



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**Unidad Iztapalapa**

Efecto de la mezcla de bacteriocina y extracto acuoso de semilla y cáscara de aguacate (*Persea americana*) en la estabilidad oxidante y microbiana en un sistema modelo de carne.

**T E S I S**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA**  
**P R E S E N T A:**

**M. EN C. MARIEL CALDERÓN OLIVER**

**DIRECTOR DE TESIS:**

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA.

**ASESORES:**

DR. HÉCTOR BERNARDO ESCALONA BUENDÍA

DRA. RUTH PEDROZA ISLAS

Ciudad de México, Julio del 2016

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrado de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466.

Agradecimiento al CONACYT por la beca de doctorado 230991.

Ciudad de México a 11 de Julio del 2016

El jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**Efecto de la mezcla de bacteriocina y extracto acuoso de semilla y cáscara de aguacate (*Persea americana*) en la estabilidad oxidante y microbiana en un sistema modelo de carne.**

Que presentó

**M. en C. Mariel Calderón Oliver**

**Comité Tutorial:**

Directora: Dra. Edith Ponce Alquicira

Asesores: Dr. Héctor B. Escalona Buendía

Dra. Ruth Pedroza Islas

**Jurado:**

Presidente:



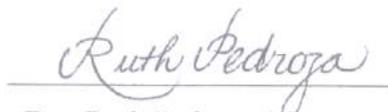
Dr. Fernando Rivera Cabrera

Secretario:



Dr. Héctor B. Escalona Buendía

Vocal:



Dra. Ruth Pedroza Islas

Vocal:



Dra. Angélica Román Guerrero

Esta tesis está dedicada a la mejor mamá del mundo, o sea mi mamá, y a mi hermano por ser en todo momento mi apoyo físico y emocional, por sus consejos, paciencia y amor que siempre me han brindado de manera incondicional, especial, y tan única, así como son ellos.

También está dedicada a una persona, que cuando lea estas líneas sabrá quién es, por haber compartido conmigo esta aventura del posgrado desde antes de su inicio, por haber sido de apoyo y de aprendizaje a lo largo de varios años, por su amistad y sus consejos. Por ser una persona de orgullo, maravillosa amistad, responsable.

Quisiera agradecer a la Dra. Edith Ponce por dejarme formar parte de su equipo de trabajo. Por confiar en mí y por cumplir el objetivo por el cual yo empecé un doctorado, el de aprender. Me llevo de aprendizaje mucho más de lo que esperaba y de lo que se puede reflejar en esta tesis. Aprendí muchas cosas tanto a nivel profesional como personal.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Héctor Escalona, que además de ser mi asesor, siempre fue esa luz al final del túnel, por siempre hacerme reír, por ayudarme y por sacarme de mis momentos de estrés y sobretodo con su paciencia. Creo que le debo mucho, por todo su apoyo y por los momentos invaluable que me regaló a lo largo de mi estancia en la UAM. Además de que gracias a él aprendí de una manera fácil y sencilla, diseño de experimentos y análisis sensorial, materias a las que siempre les hui. ¡Mil gracias Dr!

A la Dra. Ruth Pedroza, por ser la autora intelectual de los microencapsulados, por adoptarme en la Ibero y darme consejos siempre que los necesité.

A la Dra. Angélica Román y al Dr. Fernando Rivera por leer esta larguísima tesis y por sus consejos en la corrección de la misma.

A mis amigos de toda la vida y a los amigos que conocí a lo largo de estos casi 5 años: Eduardo Molina, Jorge Ramírez, Roberto Reyes, Cinthya Gutierrez, Gaby Contreras, Lila Dominguez, Israel García, Iván Jasso, Javier Valdez, Ricardo García, Aurora Pintor, Leonor Zavaleta, Yenizey Álvarez.

A mis compañeros del laboratorio S-132 y del R-010, por su paciencia, por compartir conmigo experiencias de todo tipo, por los momentos de alegrías, de tristezas, de pensamientos científicos, estrés e incluso de enojos. De cada uno de ellos me llevo algo, tanto cosas positivas como negativas, por algo estuvieron en mi camino en esta etapa.

A Leticia Flores y a Juanita Pichardo por sus atenciones, apoyo, alegrías, palabras, consejos y momentos imborrables que me ofrecieron siempre que anduve en la dirección de CBS.

Mi mayor agradecimiento a las universidades que me apoyaron en el desarrollo de esta tesis: a la UNAM, a la Ibero y principalmente a la UAM Iztapalapa.

Finalmente, mi agradecimiento a Dios y a la vida, por cada una de las etapas que me ofrecieron y que viví durante el doctorado.

**RESUMEN**

La carne y los productos cárnicos por ser alimentos ricos en proteínas y lípidos son susceptibles a sufrir reacciones de descomposición microbiana y deterioro químico y son un medio de cultivo idóneo para el crecimiento de bacterias patógenas y de descomposición. Las reacciones de deterioro, como las de oxidación lipídica y proteica, ocurren por la interacción del alimento con el oxígeno y/o sus radicales y por la presencia de catalizadores metálicos como el hierro y la luz. El uso de antioxidantes y de antimicrobianos naturales representan una buena opción en la prevención y disminución de las reacciones de descomposición y de deterioro. Una buena fuente de antioxidantes y de antimicrobianos naturales provienen de los subproductos de las frutas y verduras, como las cáscaras y semillas, los cuales presentan bajo o nulo valor agregado a nivel industrial. En este estudio se desarrolló una estrategia que involucró el encapsulamiento de un extracto de cáscara de aguacate, como antioxidante, con la nisina, un antimicrobiano natural, mediante el método de coacervación compleja y se observó su efecto antimicrobiano, sensorial y oxidante al ser adicionados en carne molida de res.

Se realizó la extracción y caracterización antioxidante y antimicrobiana de los extractos acuosos de la cáscara y semilla de aguacate; se cuantificó el contenido de polifenoles totales, flavonoides, taninos, además se analizó la capacidad atrapadora o secuestradora ante diferentes radicales y especies reactivas de oxígeno, y se identificaron algunos de los compuestos presentes en los extractos. El extracto de cáscara de aguacate presentó la mayor capacidad antioxidante y la mayor capacidad secuestradora de radicales libres debido a su contenido de polifenoles como procianidinas, epicatequina y otros polifenoles no identificados. Los extractos no presentaron actividad antimicrobiana contra *Listeria innocua*, *Weissella viridescens*, *E. coli*, *Lactobacillus sakei* y *Leuconosctoc mesenteroides*.

Posteriormente, se evaluó el efecto de la mezcla de los dos extractos de los subproductos del aguacate y la nisina, en diferentes proporciones, mediante las técnicas de ORAC y de difusión de agar con *Listeria inocua*, con el fin de encontrar la proporción de los tres compuestos que maximizara las respuestas antioxidante y antimicrobiana. El extracto de cáscara fue el componente responsable de la capacidad antioxidante en una mezcla de nisina, extracto de semilla y de cáscara de aguacate. Los extractos de cáscara y de semilla

de aguacate, presentaron un efecto sinérgico con la nisina en la respuesta antimicrobiana. La mezcla de cáscara (60%) y de nisina (40%) maximizaron la respuesta antioxidante y antimicrobiana contra *Listeria innocua*.

