S., Souad, L., Mahjoub, M. A., Mastouri, M., Aouni, M., Mighri, Z. y Verschaeve, L. (2012). In vitro evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of some Tunisian vegetables. *South African Journal of Botany*, 78, 252–256. doi:10.1016/j.sajb.2011.09.012
- El-Shahawi, M. S., Hamza, A., Bahaffi, S. O., Al-Sibaai, A. A., y Abduljabbar, T. N. (2012). Analysis of some selected catechins and caffeine in green tea by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 134(4), 2268–75. doi:10.1016/j.foodchem.2012.03.039
- Farnworth, E. ., Lagacé, M., Couture, R., Yaylayan, V., y Stewart, B. (2001). Thermal processing, storage conditions, and the composition and physical properties of orange juice. *Food Research International*, 34(1), 25–30. doi:10.1016/S0963-9969(00)00124-1
- He, C.-Y., Fu, J., Ma, J.-Y., Feng, R., Tan, X.-S., Huang, M., Shou, J.-W., Zhao, Z.-X., Zhang, X.-F., Chen, Y., y Wang, Y. (2014). Biotransformation and in vitro metabolic profile of bioactive extracts from a traditional Miao-nationality herbal medicine, *Polygonum capitatum*. *Molecules*, 19(7), 10291–308. doi:10.3390/molecules190710291
- Horžić, D., Komes, D., Belščak, A., Kovačević, K., Iveković, D., y Karlović, D. (2009). The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chemistry*, 115, 441–448. doi:10.1016/j.foodchem.2008.12.022
- Ignat, I., Volf, I., y Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821–1835. doi:10.1016/j.foodchem.2010.12.026
- International Organization for Standardization (ISO) 22196. Plastics-Measurement of bacterial activity on plastics surfaces (2007). Switzerland.

- Iñiguez-Franco, F., Soto-Valdez, H., Peralta, E., Ayala-Zavala, J. F., Auras, R., y Gámez-Meza, N. (2012). Antioxidant activity and diffusion of catechin and epicatechin from antioxidant active films made of poly(L-lactic acid). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(26), 6515–23. doi:10.1021/jf300668u
- Ji, L., Wu, J., Gao, W., Wei, J., Yang, J., y Guo, C. (2011). Antioxidant capacity of different fractions of vegetables and correlation with the contents of ascorbic acid, phenolics, and flavonoids. *Journal of Food Science*, 76(9), C1257–61. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02402.x
- Jin, B., y Kelly, J. M. (2009). Wine Industry Residues. In S. S. + B. M. B. (Ed.), *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: utilisation of agro-residues* (Part III., p. 295–296). Netherlands: Springer Netherlands. doi:10.1007/978-1-4020-9942-7_15
- Jin, J., Ma, J.-Q., Ma, C.-L., Yao, M., y Chen, L. (2014). Determination of Catechin Content in Representative Chinese Tea Germplasms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 9436–9441. doi:dx.doi.org/10.1021/jf5024559
- Joerger, R. D. (2007). Antimicrobial films for food applications: A quantitative analysis of their effectiveness. *Packaging Technology and Science*, 20(4), 231–273. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pts.774/abstract>
- Jun, X. (2009). Caffeine extraction from green tea leaves assisted by high pressure processing. *Journal of Food Engineering*, 94(1), 105–109. doi:10.1016/j.jfoodeng.2009.03.003
- Katalinić, V., Možina, S. S., Skroza, D., Generalić, I., Abramovič, H., Miloš, M., Ljubenković, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinc, P., y Boban, M. (2010). Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry*, 119(2), 715–723. doi:10.1016/j.foodchem.2009.07.019
- Khokhar, S., y Magnusdottir, S. G. M. (2002). Total Phenol, Catechin, and Caffeine Contents of Teas Commonly Consumed in the United Kingdom.

- Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 565–570.
doi:10.1021/jf010153
- Kiehne, A., y Engelhardt, U. H. (1996). Thermospray-LC-MS analysis of various groups of polyphenols in tea. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*, 202(1), 48–54. doi:10.1007/BF01229684
- Kim, S., Jeong, S., Park, W., Nam, K., Ahn, D., y Lee, S. (2006). Effect of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grape seed extracts. *Food Chemistry*, 97(3), 472–479. doi:10.1016/j.foodchem.2005.05.027
- Komes, D., Horžić, D., Belščak, A., Ganič, K. K., y Baljak, A. (2009). Determination of Caffeine Content in Tea and Maté Tea by using Different Methods. *Czech Journal of Food Sciences*, 27, S213–S216. Retrieved from <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/08057.pdf>
- Komes, D., Horžić, D., Belščak, A., Kovačević, K., y Vulić, I. (2010). Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. *Food Research International*, 43, 167–176. doi:10.1016/j.foodres.2009.09.022
- Li, K., Shi, X., Yang, X., Wang, Y., Ye, C., y Yang, Z. (2012). Antioxidative activities and the chemical constituents of two Chinese teas, *Camellia kucha* and *C. ptilophylla*. *International Journal of Food Science & Technology*, (47), 1063–1071. doi:10.1111/j.1365-2621.2012.02942.x
- Li, N., Taylor, L., y Mauer, L. (2011). Degradation kinetics of catechins in green tea powder: Effects of temperature and relative humidity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 6082–6090. doi:dx.doi.org/10.1021/jf200203n
- Lin, L.-Z., Chen, P., y Harnly, J. M. (2008). New phenolic components and chromatographic profiles of green and fermented teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 8130–40. doi:10.1021/jf800986s
- Lin, Y., Tsai, Y., Tsay, J., y Lin, J. (2003). Factors affecting the levels of tea polyphenols and caffeine in tea leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1864–1873. doi:10.1021/jf021066b

- López de Dicastillo, C., Castro-López, M. D. M., López-Vilariño, J. M., y González-Rodríguez, M. V. (2013). Immobilization of green tea extract on polypropylene films to control the antioxidant activity in food packaging. *Food Research International*, 53(1), 522–528. doi:10.1016/j.foodres.2013.05.022
- Lu, Y., y Yeap Foo, L. (1999). The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chemistry*, 65(1), 1–8. doi:10.1016/S0308-8146(98)00245-3
- Luo, Z.-L., Wang, H.-B., y Su, J.-S. (2012). Effect of Interaction of Ni²⁺ and Green Tea Epigallocatechin Gallate on Tongue Carcinoma Cells. *Journal of Inorganic Materials*, 27(2), 179–184. doi:10.3724/SP.J.1077.2012.00179
- Maggi, F., Barboni, L., Papa, F., Caprioli, G., Ricciutelli, M., Sagratini, G., y Vittori, S. (2012). A forgotten vegetable (*Smyrniolum olusatrum* L., Apiaceae) as a rich source of isofuranodiene. *Food Chemistry*, 135(4), 2852–62. doi:10.1016/j.foodchem.2012.07.027
- Manzanarez-López, F., Soto-Valdez, H., Auras, R., y Peralta, E. (2011). Release of α -Tocopherol from Poly(lactic acid) films, and its effect on the oxidative stability of soybean oil. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 508–517. doi:10.1016/j.jfoodeng.2010.12.029
- Martínez, A., Lee, R., Chaparro, D., y Páramo, S. (2003). *Postcosecha y Mercadeo de Hortalizas de Clima Frío Bajo Prácticas de Producción Sostenible*. (G. Cavelier, M. García, & L. Rocca, Eds.) (Primera., p. 28). Bogotá, Colombia: Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Retrieved from <http://books.google.com.mx/books?id=2aL2xUPJdYMC&pg=PA56&dq=Martínez,+A.+2003.+Postcosecha+y+mercadeo+de+frutas+y+hortalizas&hl=es&sa=X&ei=BoN4U-qiKZbgoATzhYLADQ&ved=0CC4Q6AEwAA#v=onepage&q=Martínez,+A.+2003.+Postcosecha+y+mercadeo+de+frutas+y+hortalizas&f=false>
- Mbata, T., Debiao, L., y Saikia, A. (2008). Antibacterial activity of the crude extract of Chinese green tea (*Camellia sinensis*) on *Listeria*

