



**SEP**  
SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
en Celaya



# TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO EN CELAYA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

TÍTULO DE TESIS

**EFFECTO DEL PROCESO DE MICROENCAPSULACIÓN  
SOBRE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DEL  
EXTRACTO ACETÓNICO DE *HIBISCUS SABDARIFFA* L.  
EN MEDIO DE CULTIVO Y EN UN EMBUTIDO**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

PRESENTA:

**M. en C. ULIN ANTOBELLI BASILIO CORTES**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. LEOPOLDO GONZÁLEZ CRUZ**

CO- DIRECTOR:

**DR. JAVIER CASTRO ROSAS**



CELAYA, GUANAJUATO, MÉXICO.

MARZO, 2020.

# AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN



**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
en Celaya

"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

Celaya, Gto., 23/enero/2020

POSGRADO DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

OFICIO No. DCIBQ/01/01/2020

Asunto: Autorización de Impresión Tesis

**ING. TERESA SÁNCHEZ PÉREZ**  
**JEFA DEL DEPTO. DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**  
**PRESENTE**

De acuerdo con la convocatoria hecha por la jefatura a su digno cargo, para que en reunión de los miembros del comité tutorial de la tesis avalada por el Claustro Doctoral del Doctorado en Ciencias en Ingeniería Bioquímica se examinara la tesis titulada:

**"Efecto del proceso de microencapsulación sobre la capacidad antimicrobiana del extracto acetónico de *Hibiscus sabdariffa* L. en medio de cultivo y en un embutido."**

Presentada por el alumno: **C. Ulin Antobelli Basilio Cortés** con número de control **D1403008**, Aspirante al Grado de Doctor en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Después de intercambiar opiniones, los miembros del comité tutorial, manifestaron **APROBAR y AUTORIZAR LA IMPRESIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**ATENTAMENTE**  
*La técnica por un México mejor ®*  
**EL COMITÉ TUTORIAL**

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Leopoldo González Cruz  
DIRECTOR DE TESIS

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Javier Castro Rosas  
CO-DIRECTOR DE TESIS

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Aurea Bernardino Nicanor  
SECRETARIO

 **EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

 **TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO**  
en Celaya

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Hugo Jiménez Islas  
VOCAL

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa  
ASESOR EXTERNO

**POSGRADO DE INGENIERÍA**  
**BIOQUÍMICA**

COORDINADOR DEL DOCTORADO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA  
BIOQUÍMICA

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Leopoldo González Cruz

C.c. p. Dr. Eloy Conde Barajas.- Presidente del Claustro Doctoral  
LGC/mgg



Av. Antonio García Cubas #600 esq. Av. Tecnológica, Colonia Alfredo V. Bonfil, C.P.38010  
Celaya, Gto. Ap 57, Conmutador 01 (461) 611 75 75 e-mail: lince@itcelaya.edu.mx  
www.tecnm.mx | www.itcelaya.edu.mx

## **DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS**

Dedico este trabajo de investigación a mi esposa Lourdes y a mi hijo Chris Antobelli, así como también a mi madre Reyna Isabel Cortes Cobarrubias, mi padre Pedro Basilio Ramirez, mis hermanos Iris Aline y Hans Cristian, a todos ellos que amo tanto, por estar siempre apoyándome en las diferentes etapas de este proceso universitario de posgrado.

Agradezco al departamento de Ingeniería Bioquímica del Tecnológico de Celaya y al Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, a todos los profesores-investigadores por la confianza en ayudarme en mi formación académica-profesional; a mi director, co-director y asesores por guiar esta investigación y formar parte de otro objetivo alcanzado. Agradezco de igual forma a mis amigos de Progreso de Obregón, Hidalgo.

A todos y cada uno de ustedes, les agradezco infinitamente.

## ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I	
Antecedentes.....	1
1.1. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs).....	1
1.2. Embutidos.....	2
1.2.1. Jamón cocido.....	2
1.3. Bacterias patógenas en productos cárnicos.....	3
1.3.1. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	5
1.3.2. <i>Salmonella</i> .....	6
1.3.3. <i>Escherichia coli</i> .....	7
1.3.4. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	8
1.3.5. <i>Shigella</i> .....	8
1.4. Métodos de conservación en cárnicos.....	9
1.4.1. Envasado al vacío.....	10
1.4.2. Películas biodegradables.....	10
1.4.3. Compuestos bioactivos.....	11
1.5. Antimicrobianos de origen natural.....	12
1.5.1. Bacteriano.....	12
1.5.2. Animal.....	13
1.5.3. Vegetal.....	14
1.5.3.1. Cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. (HS).....	16
1.6. Microencapsulación.....	17
1.6.1. Secado por aspersion.....	17
1.6.1.1. Material de pared.....	20
1.7. Almidón.....	21
1.7.1. Características y propiedades del almidón de maíz.....	22
1.8. Almidón modificado.....	22
1.8.1. Hidrólisis ácida.....	23
1.8.2. Esterificación.....	24
1.8.3. Extrusión.....	24

1.9. Pectina .....	26
1.9.1. Pectinas de bajo metoxilo. ....	26
1.9.2. Pectinas de alto metoxilo. ....	26
1.10. Liberación de compuestos .....	26
1.10.1. Liberación por difusión .....	27
JUSTIFICACIÓN.....	29
HIPÓTESIS .....	30
OBJETIVOS.....	30
Objetivo General.....	30
Objetivos específicos.....	30
<b>CAPÍTULO II</b>	
Materiales y métodos.....	31
2. Materia prima .....	31
2.1. Caracterización fisicoquímica de almidón nativo y modificado .....	31
2.1.1. Determinación del contenido de amilosa.....	31
2.1.2. Solubilidad (S) y poder de hinchamiento (SP) en función de la temperatura .....	31
2.1.3. Determinación de la viscosidad pico (VP) .....	32
2.1.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....	32
2.1.5. Análisis de perfil de textura (TPA).....	33
2.1.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	33
2.1.7. Hidrólisis ácida.....	33
2.1.7.1. Optimización del proceso de hidrólisis ácida .....	34
2.2. Esterificación.....	34
2.2.1. Grado de sustitución (GS) y eficiencia de reacción (ER).....	34
2.2.2. Espectroscopia de infrarrojo (FT-IR) .....	36
2.2.3. Espectroscopia de Raman (FT-Raman).....	36
2.3. Extrusión de almidón modificado.....	37
2.4. Obtención del extracto acetónico de <i>Hibiscus safdariffa L.</i> ....	37
2.5. Proceso de microencapsulación del extracto de HS y optimización .....	38
2.5.1. Caracterización de microcápsulas .....	39
2.5.1.1. Actividad de agua ( $a_w$ ).....	39

2.5.1.2. pH .....	39
2.5.1.3. Humedad.....	39
2.5.1.4. Higroscopicidad.....	40
2.5.1.5. Compuestos fenólicos totales, superficiales y eficiencia de encapsulación .....	40
2.5.1.6. Distribución de tamaño de partícula.....	41
2.6. Actividad antimicrobiana .....	41
2.6.1. Cepas .....	41
2.6.2. Ensayos del extracto y microcápsulas en medio de cultivo.....	41
2.6.3. Elaboración del jamón .....	41
2.6.4. Ensayos en jamón .....	42
2.6.4.1. Recuentos microbianos.....	43
2.7. Caracterización fisicoquímica y textural del jamón .....	43
2.7.1. Determinación de pH.....	43
2.7.2. Rendimiento y humedad.....	43
2.7.3. Análisis de color .....	43
2.7.4. Análisis de perfil de textura (TPA).....	44
2.8. Difusión del extracto microencapsulado <i>in vitro</i> .....	44
2.8.1. Coeficientes de difusión de microcápsulas.....	45
2.9. Análisis estadístico .....	47
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>48</b>
3. Caracterización fisicoquímica de almidón nativo y modificado .....	48
3.1. Efecto del tiempo de hidrólisis y de la concentración de ácido clorhídrico sobre las propiedades fisicoquímicas de almidón hidrolizado .....	48
3.1.1. Efecto del tiempo de hidrólisis y de la concentración de ácido clorhídrico sobre la solubilidad (S) y el poder de hinchamiento (SP) del almidón de maíz a diferentes temperaturas.....	50
3.1.2 Viscosidad de Pico (VP).....	53
3.1.3. Análisis de perfil de textura (TPA).....	53
3.1.4. Morfología y tamaño de partícula (SEM).....	54

3.1.5. Optimización del proceso de hidrólisis ácida.....	55
3.2. Efecto de la esterificación con anhídrido octenil succínico (OSA) sobre las propiedades físicoquímicas de almidón modificado.....	56
3.2.1. Efecto del grado de sustitución (GS) y eficiencia de reacción (ER) sobre OSCS y HOSCS .....	56
3.2.2. Solubilidad (S) y poder de hinchamiento (SP) en función de la temperatura .....	56
3.2.3. Análisis de perfil de viscosidad de pico (VP).....	60
3.2.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....	61
3.2.5. Microscopia electrónica de barrido (SEM) .....	64
3.2.6. Espectroscopia de infrarrojo (FT-IR) .....	65
3.2.7. Espectroscopia de Raman (FT-Raman).....	67
3.2.8. Morfología de almidón modificado extrudido.....	69
3.3. Caracterización de microcápsulas .....	70
3.3.1. Humedad, pH, aw, higroscopicidad y eficiencia de encapsulación.....	70
3.3.2. Morfología y tamaño de partícula .....	72
3.3.3. Distribución de tamaño de partícula.....	74
3.4 Actividad antimicrobiana .....	77
3.4.1 Extracto en medio de cultivo .....	77
3.4.2 Microcápsulas en medio de cultivo .....	77
3.5. Coeficientes de difusión del extracto microencapsulado .....	80
3.6. Optimización del proceso de secado por aspersión.....	81
3.6.1. Morfología y tamaño de partícula de microcápsulas.....	82
3.7. Efecto antimicrobiano de microcápsulas en jamón.....	83
3.7.1. Propiedades físicoquímicas y de textura del jamón.....	86
CONCLUSIONES.....	89
BIBLIOGRAFÍA .....	91

## ÍNDICE DE FIGURAS

1.1. Esquematación del proceso de secado por aspersión .....	18
1.2. Esquema de un extrusor y sus componentes .....	25
2.1. Representación esquemática del ensayo de difusión; a) Portaobjetos con cuadrantes esquematizados, b) colocación del agar sobre el portaobjetos, c) corte de cuadrantes del agar .....	45
3.1. Efecto del tiempo (h) de hidrólisis y concentración de ácido clorhídrico HCl (mol/L), sobre S a 25 °C (a), 60 °C (b), 70 °C (c), 80 °C (d) y 90 °C (e) y SP a 25 °C (f), 60 °C (g), 70 °C (h), 80 °C (i) y 90 °C (j) .....	52
3.2. . Efecto del tiempo (h) de hidrólisis y concentración de ácido clorhídrico HCl (mol/L), sobre la viscosidad de pico (a) y dureza (b). .....	54
3.3. Micrografías de los gránulos de almidón de maíz; nativo e hidrolizados a diferentes tiempos y concentraciones de HCl. ....	55
3.4. Perfil de viscosidad de almidón de maíz (CS), almidón de maíz succinatado (OSCS), almidón de maíz hidrolizado (HCS), almidón de maíz succinatado hidrolizado (HOSCS)..	61
3.5. Termograma de gelatinización del almidón de maíz, de 40 a 95 °C, a 5 °C / min (CS) almidón de maíz, (HCS) almidón de maíz hidrolizado, (OSCS) almidón de maíz succinatado, (HOSCS) almidón de maíz succinatado hidrolizado. ....	62
3.6. Micrografías de los gránulos de almidón almidón de maíz (CS), almidón de maíz succinatado (OSCS), almidón de maíz hidrolizado (HCS), almidón de maíz succinatado hidrolizado (HOSCS) .....	65
3.7. Espectros FT-IR de almidón de maíz (CS), almidón de maíz succinatado (OSCS), almidón de maíz hidrolizado (HCS), almidón de maíz succinatado hidrolizado (HOSCS).	67
3.8. Espectros FT-Raman de almidón de maíz (CS), almidón de maíz succinatado (OSCS), almidón de maíz hidrolizado (HCS), almidón de maíz succinatado hidrolizado (HOSCS).	69
3.9. Morfología del almidón de maíz doblemente moodificado extrudido. ....	70
3.10. Morfología de microcápsulas obtenidas a diferentes porcentajes de MLP y temperaturas de secado por aspersión. ....	74
3.11. Distribución de tamaño de partícula de microcápsulas obtenidas de almidón modificado a diferentes porcentajes de MLP y temperaturas de secado por aspersión.....	76
3.12. Actividad antimicrobiana de microcápsulas obtenidas de almidón modificado y MLP (0, 5, 10%) a diferentes temperaturas de secado por aspersión .....	79

3.13. Micrografías de EHOSCS, a) 250X, b)500X, c) 1000X y microcápsulas óptimas d) 500X, e) 1000X, f) 3000X a diferentes magnificaciones .....	83
3.14. Obtención de jamón con microcápsulas.....	84
3.15. Cinética de actividad antimicrobiana de trozos de jamón con microcápsulas empacados al vacío en refrigeración; a) <i>S. Typhimurium</i> y b) <i>S. aureus</i> .....	85

## ÍNDICE DE TABLAS

1.1. Modificaciones en almidones .....	23
2.1. Diseño central compuesto rotatable de dos factores ( $\alpha=1.414$ ).....	34
2.2. Diseño experimental factorial $2^3$ para la optimización del proceso de microencapsulación .....	39
3.1. Coeficientes estimados del modelo ajustado y nivel de significancia para todas las respuestas evaluadas para almidones hidrolizados de CS .....	49
3.2. Solubilidad (S) y poder de hinchamiento (SP) de almidones modificados a diferentes temperaturas.....	59
3.3. Propiedades térmicas de almidón nativo y modificados .....	64
3.4. Caracterización de microcápsulas ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) obtenidas después del secado por aspersión.....	73
3.5. Efecto antimicrobiano del extracto acetónico de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. representados en mm de inhibición .....	77
3.6. Coeficientes de difusión ( $D \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) de microcápsulas .....	81
3.7. Optimización del proceso de secado por aspersión .....	81
3.8. Propiedades fisicoquímicas de jamón sustituyendo almidón de maíz por microcápsulas de extracto acetónico de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	88
3.9 Propiedades texturales de jamón sustituyendo almidón de maíz por microcápsulas de extracto acetónico de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	88

## Resumen

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de microcápsulas del extracto acetónico de *Hibiscus sabdariffa* L. (HS) incorporadas en jamón cocido de cerdo. Para cumplir con dicho objetivo, primero se obtuvo el almidón de maíz triplemente modificado (hidrólisis ácida, succinatación y extrusión), posteriormente se optimizó el proceso de secado por aspersión del extracto acetónico de HS utilizando un diseño factorial  $2^3$ , empleando como material de pared, almidón modificado y pectina de bajo metoxilaje a diferentes temperaturas de secado (100, 120 y 140 °C). Una vez encapsulado el extracto acetónico de HS bajo condiciones óptimas, se procedió a evaluar la actividad antimicrobiana en un jamón cocido de cerdo tipo serrano empacado al vacío, inoculado con bacterias patógenas (*Salmonella Typhimurium* y *Staphylococcus aureus*), obteniendo exitosamente inhibición en ambas bacterias. Finalmente, en este trabajo se evaluó la difusibilidad *in vitro* de las microcápsulas obtenidas mediante la ley de Fick, observando que la difusión de los compuestos con actividad antimicrobiana microencapsulados dependen fundamentalmente del material de pared, así como también de la temperatura de secado. Las microcápsulas obtenidas en este trabajo son apropiadas para conservar jamón serrano por un determinado lapso de tiempo, por lo que, puede ser una alternativa como un conservador de origen natural.

## **Abstract**

The objective of this work was to evaluate the antimicrobial activity of microcapsules of the acetonc extract of *Hibiscus sabdariffa* L. (HS) incorporated in cooked pork ham. To meet this objective, triple-modified corn starch was first obtained (acid hydrolysis, succinate and extrusion), then the spray drying process of HS acetonc extract was optimized using a factorial design 2<sup>3</sup>, using as wall material, modified starch and pectin of low methoxylation at different drying temperatures (100, 120 and 140 ° C). Once the HS acetonc extract was encapsulated under optimal conditions, the antimicrobial activity was evaluated in a vacuum-packed serrano-type ham, inoculated with pathogenic bacteria (*Salmonella* Typhimurium and *Staphylococcus aureus*), successfully obtaining inhibition in both bacteria. Finally, in this work the *in vitro* diffusibility of the microcapsules obtained by Fick's law was evaluated, observing that the diffusion of the compounds with microencapsulated antimicrobial activity depends fundamentally on the wall material, as well as on the drying temperature. The microcapsules obtained in this work are suitable for preserving serrano ham for a certain period of time, so it can be an alternative as a preservative of natural origin.

## Introducción

El jamón tipo serrano es un embutido cárnico cocido curado, el cual, a pesar de ser sometido a procesos térmicos y de curación no es un producto completamente inocuo, ya que por su composición represente un medio apropiado para el desarrollo de bacterias patógenas, por presentar una gran cantidad de agua, minerales, compuestos nitrogenados, carbohidratos susceptibles a fermentación y un pH favorable para el desarrollo microbiano.

Los nitritos y los nitratos son adicionados a los embutidos, principalmente, para generar el color rosado característico, causado por la oxidación del ion hierro que posee la hemoglobina, además de inhibir el desarrollo de *Clostridium botulinum*, sin embargo, el uso de estas sustancias, puede generar compuestos como las nitrosaminas, las cuales, se han identificado como precursoras de cáncer (neoplasia) en el tracto intestinal. En este tipo de productos cárnicos, al ser empacados al vacío, no se puede garantizar la inocuidad de los mismos, ya que estos se pueden contaminar con algunas bacterias tales como *Salmonella Typhimurium* y *Staphylococcus aureus*, estos microorganismos patógenos por su gran importancia a nivel mundial tanto en países en desarrollo como en países desarrollados, están presentes en la carne de cerdo y comúnmente en la piel e incluso en las fosas nasales de los seres humanos, por lo que existe el riesgo de que estos patógenos lleguen a los productos cárnicos durante su elaboración y manipulación. Tomando en cuenta estos problemas se han implementado diversas técnicas para la conservación de estos productos cárnicos, mediante la adición de químicos como agentes antimicrobianos, sin embargo, existen reportes acerca de los efectos secundarios causados por la ingesta cotidiana de alimentos con conservadores. En las últimas décadas, el uso de sustancias químicas sintéticas como conservadores está siendo sustituido por el uso de antimicrobianos de origen natural, cumpliendo una doble función-beneficio para reforzar y garantizar la inocuidad de un alimento, así como también proveer compuestos benéficos para el cuerpo humano. En consecuencia, los problemas relacionados con la inocuidad de los embutidos, demandan la necesidad de establecer medidas de control opcionales para este tipo de alimentos, una de las opciones potenciales, es el uso de antimicrobianos de origen vegetal, extraídos de los cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. (HS), ya que, estos han demostrado tener potencial antimicrobiano contra diferentes microorganismos patógenos aerobios y anaerobios. Otro reto relacionado con el uso de estos antimicrobianos en los alimentos es el interés de proteger, mantener y liberar estos

compuestos bioactivos de forma gradual, para contribuir al control de la inocuidad microbiana de los alimentos, sin alterar sus propiedades organolépticas y disminuir el riesgo implícito en el uso de conservadores químicos sintéticos.

En el presente trabajo se estudió el efecto antimicrobiano del extracto acetónico de HS microencapsulado, empleando como sistema modelo un jamón de cerdo cocido. Las condiciones óptimas del proceso de secado por aspersión para obtener las microcápsulas, fueron establecidas empleando un diseño factorial  $2^3$ , para ello se usó una mezcla de almidón de maíz, previamente modificado (hidrolizado, succinatado, extrudido) y pectina de bajo metoxilo, como material de pared a diferentes temperaturas de secado (100, 120 y 140 °C), con la finalidad de obtener un material tecno-funcional, capaz de formar microcápsulas con características que permitieran una mejor difusión de los compuestos antimicrobianos (bioactivos). Previamente se calcularon los coeficientes de difusión (*in vitro*) de los compuestos activos presentes en las microcápsulas mediante la Ley de Fick, observando que las microcápsulas liberan el compuesto activo de HS, evidenciándose que la velocidad de liberación de los compuestos activos depende de la composición del material de pared empleado, así como también de la temperatura de secado y del medio o matriz alimentaria usada (jamón).

# CAPÍTULO I

## **Antecedentes**

### **1.1. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs)**

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) constituyen un problema importante de salud pública, debido al incremento en su ocurrencia, al surgimiento de nuevas formas de transmisión, a la aparición de grupos poblacionales vulnerables, al aumento de la resistencia de los patógenos a los compuestos antimicrobianos y al impacto socioeconómico que ocasionan. La incidencia de estas enfermedades es un indicador directo de la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos y se ha demostrado que la contaminación de los mismos puede ocurrir durante su procesamiento (Milleman et al., 2000) o por el empleo de materias primas contaminadas (Hielm et al., 1998; Fach et al., 2002), ya que algunas bacterias patógenas para el hombre, forman parte de la flora normal de aves, cerdos y ganado.

Las enfermedades gastrointestinales son una de las primeras causas de consulta médica y también, una de las primeras causas de muerte en México y en el mundo. Por ello, se les considera un problema de salud pública a nivel mundial, que afecta a personas de cualquier edad y condición social, aunque los grupos más vulnerables son los niños y los ancianos. Los manuales de la Organización Mundial de la Salud (OMS) definen a las ETAs como: “un conjunto de síntomas y signos clásicos originados por el consumo de productos alimenticios e ingredientes, especias, bebidas y agua, que contienen agentes patógenos o sustancias tóxicas, en cantidades tales, que afectan la salud de una persona o grupo de personas en forma aguda o crónica”; así mismo, autores independientes, ofrecen definiciones como “Aquellas enfermedades debidas a la ingestión de cualquier alimento sólido, leche, agua o cualquier otra bebida” (Frazier & Westhuff, 2000). A pesar de los avances en diversas áreas, como la medicina y la tecnología alimentaria, las enfermedades asociadas al consumo de alimentos, siguen afectando a gran parte del mundo. Dentro de estas enfermedades, destacan las de origen microbiano. En los Estados Unidos de América, por ejemplo, se estima que la incidencia anual de enfermedades producidas por alimentos es de 76 millones de casos, resultando en 325,000 hospitalizaciones y 5,000 fallecimientos (Roller, 2003). Se ha estimado que, en México, el número de casos asciende a 300 millones por año (Fernández, 2000). Cabe mencionar que el problema de las ETAs, se presenta en países desarrollados, así como en aquellos que son considerados como subdesarrollados. Enfermedades que se han agudizado en las últimas décadas por diversos factores, tales como: el incremento

poblacional, el urbanismo creciente en países desarrollados, la pobreza, el incremento en el comercio internacional de alimentos, además de la aparición de patógenos resistentes a antibióticos (Pérez et al., 2004). Dicho problema no se limita simplemente en la salud y bienestar físico de las personas, sino también representa un impacto socioeconómico negativo para los individuos, las familias, las comunidades, las empresas y los países. Ya que, si una persona llega a enfermar, esta representa un peligro como vector de contaminación, además de que presenta una baja en el rendimiento de sus actividades laborales, ausencia en el trabajo o estudio, lo cual frena la generación de riqueza, incurre en gastos medicinales, con un impacto negativo que afecta sensiblemente la economía nacional (Kopper et al., 2009).

## **1.2. Embutidos**

La palabra embutido deriva del latín *salsus* que significa salada o literalmente, carne conservada por salazón, es un alimento que se prepara con carne picada y condimentada, dándole normalmente una forma simétrica (Rust, 1994). Los embutidos escaldados son productos cárnicos elaborados con carne cruda, tejidos grasos y agua potable. El problema de su fabricación, consiste en que estos componentes deben tratarse utilizando aditivos de manera que, al someterse a la acción del calor, no se produzca la separación de los ingredientes y que el producto exhiba una adecuada consistencia al corte. Por ello, la retención de agua, la estabilización de grasas y el desarrollo de una estructura adecuada, son procesos decisivos en la fabricación de embutidos escaldados (Prändl et al., 1994).

### **1.2.1. Jamón cocido**

Es un embutido fresco, elaborado a partir de carne fresca (principalmente de cerdo); no curada, picada, condimentada y generalmente embutida en tripas; debe cocinarse bien antes de su consumo (Rust, 1994). La vida de anaquel del jamón es típicamente de 6 semanas en refrigeración (2-4 °C), pero varía según el peso del jamón fresco, el proceso debe cumplir con los requisitos del USDA (USDA FSIS 9 CFR 318.10). El jamón típico curado tratado con sal, nitrato y nitrito, pierde al menos el 18% de su peso original durante el procesamiento. La sal inhibe el crecimiento de microorganismos deterioradores al reducir la actividad del agua  $\leq 0.06$  y al solubilizar algunas de sus proteínas. Uno de los principales aditivos en la

elaboración del jamón son los nitritos y los nitratos. El nitrato se reduce a nitrito y posteriormente a óxido nítrico, mediante la enzima nitrato reductasa, el color típico rojo/rosado del jamón, se debe a la reacción entre el óxido nítrico y la mioglobina, formándose nitrosil mioglobina (Toldrá, 2002). Otros ingredientes, como el azúcar y la pimienta negra, son opcionales para mejorar el sabor (Ockerman et al., 2002).

Los nitritos son los ingredientes funcionales que brindan el típico color rosado, el sabor y las propiedades antioxidantes de los productos cárnicos curados. Otro gran beneficio de estas sales, es inhibir el crecimiento de bacterias patógenas como *Clostridium botulinum* en productos cárnicos curados empacados al vacío y refrigerados (Dana, 2011; NOM-213-SSA1-2002; Woods et al., 1981).

### **1.3. Bacterias patógenas en productos cárnicos**

La carne es un alimento rico en nutrientes, motivo por el cual se pueden desarrollar bacterias y hongos, ya que es un medio apropiado para su crecimiento, puesto que posee una gran cantidad de agua, minerales, compuestos nitrogenados, carbohidratos susceptibles a fermentación y un pH favorable para el desarrollo de este tipo de microorganismos (Qi et al., 2015; Fernández, 2000). La vida comercial de la carne fresca se ve influenciada principalmente por dos factores: 1) crecimiento bacteriano, que conduce a cambios en las propiedades organolépticas de los productos cárnicos; y 2) daño mecánico y pérdida de peso durante el transporte y el almacenamiento (Fernández-Pan et al., 2013). Los microorganismos patógenos que se transmiten comúnmente a través del consumo de embutidos y que se detectan con mayor frecuencia son: *Escherichia E. coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Shigella sp.*, *Clostridium botulinum*, *Listeria*, *Campylobacter* y *Bacillus cereus* (Desdémona-Martínez et al., 2000; López-Palacios & Valdez-Martínez, 2006).

En el año 2011, en Estados Unidos, los principales patógenos transmitidos por los alimentos fueron responsables de 9.4 millones de enfermedades, 56,000 hospitalizaciones y 1350 muertes (Scallan et al., 2011). En donde, el costo económico originado por las ETAs se estimó en 77.6 mil millones de dólares al año (Scharff, 2012). En este mismo año, en general, los porcentajes de brotes de ETAs, asociados con la ingesta de embutidos causados por *Salmonella sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Escherichia coli* y *Bacillus cereus*, representaron el 28%,

7%, 5% y 2%, respectivamente, mientras que *Listeria monocytogenes* fue una de las bacterias con la mayor tasa de mortalidad (30%) (Scallan et al., 2011).

Los grupos etarios más susceptibles de desarrollar infecciones por *Salmonella* son personas menores de edad, mujeres embarazadas y de la tercera edad. Anualmente, millones de personas sucumben a la infección y se reporta un número significativo de nuevas infecciones en todo el mundo. Globalmente, alrededor de 98.3 millones de personas presentan cuadros de gastroenteritis cada año, con alrededor de 155,000 muertes, mientras que 21 millones de casos de fiebre tifoidea ocasionan una muerte aproximada de 200,000 personas (Gilchrist et al., 2015). Las especies de *Salmonella* pueden ser específicas del huésped o pueden infectar múltiples tipos de huésped, causando diferentes patologías de enfermedades. *S. Typhimurium* infecta a humanos, aves de corral, cerdos, vacas, caballos, roedores y ovejas, lo que causa síntomas similares a los de la fiebre tifoidea y gastroenteritis con diarrea en animales y humanos, respectivamente (Kurtz et al., 2017). A pesar de que se están tomando diferentes medidas contra la infección por *Salmonella*, la prevalencia de infección todavía existe en todo el mundo y millones de vidas se pierden anualmente. La aparición de varias cepas de *Salmonella* hiperactivas resistentes a los medicamentos en la naturaleza, en varios entornos de huéspedes y no huéspedes, es una preocupación reciente de la infección prevalente. Mientras que para *S. aureus*, los factores de riesgo están asociados a las siguientes condiciones: Ingestión de alimentos preparados por una persona con infección en la piel, dado que estas infecciones comúnmente contienen *S. aureus*; Ingestión de alimentos preparados en forma inadecuada o conservados en temperaturas inadecuadas (Le Loir et al., 2003). La intoxicación alimentaria estafilocócica ocurre después de la ingesta de alimentos que contienen enterotoxinas *Staphylococcus* estables al calor, producidas durante el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. En 2012, las toxinas bacterianas causaron 127 brotes en la unión europea (UE) correspondientes al 16,6% de todos los brotes con evidencia contundente. En 35 de estos brotes, la causa estaba relacionada con la intoxicación alimentaria estafilocócica (IAE), debido a factores como la combinación tiempo-temperatura, enfriamiento lento o tratamiento térmico inadecuado durante la elaboración de alimentos. Los vehículos de alimentos involucrados en los brotes de IAE fueron carne de cerdo y productos de cerdo (5.7%), carne de pollo de engorda (8.4%), queso (20%), alimentos mixtos (31.4%) y otros alimentos (34.3%) (EFSA, 2014). En el año 2005, *S. aureus* causó

más de 94,000 infecciones potencialmente mortales y casi 19,000 muertes en los Estados Unidos (Diederer & Kluytmans, 2006).

### **1.3.1. *Listeria monocytogenes***

Es un bacilo corto Gram positivo, no esporulado de 1.2 x 0.5 µm, calificado a veces de cocoide y corineforme, puede mostrar diploformas dispuestas en V, las células también aparecen aisladas (Fernández, 2000). *L. monocytogenes* se puede aislar de una diversidad de alimentos, tanto crudos, como procesados o cocinados y del medio ambiente (Fernández, 2000). Se ha aislado de diferentes tipos de agua no turbias, leche, de ensilados, de las aguas residuales, de las heces de muchos animales e incluso, de las heces de humanos (Frazier & Westhoff, 2000). Para su desarrollo óptimo, *Listeria spp.*, necesita un pH entre 7.2 y 7.6 y temperaturas entre 30 y 37 °C. No obstante, también puede proliferar a pH ácidos y dentro de un amplio rango de temperaturas. Precisamente, estas características de acidotolerancia, termotolerancia y capacidad para sobrevivir y multiplicarse a temperaturas de refrigeración, son las que han despertado un gran interés dentro del ámbito de la microbiología alimentaria. El envasado al vacío, el envasado en atmósfera modificada y los tratamientos por alta presión hidrostática, no influyen significativamente en su crecimiento (Sánchez-Rodríguez et al., 2010).

Hábitat y distribución: *L. monocytogenes* está muy difundida en la naturaleza, en la que suele adoptar un ciclo saprofítico en estrecha relación con el suelo. Se ha aislado del suelo, de aguas continentales, de sedimentos marinos, de material vegetal en descomposición, de forrajes, de heces de animales y de personas, de aguas residuales de explotaciones animales, de efluentes de mataderos, etc., lo que explica su presencia en alimentos. La presencia de *L. monocytogenes* ha sido reportada en diversos alimentos, en productos cárnicos como, carne picada, embutidos ahumados y fermentados, salchichas, canales de cerdo, jamón, paté, lengua de cerdo en escabeche, así como también en leche cruda, leche pasteurizada, quesos, helados, vegetales crudos, pollo crudo, pollo cocinado, pescado fresco, pescado ahumado, ensaladas de verdura, lechuga, perritos calientes, productos derivados del pollo, bacalao ahumado, salmón ahumado, carne de cangrejo, langostino cocido, gambas cocidas, mantequilla, yogur, rábanos, pepinos, papas, yema de huevo, crema para pasteles, algunos alimentos preparados con aceites y grasas y salsas. (Sánchez-Rodríguez et al., 2010).

### 1.3.2. *Salmonella*

Típico bacilo Gram negativo, de la familia *Enterobacteriaceae*; generalmente son móviles, aerobios o facultativos anaerobios (Fernández, 2000). *Salmonella*, crece bien a temperatura ambiente, si bien su temperatura óptima de crecimiento es de aproximadamente 37 °C. El intervalo de pH de crecimiento se encuentra comprendido entre los valores 4.1 y 9.0. Su *aw* mínima de crecimiento varía para cada alimento, aunque es de aproximadamente 0.93 a 0.95 (Frazier & Westhoff, 1993). *Salmonella* se encuentra distribuida por todo el mundo y es universalmente reconocida como un agente zoonótico. *Salmonella* continúa siendo el origen más importante causante de ETAs más importante presente en la carne y en productos cárnicos. Los miembros del género *Salmonella* son los agentes causales del mayor número de brotes por el consumo de carnes rojas (Fernández, 2000).