La mezcla resultante de cáscara y nisina (60 y 40% respectivamente) se encapsuló mediante el método de coacervación compleja, en el que se evaluaron los siguientes factores: sistema de pared (alginato-colágeno y pectina-colágeno), incorporación del núcleo (en emulsión o sin ella) y método de secado (liofilización y secado por aspersion). En las microcápsulas resultantes se evaluaron la eficiencia de encapsulamiento, carga, tamaño de partícula, morfología final y rendimiento. Los factores de encapsulamiento que presentaron una mayor relevancia fueron el método de secado y la forma de incorporación del núcleo. Se obtuvo una mayor eficiencia de encapsulamiento en las microcápsulas elaboradas con secado por aspersion y el núcleo emulsionado mientras que la mayor eficiencia de carga se obtuvo con el núcleo no emulsionado en ambos métodos de secado. La morfología final de las microcápsulas depende del método de secado que se emplee, así como de la forma en que se incorpore el núcleo, siendo el núcleo emulsionado el que presentó un mayor tamaño de microcápsula.

Las microcápsulas obtenidas por el sistema de pectina-colágeno con el núcleo emulsificado (nisina y extracto de cáscara de aguacate en emulsión) y secadas por aspersion presentaron una mayor eficiencia de atrapamiento de los compuestos de interés. Estas microcápsulas se incorporaron a un sistema cárnico conformado por carne molida de res y se observó una disminución significativa en la velocidad de la oxidación de lípidos y proteínas, así como a la disminución en el conteo de mesófilos totales, bacterias lácticas y enterobacterias. También, en el sistema cárnico se realizó una evaluación sensorial con consumidores mediante la prueba discriminativa de A no A para determinar si hubo diferencias entre la carne molida sin la adición de microcápsulas o conservadores y la carne con microcápsulas. El resultado fue que los consumidores percibieron la diferencia entre las muestras, debido a las diferencias en la textura y a la retención de agua durante la cocción.

Las microcápsulas con el extracto de cáscara de aguacate y la nisina ofrecen una nueva opción en los conservadores naturales, y podrían ser una alternativa para reducir el uso de aditivos sintéticos en alimentos. Además de darle un uso a residuos-agroalimentarios.

**ABSTRACT**

Meat and meat products being foods rich in proteins and lipids, they are susceptible to microbial decomposition reactions and chemical deterioration, also are ideal culture medium for the growth of pathogenic and spoilage bacteria. Deterioration reactions, such as lipid and protein oxidation occurs by the interaction of food with oxygen and / or radicals and by the presence of metallic catalyts such as iron and light. The use of natural antioxidants and antimicrobials represent a good option in the prevention and reduction in the reactions of decomposition and deterioration. A good source of antioxidants and natural antimicrobial products come from fruits and vegetables, such as peels and seeds, which have low or no added value to industrial level. In this study a strategy involving encapsulation of an extract of avocado peel as antioxidant with nisin, a natural antimicrobial, by the method of complex coacervation and antimicrobial, sensory and oxidant effect was observed to be added in developed ground beef.

Extraction, antioxidant and antimicrobial characterization of aqueous extracts of peel and seed of avocado was studied; the total polyphenol content, flavonoids, tannins was determined, also the scavenging or sequestering capacity at different radicals and reactive oxygen species analyzed. Some of the compounds present in the extracts were identified. The avocado peel extract showed the highest antioxidant capacity and increased free radical scavenging ability due to its content of polyphenols such as procyanidins, epicatechin and other unidentified polyphenols. Both extracts showed no antimicrobial activity against *Listeria innocua*, *Weissella viridescens*, *E. coli*, *Lactobacillus mesenteroides sakei* and *Leuconostoc*.

Subsequently, the effect of mixing two extracts byproducts avocado and nisin, in different proportions, using techniques ORAC and agar diffusion against *Listeria innocua* was evaluated in order to find the proportion of the three compounds that maximizes the antioxidant and antimicrobial responses. The peel extract component was responsible for the antioxidant capacity of a mixture of nisin, seed extract and avocado peel. Extracts of peel and avocado seed, showed a synergistic effect with nisin in the antimicrobial response. The optimized mixture was peel extract (60%) and nisin (40%) which present the maximum of antioxidant and antimicrobial activities.

The resulting mixture of peel and nisin (60 and 40% respectively) was encapsulated by the method of complex coacervation, in which the following factors were evaluated: wall system (alginate-collagen and pectin-collagen), incorporation of core (in emulsion or not) and drying method (lyophilization and spray drying). In the resulting microcapsules encapsulation efficiency, loading, particle size, morphology and yield were evaluated. Factors that showed relevance in the encapsulation method were drying method and the core incorporation. Higher efficiency of encapsulation was obtained with the microcapsules prepared with spray drying and emulsified core. The final morphology of the microcapsules depends on the drying method employed, and the presence or not of an emulsion-core, the core being emulsified which presented a larger microcapsule.

The microcapsules obtained by the system pectin-collagen, emulsified core (nisin and avocado extract shell emulsion) and spray-dried had a higher entrapment efficiency of the compounds of interest. These microcapsules were added to a meat system comprised of ground beef. The presence of microcapsules decreased the oxidation of lipids and proteins as well as the total mesophilic, lactic bacteria and enterobacteria. On the other hand, in the sensory evaluation analysis of meat, a discriminative test A non-A was used with consumers, in order to find differences between ground beef without the addition of preservatives and microcapsules or microcapsule in meat. The result was that consumers perceived the difference between the samples due to differences in the texture and water retention during cooking.

The microcapsules with avocado peel extract and nisin, offer a new option on natural preservatives, and could be an alternative to reduce the use of synthetic additives in food.

## Contenido

RESUMEN.....	v
Índice de tablas.....	xiii
1. JUSTIFICACIÓN.....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	2
2.1 Definición de carne y su deterioro oxidante .....	2
2.2 Descomposición de la carne por microorganismos.....	2
2.3 Uso de antioxidantes como método de conservación de la carne .....	3
2.4 El aguacate ( <i>Persea americana</i> ) .....	3
2.4. El aguacate ( <i>Persea americana</i> ) como agente antioxidante y antimicrobiano .....	4
2.5 Bacteriocinas.....	6
2.5.1 Nisina .....	7
2.6 Microencapsulación .....	8
2.6.1 Coacervación compleja .....	10
2.6.1.1 Colágeno hidrolizado .....	11
2.6.1.2 Alginato.....	11
2.6.1.3 Pectina.....	11
2.7 Secado .....	12
2.8 Emulsión .....	13
2.9 Textura y análisis sensorial .....	14
3. HIPÓTESIS.....	16
4. OBJETIVO GENERAL .....	16
4. 1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	16
5. METODOLOGÍA .....	17
5.1 Esquema general de trabajo.....	17
5.2 Materiales y reactivos.....	17
5.3 Muestras de aguacate Hass y preparación de extractos.....	17
5.4 Caracterización de extractos.....	18
5.4.1 Determinación del color .....	18
5.4.2 Contenido de polifenoles totales .....	18
5.4.3 Contenido de flavonoides.....	19
5.4.4 Contenido de taninos .....	19

