



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

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE  
DOS ENVASES ACTIVOS CON ACEITE ESENCIAL DE  
AZAHAR (*Citrus aurantium*) EN LA VIDA DE ANAQUEL DE LA  
TORTILLA DE MAÍZ**

---

**Por:**

**Ana Patricia Ibarra Valenzuela**

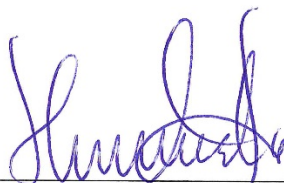
TESIS APROBADA POR LA COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE  
ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

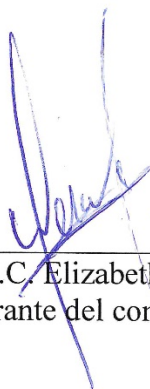
## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Ana Patricia Ibarra Valenzuela, 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



---

M.C. Elizabeth Peralta  
Integrante del comité de tesis



---

Dra. Alma Rosa Islas Rubio  
Integrante del comité de tesis



---

Dra. Rosalba Troncoso Rojas  
Integrante del comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Dos Envases Activos con Aceite Esencial de Azahar (*Citrus aurantium*) en la Vida de Anaquel de la Tortilla de Maíz” 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 de la autora Ana Patricia Ibarra Valenzuela, 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 de quien ocupe la titularidad de la Dirección 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(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.  
Coordinación de Programas Académicos

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Pablo Wong González', written over a horizontal line.

Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACYT) por la beca otorgada. Quiero agradecer al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C y a todos los que forman parte de la institución, investigadores, docentes y personal administrativo quienes contribuyeron de alguna forma en mi desarrollo durante la maestría.

Así mismo, quiero agradecer a las importantes mujeres científicas que conformaron mi comité de tesis, Dra. Herlinda Soto Valdez, M.C. Elizabeth Peralta, Dra. Rosalba Troncoso Rojas y Dra. Alma Rosa Islas Rubio. A todas ellas que me guiaron durante esta etapa de mi vida personal y profesional, agradezco que compartieran su tiempo para corregirme, aconsejarme y guiarme siempre que lo necesité.

Gracias a la Dra. Herlinda por confiar en mí, por guiarme en el camino de la ciencia, por ser el mejor ejemplo en esta profesión y por haber tenido tanta paciencia durante estos dos años. Agradezco a Elizabeth Peralta por su apoyo durante mis corridas de laboratorio y por escuchar cada trama familiar todos los días, además de corregirme en cada aspecto.

Gracias a todos los integrantes de mi familia, especialmente a mis padres Martha y Jaime, quienes a su manera supieron brindarme las herramientas para ser la mujer que soy ahora.

Gracias a mi amiga Diana López Ortiz, por estar siempre ahí en cada momento, por escucharme y regañarme, fuiste una bendición, llegaste en el momento indicado y sé que sin tu apoyo no hubiera sido igual.

Gracias a mi mejor amigo y confidente Begniol, por apoyarme, aconsejarme y por siempre estar para mí. Siempre estaré agradecida por todo.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio y generación, Edith, Jesús, Heidy, Luis y Paola, hicieron más llevadero todos los días con todas sus ocurrencias.

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>CONTENIDO</b> .....	5
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	7
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	8
<b>RESUMEN</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	11
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	12
<b>2 ANTECEDENTES</b> .....	14
2.1 Maíz en México.....	14
2.1.1 Tortilla de Maíz y su Importancia en México.....	14
2.1.2 Elaboración y Envasado de la Tortilla de Maíz.....	15
2.2 Causas de Deterioro de la Tortilla de Maíz.....	16
2.2.1 Microorganismos Deteriorativos en la Tortilla de Maíz.....	17
2.2.2 Uso de Conservadores en la Tortilla de Maíz.....	18
2.2.3 Aditivos en la Industria Alimentaria.....	19
2.3 Los Aceites Esenciales.....	20
2.3.1 Aceite Esencial de Azahar (AEA) <i>Citrus aurantium</i> y sus Propiedades Antimicrobianas.....	20
2.3.2 Mecanismo de Acción de Compuestos Activos en el Aceite Esencial Azahar ( <i>Citrus aurantium</i> ).....	24
2.4 Envases Activos.....	25
2.4.1 Envases Activos Antimicrobianos.....	25
<b>3 HIPÓTESIS</b> .....	27
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	28
4.1. Objetivo General.....	28
4.2. Objetivos Específicos.....	28
<b>5 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	29
5.1 Materiales utilizados.....	29
5.2 Aislamiento e Identificación de Principales Microorganismos Presentes en la Tortilla de Maíz.....	30
5.2.1 Muestreo de Tortillas de Maíz en la Ciudad de Hermosillo, Sonora.....	30
5.2.2 Aislamiento e Identificación de Bacterias en la Tortilla de Maíz.....	30
5.2.3 Aislamiento e Identificación de Hongos en la Tortilla de Maíz.....	31
5.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del AEA Comercial y sus componentes mayoritarios contra Microorganismos Presentes en la Tortilla de Maíz.....	31

## CONTENIDO (continuación)

5.3.1 CMI del AEA Comercial y sus Componentes Mayoritarios Frente a <i>Escherichia coli</i> .....	31
5.3.2 CMI del AEA Comercial y sus Componentes Mayoritarios Frente a <i>Aspergillus niger</i> y <i>Penicillium</i> sp.....	33
5.4 Evaluación del Efecto del Envase Activo Bicapa PEAD/PEBD con AEA Comercial sobre la Vida de Anaquel de la Tortilla de Maíz.....	33
5.4.1 Cuantificación de BMA Totales en la Tortilla de Maíz.....	34
5.4.2 Cuantificación de Hongos y Levaduras en la Tortilla de Maíz.....	36
5.4.3 Análisis Sensorial de las Tortillas de Maíz Envasadas en los Envases PEAD/PEBD Activos E y R.....	38
5.5 Diseños Experimentales.....	39
5.5.1 Diseño Experimental para determinar la CMI del AEA Comercial y sus Componentes Mayoritarios Frente a <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium</i> sp y <i>Escherichia coli</i> .....	39
5.5.2 Diseño Experimental para la Evaluación el Efecto del Envase Activo Bicapa PEAD/PEBD con AEA comercial sobre la Vida de Anaquel de la Tortilla de Maíz.....	39
5.5.3 Diseño Experimental para la Evaluación de la Aceptabilidad Sensorial de las Tortillas de Maíz Envasadas en los envases PEAD/PEBD Activos E y R.....	40
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>41</b>
6.1 Apariencia de los Materiales Utilizados en el Presente Estudio.....	41
6.2 Aislamiento e Identificación de los Principales Microorganismos Presentes en la Tortilla de Maíz.....	41
6.2.1 Aislamiento e Identificación de Bacterias en la Tortilla de Maíz.....	41
6.2.2 Aislamiento e Identificación de Hongos en la Tortilla de Maíz.....	44
6.3 Determinación de la CMI del AEA Comercial y sus Componentes Mayoritarios Frente a Microorganismos Presentes en la Tortilla de Maíz.....	51
6.3.1 CMI del AEA Comercial y sus Componentes Mayoritarios Frente a <i>Escherichia coli</i> .....	51
6.3.2 CMI del AEA Comercial y sus Componentes Mayoritarios Frente a <i>Aspergillus niger</i> y <i>Penicillium</i> sp.....	60
6.4 Evaluación el Efecto de Envases Activos Bicapa PEAD/PEBD con AEA sobre la Vida de Anaquel de la Tortilla de Maíz.....	67
6.4.1 Cuantificación de Bacterias Mesófilas Aerobias Totales, Hongos y Levaduras en la Tortilla de Maíz.....	67
6.4.2 Análisis Sensorial en la Tortilla de Maíz Envasadas en bolsas de PEAD/PEBD fabricadas por extrusión y por recubrimiento.....	72
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>75</b>
<b>8. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>76</b>
<b>9. REFERENCIAS.....</b>	<b>77</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>85</b>

## LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Evaluación de conservadores en la tortilla de maíz y su vida de anaquel.....	19
2	Función y aplicación de distintos tipos de aditivos alimentarios.....	20
3	Aceites esenciales con actividad antimicrobiana.....	21
4	Porcentaje de componentes activos en el AEA ( <i>Citrus aurantium</i> ).....	22
5	Características de los envases con AEA, utilizados para tortillas de maíz.....	29
6	Pruebas bioquímicas realizadas a la bacteria aislada de la tortilla de maíz.....	42
7	Mecanismos de acción propuestos para distintos compuestos terpénicos frente a bacterias.....	59
8	Concentración Mínima Inhibitoria del AEA frente a <i>Aspergillus niger</i> y <i>Penicillium</i> sp.....	60
9	Efecto de la adición de distintas concentraciones de AEA comercial y sus componentes mayoritarios sobre el crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> .....	61
10	Efecto de la adición de distintas concentraciones de AEA comercial y sus componentes mayoritarios sobre el crecimiento de <i>Penicillium</i> sp.....	62
11	Clasificación de antifúngicos según su estructura y mecanismo de acción.....	64

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Proceso del análisis microbiológico para bacterias mesófilas aerobias en las tortillas almacenadas a 5°C.....	35
2	Proceso del análisis microbiológico para hongos y levaduras en las tortillas de maíz almacenadas a 5 °C.....	37
3	Apariencia de las bolsas control(C), extrusión (E) y recubrimiento (R), utilizadas en el presente trabajo.....	41
4	(A) Aislamiento de bacterias presentes en tortilla de maíz en medio Plate Count. (B) Tinción Gram de bacteria aislada. Siembra en medios selectivos (C) diferencial EMB y (D) MacConkey.....	44
5	Hongos aislados de tortillas compradas en 4 zonas de la ciudad de Hermosillo Sonora. A) Norte, B) Sur, E) Este y D) Oeste.....	45
6	Tinción con azul de lactofenol en hongos obtenidos de muestras de tortillas de las cuatro zonas muestreadas en la ciudad de Hermosillo, Sonora. A) Norte, B) Sur, E) Este, y D) Oeste.....	47
7	<i>Aspergillus niger</i> proporcionado por el laboratorio de Biotecnología Vegetal y Post cosecha de CIAD. A) <i>Aspergillus niger</i> aislado en PDA y B) <i>Aspergillus niger</i> teñido con azul de lactofenol.....	48
8	A) <i>Aspergillus niger</i> aislado en PDA y B) <i>Aspergillus niger</i> en solución salina a 10X.....	48
9	A) <i>Penicillium</i> sp aislado de tortilla de maíz en medio PDA B) <i>Penicillium</i> sp con azul de lactofenol en microscopio óptico.....	49
10	A) Características morfológicas de <i>Penicillium</i> sp en PDA, B) Características microscópicas de <i>Penicillium</i> sp en tinción con azul de lactofenol .....	50
11	Características microscópicas de A) <i>Penicillium sclerotiorum</i> ; B) <i>Penicillium melinii</i> ; C) <i>Penicillium oxalicum</i> . Escala 30 µm.....	54



## LISTA DE FIGURAS (Continuación)

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
12	Curva de crecimiento UFC/mL de <i>Escherichia coli</i> durante 9 h a 37°C a partir de un inóculo de 1.12E6 UFC/mL.....	53
13	Absorbancia de <i>Escherichia coli</i> durante su desarrollo en caldo nutritivo durante 9 h a 37°C.....	54
14	Concentración mínima necesaria de los componentes del AEA que inhibió el crecimiento visible de <i>Escherichia coli</i> en cada placa de medio MacConkey incubada por 2 d a 37°C.....	56
15	Membrana de bacteria Gram negativa. 1) Membrana interna, 2) Periplasma, 3) Membrana externa, 4) Fosfolípido, 5) Peptidoglicano, 6) Lipoproteína.....	57
16	Membrana de bacteria Gram positiva. 1) Membrana citoplasmática, 2) Peptidoglicano, 3) Fosfolípido, 4) Proteínas, 5) Ácido lopoteicoico.....	58
17	Compuestos mayoritarios en el AEA ( <i>Citrus aurantium</i> ).....	65
18	Estructuras químicas de los componentes principales de la pared y membrana fúngica.....	66
19	Tortillas envasadas en Envases C, E y R después de 16 d de almacenamiento a 5°C.....	67
20	Efecto del AEA sobre el crecimiento de bacterias mesófilas aerobias durante 25 d de almacenamiento a 5°C.....	68
21	Efecto del AEA sobre el crecimiento de hongos y levaduras durante 25 d de almacenamiento a 5°C.....	69
22	Aceptabilidad sensorial de tortillas envasadas en envase activo E y R.....	74

## RESUMEN

La tortilla de maíz es un alimento básico en México que tiene una actividad de agua de 0.98, humedad de 45-50% y nutrientes suficientes que hacen de ésta el medio ideal para la proliferación de microorganismos (Rooney y Serna, 2016). Este tipo de deterioro causa alteraciones negativas en la calidad sanitaria. Lo anterior aunado a falta de buenas prácticas de manufactura, ocasionan que la vida de anaquel de la tortilla sea entre 8 y 16 d en refrigeración. El objetivo de la presente tesis fue evaluar la capacidad antimicrobiana de envases activos con aceite esencial de azahar (AEA) fabricados por dos procesos y su efecto en la vida de anaquel de las tortillas de maíz adquiridas en un comercio local.

Los microorganismos identificados en la tortilla de maíz fueron *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* y *Penicillium sp.* Se evaluó la concentración mínima inhibitoria (CMI) del AEA frente a *Escherichia coli* (1.12E6 UFC), *Aspergillus niger* (100,000 conidias) y *Penicillium sp* (100,000 conidias) la cual fue de 12.5, 85.0 y 85.0 mg/mL, respectivamente. Estos datos se emplearon para el diseño y elaboración de los dos envases activos: envase activo por el proceso de extrusión (E) y envase activo por el proceso de recubrimiento (R). Una vez fabricados, se envasaron tortillas en cada tipo de envase y un control (sin AEA) por 25 d a 5°C, encontrando que la concentración de bacterias mesófilas aerobias y hongos y levaduras en las tortillas de los envases activos se redujo significativamente respecto a las cuantificadas en las tortillas del envase control ( $p \leq 0.05$ ). La vida de anaquel de las tortillas de maíz en los envases activos se extendió en un 53 y 66%, respecto al control y tuvieron una aceptabilidad para olor y sabor mayor o igual al 80 y 38%, respectivamente. Por todo lo anterior se infiere que la adición de AEA en un envase activo es una alternativa para preservar la calidad de alimentos como la tortilla de maíz.

**Palabras clave:** Tortilla de maíz, aceite esencial de azahar, envase activo antimicrobiano, vida de anaquel.

## ABSTRACT

Corn tortilla is a staple food in Mexico. This food has a water activity of 0.98, moisture of 45-50% and nutrients that makes it the ideal media for proliferation of microorganisms (Rooney and Serna 2016). This deterioration causes negative alterations in sanitary quality. All these, combined with absence of good manufacturing practices cause a limited shelf life of tortillas (8-16 d). The objective of this thesis was to evaluate the antimicrobial capacity of active containers added with orange blossom essential oil (OBEO), and its effect on the shelf life of corn tortillas.

The microorganisms identified in the corn tortilla were *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* and *Penicillium sp.* The minimum inhibitory concentration (MIC) of the OBEO against *Escherichia coli* (1.12E6 CFU), *Aspergillus niger* (100,000 conidia) and *Penicillium sp* (100,000 conidia) was evaluated, which was 12.5, 85.0 y 85.0 mg/mL, respectively. The MIC data were used for the design of the active packaging. Two films were produced by extrusion (E) and coating (R) fabrication processes. Tortillas were packed in pouches manufactured with the films E and R, plus a control without OBEO (C) and stored for 25 days at 5°C. The concentration of aerobic mesophilic bacteria and molds and yeasts in the tortillas of the active containers was significantly reduced ( $p \leq 0.05$ ) in relation to the CFU/g quantified in the tortilla packed in the control pouches. The shelf life of tortillas in the active containers was extended by 53 and 66%, compared to those packed in the control. Tortillas packed in the active containers showed acceptability at consumer label, for smell and taste, equal or greater than 80 and 38%, respectively. In conclusion, the addition of OBEO to a bilayer container is an alternative to produce antimicrobial films, which in the shape of pouches are able to preserve the quality of foods such as corn tortillas.

**Keywords:** Corn tortilla, orange blossom essential oil, antimicrobial container, shelf life.

## 1 INTRODUCCIÓN

La tortilla de maíz es un alimento básico en México y América Central. Cerca del 72% de la producción de granos de maíz en México es empleado en la elaboración de tortillas y sus derivados, esto refiere un aumento de 72% al 87% en producción de grano de maíz para consumo humano en el periodo 2014-2017 (SAGARPA, 2017). Rooney y Serna (2016), reportaron que cada habitante en México consume 85 kg de tortilla de maíz anualmente. Sin embargo, esta cifra puede ser distinta según la zona geográfica ya que en algunos lugares se consume hasta 125 kg de tortilla de maíz por persona cada año. Las características propias de la tortilla como  $a_w$  (actividad de agua) de 0.98, porcentaje de humedad de 45-50%, prácticas de manufactura inadecuadas y tipo de envasado, son factores que pueden promover la proliferación de microorganismos como hongos y bacterias (Johnson *et al.*, 1980). La proliferación de bacterias y hongos en los alimentos causan alteraciones negativas sobre los indicadores de calidad del mismo tales como color, sabor, apariencia y pH. En la industria alimentaria se ha empleado el uso de conservadores (sorbato de potasio y propionato de sodio, entre otros) para evitar el desarrollo de microorganismos. Sin embargo, una ingesta elevada de estos compuestos podría tener efectos adversos a la salud (Vivas, 2008) Además, afectan las propiedades físicas y organolépticas como el color, olor y sabor de los alimentos a los que se les adicionan estos conservadores. En los últimos años ha aumentado la investigación en el tema de actividad antimicrobiana de los extractos naturales, los cuales revelan que gran variedad de extractos de hojas, tallos y frutos presentan actividad antimicrobiana contra distintos microorganismos (Palacios *et al.*, 2009; Caval *et al.*, 2012). Debido a la actividad antimicrobiana en los extractos naturales revelada en los estudios anteriores, se incentivó la búsqueda de la posible aplicación en el área de alimentos ya que estos extractos de origen vegetal son naturales y en la industria alimentaria se buscan productos mínimamente procesados y lo más natural posible. Por otro lado, se han realizado investigaciones sobre el uso de aceites esenciales (AE) para inhibir la proliferación de microorganismos. Tal es el caso del aceite esencial de azahar (AEA) extraído de la flor de naranjo agrio el cual ha sido evaluado por poseer propiedades antioxidantes y antimicrobianas, ya que en su composición contiene componentes terpénicos (linalool, acetato de linalilo, limoneno y  $\alpha$ -terpineol), los cuales según la literatura tienen actividad antimicrobiana (Wolffenbüttel *et al.*, 2018).

En la industria alimentaria existen diversas tecnologías para incorporar aditivos a alimentos, una de ellas es por medio del sistema de envase. En las primeras tecnologías de envases activos, los aditivos se agregaban en una pequeña bolsa, compartimento o sobre que contenía el aditivo, tal es el caso del sílica gel que aún se agrega a distintos productos para protegerlos de la humedad. Posteriormente, se desarrolló la incorporación de los aditivos como parte de la formulación del plástico que conformaba el envase. Una de las ventajas de añadir aditivos al material del envase es que los aditivos se difunden desde éste hacia el alimento por el fenómeno de migración, lo que permite que el aditivo no alcance altas concentraciones como sucede con los aditivos agregados directamente al alimento, evitando que el alimento cambie drásticamente sus características físicas, químicas y sensoriales (Catalá y Gavara, 2001).

Recientemente se han desarrollado dos materiales de envase a los que se les ha incorporado AEA utilizando diferentes tipos de procesamiento (López-Ortiz, 2019). Como parte del mismo proyecto, el objetivo de la presente tesis fue evaluar la capacidad antimicrobiana de los envases activos incorporados con AEA (*Citrus aurantium*) y su efecto en la vida de anaquel de tortilla de maíz almacenada a 5°C.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Maíz en México

#### 2.1.1 Tortilla de Maíz y su Importancia en México

El maíz (*Zea mays*) forma parte de los principales cereales junto con el trigo (*Triticum vulgare*), cebada (*Hordeum vulgare*), arroz (*Oryza sativa*), centeno (*Secale cereale*), mijo (*Panicum miliaceum*) y avena (*Avena sativa*), los cuales son empleados en diferentes culturas para la elaboración de distintos productos básicos. El maíz es ampliamente consumido en México en sus diferentes especialidades, principalmente la tortilla de maíz, siendo ésta la base de distintos platillos típicos (Cuevas, 2014). Este grano es fundamental en la mesa de los mexicanos, además de tener un buen sabor y diversas utilidades. Éste presume una variedad de nutrientes que forman la base de la dieta diaria. El maíz está conformado morfológicamente por el pericarpio, endospermo y el germen. En cada una de estas secciones se encuentran los responsables de sus características nutrimentales y dependiendo de lo que se requiera en el producto final será el proceso de elaboración que llevará el grano (González *et al.*, 2016).

La tortilla de maíz es un alimento básico en México y América central, por lo que no es extraño que México se encuentre dentro de los primeros diez productores de este grano. Cerca del 72% de la producción de granos en México es empleado en la elaboración de tortillas y sus derivados. La industria de la tortilla es una de las cuatro industrias de mayor importancia en México representando 0.90% del producto interno bruto (SAGARPA, 2017). Rooney y Serna. (2016), estimaron que cada habitante en México consume 85 kg de tortilla de maíz anualmente. Sin embargo, esta cifra puede ser distinta según la zona geográfica de estudio y en algunos lugares su consumo alcanza hasta 125 kg de tortilla de maíz por persona cada año.

### 2.1.2 Elaboración y Envasado de la Tortilla de Maíz

La tortilla de maíz se elabora por dos métodos: tradicional e industrial. El primer paso del método tradicional llamado nixtamalización, consiste en sumergir el grano de maíz en una solución de hidróxido de calcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) por un lapso de 8 a 16 h, después de ello se procede a la molienda en un molinillo de piedra. Del proceso anterior se obtiene la masa y manualmente se elabora la forma redonda de la tortilla de maíz, posteriormente se coloca en un comal caliente hasta que ya está lista para su consumo. El segundo método es el automatizado, aquí es donde se utiliza una fracción de harina de maíz comercial y otra fracción de nixtamal previamente tratado. En este caso el maíz es remojado durante 8 a 16 h en una solución de hidróxido de calcio ( $\text{Ca}(\text{OH}_2)$ ) a  $70^\circ\text{C}$ , se mezcla una fracción de harina de maíz y otra fracción de nixtamal, toda la mezcla se coloca en la zona de alimentación del equipo y posteriormente sale la tortilla de maíz ya lista para consumir (Rooney y Serna, 2016).

Durante la nixtamalización ocurre una redistribución de almidón soluble, gránulos y almidón pregelatinizado (Salinas Moreno *et al.*, 2003). El cambio que atraviesa la mezcla de maíz es debido a la fricción que se da en cada grano y se da tanto en la molienda tradicional como en la molienda en máquinas industriales. En el primero se observa al moler manualmente cada grano y en el segundo cuando se procesa en la máquina industrial. La masa preparada adquiere propiedades viscosas y adhesivas debido a la retrogradación del almidón que contiene el grano de maíz, esto sucede cuando se libera la amilosa y amilopectina, las cuales forman parte del almidón (Rooney y Serna, 2016; Weber, 2008). Cada molécula de amilosa se reordena en cadenas lineales de manera paralela uniéndose al agua mediante de puentes de hidrógeno mientras que la amilopectina queda inerte en el medio. Debido al comportamiento y composición del grano de maíz, la masa se mantiene unida en una sola fase por lo que pueden someterse a un proceso continuo a nivel industrial, teniendo como producto final, la tortilla de maíz (González, 2016).