La contaminación por *Salmonella* de carnes de cerdo, res, ovinos y de otros animales de abasto, se encuentra muy bien documentada, Rodríguez-Rebollo (1998), reportó un 87.5% de positividad en carne de cerdo y un 65.5% en carne de res, ambos tipos de carne recolectados en carnicerías, mientras que las muestras de carne de cerdo recolectadas en rastros presentaron un 75.6% de incidencia. De esto se puede inferir que cualquier materia prima cárnica empleada para la elaboración de productos embutidos puede estar contaminada con *Salmonella*. La ocurrencia de brotes por el consumo de embutidos cocidos, piezas curadas cocidas, carnes elaboradas en restaurantes y otras cocinas colectivas y en los hogares, obedece de forma general, al incumplimiento de la temperatura de cocción y a la contaminación cruzada. Genigeorgis (1986), afirma que las carnes frescas cocinadas son mejor sustrato para el crecimiento de *Salmonella* y causan más brotes que las carnes curadas (Torres et al., 2006).

Este patógeno intracelular facultativo, transmitido por alimentos, se encuentra distribuido ampliamente, debido a su capacidad para incrustarse en una gran variedad de huéspedes que infecta. La aparición adicional de cepas de *Salmonella* altamente infecciosas, el desarrollo de resistencia a los medicamentos y la aparición de resistencia a múltiples fármacos y medicamentos, han aumentado la preocupación por comprender la fisiopatología y la patogénesis molecular de este serotipo.

### **1.3.3. *Escherichia coli***

Es un bacilo corto Gram negativo, catalasa-positivo, oxidasa-negativo y anaerobio facultativo. La mayoría de las cepas fermentan lactosa, aunque algunas son fermentadoras lentas de este azúcar y algunas son anerogénicas (Sánchez-Rodríguez et al., 2010). Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en seis grupos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC). Hay cuatro clases principales de *E. coli* productoras de diarrea, que fueron clasificadas en base a sus características de virulencia codificadas por plásmidos (Adams & Moss, 1997).

Riley et al. (1983), describieron y relacionaron a EHEC con brotes caracterizados por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poco o nada de fiebre, cuadro al que se le llamó colitis hemorrágica (CH) y que era debido a la ingestión de carne cruda o mal cocida. La bacteria aislada en todos los casos fue *E. coli* del serotipo O157:H7. La cual se diferencia de las otras *E. coli*, en que no fermenta sorbitol, no crece a 44 °C y no produce β-glucoronidasa (Fengs et al., 1998). Este serotipo de *E. coli*, muestra un desarrollo entre 30 y 41 °C. Sobrevive a temperaturas de refrigeración y de ultracongelación y a diferencia de otros patógenos, crece lentamente a 6 °C, tanto en carne, como en leche cruda. Este serotipo sobrevive al proceso de fermentación y secado de salchichas (Fernández, 2000). Cuando el alimento se mantiene a bajas temperaturas, la acidotolerancia es más notoria; por ejemplo, en sidra de manzana el patógeno sobrevive menos de 3 días a 25 °C, pero hasta 31 días a 8 °C (Fernández, 2000).

La transmisión de *E. coli* O157:H7 puede ser por ingerir carne cruda o mal cocida, leche bronca, agua contaminada; también puede ser de persona a persona o debida a los manipuladores de alimentos. Hay estudios que sugieren la importancia de la mosca doméstica, como vector en la transmisión de *E. coli* O157: H7. Este patógeno se ha reportado en diferentes alimentos como: carne de res y salchichas, mayonesa, salami seco, sidra de manzana, leche pasteurizada, hortalizas, frutas, derivados lácteos, entre otros (Rodríguez-Ángeles, 2002).

#### **1.3.4. *Staphylococcus aureus***

Se trata de un estafilococo típico, son cocos Gram positivos, de forma esférica, las células ovoides miden aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, se presenta en cúmulos parecidos a racimos de uvas, en parejas o en forma de cadenas cortas. Crecen mejor en aerobiosis que en anaerobiosis. *S. aureus* se multiplica con mayor rapidez a temperaturas comprendidas entre 20 y 45 °C. La  $a_w$  mínima de crecimiento tiene un valor de 0.86 en aerobiosis y aproximadamente 0.90 en anaerobiosis (Frazier & Westhoff, 1993). Los estafilococos enterotoxigénicos pueden encontrarse en los alimentos en el momento de su compra o adquisición, en especial, en los de origen animal o bien, llegar posteriormente a ellos, a partir principalmente de manipuladores. Un porcentaje elevado de personas sanas son portadoras de *S. aureus*; los albergan principalmente en fosas nasales y garganta. Este patógeno se encuentra también en la piel y, sobre todo, en lesiones cutáneas: acné, forúnculos, heridas infectadas, etc. (Mossel & Moreno, 2003).

La intoxicación estafilococcica es una de las enfermedades más comunes, transmitidas por alimentos, donde la carne cruda y los jamones, se encuentran entre los más implicados. Tiene un periodo corto de incubación (1-6 horas). Los datos epidemiológicos indican que el inadecuado enfriamiento, la preparación de los alimentos un día o más, antes de servirse y la manipulación de las carnes cocinadas por personas infectadas, se encuentran entre las principales causas de los brotes (Genigeorgis, 1986).

#### **1.3.5. *Shigella***

El género *Shigella*, está formado por bacilos Gram-negativos, inmóviles, anaerobios facultativos, no esporulados, pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. Presentan actividad bioquímica reducida con actividad citocromo-oxidasa negativa y fermentación de glucosa sin producción de gas. *Shigella* es una bacteria altamente enteroinvasiva; su hábitat es el colon y el principal reservorio es el humano, aunque se la ha aislado de primates superiores. Se transmite a través del contacto directo o indirecto entre el agua contaminada con materia fecal de personas infectadas con los alimentos. La patogenicidad de *Shigella* está asociada a su habilidad de invadir y colonizar el epitelio intestinal humano empleando diferentes mecanismos, tales como los asociados a factores de virulencia como IpaB e IpaC. Forma poros a través de la membrana de las células del epitelio intestinal, permitiendo la

penetración de la bacteria al citoplasma del enterocito. Luego se multiplica e infectando células adyacentes, a través de protrusiones, sin entrar en contacto con el medio extracelular, destruyendo las células del huésped. *Shigella dysenteriae*, produce, además, la toxina Shiga, que se difunde extracelularmente hasta células blanco específicas. Posee efectos citotóxicos, inhibiendo la síntesis proteica, ocasionando la muerte de células intestinales, del epiteliales del glomérulo y del túbulo renal y de las células de la microcirculación del sistema nervioso central; causando de esta manera el síndrome urémico hemolítico (SUH) y convulsiones (Fernández, 2000). La contaminación de los alimentos con *Shigella*, puede provenir del contacto directo o indirecto con materia fecal de personas infectadas, a través de aguas contaminadas, plagas (moscas), o por falta de higiene y buenas prácticas del manipulador durante la preparación de los alimentos. *Shigella* crece en alimentos con bajo pH como frutas y verduras. Sobrevive durante mucho tiempo en alimentos de pH neutro, a temperaturas de congelación, en alimentos cerrados al vacío o bajo atmósferas modificadas y en el agua. Es sensible a las temperaturas de cocción de los alimentos, pero bajo ciertas condiciones, puede sobrevivir en los alimentos por largos períodos, si la temperatura se mantiene en 25 °C. Esta bacteria, por ejemplo, puede sobrevivir en harina y leche pasteurizada hasta 170 días, en huevos, almejas y camarones por 150 días, en las ostras por 30 días y en la clara de huevo por 20 días. Sin embargo, en la práctica muy raramente se puede aislar de los alimentos procesados, dado el tiempo transcurrido entre la recolección y el procesado de la muestra (Fernández, 2000).

#### **1.4. Métodos de conservación en cárnicos**

Finalmente, al ser terminado y empacado el producto cárnico, es importante destacar que no está exento de que se puedan desarrollar microorganismos aerobios, para evitar estas situaciones, se han implementado diversos post-tratamientos para alargar la vida de anaquel. El énfasis en la inocuidad de los alimentos para la prevención de ETAs ha sido abordado por tecnologías de procesamiento y empaque. Tecnologías de preservación de carne mediante el envasado al vacío, embalaje activo, intervenciones químicas (cloro, ácidos orgánicos y sus sales, ácido peroxiacético, clorito de sodio acidificado, fosfato de trisódio, ozono), agentes biológicos (extractos de plantas y aceites esenciales, bacteriocinas, bacteriófagos) y técnicas físicas (pasteurización, irradiación, calentamiento de alta frecuencia, procesamiento de alta

presión, pulsos eléctricos, campo magnético, campo magnético oscilante) para garantizar la seguridad microbiana de la carne (Chen et al., 2012).

#### **1.4.1. Envasado al vacío**

Este tipo de envasado se realiza usando películas de plástico poco permeables al aire. El envasado al vacío de carnes suprime la mayoría de las bacterias nocivas incluidas en los alimentos. Este método de envasado no garantiza al 100% la inocuidad de los productos carnicos, cuya efectividad puede ser mejorada considerando otros métodos combinados: es decir envase al vacío y antioxidantes, envasado al vacío y tratamiento térmico, etc. Por regla general un envasado al vacío de una carne no tratada (ni cocida, ni curada) soporta aproximadamente diez días. En el caso de carnes curadas, el envasado al vacío detiene el crecimiento bacteriano, prolongando la vida de anaquel en refrigeración o congelación. Siendo, además, que el poco oxígeno restante es consumido por la actividad tisular liberando dióxido de carbono. Las tecnologías de envasado al vacío pueden proporcionar efectos antimicrobianos a través de sistemas de captación de oxígeno, absorción de humedad, incremento de la actividad de agua y sistemas de control, amortiguación de la humedad, generación de dióxido de carbono, generación de etanol y sustancias migratorias y no migratorias (Suppakul et al., 2003). En general, el potencial y los inconvenientes del envasado de alimentos a vacío, con este método se puede obtener un aumento del 50% en la extensión de la vida útil con embalaje que contenga agentes antimicrobianos, por ejemplo aceites esenciales como timol/carvacrol (Malhotra et al., 2015; Zhang, Hortal, Dobon, Bermudez, & Lara-Lledo, 2015).

#### **1.4.2. Películas biodegradables**

Estudios realizados con películas biodegradables a base de polisacáridos con agentes antimicrobianos de origen natural, proteínas y aceites esenciales, han demostrado ser eficientes para inhibir diversas bacterias patógenas aerobias (Kuorwel et al., 2011). Compuestos de películas de almidón de maíz gelatinizado y  $\epsilon$ -poly-L-lisina mostraron mayor resistencia a la tracción y elongación a la rotura e inhibición efectiva contra *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, pero no para *Aspergillus niger* (Delgado-Adámez et al., 2016; Maćkiw et al., 2015; Zhang et al., 2015). Ingredientes naturales (derivados de especias, ácido láctico,

nisina, extractos de plantas) incorporados en el biopolímero de revestimiento como soporte (almidón modificado, aislado de proteína de soya, carboximetil celulosa, quitosano, cera) en los materiales de embalaje, mostraron significativamente un potencial elevado para su uso como antimicrobianos (Correa et al., 2017; Salarbashi et al., 2016; Han, 2014; Khwaldia et al., 2010).

A pesar de las investigaciones mencionadas anteriormente, realizadas para incrementar la vida de anaquel en productos cárnicos, no ha habido reportes de encapsulados con actividad antimicrobiana a base de almidón modificado, pectina y extractos de cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. (HS) evaluadas *in situ* (cárnicos) como un posible pre o post-tratamiento para alargar la vida de anaquel del producto final en refrigeración.

### **1.4.3. Compuestos bioactivos**

Los agentes bioactivos contra microorganismos podrían ser agentes antimicrobianos como iones metálicos, triclosán, bacteriocinas, especias, aceites esenciales, extractos de plantas, enzimas y otros aditivos (Salarbashi et al., 2016; Coma, 2008). Existen diversos agentes antimicrobianos que tienen potencial para su uso en sistemas de envasado de alimentos, incluyendo ácidos orgánicos, sales ácidas, anhídridos de ácido, ácidos parabenoicos, alcohol, bacteriocinas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, agentes quelantes, enzimas, metales, antioxidantes, antibióticos, fungicidas, gases esterilizantes, agentes desinfectantes, polisacáridos, compuestos fenólicos, compuestos volátiles, especias, extractos de plantas y probióticos (Cutter, 2006; Han, 2005). Directivas de la UE definen a las sustancias antimicrobianas como productos biocidas, que son permitidos en el envasado de alimentos siempre y cuando no halla impacto directo en la calidad del alimento empaquetado, lo que significa que la migración del agente al alimento debe ser incidental en lugar de intencional, el agente antimicrobiano puede proporcionar un efecto conservante en el alimento, además de no permitir la posible resistencia biocida sobre microorganismos, sin embargo, puede llegar a modificar las propiedades de textura y organolépticas del producto final (Quintavalla & Vicini, 2002).

## **1.5. Antimicrobianos de origen natural**

Los compuestos antimicrobianos naturales, pueden ser de origen bacteriano, vegetal y animal, existe una gran variedad de compuestos con estas propiedades activas, hoy en día, la aplicación de estos compuestos incluye diversas disciplinas como el área médica, farmacéutica y alimentaria. En la investigación y tecnología alimentaria, en búsqueda de tecnologías emergentes, se ha recurrido a la incorporación de antimicrobianos naturales en sistemas alimentarios, con el objetivo de incrementar la estabilidad de los alimentos y que se pueda garantizar la inocuidad de estos, así como reducir la degradación de los mismos durante el almacenamiento.

### **1.5.1. Bacteriano**

Las bacterias producen algunos compuestos antimicrobianos con efecto inhibitorio sobre otras bacterias y pueden ser utilizadas para el control del deterioro o la patogenicidad de microorganismos. Estos compuestos antimicrobianos son producidos principalmente por bacterias Gram positivas, que incluye bacterias ácido lácticas (LAB), *Bacillus* y *Streptomyces* (Davidson, 1997). Las bacterias producen miríadas de compuestos antimicrobianos proteicos y no proteicos. Los compuestos antimicrobianos proteicos incluyen mayoritariamente síntesis ribosómica de bacteriosinas. Las bacteriocinas son proteínas o péptidos producidos por algunas bacterias, que poseen actividad antimicrobiana, letal o inhibidora, frente a grupos bacterianos estrechamente relacionados, con los que las producen. Su naturaleza química permite que puedan ser consideradas conservadores naturales. Su síntesis se produce, generalmente, cuando las bacterias que las sintetizan se encuentran en situaciones de estrés. Como es habitual en las rutas metabólicas de los microorganismos, la síntesis de las bacteriocinas también depende del ecosistema, pH, potencial de óxido-reducción, cantidad de nutrientes, fase de crecimiento, temperatura, oxígeno disponible. Aunque las bacteriocinas se pueden sintetizar por levaduras, bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, son las producidas por las bacterias ácido lácticas, las que han recibido mayor atención, porque, además de conservar a los alimentos, provienen de un grupo bacteriano, por excelencia, saludable. Más información sobre la clasificación de bacteriocinas y efecto antimicrobiano en alimentos fue presentado en la revisión realizada por Cleveland et al. (2001), estos autores concluyen que la eficacia de las bacteriocinas como

conservadores naturales en alimentos está demostrada. La nisina es la bacteriocina más utilizada comercialmente, otros, tales como la pediocina, pueden tener aplicación en los sistemas alimentarios. Aunque las bacteriocinas son inhibidoras contra patógenos transmitidos por los alimentos, tales como *L. monocytogenes*, no son antibióticos. Su síntesis y modo de acción, distinguen a las bacteriocinas de los antibióticos clínicos. Las bacteriocinas son en su mayoría activas contra bacterias Gram-positivas que incluye *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus spp.* y *Streptococcus spp.* Por otro lado, compuestos antimicrobianos no proteicos incluyen reuterina ( $\beta$ -hidroxipropionaldehído) producida por *Lactobacillus reuteri*; ácido propiónico producido por bacterias ácidos propionicas, ácido láctico producido por LAB y natamicina, producida por *Streptomyces natalensis*. Uno de los antimicrobianos no proteicos llamado como Micrograd TM, es un fermentador aprobado por la FDA de *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii*, para la manufactura de queso cottage, donde el ácido propiónico es el componente antimicrobiano (Cotter et al., 2005).

### **1.5.2. Animal**

Los compuestos antimicrobianos de origen animal pueden ser de origen vertebrado (mamíferos, pescado, aviar y anfibios) e invertebrado (insectos y crustáceos). En la industria de los alimentos, los compuestos antimicrobianos secretados por animales vertebrados, han tenido un impacto significativo debido a su alta especificidad y menor toxicidad (Li et al., 2012). Satyanarayan (2008), describe el potencial de las aplicaciones de los antimicrobianos de origen animal, el cual categorizó de la siguiente forma: quelantes de hierro, enzimas e inmunoglobulinas. Algunos ejemplos de antimicrobianos naturales extraídos de animales incluyen: el quitosano, un polímero de glucosamina y N acetilglucosamina extraído del exoesqueleto de crustáceos; conalbumina/ovotransferrina, una proteína quelante de hierro encontrada en clara de huevo, lactoferritina, una proteína quelante de hierro de leche, lactoperoxidasa, una glicoproteína encontrada en leche cruda, saliva y otras secreciones biológicas. Algunos ejemplos de enzimas con efecto antimicrobiano son: la enzima lactoperoxidasa (LP) que es una oxidoreductasa y juega un papel importante en la protección de la glándula mamaria lactante y del tracto intestinal del recién nacido contra los microorganismos patógenos. Lisozima N-acetylmuramideglycanohidrolasa es biosida

contra bacterias Gram-positivas por hidrolizar el enlace  $\beta$ -1,4 del ácido N-acetilmurámico (NAM) y N-acetyl- glucosamina (NAG) en los peptidoglucanos de la pared celular. Finalmente, algunas inmunoglobulinas como las lactoglobulinas (IgG) y las Ovoglobulinas (IgY), estas inmunoglobulinas podrían ser utilizadas en los alimentos, ya que tienen un amplio espectro de actividad inhibitoria y la capacidad de neutralizar las toxinas microbianas, sin embargo, la mayoría de estos compuestos son sensibles al calor y cuando son adicionados a matrices alimentarias, esto puede presentar dificultades para su actividad antimicrobiana. La encapsulación de Ig con recubrimientos resistentes a los ácidos, puede resolver este problema en el futuro. En general, los antimicrobianos de origen animal, exhiben un amplio espectro en la inhibición de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como hongos. El quitosano inhibe bacterias ácido lácticas, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Byssochlamys spp.* y *Zygosaccharomyces bailii*. Compuestos antimicrobianos Conalbumina u ovotransferrina inhiben a *E. coli* 0157:H7, *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *Carnobacterium viridans*, *L. monocytogenes*, y *Candida albicans*. Proteínas de leche son efectivas contra *E. coli* 0157:H7, *E. coli* enteropatógena (EPEC), LAB (incluyendo *Lactobacillus* y *Pediococcus*), *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *Y. enterocolitica*, *Aspergillus*, *Byssochlamys fulva*, *Candida*, *Mucor* y *Rhodotorula* (Davidson, 1997).

### **1.5.3. Vegetal**

Los compuestos antimicrobianos de origen vegetal, son principalmente aceites esenciales, los cuales son extraídos por destilación de materiales como flores, semillas y raíces. El efecto antimicrobiano es dependiente de la concentración y puede llegar a ser fuertemente bactericida en altas concentraciones. Bacterias Gram-positivas (de esporas y no formadoras de esporas), bacterias Gram-negativas y levaduras, se ven afectados por una amplia gama de aceites esenciales. Ejemplos bien estudiados incluyen los aceites esenciales de la pimienta de Jamaica, almendra, laurel, pimienta negra, comino, canela, clavo de olor, cilantro, comino, ajo, pomelo, limón, maza, mandarina, cebolla, naranja, orégano, romero, salvia y tomillo. La actividad antimicrobiana de estos compuestos está influenciada por el medio de cultivo, la temperatura de incubación y el tamaño del inóculo. Además, presentan un fuerte sinergismo con algunos quelantes de membrana celular (Brul & Coote, 1999; Skandamis & Nychas,

2001). La estructura y composición de los grupos funcionales de los antimicrobianos, juega un papel muy importante en el rol funcional de su actividad antimicrobiana. Compuestos fenólicos como: fenoles simples, quinonas, taninos, cumarinas, flavonas y alcaloides, presentan actividad antimicrobiana. Se han realizado estudios sobre la acción antimicrobiana de aceites esenciales en sistemas modelos *in vitro* e *in vivo*. Burt (2004), menciona una gran recopilación de alimentos en los cuales se ha evaluado el efecto antimicrobiano de aceites esenciales en diferentes matrices, entre los que destacan carnes, pescado y productos lácteos, quien menciona los posibles mecanismos de acción de estos compuestos, este artículo menciona la obtención de buenos resultados en la reducción de microorganismos patógenos, como *L. monocytogenes* principalmente. No obstante, la eficacia de aceites esenciales *in vitro* es a menudo mayor que *in vivo* o *in situ*, es decir, en las matrices alimentarias (Tassou et al., 2000). A partir de estudios realizados se ha demostrado que el tipo de aceite o grasa presente en un alimento puede afectar la eficacia antimicrobiana de los aceites esenciales (Skandamis & Nychas, 2001). En lo que cabe mencionar, los aceites esenciales han sido probados como antimicrobianos en alimentos sólidos (carne y pescado), almacenados en diversas condiciones de embalaje. La disponibilidad de oxígeno puede afectar a la eficacia antimicrobiana de estos compuestos. Paster et al. (1995), observaron que la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano en *S. aureus* y *Salmonella Enteritidis* se mejoró cuando estos microorganismos se incubaron bajo condiciones microaerófila o anaeróbica, la razón fue que, bajo condiciones de baja tensión de oxígeno, hay menos cambios oxidativos en el aceite esencial. Los compuestos activos presentes en aceites esenciales, son a menudo obligados a conjugarse con los componentes de los alimentos (proteínas, grasas, azúcares, sales). Por lo tanto, sólo una parte de la dosis total de aceites esenciales en un alimento, permanece libre para ejercer la actividad antibacteriana. Factores extrínsecos tales como la temperatura, también limitan la acción antimicrobiana de aceites esenciales (Davidson, 1997). Además, la distribución espacial de las diferentes fases (sólido/líquido) en el alimento, la falta de homogeneidad de pH y el agua, también puede jugar un papel importante en la eficacia de estos compuestos. El crecimiento de bacterias en líquidos se produce con mayor eficacia, en contraste con las colonias discretas formadas, ya sea sobre o dentro de una matriz sólida (Wilson et al., 2002). Algunos autores han reportado el efecto antimicrobiano en diferentes matrices alimentarias como carne y derivados (Sánchez-Ortega et al., 2014),

evaluando diferentes bacterias relacionadas con el deterioro y la seguridad del alimento, sin embargo, se ha observado que las concentraciones para producir dicho efecto, son muy altas, las cuales pueden modificar las características organolépticas del alimento, por esta razón y lo mencionado anteriormente, sobre la interacción de los compuestos antimicrobianos con los componentes de la matriz alimentaria y los factores extrínsecos, se ha recurrido a la encapsulación de dichos compuestos en diferentes sistemas de encapsulación.

#### **1.5.3.1. Cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. (HS)**

La planta conocida como jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L. (HS)), de la familia de las *Malvaceas*, es originaria de África, fue introducida a México en la época colonial y desde entonces, se ha cultivado en regiones cálidas y semicálidas de nuestro país, siendo los estados de Guerrero, Oaxaca, Colima y Campeche, los principales productores de HS (SAGARPA). En Guerrero, el cultivo de cálices de HS tiene un gran arraigo, más allá de los aspectos nutritivos, medicinales y como bebida refrescante, ya que los productores la siembran como tradición cultural. De acuerdo con información de la SAGARPA, en esta entidad se cultivan alrededor de 14,000 hectáreas que representan casi 75% del total nacional. Los municipios donde se cultiva son Tecoaapa, Ayutla, Juan R. Escudero, Acapulco y San Marcos y en menor escala, San Luis Acatlán y Cuauhtepic, ubicados en la región Costa Chica y Centro de la entidad (SAGARPA). Donde, México ocupa el séptimo lugar a nivel mundial como productor de cálices de HS.

Las propiedades alimenticias y medicinales de los cálices HS, la hacen aceptable en muchos lugares del mundo, sin importar su clima, se toma como agua fresca o como té. Los cálices presentan efecto antimicrobiano, diurético y ligeramente laxante. Ayuda al proceso digestivo y renal, es útil para bajar de peso y para controlar los niveles de colesterol. Varios estudios han reportado que esta planta comestible posee actividad antioxidante y antihipertensiva en ratas. Sin embargo, hay menos información disponible sobre los efectos antibacterianos y antioxidantes de esta planta comestible en diferentes preparaciones de extractos. La variedad y las condiciones de extracción utilizados (tipo de disolvente, tiempo y temperatura) pueden afectar potencialmente el perfil de compuestos extraídos (Jung et al., 2013). Los compuestos presentes en extractos acuosos de HS, identificados por medio de HPLC, han sido asociados

con diferentes efectos benéficos. Estos compuestos han atraído la atención, debido a su potencial bioactividad para el ser humano. Sin embargo, no se han realizado estudios sistemáticos de la eficiencia de extracción de HS. La naturaleza de los extractos utilizados en diferentes estudios ha variado considerablemente, lo que dificulta las comparaciones. Por lo tanto, un estudio sistemático de los extractos de HS hecho con diferentes disolventes se llevó a cabo usando agua, metanol, acetato de etilo y hexano, utilizando diferentes tiempos de extracción y temperaturas (Sindi et al., 2014). La extracción, purificación e identificación de compuestos presentes en los cálices de HS. depende del efecto que se busque, ya que los extractos presentan una gran variedad de compuestos con diferentes efectos como antimicrobiano, antihipertensivo y antioxidante, solo por mencionar algunos (Da-Costa-Rocha et al., 2014).

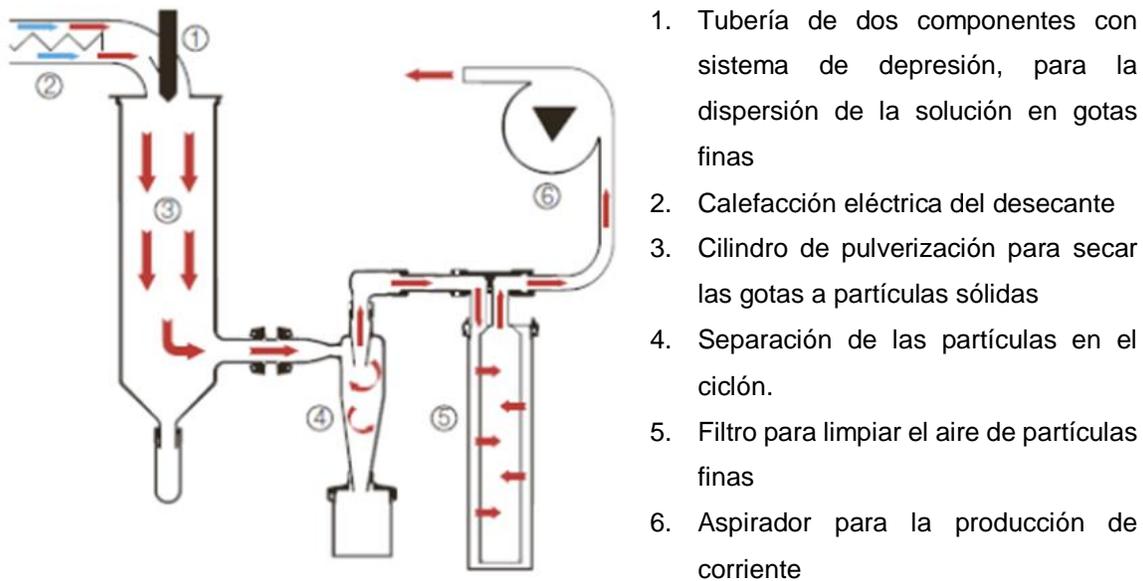
## **1.6. Microencapsulación**

La microencapsulación representa un excelente ejemplo de microtecnología aplicada, se define como un proceso en el que compuestos bioactivos, así como también probióticos, son almacenados en pequeñas cantidades, introduciéndolas en una matriz o sistema de pared, para impedir su deterioro por factores extrínsecos e intrínsecos, además de protegerlos de las condiciones ácidas del estómago para que lleguen íntegros al tracto intestinal, donde son absorbidos por el organismo (Nazzaro et al., 2012; Kailasapathy & Masondole, 2005). La microencapsulación se puede utilizar para muchas aplicaciones en la industria de alimentos, incluyendo el control de diversas reacciones, la liberación controlada en dosis y en tiempo, para enmascarar sabores, colores y olores, extender la vida útil de un producto y la protección contra la pérdida de los componentes nutricionales (Anal & Shing, 2007).

### **1.6.1. Secado por aspersión**

El secado por aspersión es el método de encapsulación más comúnmente utilizado en la industria alimentaria. Se está aplicando para moléculas con actividad biológica y probióticos vivos. Es un procedimiento rápido y relativamente barato, que cuando se realiza adecuadamente, es altamente reproducible. El proceso, como se puede observar en la Figura 1.1, consiste en convertir un fluido “mezcla líquida”, que puede ser una solución o una suspensión, en una sustancia sólida. Este fluido pasa por tuberías, hasta llegar a un

atomizador, el cual despliega partículas o gotas de tamaño pequeño, que entran en contacto directo con el aire caliente de la cámara y pierden su contenido de agua de manera inmediata, pasando a convertirse en material sólido (Shahidi & Han, 1993). La adecuada selección del atomizador y del agente encapsulante, son factores críticos. Una de las grandes ventajas de este proceso, además de su simplicidad, es que es apropiado para materiales sensibles al calor, ya que el tiempo de exposición a temperaturas elevadas es muy corto (5 a 30 segundos).



**Figura 1.1** Esquematzación del proceso de secado por aspersión (BÜCHI).

Consideraciones técnicas del secado por aspersión.

El secado por aspersión es una operación unitaria, en la que se rocía un producto líquido en un gas caliente, para obtener instantáneamente un polvo. El gas que se usa, generalmente es el aire o en ciertas ocasiones un gas inerte como el nitrógeno. El líquido inicial de la alimentación del rociador puede ser una solución, una emulsión o una suspensión.

El secado por aspersión produce, dependiendo del material de partida y de las condiciones de funcionamiento, un polvo muy fino (10-50  $\mu\text{m}$ ) o partículas de gran tamaño (2-3 mm).

El secado por aspersión se utiliza, generalmente en la industria alimentaria, para garantizar una estabilidad microbiológica de los productos, evitar el riesgo del uso de productos

químicos y/o degradación biológica, reducir los costos de almacenamiento y transporte, o finalmente para obtener un producto con propiedades específicas, como la solubilidad instantánea.

Las principales consideraciones en el proceso son:

Atomización. La atomización de líquidos en pequeñas gotas puede llevarse a cabo por la presión o energía centrífuga. El objetivo de esta etapa es crear una superficie máxima de intercambio de calor entre el aire seco y el líquido, con el fin de optimizar el calor y las transferencias de masas. El tamaño de las partículas aumenta cuando la viscosidad y la tensión superficial del líquido inicial son altas.

Contacto de la gota con el aire caliente. Este contacto tiene lugar durante la atomización y representa el inicio del secado. En el proceso, el líquido se rocía en la misma dirección que el flujo de aire caliente a través del aparato, la temperatura de entrada de aire caliente usual es de 150 a 220 °C, la evaporación se produce de forma instantánea y los polvos secos serán expuestos a temperaturas moderadas (normalmente 50 a 80 °C) que limita la degradación térmica.

La evaporación de gotas de agua. La transferencia de calor se lleva a cabo desde el aire, hacia el producto, como resultado de la diferencia de temperaturas, mientras que la transferencia de agua se lleva a cabo en la dirección opuesta, debido a la diferencia de presión de vapor. El secado, teóricamente termina cuando la temperatura de la partícula es igual a la del aire. Por lo general, los tiempos de secado son aproximadamente de 500 a 100 s, sin embargo, en un sistema bien diseñado entre 15 y 30 s son suficientes para el paso de la partícula que se rocía a través de la zona de secado.

Separación del producto y el aire húmedo. Esta separación se hace a menudo a través de un ciclón situado al final de la cámara de secado, esto reduce las pérdidas de producto en la atmósfera, las partículas más densas se recuperan en la base de la cámara de secado, mientras que las más finas, pasan a través del ciclón, para separarlas del aire húmedo. Los cambios de tamaño de partícula y de morfología durante el secado por aspersión, están relacionados con el contenido de humedad y la temperatura de secado (Alamilla-Beltrán et al., 2005).