- monocytogenes. *African Journal of Biotechnology*, 7(10), 1571–1573.
Retrieved from <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/58725>
- Mejía-Félix, I. R. (2007). *Efecto del procesamiento de películas de polietileno de baja densidad a escala piloto e industrial en la disponibilidad de a-tocoferol*. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, México.
- Misic, D., Zizovic, I., Stamenic, M., Ruzica, A., Ristic, M., Petrovic, S. D., y Skala, D. (2008). Antimicrobial activity of celery fruit isolates and SFE process modeling *in vitro*. *Biochemical Engineering Journal*, 42, 148–152. doi:10.1016/j.bej.2008.06.008
- Muñoz-Velázquez, E. E., Rivas-Díaz, K., Loarca-Piña, M. G. F., y Mendoza-Díaz, S. (2012). Comparación del contenido fenólico, capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria de infusiones herbales comerciales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(3), 481–495.
- Murphy, J. (2001). *Additives for plastics handbook* (Second., p. 484). Oxford, UK: Elsevier Ltd.
- Nakayama, M., Shigemune, N., Tsugukuni, T., Jun, H., Matsushita, T., Mekada, Y., Kurahachi, M. y Miyamoto, T. (2012). Mechanism of the combined antibacterial effect of green tea extract and NaCl against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. *Food Control*, 25(1), 225–232. doi:10.1016/j.foodcont.2011.10.021
- Nakayama, M., Shimatani, K., Ozawa, T., Shigemune, N., Tsugukuni, T., Tomiyama, D., Kurahachi, M., Nonaka, A., y Miyamoto, T. (2013). A study of the antibacterial mechanism of catechins: Isolation and identification of *Escherichia coli* cell surface proteins that interact with epigallocatechin gallate. *Food Control*, 33(2), 433–439. doi:10.1016/j.foodcont.2013.03.016
- Negi, P. S. (2012). Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, 156(1), 7–17. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006
- Neilson, A. P., Green, R. J., Wood, K. V, y Ferruzzi, M. G. (2006). High-throughput analysis of catechins and theaflavins by high performance liquid

- chromatography with diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 1132, 132–140. doi:10.1016/j.chroma.2006.07.059
- Nishitani, E., y Sagesaka, Y. M. (2004). Simultaneous determination of catechins, caffeine and other phenolic compounds in tea using new HPLC method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17(5), 675–685. doi:10.1016/j.jfca.2003.09.009
- Oliveira, D. A., Augusta, A., Smânia, A., Smânia, E. F. A., Maraschin, M., y Ferreira, S. R. S. (2013). Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. *Journal of Biotechnology*, 164(3), 423–432. doi:10.1016/j.jbiotec.2012.09.014
- Oliveira, M., Viñas, I., Colàs, P., Anguera, M., Usall, J., y Abadias, M. (2014). Effectiveness of a bacteriophage in reducing *Listeria monocytogenes* on fresh-cut fruits and fruit juices. *Food Microbiology*, 38, 137–142. doi:10.1016/j.fm.2013.08.018
- Ölmez, H., y Yilmaz, A. (2010). Changes in chemical constituents and polyphenol oxidase activity of tea leaves with shoot maturity and cold storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34, 653–665. doi:10.1111/j.1745-4549.2009.00423.x
- Ortega-Ramirez, L. A., Rodriguez-Garcia, I., Leyva, J. M., Cruz-Valenzuela, M. R., Silva-Espinoza, B. A., Gonzalez-Aguilar, G. A., Siddiqui, M., y Ayala-Zavala, J. F. (2014). Potential of Medicinal Plants as Antimicrobial and Antioxidant Agents in Food Industry: A Hypothesis. *Journal of Food Science*, 79(2), 129–137. doi:10.1111/1750-3841.12341
- Ošťádalová, M., Tremlová, B., Straka, I., Pokorná, J., y Čáslaková, P. (2014). Evaluation of significant pigments in green teas of different origin. *Potravinárstvo Scientific Journal for Food Industry*, 8(1), 221–227. doi:10.5219/344
- Otero, V., Becerril, R., Santos, J. A., Rodríguez-Calleja, J. M., Nerín, C., y García-López, M.-L. (2014). Evaluation of two antimicrobial packaging films against *Escherichia coli* O157:H7 strains in vitro and during storage of a

- Spanish ripened sheep cheese (Zamorano). *Food Control*, *42*, 296–302. doi:10.1016/j.foodcont.2014.02.022
- Özkan, G., Sagdiç, O., Göktürk Baydar, N., y Kurumahmutoglu, Z. (2004). Antibacterial activities and total phenolic contents of grape pomace extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *84*(14), 1807–1811. doi:10.1002/jsfa.1901
- Pan, X., Niu, G., y Liu, H. (2003). Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering and Processing*, *42*, 129–133. doi:0255-2701/02/\$
- Park, H. S., Lee, H. J., Shin, M. H., Lee, K., Lee, H., Kim, Y.-S., Kim, K.O., y Kim, K. H. (2007). Effects of cosolvents on the decaffeination of green tea by supercritical carbon dioxide. *Food Chemistry*, *105*, 1011–1017. doi:10.1016/j.foodchem.2007.04.064
- Pelillo, M., Bonoli, M., Biguzzi, B., Bendini, A., Gallina Toschi, T., y Lercker, G. (2004). An investigation in the use of HPLC with UV and MS-electrospray detection for the quantification of tea catechins. *Food Chemistry*, *87*(3), 465–470. doi:10.1016/j.foodchem.2003.12.034
- Pellegrini, M., Marchei, E., Rossi, S., Vagnarelli, F., Durgbanshi, A., García-Algar, O., Vall, O. y Pichini, S. (2007). Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry assay for determination of nicotine and metabolites, caffeine and arecoline in breast milk. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, *21*(16), 2693–703. doi:10.1002/rcm.3137
- Perez-Perez, C., Regalado-González, C., Rodríguez-Rodríguez, C., Barbosa-Rodríguez, J. R., y Villaseñor-Ortega, F. (2006). Incorporation of antimicrobial agents in food packaging films and coatings. *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*, *661*(2), 193–216.
- Perumalla, A. V. S., y Hettiarachchy, N. S. (2011). Green tea and grape seed extracts — Potential applications in food safety and quality. *Food Research International*, *44*(4), 827–839. doi:10.1016/j.foodres.2011.01.022