5.4.5	Capacidad antioxidante <i>in vitro</i> .....	19
5.4.6	Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC) .....	20
5.4.7	Poder antioxidante reductor de hierro (FRAP).....	21
5.4.8	Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a la ionización por electrospray y detector de masas (HPLC-ESI-TOF) .....	22
5.4.9	Actividad antimicrobiana .....	22
5.5	Optimización de la respuesta antioxidante y antimicrobiana mediante el diseño de mezclas “simplex lattice”.....	23
5.6	Preparación de microcápsulas .....	24
5.6.1	Soluciones formadoras de microcápsulas.....	24
5.6.2	Potencial zeta.....	24
5.6.3	Análisis turbidimétrico.....	24
5.6.4	Preparación de microcápsulas .....	25
5.6.4.1	Microcápsulas no emulsificadas.....	25
5.6.4.2	Microcápsulas emulsionadas.....	25
5.6.5	Proceso de secado de las microcápsulas.....	26
5.6.6	Caracterización fisicoquímica de las microcápsulas .....	26
5.6.6.1	Tamaño de partícula .....	26
5.6.6.2	Rendimiento de encapsulación (EY).....	26
5.6.6.3	Eficiencia de encapsulamiento y eficiencia de carga .....	26
5.6.6.4	Humedad residual y actividad acuosa (Aw).....	27
5.6.6.5	Liberación en agua .....	27
5.6.6.6	Morfología microscópica de los coacervados .....	28
5.7	Incorporación de las microcápsulas en carne molida .....	28
5.7.1	Preparación de las muestras de carne.....	28
5.7.2	pH.....	29
5.7.3	Aw .....	30
5.7.4	Estabilidad oxidante .....	30
5.7.4.1	Oxidación lipídica (TBARS).....	30
5.7.4.2	Oxidación proteica .....	30
5.7.5	Estabilidad microbiológica.....	31
5.7.6	Análisis sensorial.....	31
5.7.6.1	Evaluación con jueces no entrenados. Prueba “A no A” modificada.....	31
5.7.6.2	Análisis de textura, color y pérdida de agua por cocción.....	32

5.8	Análisis estadístico.....	32
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
6.1	Caracterización fisicoquímica de extractos y su interacción con la nisina.....	34
6.1.1	Características de las muestras de aguacate y de sus respectivos extractos .....	34
6.1.2	Composición y capacidad antioxidante.....	35
6.1.3	Actividad antimicrobiana .....	38
6.1.4	Efecto de las combinaciones de nisina y de los extractos de aguacate en la actividad antioxidante y antimicrobiana .....	39
6.1.5	Optimización de la interacción de los extractos de aguacate con nisina .....	41
6.2	Caracterización de las microcápsulas.....	43
6.2.1	Efecto del pH y la proporción proteína-polisacárido .....	43
6.2.2	Efecto de los métodos de incorporación del núcleo en los coacervados .....	45
6.2.3	Eficiencia de encapsulamiento, carga, rendimiento, humedad, liberación y Aw.....	47
6.2.4	Morfología de coacervados .....	52
6.3	Incorporación de microcápsulas en un sistema cárnico. ....	55
6.3.1	Estabilidad fisicoquímica y microbiológica.....	55
6.3.2	Análisis sensorial. Prueba “A no A” modificada para índice R.....	58
6.3.3	Propiedades de textura, color y pérdida de agua por cocción de las muestras de carne cocida .....	60
7.	CONCLUSIONES .....	62
8.	PERSPECTIVAS .....	62
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	63
10.	ANEXO 1. Resultados del análisis fisicoquímico y microbiológico de carne durante 10 días de almacenamiento a 4°C .....	70
11.	ANEXO 2. ANOVAS Y GRÁFICOS DE MEDIAS DE LA ETAPA 3. ....	72

## Índice de tablas

Tabla 5.1. Condiciones experimentales del diseño de mezcla y sus variables respuesta. ....	24
Tabla 5.2. Tratamientos en carne. ....	29
Tabla 6.1. Características físicas de las muestras de aguacate. ....	34
Tabla 6.2. Color, contenido de taninos, polifenoles totales y flavonoides; capacidad antioxidante y atrapadora de radicales libres en extractos de semilla y cáscara de aguacate ( <i>Persea americana</i> )... 35	
Tabla 6.3. Perfil polifenólico e identificación tentativa de compuestos encontrados en el extracto acuoso de la cáscara y semilla de aguacate en modo negativo, mediante HPLC-ESI-TOF.....	38
Tabla 6.4. Coeficientes estimados de la regresión para las variables respuesta. ....	39
Tabla 6.5. Eficiencia de encapsulamiento, rendimiento, carga, humedad, Aw y liberación de los diferentes sistemas de microcápsulas. ....	48
Tabla 6.6. Significancias (valores <i>p</i> ) de los factores para cada una de las variables respuesta.....	49
Tabla 6.7. Frecuencias de respuestas de la prueba sensorial.....	60
Tabla 6.8. Valores de índice R, $\chi^2$ y significancia para cada muestra de carne .....	60

**INDICE DE FIGURAS**

Figura 2.1. Razones para encapsular compuestos ..... 8

Figura 2.2. Tipos de microcápsulas y microesferas . ..... 9

Figura 2.3. Parámetros que influyen en la formación de coacervados ..... 10

Figura 2.4. Estructura del alginato ..... 11

Figura 2.5. Estructura del ácido galacturónico ..... 12

Figura 2.6. Gráfica típica del método de TPA ..... 15

Figura 5.1. Reacciones del ORAC.. ..... 21

Figura 5.2. Reacción de un antioxidante con el reactivo de FRAP..... 22

Figura 6.1. Cromatogramas pico base. 1a) Extracto de cáscara. 1b) Extracto de semilla..... 37

Figura 6.2. Respuesta antioxidante y antimicrobiana de la mezcla de nisina con extracto de cáscara y semilla de aguacate..... 42

Figura 6.3. Potencial zeta de biopolímeros. .... 43

Figura 6.4. Efecto del pH y de la proporción de colágeno-polisacárido ..... 45

Figura 6.5. Micrografías de contraste de fases..... 46

Figura 6.6. Gráfico de componentes principales..... 50

Figura 6.7. Micrografías de microscopía electrónica de los coacervados en polvo ..... 54

Figura 6.8. Gráficos de medias para los diferentes tratamientos y variables respuestas..... 56

Figura 6.9. Conteo de mesófilos, enterobacterias y BAL en carne molida, en función del tiempo. . 57

Figura 6.10. PCA de las muestras de carne..... 58

Figura 6.11. Frecuencia de consumo de carne en los consumidores de la prueba sensorial. .... 59

## 1. JUSTIFICACIÓN

El deterioro de los alimentos, específicamente de la carne y de los productos cárnicos, se debe principalmente a la oxidación de los lípidos y de las proteínas, así como a la contaminación microbiana durante su manipulación, procesamiento y almacenamiento. Estos factores alteran las propiedades sensoriales, físicas, químicas, nutricionales, estructurales y funcionales de los productos cárnicos lo que en consecuencia reduce la vida de anaquel del producto y sus posibilidades de venta, además de que su ingesta podría causar daños a la salud de los consumidores.