Condiciones de funcionamiento. Con el fin de obtener la máxima eficiencia de microencapsulación, incluso si el material de la pared es el conveniente, se deben optimizar las condiciones del secado por aspersión. Las variables principales a considerar para la

optimización del secado por aspersión son la temperatura de la alimentación, la temperatura de entrada de aire y la temperatura de salida de aire. La temperatura de la alimentación modifica la viscosidad de la emulsión, su fluidez, por lo tanto, su capacidad de ser rociada homogéneamente. Cuando la temperatura de la alimentación se incrementa, la viscosidad y el tamaño de las gotas se ve disminuido, pero las altas temperaturas pueden provocar la volatilización o la degradación de algunos componentes sensibles al calor. La velocidad de la alimentación en el atomizador debe ser ajustada para asegurar que cada gota de rocío alcance el nivel de secado deseado, antes de que entre en contacto con la superficie de la cámara de secado (Zbicinski et al., 2002).

La temperatura del aire de entrada es directamente proporcional a la cantidad de microcápsulas obtenidas, así como a su contenido final de humedad. Cuando la temperatura de entrada del aire es baja, la tasa de evaporación es baja y produce la formación de microcápsulas con membranas de alta densidad y alto contenido de agua, lo cual facilita su aglomeración. Sin embargo, una temperatura de entrada del aire muy alta, provoca una evaporación excesiva y los resultados son grietas en la membrana de las cápsulas, lo que puede ocasionar la liberación prematura y la degradación del ingrediente encapsulado o también una pérdida de compuestos volátiles.

Es difícil predecir la temperatura de salida para un producto determinado, ya que depende de las características de secado del material. A diferencia de la temperatura de entrada del aire, la temperatura de salida del aire no se puede controlar directamente, ya que depende de la temperatura de entrada del aire. La temperatura del aire de salida ideal para la microencapsulación de ingredientes alimentarios, tales como los sabores se ha reportado que está en el rango de 50 a 80 °C. La eficiencia de microencapsulación se puede aumentar, mediante el aumento de la concentración de sólidos en la solución (Young et al., 1993). La principal limitación de la técnica de secado por aspersión en microencapsulación es el número limitado de materiales de pared disponibles, que deben tener una buena solubilidad en agua. Otra desventaja que se debe considerar es que el producto obtenido es un polvo y necesita tratamiento posterior, como por ejemplo para evitar su aglomeración.

#### **1.6.1.1. Material de pared**

Para efectuar el proceso de microencapsulación se ha recurrido a la utilización de biopolímeros, que son los vehículos más usados para la protección de ingredientes en la

industria de alimentos, debido a su biodisponibilidad, baja toxicidad y alergenicidad nula (Nussinovitch, 2010). Los biomateriales encapsulantes, comúnmente utilizados, son carbohidratos, celulosas, gomas, proteínas y lípidos. Estos pueden emplearse en forma individual o combinados con otros materiales, a fin de generar sinergias favorables (Goh et al., 2012). El sistema de pared, está diseñado para proteger al material encapsulado de los factores que pueden causar su deterioro, para evitar una interacción prematura entre el material del núcleo y otros ingredientes, para limitar la pérdida de compuestos volátiles y también, para permitir la liberación controlada o sostenida bajo condiciones deseadas (Shahidi & Han, 1993). Un paso importante en el desarrollo de microcápsulas, es la selección de un material de pared, que cumpla con los criterios requeridos: resistencia mecánica, compatibilidad con los productos alimenticios, de bloqueo térmico o disolución, tamaño de partícula apropiado, etc. (Brazel, 1999). La selección de los materiales de pared para la microencapsulación por secado por aspersion, tradicionalmente se lleva a cabo mediante prueba y error. Generalmente al haberse formado las cápsulas, se evalúa en estas la eficiencia de encapsulación, estabilidad bajo diferentes condiciones de almacenamiento, el grado de protección provisto al material del núcleo, así como su morfología y su superficie mediante microscopía de barrido, entre otras evaluaciones (Pérez-Alonso et al., 2003).

### **1.7. Almidón**

El almidón es ampliamente utilizado como ingrediente en la industria de alimentos, debido a que es de fácil disponibilidad, no tóxico, biodegradable y de bajo costo (Eliasson, 2004). A diferencia de otros polímeros, el almidón se encuentra en la naturaleza como partículas discretas, complejas con ordenamiento radial, denominadas gránulos. Estos están constituidos mayormente por una mezcla de dos polisacáridos: amilosa y amilopectina. La amilosa es un polímero esencialmente lineal, formado por moléculas de glucosa, unidas mediante enlaces glucosídicos  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4), con un grado de polimerización de alrededor de 6000. Esta adquiere una conformación tridimensional helicoidal, en la que cada vuelta de la hélice consta de seis moléculas de glucosa (BeMiller & Whistler, 2009). La amilopectina es una molécula muy grande y altamente ramificada, que contiene enlaces glucosídicos  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) y  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6). Con respecto a sistemas de encapsulación, el almidón ha sido utilizado tanto como polímero encapsulante, así como también como material de relleno inerte (Bertolini,

2010). Con la adición del almidón como material pared se ha observado un aumento de la resistencia mecánica, la conservación de la forma y del tamaño de las cápsulas y mayor estabilidad del material encapsulado durante el almacenamiento (Chan et al., 2011).

### **1.7.1. Características y propiedades del almidón de maíz**

El almidón de maíz se cataloga por la relación que presentan de amilosa y de amilopectina: el almidón normal, cuyo contenido de amilosa oscila entre el 20 y el 30%, mientras que en los ricos en amilosa, está por encima del 50% y finalmente, en los cerosos cuyo contenido es menor al 1% (BeMiller & Whistler, 2009). El contenido de ácidos grasos libres o fosfolípidos presentes en el almidón de maíz, contribuye a tener más altas temperaturas de transición y una menor retrogradación, lo cual es debido a la formación de complejos amilosa-lípido (Davies et al., 1980). La morfología del gránulo de almidón depende de la bioquímica del amiloplasto, el tamaño promedio del gránulo de almidón de maíz oscila de 15 a 20  $\mu\text{m}$ , este almidón forma geles opacos y fuertes (Singh et al., 2003).

### **1.8. Almidón modificado**

El almidón ha sido ampliamente utilizado en la industria de alimentos, sin embargo, los procesos alimenticios generalmente requieren almidones con mejores características de comportamiento, que las provistas por los almidones nativos. En la Tabla 1.1, se presenta un listado de las principales modificaciones a las cuales pueden ser sometidos los almidones para su uso en los alimentos. Por consiguiente, vía modificación, las propiedades funcionales de los almidones pueden ser mejoradas. La modificación es realizada para introducir grupos funcionales específicos, para hacer que los productos preparados sean más resistentes. Las alteraciones toman lugar a nivel molecular, con un cambio mínimo en la apariencia superficial del gránulo. Los métodos empleados para la modificación del almidón son de tipo físico (tratamiento de calor-humedad, recocido, pre-gelatinización, tratamiento a alta presión, radiación, sonicación), químico (reticulación, sustitución, hidrólisis ácida y básica, oxidación/blanqueo) y enzimáticos (BeMiller & Huber, 2010; Singh et al., 2007), cuyo objetivo es mejorar y/o estabilizar propiedades tales como solubilidad, poder de hinchamiento, esterificación, textura, adhesión, dispersión y tolerancia a ciclos de congelación-descongelación (Thirathumthavorn et al., 2006).

### 1.8.1. Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida ha sido ampliamente investigada para modificar almidones nativos y crear productos para su aplicación en alimentos, papel, textiles y otras industrias, debido a su alta biodisponibilidad y bajo costo (Eliasson, 2004). La hidrólisis ácida del almidón se consigue degradando el almidón con ácidos fuertes (Li et al., 2010). La primera etapa de hidrólisis del almidón se presenta en las zonas amorfas, las cuales son las más afectadas por su disponibilidad al tener enlaces mas accesibles en los puntos de ramificación, (Wang et al. 2003). El material cristalino es hidrolizado lentamente, debido a la presencia de las dobles helices presentes (Hoover, 2000). La evidencia para sugerir un ataque preferencial en dominios amorfos, dentro del gránulo, proviene de observaciones de microscopía electrónica de transmisión hidrolizadas con ácido (Kainuma & French, 1971).

**Tabla 1.1** Modificaciones en almidones

Modificación	Tipos	Técnica
Física	Tratamientos que involucran calor/humedad	Calentamiento del almidón a temperatura cercana al punto de gelatinización con insuficiente contenido de humedad que causa la gelatinización del polímero.  Annealing-calentamiento de una mezcla granular del almidón sometido a incubación en exceso de agua por un cierto periodo de tiempo a temperatura arriba de la transición vítrea y abajo del punto de gelatinización.
	Pregelatinización	Pregeles/instantáneos/ almidones preparados usando secadores de tambor, extrusión, procesamiento con bases solventes.
	Hidrolisis acida	Tratamiento con ácido clorhídrico o ácido orto fosfórico o ácido sulfúrico.
Conversión	Hidrólisis enzimática	Tratamientos en una solución acuosa a temperaturas por abajo del punto de gelatinización con uno o más enzimas amilolíticas grado reactivo.
	Tratamiento alcalino	Tratamiento son solución e hidróxido de sodio o hidróxido de potasio,
Derivatización	Oxidación/blanqueamiento	Tratamiento con ácido peracético y/o peróxido de hidrogeno, hipoclorito de sodio clorito de sodio, dióxido sulfúrico, permanganato de amonio y /o persulfato de amonio.
	Piroconversión (Dextrinización)	Pirodextrinas-Preparado por acidificación del almidón seco.
	Esterificación	Almidón hidroxipropil- Esterificación con óxido propileno.
	Esterificación	Almidón acetilado-Esterificación con anhídrido acético o acetato de vinil.

	Adipato de Almidón acetilado- Esterificación con anhídrido acético y anhídrido adipico
	Almidón octenilsuccinatado de sodio -Esterificación por anhídrido octenilsuccínico.
Entrecruzamiento	Almidón monofosfatado- Esterificación con orto-ácido fosfórico, orto fosfato de sodio o potasio, o tripolifosfato de potasio. Di Almidón fosfatado- Esterificación con trimetafosfato de sodio.
Modificación dual	Almidón acetilado-fosfatado- Esterificación por trimetafosfato de sodio o fósforo combinado con la esterificación de oxiclورو de anhídrido acético o acetato de vinilo.  Hidroxiopropil-fosfatado di almidón- Esterificación por trimetafosfato de sodio y/o oxiclورو de fósforo combinado con la eterificación por óxido de propileno

---

Singh et al. 2007.

### 1.8.2. Esterificación

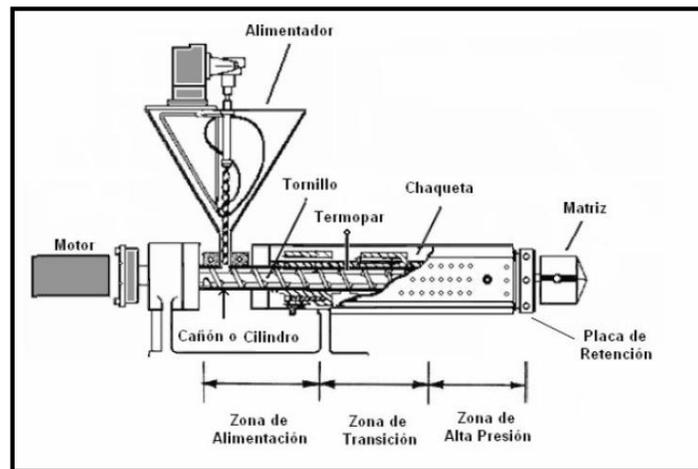
La esterificación química por sustitución con grupos octenil succinato anhídrido (OSA) del almidón (OS), le ha conferido propiedades anfífilas al almidón (Sweedman et al., 2013). Los grupos éster incluidos en el almidón durante la succinación con OSA, son preparados comercialmente por la reacción básica de anhídridos de alquénil succínico con el almidón granular en suspensión acuosa. La sustitución puede ocurrir en las posiciones 2, 3 y 6 de los carbonos de la unidad de glucosa. Con la incorporación de grupos hidrofóbicos alquénil en una molécula de almidón normalmente hidrofílica, el almidón modificado adquiere propiedades de superficie activas. Los OS se han utilizado para estabilizar concentrados de sabor en bebidas, aceite en preparaciones de ensalada y en encapsulado de sabores, fragancias y vitaminas en formulaciones secadas por aspersión (Murúa et al., 2009).

### 1.8.3. Extrusión

La extrusión, proceso que combina etapas de mezclado continuo, de cocción y de formación, es un proceso versátil, donde se emplean tiempos cortos a altas temperaturas y distintas presiones con cizallamiento, es de bajo costo, además de ser una tecnología muy eficiente en el procesamiento de alimentos, está constituido principalmente de un alimentador, un preacondicionador, un tornillo sinfín, un cilindro enchaquetado y una matriz (Figura 1.2), se comporta como intercambiador de calor, debido al flujo de calor entre las paredes del

cilindro, el tornillo y el material alimentado (Vargas-Solórzano et al., 2014). Las variables de operación, tales como el perfil de temperatura, velocidad y tipo de tornillo aunado con la velocidad de alimentación, promueven la alteración mecánica y transformación del gránulo de almidón (Zepon et al., 2013). Uno de los parámetros más importantes que influye en las diferentes reacciones sobre el gránulo de almidón en el proceso de extrusión es la energía mecánica específica (SME). SME es la cantidad de energía mecánica (trabajo) disipado como calor dentro del material, expresado por unidad de masa del material (Godavarti & Karwe, 1997).

Los extruidos a base de almidón, son más complejos que los obtenidos con otros polímeros, debido a las transiciones multifásicas que ocurren principalmente por los tratamientos térmicos, presiones y esfuerzos mecánicos (Figura 1.2), derivando reacciones físicas y estructurales sobre el gránulo de almidón como lo es la gelatinización, expansión de gránulos, fusión, recristalización, disrupción granular y formación de complejos entre la amilosa con los componentes del gránulo de almidón (Borries-Medrano et al., 2016; Xie et al., 2016; Alam et al., 2016), sin embargo, el contenido de humedad del almidón durante la alimentación y las temperaturas de extrusión permiten obtener almidones con propiedades fisicoquímicas distintas (Gulati et al., 2016).



**Figura 1.2.** Esquema de un extrusor y sus componentes. (Murua et al., 2009)

## **1.9. Pectina**

La pectina actúa como material de pared en la célula vegetal, está conformado principalmente por ácido galacturónico, producto generado a partir de la oxidación de la galactosa (Yapo, 2011), es comúnmente utilizada como agente gelificante y estabilizante (Willats et al., 2006). Sasaki et al. (2015), han reportado que la adición de pectina aumentó la viscosidad de las suspensiones de almidón. Las pectinas se clasifican como pectinas de alto metoxilo o de bajo metoxilo. Los dos grupos tienen diferentes propiedades y gelifican bajo condiciones diferentes (Willats et al., 2006).

### **1.9.1. Pectinas de bajo metoxilo.**

Las pectinas de bajo metoxilo tienen la mayoría de grupos carboxilo libre. En realidad, sólo 20-40% de los grupos carboxilo están esterificados. Por tanto, la mayoría están disponibles para formar enlaces cruzados con iones divalentes como el calcio. Si se forman suficientes enlaces cruzados, se puede obtener una red tridimensional que atrapa líquido, formando un gel. Las pectinas de bajo metoxilo pueden, por lo tanto, formar geles en presencia de iones divalentes, sin necesitar azúcar o ácido (Willats et al., 2006).

### **1.9.2. Pectinas de alto metoxilo.**

Las pectinas de alto metoxilo tienen una elevada proporción (normalmente 50-58%) de grupos carboxilos esterificados. La mayoría de los grupos ácidos, por tanto, no están disponibles para formar enlaces cruzados como iones divalentes, así, estas pectinas no forman geles de esta manera (Willats et al., 2006).

## **1.10. Liberación de compuestos**

El desarrollo de sistemas de transporte y de liberación controlada de compuestos activos es una de las estrategias de uso frecuente en la formulación de alimentos funcionales. La liberación controlada se define como el mecanismo mediante el cual, uno o más compuestos activos, puede dirigirse a un sitio específico, en un tiempo y con una velocidad modulada (Mastromatteo et al., 2010). Las principales etapas involucradas en el proceso de liberación, son: 1) difusión del compuesto activo a la superficie, 2) mecanismo de transporte, desde la superficie de la matriz al medio y 3) disolución del compuesto activo en el medio circundante

(Siepmann & Peppas, 2012). La velocidad de liberación dependerá de factores internos y externos, tales como: geometría del sistema, tipo de matriz encapsulante, naturaleza del compuesto activo, cantidad de compuesto encapsulado, temperatura, solvente de liberación, velocidad de agitación, presión, pH (ácido, base, buffer), acción enzimática, entre otros (Siepmann & Siepmann, 2008). Los mecanismos más importantes que regulan la velocidad de liberación de un compuesto activo, son: difusión, hinchamiento, biodegradación/erosión y presión osmótica. La relevancia de cada uno de ellos dependerá en gran medida de la composición de la matriz polimérica y del medio circundante, por lo que el agente activo puede ser liberado al medio por uno o por varios mecanismos actuando simultáneamente.

### **1.10.1. Liberación por difusión**

El comportamiento de liberación de agentes activos es el resultado del fenómeno de difusión en el polímero y de restricciones de transferencia de masa en la interface polímero/líquido (Kaunisto et al., 2011). La migración del compuesto activo al medio de liberación puede darse directamente a través de la estructura molecular del polímero o bien, a través de macro o microporos existentes en la matriz polimérica (Siepmann & Peppas, 2012). El modelo más común para estudiar la difusión es el propuesto en las leyes de Fick:

✓ Primera ley de Fick

La primera ley de Fick establece que, en estado estacionario, la velocidad de transferencia de una sustancia que difunde a través de la unidad de área de una sección, es proporcional al gradiente de concentración (Ec. 1).

$$J = -D \cdot \left[ \frac{\partial c}{\partial x} \right] \quad \text{Ec. 1}$$

En esta ecuación, J es la velocidad de flujo por unidad de área, C es la concentración del compuesto que difunde, x es la dirección espacial normal a la sección y D es el coeficiente de difusión.

✓ Segunda ley de Fick

La mayoría de las situaciones prácticas de difusión, son en estado no estacionario. Es decir, el flujo de difusión y el gradiente de difusión varían con el tiempo. En condiciones no estacionarias el uso de la segunda ley de Fick resulta más apropiado (Ec. 2).

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \cdot \left[ \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right] \quad \text{Ec. 2}$$

En esta ecuación, C es la concentración de la especie que difunde, t el tiempo, D es el coeficiente difusión y x, y y z, las coordenadas espaciales. Las condiciones iniciales y de frontera a tener en cuenta para la resolución de las ecuaciones varían para cada tipo de sistema de liberación (Siepmann & Peppas, 2012).

## JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) son un problema a nivel mundial, afectando a miles de personas anualmente, debido a la ingesta de alimentos contaminados por microorganismos patógenos, que llegan a sobrevivir a los tratamientos térmicos o que llegan al producto después del tratamiento térmico, por malas prácticas de higiene, causando altos índices de morbilidad y mortalidad. El jamón es un producto cárnico cocido, curado, elaborado principalmente a partir del pernil de cerdo, es uno de los alimentos de mayor consumo en países desarrollados y subdesarrollados. Sin embargo, el jamón es un medio apropiado para el desarrollo de bacterias patógenas, puesto que posee una gran cantidad de agua, minerales, compuestos nitrogenados, carbohidratos susceptibles a fermentación y un pH favorable para el desarrollo microbiano, por lo que se han implementado diversos métodos de conservación de origen natural, como lo son los extractos de cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. que se han añadido en la elaboración del jamón, sin embargo, no se ha logrado la formación del jamón debido a la incompatibilidad de los compuestos presentes en el extracto, por lo que se pretende implementar el método de microencapsulación mediante la utilización de almidón de maíz, triplemente modificado (hidrolizado/succinatado/extrudido) y pectina, con la finalidad de proteger los compuestos del extracto HS de factores extrínsecos e intrínsecos, además de proporcionar características emulsificantes y estabilizantes para la elaboración del jamón, así como también permitir una liberación gradual del extracto al medio (jamón), para mantener inocuo el producto durante un periodo de tiempo determinado. El extracto encapsulado podría aplicarse en la elaboración del jamón como un antimicrobiano de origen natural, protegido mediante un material de pared triplemente modificado, contribuyendo al control de la inocuidad microbiana y disminuyendo el riesgo que significa el uso de antimicrobianos químicos convencionales.

## HIPÓTESIS

El extracto acetónico de *Hibiscus sabdariffa* L. encapsulado con un almidón triplemente modificado y pectina tiene efecto antimicrobiano durante la vida útil de un embutido.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Microencapsular extracto acetónico de *Hibiscus sabdariffa* L. utilizando un almidón triplemente modificado y pectina para determinar el efecto antimicrobiano de las microcápsulas en medio de cultivo y en un embutido.

### Objetivos específicos

- Obtener extracto acetónico de cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. y evaluar su efecto antimicrobiano *in vitro*.
- Optimizar el proceso de hidrólisis ácida sobre almidón de maíz.
- Esterificar y caracterizar el almidón de maíz hidrolizado fisicoquímicamente.
- Optimizar el proceso de microencapsulación del extracto acetónico de *Hibiscus sabdariffa* L. utilizando almidón modificado y pectina.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto acetónico de *Hibiscus sabdariffa* L. microencapsulado en jamón.
- Determinar los coeficientes de difusión del extracto acetónico microencapsulado en agar.

## CAPÍTULO II

## **Materiales y métodos**

### **2. Materia prima**

Los cálices de *Hibiscus sabdariffa* L., de la variedad criolla, fueron proporcionados por la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, adquiridas en el municipio de Tecoaapa, Guerrero, México. Se utilizó almidón de maíz de la marca starch of maize company industrializadora de maíz (IMSA), S.A. de C.V., en México, la pectina de bajo metoxilo (MLP) se obtuvo de Ingredion México, S.A. de C.V. Los grupos éster de 2-octen-1-yl succinic anhydride (OSA, 97% purity), se obtuvo de Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA, finalmente el ácido clorhídrico se adquirió en J.T. Baker (37%, pureza). Los reactivos fueron de grado analítico.

### **2.1. Caracterización fisicoquímica de almidón nativo y modificado**

#### **2.1.1. Determinación del contenido de amilosa**

El contenido de amilosa del almidón de maíz nativo (CS) se determinó bajo la metodología descrita por Gibson et al. (1997), utilizando un kit de ensayo Megazyme, K-AMYL 07/11 (Megazyme International, Ireland Ltd., Irlanda). Las determinaciones se realizaron por triplicado únicamente para el almidón nativo.

#### **2.1.2. Solubilidad (S) y poder de hinchamiento (SP) en función de la temperatura**

La solubilidad y el poder de hinchamiento de los almidones hidrolizados y succinatados se midieron de acuerdo a la metodología descrita por Anderson et al. (1969). Brevemente se pesó 1 g de almidón en base seca, en un tubo de centrifuga de 50 mL y se adicionaron 10 mL de agua destilada, la suspensión se homogenizó durante 3 min con un vortex. Posteriormente, se centrifugó a 13,000 g por 10 min en una ultracentrífuga (Optima XL-100K ultracentrifuge Beckman Coulter, CA, USA), el sobrenadante se transfirió a una charola de aluminio a peso constante y se secó (peso soluble) en una estufa a 100 °C durante 24 h (S/marca: drying oven DHG-9075), mientras que el sedimento fue pesado. La solubilidad y poder de hinchamiento se calcularon usando las ecuaciones 3 y 4:

$$S (\%) = (\text{Peso soluble/peso seco almidón}) * 100 \quad (\text{Ec. 3})$$

$$SP \text{ (g/g)} = (\text{Peso sedimento} / \text{peso seco almidón}) \quad (\text{Ec. 4})$$

Para determinar la solubilidad y el poder de hinchamiento en función de la temperatura, se siguió el mismo procedimiento, solamente se añadió una etapa de acondicionamiento a la temperatura seleccionada (25, 60, 70, 80 y 90 °C), una vez homogenizada la suspensión de almidón, esta se colocó en baño María por 30 min con agitación en un vortex, posteriormente, la muestra se enfrió en otro baño María a 4 °C, hasta alcanzar la temperatura ambiente (25 °C).

### **2.1.3. Determinación de la viscosidad pico (VP)**

La viscosidad de pico de los almidones hidrolizados y succinatados, se midió en un analizador Rapid Visco (3C, Newport Scientific Pty. Ltd., Sydney, Australia). Se pesaron 2.5 g (base seca) de cada muestra y se añadió agua destilada hasta alcanzar un peso total de 28 g. La muestra se colocó en el equipo, se agitó a una velocidad de 960 rpm durante 10 s, en el intervalo de 25 a 50 °C, se mantuvo a 50 °C durante 1 min. Posteriormente, la muestra se calentó de 50 a 92 °C a una velocidad de calentamiento de 5.6 °C/min y se matuvo en agitación a una velocidad angular de 160 rpm. Una vez alcanzada la temperatura indicada (92 °C), está se mantuvo durante 5 min. A continuación, la muestra se enfrió a la misma velocidad de calentamiento y velocidad angular hasta 50 °C, manteniendo la temperatura constante durante 2 min. Cada muestra se analizó por triplicado.

### **2.1.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Las propiedades térmicas de los almidones hidrolizados y succinatados se determinaron en un calorímetro diferencial de barrido (Modelo 822E. Mettler Toledo, Griefensee, Zurich, Sz), bajo la metodología descrita por Fonseca-Florido et al. (2016). Se pesaron 4 mg de muestra, en base seca, se colocaron en crisoles de aluminio estándar de 40 µL, se adiciono agua destilada hasta alcanzar una relación 1:4 (almidón/agua) y como referenciase utilizó un crisol vacío. La rampa de calentamiento empleada fue de 25-95 °C, con una velocidad de 5 °C/min. Se determinó la temperatura de inicio ( $T_o$ ), de gelatinización ( $T_p$ ), final ( $T_e$ ) y la entalpia de gelatinización ( $\Delta H$ ). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

### **2.1.5. Análisis de perfil de textura (TPA)**

Se prepararon geles a partir de las muestras de almidones hidrolizados al 20% de sólidos (1:4 almidón-agua), cada muestra se colocó y selló en una jeringa de plástico, las muestras se homogenizaron por 3 min, posteriormente, se calentaron con agitación constante (90 °C/30 min), una vez obtenidos los geles, se enfriaron a temperatura ambiente (25 °C) y se refrigeraron a 4 °C por 24 h. Los geles fueron desmoldados y cortados para obtener muestras de 25 mm de diámetro por 10 mm de alto. El perfil de textura se evaluó en un texturómetro (TA-XT plus, Stable Micro Systems, United Kingdom MA, USA). Para el análisis de perfil de textura (TPA), las muestras fueron sometidas a dos ciclos de compresión a un 30% de altura inicial, con una velocidad de 2 mm/min. El valor de dureza se calculó a partir del gráfico de TPA. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

### **2.1.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

La morfología de los almidones hidrolizados y succinatados, así como también de las muestras obtenidas por secado por aspersión, se observaron en un microscopio electrónico de barrido (modelo JEOL JSM-6300 Akishima, Tokyo, Japón). Las muestras secas se colocaron sobre un porta-muestras cubierto con cinta electro-conductiva de carbono de doble cara, posteriormente, fueron recubiertas con una capa de oro. Las condiciones bajo las cuales se observaron fueron 15 A y 20 kV. El tamaño de los gránulos de almidón fue obtenido mediante el promedio de 20 mediciones.

### **2.1.7. Hidrólisis ácida**

La hidrólisis ácida del almidón de maíz, se realizó empleando un diseño central compuesto, rotatable (Tabla 2.1) con 16 tratamientos y 8 puntos centrales, para cada uno de los tratamientos, la hidrólisis se llevó a cabo de la siguiente forma. Cien gramos de almidón, en base seca, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, al cual se le adicionaron 300 mL de una solución acuosa de ácido clorhídrico (HCl), cuya concentraciones fueron establecidas en base al diseño experimental) y se dejó en agitación de acuerdo al tiempo (Tabla 2.1), a temperatura ambiente (25 °C), posteriormente, la solución se neutralizó (NaOH al 20 %), después se lavó tres veces con agua destilada y se centrifugó a 8000 g por 15 min (centrifuga Hermle Labortechnik modelo Z300K, Wehingen, Alemania). El almidón

precipitado se secó en una estufa con circulación de aire (Lab-Line, Ambi-Hi- Low Chamber, Livonia, Michigan, USA) a 40 °C, durante 24 h, luego fue molido y tamizado utilizando una malla de 250 µm. Posteriormente, se colocaron en bolsas de polietileno (Ziploc Brand Bags, Racine, Wisconsin, USA) y se almacenaron hasta su posterior análisis.

**Tabla 2.1.** Diseño central compuesto rotatable de dos factores ( $\alpha=1.414$ ).

Variable independiente	Niveles				
	$-\alpha$	-1	0	1	$\alpha$
Tiempo (h)	1.37	2	3.5	5	5.62
Concentración de HCl (mol/L)	1.39	2.02	3.5	5	5.70

### 2.1.7.1. Optimización del proceso de hidrólisis ácida

Una vez obtenidos los datos, se analizaron por regresión lineal múltiple, obteniendo gráficas de superficie de respuesta. Se utilizó el paquete estadístico Design-Expert (versión 7.1.5., Stat-Ease, Minneapolis, USA) con un nivel de confianza del 95%. La optimización del proceso de hidrólisis ácida, se realizó con la metodología de sobreposición de superficies de respuesta, donde las respuestas seleccionadas fueron: viscosidad de pico (VP), índice de solubilidad (S) y poder de hinchamiento (SP), estos últimos determinados solo a temperatura ambiente (25 °C). Los datos experimentales se ajustaron a un modelo polinomial de segundo orden representado en la ecuación 5:

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 \quad \text{Ec. 5}$$

donde  $y$  es la variable de respuesta,  $x_1$  el tiempo de hidrólisis y  $x_2$  la concentración de ácido clorhídrico.

## 2.2. Esterificación

### 2.2.1. Grado de sustitución (GS) y eficiencia de reacción (ER)

Los almidones [nativo succinatado (OSCS) e hidrolizado optimó succinatado (HOSCS)] fueron esterificados con 2-octen-1-il-succínico anhídrido (OSA, 97% de pureza, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EE.UU.) al 3%, calculo realizado en base al peso seco del

almidón, según la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (FDA, 1994). El proceso de esterificación y el grado de sustitución (GS) se determinaron de acuerdo a la metodología descrita por Bhosale & Singhal, (2006). Se preparó una suspensión en agua al 35-40% de sólidos del almidón (base seca), sometido previamente a una hidrólisis ácida, se mantuvo en agitación constante y se le adicionó por goteo, octenil succínico anhídrido en una proporción de 2 mL/100 g de almidón en base seca, durante 2 h y se ajustó el pH entre 8.0 y 8.5 continuamente, con una solución al 20% de NaOH. Se mantuvieron las mismas condiciones durante un tiempo total de 6 h. Posteriormente se ajustó el pH a 6.5 con HCl (5 M) y la suspensión fue centrifugada a 10,000 rpm, durante 15 min (Centrifuga Hermle Labortechnik, Germany modelo Z300K). Se llevaron a cabo 3 lavados del sedimento con agua destilada, para eliminar residuos del reactivo. El almidón succinatado se secó en una incubadora de aire circulante (Lab-Line, Ambi-Hi-Low Chamber, EE.UU.) a 40 °C durante 24 h, posteriormente fue molido en un mortero y cribado en una malla de 300 µm, después se introdujeron las muestras en bolsas (Ziploc Brand Bags) y se almacenaron en un recipiente de plástico sellado a temperatura ambiente (25 °C) para sus posteriores análisis.

El grado de sustitución (GS) con OSA, se determinó de acuerdo con el método descrito por Bhosale & Singhal (2006). Se pesaron 5 g de almidón en base seca (modificado y sin modificar), fueron suspendidos en 50 mL de agua destilada y se adicionaron 25 mL de una solución acuosa de NaOH 0.5 N a la mezcla de almidones y se dejó reposar durante 24 h. El exceso de álcali fue titulado con una solución estándar de HCl 0.5 N, usando fenolftaleína como indicador. Las muestras de almidón nativo fueron usadas como blancos. El porcentaje de sustitución de los grupos OSA fue calculado mediante la ecuación 6:

$$\% \text{ OSA sustitución} = \frac{(V \text{ blanco} - V \text{ muestra}) \times 0.1 \times N \times 100}{W} \quad \text{Ec. 6}$$

Donde V blanco, es el volumen de HCl gastado en la titulación del blanco (mL); V muestra, corresponde al volumen de HCl gastado en la titulación de la muestra (mL) del almidón succinatado; W, es el peso de la muestra (g); N, Normalidad de la solución de HCl.