La tortilla de maíz se envasa en distintos materiales de envase. A gran escala, la tortilla industrializada en tiendas a mayoreo es envasada en bolsas de polietileno de alta densidad (PEAD) o papel blanco grado alimenticio con alta porosidad y resistencia a la humedad al que pueden agregar rótulos. Tanto el papel como las tintas de impresión deben ser grado alimenticio (NOM-187-SSA1/SCFI-2002). En el caso de la tortilla elaborada en mini empresas como “tortillerías”,

envasan el producto en bolsas de PEAD, polietileno de baja densidad (PEBD) o papel, generalmente tipo kraft. Por el contrario, cuando se trata de tortillas caseras se puede notar que se conservan en servilletas de tela o recipientes especiales llamados tortilleras. Las características físicas y químicas de la tortilla así como el tipo de procesamiento, envasado y almacenamiento influyen en el crecimiento de microorganismos presentes provocando una limitada vida de anaquel (Martínez-Flores *et al.*, 2004). Todo lo anterior incentiva la búsqueda de la principal causa de deterioro de este alimento y de qué manera se puede contribuir a alargar la vida de anaquel de la tortilla de maíz.

## 2.2 Causas de Deterioro de la Tortilla de Maíz

Los atributos de calidad en la tortilla son, textura, enrollabilidad y sabor (Soriano *et al.*, 2016). Existen diversos factores o causas que ocasionan que la tortilla se deteriore, entre los que destacan la pérdida de humedad y el desarrollo de microorganismos. La luz, incremento de temperatura y presencia de oxígeno causan que la velocidad de las reacciones de oxidación de las grasas (rancidez) incremente, generando olores y sabores desagradables. La temperatura y el oxígeno provocan cambios en la velocidad de crecimiento de bacterias mesófilas aerobias, las cuales pueden desarrollarse en diversos alimentos, y aunque su límite no se encuentra estipulado para la tortilla de maíz, en la NOM-247-SSA1-2008 se reporta su límite máximo para alimentos elaborados a base de cereales como el maíz, razones por las cuales se debe monitorear la concentración de éstos en la tortilla de maíz.

Conociendo las causas de deterioro que afectan la calidad del alimento, se evalúan alternativas que incentivan o contribuyan a disminuir que estos factores limiten la vida de anaquel del producto.

La tortilla de maíz al poseer una alta actividad de agua (0.98) y humedad alrededor de 45% (Martínez-Flores *et al.*, 2004), contiene diversos componentes que generan un ambiente adecuado para el desarrollo de microorganismos, principalmente hongos y bacterias. Diversos autores reportan diferente vida de anaquel para tortillas de maíz. Martínez-Flores *et al.* (2004) reportaron que debido a sus propiedades, proceso de elaboración y envasado, las tortillas de maíz tienen una



vida media de anaquel de 8 d a en refrigeración y ésta puede variar según la temperatura a la cual se almacenen (López-Ortiz, 2019). No existen muchos estudios que reporten la concentración de microorganismos en la tortilla de maíz. Sin embargo, Martínez-Flores *et al.* (2004), realizaron un estudio donde evaluaron la vida de anaquel midiendo el crecimiento de hongos y bacterias como principal factor de deterioro. Estos autores reportaron que a 4 °C, la tortilla alcanzó una vida media de 8 d mientras que a 22 °C la vida de anaquel fue de 3 d. Siendo la proliferación de microorganismos la principal causa de la disminución de la vida de anaquel en la tortilla de maíz, se podría emplear un agente antimicrobiano de origen natural que impida el desarrollo de estos microorganismos manteniendo la calidad de este alimento por un tiempo prolongado.

### **2.2.1 Microorganismos Deteriorativos en la Tortilla de Maíz**

Una tortilla de calidad es aquella que conserva buen aspecto a la vista, consistencia, buen sabor y olor (Rangel-Meza *et al.*, 2004; Weber., 2008). Al evaluar la calidad e inocuidad de la tortilla hay muy pocos reportes que incluyan a microorganismos deteriorativos como responsables de pérdida de calidad sanitaria y por tanto causantes de limitar la vida de anaquel (Gómez-Aldapa *et al.*, 2013). Es importante evaluar e identificar a los microorganismos responsables del deterioro de este alimento. Se ha reportado la identificación de diversos microorganismos relacionados al deterioro de la tortilla de maíz entre ellos *Escherichia coli*, *Pseudomona aureaginosa*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus* (Flores-Chávez *et al.*, 2002; Martínez-Padrón *et al.*, 2013). Los microorganismos antes mencionados empiezan a proliferar en la tortilla a partir de 8 h posteriores a su fabricación en condiciones normales de almacenamiento (25-30 °C). Sin embargo, en otros estudios se ha reportado el desarrollo microbiano 3 h posteriores a la elaboración de la tortilla de maíz (Martínez-Flores *et al.*, 2004). Debido a que no se ha estudiado ampliamente el desarrollo de microorganismos deteriorativos en la vida de anaquel de la tortilla no es posible hacer comparaciones sobre las poblaciones de microorganismos que se desarrollan en tortilla de diferentes establecimientos o fábricas. Lo que se conoce es que el desarrollo de microorganismos en la tortilla limita su vida de anaquel, pero aún se necesita más evidencia que corrobore lo ya publicado.

## 2.2.2 Uso de Conservadores en la Tortilla de Maíz

La industria alimentaria demanda productos mínimamente procesados y procura mantenerse a la vanguardia, lo que incentiva la investigación de alternativas para preservar la calidad de sus productos por un tiempo prolongado. Se ha empleado la adición de conservadores comerciales como lo son sorbato y propionatos, modificando el pH del alimento para evitar el desarrollo de hongos y bacterias. La adición de estos compuestos químicos comprometen las características de calidad de los alimentos y un consumo elevado de estos conservadores podrían repercutir sobre la salud de quien los consume. Los principales conservadores en la industria tortillera de maíz son el propionato de sodio, hidróxido de calcio, sorbato de potasio y sorbitol, su adición en la tortilla modifica sus características como sabor y textura, además su adición está estandarizada en la Norma Oficial Mexicana NOM-187-SSA1/SCFI-2002.

Martínez-Flores *et al.* (2004), evaluaron la adición de distintos conservadores a la tortilla de maíz (Cuadro 1). Al evaluar por separado la adición de propionato de sodio al 0.30% o de Hidróxido de Calcio al 0.30% la vida de anaquel fue de 12 d a 4°C. Los autores observaron que hacer combinaciones de conservadores de 0.30% Propionato de Sodio + 0.15% Propil parabeno + 0.125% Sorbato de Potasio y 0.30% Propionato de Sodio + 0.10% Ácido Fumárico + 0.125% Sorbato de Potasio en conjunto aumentaron la vida de anaquel hasta 16 d, por lo que el añadir más de un aditivo como conservador tuvo un efecto sinérgico en la vida de anaquel. Sin embargo, en el estudio de Martínez-Flores *et al.* (2004) no se evaluaron las propiedades sensoriales del alimento por lo que no se pudo determinar si los tratamientos anteriores serían convenientes desde el punto de vista sensorial.

Flores-Farías *et al.* (2002), evaluaron la concentración de conservadores presentes en harinas comerciales que se emplean para la elaboración de tortillas de maíz. Reportaron que la harina marca MASECA contenía 4 g de sorbato de potasio por kg de tortilla de maíz, concentración que sobrepasa el límite estipulado (2 g/kg) en la NOM-187-SSA1/SCFI-2002. La ingesta continua de este conservador podría repercutir en el bienestar físico de quien lo consuma (Vivas, 2008). Debido a las repercusiones de salud que se pudieran tener al consumir tortillas de maíz o cualquier otro alimento que contenga conservadores en alta concentración, se han investigado otros compuestos de origen natural que pudieran tener el mismo efecto antimicrobiano y al mismo tiempo extendieran

la vida de anaquel de alimentos incluyendo la tortilla de maíz (López-Ortiz, 2016; Higuera-Barraza *et al.*, 2015).

**Cuadro 1.** Evaluación de conservadores en la tortilla de maíz y su vida de anaquel.

	Vida media(días)	
	22°C	4°C
Control sin aditivos	3	8
0.30 % Propionato de Sodio	3	12
0.125 % Sorbato de Potasio	3	12
0.30 % Hidróxido de Calcio	3	12
0.10% Propilparabeno	3	12
0.30% Propionato de Sodio+0.10% Propilparabeno	3	12
0.30% Propionato de Sodio+0.10% Propilparabeno+0.105 de Ácido Fumárico	3	12
0.15% Propionato de Sodio+0.05% Propilparabeno+0.10% Ácido Fumárico	3	12
0.30% Propionato de Sodio+0.15 Propilparabeno+0.125% Sorbato de Potasio	6	16
0.30% Propionato de Sodio+0.10% Ácido fumárico+0.125 % Sorbato de Potasio	6	16

Martínez-Flores *et al.* (2004).

### 2.2.3 Aditivos en la Industria Alimentaria

Según la norma general del Codex Alimentarius, un aditivo alimentario es cualquier compuesto que generalmente no aporta valor nutricional al alimento, sino que cumple una función determinada en el alimento al que se adiciona (Carballo-Herrera *et al.*, 2012). En la industria se emplean distintos tipos de aditivos alimentarios para mejorar las características propias de los alimentos (Cuadro 2). Actualmente se buscan compuestos que cumplan la función de estos aditivos alimentarios pero que sean de origen natural y sean más amigables con el medio ambiente.

**Cuadro 2.** Función y aplicación de distintos tipos de aditivos alimentarios

<b>Función</b>	<b>Aditivo alimentario</b>	<b>Aplicación</b>
Colorantes	Curcumina Carotenoides	Color amarillo Bebidas refrescantes
Conservadores	Ácido sórbico Sorbatos Propionatos Ácido láctico	Pan envasado y bollería Se adicionan a harinas previo a la elaboración de tortillas de maíz
Antioxidantes	Butil-hidroxi-anisol Ácido láctico	Protege a las grasas que se encuentran en productos de repostería Coadyuvante de antioxidante. Regula la acidez en mermeladas.
Texturizantes	Carragenatos	Mantienen la estabilidad de diversos embutidos como las salchichas o jamones.
Potenciadores de sabor	Maltol	Se emplea para potenciar el sabor dulce en los alimentos.

Martínez-Flores *et al.* (2004); Ibáñez *et al.* (2003).

## 2.3 Los Aceites Esenciales

### 2.3.1 Aceite Esencial de Azahar (AEA) *Citrus aurantium* y sus Propiedades Antimicrobianas

Los AE son compuestos volátiles que se obtienen de tejidos de flores, tallos, frutos y hojas, confiriéndole aroma a los productos que los contengan, por lo que se han aplicado en fragancias, productos de limpieza y cosméticos. Los AE tienen la característica de estar conformados por grupos éteres, cetonas, alcoholes y aldehídos. Estos AE se extraen por el método de arrastre con vapor, hidrodestilación, prensado en frío, entre otros, debido a su volatilidad (Cos *et al.*, 2008; Trabelsi *et al.*, 2016). Químicamente los aceites esenciales se pueden clasificar según el compuesto mayoritario que lo compone. Por ejemplo, aquellos aceites que tienen mayoritariamente

compuestos monoterpenos son llamados aceites monoterpenoides (aceite de salvia, albahaca, entre otros), aquellos aceites que tienen sesquiterpenos en mayoría se llaman aceites sesquiterpenoides (aceite esencial de pino, copaiba, etc.), y finalmente aquellos aceites que contienen en mayoría fenilpropanos se llaman aceites fenilpropanoides (clavo, anís, etc.) (Martínez, 1996). Diversas plantas como eucalipto, clavo de olor, manzanilla, ajo, entre muchas otras, han sido utilizadas por sus propiedades medicinales y por sus propiedades antisépticas, antioxidantes y recientemente por su propiedad antimicrobiana (Cuadro 3), aunque también se ha reportado su uso como insecticida (Hernández *et al*, 2007). Por ejemplo Alzamora *et al*. (2001), realizaron un ensayo *in vitro* donde se evaluó de manera cualitativa el efecto del aceite esencial de *Eucalyptus globulu Labill*, *Anís serrano*, *Lepechinia meyenii* frente a diversas bacterias entre ellas *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *S. typhimurium*. En este trabajo obtuvieron mayor inhibición sobre las bacterias Gram-positivas que las bacterias Gram-negativas como es el caso de *P. aeruginosa* ya que posee una membrana celular externa con mayor carácter hidrófobo. Mientras que Palacios *et al*. (2009), evaluaron la actividad anti fúngica *in vitro* de *Piper tuberculatum Jacq* contra *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* y *M. gypseum*. Los autores obtuvieron extractos por arrastre con vapor, diclorometano y metanol. En este caso se midió el porcentaje de inhibición del extracto, obteniendo más del 90% de inhibición para cada uno de los tres hongos.

**Cuadro 3.** Aceites esenciales con actividad antimicrobiana.

<b>Aceite esencial</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Inhibición</b>	<b>Referencia</b>
Aceite esencial de canela	<i>Aspergillus flavus</i>	Fuerte	García-Camarillo <i>et al</i> . (2006)
<i>Chloroxylon swietenia</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Salmonella typhi</i>	Moderada a fuerte	Ravi-Kiran <i>et al</i> . (2008)
<i>Eucalyptus globulu Labill</i> , <i>Cymbopogon citratus</i> , <i>Anís serrano</i> .	<i>S. typhimurium</i> <i>S. enteritidis</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>P. aeruginosa</i>	Moderada a fuerte	Alzamora <i>et al</i> . (2001)
Limón ( <i>Citrus lemon</i> )	<i>Bacillus cereus</i> <i>Escherichia coli</i>	Fuerte	Tserennadmid <i>et al</i> . (2010).

Por otra parte el árbol de naranjo agrio es un árbol de ornato presente en la ciudad de Hermosillo, Sonora. Se estima que la frecuencia de este árbol en la ciudad se acerca al 20% en las aceras de toda la ciudad (Navarro-Navarro *et al.*, 2016). De la flor de este árbol se extrae el AEA por medio de arrastre con vapor. En el cuadro 4 se muestra la composición del AEA reportada por diversos autores donde se observa que los compuestos en mayor concentración son el limoneno, linalool, acetato de linalilo y  $\alpha$ -terpineol. El AEA y sus componentes mayoritarios han sido evaluados *in vitro* para evidenciar su potencial antimicrobiano.

**Cuadro 4.** Porcentaje de componentes activos en el AEA (*Citrus aurantium*).

	<b>Boussaada y Chemli. (2007)</b>	<b>Wolffe nbütte l <i>et al.</i> (2018)</b>	<b>Zarrad <i>et al.</i> (2015)</b>	<b>Metoui <i>et al.</i> (2015)</b>	<b>Rahimi <i>et al.</i> (2014)</b>	<b>Sherif <i>et al.</i> (2015).</b>
$\alpha$ -pineno	-	0.30	0.56	0.69	0.09	0.70
Camfeno	-	-	0.01	-	-	-
$\beta$ -pineno	-	2.20	0.45	0.22	2.75	0.93
Sabineno	-	0.10	0.17	-	0.25	0.12
$\alpha$ -felandrieno	-	0.10	-	-	-	-
$\beta$ -felandrieno	-	-	-	-	-	-
limoneno	87.00-92.20	2.60	87.52	5.28	9.25	0.47
Citronellal	-	-	0.01	-	-	-
Acetato de linalilo	33.20-41.60	28.00	-	32.1	-	13.09
Linalool	23.20-32.20	22.40	3.36	39.30	26.19	49.90
Terpinen-4-ol	-	0.10	0.17	0.94	0.21	0.02
$\alpha$ -terpineol	7.30-9.00	-	0.92	10.8	-	8.81
Geraniol	4.90-6.40	-	0.22	2.04	-	4.69
Acetato de geraniol	4.50-6.40	6.90	0.19	-	6.95	4.49
$\beta$ -mirceno	-	-	-	-	14.31	-
Acetato de nerilo	-	4.10	0.04	-	4.36	2.18

El AEA se ha evaluado *in vitro* con diversos microorganismos. Hsouna y Hamdi. (2012), evaluaron el efecto del aceite esencial contra *Escherichia coli* y *P. aeruginosa* donde reportaron la CMI de  $1.25\pm 0.5$  mg/mL para *Escherichia coli*; mientras que para *P. aeruginosa* fue de  $2.5\pm 1.0$  mg/mL. Metoui *et al.* (2015), realizaron un análisis *in vitro* para conocer el porcentaje de inhibición del AEA contra *F. oxysporum*, *B. sorokiniana*, *B. cinerea* y *F. solani*. Se aplicaron dos concentraciones de aceite esencial a 2 y 4 uL/mL. Posterior a esto se midió el halo de crecimiento en cada placa y se comparó con un control. Se obtuvieron diámetros de crecimiento fúngico entre los  $6.5\pm 0.14$ mm y  $9.25\pm 0.35$ mm. En este trabajo encontraron mayor inhibición a una concentración de 4 uL/mL con un porcentaje de inhibición mayor al 75% con halos que oscilaron entre  $1.20\pm 0.14$ mm y  $1.65\pm 0.07$  mm.

Caval *et al.* (2012), evaluaron la actividad antifúngica de distintos extractos incluido el extraído del fruto *Citrus aurantium* frente a *Candida albicans* ATCC289065 por el método de difusión en disco. Los autores reportaron que después de incubar por 24 h a 37 °C se encontró efecto antimicótico. Los principales compuestos del fruto *Citrus aurantium* son el limoneno y mirceno los cuales fueron los responsables de la actividad antifúngica en este estudio. Sin embargo, los aceites esenciales extraídos de otras secciones del árbol *Citrus aurantium* como las hojas o flores difieren en la proporción de los compuestos activos y por tanto el efecto antimicrobiano también es distinto.

Hernández-Albíter *et al.* (2007) evaluaron el potencial efecto antifúngico de extractos de hojas de naranjo agrio frente a hongos del género *Colletotrichum sp.* En el estudio los autores evaluaron el porcentaje de germinación de esporas de estos hongos. Después de incubar a *Colletotrichum sp* por 14 h a 25°C la cantidad de esporas germinadas se disminuyeron en un 61%. Esto mostró el potencial efecto antifúngico de los compuestos activos en las hojas del árbol de naranjo agrio que son el acetato de linalilo,  $\alpha$ -terpineol, y acetato de geraniol, componentes que en conjunto generan este efecto (Azhdarzadeh y Hojjati, 2016).

Por otro lado, Scamarone (2018) evaluó la capacidad antibacteriana del extracto etanólico del epicarpio de *Citrus aurantium* y otros extractos frente a *Staphylococcus aureus* comparando sus resultados con Oxacilina, un antibiótico comercial. El autor realizó la técnica de difusión en agar evaluando la actividad de 50  $\mu$ L del extracto a una concentración de 100%, 75% y 25%. También reportó que la concentración más elevada (extracto al 100%) presentó mayor inhibición, pero al

compararlo con el antibiótico comercial se determinó mayor efecto por 10 µg de Oxacilina. El autor concluyó que el extracto etanólico de *Citrus aurantium* presentó actividad antibacteriana. López-Ortiz (2016), evaluó el efecto de la adición de AEA al 1% en la masa previo a la elaboración de la tortilla de maíz. Las tortillas fueron almacenadas a 5 y 25°C durante 4 semanas. Para determinar la vida de anaquel se midió la concentración de bacterias mesófilas aerobias (BMA), hongos y levaduras. Finalmente, se reportó que la vida de anaquel a 25°C incrementó de 2 a 4.5 d mientras que en las tortillas almacenadas a 5°C aumentó de 16 a 27 d con respecto al control. Por lo que es posible emplear el AEA como aditivo antimicrobiano de manera directa. Otra alternativa para agregar aditivos a los alimentos es de manera indirecta, por medio de envases procesados con el extracto. Esta adición se realiza con el uso de tecnologías de procesamiento de envases.

### **2.3.2 Mecanismo de Acción de Compuestos Activos en el Aceite Esencial de Azahar (*Citrus aurantium*)**

El mecanismo de acción de los aceites esenciales no está definido por ahora. Sin embargo, diversos estudios han reportado hipótesis acerca de cómo actúa el AE contra los microorganismos. Maguna *et al.* (2006), propusieron un mecanismo de acción en el que describen que debido a la naturaleza de los terpenos y su bajo peso molecular pueden introducirse en la membrana celular e interactuar con moléculas membranales generando microporos que causan un intercambio iónico descontrolado, lo que provoca inestabilidad y alta permeabilidad membranal que lleva al microorganismo a apoptosis. Por otro lado, Avello-Lorca *et al.* (2012), propusieron un mecanismo similar para el caso de hongos, donde moléculas específicas que se encuentran en los AE (linalool,  $\alpha$ -terpineol, etc.) estarían interactuando directamente con el ergosterol, el cual se encarga de la estabilidad membranal fúngica y al intervenir en su estabilidad, la célula pierde viabilidad finalizando en lisis celular. Hasta el momento aún existen incógnitas sobre el mecanismo de acción de los AE, sin embargo, se tiene la certeza de su efectividad como agente antimicrobiano y su posible aplicación en el área de envases.



## 2.4 Envases Activos

### 2.4.1 Envases Activos Antimicrobianos

Según la European Commission (2009), un envase activo es aquel envase que contiene distintos aditivos los cuales ejercen alguna propiedad que permite la mejora del alimento. Existen distintos tipos de envases activos, como puede ser los envases antioxidantes, antimicrobianos, captadores de oxígeno o liberadores de etileno. La adición de antioxidantes a envases alimentarios por medio de compuestos naturales como extracto de orégano, menta u hojas de cacao han tenido resultados favorables. La adición de estos compuestos inhibe la oxidación de lípidos en productos cárnicos y le confiere capacidad antioxidante. Se ha encontrado que algunas moléculas antioxidantes de naturaleza polifenólica poseen también actividad antimicrobiana, razón por la cual se investiga actualmente el uso de compuestos naturales con propiedades antimicrobianas que puedan emplearse como conservadores en los alimentos (Valenzuela y Pérez, 2016; Naveena *et al.*, 2008). En la actualidad los envases de mayor relevancia han sido los envases activos antimicrobianos principalmente en la industria de productos hortofrutícolas, ya que estos productos provienen de zonas que tienen mayor contacto con posibles contaminantes como hongos y bacterias que pudieran encontrarse en los campos donde se cultivan (Catalá *et al.*, 2009). Aunque, no sólo estos alimentos requieren de conservadores para inhibir el crecimiento de microorganismos ya que la adición de éstos se encuentran en diversos productos de consumo diario.

Por ejemplo, *Pseudomona aeruginosa* es una bacteria que se puede encontrar en el pollo, el desarrollo de esta bacteria deteriora la calidad de este alimento y una alternativa para preservarlo puede ser la aplicación de compuestos naturales en su envasado. En un estudio elaborado por Higuera-Barraza *et al.* (2015), evaluaron el efecto de un envase activo antimicrobiano aditivado con eugenol a dos concentraciones. Este envase se probó contra *Pseudomona aeruginosa*, bacteria que se encuentra en el pollo. Se realizó un ensayo *in vitro* para evaluar el efecto de este envase antimicrobiano frente a la bacteria y reportaron que se redujo el crecimiento de la bacteria después 5 d a 5 °C. También reportaron que la CMI por el método de difusión en placa fue de 0.36 mg/mL para 1.0E8 UFC/mL. Lo que evidencia la efectividad de este tipo de compuestos que se encuentran en el aceite esencial de clavo y su potencial aplicación en el área de envases antimicrobianos.