- Perva-Uzunalić, A., Škerget, M., Knez, Ž., Weinreich, B., Otto, F., y Grüner, S. (2006). Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food Chemistry*, 96(4), 597–605. doi:10.1016/j.foodchem.2005.03.015
- Poças, M. D. F., y Hogg, T. (2009). Exposure Assessment of Chemicals from Packaging Materials. In R. Costa & K. Kristbergsson (Eds.), *Predictive Modeling and Risk Assessment* (p. 121–137). Springer US. doi:10.1007/978-1-387-68776-6
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., y Ignacimuthu, S. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6, 39. doi:10.1186/1472-6882-6-39
- Rahim, A. A., Nofrizal, S., y Saad, B. (2014). Rapid tea catechins and caffeine determination by HPLC using microwave-assisted extraction and silica monolithic column. *Food Chemistry*, 147, 262–268. doi:10.1016/j.foodchem.2013.09.131
- Ramos, M., Jiménez, A., Peltzer, M., y Garrigós, M. C. (2012). Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. *Journal of Food Engineering*, 109(3), 513–519. doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.10.031
- Robertson, G. L. (2012). *Food Packaging: principles and practice*. (T. & F. Group, Ed.) (3rd ed., p. 17–20, 131–133, 293–307 y 399–411). Boca Raton, FL.
- Rubilar, J. F., Cruz, R. M. S., Silva, H. D., Vicente, A. A., Khmelinskii, I., y Vieira, M. C. (2013). Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. *Journal of Food Engineering*, 115(4), 466–474. doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.07.009
- Rusak, G., Komes, D., Likić, S., Horžić, D., y Kovač, M. (2008). Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*, 110(4), 852–858. doi:10.1016/j.foodchem.2008.02.072

- Sagdic, O., Ozturk, I., y Kisi, O. (2012). Modeling antimicrobial effect of different grape pomace and extracts on *S. aureus* and *E. coli* in vegetable soup using artificial neural network and fuzzy logic system. *Expert Systems With Applications*, 39(8), 6792–6798. doi:10.1016/j.eswa.2011.12.047
- Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H., y Kanazawa, K. (2003). Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 571–81. doi:10.1021/jf020926l
- Saludes, M., Troncoso, M., y Figueroa, G. (2015). Presence of *Listeria monocytogenes* in Chilean food matrices. *Food Control*, 50, 331–335. doi:10.1016/j.foodcont.2014.08.008
- Sánchez-Rabáneda, F., Jáuregui, O., Casals, I., Andrés-Lacueva, C., Izquierdo-Pulido, M., y Lamuela-Raventós, R. M. (2003). Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Mass Spectrometry*, 38(1), 35–42. doi:10.1002/jms.395
- Serra, A. T., Matias, A. A., Nunes, A. V. M., Leitão, M. C., Brito, D., Bronze, R., Silva, S., Pires, A., Crespo, M.T., San Romão, M.V., y Duarte, C. M. (2008). In vitro evaluation of olive- and grape-based natural extracts as potential preservatives for food. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(3), 311–319. doi:10.1016/j.ifset.2007.07.011
- Seto, R., Nakamura, H., Nanjo, F., y Hara, Y. (1997). Preparation of Epimers of Tea Catechins by Heat Treatment. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 61(9), 1434–1439. Retrieved from <http://pdf.lookchem.com/pdf/22/b04dbf1e-5506-460f-a85c-43dcda16f476.pdf>
- Sharif, R., Ahmad, S. W., Anjum, H., Ramzan, N., y Malik, S. R. (2014). Effect of infusion time and temperature on decaffeination of tea using liquid – liquid extraction technique. *Journal of Food Processing Engineering*, 37, 46–52. doi:10.1111/jfpe.12058