La adición de sustancias con capacidad antioxidante y antimicrobiana ha mostrado ser una estrategia efectiva para inhibir o disminuir el deterioro de los productos cárnicos y con ello evitar los consecuentes efectos indeseables en sus propiedades sensoriales que se traduciría en una disminución en las pérdidas económicas y materiales a nivel industrial ocasionadas por la descomposición de productos cárnicos durante su procesado y almacenamiento.

En lo últimos años ha aumentado la tendencia en el consumo de productos alimenticios más naturales y sanos reduciendo así la ingesta de conservadores y aditivos sintéticos. Es por ello que muchos estudios se están enfocando en la búsqueda de nuevos aditivos naturales con propiedades similares o mejores a los de los aditivos sintéticos y que a su vez mantengan la calidad, extiendan la vida de anaquel y no modifiquen las propiedades sensoriales del producto.

Una posible fuente de compuestos naturales con actividad antioxidante y antimicrobiana provendría de los desechos agroindustriales, como las cáscaras y las semillas, a los cuales por no dárseles un uso adicional o un reciclaje adecuado constituyen una fuente de contaminación.

Por lo anterior, la demanda de antioxidantes naturales en la industria de alimentos ha aumentado, y con la finalidad de aprovechar en su totalidad los desechos del sector agroindustrial es que en esta tesis se analizaron los efectos de una mezcla encapsulada de extractos provenientes de la semilla y de la cáscara del aguacate Hass (*Persea americana*) (como fuente antioxidante) y de la bacteriocina nisina (como fuente bacteriostática) en la estabilidad de un modelo cárnico.

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1 Definición de carne y su deterioro oxidante**

La carne se define como todas las porciones de un animal que han sido dictaminadas como inocuas y aptas para el consumo humano o se destinan para este fin (CAC/RCP58-2005). En México, la carne se define como la estructura muscular estriada esquelética, acompañada o no de tejido conectivo, hueso y grasa, además de fibras nerviosas, vasos linfáticos y sanguíneos proveniente de los animales para abasto que no ha sido sometida a procesos que modifiquen de modo irreversible sus características sensoriales y fisicoquímicas (NOM-194-SSA1-2004). Varios componentes de la carne (lípidos, fosfolípidos, triglicéridos, proteínas y pigmentos) son susceptibles a la descomposición por agentes ambientales como la luz, microorganismos y el oxígeno, entre otros factores (Falowo et al., 2014; Kubow, 1992; Simpson & Sofos, 2009). La oxidación de las macromoléculas es una de las principales causas de deterioro en la calidad de la carne y ocurre durante su procesamiento y/o almacenamiento causando la pérdida de calidad por el deterioro en su sabor y en su coloración, así como por la destrucción de nutrientes. También la formación de compuestos tóxicos resultantes del metabolismo de bacterias contaminantes y la presencia de compuestos como acetoínas, compuestos azufrados, aminas biogénicas, ácidos grasos volátiles y toxinas son causas de la disminución de la calidad en carne (Faustman et al., 2010; Lund et al., 2011; Nørrung et al., 2009). Un ejemplo del deterioro en la carne es la oxidación de la oximioglobina a metamioglobina (lo que produce la decoloración de la carne y afectación en su apariencia) y la oxidación de lípidos cuyos productos son los responsables del olor y sabor a rancidez. La oxidación de proteínas miofibrilares, como la actina y la miosina, causa la reducción de la funcionalidad de la carne alterando la textura y la capacidad de retención de agua entre otros parámetros. En el proceso de la oxidación de lípidos y de proteínas participan el oxígeno y algunos catalizadores metálicos, como el hierro y el cobre, que promueven la producción de especies reactivas de oxígeno mediante la reacción de Fenton (Richards, 2010).

### **2.2 Descomposición de la carne por microorganismos**

La carne y sus productos derivados sufren un deterioro por las condiciones oxidantes al cual se le suman los efectos ocasionados por compuestos formados por la presencia de microorganismos cuyas características dependen del medio ambiente en el que se

encuentren, así como del procesamiento, almacenamiento, temperatura, tipo de empaques y de las condiciones sanitarias (Nørrung et al., 2009). Los microorganismos presentes pueden ser patógenos (como *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia coli*, *Campilobacter* y *Clostridium*) y/o de descomposición (como *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Aeromonas*, *Brochothrix thermosphacta*) (Nørrung et al., 2009) y pueden ocasionar cambios físicos en la apariencia de la carne (color, sabor, olor, presencia de viscosidad, etc.) así como cambios químicos (oxidación de grasas y proteínas, producción de gas, proteólisis, producción de aminos biogénicas, producción de toxinas, etc.).

### **2.3 Uso de antioxidantes como método de conservación de la carne**

La oxidación en la carne y de sus productos durante el almacenamiento se evita mediante la eliminación del oxígeno y la luz, así como por la adición de ingredientes con actividad antioxidante, es decir, de sustancias que tengan la capacidad de atrapar especies reactivas de oxígeno y de interrumpir la reacción en cadena de la oxidación de las macromoléculas. El empleo de antioxidantes naturales como vitamina E, licopeno, carnosina, orégano, propóleos, extractos de plantas y de frutos inhibe la oxidación lipídica y proteica con lo que la vida de anaquel de la carne aumenta sin alterar sus propiedades sensoriales (Boon et al., 2008; Faustman et al., 2010; Hernández-Hernández et al., 2009; Lee et al., 2015; Sánchez-Escalante et al., 2011; Weiss et al., 2010). Lo anterior indica que los antioxidantes endógenos presentes en la carne como glutatión, piruvato y lactato y enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (Faustman et al., 2010; Hayes et al., 2009; Serpen et al., 2012) no son suficientes para evitar el deterioro oxidante al que la carne está expuesta durante su procesamiento, almacenamiento, distribución y venta.

### **2.4 El aguacate (*Persea americana*)**

El aguacate (*Persea americana*=*Persea gratissima*) es un árbol originario de México y de Guatemala, es miembro de la familia de las lauráceas, produce frutos comestibles que se conocen como aguacate, palta, cura, avocado, abacate, según el país donde se produce. La altura del árbol puede alcanzar los 20 m de altura, sus hojas son de color verde oscuro a pálido y sus flores, de color crema-verdusco, se encuentran en la unión de la hoja con el tallo. Solamente el 0.1% de las flores se transforma en fruto el cual es una baya en forma de pera, de superficie lisa o rugosa, de piel fina o gruesa y cuyo color varía de verde oscuro a

negro dependiendo de la variedad y del grado de madurez. Los frutos varían en peso de 150 g a 350 g y tienen un tamaño de 7 a 20 cm de largo y un diámetro de 6 cm. El fruto contiene una semilla oval que mide de 5 a 6.4 cm de largo (SAGARPA, 2016).