El grado de sustitución (GS) fue calculado a partir del valor obtenido del % OSA sustituyéndolo en la ecuación 7:

$$GS = \frac{162 \times \text{OSA sustitución}}{21,000 - (209 \times \text{OSA sustitución})} \times 100 \quad \text{Ec. 7}$$

Donde 162 = masa molecular de la unidad de glucosa anhidra; 21.000 = 100 x masa molecular del grupo octenil succínico; 209 = masa molecular del grupo octenil succínico.

La eficiencia de reacción (ER) se determinó bajo la ecuación 8:

$$ER = \frac{\text{Actual GS}}{\text{Teórico GS}} \times 100 \quad \text{Ec. 8}$$

El GS teórico, se calculó sobre la base del supuesto de que OSA reaccionó cuantitativamente en el almidón para formar el derivado éster.

Los almidones modificados obtenidos fueron evaluados mediante solubilidad (S) y poder de hinchamiento (SP) en función de la temperatura, viscosidad de pico (VP), calorimetría diferencial de barrido (DSC), microscopía electrónica de barrido (SEM), empleando las metodologías descritas anteriormente, anexando métodos espectroscópicos descritos a continuación.

### **2.2.2. Espectroscopia de infrarrojo (FT-IR)**

Los espectros FT-IR de los almidones de maíz, nativo y modificados, se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro de infrarrojo (Perkin Elmer System 200 FT-IR) equipado con un sistema de reflectancia total atenuada (ATR) a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C. Para cada muestra se colectaron 48 barridos con una resolución de  $4 \text{ cm}^{-1}$  y de estos se obtuvo un valor promedio. Se trabajó en la región de 400 a  $4,000 \text{ cm}^{-1}$ .

### **2.2.3. Espectroscopia de Raman (FT-Raman)**

Los espectros de Raman, se obtuvieron en un Espectrómetro FT-Raman 2000R NIR de Perkin Elmer (Perkin Elmer, Inc., MA, EE.UU.) equipado con un láser Nd: YAG, que emitía a una longitud de onda de 1064 nm y un detector InGaAs. Para estos análisis, se utilizó la

geometría refractiva de retrodifusión a 180°. El espectrómetro se manipulo mediante el software Perkin-Elmer Spectrum. Los datos espectrales para el almidón de maíz se obtuvieron con una resolución de 4 cm<sup>-1</sup> con una potencia láser nominal de 500 mW. Para cada espectro, se acumularon 20 exploraciones para asegurar una relación señal/ruido aceptable. Todos los espectros Raman se corrieron a temperatura ambiente (25 °C).

### **2.3. Extrusión de almidón modificado**

El almidón de maíz succinatado hidrolizado (HOSCS), fue extrudido en un extrusor de un tornillo simple (KE 19 Brabender, Germany), el barril del extrusor es estriado y está dividido en tres zonas de calentamiento, las temperaturas del barril del extrusor se establecieron en 80, 110, 110 y la de la matriz en 120 °C. Se utilizó un tornillo con una relación de compresión 2:1 y una velocidad de 250 rpm, la velocidad de alimentación fue de 30 g/min. Se utilizó una matriz circular con una boquilla de salida de 4 mm de diámetro interno. La humedad del HOSCS fue del 20%. La muestra extrudida se colocó en una estufa con circulación de aire (Lab-Line, Ambi-Hi-Low Chamber, Livonia, Michigan, EE.UU.) a una temperatura de 65 °C durante 3 h, finalmente se molió, utilizando una licuadora de cocina (Oster, modelo Bpst02 B00 - L0202, México) y se tamizó en una malla con una abertura de 250 µm. El almidón de maíz succinatado hidrolizado extrudido (EHOSCS) fue almacenado en bolsas de polietileno hasta su posterior uso.

### **2.4. Obtención del extracto acetónico de *Hibiscus safdariffa* L.**

El extracto acetónico de HS se obtuvo bajo la metodología descrita por Cruz-Gálvez et al. (2013). Se pesaron 100 g de cálices, se dejaron macerar en acetona, en un recipiente sellado por siete días. El extracto se filtró (Whatman Papel N° 2) y se concentró en un evaporador rotatorio R-205V800, Büchi Labortechnik AG. CH-9230, Flawil, Suiza, hasta retirar el disolvente, recuperándose el extracto obtenido en un cristalizador, colocándolo en una estufa con circulación de aire (Lab-Line, Ambi-Hi-Low Chamber, Livonia, Michigan, EE.UU.) a una temperatura de 50 °C, para retirar en su totalidad la acetona restante, el extracto concentrado se almacenó en recipientes de cristal color ámbar a 4 °C para su posterior uso y análisis.

## 2.5. Proceso de microencapsulación del extracto de HS y optimización

Para la optimización del proceso de microencapsulación, se utilizó un diseño experimental factorial completo  $2^3$ , donde las variables independientes analizadas fueron la relación de almidón modificado y pectina de bajo metoxilo (MLP) a diferentes porcentajes (0, 5 y 10%), así como la temperatura de secado (Tabla 2.2). Las variables respuesta fueron el coeficiente de difusión, la eficiencia de encapsulación, la higroscopicidad y la actividad antimicrobiana *in vitro*. El EHOSCS con MLP se mezclaron en base seca, de acuerdo al diseño de experimentos (Tabla 2.2), mientras que la concentración del extracto adicionado, se mantuvo constante a 6 g/100 mL, posteriormente se mezclaron todos los componentes, presentando una concentración de sólidos solubles totales (SST) de 16 g/100 mL. La cantidad de extracto adicionado se determinó de acuerdo a los resultados obtenidos en ensayos previos utilizando solo almidón modificado como material de pared, de acuerdo a la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto encapsulado contra bacterias patógenas. Todos los componentes fueron mezclados en una parrilla con agitación por un periodo de 30 min, posteriormente se sometió a homogenización utilizando un Ultra Turrax T-Homogenizer 25-SI a 12000 rpm durante 4 min (IKA Works, Wilmington, NC, USA) con ayuda de una propela S25N-25G-ST, una vez homogenizadas las mezclas, se alimentaron en un secador por aspersión (Buchi B-191 Labortechnik AG laboratory spray dryer, Flawil, Switzerland), con una boquilla de 0.5 mm, a una velocidad de flujo de 10 mL/s bajo las condiciones establecidas por en el diseño experimental. Las microcápsulas obtenidas se recuperaron y se almacenaron en bolsas de polietileno con sello hermético a 4 °C, las cuales fueron aisladas de la luz, hasta futuros análisis.

La optimización del proceso de encapsulación se realizó utilizando el software estadístico Design expert versión 7.1 (Stat-Ease, Inc., MN, USA). Las respuestas utilizadas para la optimización fueron; el máximo coeficiente de difusión de los compuestos fenólicos, la máxima inhibición contra microorganismos patógenos (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* y *Shigella*), la máxima eficiencia de encapsulación y la menor higroscopicidad. Las condiciones óptimas teóricas se validaron experimentalmente, realizando tres experimentos bajo las condiciones óptimas.

**Tabla 2.2.** Diseño experimental factorial 2<sup>3</sup> para la optimización del proceso de microencapsulación.

Pectina (%)	Temperatura de secado (°C)	Almidón modificado base seca (g)
0 (0 g)	100	10
	120	10
	140	10
5 (0.5g)	100	9.5
	120	9.5
	140	9.5
10 (1.0 g)	100	9
	120	9
	140	9

### 2.5.1. Caracterización de microcápsulas

A las microcápsulas obtenidas se les determinó su actividad de agua, pH, contenido de humedad, higroscopicidad, contenido total de compuestos fenólicos (PTC), Eficiencia de encapsulación (EE), tamaño de partícula y distribución de tamaño de partícula, cuyas metodologías se describen a continuación. Todas las determinaciones fueron hechas por triplicado.

#### 2.5.1.1. Actividad de agua ( $a_w$ )

Se utilizó un medidor de actividad de agua (AquaLab LITE PawKit, Decagon Devices, EE.UU.) para medir  $a_w$  del extracto y de las microcápsulas.

#### 2.5.1.2. pH

Para determinar el pH del extracto y de las microcápsulas, se suspendieron 5 g de muestra en 30 mL de agua desionizada a temperatura ambiente (25°C), y se midieron usando un pH metro previamente calibrado con soluciones buffer estándar de pH 7 y 4.

#### 2.5.1.3. Humedad

El contenido de humedad del extracto y de las microcápsulas se determinó por la metodología descrita por la AOAC (AÑO), método número 925.10, utilizando una estufa (Lab-Line, Ambi-Hi-Low Chamber, Livonia, Michigan, EE.UU.) a 130°C durante 1 h por diferencia de pesos después del secado.

#### 2.5.1.4. Higroscopicidad

La higroscopicidad de las microcápsulas se determinó mediante la metodología descrita por Tonon et al. (2008). Se colocó 1 g de muestra seca sobre un recipiente hermético, dentro de una incubadora (modelo LCO-266 AIP DAIHAN LABTECH INDIA PVT.LTD), bajo las siguientes condiciones: temperatura 25 °C y humedad relativa del 75.3%. Las muestras se pesaron después de una semana y se determinó la higroscopicidad y se expresó en g de agua adsorbida por 100 g de sólido seco (100 g/g).

#### 2.5.1.5. Compuestos fenólicos totales, superficiales y eficiencia de encapsulación

Los compuestos fenólicos totales (CFT) y los compuestos fenólicos superficiales (CFS), fueron cuantificados por espectrofotometría de acuerdo a la metodología descrita por Díaz-Bandera et al. (2015) y Sáenz et al. (2009), con algunas modificaciones. Primeramente, se construyó una curva estándar, utilizando diferentes concentraciones de ácido gálico, desde 0.01 hasta 0.1 mg mL<sup>-1</sup>. Para la determinación de CFT fueron pesados 3 mg de microcápsulas y dispersadas en 15 mL de una solución de etanol, ácido acético y agua (50:8:42). Esta dispersión se agitó en un Vortex por 1 min y luego se ultrasónico por 30 min. El sobrenadante se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min y se filtró (0.45 µm Millipore filter). Las concentraciones de compuestos fenólicos fueron cuantificados por el método de Folin-Ciocalteu y se expresó en mg equivalentes de ácido gálico (mg GAE) por g de material seco. Para la determinación de CFS, se emplearon las mismas condiciones descritas anteriormente, únicamente en este caso, se empleó como agente dispersante etanol-metanol (1:1). La eficiencia de encapsulación (EE), se calculó mediante el porcentaje de compuestos fenólicos superficiales (CFS) y compuestos fenólicos teóricos totales (CFTT) de acuerdo a las ecuaciones 9 y 10, respectivamente.

$$CFS(\%) = \frac{\text{Compuestos fenólicos superficiales}}{\text{Compuestos fenólicos teóricos totales}} \times 100 \quad \text{Ec. 9}$$

$$EE(\%) = 100 - CFS(\%) \quad \text{Ec. 10}$$

### **2.5.1.6. Distribución de tamaño de partícula**

Se determinó la distribución del tamaño de partícula usando un analizador de tamaño de partículas por difracción laser (LS13320, Beckman Coulter), en una celda de flujo continuo. El índice de refracción (IR) de la muestra se fijó a 1.54. El IR de la fase continua se ajustó a 1.33 (agua) y el índice de oscurecimiento fue 8-10%.

## **2.6. Actividad antimicrobiana**

### **2.6.1. Cepas**

Para evaluar el efecto antimicrobiano de las microcápsulas, se utilizaron cepas de: *S. Typhimurium* (ATCC 14028); *L. monocytogenes* (ATCC 19115); *S. aureus* (ATCC 25923); *S. sonnei* (ATCC 12022); *E. coli* (ATCC 25922). Todas las cepas fueron marcadas con resistencia a Rifampicina (R+) (Castro-Rosas & Escartín, 2000). La resistencia de las cepas al antibiótico se mantuvo en el transcurso del estudio. Las cepas utilizadas se mantuvieron a 4-7 °C en agar base sangre (ABS) y se activaron en caldo soya tripticaseína (CST) con incubación de 35 °C/24 h.

### **2.6.2. Ensayos del extracto y microcápsulas en medio de cultivo**

Se utilizó la técnica de difusión en agar, empleando discos de papel. Sobre el agar se coloraron 100 µL de cepa (concentración aproximada de  $10^6$  UFC/mL), la cual se extendió en toda la superficie del agar, con la ayuda de una varilla de vidrio (doblada en forma de “L”), hasta que el inóculo se absorbió. Posteriormente, sobre cada placa inoculada, se colocaron 10 µL del extracto (500, 100, 20 mg/mL), sobre un disco de 5 mm de diámetro. Para las microencápsulas, se colocaron directamente en el agar 10 mg de polvo obtenido cubriendo un diámetro de 5 mm, las cajas se mantuvieron a temperatura ambiente (25 °C), hasta que las microcápsulas fueron absorbidas por completo; las cajas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Después de la incubación, con ayuda de un vernier digital, se midió el diámetro de cada una de las zonas de inhibición formadas.

### **2.6.3. Elaboración del jamón**

Se elaboró jamón bajo la metodología descrita por Aguilar-Rico et al. (2011), brevemente, se compró pierna de cerdo y en el laboratorio se deshuesó y se separó la carne magra del

tendón y grasa excedente. La carne fue molida, posteriormente se preparó la solución de salmuera con agua/hielo (1:1) y se agito durante 10 min hasta disolver completamente todas las sales y aditivos empleados. Una vez preparada la salmuera, se depositó junto con la carne y las microcápsulas optimas en un recipiente hermético cerrado, para masajear, hasta observar una buena extracción de proteína durante 60 min. Después del proceso de masaje, la pasta se dejó en refrigeración y vacío por un periodo de 18 h. Posteriormente se embutió y coció el jamón, hasta alcanzar una temperatura interna mínima de 68 °C a 72 °C. Finalmente se enfrió y se refrigeró a 4 °C. Se elaboraron tres jamones (con microcápsulas optimas, sin microcápsulas y sin benzoato sódico como conservador).

#### **2.6.4. Ensayos en jamón**

En condiciones de higiene, el jamón fue cortado en trozos (aprox. 2.5 x 2.5 cm) y se colocaron en bandejas de acero inoxidable. Cada trozo de jamón, se inoculó con aproximadamente 6 log UFC/mL de una suspensión de cada bacteria de forma individual de *S. aureus* y *S. Typhimurium*, mediante la colocación de 10 µL, en el centro de una superficie externa del trozo de jamón. Una vez inoculadas todas las piezas, se dejaron en reposo por 30 min, finalmente, se empaco al vacío, empleando empaques especiales para ello y se almacenó a 5 ± 2 °C. Periódicamente, se tomaron al azar trozos inoculados con cada microorganismo y se efectuó el recuento de los patógenos. Para esto, los trozos de jamón se colocaron en bolsas de plástico, con 20 ml de diluyente peptona. Posteriormente, los materiales fueron frotados manualmente por la parte exterior de la bolsa por 1 minuto. Del contenido de la bolsa, se tomó 1 ml y se colocó en una caja Petri. Se realizó una dilución decimal, se agito y colocó 1 ml de esta dilución en una segunda caja Petri. Se agregó agar para métodos cuenta estándar (con rifampicina 100 mg/L) en cada caja de Petri inoculada y se realizaron movimientos circulares para homogenizar la distribución de la muestra con el agar, posteriormente se incubo a 37 °C durante 24 h. Finalmente se realizó el conteo de UFC. El conteo se realizó para cada muestra por triplicado, a los 0, 2, 5, 10, 15, 25 días. Se utilizó un control positivo (jamón inoculado/benzoato) y negativo (jamón inoculado/sin benzoato y sin microcápsulas), para este experimento se utilizaron las microcápsulas optimas, sustituyendo la fécula de maíz en la elaboración del jamón. Se decidió utilizar *S. Typhimurium* y *S. aureus* por su importancia a nivel mundial, tanto en países en desarrollo, como en países desarrollados, los

cerdos están influenciados por ser portadores de *Salmonella*, mientras que *S. aureus* se encuentra comúnmente en la piel y fosas nasales del humano (Fernández-Escartín, 2000), por lo que existe el riesgo de que este patógeno llegue a los productos cárnicos durante su elaboración y manipulación.

#### **2.6.4.1. Recuentos microbianos**

Para la cuantificación de bacterias presentes en jamón, cada muestra se colocó en una bolsa estéril con 20 mL de agua de peptona estéril (0.1%) y se homogenizó en un stomacher durante 90 s. Se realizaron diluciones decimales de esta suspensión, utilizando peptona como diluyente (0.1%). Los conteos se realizaron por triplicado, las suspensiones bacterianas se diseminaron en placas con agar para métodos cuenta estándar, conteniendo 100 mg R +/-L. Las placas se incubaron a  $35 \pm 2$  °C, durante 24 h. Con el fin de evaluar la presencia de *S. aureus* y *S. Typhimurium*.

### **2.7. Caracterización fisicoquímica y textural del jamón**

#### **2.7.1. Determinación de pH**

El pH de las muestras se determinó bajo la metodología descrita por Viuda-Martos et al. (2011).

#### **2.7.2. Rendimiento y humedad**

El rendimiento se evaluó bajo la metodología descrita por Aguilar-Rico et al. (2011), se calculó utilizando la relación entre el peso del producto después de la cocción y el peso del producto antes de la cocción. La humedad exprimible se midió utilizando tubos de centrifuga de 50 mL, se colocaron 2 g de jamón sobre una capa de algodón, cubierta con un disco de papel filtro Whatman No. 1, se centrifugó a 6000 rpm durante 30 min, la muestra fue extraída y pesada nuevamente, el porcentaje de humedad exprimible se reportó como la relación entre el peso final e inicial del jamón.

#### **2.7.3. Análisis de color**

Se utilizó el espacio de color CIE Lab, determinando las coordenadas: luminosidad (L), tono rojo (+a\*) y tono amarillo (+b\*). Las determinaciones de color se hicieron utilizando un

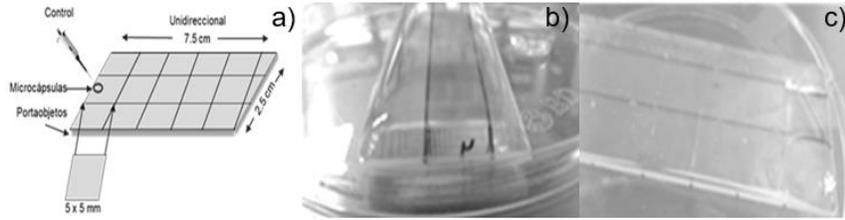
espectrofotómetro MinScan by HunterLab (Reston, Virginia, USA). Las mediciones fueron hechas por triplicado empleando como estándar la muestra de jamón elaborada sin microcápsulas.

#### **2.7.4. Análisis de perfil de textura (TPA)**

El TPA se realizó con un texturómetro (TA-XT plus, Stable Micro Systems, United Kingdom MA, USA), equipado con una celda (P/75). El jamón se cortó en rodajas de 5 cm de diámetro por 1 cm de espesor, se comprimió 20% de su altura original, con una celda de acrílico de ¼ de pulgada a una velocidad constante de 1 mm/s. De las curvas fuerza-deformación se calcularon los parámetros mecánicos primarios: dureza, cohesividad, adhesividad y elasticidad, y los secundarios: masticabilidad y gomosidad.

#### **2.8. Difusión del extracto microencapsulado *in vitro***

El ensayo de difusión del extracto de HS encapsulado fue determinado mediante los coeficientes de difusión, empleando la metodología descrita por Samprovalaki et al. (2012), con algunas modificaciones. La superficie de un portaobjetos, con la ayuda de un plumón de punta fina, fue fraccionado en cuadrantes de 5 x 5 mm, mientras que a la segunda cara del mismo se le añadió y expandió agar métodos estándar (MS; Bioxon, Becton Dickinson, México) a una temperatura de 50 °C (Fig. 2.1) hasta cubrir por completo el portaobjetos, con el fin de tener un grosor aproximado de 3 mm, una vez solidificado el agar (25 °C), posteriormente, en la parte inicial del centro del primer cuadrante, se colocaron 10 mg de microcápsulas, esto con la finalidad de obtener un flujo unidireccional del extracto acetónico encapsulado, como control se empleó extracto acetónico de HS sin encapsular, con una concentración de 1.5 g/25 mL (1:3 p/v), de este se tomó una alícuota de 10 µL. Finalmente se realizaron cuidadosamente cortes de los cuadrantes cada 15 min con ayuda de un bisturí, a cada cuadrante cortado se le determino el contenido de fenoles totales (CFT) para calcular la difusibilidad del extracto de HS de las microcápsulas sobre el agar en función del tiempo y de la distancia.



**Figura. 2.1.** Representación esquemática del ensayo de difusión; a) Portaobjetos con cuadrantes esquematizados, b) colocación del agar sobre el portaobjetos, c) corte de cuadrantes del agar.

### 2.8.1. Coeficientes de difusión de microcápsulas

Para calcular los coeficientes de difusión, se parte del modelo de difusión lineal de partículas materiales en un medio, el cual se plantea a partir de la segunda ley de Fick (Ec. 11).

$$C \cdot [D(x, y, z) \cdot C(x, y, z)] = \frac{\partial c(x, y, z)}{\partial t} \quad \text{Ec. 11}$$

donde  $D$  es el coeficiente de difusión de la especie de concentración  $c$  en un punto espacial  $(x, y, z)$  en el tiempo  $t$ .

Con respecto al experimento realizado para la obtención de los coeficientes de difusión de forma unidireccional se obtuvo una ecuación diferencial parcial (consecuencia inmediata de la segunda ley de Fick) o ecuación de difusión lineal (Ec. 12).

$$D \frac{\partial^2 c(x, t)}{\partial x^2} = \frac{\partial c(x, t)}{\partial t} \quad \text{Ec. 12}$$

Aplicando la transformada de Laplace a cada término en la ec. 11 se obtuvo la ecuación 13.

$$\mathcal{L} \frac{\partial c}{\partial t} = D \text{ eff } \mathcal{L} \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad \text{Ec. 13}$$

Por lo tanto, la ecuación diferencial parcial (Ec. 14) se resolvió en una ecuación ordinaria:

$$c = c_1 \cos h \sqrt{\frac{t}{Def f}} x + c_2 \operatorname{sen} h \sqrt{\frac{t}{Def f}} x + \frac{C_0}{t} \quad \text{Ec. 14}$$

Calculando  $C_1$  y  $C_2$  a partir de la ec. 14.

$$C_1 = \frac{C_1 - C_0}{t} \quad \text{Ec. 15}$$

$$C_2 = - \frac{c_1 \operatorname{sen} h \sqrt{\frac{t}{Def f}} \mathcal{L}}{\cos h \sqrt{\frac{t}{Def f}} \mathcal{L}} \quad \text{Ec. 16}$$

Entonces sustituyendo  $C_1$  y  $C_2$  en la ec. 14 y resolviendo la ec. se obtuvo la ecuación 17.

$$C = C_1 - \frac{4(C_1 - C_0)}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{2n-1} e^{(2n-1)^2 \pi^2 Def f \frac{t}{4\mathcal{L}^2}} \operatorname{Sen} \frac{(2n-1)\pi x}{2\mathcal{L}} \quad \text{Ec. 17}$$

Donde  $C$ , es la fuerza impulsora de la transferencia de masa adimensional;  $T$  el tiempo adimensional y  $D$  es la distancia adimensional con dirección de  $X$ .

El análisis de los datos obtenidos experimentalmente, para determinar los coeficientes de difusión ( $D$ ) en términos de parámetros adimensionales, a través de una pared plana o una membrana con un espesor de 5 mm (agar-gelificado), cuyos límites fueron establecidos de la siguiente forma, primer cuadrante (0 mm)  $x = 0$ , hasta el último cuadrante (60 mm),  $x = l$ , donde la sustancia isotrópica del extracto encapsulado de HS ( $C$ ) inició a partir del primer cuadrante, en el tiempo cero, iniciando la difusión sobre la superficie, hasta alcanzar el límite de distancia del ensayo (60 mm) en determinado tiempo, para evaluar la difusión del extracto sobre la superficie, se cuantificó el contenido de fenoles totales por cada cuadrante cada 15 min. Para obtener los valores de  $D$ , para cada tratamiento del diseño de experimentos (Tabla 2.2) se utilizó la ecuación 17.

Por lo tanto, las condiciones límite establecidas fueron:

$$\begin{aligned}
 T = 0, & \quad X = 0 \quad y \quad C = C_o \\
 T > 0, & \quad X = \pm l \quad y \quad C = C_l
 \end{aligned}$$

La ecuación 17 se puede reescribir en términos adimensionales mediante las siguientes ecuaciones (19, 20 y 21), partiendo de la obtención de la concentración de polifenoles totales presentes en cada cuadrante, obtenidos cada 15 min, hasta el último cuadrante empleando la ecuación Ec. 17.

$$C = \frac{C - C_o}{C_l - C_o} \quad \text{Ec. 18}$$

$$T = \frac{Dt}{l^2} \quad \text{Ec. 19}$$

$$X = \frac{x}{l} \quad \text{Ec. 20}$$

## 2.9. Análisis estadístico

Los datos cuantitativos se expresaron como la desviación estándar  $\pm$  media. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de Tukey, con un intervalo de confianza del 95% ( $p \leq 0.05$ ). Se utilizó el software Origin versión 8.0 (Origin Inc. Northampton, MA, EE. UU.) Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

## CAPÍTULO III

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3. Caracterización fisicoquímica de almidón nativo y modificado**

#### **3.1. Efecto del tiempo de hidrólisis y de la concentración de ácido clorhídrico sobre las propiedades fisicoquímicas de almidón hidrolizado**

El contenido de amilosa del almidón de maíz (CS) fue del  $27\pm 0.57$  %. Los coeficientes de regresión del modelo ajustado para todas las variables respuesta evaluadas para determinar el efecto del tiempo de hidrólisis y de la concentración de ácido clorhídrico sobre las propiedades fisicoquímicas del almidón de maíz se presentan en la Tabla 3.1. Los valores de los coeficientes de variación ( $R^2$ ) de todos los modelos estuvieron comprendidos entre 0,72 a 0,97. El tiempo de hidrólisis en sus términos lineal y cuadrático, tuvo un efecto estadísticamente significativo ( $p\leq 0.05$ ) en todas las respuestas evaluadas, mientras que la concentración de ácido clorhídrico, en ambos términos (lineal y cuadrático), presentó un efecto estadísticamente significativo ( $p\leq 0.05$ ) para todas las respuestas evaluadas. Finalmente, la interacción entre el tiempo de hidrólisis y la concentración de ácido clorhídrico mostró un efecto estadísticamente significativo ( $p\leq 0.05$ ) sobre las variables S60, S70, S80, S90 y dureza.

**Tabla 3.1.** Coeficientes estimados del modelo ajustado y nivel de significancia para todas las respuestas evaluadas para almidones hidrolizados de CS.

Parámetros de respuesta	Intercepto	Lineal		Interacción	Cuadrático		R <sup>2</sup>
	$\beta_0$	$\beta_1$	$\beta_2$	$\beta_{12}$	$\beta_{11}$	$\beta_{22}$	
S25 °C	4.2516	<b>-1.3210</b>	<b>-1.9847</b>	0.8893	<b>0.0908</b>	<b>0.2072</b>	0.91
S60 °C	-32.5553	<b>13.0323</b>	<b>15.3608</b>	<b>-4.0636</b>	<b>-0.9805</b>	<b>-1.6289</b>	0.91
S70 °C	-35.2554	<b>15.0651</b>	<b>19.2198</b>	<b>-5.29</b>	<b>-0.917</b>	<b>-2.2779</b>	0.91
S80 °C	-25.5997	<b>2.2998</b>	<b>17.5676</b>	<b>-0.9041</b>	<b>0.7239</b>	<b>-2.7483</b>	0.80
S90 °C	-34.6288	<b>8.767</b>	<b>19.9084</b>	<b>-2.8866</b>	<b>-0.4909</b>	<b>-2.9546</b>	0.97
SP25 °C	0.2397	<b>0.7117</b>	<b>1.2208</b>	-0.3956	<b>-0.0258</b>	<b>-0.1564</b>	0.92
SP60 °C	10.0482	<b>-4.6313</b>	<b>-0.7695</b>	0.4412	<b>0.7529</b>	<b>0.0755</b>	0.72
SP70 °C	14.1583	<b>-3.2299</b>	<b>-3.228</b>	0.8578	<b>0.3251</b>	<b>0.4691</b>	0.91
SP80 °C	14.7935	<b>-4.004</b>	<b>-1.6418</b>	1.466	<b>0.4704</b>	<b>-0.0119</b>	0.81
SP90 °C	18.8082	<b>-4.975</b>	<b>-2.7948</b>	1.0383	<b>0.7427</b>	<b>0.1839</b>	0.72
VP	1367.01	<b>320.10</b>	<b>694.77</b>	-202.46	<b>-64190</b>	<b>-134.72</b>	0.97
Dureza	-27.02	<b>17.37</b>	<b>17.36</b>	<b>-4.5622</b>	<b>-1.9769</b>	<b>-2.2502</b>	0.91

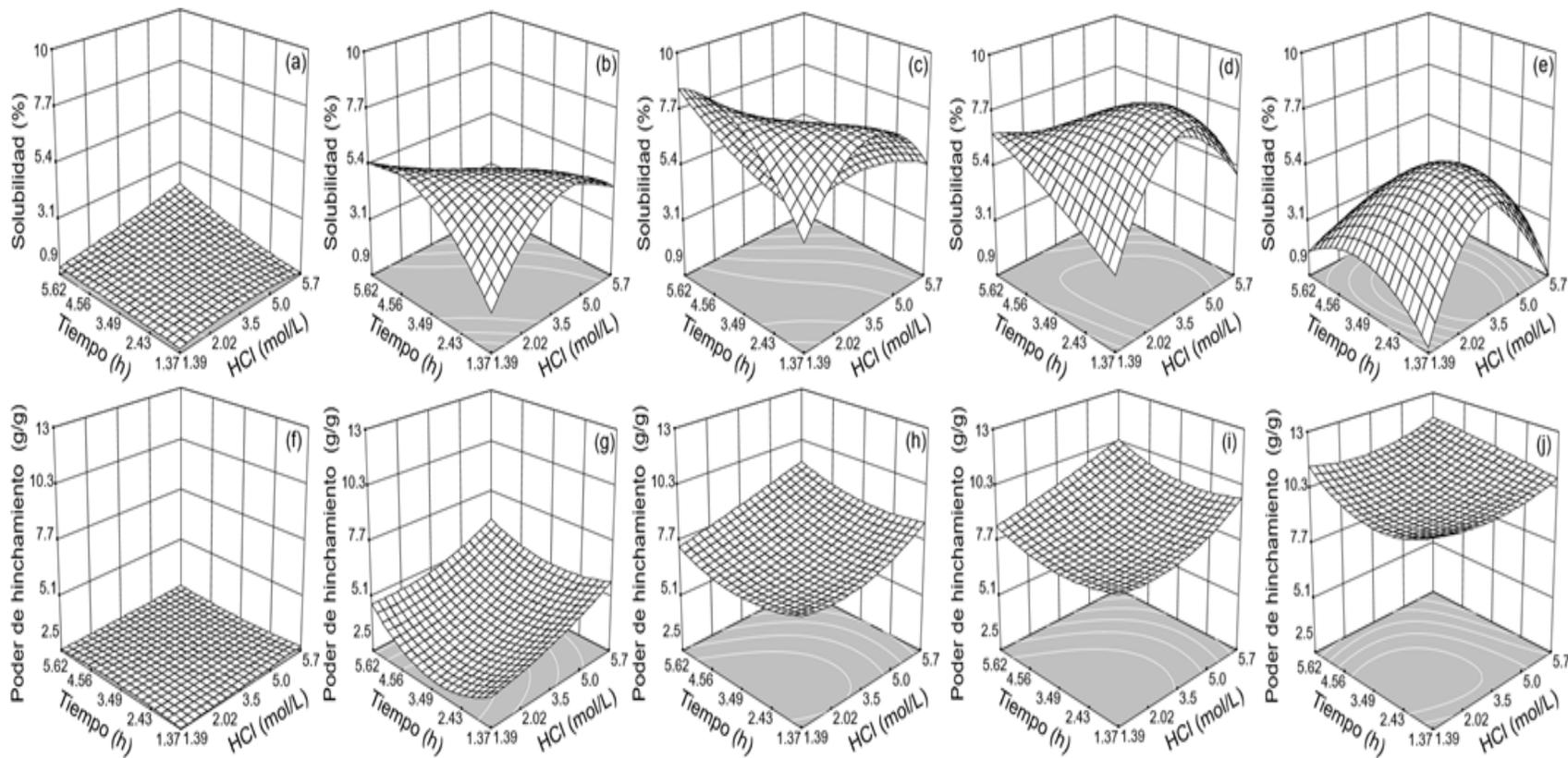
Modelo en el cual  $\beta_1$ ,  $\beta_{11}$  y  $\beta_2$ ,  $\beta_{22}$  corresponde al tiempo (h) y a la concentración de ácido clorhídrico (%), respectivamente, para la ecuación:  $y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2$ . Números con negrita presentan efecto significativo  $p < 0.05$ . Viscosidad de pico (VP), Solubilidad (S) y Poder de hinchamiento (SP) (25, 60, 70, 80 y 90 °C) y análisis de perfil de textura (Dureza).