Existen diversas maneras de añadir los AE en el envase alimentario, convencionalmente la adición de los aditivos se realiza directamente en la tolva del extrusor donde se mezcla junto con el polímero, aunque existen otras maneras de adicionar el aceite esencial al envase y puede ser en bolsitas con zeolita, recubrimiento por el proceso de aspersión o rodillo entre otros (Alarcón-García *et al.*, 2015; López-Rubio *et al.*, 2004). El proceso para aplicar los AE a los envases se determina de acuerdo a la naturaleza del aceite, las propiedades físicas y químicas que posee, así como también las características propias del polímero que se use. Consecuentemente, el desarrollo de envases antimicrobianos debe basarse en un diseño integral que considere la naturaleza de todos los componentes del sistema, polímero, aditivo, proceso de fabricación entre otros factores.

Alarcón-García *et al.* (2015), evaluaron dos procesos para la adición de aceites cítricos sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* en fresas frescas. El primer proceso fue la elaboración de esferas con alginato y gelatina al 2% y la segunda fue un barniz con grenetina al 4%. Evaluaron el efecto *in vitro* del aceite de naranja, limón y la mezcla de ambos a tres concentraciones 9,000, 10,000 y 11,000 ppm. Reportaron que el aceite esencial con actividad antifúngica fue el aceite de limón inhibiendo 100% el crecimiento fúngico en las tres concentraciones empleadas. Para evaluar la inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea* emplearon dos prototipos de envases activos y reportaron que el envase con el barniz permitió el escape de vapor de agua causando que las fresas presentaran deshidratación lo que disminuyó la velocidad de crecimiento. Además, se realizaron pruebas *in vitro* utilizando 3 mL de barniz en la tapa de la caja Petri. Posteriormente, se inoculó cada placa y se midió el crecimiento micelial reportando el porcentaje de crecimiento. El envase con el barniz presentó menor presencia de la pudrición comparado con el envase activo con esferas desde el día 8 de almacenamiento.

Después de evaluar las propiedades antimicrobianas del AEA y la efectividad que mostró al agregarlo directamente a la masa de las tortillas de maíz (López-Ortiz, 2016), se propuso añadirlo al material de envase. López-Ortiz (2019), desarrolló un envase de doble capa PEAD/PEBD para tortillas de maíz donde la adición del AEA fue en la parte interna del envase. La efectividad del envase desarrollado mediante dos procesos diferentes, fue evaluada por diversos experimentos necesarios para probar la hipótesis que se presenta a continuación.

### 3 HIPÓTESIS

El envasado de la tortilla de maíz en envases de polietileno con aceite esencial de azahar (*Citrus aurantium*), disminuirá la velocidad de crecimiento de microorganismos presentes, prolongando su vida de anaquel.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Evaluar la capacidad antimicrobiana de envases activos con aceite esencial de azahar (*Citrus aurantium*) y su efecto en la vida de anaquel de la tortilla de maíz.

### 4.2. Objetivos Específicos

Identificar los principales microorganismos presentes en la tortilla de maíz, responsables de limitar su vida de anaquel.

Determinar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de azahar (*Citrus aurantium*) y sus componentes mayoritarios sobre los principales microorganismos presentes en la tortilla de maíz.

Evaluar el efecto de dos envases activos bicapa de PEBD/PEAD con aceite esencial de azahar (*Citrus aurantium*), uno elaborado por el proceso de extrusión y otro por el proceso de recubrimiento sobre la vida de anaquel de la tortilla de maíz.

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Materiales utilizados

Se analizaron tortillas de maíz fabricadas en tortillerías de 4 zonas de la ciudad de Hermosillo, Sonora. En estudio previo se fabricaron tres tipos de bolsas (18 x 14 cm, largo x ancho) de película bicapa de PEAD/PEAD con las características que se muestran en el cuadro 5. Envase elaborado por el proceso de extrusión sin ningún aditivo (C), envase elaborado por el proceso de extrusión con AEA (E) y envase elaborado por el proceso de extrusión-recubrimiento (R) (López-Ortiz, 2019).

**Cuadro 5.** Características de los envases con AEA, utilizados para tortillas de maíz.

	<b>Envase C</b>	<b>Envase E</b>	<b>Envase R</b>
Proceso de fabricación	Coextrusión PEAD y PEBD	Coextrusión PEAD y PEBD con AEA <sup>a</sup>	Coextrusión PEAD/PEBD + recubrimiento con AEA <sup>a</sup>
Espesor total (µm)	74.67 ± 21.84	73.15 ± 17.78	74.42 ± 18.54
Linalool (mg/g de película)	0.00 ± 0.00	3.19 ± 0.20	3.74 ± 12.23
Limoneno (mg/g de película)	0.00 ± 0.00	0.39 ± 0.81	0.82 ± 0.07
Acetato de linalilo (mg/g de película)	0.00 ± 0.00	1.78 ± 10.45	1.94 ± 0.35
α-terpineol (mg/g de película)	0.00 ± 0.00	2.82 ± 14.14	2.76 ± 0.87

López-Ortiz, 2019.<sup>a</sup> El AEA se aplicó en la capa de PEBD.

Los medios de cultivo utilizados fueron caldo nutritivo, agar nutritivo, agua peptonada, Plate Count (agar triptona extracto de levadura) todos de la marca Difco®. Agar eosina y azul de metileno

(EMB), MIO (movilidad, indol, ornitina), Citrato de Simmons, Rojo de Metilo y Voges-Proskauer de la marca Dibico®. Finalmente el medio MacConkey y agar papa dextrosa (PDA) de la marca Sigma®.

Se emplearon los estándares de linalool, acetato de linalilo, limoneno y  $\alpha$ -terpineol de la marca Sigma-Aldrich®, además de AEA comercial de la marca Just®.

Los microorganismos aislados de la tortilla de maíz comercial fueron *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* y *Penicillium sp.*

## 5.2 Aislamiento e Identificación de Principales Microorganismos Presentes en la Tortilla de Maíz

### 5.2.1 Muestreo de Tortillas de Maíz en la Ciudad de Hermosillo, Sonora

Se seleccionaron 4 tortillerías ubicadas en 4 diferentes zonas en la ciudad de Hermosillo, Sonora (Norte, Sur, Este y Oeste de la ciudad) adquiriendo 3 kg de tortillas de cada comercio. Se separaron al azar tres muestras de cada kg de tortilla de maíz, cada una de las muestras pesó 250 g colocándose en bolsas estériles a 25°C expuestas a la luz durante 15 d.

### 5.2.2 Aislamiento e Identificación de Bacterias en la Tortilla de Maíz

Una vez transcurridos los 15 días, el contenido de cada envase se trituró en una licuadora, pesando 10 g del triturado y se añadieron a 90 mL de buffer fosfato (NOM-110-SSA1-1994). Posteriormente se realizaron diluciones seriadas y a partir de éstas se tomó 1 mL de inóculo de cada uno, los cuáles se sembraron en medio de cultivo nutritivo por 24 h a 37 °C. Posterior a la incubación se seleccionaron 2-3 colonias con características morfológicas similares, las cuales se sembraron en agar nutritivo para obtener un cultivo puro. Así mismo, se realizó tinción Gram y siguiendo la NOM-210-SSA1-2014, la bacteria fue inoculada en el medio EMB y MacConkey

incubada a 37 °C por 48 h. Una vez inoculados en los medios de cultivos diferenciales, se realizaron las pruebas bioquímicas específicas para bacterias que dan positivo a la fermentación de lactosa en el medio EMB y MacConkey. Finalmente, se inocularon las pruebas bioquímicas del IMViC (Indol, Rojo de metilo, Voges Proskauer y Citrato) a 37 °C por 48 h siguiendo la norma mencionada anteriormente.

### **5.2.3 Aislamiento e Identificación de Hongos en la Tortilla de Maíz**

Se seleccionó cada uno de los hongos desarrollados en las tortillas, se inocularon en medio agar papa-dextrosa (PDA) e incubaron a 25°C por un lapso de 7 d. Cada aislamiento se resembró tres veces para evitar contaminación. Partiendo de una colonia pura se realizó una tinción con azul de lactofenol para lo cual se empleó la técnica de cinta adhesiva (Guédez *et al.*, 2010). Las muestras se observaron en el microscopio óptico Amscope B020c® a 40 X. Se realizó la identificación comparando las estructuras encontradas con las reportadas en la bibliografía (Abarca, 2000; Luna *et al.*, 2010).

## **5.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del AEA Comercial y sus componentes mayoritarios contra Microorganismos Presentes en la Tortilla de Maíz**

### **5.3.1 CMI del AEA Comercial y sus Componentes Mayoritarios Frente a *Escherichia coli***

Se realizó la curva de crecimiento durante 18 h a 37°C de la bacteria aislada *Escherichia coli*, inoculando la cepa pura en 3 mL de caldo nutritivo empleando un asa estéril. Se tomó 1 mL de cultivo y se adicionó a 400 mL de agar nutritivo. El medio de cultivo se colocó en una incubadora en movimiento (Shaker Incubator) a 150 rpm y se tomaron muestras al tiempo 0 y cada h posterior a la incubación durante 9 h. Para el tiempo 0, se tomó 1 mL de la suspensión de la bacteria en

incubación, de este mL se realizaron diluciones seriadas, de las cuales se tomaron alícuotas de la dilución 1:10 y 1:100 y se sembraron por vaciado en placa con agar MacConkey, este procedimiento se repitió a la primera y segunda hora de incubación. A partir de la segunda hora (fase exponencial), se tomó 1 mL de la suspensión de la bacteria en incubación, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron las diluciones 1:1,000, 1:10,000 y 1:100,000. Mientras que en la fase estacionaria se sembraron las diluciones 1:100,000, 1:10,000,000, 1:100,000,000. En cada tiempo de muestreo se midió la absorbancia a 600 nm empleando como blanco caldo nutritivo sin inocular. Todas las placas se inocularon por vaciado en agar MacConkey y se incubaron a 37 °C/24 h para cuantificar las colonias presentes en cada tiempo y reportarlas como UFC/mL (Higuera-Barraza *et al.*, 2015).

Para la determinación de CMI en bacterias se siguió la metodología de diluciones medias, de acuerdo a National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2002) con algunas modificaciones. Los compuestos a evaluar fueron AEA comercial y estándares de linalool, limoneno, acetato de linalilo y  $\alpha$ -terpineol con concentraciones en un rango de 0.78 a 200 mg/mL. Inicialmente, se numeraron nueve tubos de ensayo a los que se les añadió 1 mL de caldo nutritivo siguiendo el procedimiento que a continuación se describe: al tubo número 1 se le añadió 800 mg del compuesto a evaluar y se agitó vigorosamente, de la mezcla del tubo número 1 se tomó 1 mL y se añadió al tubo número 2, del contenido del tubo número 2 se tomó 1 mL y se añadió al tubo número 3. Se repitió lo anterior con todos los tubos para cada uno de los compuestos a evaluar y finalmente se añadió 1 mL de suspensión de *Escherichia coli* a una concentración de  $1.12 \times 10^6$  UFC/mL a cada tubo. Las concentraciones finales del tubo 1 al 9 fueron las siguientes 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56 y 0.78 mg/mL, respectivamente. Todos los tubos se incubaron a 37°C/48 h incluyendo un tubo control con 1 mL de caldo nutritivo y 1 mL de inóculo. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron diluciones seriadas (1:10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000, 1:100,000, 1:1,000,000) de las cuales se sembraron las diluciones (1:100,000, 1:1,000,000) por duplicado en agar MacConkey. Las placas se incubaron a 37°C por 48 h. Finalmente se cuantificaron las colonias reportadas en UFC/mL para cada concentración de cada compuesto analizado.



### 5.3.2 CMI del AEA Comercial y sus Componentes Mayoritarios Frente a *Aspergillus niger* y *Penicillium* sp

Se siguió la metodología de Quintana-Obregón *et al.* (2010) y Trabelsi *et al.* (2016) con algunas modificaciones. Inicialmente, se estandarizó el inóculo por conteo de conidias en la cámara de Neubauer a una concentración de  $1E6$  esporas/mL. De éste se tomaron 100  $\mu$ L equivalentes a 100,000 conidias, las cuales se depositaron en un pocillo de 0.9 cm de diámetro ubicado en el centro de cada placa Petri conteniendo PDA. Posteriormente, se depositaron a un segundo pocillo del mismo diámetro a 2 cm adyacentes al inóculo central 100  $\mu$ L del compuesto a evaluar. Los compuestos evaluados fueron AEA y estándares de linalool, limoneno, acetato de linalilo y  $\alpha$ -terpineol a 4 concentraciones diferentes disueltas en etanol (1, 3, 5, 10 % v/v), además de un control con agua y otro con etanol puro para descartar la posible actividad antifúngica del diluyente. De tal modo que se evaluó un compuesto y una concentración por placa Petri. Una vez inoculadas todas las placas con todos los compuestos y concentraciones antes mencionados se incubaron a 25°C/5 d. El análisis se realizó por triplicado. Finalmente, se determinó la CMI como la concentración más baja que logró inhibir por completo el crecimiento visible de 100,000 conidias durante 5 d.

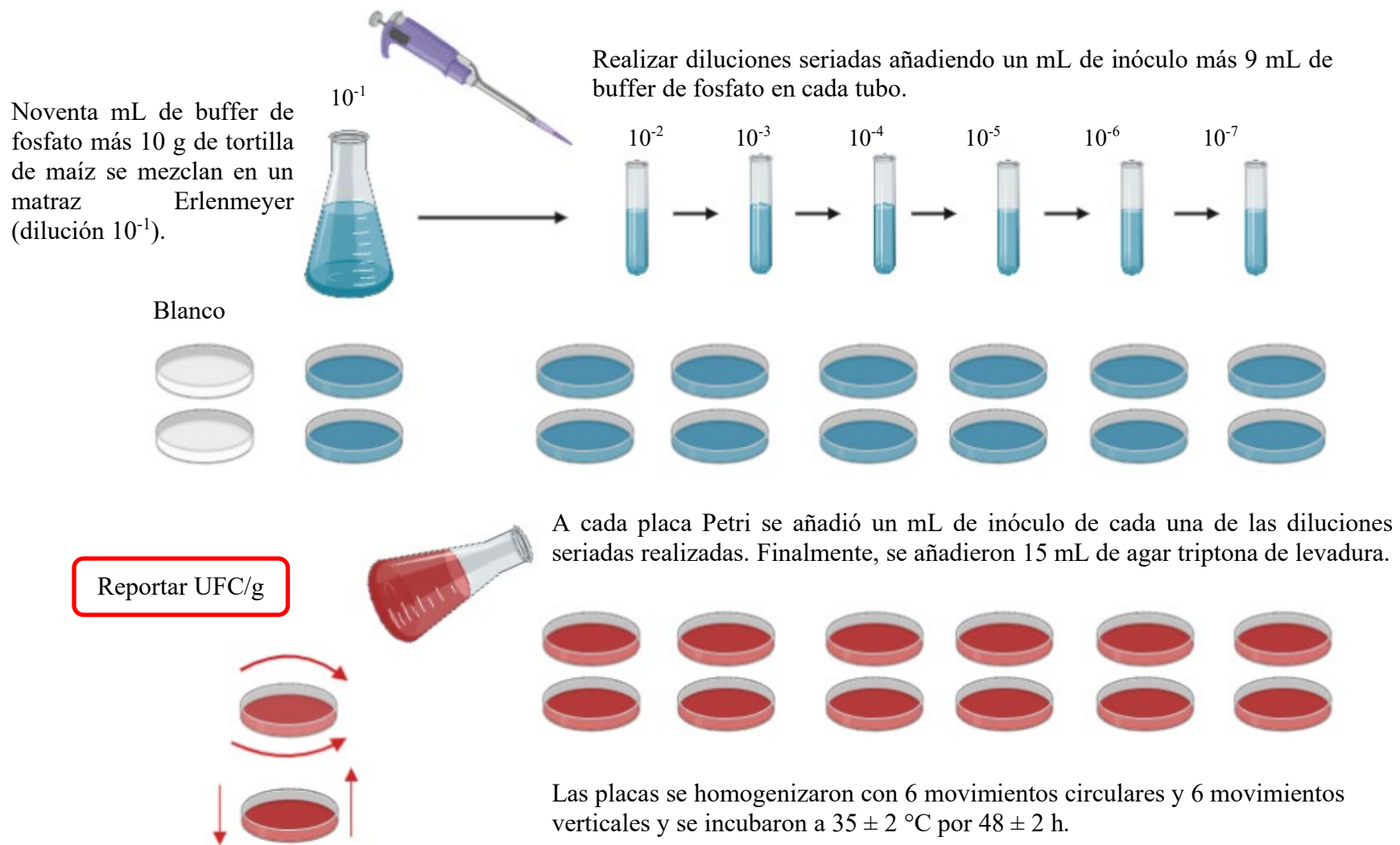
### 5.4 Evaluación del Efecto del Envase Activo Bicapa PEAD/PEBD con AEA Comercial sobre la Vida de Anaquel de la Tortilla de Maíz.

Para la tercera etapa de la metodología se utilizaron tortillas de maíz comerciales adquiridas en un comercio local. Se envasaron 8 tortillas en los envases denominados E, R y C. Posteriormente se almacenaron en una cámara con temperatura y humedad relativa controlada Binder® LCR-735T® a 5°C y 80 - 85 % HR por 30 d, pero los resultados se reportan hasta el día 25, ya que la cuantificación en el muestreo del día 30 fue incontable. Para calcular la vida de anaquel de la tortilla se cuantificaron BMA, hongos y levaduras cada 5 d desde el tiempo 0. La vida de anaquel se estableció como el tiempo en el que el número de BMA alcanzó 1000 UFC/g, o bien cuando se observó la colonia micótica a simple vista en las tortillas de cada envase.

#### **5.4.1 Cuantificación de BMA Totales en la Tortilla de Maíz**

Para el análisis microbiológico de BMA se siguió el procedimiento según la NOM-092-SSA1-1994 para la cuenta de bacterias en placa (agar Plate Count). Para la elaboración de las diluciones se empleó la NOM-110-SSA1-1994. Se homogenizaron las 8 tortillas de cada tratamiento y se seleccionaron 10 g al azar, los 10 g se añadieron a 90 mL de buffer de fosfato a pH neutro y todo en conjunto se homogenizó empleando un vortex Genie 0236 por 5 minutos. Se tomó 1 mL de la mezcla anterior y se agregó a 9 mL de buffer fosfato. Posteriormente se añadió 1 mL de cada inóculo a placas estériles con 15 mL de agar Plate Count (agar tripona extracto de levadura). Se incubaron a 37°C por 48 h y se realizaron los análisis correspondientes los cuales se reportaron como UFC/g (Figura 1).

## Bacterias mesófilas aerobias NOM-092-SSA1-1994



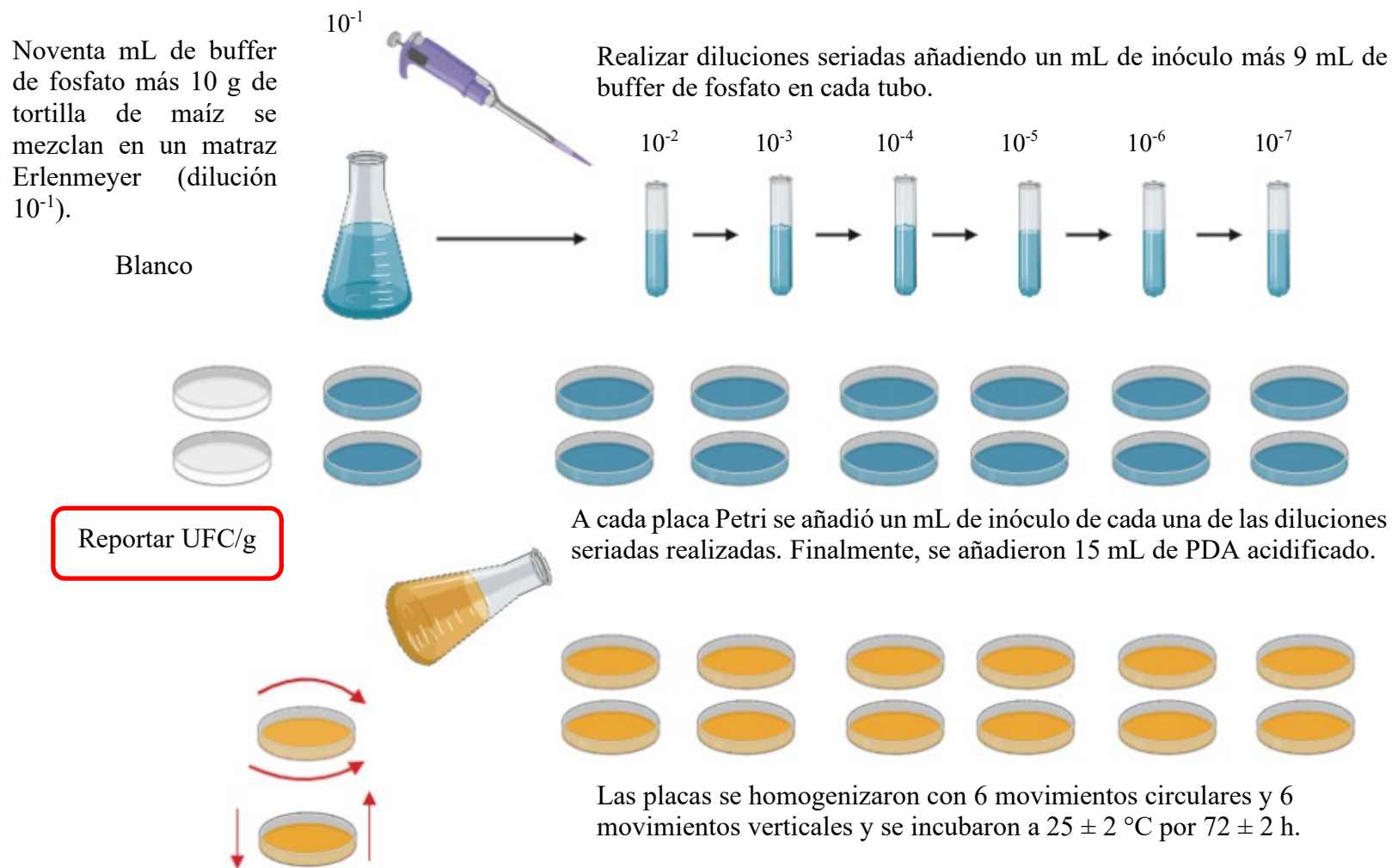
**Figura 1.** Proceso del análisis microbiológico para cuantificar bacterias mesófilas aerobias en las tortillas de maíz almacenadas a 5 °C.

#### **5.4.2 Cuantificación de Hongos y Levaduras en la Tortilla de Maíz**

Para el análisis microbiológico de hongos y levaduras se siguió el procedimiento según la NOM-111-SSA1-1994 y para la preparación de diluciones de la muestra a utilizar se realizó siguiendo la NOM-110-SSA1-1994. La preparación de cada muestra se llevó a cabo como en la sección anterior, únicamente se cambió el medio de cultivo a utilizar el cual fue PDA (agar papa dextrosa acidificada). Finalmente, todas las placas se incubaron a 25°C por 72 h, tiempo en el que se realizaron los conteos de colonias desarrolladas. Se seleccionó la dilución en la que fue posible contar colonias de mínimo 50 y máximo 250 UFC por placa, las cuales se reportaron como UFC/g (Figura 2). La vida de anaquel de las tortillas se determinó cuando se observó a simple vista la aparición de la primera colonia micótica.

# Hongos y levaduras

## NOM-111-SSA1-1994



**Figura 2.** Proceso del análisis microbiológico para cuantificar hongos y levaduras en las tortillas de maíz almacenadas a 5°C.