El aguacate como fruto se utiliza en la alimentación diaria y como complemento de comidas y ensaladas en países como México, Chile, Perú, Venezuela entre otros. Siendo un alimento muy nutritivo por su contenido de vitaminas, minerales y grasas (Dreher & Davenport, 2013). Por su composición grasa el aguacate se utiliza en la industria cosmética y farmacéutica para la elaboración de lociones, aceites, jabones, cremas y champús para el cabello.

México es el principal productor de aguacate en el mundo, seguido por Chile, Estados Unidos, Indonesia, República Dominicana, Colombia y Perú (FAO, 2011). En el 2009, México fue el principal exportador de aguacate en el mundo, seguido por Chile, Países Bajos, España, Perú, Israel, Estados Unidos y Nueva Zelanda (FAO, 2011).

En el año 2014, México tuvo una producción anual de aguacate de 1,520,694.50 toneladas, de los cuales 35,155.37 corresponden al aguacate Criollo; 10,099.59 de aguacate Fuerte; y 1,475,408.29 de la variedad Hass (SIAP-SAGARPA, 2014). Los principales estados productores de aguacate del país son Michoacán, Estado de México, Nayarit, Guerrero y Morelos, los cuales participan con un 95% de la producción total del país. Los estados de Jalisco, Oaxaca, Veracruz, Yucatán, Puebla y Chiapas son productores minoritarios de este producto (SAGARPA, 2016).

#### **2.4.1 El aguacate (*Persea americana*) como agente antioxidante y antimicrobiano**

El aguacate es un fruto que contiene ácidos grasos insaturados, vitaminas B1, B2, D y E, fibra, minerales como calcio, hierro, potasio, magnesio, sodio y otros nutrientes que le confieren diversos efectos benéficos en la salud (Dembitsky et al., 2011). Dentro estos efectos se encuentra un beneficio contra el cáncer al inducir apoptosis e inhibir el crecimiento de células cancerígenas (Ding et al., 2007); además por su contenido de carotenoides disminuye los efectos secundarios en enfermedades cardiovasculares. El aguacate disminuye el daño en hígado inducido en ratas por D-galactosamina por su alto contenido en ácidos grasos (Kawagishi et al., 2001). La mayoría de los estudios que

muestran efectos benéficos de este fruto, están basados en el consumo o administración de extractos provenientes de la parte comestible del aguacate y son pocos los estudios en los que se analiza el contenido de nutrientes o compuestos antioxidantes de la semilla y de la cáscara del aguacate; los cuales se consideran desechos subutilizados.

Las semillas de varias frutas como el mango y el tamarindo, entre otras, presentan mayor capacidad y contenido antioxidante en comparación con las partes comestibles (Soong & Barlow, 2004). También en el aguacate se presenta esta situación pues la semilla presenta 50 veces más actividad antioxidante que la parte comestible y tiene 68 veces más contenido de polifenoles (Soong & Barlow, 2004). Las diferentes variedades de aguacate como Hass, Fuerte y otras especies de aguacate cultivados en Florida también presentan un mayor contenido de polifenoles (epicatequina, catequina A y B), flavonoides (luteolina), ácidos hidroxycinámicos (ácido cafeico) y clorofilas en la semilla en comparación con la cáscara y la pulpa; este contenido se correlaciona con una mayor capacidad antioxidante (Rodríguez-Carpena et al., 2011; Wang et al., 2010) (Fu et al., 2011; Wang et al., 2010).

Los extractos de la semilla y la cáscara de aguacate empleados como fuentes antioxidantes en carne cruda para hamburguesas, previenen la lipoperoxidación y la formación de proteínas carboniladas, así como la pérdida de color y luminosidad cuando las muestras son almacenadas por 15 días en refrigeración (Rodríguez-Carpena, Morcuende, & Estévez, 2011), por lo que su empleo en alimentos debe ser más explorado y estudiado.

Existen pocos reportes acerca de la pulpa, la semilla y la cáscara del aguacate en cuanto a la actividad antimicrobiana. Los extractos de la cáscara y de la semilla inhiben de manera significativa el crecimiento de bacterias Gram positivas como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, de bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* (Rodríguez-Carpena et al., 2011) y de levaduras de importancia médica en humanos como *Candida spp.*, *Cryptococcus Neoformans* and *Malassezia Pachydermatis* (Leite et al., 2009).

Así entonces, debido a las propiedades antioxidantes y antimicrobianas que presentan los extractos de del aguacate, se propone que los extractos de sus semillas podrían aplicarse en

la industria cárnica para disminuir algunos problemas de deterioro en los productos relacionados a ella.

## 2.5 Bacteriocinas

El uso de bacteriocinas es una estrategia para la conservación de la carne y de productos cárnicos. Estas moléculas son proteínas biológicamente activas que presentan toxicidad sobre otras bacterias generalmente relacionadas filogenéticamente con el organismo productor, específicamente bacterias Gram positivas (Moll et al., 1999) aunque algunas bacteriocinas como las producidas por el género *Bacillus* pueden tener efecto sobre bacterias Gram negativas, levaduras y hongos (Abriouel et al., 2011). Los géneros de bacterias que producen bacteriocinas son principalmente bacterias lácticas como *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Enterococcus* (McMullen & Stiles, 1996).

Las bacteriocinas son pequeñas proteínas catiónicas (de 30-60 residuos de aminoácidos) con un punto isoeléctrico alto y con propiedades anfipáticas y de acuerdo a sus características se han dividido en diferentes clases (Moll et al., 1999; Snyder & Worobo, 2014):

- Clase I. Lantibióticos que contiene aminoácidos inusuales como lantionina y metillantionina.
- Clase II. Bacteriocinas termoestables (péptidos simples con actividad frente a *Listeria*), que requieren de dos péptidos para ser activas, bacteriocinas que necesitan grupos tioles activos.
- Clase III. Bacteriocinas termosensibles y de alto peso molecular (>30 kDa).
- Clase IV. Bacteriocinas complejas que contienen lípidos y carbohidratos en regiones esenciales para su actividad.

El mecanismo antibacteriano de las bacteriocinas ocurre cuando se unen a la membrana celular y se forma un poro que induce la salida de iones potasio lo que ocasiona un cambio en el potencial de membrana, un aumento en la hidrólisis de ATP y luego muerte celular

por la deficiencia de ATP y por el cambio en el potencial de la membrana (McAuliffe et al., 2001; Moll et al., 1999).

Diversas bacteriocinas se emplean en la elaboración o procesamiento de varios tipos de alimentos como vegetales y lácteos, así como en la carne y en productos cárnicos. Ejemplo de ello es el uso de la pediocina (bacteriocina producida por *Pediococcus*) como control efectivo contra *Listeria monocytogenes* en la carne de vacuno, salchichas, extractos de carne, productos cárnicos y como aditivo en la formulación de películas y recubrimientos comestibles para productos cárnicos (Burke et al., 2013; Irkin & Esmer, 2015; Quintero-Salazar et al., 2005).