### **3.1.1. Efecto del tiempo de hidrólisis y de la concentración de ácido clorhídrico sobre la solubilidad (S) y el poder de hinchamiento (SP) del almidón de maíz a diferentes temperaturas**

En la figura 3.1 (a, b, c, d, e), se muestran los gráficos de superficie de respuesta para la solubilidad (S) del almidón de maíz evaluados a diferentes temperaturas (ambiente, 60, 70, 80 y 90 ° C). De forma general se observó que la temperatura de evaluación tuvo un efecto significativo sobre la solubilidad del almidón de maíz hidrolizado. A temperatura ambiente, esta variable se vio afectada ligeramente por la interacción entre el tiempo de hidrólisis y la concentración de ácido, ya que los valores oscilaron entre 0.9 y 2.5%, obteniéndose la mayor solubilidad en condiciones severas de hidrólisis (5.62 h-5.7 mol/L), lo cual puede ser explicado con base a la baja afinidad por el agua que tiene el almidón granular.

Los valores de S, determinados a 60 y 70 °C fueron de 5.4 y 8.8% respectivamente, viéndose afectados principalmente por la concentración del ácido clorhídrico en sus dos terminos (lineal y cuadrático), en segundo lugar, por el tiempo de hidrólisis (lineal y cuadrático), así como por la interacción del tiempo de hidrólisis y la concentración de ácido clorhídrico. Se observó un aumento de la solubilidad, sin embargo, cuando el tiempo de hidrólisis alcanzó su valor máximo y empezó a aumentar la concentración de ácido, la solubilidad disminuyó, observándose el mismo efecto cuando la concentración de ácido alcanza su máximo valor, en el valor más bajo del tiempo de hidrólisis, cuando el tiempo aumenta, la solubilidad baja la solubilidad del almidón. Alcanzándose los mayores valores de solubilidad al mayor tiempo de hidrólisis con la concentración más baja de ácido. A 80 °C la solubilidad máxima fue de 7.7%, sucede un fenómeno similar, sin embargo, se invierte el patrón de solubilidad, ya que, en este caso, los máximos valores de esta respuesta, se obtuvieron con un tiempo de hidrólisis de aproximadamente 2.4 h y una concentración de ácido de 5 mol/L. A 90 °C presentó una solubilidad máxima de 5.5%, en la cual se observó una disminución en el almidón, en comparación con los valores de solubilidad obtenidos a 70 y 80 °C, también se observó que el patrón cambió, obteniéndose los máximos valores de solubilidad a esta temperatura a un tiempo de hidrólisis de 3.5 h y una concentración de ácido de 3.5 mol/L.

Se ha demostrado que la hidrólisis ácida es un enfoque eficiente para revelar la microestructura de los gránulos de almidón y modificar sus propiedades funcionales. La hidrólisis ácida ataca preferentemente la superficie de los gránulos seguida de las regiones amorfas sueltas dentro de los gránulos de almidón, que se componen principalmente de áreas amorfas centrales y anillos de crecimiento amorfos periféricos. La hidrólisis preferencial de regiones amorfas da como resultado un aumento en la proporción relativa de regiones cristalinas y dobles hélices. Tanto la amilosa como la amilopectina se encuentran en la superficie de los gránulos y se atacan simultáneamente en las primeras etapas de la hidrólisis ácida. A medida que progresa la hidrólisis ácida, las propiedades funcionales del almidón nativo se alteran significativamente, lo que puede usarse para diferentes aplicaciones industriales (Wang & Copeland, 2015).



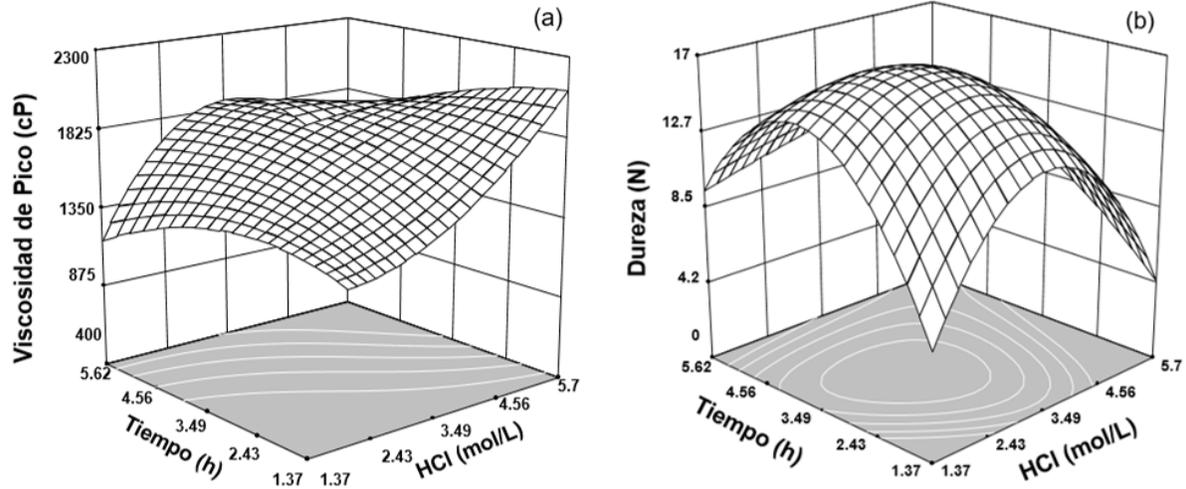
**Figura 3.1.** Efecto del tiempo (h) de hidrólisis y concentración de ácido clorhídrico HCl (mol/L), sobre S a 25 °C (a), 60 °C (b), 70 °C (c), 80 °C (d) y 90 °C (e) y SP a 25 °C (f), 60 °C (g), 70 °C (h), 80 °C (i) y 90 °C (j).

### **3.1.2 Viscosidad de Pico (VP)**

En la viscosidad de pico (VP) de los almidones analizados (Fig. 3.2 a), los valores se vieron afectados por la interacción de las variables independientes, ya que estos valores disminuyeron a medida que aumentaron las condiciones de hidrólisis ácida (tiempo y concentración de ácido clorhídrico), con valores que van desde 2271.54 a 800.4 cP. El comportamiento presentado en el VP se atribuye a la despolimerización de las moléculas de almidón (Ai y Jane 2015), lo que se correlaciona directamente con el aumento del S observado (liberación de dextrina) en función de la temperatura, originando valores de baja viscosidad.

### **3.1.3. Análisis de perfil de textura (TPA)**

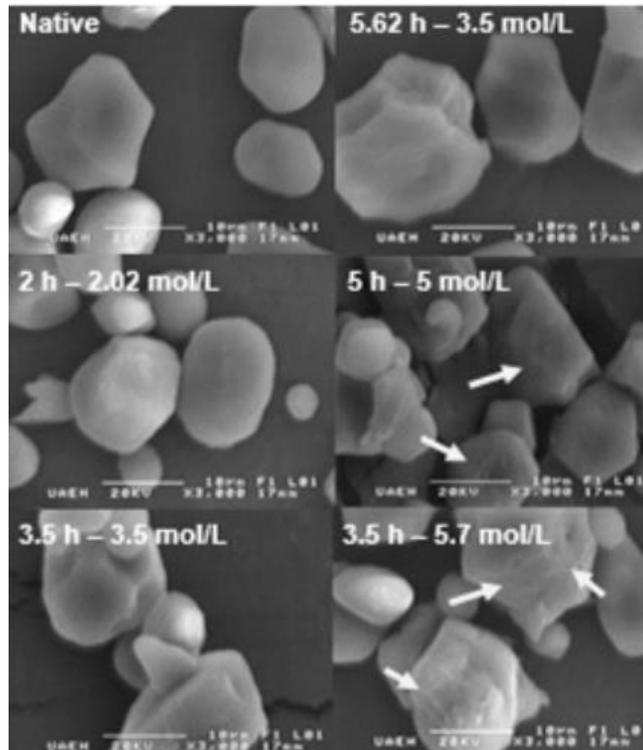
La gelificación del almidón es afectada fuertemente por su contenido y tamaño molecular de la amilosa y amilopectina (Wang et al., 2003), por lo que la dureza de los geles de almidón es influenciada por la formación de una red tridimensional de amilosa (Fig. 3.2 b). En la dureza de los geles de almidón se observó un aumento conforme las condiciones de hidrólisis incrementaron hasta 3.5 h-3.5 mol/L de HCl con un valor máximo de 16.5 N, sin embargo, al seguir incrementándose las condiciones de hidrólisis la dureza disminuyó con valores hasta de 9.3 N. A condiciones de hidrólisis moderadas la dureza de los geles incrementa debido a la liberación rápida de moléculas lineales de almidón para la formación de un gel, mientras que a prolongadas condiciones de hidrólisis se producen geles débiles por la reducción de los pesos moleculares y longitud de cadena (Abdorreza et al., 2012; Singh et al., 2009). La dureza de los geles de CS fue favorecida por el contenido de amilosa de este almidón (27%) permitiendo la formación de una red tridimensional.



**Figura 3.2.** Efecto del tiempo (h) de hidrólisis y concentración de ácido clorhídrico HCl (mol/L), sobre la viscosidad de pico (a) y dureza (b).

### 3.1.4. Morfología y tamaño de partícula (SEM)

El almidón nativo e hidrolizado fueron observados por SEM (Figura 3.3). Las micrográficas de los gránulos de almidón nativo, presentaron una forma poligonal y redonda, con un tamaño de gránulo promedio de 18  $\mu\text{m}$ . En general no se presentaron cambios aparentes sobre la morfología de los gránulos de CS hidrolizados, sin embargo, en los tratamientos más severos bajo el diseño experimental (Tabla 2.1: 3.5, 5, 5.62 h y 3.5, 5, 5.7 mol/L), se observaron pequeños poros producto de la hidrólisis ácida que permiten a las moléculas de agua difundirse más fácilmente dentro de la estructura granular (Chen & Zhang, 2012), lo cual pudo a ver favorecido al incremento de S y SP a ciertas condiciones de hidrólisis ácida y temperatura. Con respecto al tamaño de los gránulos hidrolizados no presentaron diferencias con el almidón nativo. Dependiendo de las condiciones del proceso de hidrólisis ácida, se pueden generar diferentes daños sobre la estructura molecular en el almidón (despolimerización), presentando un efecto significativo sobre las propiedades fisicoquímicas (S y SP en función de la temperatura, las propiedades térmicas, la dureza y morfología del granulo) del CS.



**Figura 3.3.** Micrografías de los gránulos de almidón de maíz; nativo e hidrolizados a diferentes tiempos y concentraciones de HCl.

### 3.1.5. Optimización del proceso de hidrólisis ácida

Los criterios de optimización fueron un valor mínimo para VP y un valor máximo para S y SP mantenido en el rango experimental a temperatura ambiente, ya que estos parámetros se usan ampliamente en diferentes industrias para diferentes procesos como el secado por dispersión. Las condiciones óptimas de hidrólisis predichas por el programa fueron un tiempo de hidrólisis de 4,48 h y una concentración de HCl al 5M. Las condiciones predichas por el diseño fueron validadas experimentalmente, obteniendo los siguientes valores: VP  $322 \pm 1.47$  cP, S  $2.71 \pm 0.09\%$  y SP  $2.22 \pm 0.02$  g / g. Los valores pronosticados por el modelo no diferían en su totalidad, mostrando la razón por la cual el modelo utilizado puede ser efectivo para la optimización del proceso de hidrólisis ácida de CS utilizando estos resultados.

### **3.2. Efecto de la esterificación con anhídrido octenil succínico (OSA) sobre las propiedades fisicoquímicas de almidón modificado**

El almidón hidrolizado bajo condiciones óptimas fue succinatado, con el propósito de evaluar el efecto anfifílico por la esterificación sobre las propiedades fisicoquímicas del almidón, mediante la comparación con el almidón nativo (CS), nativo-succinatado (OSCS), hidrolizado óptimo (HCS) e hidrolizado-succinatado (HOSCS).

#### **3.2.1. Efecto del grado de sustitución (GS) y eficiencia de reacción (ER) sobre OSCS y HOSCS**

El OSCS presentó un GS de  $0.0143 \pm 0.003$  (ER=52.6%), mientras que en el almidón de HOSCS fue de  $0.0208 \pm 0.004$  (ER=75.9%), obteniendo un mayor valor de GS y como consecuencia una mayor ER como consecuencia del proceso previo de hidrólisis ácida realizada en comparación al OSCS, lo cual, es atribuido al incremento de grupos hidroxilo disponibles para esterificarse con los grupos OSA (Wang et al., 2017). La esterificación de los grupos OSA en los componentes del gránulo de almidón sin hidrolizar, preferentemente ocurren en las posiciones 2, 3 y 6 de los carbonos de la unidad de glucosa, de las regiones amorfas (específicamente en las ramificaciones del gránulo), aunado a esto, la compactación del gránulo influye para obtener incrementos o decrementos de GS y ER, ya que, los grupos OSA llegan a quedar sobre la superficie del gránulo (Bai et al., 2014; Bello-Flores et al., 2014), por consiguiente, en este trabajo, las condiciones de hidrólisis ácida (sin disrupción granular) a las que se sometió el almidón de maíz se generó una desestabilización, despolimerización y desobstrucción polimérica del gránulo, permitiendo obtener espacios en las zonas amorfas y generar grupos hidroxilo respectivamente para ser esterificados con grupos OSA, estos cambios originados en los almidones modificaciones están correlacionados e influenciados en las disminuciones de los valores de DSC y VP, indicando cambios estructurales de los componentes poliméricos del gránulo de almidón, manteniendo íntegra su estructura molecular para incrementar su GS y ER.

#### **3.2.2. Solubilidad (S) y poder de hinchamiento (SP) en función de la temperatura**

La solubilidad de CS, HCS, OSCS y HOSCS se presenta en la Tabla 3.2 a diferentes temperaturas (ambiente, 60, 70, 80 y 90 °C). Las muestras presentaron diferencias

significativas  $p < 0.05$  a cada temperatura evaluada. A 25 °C la S fue para HCS>OSCS>CS>HOSCS, mientras que a 60 y 70 °C, la S fue para HCS>OSCS>HOSCS>CS. El comportamiento de OSCS y HOSCS puede ser explicado debido a la incorporación de los grupos OSA.

A 80 y 90 °C, la S fue OSCS>HOSCS>HCS>CS. HCS disminuyó su S debido a la formación de un gel producto de la lixiviación rápida de los polisacáridos del almidón (Jayakody & Hoover, 2002). OSCS y HOSCS, conforme aumento la temperatura incrementaron su solubilidad, lo cual se puede deber al tratamiento alcalino al que fueron sometidos durante el proceso de esterificación, que pudo haber generado una desorganización sobre las zonas amorfas y cristalinas, siendo más notorio sobre OSCS en comparación de HOSCS, donde las cadenas producto del proceso de hidrólisis (dextrinas) pudieron estar interactuando entre ellas o con los grupos OSA. HOSCS presentó un incremento de solubilidad conforme aumento la temperatura con respecto a HCS, indicando que la doble modificación altero la estructura granular que permitió una mayor facilidad de lixiviación de los componentes del almidón.

El SP presentó diferencias significativas  $p < 0.05$  entre los tratamientos sobre todas las temperaturas evaluadas (Tabla 3.2). Con respecto a la temperatura ambiente (25 °C), hubo un incremento en el SP a medida que aumento la temperatura, debido a la desestabilización entre sus componentes del gránulo generado espacios por efecto de la temperatura permitiendo una mayor absorción de agua. A 60 °C el SP fue HOSCS>HCS>OSCS>CS, HOSCS presentó el mayor SP, como consecuencia de la doble modificación en el almidón que ocasiono una mayor alteración en la estructura del gránulo, permitiéndole absorber mayores cantidades de agua, sin embargo, a 70, 80 y 90 °C presentó un ligero incremento. HCS presento los mayores valores de SP a 70, 80 y 90 °C debido a la despolimerización de su estructura obteniendo mayores espacios para absorber agua. A 90 °C el comportamiento de SP fue HCS>CS>OSCS>HOCS. La estructura de la amilopectina es la responsable de la capacidad de gránulo de almidón para retener agua e hinchar (Wang & Copeland, 2012b), una vez que la estructura de amilopectina es modificada, altera el poder de hinchamiento y solubilidad del almidón, lo cual explica las diferencias encontradas entre los diferentes tratamientos, donde la incorporación de grupos OSA puede brindar características

hidrofóbicas o hidrofílicas al almidón dependiendo de la temperatura de evaluación, incrementando o disminuyendo la capacidad de absorción de agua y solubilidad del almidón.

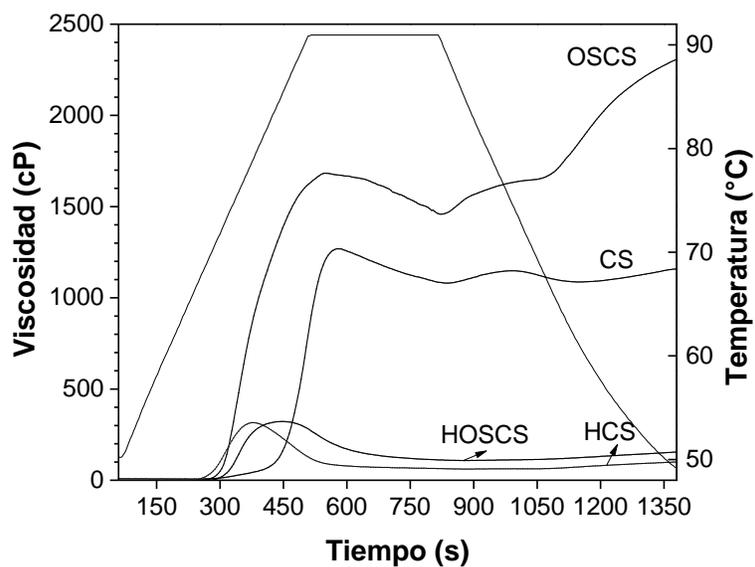
**Tabla 3.2.** Solubilidad (S) y poder de hinchamiento (SP) de almidones modificados a diferentes temperaturas.

Parámetro	Muestra	25 °C	60 °C	70 °C	80 °C	90 °C
S (%)	CS	1.15±0.07 <b>a</b>	1.45±0.03 <b>a</b>	3.48±0.05 <b>a</b>	3.09±0.08 <b>a</b>	1.60±0.03 <b>a</b>
	OSCS	0.85±0.03 <b>a</b>	10.17±0.05 <b>b</b>	15.82±0.06 <b>b</b>	23.37±0.04 <b>b</b>	34.18±0.03 <b>b</b>
	HCS	13.4±0.30 <b>b</b>	18.14±0.13 <b>c</b>	25.23±0.13 <b>c</b>	10.82±0.04 <b>c</b>	6.82±0.04 <b>c</b>
	HOSCS	0.52±0.04 <b>c</b>	9.44±0.13 <b>d</b>	14.51±0.05 <b>d</b>	22.20±0.04 <b>d</b>	32.53±0.10 <b>d</b>
SP (g/g)	CS	1.90±0.005 <b>a</b>	3.63±0.01 <b>a</b>	5.63±0.2 <b>a</b>	7.74±0.1 <b>a</b>	9.91±0.05 <b>a</b>
	OSCS	1.62±0.03 <b>b</b>	3.86±0.1 <b>a</b>	5.14±0.1 <b>a</b>	7.41±0.1 <b>b</b>	9.19±0.05 <b>b</b>
	HCS	2.23±0.05 <b>c</b>	4.24±0.1 <b>b</b>	8.66±0.2 <b>b</b>	9.17±0.1 <b>c</b>	10.17±0.15 <b>c</b>
	HOSCS	2.00±0.01 <b>d</b>	7.25±0.09 <b>c</b>	7.91±0.8 <b>b</b>	8.08±0.1 <b>d</b>	8.54±0.05 <b>d</b>

Diferentes letras minúsculas representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre columna de cada muestra de almidón por cada temperatura. Almidón de maíz (CS), almidón de maíz succinatado (OSCS), almidón de maíz hidrolizado (HCS), almidón de maíz succinatado hidrolizado (HOSCS).

### **3.2.3. Análisis de perfil de viscosidad de pico (VP)**

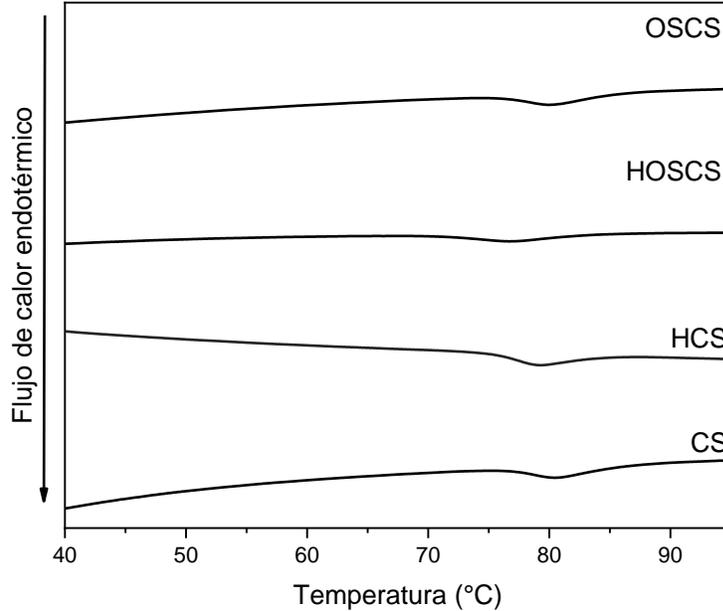
Los perfiles de pico de viscosidad se presentan en la Figura 3.4. El pretratamiento de hidrólisis ácida fuertemente afectó el pico de viscosidad de los almidones, que disminuyó considerablemente a 1269 1.4 cP y 322 1.4 cP en los almidones sin succinatar (CS y HCS, respectivamente). Una tendencia similar fue observada para el almidón que se trató con octenil succinato; los valores de viscosidad de pico disminuyeron a 1686 4.2 cP y 367 1.4 cP para el almidón tratado con octenil succinato sin pretratamiento por hidrólisis (OSCS) y el almidón con doble modificación (HOSCS), respectivamente. El VP disminuyó en el almidón con el pretratamiento de hidrólisis ácida probablemente se debió a un aumento en el proceso de despolimerización en el almidón, generando pastas débiles como resultado de los efectos hidrolíticos de la modificación ácida sobre las regiones amorfas de almidón. Otros autores han informado que el efecto de hidrólisis ácida sobre la disminución de la VP en el almidón quienes han indicado que la doble modificación mediante hidrólisis ácida y la sustitución de ácido cítrico genera un VP inferior del almidón extraído de cultivo de ñame (Falade y Ayetigbo, 2017). El pretratamiento con hidrólisis ácida mejoró el proceso de succinilación, aumentando la interacción entre los grupos succinilo y los componentes moleculares del almidón. Estudios previos han informado que las propiedades de pastas de los almidones se modifican no solo por hidrólisis ácida sino también por peso molecular y tipo de los grupos éster incorporados, lo que potencialmente promueve la reticulación o redes moleculares con amilosa o amilopectina (Ortega-Ojeda et al., 2005). Evidentemente, la doble modificación conduce a un mayor daño a los componentes del almidón en comparación con el proceso de succinilación sin hidrólisis ácida como pretratamiento. Sin embargo, algunos autores han informado que la modificación con grupos succinatos afecta la estructura del almidón y en consecuencia, modifica las propiedades fisicoquímicas del almidón, disminuyendo la temperatura de gelatinización y la modificación de la viscosidad del almidón (Song et al., 2006; Zhu et al., 2011).



**Figura 3.4.** Perfil de viscosidad de almidón de maíz (CS), almidón de maíz succinatado (OSCS), almidón de maíz hidrolizado (HCS), almidón de maíz succinatado hidrolizado (HOSCS).

### 3.2.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El termograma de DSC se muestra en la Figura 3.5. El almidón de maíz hidrolizado con o sin tratamiento de succinilación difirió significativamente ( $p < 0.05$ ) con respecto al almidón de maíz nativo y el almidón tratado con OSA sin tratamiento previo por hidrólisis. El tratamiento previo de hidrólisis ácida del almidón de maíz influyó en la temperatura de inicio ( $T_0$ ), la temperatura máxima ( $T_p$ ), la temperatura final ( $T_c$ ) y la entalpía para la gelatinización ( $\Delta H$ ).



**Figura 3.5.** Termograma de gelatinización del almidón de maíz, de 40 a 95 °C, a 5 °C / min (CS) almidón de maíz, (HCS) almidón de maíz hidrolizado, (OSCS) almidón de maíz succinatado, (HOSCS) almidón de maíz succinatado hidrolizado.

Como se muestra en la Tabla 3.3, la temperatura de transición de los almidones de maíz con pretratamiento de hidrólisis ácida (HCS y HOSCS) fue menor que la temperatura de transición de los almidones de maíz sin pretratamiento de hidrólisis ácida (CS y OSCS). Este fenómeno probablemente se deba al proceso de despolimerización del almidón. Por otro lado, las temperaturas de transición de los almidones tratados con OSA (OSCS y HOSCS) fueron más bajas que la temperatura de transición del almidón de maíz que no se sometió a succinilación (CS y HCS). Esta propiedad es una de las ventajas de la succinilación, debido a la presencia de los grupos succinilo (Betancur-Ancona et al., 2002). Estos resultados sugieren que ambos procesos de modificación (pretratamiento de hidrólisis ácida o succinilación) afectan la estructura del gránulo, dando como resultado alteraciones en las propiedades térmicas del almidón. Las modificaciones a las propiedades térmicas de los almidones modificados permiten el uso de estos almidones en el procesamiento de alimentos y reduce la energía requerida durante la cocción.

Se observó un rango más alto de temperaturas de gelatinización ( $T_c$ - $T_o$ ) en los almidones tratados con OSA; este aumento indicó que los grupos succinato modificaron la estructura cristalina, interfiriendo con la reasociación de la amilosa y la amilopectina durante el proceso de gelatinización. Se ha informado que los grupos OSA debilitan el enlace de hidrógeno de la amilopectina, lo que lleva a un aumento de los segmentos lineales que facilitan la absorción de agua en el gránulo, cambiando así las propiedades térmicas (Bhosale y Singhal, 2007; Bao et al., 2003). Se ha informado que cualquier modificación o tratamiento de los almidones modifica las propiedades de temperatura en comparación con los almidones nativos [Klein et al., 2013; Pinto et al., 2012; González-Cruz, et al., 2018; Bernardino-Nicanor, et al., 2017]. Por esta razón, las alteraciones de las propiedades térmicas fueron más notables en los almidones que fueron sometidos a la doble modificación (pretratamiento de hidrólisis ácida y succinación). Estos resultados están de acuerdo con los publicados previamente reportadas por Betancur-Ancona et al. (2002) quienes informaron que el proceso de succinación modifica la temperatura de gelatinización de los almidones, además, informes anteriores han mencionado que el tipo y la naturaleza de la unión del grupo funcional y el grado de esterificación tienen un efecto importante sobre la entalpía de gelatinización Singh, Kaur y McCarthy, 2007.

El almidón de maíz con doble modificación mostró significativamente menor  $T_o$ ,  $T_p$ ,  $T_c$  y  $\Delta H$  que sus contrapartes nativas, Sharma et al. (2016) y Lv et al. (2018) han indicado que la menor gelatinización, la temperatura y la entalpía se deben a la reducción del enlace de hidrógeno por parte de los grupos alquenoilo hidrófobos, lo que permite la hinchazón del almidón a una temperatura más baja, por lo tanto, la entalpía del almidón de maíz con doble modificación disminuyó. Por otro lado, la introducción de grupos OSA en la estructura del biopolímero mejoró la flexibilidad estructural y contribuyó a la reducción de la temperatura de gelatinización del almidón de maíz con doble modificación.

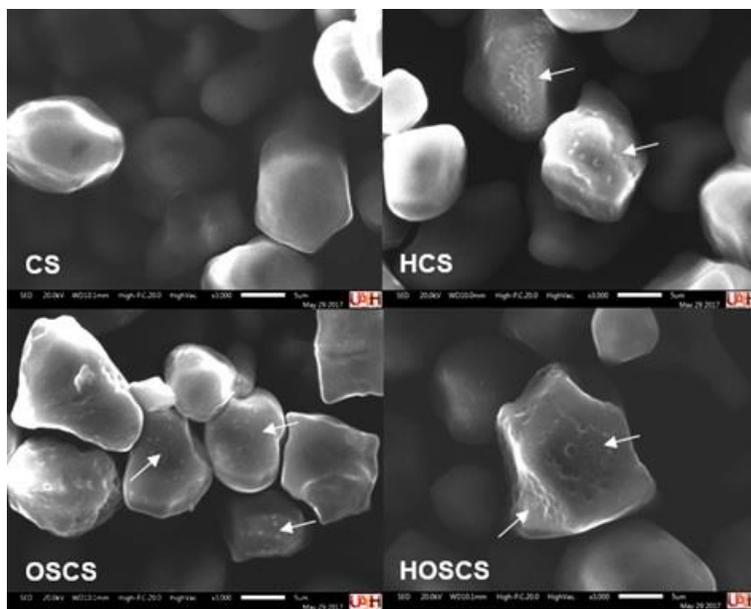
**Tabla 3.3.** Propiedades térmicas de almidón nativo y modificados.

Muestra	T <sub>o</sub> (°C)	T <sub>p</sub> (°C)	T <sub>e</sub> (°C)	ΔH (J/g)	Intervalo de gelatinización To-Te (°C)
CS	76.69±0.18a	80.45±0.16a	85.46±0.12a	10.94±0.14a	8.77
OSCS	75.91±0.18a	79.08±0.12b	84.95±0.16a	10.07±0.14b	9.04
HCS	65.09±0.28b	69.45±0.14c	74.93±0.19b	10.57±0.18b	9.84
HOSCS	60.52±0.27c	67.09±0.15d	73.99±0.14c	9.14±0.15c	13.47

Diferentes letras minúsculas representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en una misma columna. Temperatura inicial (T<sub>o</sub>), temperatura de pico (T<sub>p</sub>), temperatura final (T<sub>e</sub>) y entalpía de gelatinización ΔH (J/g). Almidón de maíz (CS), almidón de maíz succinatado (OSCS), almidón de maíz hidrolizado (HCS), almidón de maíz succinatado hidrolizado (HOSCS).

### 3.2.5. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Las imágenes de SEM de almidón de maíz con o sin hidrólisis ácida o succinación se muestran en la Figura 3.6. SEM reveló que la superficie expuesta del almidón de maíz nativo era principalmente lisa con una forma poligonal distintiva, similar a los resultados obtenidos por Utrilla-Coello et al. (2014). Después de que el almidón de maíz nativo se sometió a un tratamiento previo de hidrólisis ácida, algunos gránulos de almidón presentaron una ligera exo-erosión que generó una superficie rugosa con muescas o poros. La succinación dio como resultado puntos blanquecinos en la superficie del gránulo, lo que probablemente se debió a la acumulación de grupos OSA, lo que sugiere una compactación de los polisacáridos en la superficie del almidón tratado con octenil succinato. Cuando el almidón de maíz nativo se sometió a la doble modificación, el número de puntos blanquecinos fue menor en comparación con el almidón que se sometió con grupos OSA sin pretratamiento con hidrólisis ácida. Este hallazgo indicó un mayor grado de incorporación de los grupos succinato en el almidón, que fue consecuencia de la erosión de la superficie, la fractura del gránulo y la descompactación polimérica en el almidón que resultó del pretratamiento con hidrólisis ácida (Sharma et al., 2016). En el almidón de maíz con doble modificación, no ocurrieron grandes variaciones en la forma y tamaño de los gránulos.



**Figura 3.6.** Micrografías de los gránulos de almidón almidón de maíz (CS), almidón de maíz succinatado (OSCS), almidón de maíz hidrolizado (HCS), almidón de maíz succinatado hidrolizado (HOSCS).

### 3.2.6. Espectroscopia de infrarrojo (FT-IR)

Los espectros FTIR de almidón de maíz nativo, almidón de maíz hidrolizado, almidón de maíz tratado con OSA y almidón de maíz sometido a doble modificación se muestran en la Figura 3.7. Las modificaciones moderadas se observaron en la banda ancha centrada a  $3400\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a la vibración de estiramiento de los enlaces O–H, que depende del contenido de humedad. La banda más lisa de  $3400\text{ cm}^{-1}$  observada para el almidón con OSA con o sin tratamiento previo de hidrólisis ácida sugirió la formación de más enlaces de hidrógeno en el almidón, lo que fue atribuible a la presencia de los grupos succínico, que generaron más segmentos lineales en el almidón y facilitó la absorción de agua en el gránulo (Bhosale y Singhal, 2007; Bao et al., 2004).