### **5.4.3 Análisis Sensorial de las Tortillas de Maíz Envasadas en los Envases PEAD/PEBD**

#### **Activos E y R**

Una vez terminados los análisis microbiológicos del estudio de vida de anaquel, se planeó el diseño del análisis sensorial de las tortillas envasadas en los envases E y R. Se realizó un segundo estudio de vida de anaquel con tortillas de maíz adquiridas en la misma tortillería del estudio anterior y por seguridad para los panelistas se determinó un solo muestreo, a un tiempo en el que las BMA no hubieran alcanzado el máximo permitido por las mexicanas, y debido a que no existe un límite para BMA en tortilla se tomó como referencia la NOM-247-SSA1-2008 (2,500 UFC/mL) límite permitido para alimentos elaborados a base de cereales. Para evaluar si los consumidores podrían detectar los atributos olor y sabor de los componentes del AEA en las tortillas, y además, diferenciar estas características en las tortillas envasadas en los envases E y R, se utilizó una prueba triangular (Ramírez-Navas, 2012). Se empleó una escala hedónica de nueve puntos con un panel no entrenado (60 personas) a los que se les pidió evaluar tres muestras que consistieron en  $\frac{1}{4}$  de tortilla de maíz previamente calentada por un minuto en horno de microondas de 1000 watts de potencia. Las tortillas analizadas fueron almacenadas durante 10 d a 5 °C. La escala a evaluar fue desde “me disgusta extremadamente” hasta “me gusta extremadamente” que corresponden a un puntaje de 1 hasta 9 (Ramírez-Navas, 2012).

## 5.5 Diseños Experimentales

### **5.5.1 Diseño Experimental para determinar la CMI del AEA Comercial y sus Componentes Mayoritarios Frente a *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp y *Escherichia coli***

Para cada etapa de la CMI se realizó un diseño completamente al azar con ANOVA de una sola vía con una confiabilidad al 95% y al encontrar diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) se realizó una comparación de medias por Tukey-Kramer. Para la determinación de la CMI en *Aspergillus niger* y *Penicillium* sp la variable respuesta fue el diámetro de la colonia (cm), los factores fueron cada uno de los compuestos evaluados (AEA comercial, linalool, limoneno, acetato de linalilo, y  $\alpha$ -

terpienol) y los niveles de cada factor fueron las distintas concentraciones de los compuestos (1, 3, 5, 10% v/v) (Quintana-Obregón *et al.*, 2010). Para el caso de *Escherichia coli* la variable respuesta fue las UFC/mL, los factores fueron los compuestos evaluados (AEA comercial, linalool, limoneno, acetato de linalilo, y  $\alpha$ -terpienol) y los niveles de cada factor fueron las nueve concentraciones aplicadas (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56 y 0.78 mg/mL) por duplicado con 4 repeticiones (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002). Todos los datos obtenidos se analizaron en el paquete estadístico NCSS® (2008).

### **5.5.2 Diseño Experimental para la Evaluación el Efecto del Envase Activo Bicapa PEAD/PEBD con AEA comercial sobre la Vida de Anaquel de la Tortilla de Maíz**

En esta sección tanto para el conteo de BMA, como para hongos y levaduras los datos se analizaron en el paquete estadístico NCSS® (2008) con un diseño completamente al azar con ANOVA de una sola vía, donde la variable respuesta fue la vida de anaquel, los tratamientos fueron los envases E, R y C, los análisis se realizaron por triplicado con 6 repeticiones. El análisis estadístico se realizó en cada tiempo de muestreo con una confiabilidad al 95% y al encontrar diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) se realizó una comparación de medias por Tukey-Kramer.

### **5.5.3 Diseño Experimental para la Evaluación de la Aceptabilidad Sensorial de las Tortillas de Maíz Envasadas en los envases PEAD/PEBD Activos E y R**

Los resultados del análisis sensorial se analizaron por estadística descriptiva en el programa Excel® (2011), reportando la frecuencia con la que las personas catalogaron a la tortilla con sabor y olor entre “me gusta moderadamente” hasta “me gusta extremadamente” ( $\geq 7$  en la escala hedónica). La variable respuesta fueron los puntajes de 1 a 9 para aceptabilidad de olor y sabor, los tratamientos fueron las tortillas envasadas en los envases R y E.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Apariencia de los Materiales Utilizados en el Presente Estudio

Las bolsas C, E y R para envasar las tortillas de maíz utilizadas en este trabajo, se presentan en la figura 3. En el cuadro 5 se presentan las concentraciones de los componentes del AEA en cada una.



**Figura 3.** Apariencia de las bolsas control (C), extrusión (E) y recubrimiento (R), utilizadas en el presente trabajo.

### 6.2 Aislamiento e Identificación de los Principales Microorganismos Presentes en la Tortilla de Maíz

#### 6.2.1 Aislamiento e Identificación de Bacterias en la Tortilla de Maíz

En las tortillas analizadas de las cuatro zonas de Hermosillo sólo se identificó una bacteria. La tinción Gram evidenció que la pared celular de la bacteria aislada pertenece a las Gram negativas. La coloración celular se observó en color rosa debido a la escasa cantidad de peptidoglicano en su membrana lo que evita que el colorante cristal violeta se impregne en su totalidad. Al aplicar la



mezcla alcohol-acetona se elimina la capa externa de la membrana celular debido a que esta sección es soluble en compuestos orgánicos y finalmente al adicionar la safranina aquellas moléculas que no presentan ningún colorante, lo absorben adoptando el color rosado característico en bacterias Gram negativas como en el caso de la bacteria aislada de las tortillas de maíz en el presente estudio (López-Jácome *et al.*, 2014).

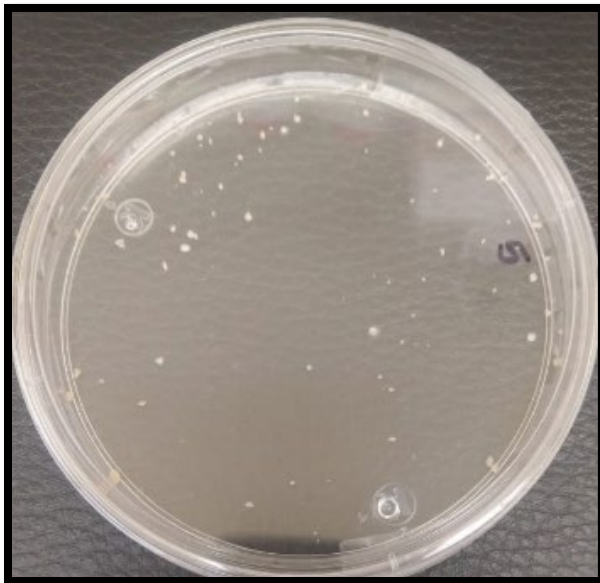
Al observar la presencia de bacterias Gram negativas que se aislaron de la tortilla se siguió la norma NOM-210-SSA1-2014 para la identificación de bacterias coliformes en alimentos. Se sembró la bacteria aislada en medios selectivos-diferenciales. El medio EMB es un medio diferencial que divide a las bacterias fermentadoras o no de lactosa, generando acidez lo que a su vez produce un complejo de eosina y azul de metileno que provoca un cambio de color a verde metálico característico sólo de *Escherichia coli* (Horvath y Ropp, 1974). Además, la coloración rosa con colonias de tamaño mediano y circular uniforme en el medio MacConkey confirma la presencia de *Escherichia coli*. Para reafirmar la presencia de la bacteria aislada de la tortilla de maíz, se realizaron pruebas bioquímicas, donde la prueba más importante es el citrato negativo (Cuadro 6). *Escherichia coli* da negativo a esta prueba, ya que no utiliza el carbono como única fuente de energía (Méndez *et al.*, 2013).

**Cuadro 6.** Pruebas bioquímicas realizadas a la bacteria aislada de la tortilla de maíz

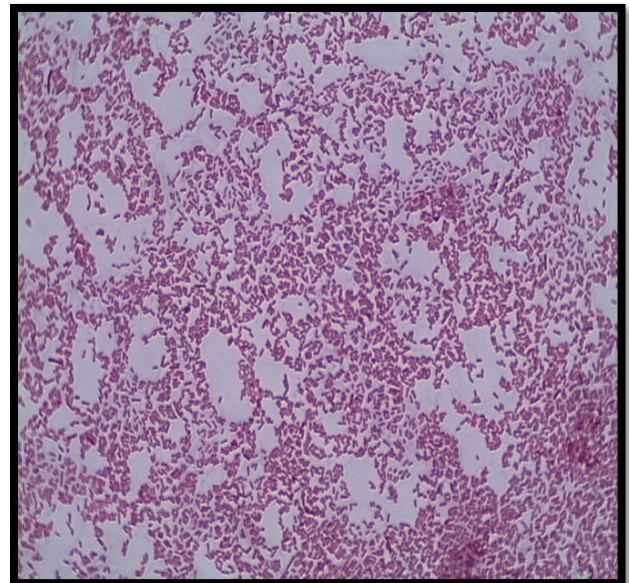
Pruebas bioquímicas			
Indol	Rojo de Metilo	Vogues-Proskauer	Citrato
+	+	-	-

Cada una de las distintas pruebas realizadas sobre la bacteria aislada de la tortilla de maíz evidencia la presencia de *Escherichia coli*. Se identificó esta bacteria sólo en una de las cuatro zonas muestreadas (zona Norte), esto pudo deberse a que en el resto de las tortillerías se tiene mayor control de higiene y se llevan a cabo las buenas prácticas de manufactura. *Escherichia coli* al pertenecer al grupo conocido como coliformes, se estudian frecuentemente en el área de alimentos ya que además de ser un indicador de calidad sanitaria está presente en distintas normas que evalúan la calidad alimentaria (Figura 4). No existen muchos reportes sobre microorganismos presentes en

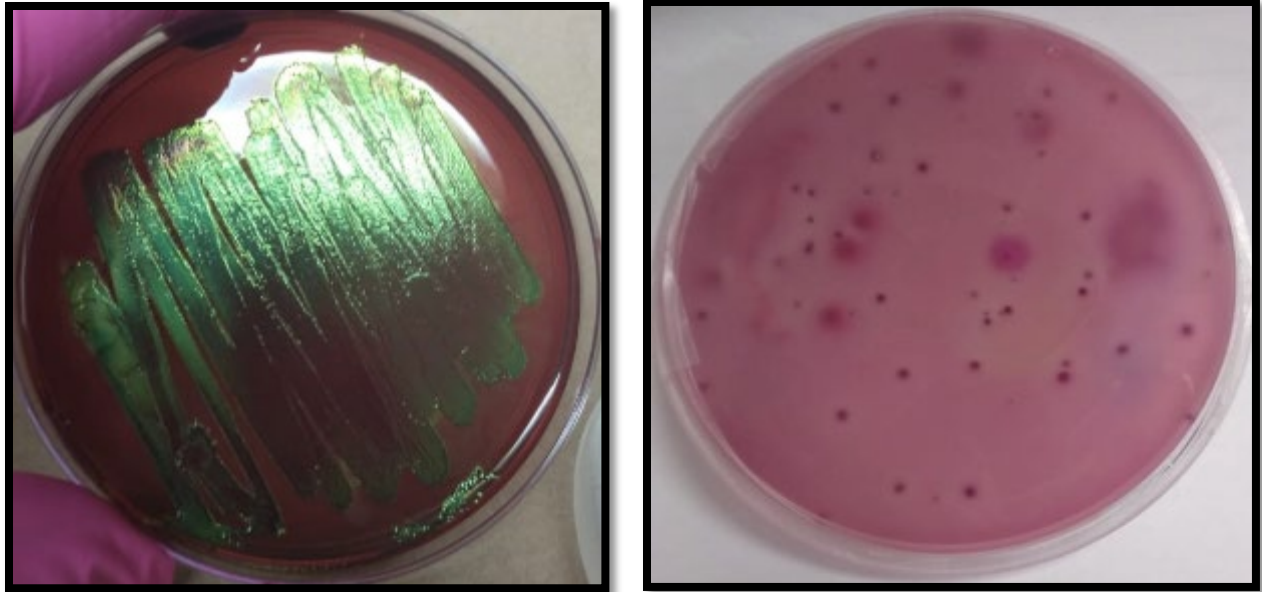
la tortilla de maíz, dado que es un alimento que generalmente se consume justo después de su elaboración, pero al no recalentar este producto aumenta la probabilidad de encontrar microorganismos presentes que si bien, no han sido reportados como de alto riesgo, si podrían causar malestar estomacal debido al consumo de un producto ya contaminado (Espinoza *et al.*, 2004). Adicionalmente, se presenta una pérdida de calidad del producto como consecuencia de la proliferación de este grupo de bacterias. La presencia de *Escherichia coli* en la tortilla de maíz evidencia la falta de buenas prácticas de manufactura en el ambiente laboral. El mejorar dichas prácticas podría incentivar el descenso de esta bacteria, mejorando la calidad e inocuidad de los alimentos incluida a la tortilla de maíz (Gómez-Aldapa *et al.*, 2013).



A



B



C

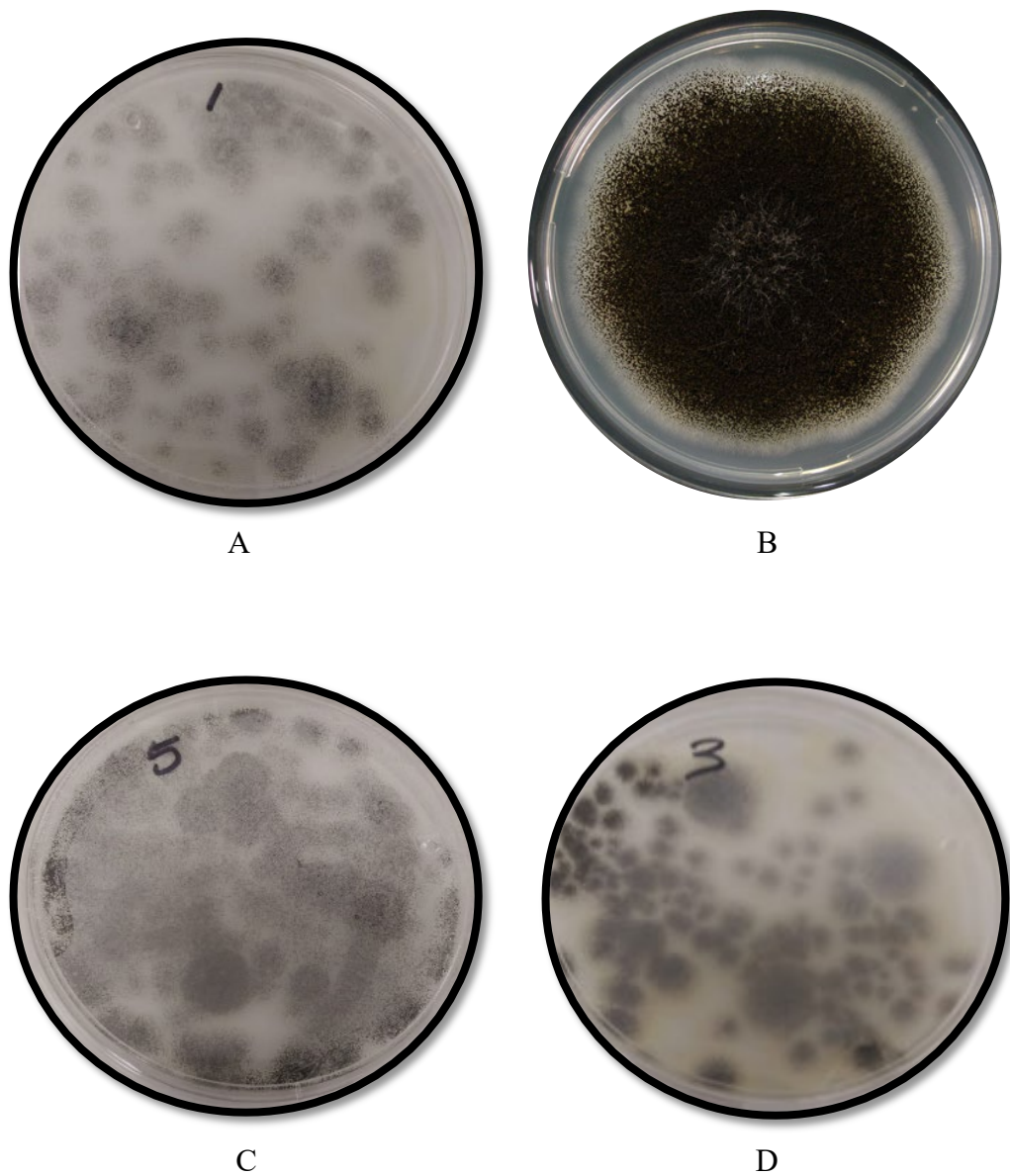
D

**Figura 4.** (A) Aislamiento de bacterias presentes en tortilla de maíz en medio Plate Count. (B) Tinción Gram de bacteria aislada. Siembra en medios selectivos (C) diferencial EMB y (D) MacConkey.

### 6.2.2 Aislamiento e Identificación de Hongos en la Tortilla de Maíz

La proliferación de hongos en el maíz es común, se pueden encontrar de distintos géneros desde *Fusarium* sp, *Penicillium* sp hasta *Aspergillus* sp, entre algunos otros. Su desarrollo en el maíz dependerá del tipo de suelo y nutrientes propios en el ambiente que se encuentren (Figuroa-Rivera *et al.*, 2010). Por lo que se espera que al menos uno de los géneros de hongos antes mencionados pudiera estar presente en la tortilla de maíz. Posterior al periodo de incubación de cada muestra se observaron colonias uniformes principalmente de color marrón y escasamente colonias de color verde. Cada una de las colonias de hongos desarrollados se sembró en agar PDA para su identificación. Pasados 10 d de crecimiento se observó el desarrollo de una colonia en la parte frontal de color marrón oscuro a negro y en la parte trasera de la placa, de color blanco a amarillento, por lo que se sospechó de la presencia de *Fusarium* sp o *Aspergillus* sp, hongos que ya se han reportado en el maíz, resultados que concuerdan con Hernández-Delgado *et al.* (2007)

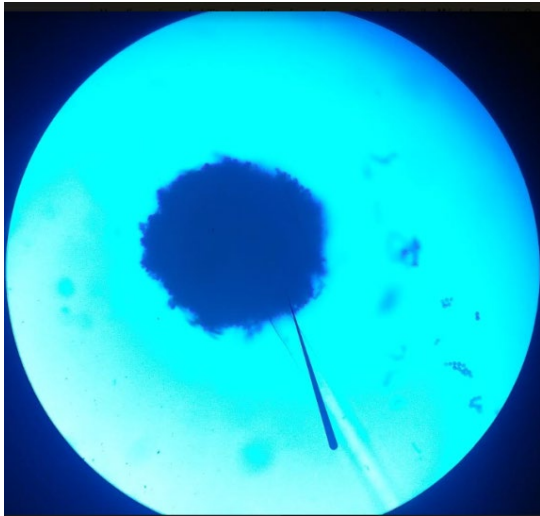
quienes evaluaron la incidencia de hongos (*Fusarium* sp, *Aspergillus* sp y *Penicillium* sp) en el maíz antes de ser procesado (Figura 5). Para observar la morfología microscópica de cada hongo y poder concluir con la identificación, se realizó una tinción con azul de lactofenol.



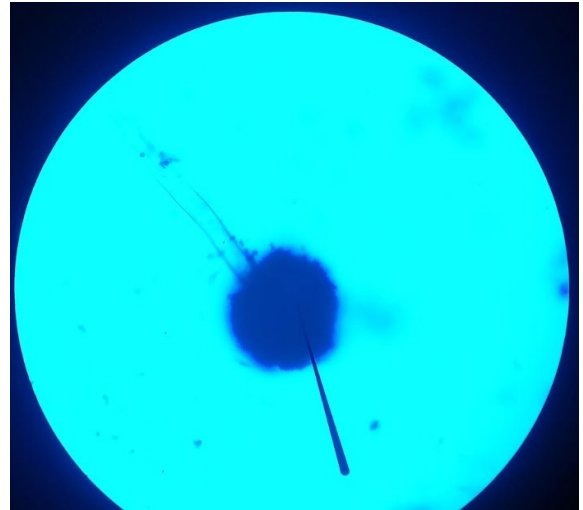
**Figura 5.** Hongos aislados de tortillas compradas en 4 zonas de la ciudad de Hermosillo Sonora. (A) Norte, (B) Sur, (E) Este y (D) Oeste.

La tinción con azul de lactofenol es ampliamente utilizada en muestras fúngicas. Este tipo de tinción, a pesar de no ser una tinción diferencial, es de gran utilidad ya que pone en evidencia cada estructura que compone al hongo, facilitando así su identificación (López-Jácome *et al.*, 2014). Dentro de los componentes de esta tinción se encuentra el ácido láctico y el fenol que actúan aclarando cada componente. Además, el fenol cumple con la función de inactivar las enzimas responsables de lisar las células. Por otro lado, el azul de metileno se une a la quitina presente evidenciando cada sección del hongo y por último, el glicerol se encarga de mantener húmeda la tinción.

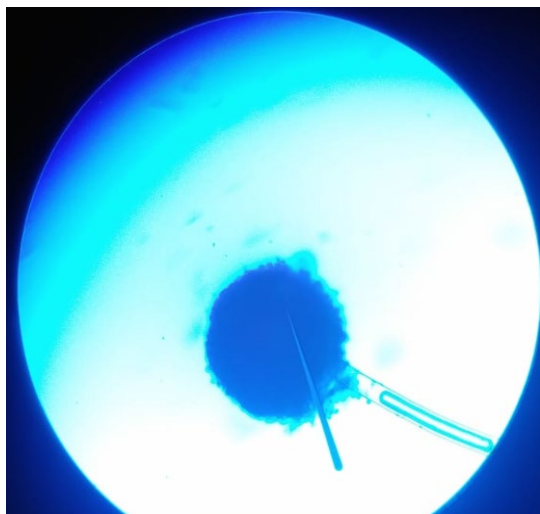
Se realizó la tinción con azul de lactofenol a cada uno de los hongos aislados de las muestras analizadas de las 4 zonas de Hermosillo y fueron observadas al microscopio a 40X (Figura 6). En cada una de las tinciones se observaron hifas hialinas y conidióforos de forma circular rodeados de conidias, esto debido a que la tinción se realizó a los cinco días de haber inoculado en medio PDA por lo que el hongo se encontraba en su forma reproductiva activa. Se realizó la tinción a una cepa usada como referencia previamente identificada como *Aspergillus niger* (Figura 7) y al observar al microscopio se advirtieron claramente conidióforos uniformemente circulares similares a los encontrados en cada una de las muestras analizadas. Trujillo-Bonifaz *et al.* (2012), describieron las características antes mencionadas como conidióforo circular uniforme e hifas hialinas septadas característico de *Aspergillus niger* (Figura 8). La morfología del conidióforo es particular de cada género micótico y aunado a sus características macroscópicas es posible la identificación de hongos (Abarca, 2000). Debido a las similitudes observadas en las muestras de cada zona y la cepa que se tomó como referencia y aunado a lo revisado en la bibliografía, se concluye que el hongo de color marrón presente en todas las muestras es *Aspergillus niger*.