### 2.5.1 Nisina

La nisina es una bacteriocina producida por bacterias del género *Lactococcus lactis* y está compuesta por 34 aminoácidos, entre ellos hay aminoácidos inusuales, una lantionina, cuatro metil-lantioninas, dehidroalanina y dehidrobutirina (De Vos et al., 1995) por lo que pertenece a las bacteriocinas de la clase I. Existen dos variantes de nisina, la A y la Z, las cuales difieren en el aminoácido que se presenta en la posición 27, la histidina para la nisina A y la asparagina en la nisina Z (Mulders et al., 1991). Por lo anterior, la nisina Z presenta mayor solubilidad y difusión en comparación con la nisina A (De Vos et al., 1993). Esta bacteriocina es utilizada como conservador de alimentos lácteos como queso y leche fermentada (Gálvez et al., 2008; Laridi et al., 2003) así como en productos cárnicos almacenados en diversas condiciones y sometidos a diferentes procesamientos (Gálvez et al., 2008). La nisina es la única bacteriocina reconocida por la Food and Drug Administration (FDA) en la categoría GRAS (generally recognized as safe). Se ha observado que la nisina tiene un efecto inhibitorio en bacterias como *Clostridium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus* y *Brochothrix thermosphacta* (Gálvez et al., 2008). La inmovilización en geles o en películas, la formación de liposomas y la encapsulación de las bacteriocinas ofrecen una mayor eficacia en su efecto bacteriostático ya que la bacteriocina no es inhibida o inactivada por los componentes del alimento (Bali et al., 2014; Malheiros et al., 2012).

## 2.6 Microencapsulación

La microencapsulación es definida como el proceso en el cual pequeñas partículas o gotas de un compuesto o sustancia son rodeadas por un revestimiento o incrustados en una matriz homogénea o heterogénea para obtener pequeñas cápsulas con varias propiedades funcionales (Gharsallaoui et al., 2007). En otras palabras, es la formación de una barrera física entre un compuesto de interés y de otros compuestos de un producto. Para el caso de alimentos, la microencapsulación es una técnica en la que un solo material o varios como gotas de un líquido, partículas sólidas o compuestos gaseosos pueden ser embebidos o atrapados en una película de grado alimenticio que puede ser sencilla, doble o múltiple.

Las razones para emplear la microencapsulación son: (a) reducir la interacción del compuesto de interés con factores ambientales; (b) disminuir la velocidad de transferencia del compuesto a su entorno; (c) promover un manejo más fácil; (d) controlar la salida del compuesto; (e) enmascarar su sabor; (f) diluir fácilmente el compuesto de interés cuando se utilicen cantidades pequeñas de éste (Shahidi & Han, 1993) (Figura 2.1).

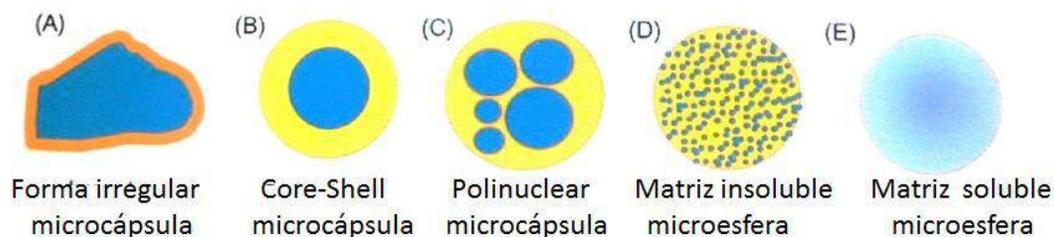


**Figura 2.1. Razones para encapsular compuestos (Buchi, 2014).**

La forma más simple de una microcápsula es una esfera pequeña con una pared uniforme y el material contenido puede ser una emulsión, una suspensión de sólidos, una suspensión de pequeñas microcápsulas o un material cristalino. Es común que se microencapsulen ingredientes con actividad biológica como enzimas, bacterias, vitaminas, minerales,

aditivos, saborizantes y especias (Zuidam & Shimoni, 2010) mientras que la pared o recubrimiento de la microcápsula puede ser de una sola capa o de capas múltiples y se emplean diversos materiales como proteínas, gomas, almidones y maltodextrinas (Gouin, 2004).

La morfología final de las microcápsulas varía en función a su tamaño, el cual puede ir de micrómetros a milímetros lo cual depende de los materiales y del método que se emplee para su fabricación (Figura 2.2). También se pueden formar microesferas en las que no existe una pared que recubra al núcleo, sino que el núcleo y el material encapsulante se encuentran repartidos tanto en la superficie como en el centro de la cápsula. Los métodos más empleados para la fabricación de microcápsulas y microesferas son el secado por aspersión, el secado por congelación, el recubrimiento por aspersión, la extrusión, atrapamiento en liposomas, la coacervación simple o compleja, la inclusión molecular y la polimerización interfacial, entre otros (Desai & Park, 2005; Vasisht, 2014b).



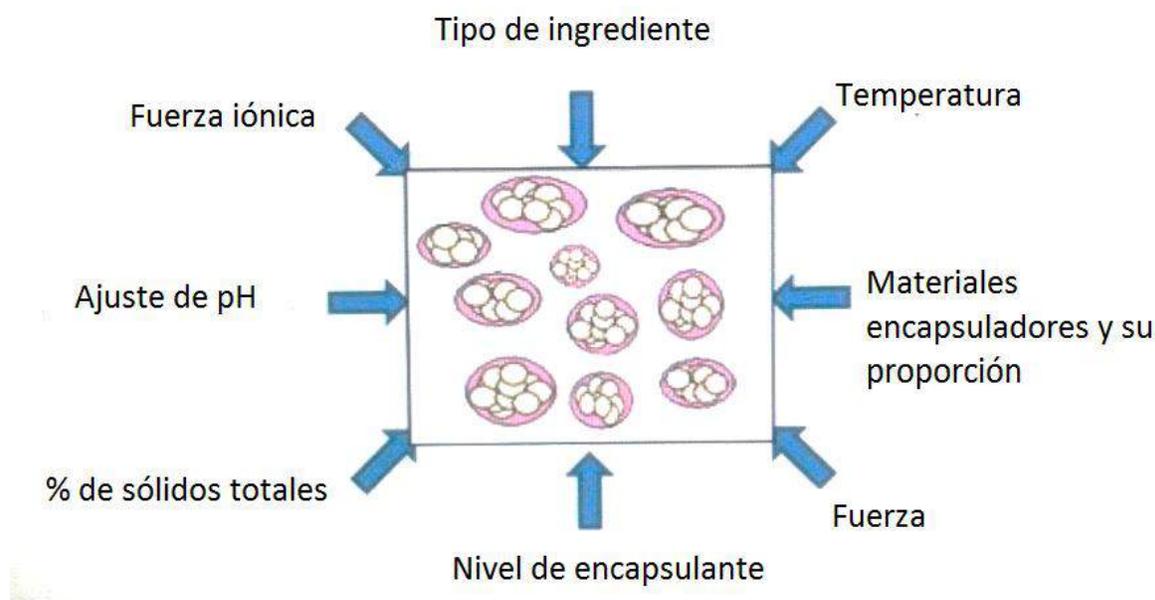
**Figura 2.2. Tipos de microcápsulas y microesferas (Vasisht, 2014a).**

Un aspecto importante en la microencapsulación es el tipo de material a emplear como recubrimiento ya que éste debe mostrar una alta eficiencia de atrapamiento durante el encapsulado y estabilidad. Por ello, para elegir un material de recubrimiento se deben considerar sus propiedades fisicoquímicas como solubilidad, peso molecular, difusibilidad, formación de película, propiedades emulsificantes, compatibilidad con el producto a encapsular y con el producto al que se va a adicionar, costo y tamaño apropiado de partícula.