Todos los almidones exhibieron una banda bien definida de alrededor de  $2940\text{ cm}^{-1}$ , que se asignó a la vibración de estiramiento del enlace C-H de las unidades de glucosa. Se observó una ligera modificación en la intensidad máxima de la banda alrededor de  $1660\text{ cm}^{-1}$  solo en el almidón con la doble modificación (HOSCS), lo que implica que hubo alteraciones en la cristalinidad del almidón. La banda de alrededor de  $1660\text{ cm}^{-1}$  se asignó a las vibraciones en tijera de los grupos –OH debido a la hidratación del agua en las regiones amorfas del almidón (Pascoal et al., 2013), y la interacción del almidón con los grupos ácido y succínico

aparentemente implica la hidrólisis de enlaces glucosídicos, en consecuencia, una pérdida de estructura amorfa debido a la hidrólisis de la amilosa (Dutta et al., 2011).

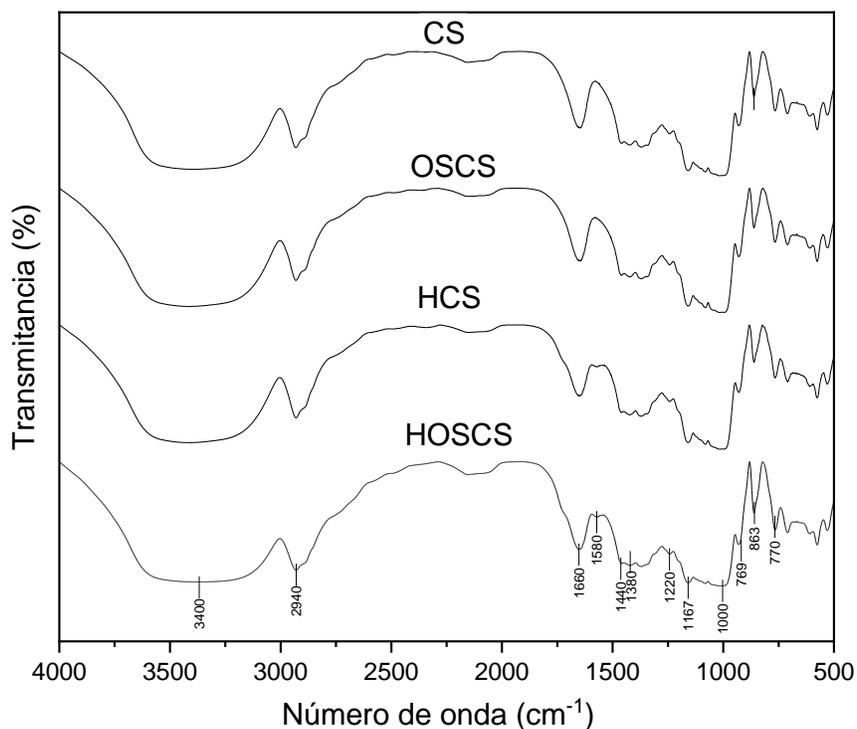
Los almidones tratados con OSA exhibieron una nueva banda en los espectros FTIR a aproximadamente  $1573\text{ cm}^{-1}$ , que se ha relacionado con la vibración de estiramiento asimétrico de los grupos carboxilato; Además, en los espectros FTIR de estos almidones, se asignó a su grupo carbonilo que apareció a  $1730\text{ cm}^{-1}$ . Wang et al. (2017) ha indicado que la presencia de estas dos nuevas bandas ( $1573\text{ cm}^{-1}$  y  $1730\text{ cm}^{-1}$ ) es indicativa de que el grupo succínico se esterificó con éxito con el almidón. De acuerdo con Ye et al. (2014), Miao et al. (2014) y Zhang et al. (2011), la intensidad de estos picos ( $1573\text{ cm}^{-1}$  y  $1730\text{ cm}^{-1}$ ) aumenta cuando incrementa el GS. Por esta razón, en este estudio, la señal de estas bandas en los espectros FTIR de los almidones OSA con un nivel de esterificación del 3% fue menor que la de los almidones OSA con un nivel de esterificación del 15%, según lo informado por Wang et al. (2017).

Se observó una ligera modificación en la intensidad de la banda alrededor de  $1660\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a las vibraciones de tijera de  $\text{-OH}$  del agua en las regiones amorfas del almidón (Pascoal et al. 2013). La doble modificación del almidón mejoró la banda a  $1660\text{ cm}^{-1}$  (HOSCS), lo que implica alteraciones en la cristalinidad del almidón que resultó de la hidrólisis de amilosa debido a la interacción del ácido clorhídrico-almidón-anhídrido succínico.

Todos los almidones exhibieron la banda característica de los polisacáridos correspondiente a la flexión en el plano de O-H alrededor de  $1440\text{ cm}^{-1}$ ; sin embargo, también hubo dos bandas alrededor de  $1460\text{ cm}^{-1}$  y  $1380\text{ cm}^{-1}$ , que indicaron una deformación angular de la C-H en el almidón (Pascoal et al., 2013; Guo et al., 2014; Parvinzadeh et al., 2013) y una banda alrededor de  $1245\text{ cm}^{-1}$  que está asociada con el orden estructural del almidón (Guo et al., 2014).

La alteración de la cristalinidad se confirmó en base al ligero cambio en la relación de las intensidades de la banda de  $1047/1022\text{ cm}^{-1}$  (1.28 a 1.22) para el almidón sin modificación (CS) y el almidón con la modificación dual (HOSCS) respectivamente; Este cambio indicó una disminución en la cristalinidad (Kaur et al., 2013), aparentemente debido a la pérdida de la estructura amorfa del almidón de maíz por el efecto de la hidrólisis de amilosa y las interacciones del almidón de maíz con los grupos OSA.

Todos los almidones mostraron bandas alrededor de  $864\text{ cm}^{-1}$  y  $770\text{ cm}^{-1}$ , que estaban relacionadas con la vibración de estiramiento de C–O–C y C–O–H de los enlaces glucosídicos. Este hallazgo confirmó la configuración del enlace glucosídico en el almidón (Capek et al., 2010). Una banda bien definida alrededor de  $580\text{ cm}^{-1}$  indicó los modos esqueléticos del anillo de piranosa.



**Figura 3.7.** Espectros FT-IR de almidón de maíz (CS), almidón de maíz succinatado (OSCS), almidón de maíz hidrolizado (HCS), almidón de maíz succinatado hidrolizado (HOSCS).

### 3.2.7. Espectroscopia de Raman (FT-Raman)

Los espectros Raman de las muestras de almidón se presentan en la Figura 3.8. Se observaron diferencias notables en los espectros del almidón con doble modificación (HOSCS), mientras que los espectros de maíz el almidón sin modificaciones (CS) y el almidón de maíz hidrolizado (HCS) fueron muy similares.

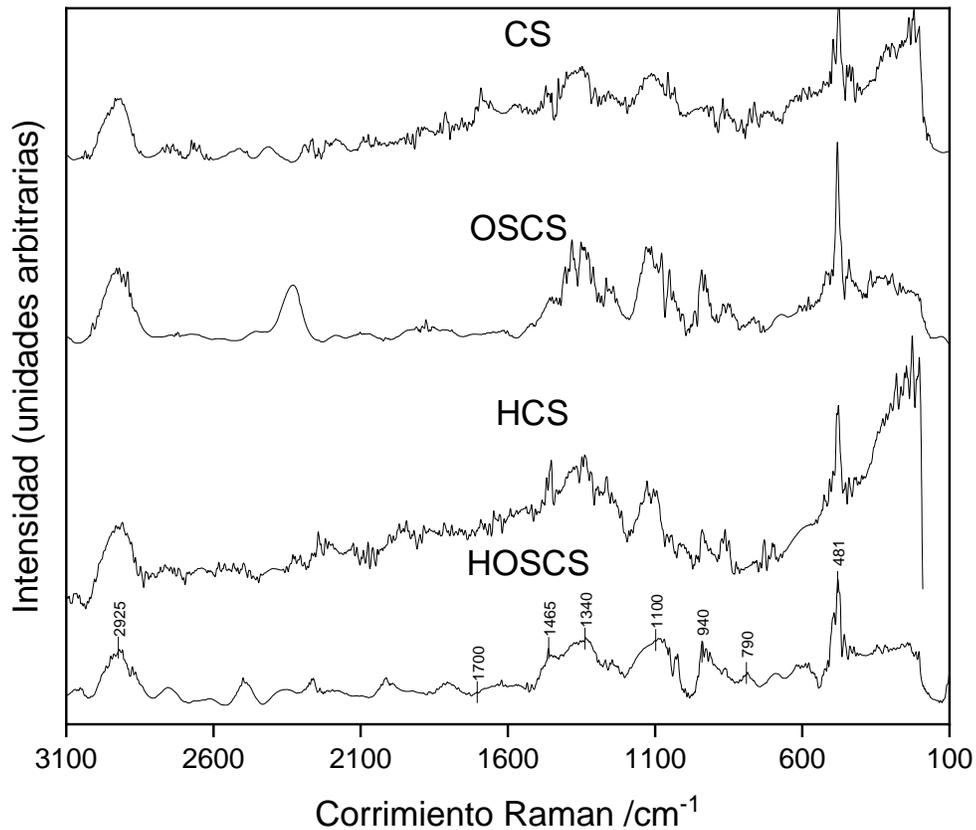
Los espectros FT-Raman de almidones indicaron el modo de estiramiento de C-H alrededor de  $2930\text{ cm}^{-1}$ , y se observó un cambio en la intensidad de esta banda en el almidón con doble

modificación (HOSCS), que podría atribuirse a variaciones en la amilosa. Interacción de amilopectina causada por los tratamientos de hidrólisis y succinación.

La banda de alrededor de  $1700\text{ cm}^{-1}$  debido al estiramiento  $\text{C}=\text{O}$  del grupo funcional succínico (Phillips et al., 2000) solo se observó en el almidón con la doble modificación. Evidentemente, un reordenamiento de la amilosa y la amilopectina resulto del proceso de hidrólisis generando una alta succinación del almidón en la superficie del gránulo. De acuerdo con Wezel et al. (2010) la mejora de esta banda es una clara evidencia de la presencia del grupo éster octenil succinato en la superficie del gránulo de almidón modificado. Además, se observaron cambios en los espectros Raman resultantes de la doble modificación de los almidones en la región de alrededor de  $940\text{ cm}^{-1}$ ; Este cambio en los espectros también es evidencia de la modificación molecular del almidón. Estos resultados confirmaron que la succinación del almidón alteró la estructura del gránulo de almidón y generó un almidón modificado con octenil succinato no aplanado, como ya han informado otros autores (Wetzel et al., 2010).

Se ha informado que la banda más intensa a  $481\text{ cm}^{-1}$  que se observó en el almidón con doble modificación es evidencia de una alteración del orden molecular de corto alcance en el almidón. El efecto de esta interrupción del orden molecular de corto alcance fue mayor cuando la succinación es la modificación primaria (OSCS) en comparación con el pretratamiento de acidificación (HCS). Por otro lado, el proceso de succinación después del pretratamiento de acidificación aumentó aún más la interrupción del orden molecular de corto alcance; algunos autores indican que este efecto se debe a que la derivatización con OSA aumenta la interrupción del orden molecular de corto alcance en el almidón de maíz pretratado (Wang et al., 2017).

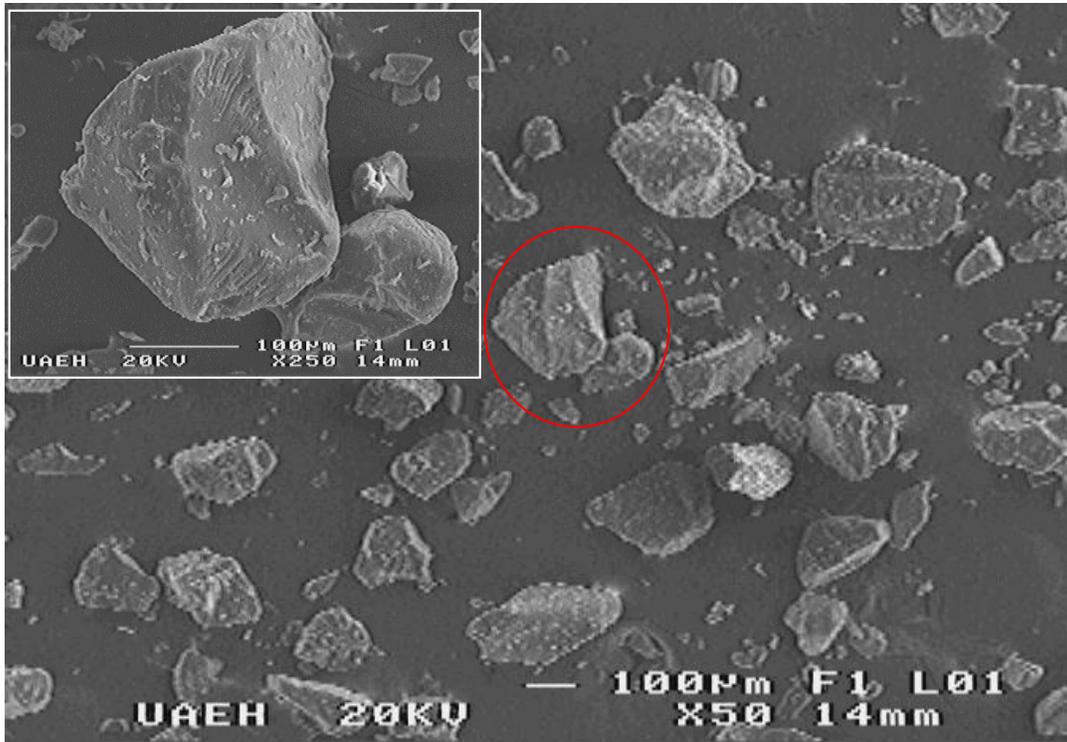
En general, las bandas entre  $1130\text{ cm}^{-1}$  y  $474\text{ cm}^{-1}$  estaban dominadas por grupos  $\text{C}-\text{OH}$  y  $\text{OH}$ , que indican interacciones intramoleculares entre las cadenas de polímeros que son típicas en las regiones cristalinas del almidón (Mutungi et al., 2012) generadas por enlaces de hidrógeno. Por esta razón, los resultados del almidón tratado con succinato sugieren que los cambios estructurales en los almidones con o sin tratamiento previo de hidrólisis exhibieron un comportamiento anfifílico, ya que los espectros Raman se caracterizaron por modificaciones en las señales (presencia o intensidad) entre el rango de  $1130\text{ cm}^{-1}$  y  $474\text{ cm}^{-1}$  (OSCS y HOSCS).



**Figura 3.8.** Espectros FT-Raman de almidón de maíz (CS), almidón de maíz succinatado (OSCS), almidón de maíz hidrolizado (HCS), almidón de maíz succinatado hidrolizado (HOSCS).

### 3.2.8. Morfología de almidón modificado extrudido

En la micrografía a 50X (Figura 3.9) se observó una completa disrupción del gránulo de almidón por efecto del proceso de extrusión, provocando una despolimerización de los componentes poliméricos del gránulo, originando la formación de nuevas conformaciones y organizaciones a partir de los componentes del gránulo de almidón, en la micrografía a una magnificación de 250X (Fig. 3.9) se observó una morfología poligonal (irregular) con un tamaño de partícula promedio de 285.75  $\mu\text{m}$ , posteriormente este material de pared fue utilizado para realizar el proceso de microencapsulación con mezclas de pectina de bajo metoxilo.



**Figura 3.9.** Morfología del almidón de maíz doblemente moodificado extrudido.

El proceso de extrusión como mezcla continua, cocción y formación es un proceso versátil, de bajo costo, alta temperatura y tiempos cortos. Es un proceso y tecnología muy eficiente en la elaboración de alimentos (Vargas-Solórzano et al., 2014). Durante la cocción por extrusión, las materias primas experimentan muchas transformaciones químicas y estructurales, gelatinización de almidón, desnaturalización de proteínas, formación de complejos entre la amilosa y los lípidos, además de reacciones de degradación de las vitaminas, pigmentos, etc. (Sun, 2004; Gulati et al., 2016).

### **3.3. Caracterización de microcápsulas**

#### **3.3.1. Humedad, pH, aw, higroscopicidad y eficiencia de encapsulación**

En todas las muestras se obtuvieron 10 g de polvo recuperado, es decir un 62.5% de rendimiento de microcápsulas por tratamiento, el rendimiento puede variar debido a la aglomeración de partículas por el incremento de SST, así como también la temperatura de secado y el contenido de humedad de la muestra (Díaz-Bandera et al., 2015).

En la Tabla 3.4 se muestra la caracterización de las microcápsulas obtenidas después del proceso de secado por aspersión. La cuantificación de los CFT del extracto acetónico de HS sin encapsular, presentó un valor de 24.5 g GAE/g. Díaz-Banderas et al. (2015) empleo un extracto acuoso, donde obtuvo un valor de CFT 72.06 g GAE/100 g sin encapsular, este valor es atribuido al disolvente (agua), ya que tiene la capacidad para formar puentes de hidrógeno con compuestos bioactivos y se disuelven al interactuar con las moléculas polares del agua. La CFT obtenida en este trabajo fue menor, debido al tipo de disolvente (acetona) utilizado para obtener el extracto. La EE% de los diferentes tratamientos presento un rango de 68.1 a 98.4%, demostrando que a una concentración de solidos de MLP (10%) y una temperatura intermedia (120 °C), se obtuvo la mayor EE%. La retención del extracto en el material de pared después del proceso de secado por aspersión, es atribuido a la reducción de tamaño de cadena de los componentes poliméricos del gránulo de almidón, originando una nueva conformación polimérica, así como también de los compuestos bioactivos del extracto encapsulado (Liang et al., 2013). Moura et al., (2018) reporto eficiencias de encapsulación (EE) de 74.4 a 95.6% de polifenoles, mediante el método de encapsulación de gelación iónica del extracto de HS hidrosoluble, utilizando previamente dos técnicas: goteo-extrusión y atomización ambas mediante una emulsión doble (HS / aceite de Brassica napus / pectina) y una solución reticulada (CaCl<sub>2</sub>), demostrando mayor EE% mediante el proceso de atomización. Los valores de EE% de polifenoles obtenidos en este estudio fueron más altos al emplear una mezcla de almidón modificado y pectina, debido al tamaño de cadena del CS originado por el proceso de extrusión para encapsular el extracto de HS, estos resultados son similares a los reportados por Gómez-Aldapa et al., 2018, reporto una eficiencia de encapsulación del 68.7%, utilizando una concentración de solidos totales del 15% a una temperatura de secado de 120 °C, empleando como material almidón modificado (hidrólisis ácida / esterificación / extrusión) de Achira (*Canna indica* L.), atribuyendo estos valores al tamaño de cadena originado por el proceso de extrusión al cual fue sometido el almidón y a las condiciones de solidos totales y temperatura de secado. La higroscopicidad de las microcápsulas presento porcentajes que oscilaron en un rango de 9.0 a 11.9 %, mientras que el extracto sin encapsular incrementó hasta un 12.85%. El pH aumento al incrementar la cantidad de solidos solubles totales, debido a la dilución entre los sólidos utilizados. La humedad de las microcápsulas fue de 4.54-5.73 g/100 g (base seca) esta humedad puede

variar dependiendo del compuesto a encapsular y la temperatura de secado, mientras que la aw de igual manera incremento conforme aumento la cantidad de pectina, debido al incremento de los sólidos.

### **3.3.2. Morfología y tamaño de partícula**

En la Figura 3.10 se presentan las micrográficas de microcápsulas obtenidas de EHOSCS y MLP, se observó en todos los tratamientos la formación de microcápsulas, presentando formas esféricas con características de abolladuras sobre la superficie con un tamaño de partícula aproximado de 17.5-23.4µm. La superficie de la microcápsula al sellarse se ve facilitada por el contenido de glúcidos, tamaño de cadena, tipo de polímero entre otras características para dar origen a la morfología de la microcápsula (Liang et al., 2013; Anwar & Kunz, 2011; Westergaard, 2004), de igual forma se observaron aglomeración de microcápsulas, efecto causado por el extracto a temperaturas de secado de 100 y 120°C. Sin embargo, el contenido de pectina origino una disminución de aglomeración entre microcápsulas debido a las cargas electrostáticas entre ambos biopolímeros y extracto.

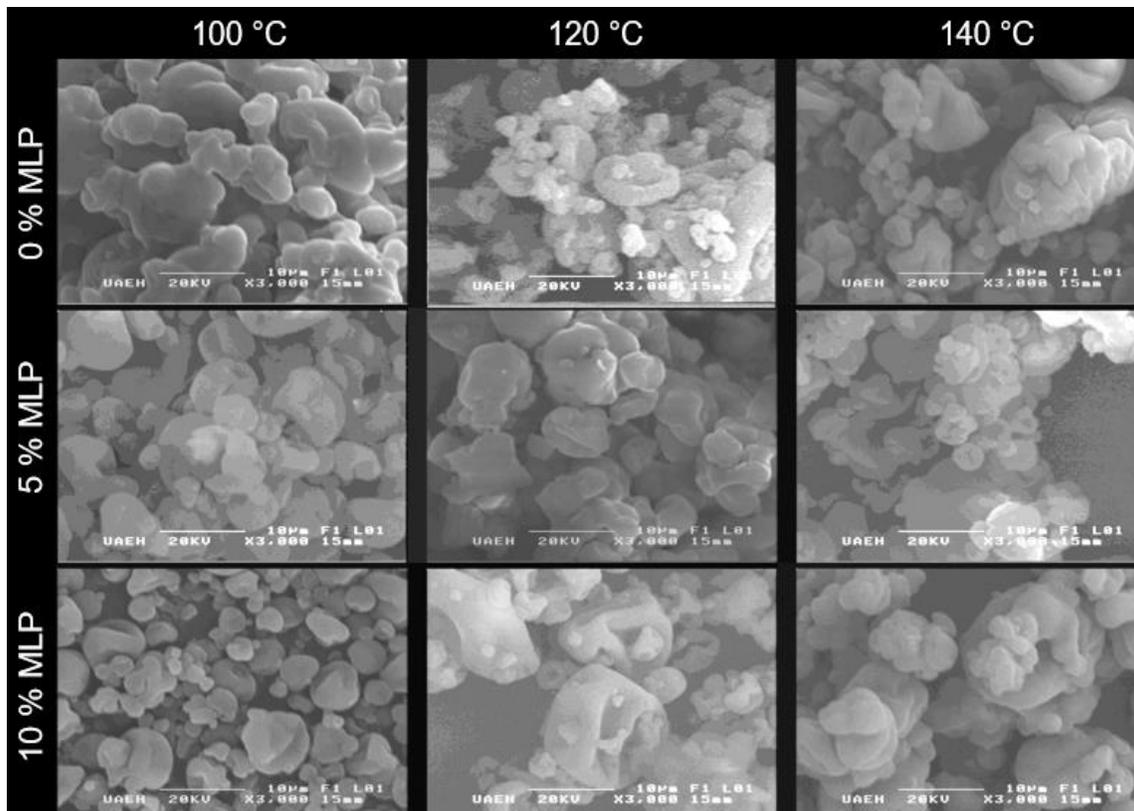
**Tabla 3.4.** Caracterización de microcápsulas (*Hibiscus sabdariffa* L.) obtenidas después del secado por aspersión.

Pectina (%)	Temperatura de secado (°C)	Humedad (g/100 g) (base seca)	pH	a <sub>w</sub>	Higroscopicidad (%)	EE (%)
0	100	4.34±0.02	2.45±0.01	0.36±0.002	11.8±0.1	77.9±0.001
	120	4.91±0.03	2.38±0.01	0.37±0.002	10.1±0.2	90.8±0.001
	140	4.53±0.01	2.26±0.01	0.34±0.002	9.7±0.2	68.1±0.001
5	100	4.98±0.01	2.98±0.01	0.40±0.001	9.0±0.1	81.3±0.006
	120	4.97±0.02	2.87±0.01	0.36±0.001	10.9±0.2	92.6±0.009
	140	5.02±0.02	2.69±0.01	0.38±0.001	10.0±0.2	71.7±0.001
10	100	5.73±0.01	3.35±0.01	0.40±0.001	11.9±0.2	83.8±0.005
	120	5.23±0.03	3.22±0.01	0.41±0.001	10.1±0.1	98.4±0.003
	140	5.66±0.01	3.10±0.01	0.47±0.001	11.8±0.2	75.1±0.008
*Extracto	-	16.55±0.4	1.18±0.01	0.48±0.001	12.9±0.5	-

\* Extracto no encapsulado.

a<sub>w</sub> - Actividad de agua

EE - Eficiencia de Encapsulación

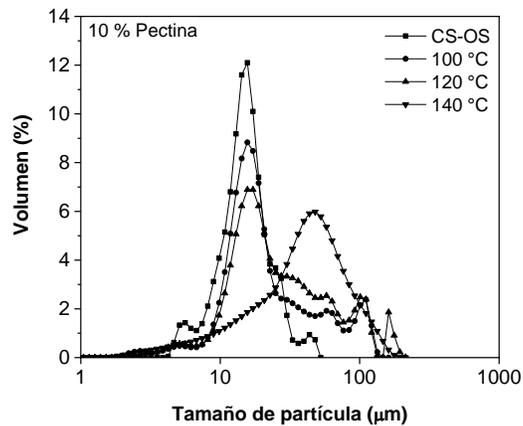
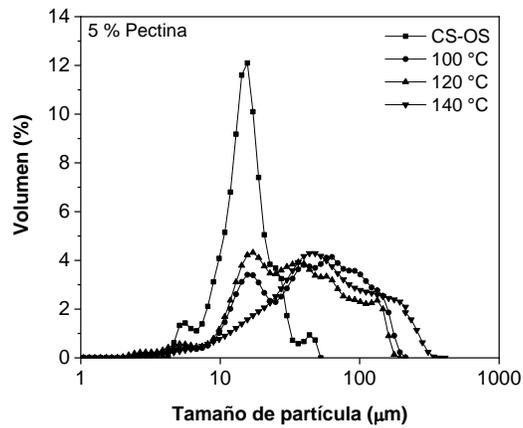
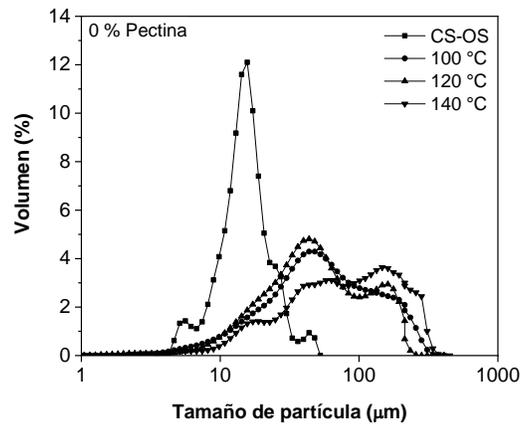


**Figura 3.10.** Morfología de microcápsulas obtenidas a diferentes porcentajes de MLP y temperaturas de secado por aspersión.

### 3.3.3. Distribución de tamaño de partícula

En la Figura 3.11 se muestra la distribución del tamaño de partícula de la microcápsulas obtenidas a diferentes temperaturas de secado y porcentajes de MLP. Las microcápsulas obtenidas al 0 y 5% de MLP presentaron una distribución bi-modal y tri-modal con un tamaño de partícula entre 47.33 a 121  $\mu\text{m}$  respectivamente, mientras que las microcápsulas obtenidas con 10% de MLP mostró un comportamiento mono-modal con un tamaño de partícula de 31.12  $\mu\text{m}$ . La aglomeración de las microcápsulas impide una mayor difusión del extracto, sin embargo, al incrementar la concentración de pectina disminuyo la aglomeración de microcápsulas permitiendo una mayor difusión de compuestos antimicrobianos, esto fue corroborado con la actividad antimicrobiana (Figura 3.12) presentado mayores halos de inhibición, estos resultados son atribuidos que al incrementar la MLP, se generan interacciones y estabilizaciones entre ambos biopolímeros formando una nueva matriz polimérica, permitiendo la disminución de aglomeraciones entre partículas. Acordando con

Díaz-Bandera et al. (2015), reportaron que la variación en la distribución del tamaño de partícula de las microcápsulas depende de las propiedades del extracto (pH, viscosidad, solubilidad), material de pared, porcentajes de sólidos, entre otros factores, además reportaron que la pectina presento un comportamiento mono-modal al encapsular el extracto de HS. La aglomeración de las microcápsulas reduce la retención del principio activo (polifenoles), dificultando el flujo y dispersión (difusión) (Chen & Özkan, 2007).



**Figura 3.11.** Distribución de tamaño de partícula de microcápsulas obtenidas de almidón modificado a diferentes porcentajes de MLP y temperaturas de secado por aspersión.

### 3.4 Actividad antimicrobiana

#### 3.4.1 Extracto en medio de cultivo

El efecto antimicrobiano de HS contra diferentes microorganismos patógenos, fue demostrado al haber presentado halos de inhibición entre 6.12-30.25 mm dependiendo de la dilución y la bacteria a inhibir (Tabla 3.5), lo cual es similar a lo reportado por Borrás-Linares et al. (2015).

**Tabla 3.5.** Efecto antimicrobiano del extracto acetónico de cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. representados en mm de inhibición.

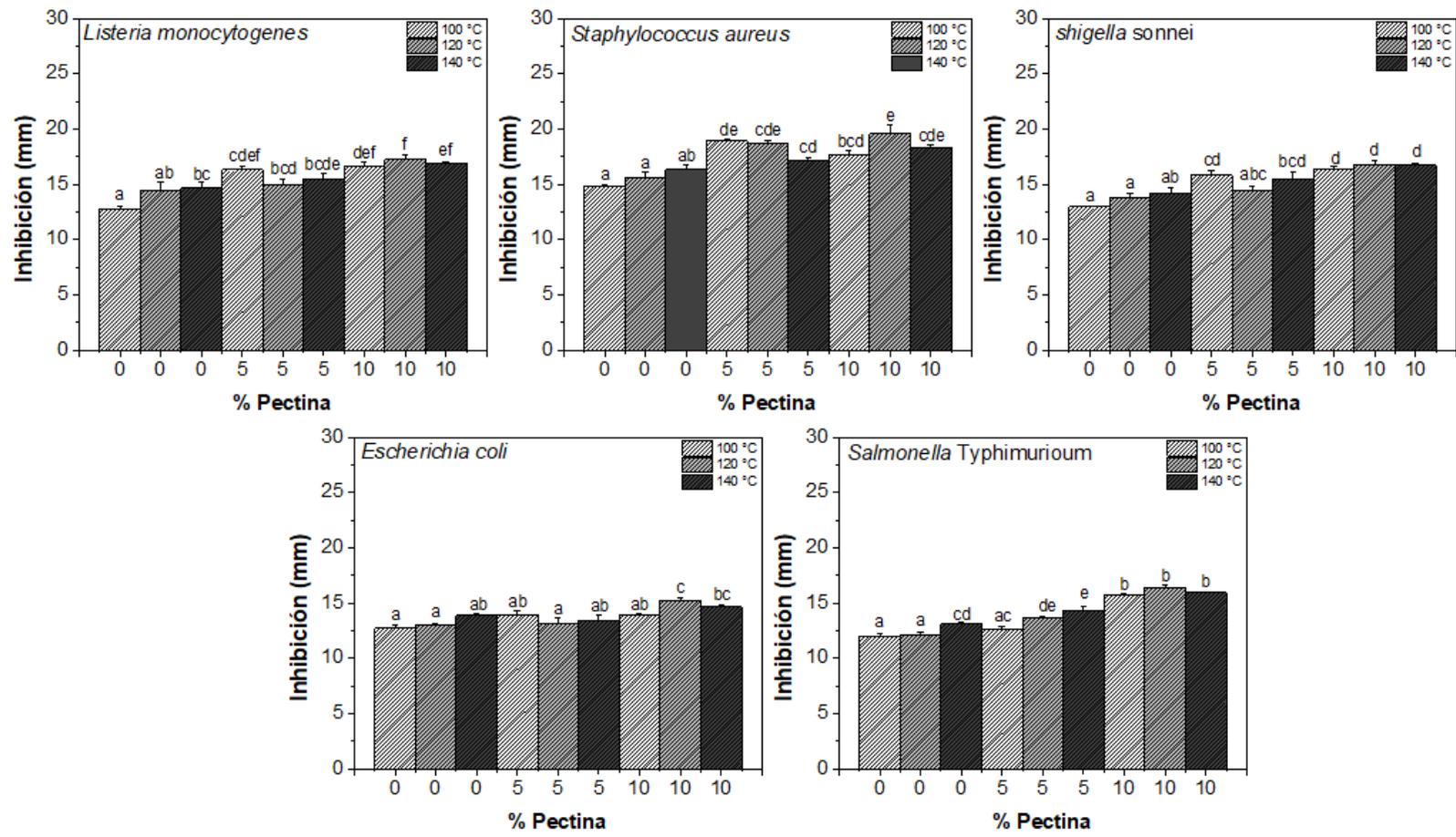
Dilución	mg/mL	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Shigela</i>	<i>L. monocytogenes</i>
1:1	500	30.25±0.9 <sup>Aa</sup>	25.49±0.9 <sup>Ab</sup>	28.06±0.9 <sup>Ab</sup>	24.95±0.9 <sup>Ab</sup>	29.96±0.9 <sup>Aa</sup>
1:20	100	9.35±0.6 <sup>Ba</sup>	7.89±0.3 <sup>Bb</sup>	9.25±0.3 <sup>Ba</sup>	8.03±0.4 <sup>Ba</sup>	9.05±0.1 <sup>Ba</sup>
1:100	20	6.72±0.4 <sup>Ca</sup>	7.5±0.5 <sup>Ba</sup>	7.75±0.2 <sup>Ca</sup>	7.05±0.06 <sup>Ba</sup>	6.12±0.1 <sup>Ca</sup>

Letras minúsculas diferentes por columna representan diferencias significativas  $p < 0.05$  entre dilución. Letras mayúsculas diferentes por fila representan diferencias significativas  $p < 0.05$  entre bacterias. Promedio de los halos de inhibición de tres repeticiones  $\pm$  SD, diámetro de inhibición milímetros (mm).