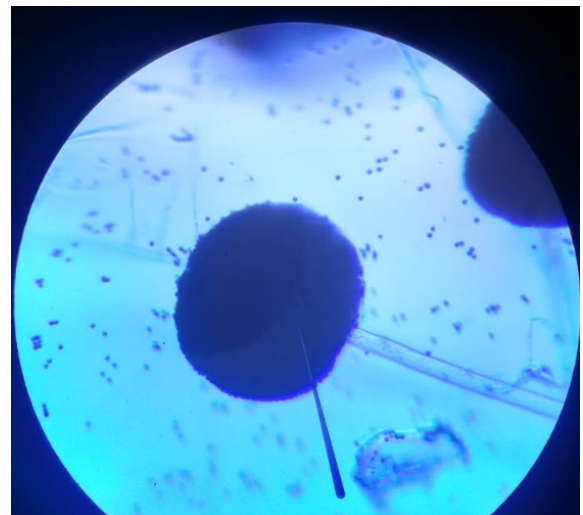
A



B



C

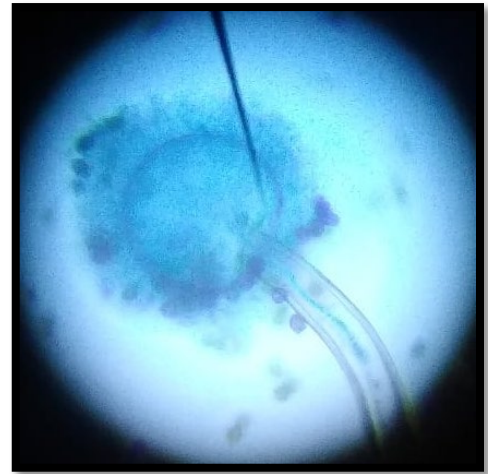


D

**Figura 6.** Tinción con azul de lactofenol en hongos obtenidos de muestras de tortillas de las cuatro zonas muestreadas en la ciudad de Hermosillo, Sonora. A) Norte, B) Sur, E) Este, y D) Oeste.

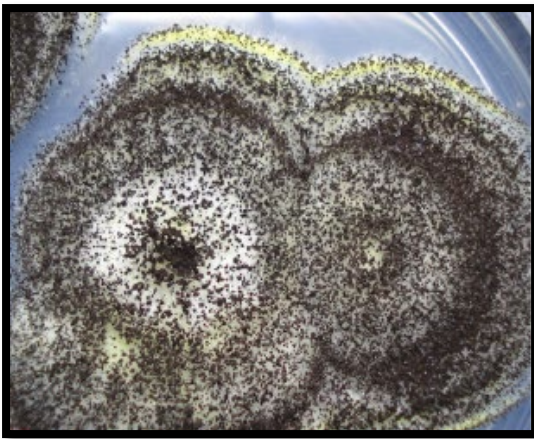


A



B

**Figura 7.** *Aspergillus niger* proporcionado por el laboratorio de Biotecnología Vegetal y Post cosecha de CIAD. A) *Aspergillus niger* aislado en PDA y B) *Aspergillus niger* teñido con azul de lactofenol.



A

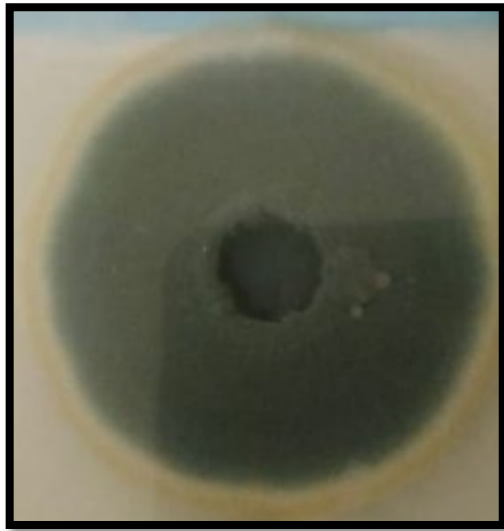


B

**Figura 8.** A) *Aspergillus niger* aislado en PDA y B) *Aspergillus niger* en solución salina a 10X reportado por Trujillo-Bonifaz *et al.* (2012).

Se aisló un segundo hongo proveniente de la zona oeste de la ciudad, el cual difiere morfológicamente de *Aspergillus niger* (Figura 9 A-B). Se observa una colonia de color verde olivo con circunferencia micelial blanco que primeramente podría sugerir la presencia de otra especie de

*Aspergillus* sp como *Aspergillus flavus* el cual se ha aislado previamente del maíz (Mazzani *et al.*, 1999).



A

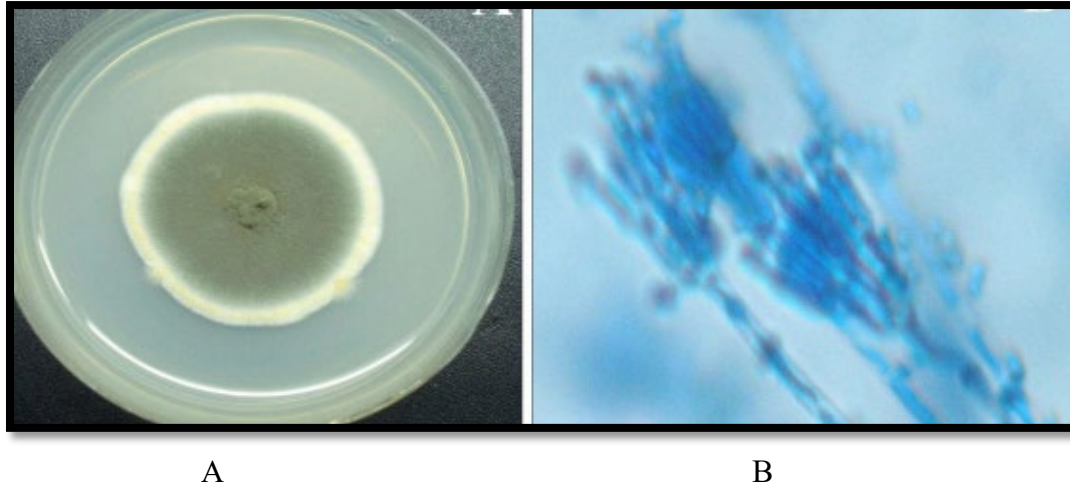


B

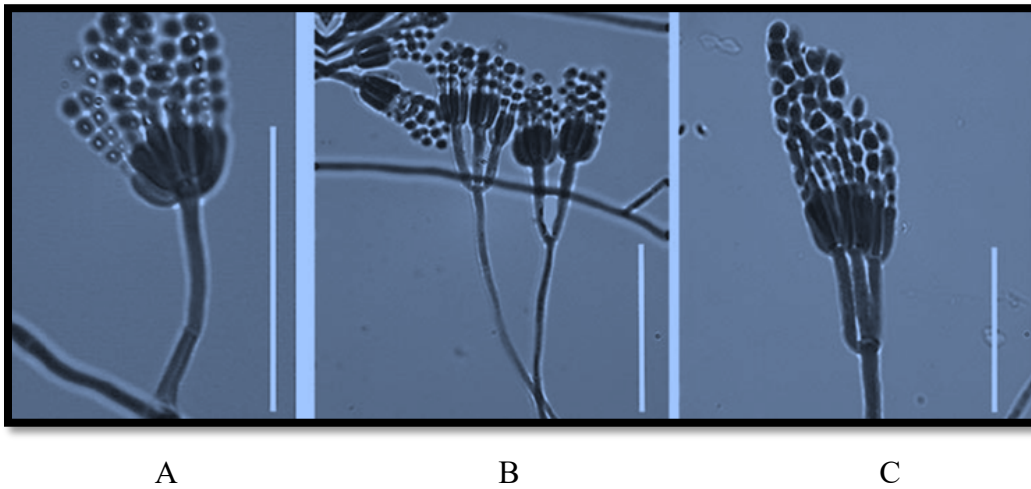
**Figura 9.** A) *Penicillium* sp aislado de tortilla de maíz en medio PDA B) *Penicillium* sp con azul de lactofenol en microscopio óptico (Objetivo a 40 X).

En la preparación con azul de lactofenol se observaron las características morfológicas en microscopio óptico 40X en el que se evidenciaron conidióforos alargados que unen a las métulas y fiálides. De cada fiálide se puede observar la proliferación de conidios los cuáles, dependiendo de la maduración del hongo, se irán desprendiendo para formar un conidióforo nuevo. Cada una de las características como el ramillete de cada métula y fiálide son características de hongos pertenecientes al género *Penicillium* sp. Hemath-Naveen *et al.* (2010) y Pereira *et al.* (2009), observaron al microscopio tres especies de *Penicillium* sp los cuáles presentan características morfológicas similares al hongo aislado en el presente estudio (Figuras 10 y 11) por todo lo anterior se puede asegurar que el segundo hongo que se aisló de dos zonas muestreadas fue *Penicillium* sp.





**Figura 10.** A) Características morfológicas de *Penicillium* sp en PDA, B) Características microscópicas de *Penicillium* sp en tinción con azul de lactofenol reportadas por Hemath-Naveen *et al.* (2010) (Objetivo 40 X). Fuente: Hemath-Naveen *et al.* (2010).



**Figura 11.** Características microscópicas de distintas especies de *Penicillium* sp A) *Penicillium sclerotiorum*; B) *Penicillium melinii*; C) *Penicillium oxalicum*. Escala 30  $\mu$ m. Fuente: Pereira *et al.* (2009).

Por otro lado, Trabelsi *et al.* (2016), aislaron *Penicillium* sp de naranja dulce mostrando colonias verdosas con circunferencia micelial blanca, que al realizar la tinción con azul de lactofenol se evidenciaron conidióforos, métulas, fiálides y conidias características del género, que también son semejantes a las características encontradas en el hongo aislado de tortilla de maíz. Con las

características presentes en las referencias antes mencionadas y las que se encontraron en el hongo aislado de color verde en este estudio, es posible llegar a la identificación del género denominado *Penicillium* sp.

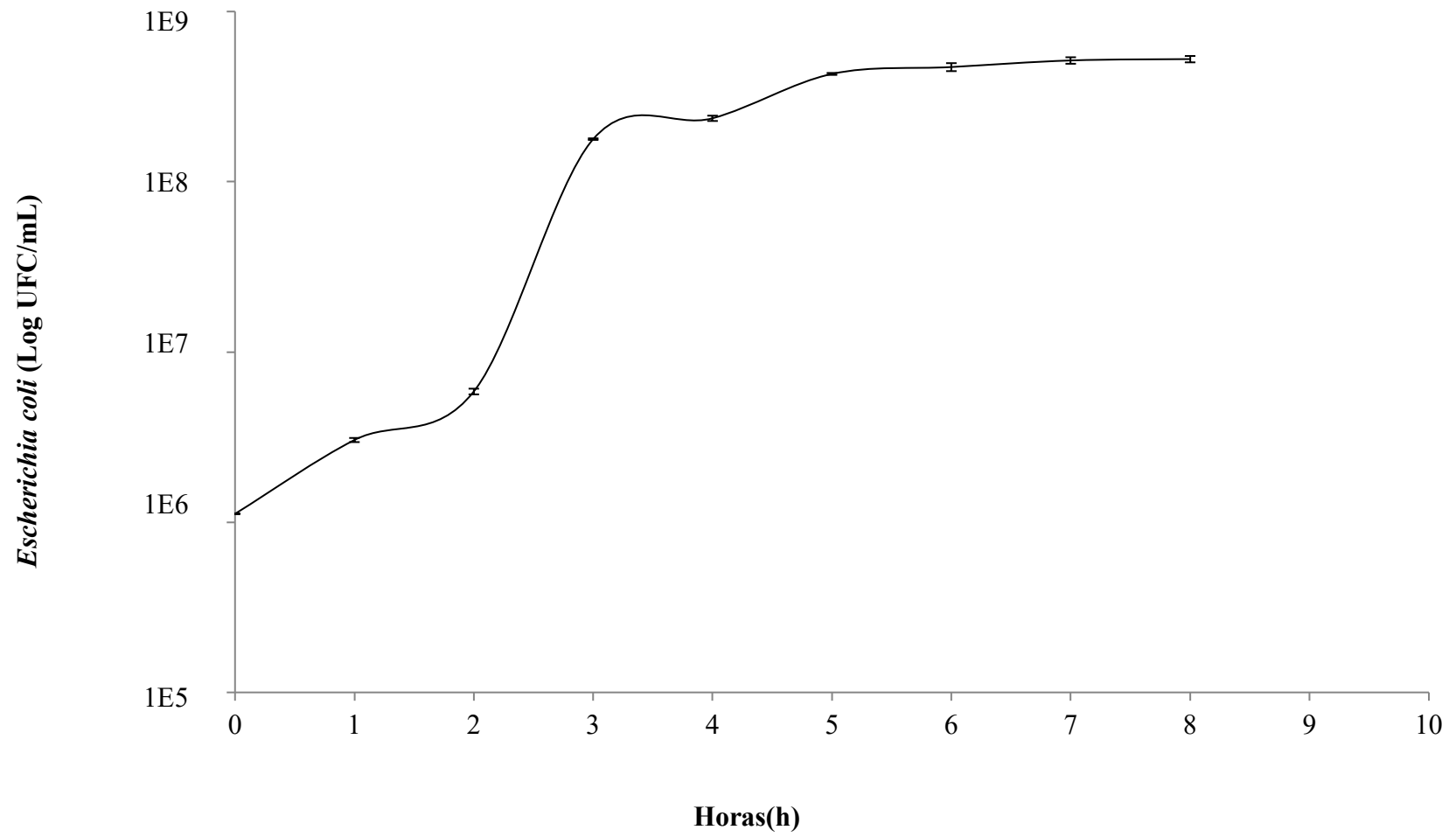
El primer objetivo de la presente tesis se cumplió considerando que los hongos y las bacterias que se han aislado de la tortilla de maíz pertenecen a distintos géneros y el hecho de que puedan proliferar en el alimento después de su elaboración dependerá de las condiciones higiénicas que se sigan en las plantas donde se fabrican las tortillas. Se identificó a *Escherichia coli* empleando medios diferenciales y pruebas bioquímicas y se logró identificar por medio de características micro y macroscópicas la presencia de *Aspergillus niger* y *Penicillium* sp.

### 6.3 Determinación de la CMI del AEA Comercial y sus Componentes Mayoritarios Frente a Microorganismos Presentes en la Tortilla de Maíz

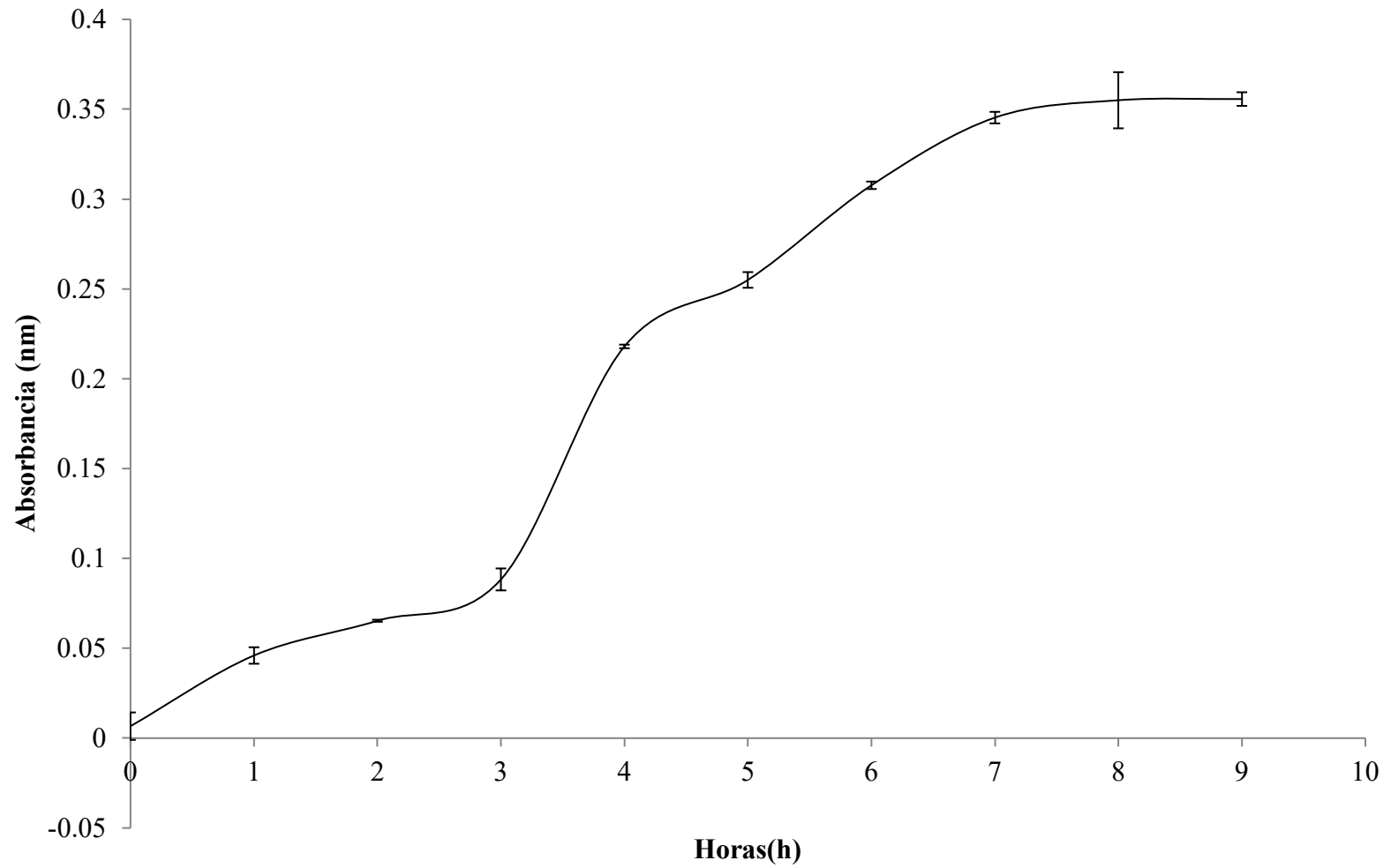
#### 6.3.1 CMI del AEA Comercial y sus Componentes Mayoritarios Frente a *Escherichia coli*

*Escherichia coli* fue la única bacteria aislada de las tortillas de maíz analizadas de las 4 tortillerías. Para determinar la CMI del AEA frente a esta bacteria fue necesario construir su curva de crecimiento en todas sus fases. Con el fin de identificar estas fases de crecimiento y establecer el tiempo para llegar a la fase exponencial se realizó la cuantificación y lectura de absorbancia a 600 nm de un cultivo nuevo durante un lapso de 9 h tomando muestras de 1 mL cada h para cada medición. Para evaluar la CMI por diluciones medias según la NCCLS (2002), se aplica un inóculo inicial de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL. La curva de crecimiento de *Escherichia coli* presentó la concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL 3 h posteriores a su incubación. La primera fase que corresponde a adaptación se presentó del tiempo cero a la segunda hora de incubación, observando que la bacteria se adaptó rápidamente a las condiciones de estudio. La fase exponencial se evidenció a partir de la segunda hasta la cuarta h y finalmente la fase estacionaria se presentó desde la cuarta hasta la novena h. En las figuras 12 y 13 se muestran cada una de las etapas de crecimiento de la bacteria y las absorbancias correspondientes durante las 9 h de incubación.

*Escherichia coli* ha sido una bacteria ampliamente estudiada, por lo que existen diversos reportes acerca de su desarrollo. Castaño *et al.* (2010), reportaron que se encuentra en la fase exponencial a la quinta hora de incubación, tiempo mucho mayor al que se observó en el presente estudio. Este comportamiento pudo deberse a que la cepa bacteriana empleada tuvo una adaptación tardía antes de llegar al crecimiento exponencial. Moreno *et al.* (2011), realizó la cinética de crecimiento de *Escherichia coli*, reportando que la fase exponencial se encontró entre la tercera y cuarta h de incubación, mientras que la fase estacionaria fue después de la cuarta hora. En el presente trabajo, el crecimiento y desarrollo de *Escherichia coli* se presentó de manera semejante a lo reportado por Ramírez-Santos *et al.* (2005) es decir la fase exponencial a partir de la segunda hora de incubación mientras que la fase estacionaria a partir de la cuarta hora de incubación. Diversos factores podrían causar diferencias en la curva de crecimiento como puede ser el biotipo de *Escherichia coli*, la estabilidad de la bacteria desde el tiempo cero entre otros. Para efectos de la CMI de *Escherichia coli* se consideró tanto la absorbancia que reportó la concentración 1.12E6 UFC/mL como la cuantificación realizada según la metodología en NCCLS (2002), que indica que esta concentración se emplea como inóculo inicial para evaluar la actividad antimicrobiana.

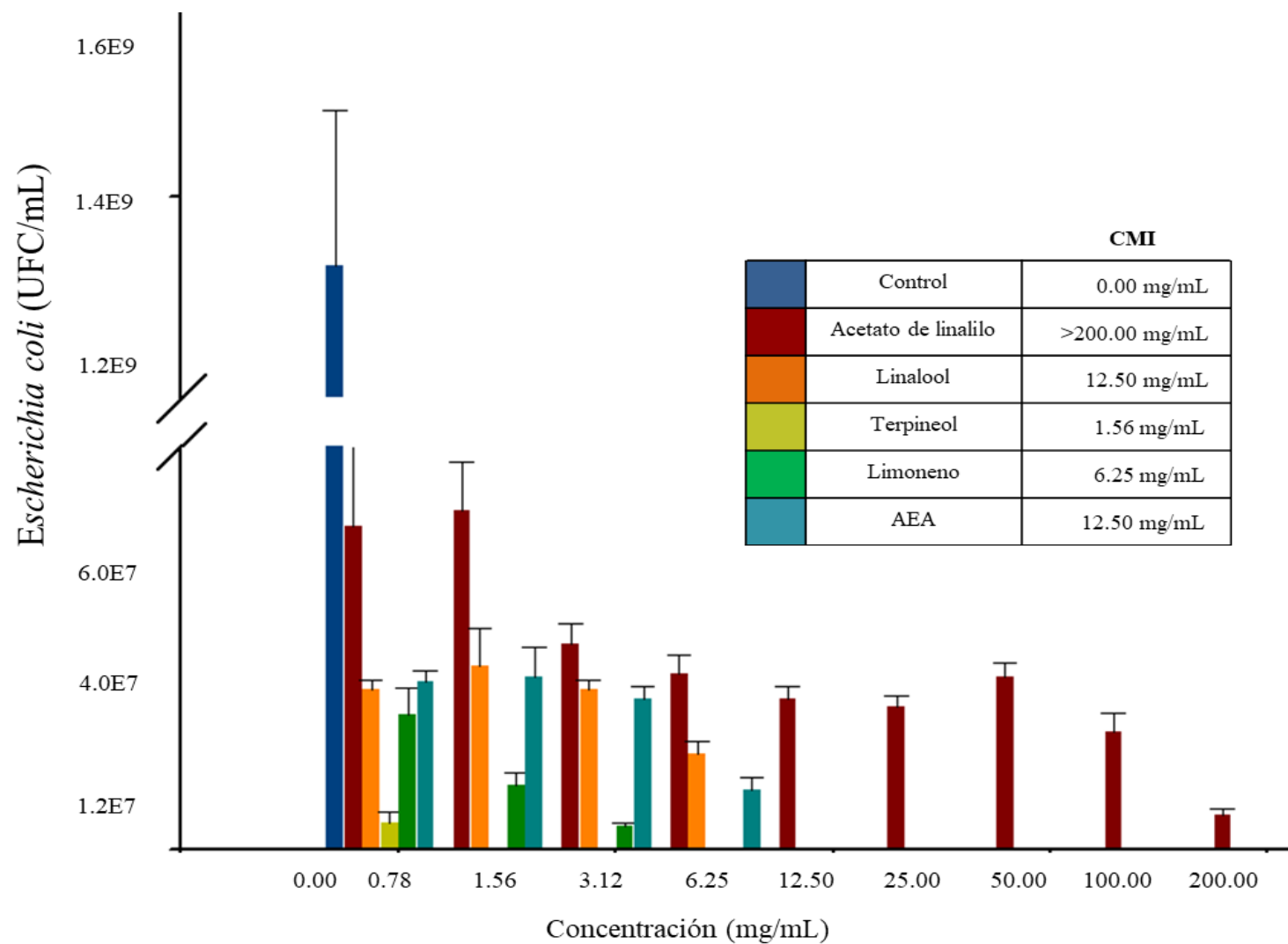


**Figura 12.** Curva de crecimiento de *Escherichia coli* durante 9 h a 37°C a partir de un inóculo de 1.12E6 UFC/mL.



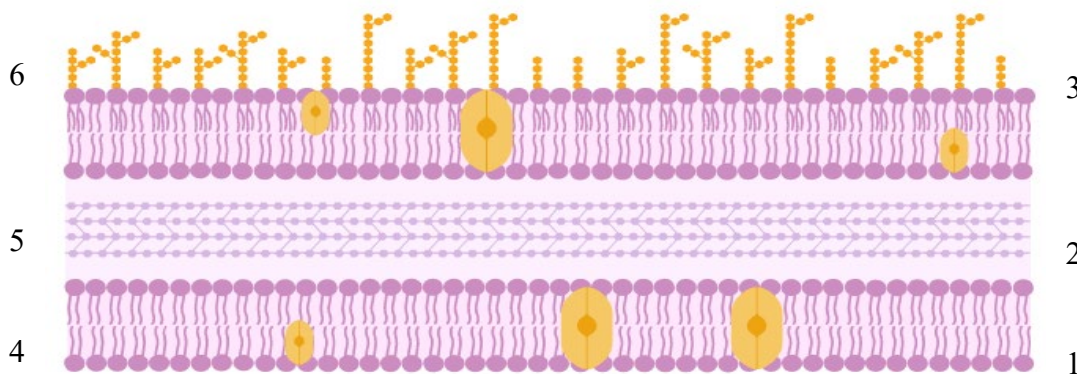
**Figura 13.** Absorbancia de *Escherichia coli* durante su desarrollo en caldo nutritivo durante 9 h a 37°C a partir de un inóculo de 1.12E6 UFC/mL.