### 2.6.1 Coacervación compleja

El uso de esta técnica se ha incrementado en los últimos años en la industria de alimentos para encapsular diferentes compuestos como saborizantes, edulcorantes, enzimas, vitaminas, pre y probióticos, antioxidantes, minerales ácidos grasos y otros (Comunian et al., 2013; Eratte et al., 2015; Mendanha et al., 2009; Rocha-Selmi et al., 2013).

El proceso de coacervación involucra uno o más hidrocoloides de carga opuesta (comúnmente un polisacárido y una proteína) que forman una matriz alrededor de un compuesto activo (núcleo) previamente suspendido o emulsificado en el mismo medio (Gouin, 2004; Koupantsis et al., 2014). Para llevar cabo la formación de coacervados se deben de tomar en cuenta parámetros como el pH, la fuerza iónica, la concentración y relación de ambos biopolímeros y la temperatura, entre otros (Schmitt et al., 2009) (Figura 2.3).



**Figura 2.3. Parámetros que influyen en la formación de coacervados (Yan & Zhang, 2014).**

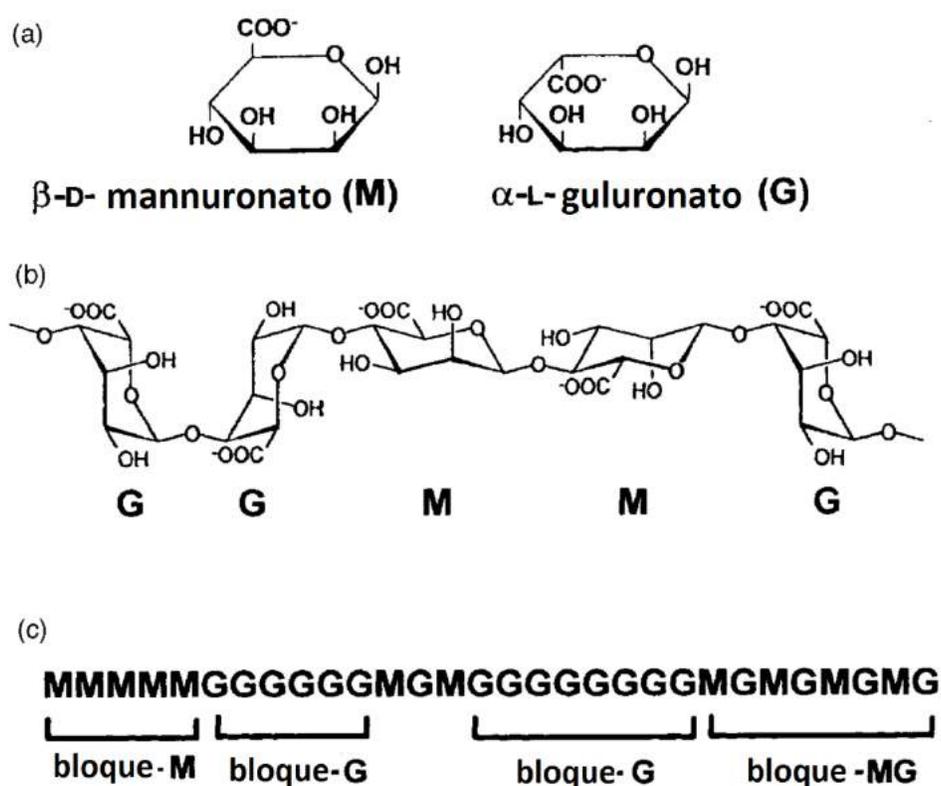
Algunos hidrocoloides empleados en esta técnica son la gelatina, proteínas de suero de leche, proteína de chícharo, lactoglobulinas, alginato, carragenina, pectina y goma arábica, entre otros. En este trabajo, se empleó como materiales encapsulantes al colágeno hidrolizado, alginato y pectina.

### 2.6.1.1 Colágeno hidrolizado

El colágeno es una proteína fibrosa, proveniente de huesos, piel y cartílago. El colágeno hidrolizado consiste en péptidos del colágeno tipo I y está compuesto por un 97% de proteína pura, además de contener los aminoácidos característicos del colágeno como la glicina, prolina e hidroxiprolina.

### 2.6.1.2 Alginato

El alginato es un polisacárido obtenido de las algas cafés (*Laminaria*, *Ascophyllum*, *Lessonia*, *Durvillea* y *Macrocystis*) a través de intercambio iónico, filtración y precipitación (Pegg, 2012). El alginato está compuesto por cadenas de ácido D-manurónico y ácido L-gulurónico (Xiao et al., 2014) las cuales se encuentran formando bloques alternados (Figura 2.4).



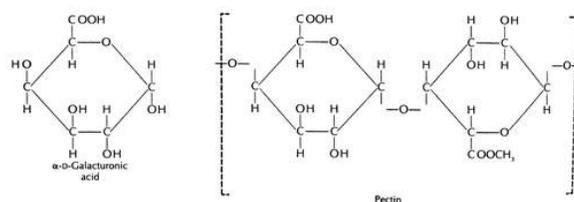
**Figura 2.4. Estructura del alginato:** a) Monómeros del alginato. b) Conformación de silla. c) Distribución de bloques (Draget, 2009).

### 2.6.1.3 Pectina

La pectina es un heteropolisacárido extraído de las células y de la pared celular de las plantas y frutas. Está compuesto en un 65% por unidades de ácido D-galacturónico (Espitia

et al., 2014) y el grupo ácido de las unidades de galacturónico se puede encontrar libre o esterificado con metanol. Esta pectina puede contener azúcares como la ramnosa y galactosa (Figura 2.5).

Por el grado de esterificación que presentan las pectinas se dividen en pectinas de bajo metoxilo y alto metoxilo. Las primeras contienen un 50% o menos de grupos ácidos esterificados, lo que las hace muy reactivas frente a iones de calcio y necesitan condiciones especiales de pH y del contenido de sólidos totales para gelificar. Su funcionalidad no depende del pH y la temperatura mientras que las segundas, las de alto metoxilo, tienen un grado de metilación mayor al 50% de los grupos ácidos. Su funcionalidad depende del pH y del contenido de sólidos totales (Endreß & Christensen, 2009).



**Figura 2.5. Estructura del ácido galacturónico (Vaclavik & Christian, 2014).**

En el proceso de microencapsulación participan otros factores que ayudan a la estabilidad y al alargamiento de la vida útil de las microcápsulas formadas. Algunos de estos factores son la incorporación del núcleo o de las sustancias activas por medio de una emulsión para cambiar la polaridad y su solubilidad y también la reducción del contenido de agua mediante métodos de secado, como el secado por aspersión y la liofilización.