#### 3.4.2 Microcápsulas en medio de cultivo

Los resultados de los bioensayos antimicrobianos de los microencapsulados, se muestran en la Figura 3.12, el control fue un extracto puro (100mg - 900 $\mu$ l), obteniendo halos de inhibición de 28 a 30 mm dependiendo de la bacteria evaluada (resultados no mostrados), el efecto antimicrobiano fue positivo, mientras en los microencapsulados presentaron efecto significativo  $p < 0.05$  sobre las cinco cepas utilizadas en el estudio, demostrando actividad antimicrobiana, observando halos de inhibición de 12 a 20 mm, siendo *E. coli* el microorganismo más resistente. Además, se puede destacar que al incrementar el contenido de MLP con almidón modificado como material de pared, independientemente de la temperatura de secado, fueron aumentando los diámetros de inhibición, esto es atribuido, al no presentar aglomeraciones los microencapsulados (Figura 3.11. 5% Pectina) entre partículas por el aumento de MLP, permitiendo mayor difusión del compuesto bioactivo al medio a inhibir, aunado a nuevas conformaciones estructurales poliméricas de los materiales de pared (no compactas), generando microcápsulas porosas e incluso semi abiertas,

permitiendo mayor difusión del compuesto bioactivo al medio. Según Drusch & Schwarz, (2012) observaron porosidades de microcápsulas de almidón modificado con OSA mediante cortes transversales. La actividad antimicrobiana de microencapsulados está directamente correlacionada por el tipo de compuesto y material de pared encapsulante (Xiao, Michael & Zhong, 2011; Beirão da Costa et al. 2012). Diversos estudios han sugerido como los compuestos bioactivos inhiben el desarrollo y crecimiento microbiano mediante la ruptura de la pared de la membrana celular generando la liberación de componentes celulares tales como proteínas y ácidos nucleicos, además de incorporar iones de alta densidad generando altas presiones hidrostáticas, interacciones con otros componentes que conllevan a la formación de electrones densos que pueden interactuar sobre la célula generando sustancias condensadas sobre el ADN, citoplasma y proteínas de la célula (Feng et al., 2000; Zhou et al., 2010; Wang et al., 2015).



**Figura 3.12.** Actividad antimicrobiana de microcápsulas obtenidas de almidón modificado y MLP (0, 5, 10%) a diferentes temperaturas de secado por aspersión.

### 3.5. Coeficientes de difusión del extracto microencapsulado

A partir de la experimentación, en la que se diseñó el procedimiento de trabajo descrito anteriormente, en función de variables como: tiempo, distancia, concentración de pectina (0, 5, 10 %) a diferentes temperaturas de secado de 100, 120 y 140 °C presentaron impacto sobre la difusión. En la Tabla 3.6 se presentan los coeficientes de difusión de las microcápsulas. Se observó que el material de pared de almidón modificado y pectina, así como la temperatura de secado fueron factores importantes para la difusión del extracto de HS. A una temperatura de secado de 120 °C se observó un incremento gradual de la  $D$  con forme se aumentó la concentración de pectina, por lo que a esta temperatura de secado puede estar originando una matriz polimérica (microcápsula) semi-compacta para difundir el extracto a un medio específico, de igual forma las microcápsulas obtenidas con un 5% de pectina, presentaron un comportamiento de difusión similar al incrementar la temperatura de secado, esto es atribuido a la concentración de pectina, la cual está formando una conformación y reacomodo estructural estable con los componentes poliméricos del almidón modificado. Las pectinas han demostrado ser agentes gelificantes y estabilizantes para diversos alimentos (e.g. bebidas lácteas acidificadas, yogures entre otros), mientras que el almidón succinatado ha demostrado ser un excelente agente emulsificante por presentar capacidad anfifílica (Altuna et al. 2018; Fonseca-Florido et al., 2018; Willats, Knox, & Mikkelsen, 2006), por lo que, al combinar ambas características de ambos materiales de pared a ciertas condiciones de secado por aspersión, origina una matriz polimérica estable y semi-compacta, permitiendo una difusión del extracto de HS. Con respecto a la temperatura de secado de 100 °C la difusión se presentó en un orden de 0% > 10% > 5% de pectina, mientras que a una temperatura de secado de 140 °C fue de un orden de 5% > 0% > 10% de pectina, por lo tanto, la temperatura y el aumento de la pectina fueron factores primordiales, para la formación de una matriz polimérica compacta o semi-compacta dificultando la  $D$  del extracto de HS, con respecto al control que fue el extracto sin encapsular se obtuvo un valor de  $1.88E^{-10}$ . Acordando con Panyoyai et al. (2016); Díaz-Banderas et al. (2015) la eficacia de los coeficientes de difusión depende

fundamentalmente del material de pared (matriz polimérica), temperatura de secado, tipo y peso molecular del compuesto a encapsular.

**Tabla 3.6.** Coeficientes de difusión ( $D \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) de microcápsulas.

Temperatura (°C)	Porcentaje de pectina (%)		
	0	5	10
100	1.53E <sup>-10</sup>	1.37E <sup>-10</sup>	1.49E <sup>-10</sup>
120	1.64E <sup>-10</sup>	1.70E <sup>-10</sup>	1.77E <sup>-10</sup>
140	1.35E <sup>-10</sup>	1.66E <sup>-10</sup>	1.31E <sup>-10</sup>

### 3.6. Optimización del proceso de secado por aspersión

Las condiciones óptimas para la obtención de encapsulados con el mayor valor de coeficiente de difusión aunado con la mayor actividad antimicrobiana (inhibición) contra bacterias patógenas y eficiencia de encapsulación, así como la menor higroscopicidad, fueron; temperaturas de secado de 120° C y una relación de EHOSCS-MLP del 90:10 w/w respectivamente. Estos parámetros teóricos se validaron experimentalmente (Tabla 3.7). El valor del coeficiente de difusión predicho por el programa fue menor al valor obtenido experimental, mientras que los demás parámetros evaluados están dentro del rango predicho por el programa Design-Expert (versión 7.1.5., Stat-Ease, Minneapolis, USA) al ser obtenidos con un nivel de confianza del 95%.

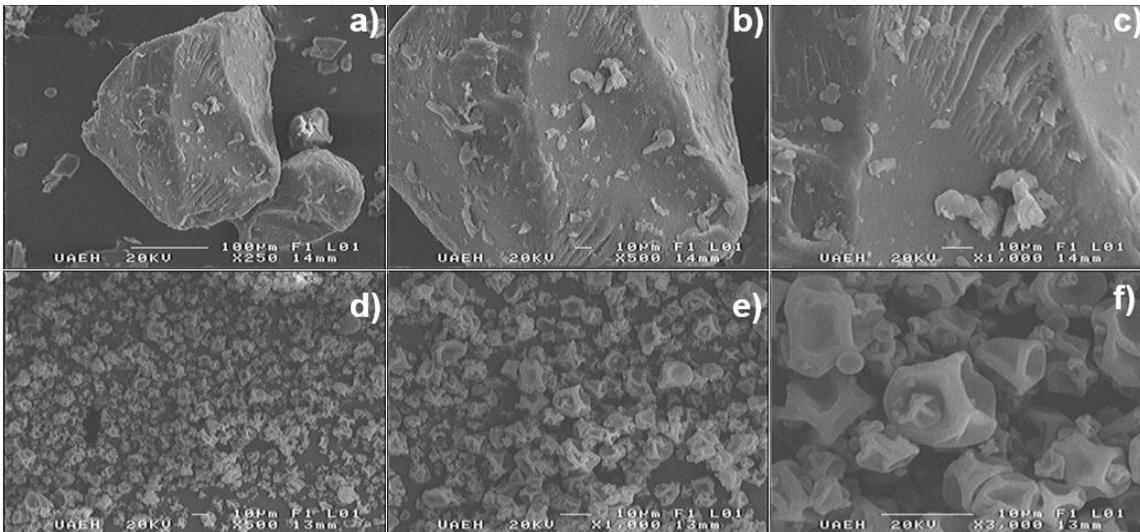
**Tabla 3.7.** Optimización del proceso de secado por aspersión

Variable de respuesta	Valores predichos	Valores experimentales
Coeficiente de difusión	1.53E <sup>-10</sup> m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>	1.77E <sup>-10</sup> m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>
<i>L. monocytogenes</i>	15.48 mm	17.48 mm
<i>S. aureus</i>	17.39 mm	18.93 mm
<i>E. coli</i>	13.77 mm	15.21 mm
<i>S. Typhimurium</i>	13.98 mm	14.39 mm
<i>S. sonnei</i>	15.16 mm	17.66 mm
Higroscopicidad	10.60%	9.80%
Eficiencia de encapsulación	98.31%	98.52%

### **3.6.1. Morfología y tamaño de partícula de microcápsulas**

Las microcápsulas obtenidas a partir de EHOSCS y MLP al 10% y del extracto acetónico de HS se muestran en la Figura 3.13. En las micrografías del EHOSCS a 250, 500, y 1000X de magnificación como se muestra en la Figura 3.13. a, b, c, respetivamente, se observó una completa disrupción total del gránulo de almidón (gelatinización), por efecto de las temperaturas utilizadas y tiempos de retención en cada zona de calentamiento del cañón del extrusor, provocando una despolimerización de los componentes poliméricos del gránulo, por consiguiente, origino la formación de nuevas conformaciones y organizaciones moleculares, mostrando morfologías poligonales (irregulares) con un tamaño de partícula promedio de 285.75  $\mu\text{m}$ . Según (Vargas-Solórzano et al., 2014), el proceso de extrusión es un método versátil de bajos costos, altas temperaturas y tiempos cortos, caracterizado principalmente por transformar la materia prima en nuevas conformaciones estructurales moleculares mediante la despolimerización. Durante el calentamiento en las diferentes zonas del cañón del extrusor, las materias primas (polímeros) experimentan diversas transformaciones químicas y estructurales, gelatinización de almidón, desnaturalización de proteínas, formación de complejos entre la amilosa y los lípidos, además de reacciones de degradación de las vitaminas, pigmentos, entre otros. (Gulati et al., 2016).

Las microcápsulas obtenidas a 500, 1000, 3000X de magnificación se presentan en la Figura 3.13. d, e, f, respetivamente, se observó la formación de microcápsulas, presentando formas esféricas con abolladuras sobre la superficie, con un tamaño de partícula promedio de 8.82 $\mu\text{m}$ . La superficie de la microcápsula al sellarse se ve facilitada por la longitud de cadena, peso molecular, contenido y tipo de polímero entre otras características para originar la morfología característica de la microcápsula (Liang et al., 2013; Anwar & Kunz, 2011).



**Figura 3.13.** Micrografías de EHOSCS, a) 250X, b) 500X, c) 1000X y microcápsulas óptimas d) 500X, e) 1000X, f) 3000X a diferentes magnificaciones.

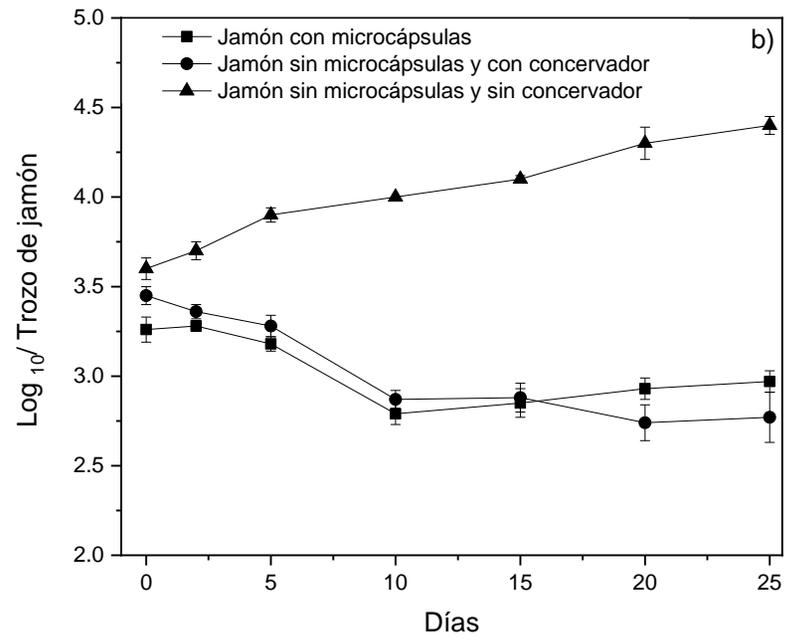
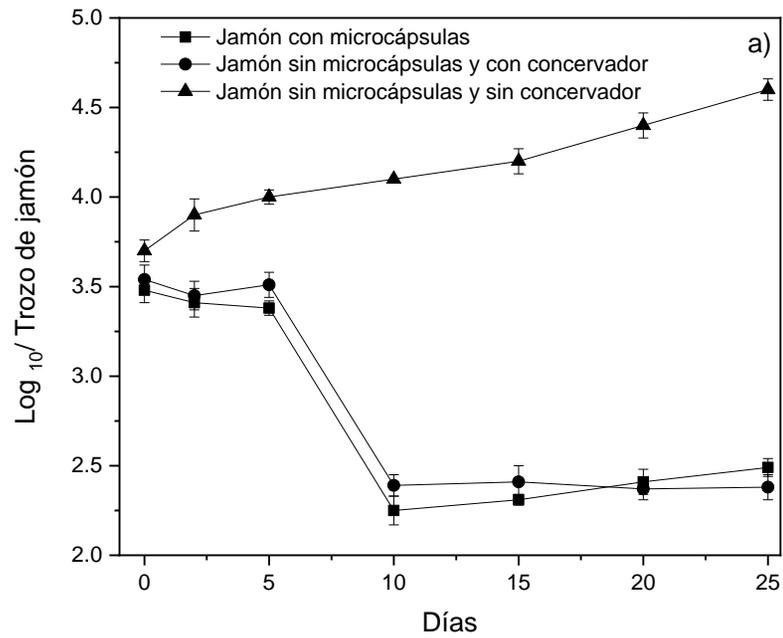
### 3.7. Efecto antimicrobiano de microcápsulas en jamón

Las condiciones óptimas de microencapsulación del extracto acetónico de HS para evaluar la actividad antimicrobiana en la elaboración de un jamón fueron; 10% de pectina a una temperatura de secado de 120 °C. En la Figura 3.15, se observó para ambas cinéticas de conservación de jamón elaborado con microcápsulas adicionadas de extracto de HS, presentó actividad antimicrobiana contra ambos patógenos. *S. Typhimurioum* (Figura 3.15. a) presento una reducción aproximada de 2.5 log UFC, con respecto a *S. aureus* (Figura 3.15. b) que mostro una reducción aproximada de 1 log UFC durante los primeros 10 días de haber sido inoculados los trozos de jamón, posteriormente pasando el décimo día la tendencia de ambos microorganismos fue incrementar las UFC. Con respecto al control positivo para ambas cinéticas presento mayor inhibición en un lapso de tiempo más prolongado de veinticinco días, mientras que el control negativo conforme pasaban los días fue gradualmente incrementado las UFC debido a la disponibilidad de nutrientes y la ausencia de conservadores. Diversas investigaciones han reportado diversos compuestos con actividad antimicrobiana en diferentes matrices alimentarias como carne y derivados contra distintas

bacterias relacionadas con el deterioro y seguridad del alimento, sin embargo, las concentraciones para producir dicho efecto son muy altas, las cuales modifican las propiedades organolépticas del alimento, por lo que, aún se siguen utilizando conservadores (McMillin, 2017; Sánchez-Ortega et al., 2014). Muchas opciones de antimicrobianos encapsulados son útiles para la conservación de alimentos cárnicos e incluso para otros, pero se requiere refinamientos antes de que la implementación sea factible y rentable. Por lo que, es importante proteger los compuestos antimicrobianos mediante la microencapsulación utilizando almidón, ya que la mayoría de los alimentos industrializados están elaborados principalmente de almidón modificado.



**Figura 3.14.** Obtención de jamón con microcápsulas.



**Figura 3.15.** Cinética de actividad antimicrobiana de trozos de jamón con microcápsulas empacados al vacío en refrigeración; a) *S. Typhimurium* y b) *S. aureus*.

### **3.7.1. Propiedades fisicoquímicas y de textura del jamón**

Los valores de las propiedades fisicoquímicas del jamón con microcápsulas de HS se presentan en la Tabla 3.8. El porcentaje de humedad exprimible y rendimiento presentaron un incremento en comparación con el control, estos resultados indicaron un aumento de la retención de agua por las microcápsulas durante el tratamiento térmico de la cocción del jamón. La carragenina y la proteína de soya contribuyen a la gelificación, por consiguiente, una absorción de agua durante el tratamiento térmico (Romero-López et al., 2011). Las microcápsulas con los componentes gelificantes generan un sinergismo formando una matriz semi-compacta (no hay formación de gel), efecto causado por la temperatura de cocción del jamón, debido a los grupos OSA mostrando un comportamiento emulsificante (Tabla 3.2.). El pH en el jamón con microcápsulas en el jamón originó una disminución del pH con respecto al control, esto es atribuido a la presencia de ácidos orgánicos en el extracto de HS como lo es el ácido Hibiscus (pH 0.8) (Castro-Rosas et al., 2018). Las coordenadas de color mostraron cambios en los valores efecto causado por el extracto en comparación del jamón sin microcápsulas 78.62 a 86.81 para L\* (luminosidad), 6.52 a 7.49 para a\* (tonalidad roja) y 9.2 a 7.04 para b\* (tonalidad amarilla) respectivamente. Estos cambios de coloración (Fig. 3.14) son atribuidos a las antocianinas del extracto de HS las cuales confieren a los cálices el color rojo marrón característico (Tsai et al., 2002).

En la Tabla 3.9 se muestran los resultados de TPA del jamón adicionado con microcápsulas. Se observó que la adición de las microcápsulas influye de forma significativa sobre las características de textura del jamón, mostrando deficiencia sobre las propiedades de textura. La dureza del jamón fue afectada mediante la sustitución de la fécula de maíz por microcápsulas, así como al extracto de HS, provocando una disminución de la dureza en el jamón y por consiguiente un valor bajo de adhesividad, esto es atribuido a la falta de gelificación debido a la presencia de los grupos OSA (almidón modificado) no permite la gelificación en comparación con el control. Sin embargo, la presencia de MLP provocó una estabilidad de los componentes para obtener un valor mínimo de dureza en el jamón. La

dureza es un factor significativo de las preferencias de aceptación de productos cárnicos por parte del consumidor (Chambers & Bowers, 1993).

**Tabla 3.8.** Propiedades fisicoquímicas de jamón sustituyendo almidón de maíz por microcápsulas de extracto acetónico de cálices de *Hibiscus sabdariffa* L.

Muestra	Humedad (%)	pH	Rendimiento	L	a	b
Control	40.39	6.91	95.16	86.81	7.49	7.04
Microcápsulas	45.18	5.64	99.08	78.62	6.52	9.2

**Tabla 3.9.** Propiedades texturales de jamón sustituyendo almidón de maíz por microcápsulas de extracto acetónico de cálices de *Hibiscus sabdariffa* L.

Muestra	Dureza (N)	Cohesividad	Elasticidad (%)	Adhesividad	Masticabilidad
Control	0.28	0.95	99.65	0.0010	0.12
Microcápsulas	0.16	0.54	44.06	0.0002	0.04

## CONCLUSIONES

- \* Las condiciones óptimas de hidrólisis ácida permitieron aumentar los grados de sustitución y eficiencia de reacción en comparación con el almidón nativo.
- \* La solubilidad de los almidones succinatados fue en incremento al aumentar la temperatura, mientras que el poder de hinchamiento demostró un efecto hidrofóbico en comparación con los demás almidones sin los grupos OSA.
- \* Los parámetros de viscosidad y térmicos, de los almidones modificados demostraron disminuciones en sus valores obtenidos conforme fue modificado. Mientras que los espectros de FT-IR y Raman demostraron que hubo alteraciones en la estructura del almidón.
- \* El proceso de extrusión del almidón hidrolizado-succinatado, generó una reducción en el tamaño del gránulo de almidón beneficiando a la generación de microcápsulas, mediante el proceso de secado por aspersión.
- \* Mediante condiciones óptimas de secado por aspersión, se encapsuló el extracto acetónico de *Hibiscus Sabdariffa* L. utilizando como material de pared almidón triplemente modificado y pectina, permitiendo la formación de microcápsulas capaces de obtener efecto antimicrobiano en medios de cultivo y en un embutido.
- \* Los valores obtenidos de los coeficientes de difusión, dependieron de la restructuración polimérica de ambos polímeros utilizados como material de pared para la difusión del extracto acetónico de *Hibiscus Sabdariffa* L.
- \* Las propiedades de TPA demostraron la formación del jamón, mediante la adición de las microcápsulas óptimas como sustituyentes de fécula de maíz.

\* El color del jamón adicionado con microcápsulas fue modificado por las antocianinas presentes en el extracto acetónico de *Hibiscus sabdariffa* L.

\* Las microcápsulas de extracto acetónico de *Hibiscus sabdariffa* L. obtenidas en este trabajo son una alternativa de origen natural para la conservación eficiente de jamón durante la refrigeración.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdorrezza, M. N., Robal, M., Cheng, L. H., Tajul, A. Y., & Karim, A. A. (2012). Physicochemical, thermal and rheological properties of acid-hydrolyzed sago (Metroxylon sago) starch. *Food Science and Technology*, 46, 135-141.
- Adams M. R., & Moss, M. O. (1997). *Microbiología de los alimentos*. España: Acirbia, 229-261.
- Aguilar-Rico, J. A., González-Cruz, L., Juárez-Goiz, J. M., Guadarrama-Álvarez, Z. B., Ramírez-Ortíz, M. E., & Bernardino-Nicanor, A. (2011). Effect of use of citrus bagasse as functional product-extender on physicochemical and textural properties of cooked ham. *Nacameh*.
- Ai, Y., & Jane, J. L. (2015). Gelatinization and rheological properties of starch. *Starch-Stärke*, 67, 213-224.
- Alam, M. S., Pathania, S., & Sharma, A. (2016). Optimization of the extrusion process for development of high fibre soybean-rice ready-to-eat snacks using carrot pomace and cauliflower trimmings. *LWT-Food Science and Technology*, 74, 135-144.
- Alamilla-Beltran, L., Chanona-Perez, J. J., Jimenez-Aparicio, A. R., & Gutierrez-Lopez, G. F. (2005). Description of morphological changes of particles along spray drying. *Journal of Food Engineering*, 67, 179-184.
- Altuna, L., Herrera, M. L., & Foresti, M. L. (2018). Synthesis and characterization of octenyl succinic anhydride modified starches for food applications. A review of recent literature. *Food Hydrocolloids*, 80, 97-110.
- Anal, A. K., & Shing, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 240-251.
- Anderson. A., Conway, H., Pfeifer, V., & Griffin, E. (1969). Gelatinization of corn grits by roll and extrusion cooking. *Journal of Cereal Science*, 14, 4-12.
- Anwar, S. H., & Kunz, B. (2011). The influence of drying methods on the stabilization of fish oil microcapsules: comparison of spray granulation, spray drying, and freeze drying. *Journal Food Engineering*, 105, 367-378.
- Bai, Y., & Shi, Y., C. (2013). Reaction of octenylsuccinic anhydride with a mixture of granular. *Carbohydrate Polymers*, 98, 1599-1602.
- Bai, Y. (2008). Preparation and structure of octenyl succinic anhydride modified waxy maize starch, microporous starch and maltodextrin, Master Thesis, Kansas State University.
- Bai, Y., Shi Y., & Herrerab A., (2011). Study of octenyl succinic anhydride-modified waxy maize starch by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 83, 407-413.
- Bai, Y., Kaufman, R. C., Wilson, J. D., & Shi, Yong-Cheng., (2014). Position of modifying groups on starch chains of octenylsuccinic anhydride-modified waxy maize starch. *Food Chemistry*, 153, 193-199.
- Bai, Y., & Shi, Y., C. (2011). Structure and preparation of octenyl succinic esters of granular starch, microporous starch and soluble maltodextrin. *Carbohydrate Polymers*, 83, 520-527.
- Bao, J. S., Xing, J., Phillips, D. L., & Corke, H. (2003). Physical properties of octenyl succinic anhydride modified rice, wheat, and potato starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2283-2287.

- Beirão da costa S., Duarte C., Bourbon I. A., Pinheiro C.A., Teresa S. A., Moldão M. M., Isabel N. J. M., Vicente A. A., Delgadillo I., Duarte C., & Beirão da costa M. L. (2012). Effect of the matrix system in the delivery and in vitro bioactivity of microencapsulated Oregano essential oil. *Journal of Food Engineering*, 110, 190-199.
- Bello-Flores, C. A., Nuñez-Santiago, M. C., San Martín-Gonzalez, M. F., BeMiller, J. N., & Bello-Pérez. L. A. (2014). Preparation and characterization of octenylsuccinylated plantain starch. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 334-339.
- BeMiller, J. M., & Huber, K. C. (2010). Starch (7th ed.). In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, pp. 1-28. Daniel, R., Whistler, R. L., and Roeper, H., Ed., Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
- BeMiller, J., & Whistler, R. (2009). Starch: chemistry and technology. Tercera edición. Elsevier, Oxford, UK.
- Berg, S., Bretz, M., Hubbermann, E. M., & Schwarz K., (2012). Influence of different pectins on powder characteristics of microencapsulated anthocyanins and their impact on drug retention of shellac coated granulate. *Journal of Food Engineering*, 108, 158–165.
- Bernardino-Nicanor, A., Acosta-García, G., Güemes-Vera, N., Montañez-Soto, J. L., de los Ángeles Vivar-Vera, M., & González-Cruz, L. (2017). Fourier transform infrared and Raman spectroscopic study of the effect of the thermal treatment and extraction methods on the characteristics of ayocote bean starches. *Journal of food science and technology*, 54, 933-943.
- Bertolini, A. (2010). Starches: characterization, properties, and applications. BocaRaton, FL: CRC Press.
- Betancur-Ancona, D., García-Cervera, E., Cañizares-Hernández, E., & Chel-Guerrero, L. (2002). Chemical modification of jack bean (*Canavalia ensiformis*) starch by succinylation. *Starch-Stärke*, 54(11), 540-546.
- Bhosale, R., & Singhal, R. (2007). Effect of octenylsuccinylation on physicochemical and functional properties of waxy maize and amaranth starches. *Carbohydrate Polymers*, 68, 447–456.
- Bhosale, R., & Singhal R. (2006). Process optimization for the synthesis of octenyl succinyl derivative of waxy corn and amaranth starches. *Carbohydrate Polymers*, 66, 521-527.
- Biliaderis, C. G. (2009). Structural transitions and related physical properties of starch. In J. BeMiller, & R. Whistler (Eds.), *Starch: Chemistry and technology* (3rd ed.). (332-354). Burlington, MA, USA: Elsevier Inc.
- Borrás-Linares, I., Fernández-Arroyo, S., Arráez-Roman, D., Palmeros-Suárez, P. A., Del Val-Díaz, R., Andrade-González, I., ... & Segura-Carretero, A. (2015). Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Industrial Crops and Products*, 69, 385-394.
- Borries-Medrano, E., Jaime-Fonseca, M. R., & Aguilar-Mendez, M. A. (2016). Starchguar gum extrudates: Microstructure, physicochemical properties and in-vitro digestion. *Food Chemistry*, 194, 891-899.
- Brazel, C. S. (1999). Microencapsulation: Offering solutions for the food industry. *Cereal Foods World*, 44, 388–393.
- Brul, S., Coote, P. (1999). Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 1–17.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.

- Cael, J. J., Koenig, J. L., & Blackwell, J. (1973). Infrared and Raman spectroscopy of carbohydrates. Part III. Raman-spectra of polymorphic forms of amylose. *Carbohydrate Research*, 29, 123–134.
- Cael, J. J., Koenig, J. L., & Blackwell, J. (1975). Infrared and Raman-spectroscopy of carbohydrates. Part VI. Normal coordinate analysis of V-amylose. *Biopolymers*, 14, 1885–1903.
- Cai, C., & Wei, C. (2013). In situ observation of crystallinity disruption patterns during starch gelatinization. *Carbohydrate Polymers*, 92, 469-478.
- Capek, P., Draňbik, M., & Turjan, J. (2010) Characterization of starch and its mono and hybrid derivatives by thermal analysis and FT-IR spectroscopy. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 99, 667–673.
- Castro-Rosas, J., Gómez-Aldapa, C. A., Acevedo-Sandoval, O. A., González-Ramírez, C. A., Villagomez-Ibarra, J. R., & Chavarría-Hernández, N., Villarruel-López, A., & Torres-Vitela, M. del Refugio. (2011). Frequency and behavior of Salmonella and Escherichia coli on whole and sliced jalapeno and serrano peppers. *Journal of Food Protection*, 74, 874-881.
- Castro-Rosas, J., Santos, E. M. L., Gómez-Aldapa, C. A., González-Ramírez, C. A., Villagomez-Ibarra, J. R., Gordillo-Martínez, A. J., Torres-Vitela, M. D. R. (2010). Incidence and behavior of Salmonella and Escherichia coli on whole and sliced zucchini squash (Cucurbita pepo) fruit. *Journal of Food Protection*, 73, 1423-1429.
- Chan, E. S., Wong, S. L., Lee, P. P., Lee, J. S., Ti, T. B., Zhang, Z., Poncelet, D., Ravindra, P., Phan, S. H., & Yim, Z. H. (2011). Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium-alginate beads and the viability of encapsulated cells. *Carbohydrate Polymers*, 83, 225-232.
- Chen, J. H., Ren, Y, Seow, J., Liu, T., Bang, W. S., & Yuk, H. G. (2012). Intervention technologies for ensuring microbiological safety of meat: Current and future trends. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 119-132.
- Chen, X, D., & Ozkan, N. (2007). Stickiness, Functionality, and Microstructure of Food Powders. *Drying Technology: An International Journal*, 25, 959-969.
- Čížová, A., Koschella, A., Heinze, T., Ebringerová, A., & Sroková, I. (2008). Octenylsuccinate derivatives of carboxymethyl starch-synthesis and properties. *Starch-Stärke*, 59, 482-492.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., & Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 1-20.
- Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*, 78, 90-103.
- Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 777-788.
- Cova, A., Sandoval, A. J., Balsamor, V., & Müller, A. J. (2010). The effect of hydrophobic modifications on the adsorption isotherms of cassava starch. *Carbohydrate Polymers*, 81, 660-667.
- Cutter, C. N. (2006). Opportunities for bio-based packaging technologies to improve the quality and safety of fresh and further processed muscle foods. *Meat Science*, 74, 131-142.

- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2009). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-First Edition. M02-A10 and M07-A8.
- Cruz-Galvez, M. A., Gómez-Aldapa, C. A., Villagómez-Ibarra, J. R. Chavarría-Hernández, N., Rodríguez-Baños, J., Rangel-Vargas, E., & Castro-Rosas, J. (2013). Antibacterial effect against foodborne bacteria of plants used in traditional medicine in central Mexico: Studies in vitro and in raw beef. *Food Control*, 32, 289-295.
- Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I., & Heinrich, M. (2014). *Hibiscus sabdariffa* L.—A phytochemical and pharmacological review. *Food chemistry*, 165, 424-443.
- Dana J. H., & Ph, D. (2011), Optimizando el procesamiento de embutidos para alcanzar más inocuidad, revista en línea carnetes.
- Davies, T., Miller, D., & Proctor, A. (1980). Inclusion complexes of free fatty acids with amylose. *Starch/Starke*, 32, 149-154.
- Davidson, P.M. (1997). Chemical Preservatives and Natural antimicrobial compounds. In *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (eds), NY: ASM Press, 520–556.
- Delgado-Adámez, J., Bote, E., Parra-Testal, V., Martín, M.J., & Ramírez, R. (2016). Effect of the olive leaf extracts in vitro and in active packaging of sliced Iberian pork loin. *Packaging Science and Technology*, 29, 649-660.
- Desdémona-Martínez, E., Soto-Simental, S., & Hernández-Chávez, J. F. (2000). Incidencia de patógenos en productos cárnicos y métodos para prevenirlos. *Carnetec*, 7, 42- 47.
- Díaz-Bandera, D., Villanueva-Carvajal, A., Dublán-García, O., Quintero- Salazar, B., Dominguez-Lopez, A. (2015). Assessing release kinetics and dissolution of spray-dried Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract encapsulated with different carrier agents. *Food Science and Technology*, 64, 693-698.
- Diederer, B. M. W., & Kluytmans, J. A. J. W. (2006). The emergence of infections with community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Infection*, 52(3), 157-168.
- Domian, E., Brynda-Kopytowska, A., Cenkier, J., & S´wirydow E. (2015). Selected properties of microencapsulated oil powders with commercial preparations of maize OSA starch and trehalose. *Journal of Food Engineering*, 152, 72–84.
- Dutta, H., Paul, S. K., Kalita, D., & Mahanta, C. L. (2011). Effect of acid concentration and treatment time on acid–alcohol modified jackfruit seed starch properties. *Food Chemistry*, 128(2), 284-291.
- Dziezak, J.D. (1988). Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technology*, 42, 36-151.
- EFSA, 2014. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA J.* 12, 3547.
- El-Abassy, R. M., Eravuchira, P. J., Donfack, P., Von der Kammer, B., & Materny, A. (2011). Fast determination of milk fat content using Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 56, 3–8.
- Eliasson, A. (2004). *Starch in food. Structure, function and applications*. CRC Press. Cambridge, Inglaterra.