La curva de crecimiento de *Escherichia coli* se realizó para determinar el tiempo que tarda la bacteria en llegar a la fase exponencial. Esta fase es importante ya que es donde la bacteria se encuentra en su mejor estado metabólico y se desarrolla sin inconveniente (Varela y Grotiuz, 2008). Una vez realizada la curva de crecimiento, se procedió a evaluar la CMI del AEA y sus compuestos principales (limoneno, linalool, acetato de linalilo y  $\alpha$ -terpineol) sobre *Escherichia coli*. Los resultados obtenidos se basaron en la concentración mínima necesaria que inhibió el crecimiento visible en agar MacConkey (2 d a 37°C). Posterior al periodo de incubación, la CMI del AEA, linalool,  $\alpha$ -terpineol, limoneno fue de 12.5, 12.5, 1.56, 6.25 mg/mL (para la concentración del inóculo de 1.12E6 UFC/mL). Por otro lado, *Escherichia coli* creció en todas las concentraciones de acetato de linalilo por lo que para reportar una CMI se necesitarían concentraciones mayores a 200 mg/mL (Figura 14). No se intentó encontrar la CMI para este éster ya que evidentemente no es uno de los componentes del AEA que contribuye a la actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*.



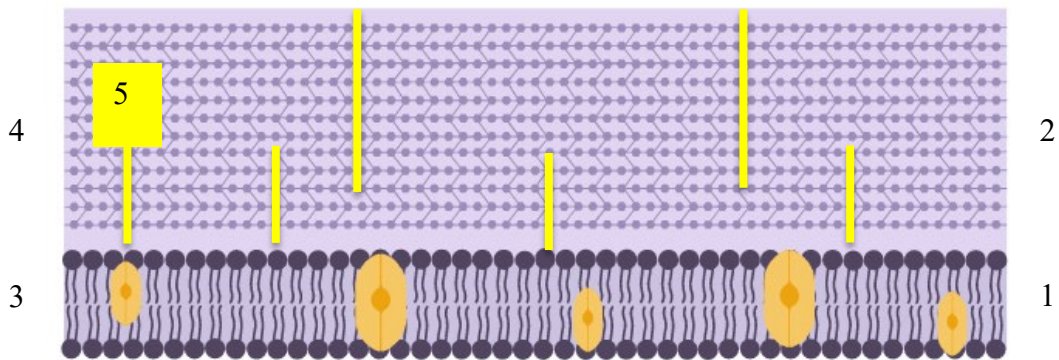
**Figura 14.** Concentración mínima necesaria de los componentes del AEA que inhibió el crecimiento visible de *Escherichia coli* en medio MacConkey incubada por 2 d a 37°C.

Maguna *et al.* (2006), evaluaron el efecto de la adición de distintos compuestos terpénicos sobre el desarrollo de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Los autores reportaron que el efecto de los compuestos terpénicos es mayor frente a bacterias Gram positivas que en bacterias Gram negativas debido a que estas últimas poseen una membrana doble que les confiere resistencia a distintos compuestos, siendo capaces de resistir a concentraciones más elevadas de agentes antibacterianos en comparación con las Gram positivas (Figuras 15 y 16). En el cuadro 7 se muestra una recopilación de microorganismos incluyendo *Escherichia coli* expuesto a limoneno y linalool. Las CMI en esta tesis difieren de lo reportado en este estudio lo que puede deberse a diversos factores, ya sea la metodología, inóculo, medio de cultivo empleado entre otros. Por otro lado, Coelho-Oliveira *et al.* (2014) reportaron que la adición de 2 mL de AEA durante 5 h fue suficiente para inhibir el crecimiento de  $1E6$  UFC/mL de *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli*. Las CMI de otros autores y los resultados obtenidos en el presente estudio confirman el potencial antimicrobiano del AEA, el cual al ser de origen natural, podría ser utilizado en la industria alimentaria para inhibir el crecimiento de microorganismos.



**Figura 15.** Membrana de bacteria Gram negativa. 1) Membrana interna, 2) Periplasma, 3) Membrana externa, 4) Fosfolípidos, 5) Peptidoglicanos, 6) Lipoproteínas. Fuente: Mollinedo y Gonzáles, 2014.





**Figura 16.** Membrana de bacteria Gram positiva. 1) Membrana citoplasmática, 2) Peptidoglicanos, 3) Fosfolípidos, 4) Proteínas, 5) Ácido lipoteicoico. Fuente: Castaño *et al.* 2010.

Un mecanismo de acción propuesto para los aceites esenciales en bacterias supone que los grupos funcionales interactúan con proteínas de membrana lo que ocasiona un aumento en la permeabilidad celular y disminución de componentes intracelulares fundamentales para el desarrollo bacteriano. Concentraciones altas de compuestos terpénicos podrían ocasionar daños severos a nivel genético evitando que se sinteticen componentes esenciales para la supervivencia bacteriana, causando lisis celular. Sin embargo, la actividad antimicrobiana de compuestos terpénicos frente a microorganismos dependerá de la concentración de los compuestos y el tiempo de exposición ya que, a mayor concentración y mayor tiempo, mayor será el efecto antimicrobiano, ya sea frente a bacterias u hongos (Coelho-Oliveira *et al.*, 2014).

**Cuadro 7.** Mecanismos de acción propuestos para distintos compuestos terpénicos frente a bacterias.

<b>Compuesto</b>	<b>Microorganismo (CMI)</b>	<b>Mecanismo de acción reportado</b>	<b>Referencias</b>
Linalool de aceites cítricos	<i>Bacillus cereus</i> (1073 µg/mL) <i>Escherichia coli</i> (515-2145 µg/mL) <i>Salmonella typhimurium</i> (1500 µg/mL)	Modifica la permeabilidad de la membrana celular.	Carson y Riley. (1995); Kim <i>et al.</i> (1995); Bagamboula <i>et al.</i> (2004); Ait- Ouazzou <i>et al.</i> (2011); Fisher y Philips. (2006)
Acetato de linalilo de bergamota	<i>Escherichia coli</i> (5000 µg/mL) <i>Staphylococcus aureus</i> (1250 µg/mL)	Perturba la permeabilidad de la membrana Puede interactuar con componentes intracelulares	Trombetta <i>et al.</i> (2005); Schipilliti <i>et al.</i> (2011)
Limoneno de naranja, limón y mandarina	<i>Escherichia coli</i> (8.4 µg/mL) <i>Staphylococcus aureus</i> (1.6 µg/mL)	Perturba la permeabilidad de la membrana Puede interactuar con componentes intracelulares	Di Pasqua <i>et al.</i> (2010); Espina <i>et al.</i> (2011)
Eugenol (18.2%), linalool (10.6%), trans-caryophyllene (8.9%), α-terpineol (6%), p-cymene (5.8%)	Seis bacterias (0.39-1.56 µg/mL)	Disrupción de pared y membrana celular	Zeng <i>et al.</i> (2011)

### 6.3.2 CMI del AEA Comercial y sus Componentes Mayoritarios Frente a *Aspergillus niger* y *Penicillium* sp

Se evaluó la CMI del AEA y sus compuestos principales (limoneno, linalool, acetato de linalilo y  $\alpha$ -terpineol) sobre *Aspergillus niger* y *Penicillium* sp. Los resultados obtenidos se basaron en la concentración mínima que inhibió el crecimiento visible del micelio de 100,000 conidias por pocillo durante el periodo de incubación planteado (5 d a 25°C). Posterior al periodo de incubación, la CMI del AEA, linalool, y  $\alpha$ -terpineol fue de 85 mg/mL, 87 mg/mL y 94 mg/mL, respectivamente contra *Aspergillus niger* y *Penicillium* sp siendo la misma CMI para ambos hongos. Por otro lado, la CMI de limoneno y acetato de linalilo no se logró determinar ya que los hongos crecieron hasta en la concentración más alta, por lo que para ser evaluado se necesitarían concentraciones mayores a 84.4 mg/mL para limoneno y 90 mg/mL para acetato de linalilo. Debido a que el objetivo principal es la determinación de la CMI del AEA no se consideró buscar la CMI para estos componentes del AEA (Cuadros 8-10).

**Cuadro 8.** Concentración Mínima Inhibitoria del AEA frente a *Aspergillus niger* y *Penicillium* sp.

<b>AEA comercial (mg/mL)</b>	<b><math>\alpha</math>-Terpineol (mg/mL)</b>	<b>Linalool (mg/mL)</b>	<b>Acetato de linalilo (mg/mL)</b>	<b>Limoneno (mg/mL)</b>
85.00 (8.50 mg*)	94.00 (9.40 mg*)	87.00 (8.70 mg*)	>84.00 (8.40 mg*)	>84.40 (8.44 mg*)

\*Cantidades añadidas por placa petri equivalentes a 100  $\mu$ L de solución madre de cada compuesto. Se inoculó cada placa con 100,000 conidias.

**Cuadro 9.** Efecto de la adición de distintas concentraciones de AEA comercial y sus componentes mayoritarios sobre el crecimiento de *Aspergillus niger*.

Concentración	Limoneno	Acetato de linalilo	Linalool	$\alpha$ -terpineol	AEA comercial
%	<b>CRECIMIENTO DEL MICELIO (cm)</b>				
1	3.50 ± 0.17 a	3.63 ± 0.05 a	3.40 ± 0.00 b	3.03 ± 0.05 b	3.33 ± 0.15 b
3	3.53 ± 0.05 a	3.60 ± 0.10 a	3.00 ± 0.10 c	2.33 ± 0.05 c	2.73 ± 0.37 c
5	3.56 ± 0.05 a	3.50 ± 0.00 ab	3.10 ± 0.10 c	1.56 ± 0.05 d	2.13 ± 0.45 d
10	3.53 ± 0.05 a	3.46 ± 0.05 b	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
Etanol	4.10 ± 0.01 b	4.10 ± 0.01 c	4.10 ± 0.01 d	4.10 ± 0.01 e	4.10 ± 0.01 e
Agua	4.46 ± 0.05 c	4.46 ± 0.05 d	4.46 ± 0.05 e	4.46 ± 0.05 f	4.46 ± 0.05 f

Resultados en diámetro de crecimiento de micelio (cm) ± desviación estándar. Literales distintas en cada columna indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

**Cuadro 10.** Efecto de la adición de distintas concentraciones de AEA comercial y sus componentes mayoritarios sobre el crecimiento de *Penicillium* sp.

Concentración	Limoneno	Acetato de linalilo	Linalool	$\alpha$ -terpineol	AEA comercial
%	<b>CRECIMIENTO DEL MICELIO (cm)</b>				
1	3.86 $\pm$ 0.05 a	3.66 $\pm$ 0.05 a	3.00 $\pm$ 0.00 a	3.33 $\pm$ 0.25 a	3.33 $\pm$ 0.28 a
3	3.63 $\pm$ 0.05 b	3.43 $\pm$ 0.37 ab	3.00 $\pm$ 0.00 a	2.60 $\pm$ 0.10 b	2.60 $\pm$ 0.52 ab
5	3.46 $\pm$ 0.05 c	3.50 $\pm$ 0.05 b	2.26 $\pm$ 0.05 b	1.83 $\pm$ 0.05 c	2.23 $\pm$ 0.32 b
10	3.00 $\pm$ 0.00 d	3.53 $\pm$ 0.11 b	0.00 $\pm$ 0.00 c	0.00 $\pm$ 0.00 d	0.00 $\pm$ 0.00 c
Etanol	4.20 $\pm$ 0.00 e	4.20 $\pm$ 0.00 c	4.20 $\pm$ 0.00 d	4.20 $\pm$ 0.00 e	4.20 $\pm$ 0.00d
Agua	4.30 $\pm$ 0.00 f	4.30 $\pm$ 0.00 d	4.30 $\pm$ 0.00 e	4.30 $\pm$ 0.00 f	4.30 $\pm$ 0.00 e

Resultados en diámetro de crecimiento de micelio (cm)  $\pm$  desviación estándar. Literales distintas en cada columna indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

La actividad antifúngica del AEA ha sido evaluada en otros estudios por distintas metodologías. Trabelsi *et al.* (2016), reportan que 12.5 mg/mL fue la CMI del AEA contra *Penicillium digitatum* siendo una concentración menor a la de este estudio, por lo que se puede inferir que esta especie de *Penicillium* resultó ser más sensible a este tipo de aceite esencial. Aunque no se descarta que la diferencia en la CMI reportadas pueda deberse a la metodología empleada ya que Trabelsi *et al.* (2016), siguieron la técnica de microdilución en placa con un inóculo inicial de 1,000 conidias por pocillo mientras que en el presente estudio se empleó el crecimiento radial de micelio con un inóculo inicial de 100,000 conidias. Por otro lado, en otro estudio realizado por Gamboa. (2015), por el proceso de diluciones medias empleando caldo Sabraud reportaron que la CMI para el AEA contra *Trichophyton mentagrophytes* fue de 0.586 mg/mL cantidad mucho menor a la que se reporta contra *Aspergillus niger* y *Penicillium* sp. Otro factor que pudiera haber influido entre las diferentes CMI reportadas puede ser el medio de cultivo utilizado, la especie y género de hongo, la composición propia del aceite, entre otros factores.

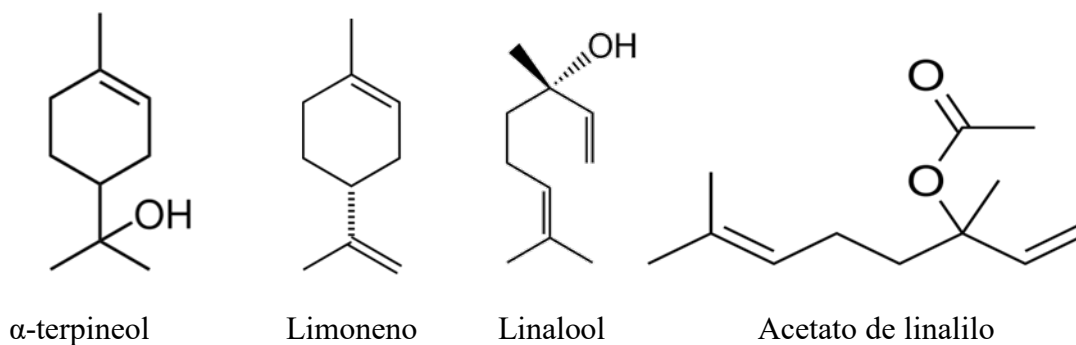
Existen diversas hipótesis sobre los mecanismos de acción para los aceites esenciales. El principal que se propone en la literatura se basa en desestabilizar la membrana celular debido a que los aceites esenciales son lipofílicos, razón por la cual se les facilita interactuar con moléculas de la membrana fúngica. Los fármacos antifúngicos se clasifican según su composición y su mecanismo de acción y según esta clasificación, los aceites esenciales actúan a nivel de la pared (Cuadro 11). En la pared celular se encuentran moléculas como quitina, glucanos y proteínas con las que los aceites esenciales podrían interactuar formando puentes de hidrógeno y modificando así la estructura de la pared celular. Esta modificación puede ocasionar que el intercambio de iones esenciales para el desarrollo fúngico sea inadecuado, causando la muerte celular (Maertens y Boogaerts. 2003; Diomedi, 2004 y Gregori-Valdés, 2005).

**Cuadro 11.** Clasificación de agentes antifúngicos según su estructura y mecanismo de acción.

<b>Estructura</b>	<b>Ejemplos</b>	<b>Mecanismo de acción</b>
Polienos	Nistatina, natamicina, amfotericina B	Antifúngicos interactuando en membrana celular
Azoles	Imidazol: miconazol, clotrimazol Triazoles: fluconazol, itraconazol, ketoconazol Triazoles de segunda generación: voriconazol, ravuconazol, posaconazol	Antifúngicos interactuando en membrana celular
Alilaminas	Terbinafina, naftifina	Antifúngicos interactuando en pared celular
Lipopéptidos	Papulacandinas Triterpenos glicosilados Monoterpenos (aceites esenciales) Equinocandinas: caspofungina, anidulofungina, micafungina	Antifúngicos interactuando en pared celular
Pirimidinas fluoradas	Flucitosina	Antifúngicos interactuando en núcleo

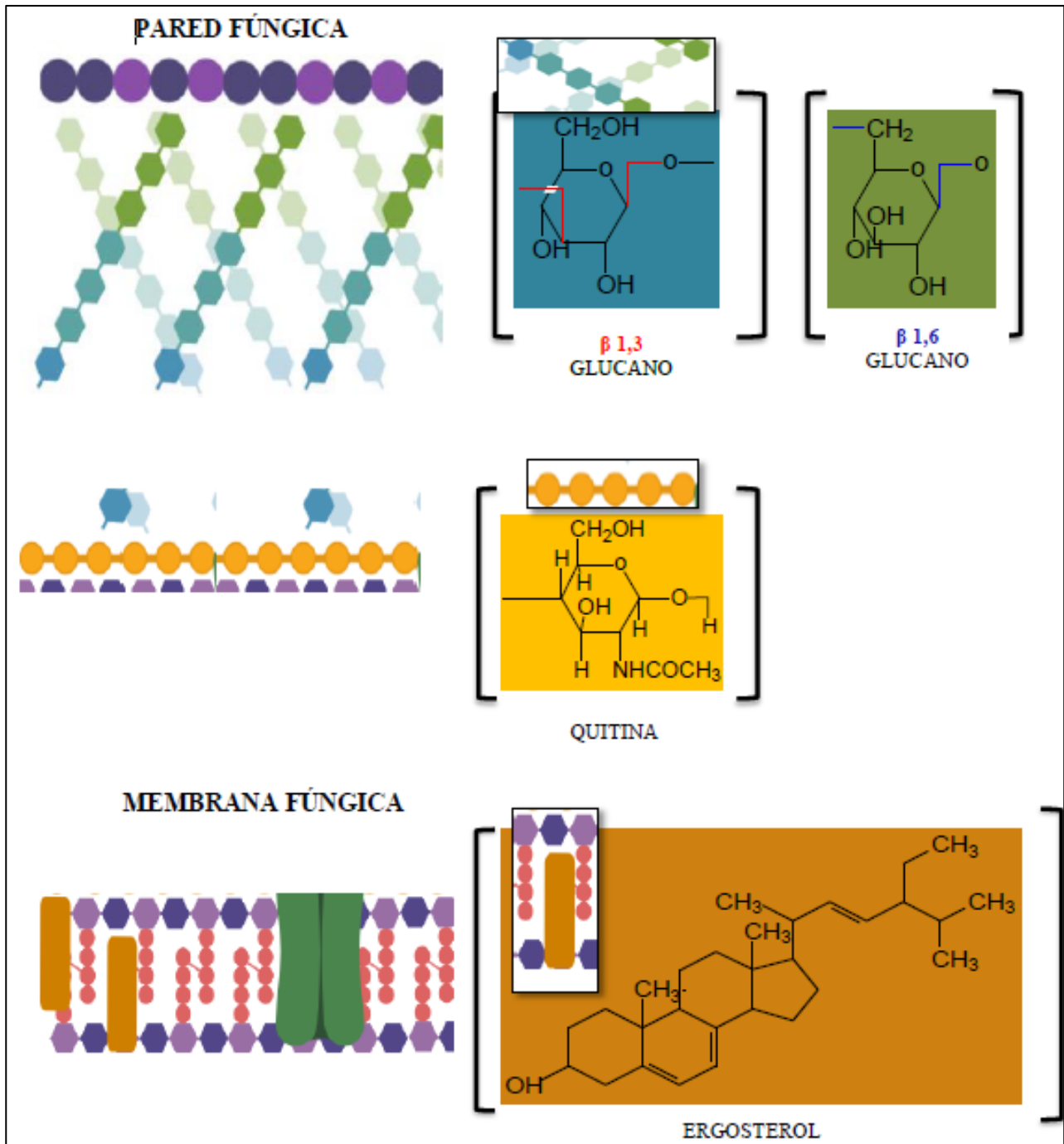
(Maertens y Boogaerts, 2003; Diomedi, 2004; Gregori-Valdés, 2005).

Un estudio realizado por An *et al.* (2019), reportó que la adición de 0.8  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de  $\alpha$ -terpineol a *Aspergillus niger* fue suficiente para causar disrupciones estructurales en los componentes principales de la morfología fúngica observando que, tanto conidióforos como conidias, sufrieron rupturas membranales en cada una de sus estructuras. La adición de estos compuestos terpénicos intervinieron en la ruta de degradación de histidina, asparagina, entre otras, en la pared fúngica ocasionando un desorden metabólico a nivel celular, lo que finalmente provocó apoptosis en cada una de las estructuras del hongo. Otro posible mecanismo de acción de los compuestos terpénicos como  $\alpha$ -terpineol se basa en los grupos funcionales, como lo es el grupo  $-\text{OH}$  el cual podría estar interaccionando con ergosteroles, moléculas estructurales de la membrana fúngica. Avello-Lorca *et al.* (2012), aseveran que los grupos funcionales hidroxilos con cargas polares interaccionan con las zonas polares de ergosteroles y lípidos de membrana en la que se encuentran enzimas como la glucano sintentasa que se encarga de sintetizar glucano para la pared celular; inhibiendo la actividad de esta enzima la presión osmótica se ve comprometida causando muerte celular (Figuras 17 y 18).



**Figura 17.** Compuestos mayoritarios en el AEA (*Citrus aurantium*) (López-Ortiz, 2019).





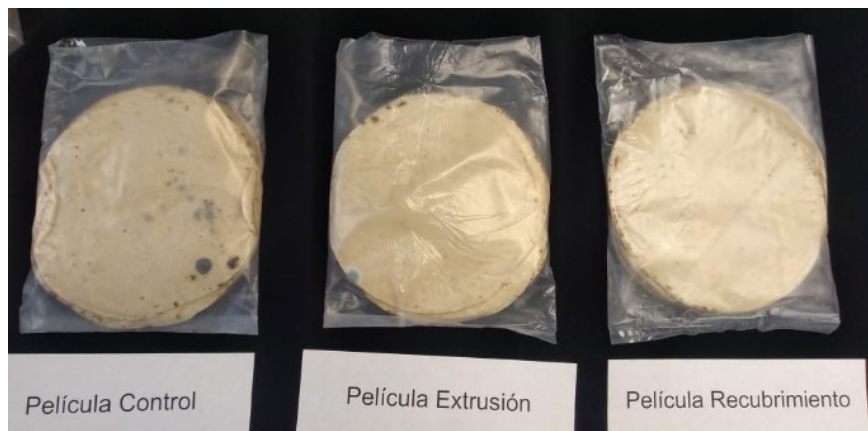
**Figura 18.** Estructuras químicas de los componentes principales de la pared y membrana fúngica.