- Shi, W., Qingping, W., Jumei, Z., Moutong, C., y Zéan, Y. (2015). Prevalence, antibiotic resistance and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from retail ready-to-eat foods in China. *Food Control*, 47, 340–347. doi:10.1016/j.foodcont.2014.07.028
- Si, W., Gong, J., Tsao, R., Kalab, M., Yang, R., y Yin, Y. (2006). Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in Chinese green tea extract. *Journal of Chromatography. A*, 1125(2), 204–10. doi:10.1016/j.chroma.2006.05.061
- Silván, J. M., Mingo, E., Hidalgo, M., de Pascual-Teresa, S., Carrascosa, A. V., y Martinez-Rodriguez, A. J. (2013). Antibacterial activity of a grape seed extract and its fractions against *Campylobacter* spp. *Food Control*, 29(1), 25–31. doi:10.1016/j.foodcont.2012.05.063
- Siripatrawan, U., y Noipha, S. (2012). Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 102–108. doi:10.1016/j.foodhyd.2011.08.011
- Sivansankar, B. (2005). Food spoilage. In P. Hall (Ed.), *Food processing and preservation* (p. 157–159). New Delhi, India.
- Sivarooban, T., Hettiarachchy, N. S., y Johnson, M. G. (2008). Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Research International*, 41, 781–785. doi:10.1016/j.foodres.2008.04.007
- Spáčil, Z., Nováková, L., y Solich, P. (2010). Comparison of positive and negative ion detection of tea catechins using tandem mass spectrometry and ultra high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 123(2), 535–541. doi:10.1016/j.foodchem.2010.04.048
- Stankevičius, M., Akuņeca, I., Jākobsone, I., y Maruška, A. (2011). Comparative analysis of radical scavenging and antioxidant activity of phenolic compounds present in everyday use spice plants by means of spectrophotometric and chromatographic methods. *Journal of Separation Science*, 34(11), 1261–7. doi:10.1002/jssc.201000915

- Storia, A. La, Ferrocino, I., Torrieri, E., Mauriello, G., Villani, F., y Ercolini, D. (2012). International Journal of Food Microbiology A combination of modified atmosphere and antimicrobial packaging to extend the shelf-life of beefsteaks stored at chill temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 158(3), 186–194. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.011
- Sulaiman, S. F., Sajak, A. A. B., Ooi, K. L., y Seow, E. M. (2011). Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(4-5), 506–515. doi:10.1016/j.jfca.2011.01.020
- Tortora, G. J., Funke, B., y Case, C. L. (2007). *Introducción a la Microbiología* (9a ed., p. 85–87). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana. Retrieved from <http://books.google.com.mx/books?id=Nxb3iETuwpIC&printsec=frontcover&dq=Tortora,+G.+2007&hl=es&sa=X&ei=gpR5U-rsKsnjoASs54GIBA&ved=0CDoQ6AEwAA#v=onepage&q=Tortora,+G.+2007&f=false>
- Ulloa, J. A. (2007). Causas de deterioro. En U. A. de Nayarit (Ed.), *Frutas auto estabilizadas en el envase por la tecnología de obstáculos* (1st ed., p. 35–43). Tepic, Nayarit.
- Valdés, A., Mellinas, A. C., Ramos, M., Garrigós, M. C., y Jiménez, A. (2014). Natural additives and agricultural wastes in biopolymer formulations for food packaging. *Frontiers in Chemistry*, 2(February), 6. doi:10.3389/fchem.2014.00006
- Viswanathan, P., y Kaur, R. (2001). Prevalence and growth of pathogens on salad vegetables, fruits and sprouts. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 203, 205–213. doi:1438-4639/01/203/3-205
- Vuong, Q. V, Golding, J. B., Nguyen, M. H., y Roach, P. D. (2013). Preparation of decaffeinated and high caffeine powders from green tea. *Powder Technology*, 233, 169–175. doi:10.1016/j.powtec.2012.09.002
- Wang, D., Lu, J., Miao, A., Xie, Z., y Yang, D. (2008). HPLC-DAD-ESI-MS/MS analysis of polyphenols and purine alkaloids in leaves of 22 tea cultivars in