- Fach P, Perelle S, Dilasser F, Grout J, Dargaignaratz C., & Botella L. (2002). Detection by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay of *Clostridium botulinum* in fish and environmental samples from a coastal area in northern France. *Application Environmental Microbiology*, 68, 5870-5876.
- Falade, K. O., & Ayetigbo, O. E. (2017). Effects of tempering (annealing), acid hydrolysis, low-citric acid substitution on chemical and physicochemical properties of starches of four yam (*Dioscorea* spp.) cultivars. *Journal of food science and technology*, 54(6), 1455-1466.
- FDA. (1994). Code of Federal Regulations. Title 21, Chap. I, Part 172, food additives permitted in foods for human consumption, Section 172.892, food starch-modified. Washington, DC: U.S. Government Printing Office.
- Fengs, P., Stephen, D., Weagant, & Michael A. G. (1998). *Bacteriological Analytical Manual*, 8th Edition, Revision A, Chapter 4. Revised: 2002.
- Feng, Q., Wu, J., Chen, G., Cui, F., Kim, T., & Kim, J. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52, 662–668.
- Fernández E. E. (2000). *Microbiología e inocuidad de los Alimentos*. Universidad Autonoma de Queretaro. Mexico.
- Fernandez-Pan, I., Mendoza, M., & Mate, J. I. (2013). Whey protein isolate edible films with essential oils incorporated to improve the microbial quality of poultry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(12), 2986-2994.
- Flores-Morales, A., Jiménez-Estrada, M., & Mora-Escobedo, R. (2012). Determination of the structural changes by FT-IR, Raman, and CP/MAS 13 C NMR spectroscopy on retrograded starch of maize tortillas. *Carbohydrate Polymers*, 87, 61-68.
- Food and Agricultural Organization of the United Nations (ed.). (2009). *Compendium of food additive specifications*. In *FAO JECFA Monographs 7*. Rome: FAO. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/012/i0971e/i0971e00.pdf>.
- Fonseca-Flrido, H. A., Vázquez-García, H. G., Méndez-Montevalvo, G., Basilio-Cortés, U. A., Navarro-Cortés, R., Rodríguez-Marín, M. L., Castro-Rosas, J. & Gómez-Aldapa, C. A. (2018). Effect of acid hydrolysis and OSA esterification of waxy cassava starch on emulsifying properties in Pickering-type emulsions. *LWT, Food Science and Technology*. 91, 258-264.
- Fonseca-Flrido, H. A., Hernández-Ávila, J., Rodríguez-Hernández, A. I., Castro-Rosas, J., Acevedo-Sandoval, O. A., Chavarria-Hernández, N., & Gómez-Aldapa, C. A. (2016). Thermal, rheological, and mechanical properties of normal corn and potato starch blends. *International Journal of Food Properties*, 1-12.
- Frazier, W.C.& Westhuff, D.C. (2000). *Microbiología de los alimentos*. 4ta edición. Edición española. Zaragoza España.
- Galat, A. (1980). Study of the Raman scattering and infrared absorption spectra of branched polysaccharides. *Acta Biochimica Polonica*, 27, 135-42.
- Gardner M. S. (1975). *The microbiological examination of cured meats in sampling microbiological monitoring of environments*. Editado por R. G. Board. Academic Press. London-New York, 11-20.
- Gashti, P.M, Stir, M., Bourquin, M., & Hulliger, J. (2013) Mineralization of calcium phosphate crystals in starch template inducing a brushite kidney stone biomimetic composite. *Crystal Growth Design*, 13, 2166–2173.
- Genigeorgis, C. (1986). Problems associated with perishable meats. *Foods technology*, 140-154.

- Gibson, T., Solah, V., & McCleary, B. (1997). A procedure to measure amylose in cereal starches and flours with concanavalin A. *Journal of Cereal Science*, 25, 111-119.
- Gilchrist, J.J., MacLennan, C.A., Hill, A.V., 2015. Genetic susceptibility to invasive *Salmonella* disease. *Nat. Rev. Immunol.* 15 (7), 452.
- Godavarti, S., & Karwe, M. (1997). Determination of specific mechanical energy distribution on a twin-screw extruder. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 67, 277-287.
- Goh, C. H., Heng, P. W. S., & Chan, L. W. (2012). Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*, 88, 1-12.
- Guo, J., Liu, L., Lian, X., Li, L., & Wu, H. (2014). The properties of different cultivars of Jinhai sweet potato starches in China. *International Journal Biological Macromolecules*, 67, 1–6.
- Gulati, P., Weier, S. A., Santra, D., Subbiah, J., & Rose, D. J. (2016). Effects of feed moisture and extruder screw speed and temperature on physical characteristics and antioxidant activity of extruded proso millet (*Panicum miliaceum*) flour. *International Journal Food Science Technology*, 51, 114-122.
- Gunvig, A., Andresen, M. S., Jacobsen, T., & Borggaard, C. (2018). Staphtox predictor-A dynamic mathematical model to predict formation of Staphylococcus enterotoxin during heating and fermentation of meat products. *International journal of food microbiology*, 285, 81-91.
- Guzmán, E., Baeten, V., Pierna, J. A. F., & García-Mesa, J. A. (2011). Application of low-resolution Raman spectroscopy for the analysis of oxidized olive oil. *Food Control*, 22, 2036–2040.
- Han, C., Wang, J., Li, Y., Lu, F., & Cui, Y. (2014). Antimicrobial-coated polypropylene films with polyvinyl alcohol in packaging of fresh beef. *Meat Science*, 96, 901-907.
- Han, F., Gao, Ch., Liu, M., Huang, F., & Zhang, B. (2013). Synthesis, optimization and characterization of acetylated corn starch with the high degree of substitution. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 372-376.
- Han, J. H. (2005). Antimicrobial packaging systems. Chapter 6 In J. H. Han, *Innovations in Food Packaging* (pp. 80-107). Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- He, J. H., Liu, J., & Zhang, G. Y. (2008). Slowly digestible waxy maize starch prepared by octenyl succinic anhydride esterification and heat-moisture treatment: Glycemic response and mechanism. *Biomacromolecules*, 9, 175-184.
- He, G. Q., Song, X. Y., Ruan, H., & Chen, F. (2006). Octenyl succinic anhydride modified early indica rice starches differing in amylose content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2775–2779.
- Hielm S., Björkroth J., Hyytiä E., & Korkeala H. (1998). Prevalence of Clostridium botulinum in Finnish trout farms: Pulsed-field gel electrophoresis typing reveals extensive genetic diversity among type E isolates. *Application Environmental Microbiology*, 64, 4161-4167.
- Hoover, R. (2000). Acid-treated starches. *Food Reviews International*, 16, 369–392.
- Jayakody, L., & Hoover, R. (2002). The effect of lintnerization on cereal starch granules. *Food Research*, 35, 665-680.

- Jung, E., Kimb Y. J and Jooa N. (2013). Physicochemical properties and antimicrobial activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Journal Science Food Agriculture*, 93: 3769–3776.
- Kačuráková, M., & Wilson, R. H. (2001). Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. *Carbohydrate Polymers*, 44, 291-303.
- Kainuma, K., & French, D. (1971). Naegeli amylopectin and its relationship to starch granule structure. I. Preparation and properties of amylopectins from various starch types. *Biopolymers*, 10, 1673-1680.
- Kailasapathy, K., & Masondole, L. (2005). Survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* and their effect on texture of feta cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 66, 252-258.
- Kaunisto, E., Marucci, M., Borgquist, P., & Axelsson, A. (2011). Mechanistic modelling of drug release from polymer-coated and swelling and dissolving polymer matrix systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 418, 54-77.
- Kaur, S., Kaur, A., Singh, N., & Sodhi, N. S. (2013). Effect of shearing on functional properties of starches isolated from Indian kidney beans. *Starch-Stärke*, 65(9-10), 808-813.
- Khwaldia, K., Ara-Tehrany, E., & Desobry, S. (2010). Biopolymer coatings on paper packaging materials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 82-91.
- Klein, B., Pinto, V. Z., Vanier, N. L., da Rosa Zavareze, E., Colussi, R., do Evangelho, J. A., ... & Dias, A. R. G. (2013). Effect of single and dual heat–moisture treatments on properties of rice, cassava, and pinhao starches. *Carbohydrate polymers*, 98(2), 1578-1584.
- Kopper, G., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W., & Gutiérrez, G. (2009). Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua. (Informe técnico sobre ingeniería agrícola y alimentaria No.6) Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Kuorwel, K. K., Cran, M. J., Sonneveld, K., Miltz, J., & Bigger, S. W. (2011a). Antimicrobial activity of biodegradable polysaccharide and protein-based films containing active agents. *Journal of Food Science*, 76(3), 90-102.
- Kurtz, J.R., Goggins, J.A., McLachlan, J.B., 2017. *Salmonella* infection: interplay between the bacteria and host immune system. *Immunol. Lett.* 190, 42–50.
- Lawal, O. S. (2004). Succinyl and acetyl starch derivatives of a hybrid maize: Physicochemical characteristics and retrogradation properties monitored by differential scanning calorimetry. *Carbohydrate Research*, 339, 2673–2682.
- Le Loir, Y., F. Baron, and M. Gautier. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* 2:63–76.
- Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y., & Su, Z. (2012). Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*, 37(2), 207-215.
- Li, J. Y., & Yeh, A. I., (2001). Relationships between thermal, rheological characteristics and swelling power for various starches. *Journal Food Engineer*, 50, 141-148.

- Li, X., Gao, W. Y., Wang, J., Jiang, Q. Q., & Huang, L. Q. (2010). Comparison of the morphological, crystalline, and thermal properties of different crystalline types of starches after acid hydrolysis. *Starch /Stärke*, 62, 686-696.
- Lian X, Wang C, Zhang K, & Li, L. (2014). The retrogradation properties of glutinous rice and buckwheat starches as observed with FTIR, <sup>13</sup>C NMR and DSC. *International Journal Biological Macromolecules*. 64, 288–293.
- Liang, R., Huang, Q., Jianguo, M., Shoemaker, C. F., & Zhong, F. (2013). Effect of relative humidity on the store stability of spray-dried betacarotene nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, 33, 225–233.
- López-Palacios, G., & Valdez-Martinez, S. E. (2000). Factores que favorecen el desarrollo de microorganismos en carne y su efecto sobre la calidad. *Lácteos y cárnicos mexicanos*, 15, 47-55.
- Lopez-Rubio A., Clarke J. M., Ben Scherer, B., Topping, D. L., & Gilbert, E. P. (2009). Structural modifications of granular starch upon acylation with short-chain fatty acids. *Food Hydrocolloids*. 23, 1940–1946.
- Lv, Q. Q., Li, G. Y., Xie, Q. T., Zhang, B., Li, X. M., Pan, Y., & Chen, H. Q. (2018). Evaluation studies on the combined effect of hydrothermal treatment and octenyl succinylation on the physic-chemical, structural and digestibility characteristics of sweet potato starch. *Food chemistry*, 256, 413-418.
- Maćkiw, E., Maka, Ł., Ścieżyńska, H., Pawlicka, M., Dziadczyk, P., & Rżanek-Boroch, Z. (2015). The impact of plasma-modified films with sulfur dioxide, sodium oxide on food pathogenic microorganisms. *Packaging Technology and Science*, 28, 285-292.
- Malhotra, B., Keshwani, A., & Kharkwal, H. (2015). Antimicrobial food packaging: potential and pitfalls. *Frontiers in Microbiology* 6:611. doi: 10.3389/fmicb.2015.00611.
- Mastromatteo, M., Conte, A., & Del Nobile, M. A. (2010). Advances in controlled release devices for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 591-598.
- Miao, M., Li, R., Jiang, B., Cui, S. W., Zhang, T., & Jin, Z. (2014). Structure and physicochemical properties of octenyl succinic esters of sugary maize soluble starch and waxy maize starch. *Food Chemistry*, 151, 154–160.
- Millemann Y., Gaubert S., Remy D., & Colmin C. (2000). Evaluation of IS200-PCR and comparison with other molecular markers to trace *Salmonella enteritidis* subsp. enterica serotype yphimurium bovine isolates from farm meat. *Journal Clinical Microbiology*, 38, 2204-2209.
- Moura, S. C., Berling, C. L., Germer, S. P., Alvim, I. D., & Hubinger, M. D. (2018). Encapsulating anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. calyces by ionic gelation: Pigment stability during storage of microparticles. *Food Chemistry*, 241, 317-327.
- Mossel A. A. D., & Moreno G. B. (2003). *Microbiología de los alimentos; fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos*. Zaragoza: Acribia, 10-39.
- Murúa, P. B., Beristain-Guevara, C. I. & Martinez-Bustos, F. (2009). Preparation of starch derivaties using reactive extrusión and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spary drying. *Journal of Food Engineering*, 91, 380-386.
- Mutungi, C., Passauer, L., Onyango, C., Jaros, D., & Rohm, H. (2012). Debranched cassava starch crystallinity determination by Raman spectroscopy: Correlation of features in Raman spectra with X-ray diffraction and <sup>13</sup>C CP/MAS NMR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 87, 598–606.

- Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F., & Coppola, R. (2012). Microencapsulation in food science and Biotechnology. *Current Option in Biotechnology*, 182-186.
- Nobrega, M. M., Olivato, J. B., & Muller, C. M. O., & Yamashita, F. (2012). Biodegradable starch-based films containing saturated fatty acids: thermal, infrared and Raman spectroscopic characterization. *Polímeros*, 22, 467–474.
- Norma Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2002, Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Secretaria de salud México.
- Norma Oficial Mexicana NOM-122-SSA1-1994, Bienes y servicios. Productos de la carne. Productos cárnicos curados y cocidos, y curados emulsionados y cocidos. Especificaciones sanitarias. Secretaria de salud México.
- Ockerman, H.W., Basu, L., Crespo, F. L., & Sánchez, F. J. C. (2002). Comparison of European and American systems of production and consumption of dry-cured hams. Des Moines: National Pork Board. American Meat Science Association, 1–12.
- Ortega-Ojeda, F. E., Larsson, H., & Eliasson, A. C. (2005). Gel formation in mixtures of hydrophobically modified potato and high amylopectin potato starch. *Carbohydrate Polymers*, 59, 313–327.
- Palma-Rodriguez, H. M., Agama-Acevedo, E., Mendez-Montealvo, G., Gonzalez-Soto, R. A., Vernon-Carter, E. J., & Bello-Pérez, L. A., (2012). Effect of acid treatment on the physicochemical and structural characteristics of starches from different botanical sources. *Starch/Stärke*, 64, 115–125.
- Panyoyai, N., Bannikova, A., Small, D. M., Shanks, R. A., & Kasapis, S. (2016). Diffusion of nicotinic acid in spray-dried capsules of whey protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 52, 811-819.
- Pascoal, A. M., Di-Medeiros, M. C., Batista, K. A., Leles, M. I., Lião, L. M., & Fernandes K. F. (2013). Extraction and chemical characterization of starch from *S. Lycocarpum* fruits. *Carbohydrate Polymers*, 98, 1304–1310.
- Passauer, L., & Bender, H. (2017). Functional group analysis of starches reacted with urea-phosphoric acid—Correlation of wet chemical measures with FT Raman spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 168, 356-364.
- Passauer, L., Bender, H., & Fischer, S. (2010). Synthesis and characterization of starch phosphates. *Carbohydrate Polymers*, 82, 809–814.
- Paster, N., Menasherov, M., Ravid, U., & Juven, B. (1995). Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain, *Journal of Food Protection*, 58, 81–85.
- Pérez-Alonso, C., Baez-Gonzalez, J. G., Beristaín, C. I., Vernon-Carter, E. J., & Vizcarra-Mendoza, M. G. (2003). Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as selection criteria for their use as wall material for spray-dried microcapsules. *Carbohydrate polymers*, 53, 197–203.
- Pérez, E., Aguiar, P., Salvatella, R., Ribetto, A., & Castro, A. (2004). Vigilancia de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA): su importancia en la caracterización de riesgos. *Asociación Argentina de Microbiología*.
- Phillips, D. L., Xing, J., Chong, C. K., Liu, H., & Corke, H. (2000). Determination of the degree of succinylation in diverse modified starches by Raman spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(11), 5105-5108.

- Pinto, V. Z., Vanier, N. L., Klein, B., Zavareze, E. D. R., Elias, M. C., Gutkoski, L. C., ... & Dias, A. R. G. (2012). Physicochemical, crystallinity, pasting and thermal properties of heat-moisture-treated pinhão starch. *Starch-Stärke*, 64(11), 855-863.
- Plate, S., Diekmann, S., Steinhäuser, U., & Drusch, S. (2012). Determination of the degree of substitution of hydrolysed octenylsuccinate-derivatised starch. *Food Science and Technology*, 46, 580-582.
- Polesi, L. F., & Samento, S. B. S. (2011). Structural and physicochemical characterization of RS prepared using hydrolysis and heat treatments of chickpea starch. *Starch/Stärke*, 63, 226-235.
- Prändl O., Fischer A., Schmidhofer T., & Sinell H. J. (1994). *Fundamentos de la conservación de la carne en Tecnología e Higiene de la Carne*. Editorial Acribia.
- Qi, S., Huang, H., Huang, J., Wang, Q., & Wei, Q. (2015). Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) seed water extract as potential antioxidant and anti-obese natural additive in meat products. *Food Control*, 50, 195-201.
- Quintavalla, S., & Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*, 62, 373-380.
- Reineccius, G. A. (2004). The spray drying of food flavors. *Drying Technology*, 22, 1289-1324.
- Riley L. W., Remis R. S., & Helgerson. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* O157:H7 serotype. *N. Engl. Journal Medical*, 308: 681-85.
- Rindlav, A., Hulleman, S. H. D., & Gatenholm, P. (1997). Formation of starch films with varying crystallinity. *Carbohydrate Polymers*, 34, 25-30.
- Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 44, 464-475.
- Rodríguez-Rebollo, M. (1998). *Manual de industrias cárnicas*. Publicaciones técnicas Alimentarias, S. A., Madrid.
- Roller S., (2003). *Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods*. Wood head Publishing. Cambridge, England.
- Ruan, H., Chen, Q., Fu, M., Xu, Q., & He, G. (2009). Preparation and properties of octenyl succinic anhydride modified potato starch. *Food Chemistry*, 114, 81-86.
- Rust R. E., (1994). *Productos embutidos en Ciencia de la carne y de los productos cárnicos*. J. C. Price y B. S. Schweigert (Eds.). Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- Saézn, C., Tapia, S., Chávez, J., Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 114, 616-622.
- SAGARPA-México, (2015) <http://www.gob.mx/sagarpa>.
- Salarbashi, D., Mortazavi, S. A., Noghabi, M. S., Bazzaz, B. S. F., Sedaghat, N., Ramezani, M., & Shahabi-Ghahfarrokhi, I. (2016). Development of new active packaging film made from a soluble soybean polysaccharide incorporating ZnO nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 140, 220-227.
- Sánchez-Ortega, I., García-Almendárez, B. E., Santos-López, E. M., Amaro-Reyes, A., Barboza-Corona, J. E., & Regalado, C. (2014). Antimicrobial edible films and coatings for meat and meat products preservation. *The Scientific World Journal*, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/248935>.

- Sánchez-Rodríguez J. A., Serrano-Jiménez S., & Marfil-Navarro R. (2010). Patógenos emergentes en la línea de sacrificio de porcino: fundamentos de seguridad alimentaria. España: Ediciones Díaz de Santos. 44.
- Sasaki, T., Sotome, I., & Okadome, H. (2015). In vitro starch digestibility and in vivo glucose response of gelatinized potato starch in the presence of non-starch polysaccharides. *Starch-Starke*, 67, 415-423.
- Satyanarayana, V. S. V., Sreevani, P., Sivakumar, A., & Vijayakumar, V. (2008). Synthesis and antimicrobial activity of new Schiff bases containing coumarin moiety and their spectral characterization. *Arkivoc*, 17, 221-233.
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M.A., Roy, S. L., Jones, J. L., & Griffin, P.M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 7–15.
- Scharff, R. L. (2012). Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. *Journal of Food Protection*, 75, 123–131.
- Secretaria de Salud. (2012). Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Aparato Digestivo. México: Boletín Epidemiología, Available at [http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/plantilla/intd\\_boletin.html](http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/plantilla/intd_boletin.html) Accessed 07.12.12.
- Serfert, Y., Drusch, S., Schmidt-Hansberg, B., Kind, M., & Schwarz, K. (2009). Process engineering parameters and type of n-octenylsuccinate-derivatised starch affect oxidative stability of microencapsulated long chain polyunsaturated fatty acids. *Journal Food Engineering*, 95, 386–392.
- Shahidi, F., & Han, X. Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 33, 501–547.
- Sharma, M., Singh, A. K., Yadav, D. N., Arora, S., & Vishwakarma, R. K. (2016). Impact of octenyl succinylation on rheological, pasting, thermal and physicochemical properties of pearl millet (*Pennisetum typhoides*) starch. *LWT*, 73, 52-59.
- Shih, F. F., & Daigle, K. W. (2003). Gelatinization and pasting properties of rice starch modified with 2-octenylsuccinic anhydride. *Food/Nahrung*, 47, 64-67.
- Shogren, R. L., Viswanathan, A., Felker, F., & Gross, R. A. (2000). Distribution of octenyl succinate groups in octenyl succinic anhydride modified waxy maize starch. *Starch/Stärke*, 52, 196-204.
- Siepmann, J., & Peppas, N. A. (2012). Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced drug delivery reviews*, 64, 163-174.
- Siepmann, J., & Siepmann, F. (2008). Mathematical modeling of drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, 364(2), 328-343.
- Sindi, H. A., Marshall, L. J., & Morgan, M. R. (2014). Comparative chemical and biochemical analysis of extracts of *Hibiscus sabdariffa*. *Food chemistry*, 164, 23-29.
- Singh, J., Kaur, L., & McCarthy, O. J. (2007). Factors influencing the physicochemical morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications - A review. *Food hydrocolloids*, 21, 1- 22.

- Singh, N., Singh, J., Lovedeep, K., Singh, N., & Singh, B. (2003). Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chemistry*, 8, 219-231.
- Singh, H., Sodhi, N. S., & Singh, N. (2009). Structure and functional properties of acid thinned sorghum starch. *International Journal Food Properties*, 12, 713-725.
- Singh, J., Kaur, L., & McCarthy, O. J. (2007). Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications – A review. *Food Hydrocolloid*, 21, 1-22.
- Skandamis, P., & Nychas, G. J. E. (2001). Effect of oregano essential oil on microbiological and physicochemical attributes of mince meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 1011–1022.
- Socrates, G. (2007). *Infrared and RAMAN characteristics group frequencies, tables and charts* (3rd ed.). John Wiley & Sons Ltd.
- Song, X.-Y., He, G.-Q., Ruan, H., & Chen, Q., H. (2006). Preparation and properties of octenyl succinic anhydride modified early indica rice starch. *Starch-Stärke*, 58, 109-117.
- Soottitantawat, A., Peigney, J., Uekaji, Y., Yoshii, H., Furuta, T., Ohgawara, M., & Linko, P. (2007). Structural analysis of spray-dried powders by confocal laser scanning microscopy. *Asia-Pac. Journal Chemistry Engineering*, 2, 41–46.
- Sun, Q., Zhu, X., Si, F., & Xiong, L. (2015). Effect of acid hydrolysis combined with heat moisture treatment on structure and physicochemical properties of corn starch. *Journal of Food Science and Technology*, 52(1), 375-382.
- Sun, Q., Han, Z., Wang, L., & Xiong, L. (2014). Physicochemical differences between sorghum starch and sorghum flour modified by heat-moisture treatment. *Food Chemistry*, 145, 756-764.
- Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., & Bigger, S. W. (2003). Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *Journal of Food Science*, 68(2), 408-420.
- Sweedman, M. C., Tizzotti, M. J., Schäfer, C., & Gilbert, R. G. (2013). Structure and physicochemical properties of octenyl succinic anhydride modified starches: A review. *Carbohydrate Polymers*, 92, 905-920.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food, A-Review. *Food Control*, 21, 1199-1218.
- Tassou, C. C., Koutsoumanis, K., & Nychas, G. J. E. (2000). Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research International* 33, 273–280.
- Tester, R. F., & Morrison, W. R., (1990). Swelling and gelatinization of cereal starches. I. Effects of amylopectin, amylose, and lipids. *Cereal Chemistry*, 67, 551–557.
- Thirathumthavorn, D., & Charoenrein, S. (2006). Thermal and pasting properties of native and acid-treated starches derivatized by 1-octenyl succinic anhydride. *Carbohydrate Polymers*, 66, 258-265.
- Thygesen, L. G., Lokke, M. M., Micklander, E., Engelsen, S. B., 2003. Vibrational microspectroscopy of food Raman vs. FT-IR. *Trends in Food Science and Technology*, 14, 50–57.

- Toldrá, F. (2002). Dry-cured meat products. Trumbull, Conn.: Food & Nutrition Press (c2002).
- Tonon, R. V. Brabet, C., & Hubinger, M. D. (2008). Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal Food Engineering*, 88, 411–418.
- Torres, M. R., & Castillo, A. (2006). *Microbiología de los alimentos*. Universidad de Guadalajara.
- USDA (2015). United States Department of Agriculture. Code of Federal Regulations. 9.301; Code of Federal Regulations (<http://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>, Accessed July 21st, 2015).
- Vansoest, J. J. G., Dewit, D., Tournois, H., & Vliegthart, J. F. G. (1994). Retrogradation of potato starch as studied by Fourier-transform infrared-spectroscopy. *Starch/Stärke*, 46, 453–457.
- Vargas-Solórzano, J. W., Carvalho, C. W. P., Takeiti, C. Y., Ascheri, J. L. R., & Queiroz, V. A. V. (2014). Physicochemical properties of expanded extrudates from colored sorghum genotypes. *Food Research International*, 55, 37-44.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A. (2011). Effect of packaging conditions on shelf-life of mortadella made with citrus fibre washing water and thyme or rosemary essential oil. *Food and Nutrition Sciences*, 2(01), 1.
- Wang, C. J., Chang, T., Yang, H., & Cui. M. (2015). Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 47, 231–236.
- Wang, L., Wang, Q., Tong, J., & Zhou, J. (2015). Physicochemical properties of chitosan films incorporated with honeysuckle flower extract for active food packaging. *Journal of Food Process Engineering*, 2015, 1-8.
- Wang, L., & Wang, Y. J., (2001). Structure and physicochemical properties of acid-thinned corn, potato and rice starches. *Starch-Stärke*, 53, 570-576.
- Wang, S., Li, T., Wang, S., & Copeland, L. (2017). Effects of hydrothermal-alkali and freezing-thawing pre-treatments on modification of corn starch with octenyl succinic anhydride. *Carbohydrate Polymers*, 175, 361–369.
- Wang, S., Zhang, X., Wang, S., & Copeland, L. (2016). Changes of multi-scale structure during mimicked DSC heating reveal the nature of starch gelatinization. *Scientific Reports*, 6, 28271.
- Wang, S., & Copeland, L., (2015). Effect of Acid Hydrolysis on Starch Structure and Functionality: A Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55, 95-1079.
- Wang, S., Copeland, L., (2012a). Nature of thermal transitions of native and acid-hydrolysed pea starch: Does gelatinization really happen? *Carbohydrate Polymer*, 87, 1507–1514.
- Wang, S. J. & Copeland, L., (2012b). New insights into loss of swelling power and pasting profiles of acid hydrolyzed starch granules. *Starch/Stärke*, 0, 1-7.
- Wang, X., Li, X., Chen, L., Xie, F., Yu, L., & Li, B. (2011). Preparation and characterisation of octenyl succinate starch as a delivery carrier for bioactive food components. *Food Chemistry*, 126, 1218-1225.

- Wang, Y. J., Truong, V. D., & Wang, L. (2003). Structures and rheological properties of corn starch as affected by acid hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*, 52, 327-333.
- Westergaard, V. (2004). *Milk Powder Technology – Evaporation and Spray Drying*. GEA A/S Niro Copenhagen, Denmark.
- Wetzel, D. L., Shi, Y.-C., & Schmidt, U. (2010). Confocal Raman and AFM imaging of individual granules of octenyl succinate modified and natural waxy maize starch. *Vibrational Spectroscopy*, 53, 173-177.
- Wiercigroch, E., Szafranec, E., Czamara, K., Pacia, M. Z., Majzner, K., Kochan, K., Kaczor, A., Baranska, M., & Malek, K. (2017). Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 185, 317-335.
- Willats, W. G. T., Knox, J. P., & Mikkelsen, J. D., (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 97–104.
- Wilson, P. D. G., Brocklehurst, T. F., Arino, D., Thuault, M., Jakobsen, M., Lange, J. W. T., Farkas, J., Wimpenny, J. W. T., & Van Impe, J. F. (2002). Modelling microbial growth in structured foods: towards a unified approach. *International Journal of Food Microbiology*, 75, 273–289.
- Woods, L. F., Wood, J. M., & Gibbs, P. A. (1981). The involvement of nitric oxide in the inhibition of the phosphoroclastic system in *Clostridium sporogenes* by sodium nitrite. *Microbiology*, 125(2), 399-406.
- Xiao D., Michael P. D., & Zhong Q. (2011). Spray-Dried Zein Capsules with Coencapsulated Nisin and Thymol as Antimicrobial Delivery System for Enhanced Antilisterial Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 7393-7404.
- Xie, M., Duan, Y., Li, F., Wang, X., Cui, X., Bacha, U., & Zhao, Z. (2016). Preparation and characterization of modified and functional starch (hexadecyl corboxymethyl starch) ether using reactive extrusion. *Starch-Starke*, 68, 1-9.
- Xie, Y. L., Zhou, H. M., Liang, X. M., He, B. S., & Han, X. X. (2010). Study on the morphology, particle size and thermal properties of vitamin A microencapsulated by starch octenylsuccinate. *Agriculture Science China*, 9, 1058–1064.
- Yapo, B. M. (2011). Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins - A new hypothetical model. *Carbohydrate Polymers*, 86, 373-385.
- Ye, F., Miao, M., Huang, C., Lu, K., Jiang, B., & Zhang, T. (2014). Elucidation of substituted ester group position in octenyl succinic anhydride modified sugary maize soluble starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 11696–11705.
- Young, S. L., Sarda, X., & Rosenberg, M. (1993). Microencapsulating properties of whey proteins. 1. Microencapsulation of anhydrous milk fat. *Journal of Dairy Science*, 76, 2868-2877.
- Zepon, K. M., Vieira, L. F., Soldi, V., Salmoria, G. V., & Kanis, L.A. (2013). Influence of process parameters on microstructure and mechanical properties of starchcellulose acetate/silver sulfadiazine matrices prepared by melt extrusion. *Polymer Testing*, 32, 1123-1127.
- Zbicinski, I., Delag, A., Strumillo, C., & Adamiec, J. (2002). Advanced experimental analysis of drying kinetics in spray drying. *Chemical Engineering Journal*, 86, 207-216.

- Zhang, B., Huang, Q., Luo, F. X., Fu, X., Jiang, H., & Jane, J. I. (2011). Effects of octenylsuccinylation on the structure and properties of high-amylose maize starch. *Carbohydrate Polymers*, 84, 1276–1281.
- Zhang, H., Hortal, M., Dobon, A., Bermudez, J.M., & Lara-Lledo, M. (2015). The effect of active packaging on minimizing food losses: Life cycle assessment (LCA) of essential oil component-enabled packaging for fresh beef. *Packaging Technology and Science*, 28, 761-774.
- Zhang, X., Zhang, Y. W., Zhang, H., Yanga, Q., Wang, H., & Zhanga, G. (2015). Preparation, characterization and antibacterial activity of octenyl succinic anhydride modified inulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 78, 79–86.
- Zhou, Z. X., Wei, D. F., Guan, Y., Zheng, A. N., & Zhong, J. J. (2010). Damage of *Escherichia coli* membrane by bactericidal agent polyhexamethylene guanidine hydrochloride: micrographic evidences. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 898–907.
- Zhu, W., Xie, H. L., Song, X. Y., & Ren, H. T. (2011). Production and Physicochemical Properties of 2-Octen-1-Ylsuccinic Derivatives from Waxy Corn Starch. *Journal of Food Science*, 76, 362-367.