La demanda de productos mínimamente procesados incentiva la búsqueda de compuestos naturales como lo son los aceites esenciales, los cuales pueden ser empleados como aditivos en la industria alimentaria con el fin de preservar los alimentos por un periodo prolongado. La CMI del AEA frente a *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp y *Escherichia coli*, microorganismos aislados de la tortilla

de maíz, proporciona la cantidad mínima necesaria que se requiere para inhibir su crecimiento. La CMI reportada en el presente estudio se utilizó para decidir qué cantidad de AEA fue necesario adicionar al envase bicapa (PEBD/PEAD) que se evaluó en el siguiente apartado y finalmente, con la información generada en esta sección se cumple el segundo objetivo de la presente tesis.

#### 6.4 Evaluación el Efecto de Envases Activos Bicapa PEAD/PEBD con AEA sobre la Vida de Anaquel de la Tortilla de Maíz.

En el presente trabajo, la vida de anaquel de las tortillas envasadas en el envase control, activo E y activo R fue de 15, 23 y 25 d, respectivamente. En la Figura 19 se muestra el aspecto de las tortillas a los 16 días de almacenamiento.

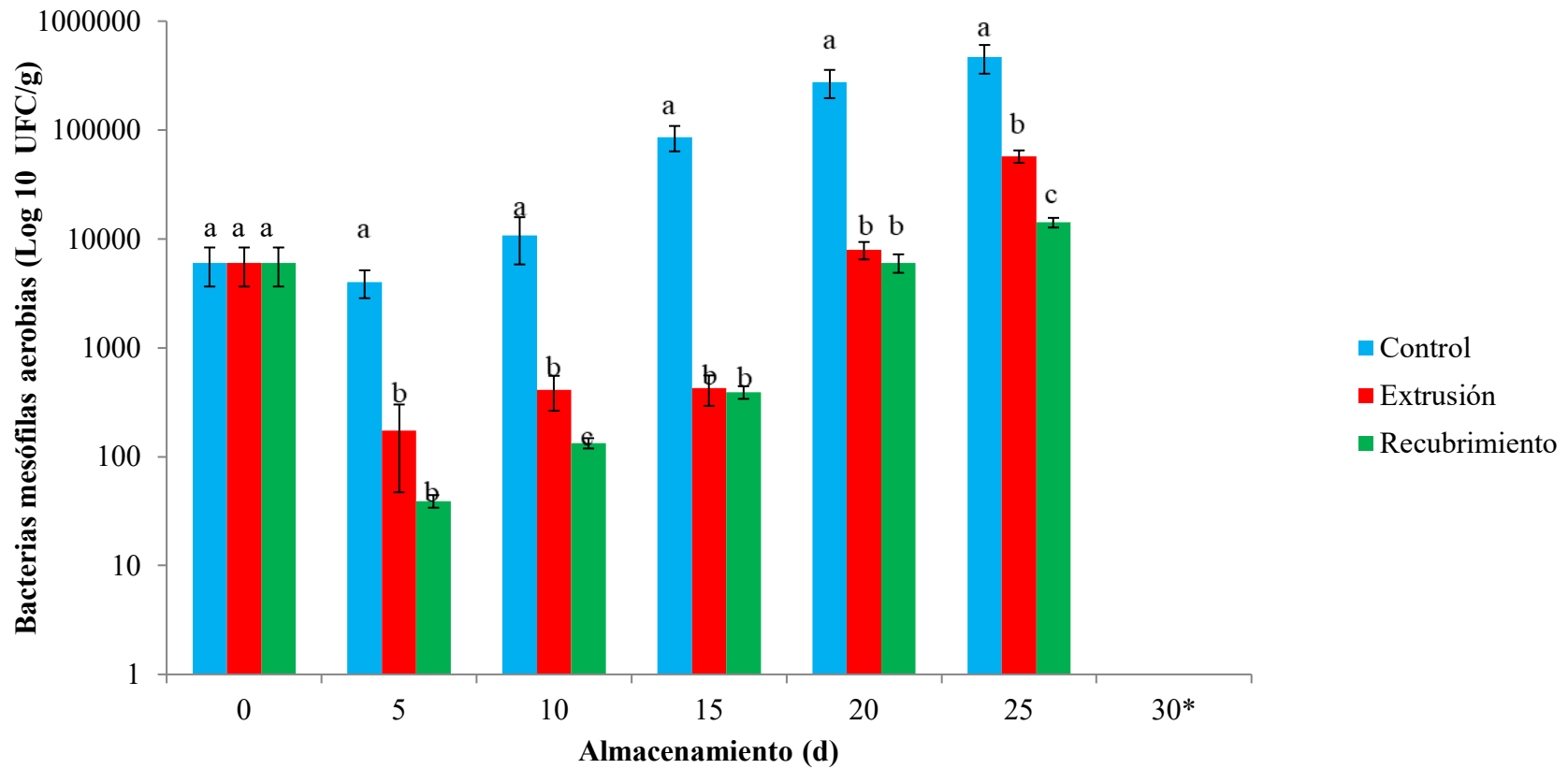


**Figura 19.** Tortillas envasadas en Envases C, E y R después de 16 d de almacenamiento a 5°C.

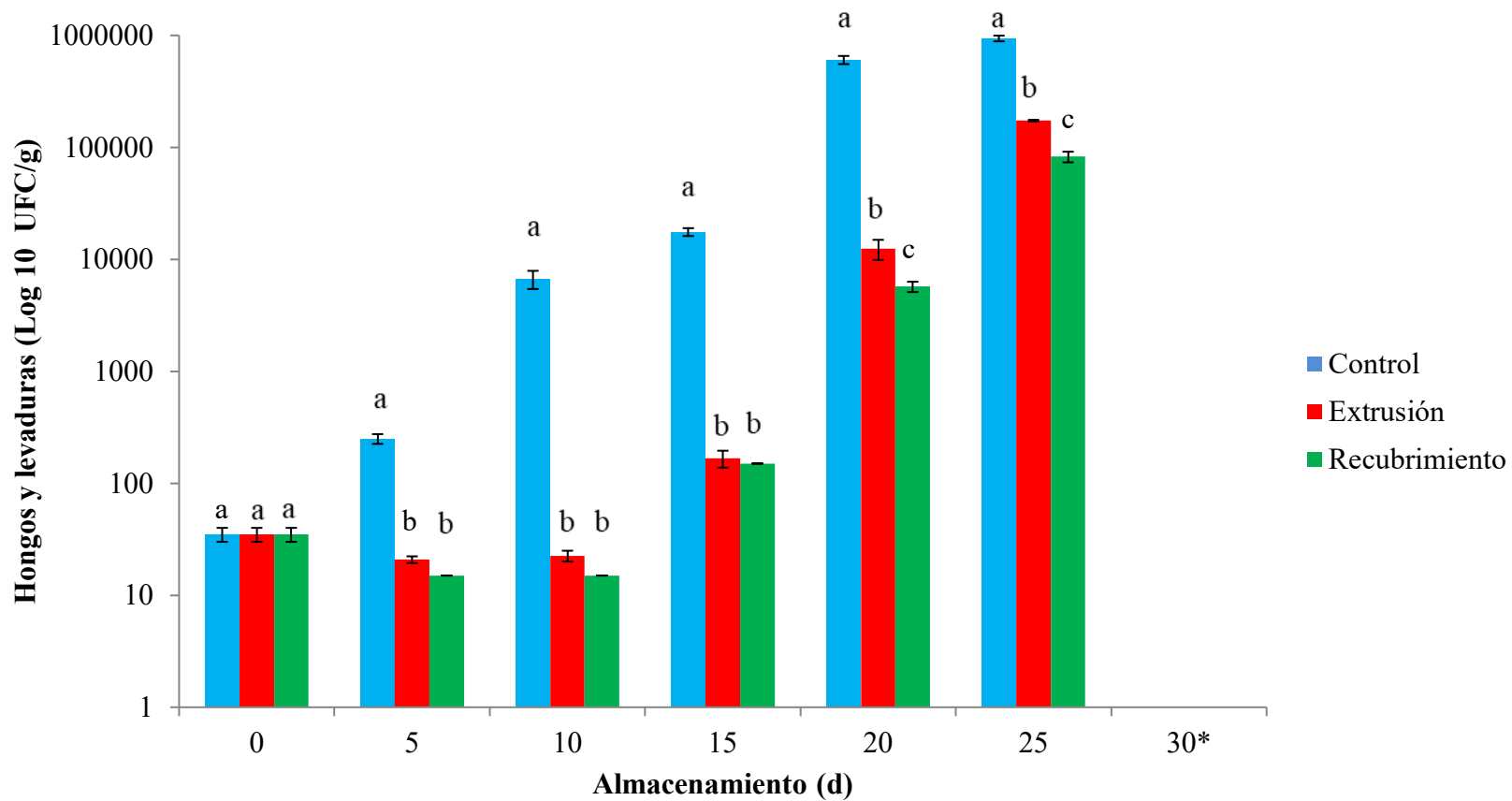
#### 6.4.1 Cuantificación de Bacterias Mesófilas Aerobias Totales, Hongos y Levaduras en la Tortilla de Maíz

En la figura 20 se muestra el crecimiento de BMA en las tortillas envasadas en los envases control (C) y activos (E) y (R). La adición de AEA a los envases E y R redujo en 96 y 87%,

respectivamente, la concentración de UFC/g, comparados con el envase control ( $p \leq 0.05$ ). En la figura 21 se muestra el crecimiento de hongos y levaduras en los envases control y activos E y R.



**Figura 20.** Efecto del AEA sobre el crecimiento de BMA en tortillas de maíz envasadas en bolsas fabricadas por extrusión (E) y recubrimiento (R), comparado con las tortillas envasadas en las bolsas control (C) durante 30 d de almacenamiento a 5°C. Literales distintas indica diferencias significativas en cada tiempo de muestreo. \*BMA incontables.



**Figura 21.** Efecto del AEA sobre el crecimiento de hongos y levaduras en tortillas de maíz envasadas en envases activos fabricados por extrusión (E) y recubrimiento (R), comparado con las tortillas envasadas en los envases control (C), durante 30 d de almacenamiento a 5°C. Literales distintas indica diferencias significativas en cada tiempo de muestreo. \*Hongos y levaduras incontables.

El efecto de los diferentes envases evaluados sobre el crecimiento de hongos y levaduras siguió la misma tendencia que la seguida para BMA. A partir del día 5, el crecimiento de microorganismos fue significativamente menor en las tortillas envasadas en los envases activos con respecto a las envasadas en el control ( $p \leq 0.05$ ). A partir del día 20 de almacenamiento, el crecimiento de microorganismos en las tortillas de los envases activos comenzó a acelerarse, comportamiento similar al reportado por López-Ortiz (2016) y López-Ortiz *et al.* (2016). En ese estudio se evaluó el efecto de la adición de AEA al 1% a la masa para tortilla de maíz sobre el crecimiento de BMA, hongos y levaduras. Los resultados evidenciaron que el efecto del aceite esencial fue disminuir el crecimiento de los microorganismos durante los primeros 15 d de almacenamiento.

La disminución del crecimiento de BMA, hongos y levaduras en la tortilla de maíz envasada en el envase bicapa PEAD/PEBD con AEA se puede atribuir al efecto de migración que se da en los envases hacia los alimentos. Hernández y Gavara, (1999), lo reportan como transferencia de masa, debido al efecto que tiene todo sistema de ir al equilibrio. Así los componentes que se encuentran en el envase activo migran hacia el alimento, proceso que sigue dos mecanismos, de difusión en el plástico y de sorción en las tortillas.

El efecto de migración de aditivos varía dependiendo de su naturaleza química. En el caso del AEA, los compuestos mayoritarios son de naturaleza terpénica los cuales contienen en su estructura grupos funcionales como el hidroxilo que facilitan el proceso de migración hacia el alimento debido a su alta volatilidad y polaridad (Sanz, 2007). Al tener afinidad con las moléculas de agua presentes en la tortilla, resulta en un mejor efecto antimicrobiano lo que prolonga la vida de anaquel de la tortilla de maíz. Como se reportó en la sección que corresponde al objetivo 2, los compuestos con mayor efecto antimicrobiano fueron el linalool y  $\alpha$ -terpineol. Sin embargo, no se puede descartar algún tipo de efecto sinérgico que pudiera ocurrir en el AEA con todos los componentes en conjunto. Según estudios reportados, la aplicación de aceites esenciales en envases es capaz de inhibir y/o disminuir la velocidad de crecimiento de bacterias, hongos y levaduras (Higuera-Barraza *et al.*, 2015; Guerrero *et al.*, 2015; Pontigo-Suárez *et al.*, 2015).

La presencia de BMA en tortillas de maíz ha sido escasamente estudiada. Para el caso de hongos y levaduras, las normas mexicanas no mencionan el límite permitido para la tortilla de maíz. Lo anterior puede deberse a que la tortilla en México se compra y se consume a diario. Sin embargo, en lugares donde no es tan común este alimento, se emplean aditivos artificiales como el sorbato de potasio o propionato de sodio para preservar su calidad (NOM-187-SSA1/SCFI-2002). La

adición de estos aditivos interfiere con las propiedades sensoriales de la tortilla, sin mencionar que el consumo de aditivos artificiales podría ocasionar problemas de salud (Vivas, 2008). Según Walker (1990), se ha detectado urticaria al contacto (no inmunológica) o alguna especie de alergia después del consumo de alimentos con ácido sórbico y sus sales. Además de la adición de aditivos, las buenas prácticas de manufactura son fundamentales para evitar una alta concentración de microorganismos en los alimentos, incluidas las tortillas de maíz. Todo lo anterior, aunado a que hoy en día los consumidores demandan alimentos mínimamente procesados y con aditivos naturales. En este contexto, la alternativa de implementar envases activos que pueden ser los vehículos para aplicar compuestos naturales con actividad antimicrobiana, como el AEA, resulta atractiva. En este caso, los compuestos activos pueden ser liberados durante el almacenamiento o comercialización de alimentos como la tortilla de maíz, prolongando así su vida de anaquel sin depender de los aditivos artificiales que se utilizan actualmente.

El efecto antimicrobiano de los envases E y R, comparados con el control, son evidentes. Con respecto al efecto de cada tipo de envase activo sobre el crecimiento de BMA y hongos y levaduras, en los muestreos de los días 0, 5, 10, 15 y 20 de almacenamiento, no hubo diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ). Sin embargo, al día 25 el envase activo R redujo significativamente el crecimiento de microorganismos en las tortillas comparado con el envase E ( $p \leq 0.05$ ).

Aunque la concentración de los componentes del AEA en los envases E y R fue muy similar (Cuadro 5), una de las posibles razones por las que las tortillas del envase obtenido por extrusión tuvieron mayor crecimiento de microorganismos, comparado con las envasadas en el envase con recubrimiento, pudo ser que el AEA en el envase E se mezcló con el material polimérico durante su elaboración, razón por la cual los compuestos del AEA tuvieron que difundirse primero a través de todo el espesor de la matriz polimérica de la capa de PEBD, para después migrar hacia la tortilla. Por otra parte, en el envase R, la capa interna se recubrió con el AEA, por lo que penetró en la zona más próxima y una vez en contacto con las tortillas, desde allí pudo interaccionar con mayor facilidad, mostrando más efecto antimicrobiano. Las diferentes interacciones del AEA en cada tipo de envase hacia las tortillas repercutió en la vida de anaquel, aumentándola en un 53 y 66% para el envase E y R, respectivamente, comparado con las tortillas envasadas en el envase control.

El tipo de procesamiento de cada envase activo repercutió sobre el crecimiento de UFC/g de BMA, hongos y levaduras; mientras que el contenido de AEA dentro del envase activo modificó también

las propiedades sensoriales del alimento por lo que fue necesario evaluar la aceptabilidad sensorial de cada tortilla envasada en el envase E y R.

#### **6.4.2 Análisis Sensorial en la Tortilla de Maíz Envasadas en bolsas de PEAD/PEBD fabricadas por extrusión y por recubrimiento**

Al añadir algún aditivo a un alimento, ya sea directa o indirectamente, es necesario evaluar su aceptabilidad sensorial. Después de realizar los análisis microbiológicos se observó que a los 10 días de contacto, el crecimiento de BMA en las tortillas del envase E todavía era de  $408 \pm 114$  UFC/g, y en las del envase R era de  $133 \pm 14$  UFC/g. Aunque no se encuentra estipulado el límite máximo para la tortilla de maíz, la NOM-247-SSA1-2008 marca un límite de 2,500 UFC/g BMA para alimentos elaborados a base de cereales como el maíz, por lo que las evaluaciones sensoriales se realizaron a los 10 d de almacenamiento, ya que se consideraron seguras para los panelistas.

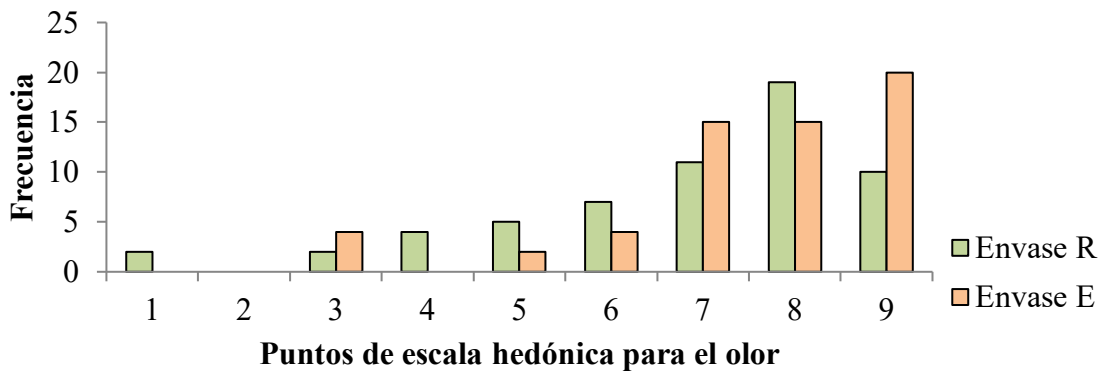
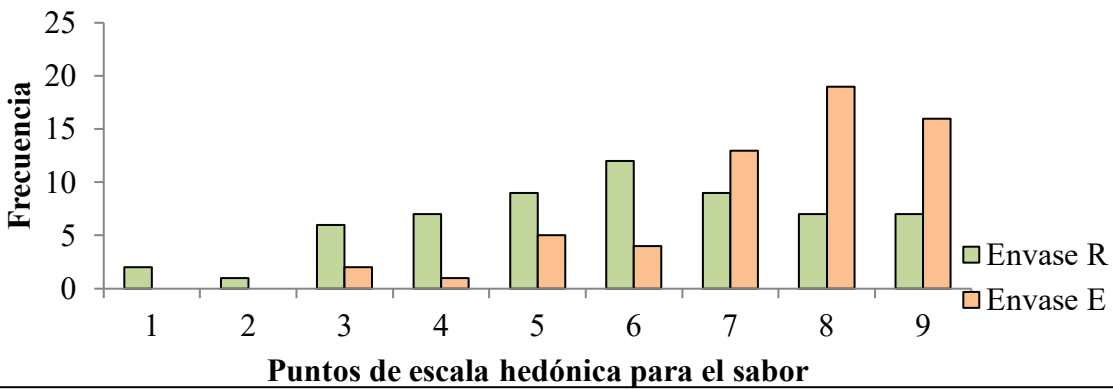
La aceptabilidad de olor de la tortilla envasada fue 83 y 80% para los envases E y R, respectivamente. Estos niveles de aceptación indican una puntuación  $\geq 7$  que corresponde al rango de la escala hedónica utilizada “me gusta moderadamente” – “me gusta extremadamente”. Por otro lado, la aceptabilidad de sabor para los envases E y R fue de 66 y 38%, respectivamente. Los porcentajes mencionados indican que este porcentaje de personas catalogaron el sabor de la tortilla con una puntuación  $\geq 7$  que corresponde a “me gusta moderadamente” – “me gusta extremadamente” en la escala hedónica de nueve puntos (Figura 22). Tanto la aceptabilidad de olor y sabor fue mayor para el envase E que el envase R, mientras que la vida de anaquel fue mayor en el envase R que en el envase E. Los resultados del análisis sensorial indican que las tortillas envasadas en el envase E tuvieron mayor aceptabilidad, esto debido a que el AEA en este envase se encontraba embebido en la matriz polimérica de toda la capa de PEBD, por lo que el AEA tuvo que difundirse a través de la matriz para luego interactuar con las tortillas de maíz, y aunque el tiempo de almacenamiento fue el mismo en ambos envases, la interacción del AEA con el alimento fue distinta. Para el caso del envase R, el AEA se aplicó por recubrimiento en la superficie interna del envase por lo que estaba en la zona más próxima a las tortillas, lo que permitió que la interacción



se diera con mayor facilidad, razón por la cual la vida de anaquel fue mayor y la aceptabilidad fue menor comparada con la aceptabilidad de las tortillas envasadas en el envase E.

Los resultados obtenidos son un avance en el proceso de fabricación de los envases para aumentar la aceptabilidad sensorial. Una de las alternativas que se pudiera implementar para mejorar la aceptabilidad en el envase R es disminuir la concentración de AEA. Al utilizar el envase, los microorganismos que pudieran encontrarse en la tortilla quedan más expuestos a los compuestos activos, por lo que la acción inhibidora del AEA sobre el crecimiento es más eficiente. Por lo que el disminuir la concentración de AEA en este envase pudiera tener el mismo efecto que el envase E pero con mejor aceptabilidad sensorial. Esto también mejoraría la factibilidad económica de la producción del envase R al utilizar menos aditivo con aceptabilidad sensorial y preservar al menos 23 d las tortillas, es decir 8 d más comparado con el control.

Este estudio genera nueva información sobre la aplicación de recubrimientos en envases en la industria alimentaria, con la cual se pueden rediseñar los envases para obtener mejores resultados creando mejores alternativas para su aplicación en investigaciones futuras.



**Figura 22.** Aceptabilidad sensorial de tortillas envasadas en los envases activos elaborados por extrusión (E) y recubrimiento (R) realizado a 60 panelistas.

## 7 CONCLUSIONES

Los microorganismos aislados de las tortillas de maíz evaluadas fueron *Escherichia coli*, *Penicillium* sp y *Aspergillus niger*.

El AEA comercial disminuyó el crecimiento de estos microorganismos.

La adición del AEA en el envase elaborado por extrusión (E) y recubrimiento (R) extendieron la vida de anaquel de la tortilla de maíz en 8 (53%) y 10 d (66%), respectivamente, comparados con el envase control (C).

Las tortillas almacenadas en el envase elaborado por extrusión (E) presentaron una mayor aceptabilidad sensorial comparadas con las tortillas envasadas en el envase obtenido por recubrimiento.

La adición de AEA en los envases para tortillas de maíz resulta una alternativa promisoriosa para disminuir el uso de conservadores artificiales e incentiva la adición de aceites esenciales en envases para alimentos.

## **8 RECOMENDACIONES**

Disminuir la concentración del AEA en la formulación de las películas procesadas por recubrimiento y realizar de nuevo el estudio de vida de anaquel monitoreando el crecimiento microbiano y el efecto sensorial en las tortillas de maíz.