- China. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(5), 361–369. doi:10.1016/j.jfca.2008.01.002
- Wang, H., Helliwell, K., y You, X. (2000). Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. *Food Chemistry*, 68, 115–121. doi:10.1016/S0308-8146(99)00179-X
- Wang, L., Kim, D., y Lee, C. Y. (2000). Effects of Heat Processing and Storage on Flavanols and Sensory Qualities of Green Tea Beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4227–4232.
- Wang, R., Zhou, W., y Jiang, X. (2008). Reaction kinetics of degradation and epimerization of epigallocatechin gallate (EGCG) in aqueous system over a wide temperature range. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(8), 2694–701. doi:10.1021/jf0730338
- Wang, S., Marcone, M. F., Barbut, S., y Lim, L. (2012). Fortification of dietary biopolymers-based packaging material with bioactive plant extracts. *Food Research International*, 49(1), 80–91. doi:10.1016/j.foodres.2012.07.023
- Wu, C., Xu, H., Héritier, J., y Andlauer, W. (2012). Determination of catechins and flavonol glycosides in Chinese tea varieties. *Food Chemistry*, 132(1), 144–149. doi:10.1016/j.foodchem.2011.10.045
- Xi, Y., Sullivan, G. A., Jackson, A. L., Zhou, G. H., y Sebranek, J. G. (2012). Effects of natural antimicrobials on inhibition of *Listeria monocytogenes* and on chemical, physical and sensory attributes of naturally-cured frankfurters. *Meat Science*, 90(1), 130–138. doi:10.1016/j.meatsci.2011.06.013
- Xia, E., He, X., Li, H., Wu, S., Li, S., y Deng, G. (2013). Biological Activities of Polyphenols from Grapes. In *Polyphenols in Human Health and Disease* (Vol. 1, pp. 47–58). Elsevier Inc. doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00005-0
- Xu, G., Ye, X., Chen, J., y Liu, D. (2007). Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(2), 330–5. doi:10.1021/jf062517l

- Yam, T. S., Shah, S., y Hamilton-Miller, J. M. T. (1997). Microbiological activity of whole and fractionated crude extracts of tea (*Camellia sinensis*), and of tea components. *FEMS Microbiology Letters*, *152*, 169–174.
- Yao, Y., y Ren, G. (2011). Effect of thermal treatment on phenolic composition and antioxidant activities of two celery cultivars. *LWT - Food Science and Technology*, *44*(1), 181–185. doi:10.1016/j.lwt.2010.07.001
- Yu, J., y Ahmedna, M. (2013). Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science & Technology*, *48*(2), 221–237. doi:10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x
- Zhang, L., Li, N., Ma, Z., y Tu, P. (2011). Comparison of the Chemical Constituents of Aged Pu-erh Tea , Ripened Pu-erh Tea , and Other Teas Using HPLC-DAD-ESI-MS n. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 8754–8760. doi:dx.doi.org/10.1021/jf2015733
- Zhao, Y., Chen, P., Lin, L., Harnly, J. M., Lucy, L., y Li, Z. (2011). Tentative identification , quantitation, and principal component analysis of green pu-erh, green, and white teas using UPLC / DAD / MS. *Food Chemistry*, *126*(3), 1269–1277. doi:10.1016/j.foodchem.2010.11.055

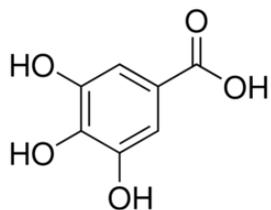
APENDICES

Abreviaturas

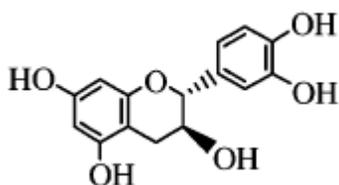
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG	Ácido gálico
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
C	Catequina
Cf	Cafeína
CIAD	Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo
EA	Extracto de apio
EAG	Equivalente de ácido gálico
EC	Epicatequina
EGC	Epigalocatequina
EOU	Extracto de orujo de uva
EqC	Equivalente de catequina
ETV	Extracto de té verde
GC	Galocatequina
GEC	Galato de epicatequina
GEGC	Galato de epigalocatequina
GGC	Galato de galocatequina
GSE	Extracto de semilla de uva
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HR	Humedad relativa
ISO	International Organization for Standardization
ISQ	Isoquercetina
log	Logaritmo
NCSS	Number Crunching Statistical System
Nd	No detectado
N.i.	No identificado
Pa	Pascal
PEBD	Polietileno de baja densidad
psi	Libra-fuerza por pulgada cuadrada
rpm	Revoluciones por minuto
Tf	Teaflavina

Tg	Temperatura de transición vítrea
Tm	Temperatura de fusión
T _R	Tiempo de retención
TSA	Agar tripticasa de soya
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
V	Volts

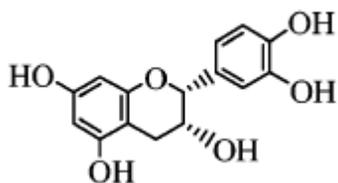
Estructuras moleculares de los compuestos fenólicos y flavonoides



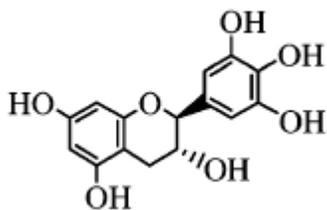
Ácido gálico (AG), peso molecular: 170.12, fórmula $(\text{OH})_3\text{C}_6\text{H}_2\text{CO}_2\text{H}$.



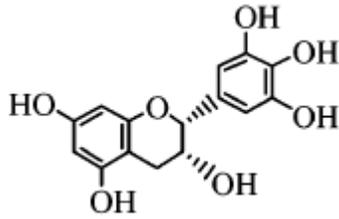
Catequina (C), peso molecular: 290.3, fórmula $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$.



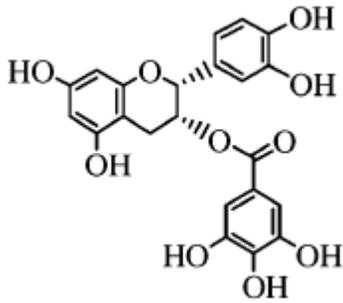
Epicatequina (EC), peso molecular: 290.3, fórmula $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$.



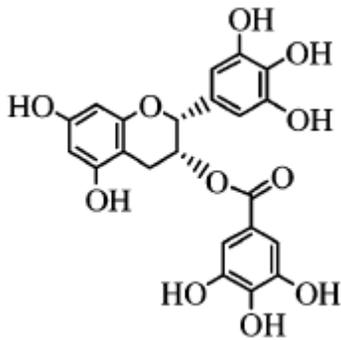
Galocatequina (GC), peso molecular: 306.3, fórmula $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_7$.



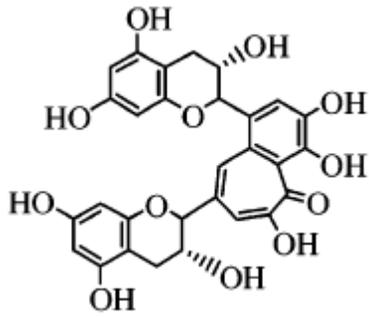
Epigallocatequina (EGC), peso molecular: 306.3,
fórmula $C_{15}H_{14}O_7$.



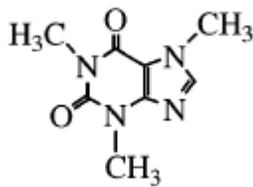
Galato de epicatequina (GEC), peso molecular:
442.4, fórmula $C_{22}H_{18}O_{10}$.



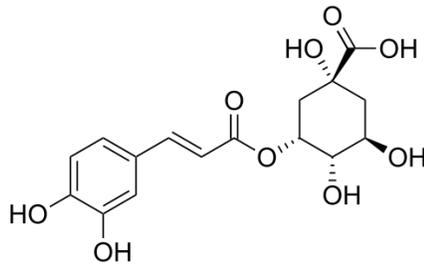
Galato de epigallocatequina (GEGC), peso molecular:
458.4, fórmula $C_{22}H_{18}O_{11}$.



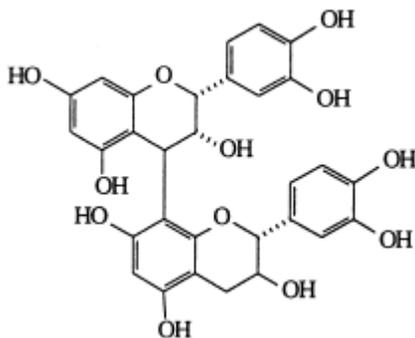
Teaflavina (Tf), peso molecular: 564.5, fórmula $C_{29}H_{24}O_{12}$.



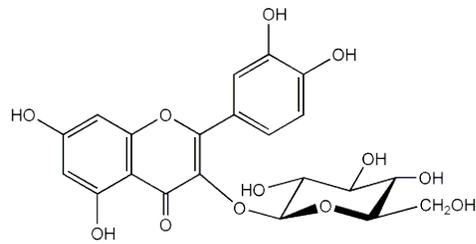
Cafeína (Cf), peso molecular: 194.19, fórmula $C_8H_{10}N_4O_2$.



Ácido 5-O-cafeoilquínico, peso molecular: 354.31, fórmula $C_{16}H_{18}O_9$.