Realizar un estudio de migración de los compuestos de los envases activos hacia alimentos o simulantes de alimentos.

Analizar el comportamiento de los compuestos activos del AEA en diferentes alimentos como productos de panificación o vegetales, ya que son alimentos que se contaminan fácilmente por hongos.

## 9 REFERENCIAS

- Abarca, M. L. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17(3), S79-84.
- Ait-Ouazzou, A., Cherrat, L., Espina, L., Lorán, S., Rota, C., y Pagán, R. (2011). The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. *Innovative Food Science y Emerging Technologies*. 12, 320–329.
- Alarcón-García, Y., Trejo-Márquez, M. A., Corrales-Salinas, A., y Pascual-Bustamante, S. (2015). Desarrollo de un envase activo adicionado con aceites esenciales de cítricos para el control de la podredumbre en fresa. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 16(2), 222-227.
- Alzamora, L., Morales, L., Armas, L., y Fernández, G. (2001). Medicina tradicional en el Perú: actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. *Revista de la Facultad de Medicina*, 62(2), 156-161.
- An, P., Yang, X., Yu, J., Qi, J., Ren, X. y Kong, Q. (2019).  $\alpha$ -terpineol and terpe-4-ol, the critical components of tea tree oil, exert antifungal activities *in vitro* and *in vivo* against *Aspergillus niger* in grapes by inducing morphous damage and metabolic changes of fungs. *Food Control*, 98, 42-53.
- Avello-Lorca, M., Canales, C. L., Valenzuela, C. G., Concha, E. B., Chait, A. B., Pastene-Navarrete, E., y Bittner-Berner, M. (2012). Efectos antimicrobianos de extractos de plantas chilenas de las familias *Lauraceae* y *Atherospermataceae*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(1), 73-83.
- Azhdarzadeh, F., y Hojjati, M. (2016). Chemical composition and antimicrobial activity of leaf, ripe and unripe peel of bitter orange (*Citrus aurantium*) essential oils. *Nutrition and Food Sciences Research*, 3(1), 43-50.
- Bagamboula, CF, Uyttendaele, M., y Debevere, J. (2004) Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*. 21, 33–42.
- Boussaada O. y Chemli R. (2007) Seasonal variation of essential oil composition of *Citrus Aurantium L. var. amara*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 10 (2), 109-120.
- Carballo-Herrera, A., Villarreal-Gómez, A., y Toro-Martínez, J. (2012). La etiqueta nutricional, política de seguridad alimentaria. *Investigación y Desarrollo*, 20 (1), 168-189.
- Carson, C. F., y Riley, T. V. (1995). Antimicrobial activity of the main components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology*. 78, 264–269.
- Castaño, H. I., Gelmy, C. I. R. O., Zapata, J. E., y Jiménez, S. L. (2010). Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis L.* sobre algunas bacterias de interés alimentario. *Vitae*, 17(2), 149-154.
- Catalá, R., y Gavara, R. (2001). Nuevos envases. De la protección pasiva a la defensa activa de los alimentos envasados. *Arbor*, 168(661), 109-127.

- Catalá, R., Hernández y Muroz, P., López y Carballo, G., y Gavara, R. (2009). Materiales para el envasado de frutas y hortalizas con tratamientos mínimos. *Horticultura Internacional*, 69, 60-65.
- Caval Y. W., Alves A.L., Rocha G. D., Dantas L. F., y Wilney W. (2012) Antifungal activity of brazilian plant extracts against *Candida Strains*. *Revista Brasileña de Ciencias de la Salud*. (2), 43-48.
- Coelho-Oliveira, SA, Mina-Zambrana, JR, Reis-Di Iorio, FB, Pereira, CA, y Cardoso-Jorge, AO (2014). The antimicrobial effects of *Citrus limonum* and *Citrus aurantium* essential oils on multi-species biofilms. *Brazilian Oral Research*, 28 (1), 22-27.
- Cos, P., Maes, L., Vlietinck, A. y Pieters, L (2008). Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection – an update (1998 – 2007). *Planta Médica*, 74(11), 1323-1337.
- Cuevas M. J. (2014). Maíz: Alimento fundamental en las tradiciones y costumbres mexicanas. PASOS. *Revista de Turismo y Patrimonio Cultural*, 12 (2), 425-432.
- Di Pasqua, R., Mamone, G., Ferranti, P., Ercolini, D., y Mauriello, G. (2010). Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. *Proteomics*, 10, 1040-1049.
- Diomedi, P. (2004). Nuevos antifúngicos: Las equinocandinas. *Revista Chilena de Infectología*, 21(2), 89-101.
- Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García, D., y Pagán, R. (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*. 22, 896-902.
- Espinoza, A., Arguedas, H., y Asenjo, A. (2004). Intoxicación alimentaria por *Clostridium perfringens* en el Centro Penitenciario Cocori, Cartago, Costa Rica, del 4 al 5 de septiembre del 2002. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 13(24), 82-90.
- European Commission. (2009). Regulation (EC) No. 450/2009. *Official Journal of European Union*, L-135(450), 3-11.
- Figuroa-Rivera, M. G., Rodríguez-Guerra, R., Guerrero-Aguilar, B. Z., González-Chavira, M. M., Pons-Hernández, J. L., Jiménez-Bremont, J. F. y Mendoza-Elos, M. (2010). Caracterización de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición de raíz de maíz en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28(2), 124-134.
- Fisher, K., y Phillips, CA (2006). The mechanism of action of a citrus oil blend against *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of Applied Microbiology* 101, 1232-1240.
- Flores-Chávez, H. D., Villareal-López, J. L., y Villareal-Sánchez, J. A. (2002). Determinación y caracterización de microorganismos presentes en la masa para tortilla de maíz en tortillerías del municipio de Saltillo, Coahuila. *Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales*, 13, 1-11.
- Flores-Farías, R., Martínez-Bustos, F., Salinas Moreno, Y., Ríos, E. (2002). Caracterización de harinas comerciales de maíz nixtamalizado. *Agrociencia*, 36(5), 557-567.
- Gamboa, J. (2015). Actividad antimicótica del aceite esencial de *Citrus aurantium L.* "naranja"

frente a la cepa de *Trichophyton mentagrophytes*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, Perú.

- García-Camarillo, E. A., Quezada-Viay, M. Y., Moreno-Lara, J., Sánchez-Hernández, G., Moreno-Martínez, E., y Pérez-Reyes, M. C. J. (2006). Actividad antifúngica de aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y orégano (*Origanum vulgare* L.) y su efecto sobre la producción de aflatoxinas en nuez pecanera *Carya illinoensis* (FA Wangenh) K. Koch]. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(1), 8-12.
- Gómez-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E., Gálvez, A. M. C., Román-Gutiérrez, A. D., y Castro-Rosas, J. (2013). Presence of coliform bacteria, fecal coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella* on corn tortillas in central México. *Food Control*, 32(1), 31-34.
- González, F., Avila, M., Gil, Y., y Velasco, D. (2016). Proceso de fabricación de la harina precocida de maíz. Facultad de Ingeniería, 609028418, 16.
- Gregori-Valdés, B. S. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*, 39(2), 1-1.
- Guédez, C., Cañizalez, L., Castillo, C., Olivar, R., y Maffei, M. (2010). Alternativas para el control de hongos postcosecha en naranjas valencia (*Citrus sinensis*). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 30(1), 43-47.
- Guerrero, A., Carvalho, C. B., Madrona, G. S., Cestari, L. A., Scapin, M. R. S., y Prado, I. N. (2015). Envases alternativos biodegradables y activos con aceites esenciales para productos cárnicos. *Eurocarne*, 238.
- Hemath-Naveen, KS, Kumar, G., Karthik, L., y Bhaskara-Rao, KV (2010). Biosíntesis extracelular de nanopartículas de plata utilizando el hongo filamentoso *Penicillium* sp. *Archives of Applied Science Research*, 2(6), 161-167.
- Hernández T., Canales M., Teran B., Avila, O. (2007). Antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Cordia curassavica* (Boraginaceae). *Journal of Ethnopharm*, 111(1), 137-141.
- Hernández, R. J. y Gavara, R. (1999). Plastics Packaging. Methods for Studying Mass Transfer Interactions. En: Migración de Componentes y Residuos de Envases en Contacto con Alimentos. Editado por: Catalá R. y Gavara R. Valencia: *Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, CSIC. España. 3-4.
- Hernández-Albíter, RC, Barrera-Necha, LL, Bautista-Baños, S. y Bravo-Luna, L. (2007). Potencial antifúngico de extractos crudos de plantas sobre la germinación conidial de dos símbolos de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. *Revista mexicana de fitopatología*, 25(2), 180-185.
- Hernández-Delgado, S., Reyes-López, M. Á., García-Olivares, J. G., Mayek-Pérez, N., y Reyes-Méndez, C. A. (2007). Incidencia de hongos potencialmente toxígenos en maíz (*Zea mays* L.) almacenado y cultivado en el norte de Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(2), 127-133.
- Higuera-Barraza, OA, Soto-Valdez, H., Acedo-Félix, E., y Peralta, E. (2015). Fabricación de un envase antimicrobiano activo y su efecto sobre el crecimiento de *Pseudomonas* y bacterias aerofóbicas mesofílicas en pollos. *Vitae* 22 (2), 111-120.

- Horvath, RS, y Ropp, ME (1974). Mecanismo de acción del eosina-agar azul de metileno en la diferenciación de *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes*. *Revista Internacional de Microbiología Sistemática y Evolutiva*, 24 (2), 221-224.
- Hsouna, A. y Hamdi, N. (2012). Composición fitoquímica y actividades antimicrobianas de los aceites esenciales y extractos orgánicos de *Pelargonium graveolens* que crecen en Túnez. *Lípidos en Salud y Enfermedad*, 11 (1), 167.
- Ibáñez F. C., Torre P. e Irigoyen A. (2003). Aditivos alimentarios. *Área de nutrición y bromatología. Universidad Pública de Navarra*, 3-5.
- Johnson, B. A., Rooney, L. W., y Khan, M. N. (1980). Tortilla-making characteristics of micronized sorghum and corn flours. *Journal of Food Science*, 45(3), 671-674. |
- Kim, J., Marshall, MR, y Wei, CI (1995). Volatile compounds in stir-fried garlic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43, 2839-2845.
- López-Jácome, L., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., y Franco-Cendejas, R. (2015). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad Medigraphic*, 3 (1), 10-18.
- López-Ortiz, D., Peralta, E. y Soto-Valdez, H. (2016). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos vegetales en la vida de anaquel de tortillas de maíz. Congreso Internacional en Ciencias Alimentarias y Biotecnología. Hermosillo, Sonora.
- López-Ortiz, D. (2016) Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos vegetales en la vida de anaquel de tortillas de maíz. (Tesis de licenciatura). Universidad Tecnológica de Tehuacán.
- López-Ortiz, D. (2019). Comparación de dos tipos de procesos para la elaboración de un envase activo adicionado con aceite esencial de azahar (*Citrus aurantium*). (Tesis de maestría). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Hermosillo, Sonora, México.
- López-Rubio, A., Almenar, E., Hernández-Muñoz, P., Lagarón, J., Catalá, R. y Gavara, R. (2004). Descripción general de las tecnologías de envasado activas basadas en polímeros para aplicaciones alimentarias. *Food Reviews International*, 20 (4), 357-387.
- Luna, M., Lozada, Y., y Trigos, Á. (2010). Aislamiento de cepas de *Aspergillus niger*, productoras de ocratoxina A, en café verde (*Coffea arabica*) almacenado. *Revista Mexicana de Micología*, 32, 63-68.
- Maertens, J., y Boogaerts, M. (2003). Caspofungin in the treatment of candidosis and aspergillosis. *International Journal of Infectious Diseases*, 7 (2), 94-101.
- Maguna, F. P., Romero, A. M., Garro, O. A., y Okulik, N. B. (2006). Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas en Internet. Argentina: *Facultad de Agroindustrias*, 57, 4-5.
- Martínez, A. (1996). Aceites esenciales. *Journal Nature Products*, 59(1), 77-79.
- Martínez-Flores, H., Gaytán-Martínez, M., Figueroa-Cárdenas, J., Martínez-Bustos, F. Reyes-Vega, M., y Rodríguez-Vidal, A. (2004). Effect of some preservatives on shelf-life of corn tortillas obtained from extruded masa. *Agrociencia* 38, 285-292.
- Martínez-Padrón, Y., Hernández-Delgado, S., Reyes-Méndez, C., y Vázquez-Carrillo, G. (2013).



El género *Aspergillus* y sus micotoxinas en maíz en México: Problemática y Perspectivas. *Revista mexicana de fitopatología*, 31(2), 126-146.

Mazzani, C., Borges, O., Luzón, O., Barrientos, V., y Quijada, P. (1999). Incidencia de *Aspergillus flavus*, *Fusarium* moniliforme, aflatoxinas y fumonisinas en ensayos de híbridos de maíz en Venezuela. *Fitopatología de Venezuela*, 12(9), 13.

Méndez, C. R., Vergaray, G., Morante, H. Y., Flores, P. R., y Gamboa, R. A. (2013). Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* O157: H7 a partir de carne molida de bovino en Lima-Perú. *Revista Peruana de Biología*, 20(2), 159-164.

Metoui, N., Gargouri, S., Amri, I., Fezzani T., Jamoussi, B. y Hamrouni, L. (2015) Activity antifungal of the essential oils; aqueous and ethanol extracts from *Citrus aurantium L*, *Natural Product Research*, 29 (23), 2238-2241.

Mollinedo-Patzi, M. A., y Gonzáles-Villalobos, C. (2014). Bacterias Gram Negativas. *Revista de Actualización Clínica*, 49, 2609.

Moreno, A. L., Castro, C. A., Centeno, A., y Giraldo, S. A. (2011). Cinética de la Desinfección Fotocatalítica de Agua contaminada con *Escherichia coli*: Efecto de la Concentración del Fotocatalizador y la Potencia de Irradiación. *Información Tecnológica*, 22(3), 69-78.

Naveena, B.M., Sen, A.R., Vaithyanathan, S., Babji, Y. y Kondaiah, N. (2008). Comparative efficacy of pomegranate juice, pomegranate rind powder extract and BHT as antioxidants in cooked chicken patties. *Meat Science*, 80, 1304-1308.

Navarro-Navarro, L. A., Vázquez, M., y Luis, J. (2016). Cambios en el paisaje arbolado en Hermosillo: escasez de agua y plantas nativas. *Región y sociedad*, 28(67), 79-120.

NCCLS, (2002). National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2002). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twelfth informational supplement. *NCCLS Document M100-S12*, 22, 56-58.

NOM-092-SSA1-1994. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/092ssa14.html>

NOM-110-SSA1-1994. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/110ssa14.html>

NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/111ssa14.html>.

NOM-187-SSA1/SCFI-2002, Productos y servicios. Masa, tortillas, tostadas y harinas preparadas para su elaboración y establecimientos donde se procesan. Especificaciones sanitarias. Información comercial. Métodos de prueba. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/187ssa1scfi02.html>

NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015)

NOM-247-SSA1-2008, Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Métodos de prueba.

<http://www.fao.org/faolex/results/details/es/c/LEX-FAOC088981/>

- Palacios G. F., Delgado G. E., Moreno M. C., Kato M. J. y Rojas C. (2009) Actividad antifúngica *in vitro* de extractos crudos de *Piper tuberculatum*. *Revista Peruana de Biología*, 16(2), 209-214.
- Pereira, E. D. S., Sarquis, M. I. D. M., Ferreira-Keppler, R. L., Hamada, N., y Alencar, Y. B. (2009). Filamentous fungi associated with mosquito larvae (*Diptera: Culicidae*) in municipalities of the Brazilian Amazon. *Neotropical Entomology*, 38 (3), 352-359.
- Pontigo-Suárez, A. G., Trejo-Márquez, M. A., y Lira-Vargas, A. A. (2015). Desarrollo de un recubrimiento con efecto antifúngico y antibacterial a base de aceite esencial de orégano para conservación de papaya 'Maradol'. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 16(1), 58-63.
- Quintana-Obregón, E. A., Plascencia-Jatomea, M., González-Aguilar, G. A., y Cortez-Rocha, M. O. (2010). Inhibición del crecimiento de *Penicillium chrysogenum* por presencia de aceites de *Cinnamomum zeylanicum*, *Allium cepa* y *Cymbopogon citratus*. *Revista Mexicana de Micología*, 32, 59-62.
- Rahimi, A., Hashemi, P., Talei, GR, Borzuei, M., y Ghiasvand, AR (2014). Análisis comparativos de los componentes volátiles de las flores de *Citrus aurantium L.* utilizando SPME del espacio de cabeza asistido por ultrasonidos e hidrodestilación combinada con GC-MS y evaluación de sus actividades antimicrobianas. *Investigación en Química Analítica y Bioanalítica*, 1 (2), 83-91.
- Ramírez-Navas, J. S. (2012). Análisis sensorial: pruebas orientadas al consumidor. *Revista Revisiones de la Ciencia, Tecnología e Ingeniería de los Alimentos*, 12(1), 89-92.
- Ramírez-Santos, J., Contreras-Ferrat, G., y Gómez-Eichelmann, M. (2005). La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. *Revista Latinoamericana Microbiología* 47, 92-101.
- Rangel-Meza, E., Muñoz-Orozco, A., Vázquez-Carrillo, G., Cuevas-Sánchez, J. C., Merino-Castillo, J., y Miranda-Colín, S. (2004). Nixtamalización, elaboración y calidad de tortilla de maíces de Ecatlán, Puebla, México. *Agrociencia*, 38(1), 53-61.
- Ravi-Kiran, S., Sita-Devi, P., y Janardhan Reddy, K. (2008). Evaluation of in vitro antimicrobial activity of leaf and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1909-1914.
- Rooney L.W. y Serna S.O. (2016). Tortillas. *Módulo de Referencia en Ciencia de los alimentos*. 90-96. Monterrey, México. Elsevier. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00124-4>.
- SAGARPA (2017) Planeación agrícola nacional 2017-2030. Fecha de consulta: 23 de octubre del 2019. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256429/B\\_sico-Ma\\_z\\_Grano\\_Blanco\\_y\\_Amarillo.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256429/B_sico-Ma_z_Grano_Blanco_y_Amarillo.pdf)
- Salinas-Moreno, Y., Pérez-Herrera, P., Castillo-Merino, J., y Álvarez-Rivas, L. (2003). Relación de amilosa: amilopectina en el almidón de harina nixtamalizada de maíz y su efecto en la calidad de la tortilla. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 26 (2), 115-121.
- Sanz, J. S. (2007). Agua es vida. *Revista Real Academia de Ciencias, Zaragoza*, 62, 65-74.
- Scamarone S. G. (2018) Efecto antimicrobiano de *Citrus aurantium* comparado con Oxaciclina en

cepas de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo. (Tesis de licenciatura). Universidad de César Vallejo. Facultad de Medicina. Trujillo, Perú.

- Schipilliti, L., Dugo, G., Santi, L., Dugo, P., y Mondello, L. (2011). Authentication of bergamot essential oil by gas chromatography-combustion-isotope mass spectrometer (GC-C-IRMS). *Journal of Essential Oil Research*, 23, 60-71.
- Sherif A.E, Marzouk A.M., Zaghloul M.G., y Halim A.F (2015) Chemical composition and cytotoxic activity of petitgrain essential oil of *Citrus aurantium L.* "Russian colon". *Journal of American Science*, 11(8), 64-68.
- Soriano C.I., Buendía G. M., Palacios R. N., Martínez C. E., Villaseñor H. E., y Santa R. R. (2016) Quality ssement corn tortilla added with oatmeal (*Avena Sativa L.*) nixtamalized. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(7), 1715-1725.
- Trabelsi, D., Hamdane, A. M., Said, M. B., y Abdrrabba, M. (2016). Chemical composition and antifungal activity of essential oils from flowers, leaves and peels of Tunisian *Citrus aurantium* against *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(7), 1660-1674.
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, MG, Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G., y Bisignano, G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49, 2474–2478.
- Trujillo-Bonifaz, J. A. B., González, D. V., y Araiza, J. (2012). *Micología Médica Básica*. McGraw-Hill Interamericana. Editores S.A. de C.V. México D.F.
- Tserennadmid, R., Takó, M., Galgóczy, L., Papp, T., Vágvölgyi, C., Gerő, L., y Krisch, J. (2010). Antibacterial effect of essential oils and interaction with food components. *Open Life Sciences*, 5(5), 641-648.
- Valenzuela, C., y Pérez, P. (2016). Actualización en el uso de antioxidantes naturales derivados de frutas y verduras para prolongar la vida útil de la carne y productos cárneos. *Revista chilena de nutrición*, 43(2), 188-195.
- Varela, G., y Grotiuz, G. (2008). *Fisiología y metabolismo bacteriano*. Uruguay, Editorial Cefa, 43-58.
- Vivas, R. J. (2008) El riesgo en los niños del consumo de alimentos transformados. Los agentes químicos en los alimentos. *Isla de Arriarán: Revista Cultural y Científica*, (32), 279-331.
- Walker, R. (1990). Toxicología del ácido sórbico y sorbatos. *Aditivos alimentarios y contaminantes*, 7(5), 671-676.
- Weber, R. J. (2008) Shelf life extension of corn tortillas. (Tesis de maestría). Kansas State University. Manhattan, Kansas. Estados Unidos de América.
- Wolffenbüttel, A. N., Zamboni, A., Becker, G., dos Santos, M. K., Borille, B. T., de Cássia Mariotti, K., y de Moura Linck, V. (2018). Citrus essential oils inhalation by mice: Behavioral testing, GCMS plasma analysis, corticosterone, and melatonin levels evaluation. *Phytotherapy Research*, 32(1), 160-169.
- Zarrad, K., Hamoudab A., Chaiebb, I, Laarifb, A., Mediouni-Ben Jemâa, J. (2015) Chemical composition, fumigant and anti-acetylcholinesteraseactivity of the Tunisian *Citrus aurantium L.* essential oils. *Industrial Crops and Products*, 76, 121-127.

Zeng, WC, Zhu, RX, Jia, LR, Gao, H., Zheng, Y. y Sun, Q. (2011). Composición química, antimicrobiana y actividad antioxidante de esencial aceite de *Gnaphlium affine* . *Food Chemistry Toxicology*. 49, 1322-1328.

## 10 ANEXOS

Nombre \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_

Edad \_\_\_\_\_

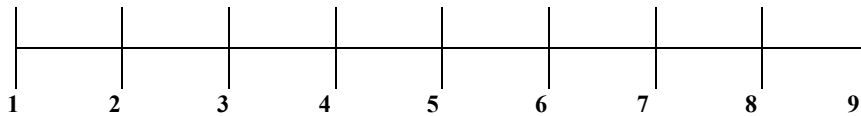
Sexo \_\_\_\_\_

### INSTRUCCIONES

Frente a usted se presentan tres muestras de tortilla de maíz. Por favor observe y pruebe cada una de ellas, yendo de izquierda a derecha. Indique el grado en el que le disgusta o agrada el atributo de cada muestra, de acuerdo al puntaje/categoría, cruce con una raya el número correspondiente de acuerdo al grado de gusto que percibe para cada atributo.

Puntaje	Categoría	Puntaje	Categoría
1	Me disgusta extremadamente	6	Me gusta levemente
2	Me disgusta mucho	7	Me gusta moderadamente
3	Me disgusta moderadamente	8	Me gusta mucho
4	Me disgusta levemente	9	Me gusta extremadamente
5	No me gusta ni me disgusta		

#### OLOR



#### SABOR



Boleta para prueba hedónica para la evaluación de la calidad sensorial de las tortillas de maíz almacenadas a 5°C en los diferentes envases activos.