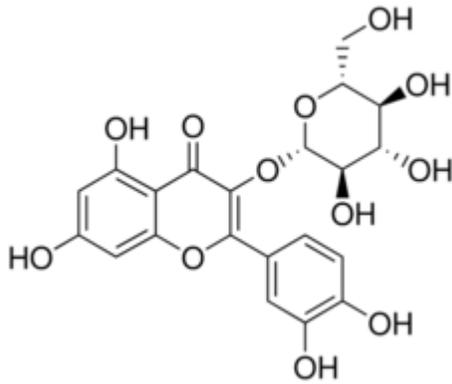


Procianidina B1, peso molecular: 578.5, fórmula $C_{30}H_{26}O_{12}$.



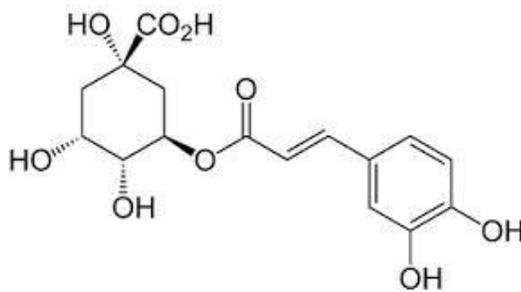
Isoquercetina (ISQ), peso molecular:

464.38, fórmula $C_{21}H_{20}O_{12}$.



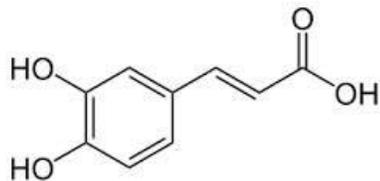
Quercetina 3-glucósido, peso molecular:

464.38, fórmula $C_{21}H_{20}O_{12}$.

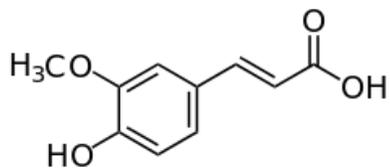


Ácido clorogénico, peso molecular:

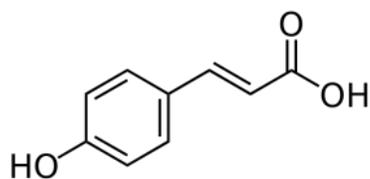
354.31, fórmula $C_{16}H_{18}O_9$.



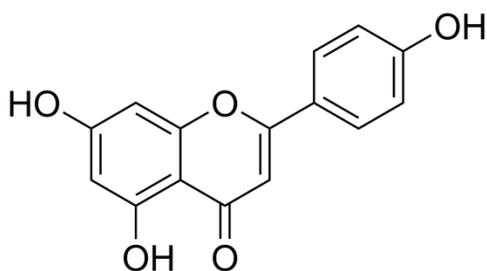
Ácido cafeico, peso molecular: 180.16, fórmula
(OH) $_2$ C $_6$ H $_3$ CH=CHCO $_2$ H.



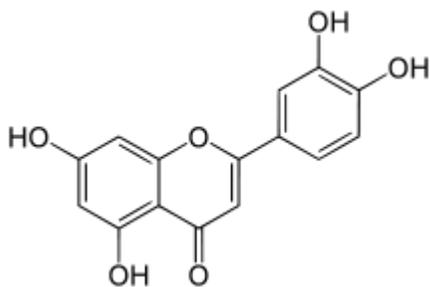
Ácido ferúlico, peso molecular: 194.18, fórmula
 $\text{HOC}_6\text{H}_3(\text{OCH}_3)\text{CH}=\text{CHCO}_2\text{H}$.



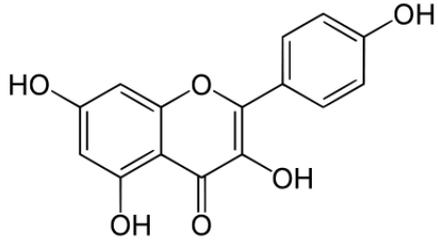
Ácido p-cumárico, peso molecular: 164.16, fórmula
 $\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CH}=\text{CHCO}_2\text{H}$.



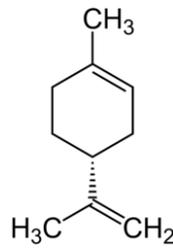
Apigenina, peso molecular: 270.24, fórmula
 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$.



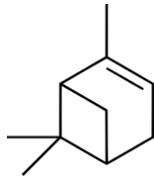
Luteolina, peso molecular: 286.24, fórmula
 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$.



Kaempferol, peso molecular: 286.24, fórmula $C_{15}H_{10}O_6$.



Limoneno, peso molecular: 136.23, fórmula $C_{10}H_{16}$.



α -pineno, peso molecular: 136.23, fórmula $C_{10}H_{16}$.