## 2.7 Secado

Esta operación unitaria disminuye el contenido de agua y la actividad acuosa, evitando el riesgo de la degradación de un alimento o de sus ingredientes, ya sea por microorganismos u otros factores. Además de reducir los costos de transporte y de almacenamiento, y en algunos casos se obtienen productos con propiedades específicas como una mayor solubilidad (Gharsallaoui et al., 2007).

Existen varios métodos de secado entre los que se encuentra el secado por aspersión y la liofilización. El secado por aspersión es una operación unitaria en la cual un producto

líquido (emulsión, suspensión o solución) es atomizado mediante atomizadores neumáticos o boquillas presurizadas, el cual entra en contacto con una corriente de aire caliente (aire o un gas inerte como nitrógeno), lo que permite la evaporación de agua o de líquido, para posteriormente obtener un polvo (Gharsallaoui et al., 2007). Dependiendo del tamaño de la atomización, del tipo de material y de las condiciones de operaciones durante el proceso de secado por aspersión se pueden obtener un polvo fino (10-50  $\mu\text{m}$ ) hasta partículas grandes (2-3 mm). Mientras que la liofilización es un proceso en el cual se extrae el agua de un producto mediante el proceso de sublimación (cambio de fase de sólido a gaseoso, sin pasar por el líquido). Esta técnica se emplea para secar compuestos que son sensibles al calor.

## **2.8 Emulsión**

La formación de emulsiones es importante para poder incluir el núcleo o el material a encapsular en diversos métodos de encapsulación; esto es necesario cuando el material a encapsular tiene una polaridad o solubilidad similar al del material que conformará la pared.

Una emulsión es una mezcla de líquidos inmiscibles de manera homogénea; es decir es la suspensión de una fase en otra, en la cual no es miscible (Charcosset, 2009). Un líquido (gotas) es dispersado en otro líquido, siendo el primero la fase dispersa y el segundo la fase continua.

Las emulsiones en los alimentos son muy comunes, ejemplo de ello, son las emulsiones aceite/agua, es decir gotas de aceite suspendidas en agua como fase continua. Ejemplos de este tipo de emulsiones son la mayonesa, cremas, helados, salchichas. Como otro ejemplo de emulsiones comunes en alimentos, son las emulsiones agua/aceite, en las cuales el agua es la fase dispersa y el aceite es la fase continua; como ejemplo de este tipo de emulsiones se puede mencionar las mantequillas y las margarinas.

En medio de estas dos fases es necesaria la presencia de un surfactante, también llamado emulgente o emulsificante, el cual disminuye la tensión superficial en la superficie de contacto entre las dos fases y mantiene estable la emulsión (Charcosset, 2009; Dalgleish, 2006).

Las emulsiones juegan un papel importante en la formulación de los alimentos, ya que algunos productos finales son por sí mismos emulsiones, como los sustitutos de leche para

café, cremas ácidas, etcétera; o las emulsiones pueden formar parte de los ingredientes de un alimento más complejo, como la microencapsulación de aceites esenciales, vitaminas en liposomas, entre otros (Charcosset, 2009).

Existen otro tipo de emulsiones llamadas emulsiones múltiples o emulsión doble o emulsión de emulsión, ya que una emulsión primaria se dispersa en una segunda fase continua. Ejemplo de ello son las gotas de agua en gotas de aceite en agua o las gotas de aceite en gotas de agua en aceite. Este tipo de emulsiones son empleadas para contener ingredientes susceptibles a la oxidación (Dalglish, 2006).

## **2.9 Textura y análisis sensorial**

Para los consumidores, la apariencia y el color de un alimento influyen mucho sobre la decisión de compra y en la calidad (Lawless & Heymann, 2010a). Dentro del concepto de apariencia se incluye a la textura. La textura es una manifestación sensorial y funcional de las propiedades estructurales, mecánicas y de superficie de los alimentos, detectada a través de los sentidos de olor, visión, audición, tacto y quinesésico (Szczesniak, 2002). Debido a la importancia de esta propiedad, se han implementado varias técnicas y métodos de su evaluación, tanto instrumentales como evaluaciones sensoriales con jueces entrenados y consumidores.

En las técnicas instrumentales, se ha empleado el uso del texturómetro y la técnica del análisis de perfil de textura o TPA por sus siglas en inglés (texture profile analysis). Ésta medición es una doble compresión (Figura 2.6) que asemeja a dos veces la masticación, obteniendo los parámetros, de dureza, adhesividad, cohesividad, elasticidad, masticabilidad y gomosidad (Lu, 2013).

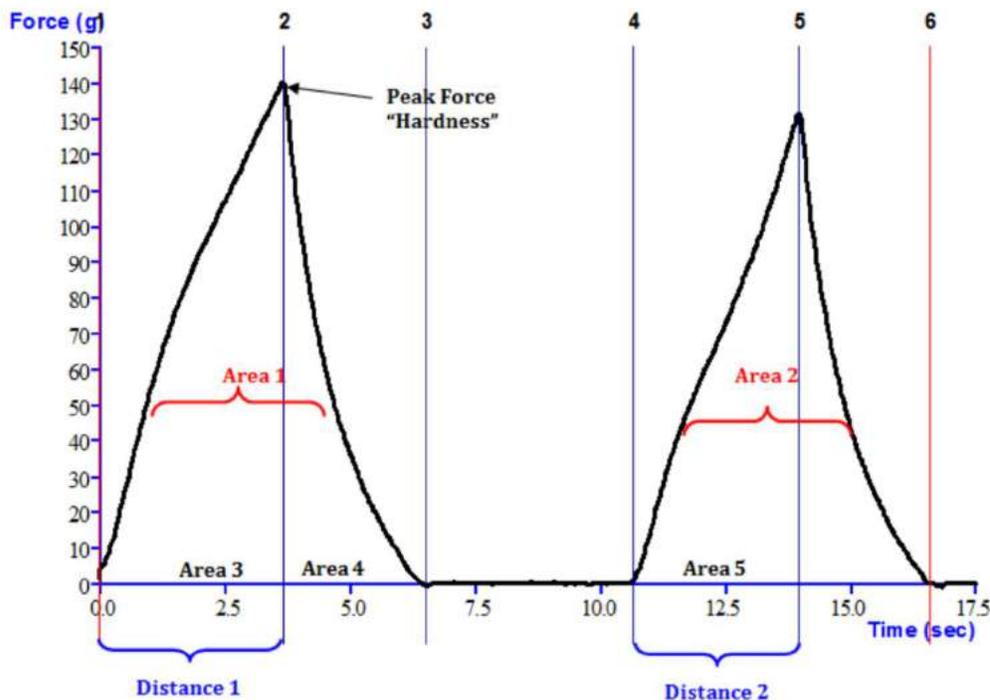
\*Dureza: Es la máxima fuerza de compresión del primer pico. Su significado es, la fuerza necesaria para comprimir la comida entre los molares.

\*Cohesividad: Es el área de trabajo de la segunda compresión dividido entre el área de trabajo de la primera compresión. Y significa que tanto soporta el producto una segunda deformación relativa a la primera deformación.

\*Elasticidad: Es el resultado de dividir la altura alcanzada en la segunda compresión entre la altura de la primera compresión. Y significa la capacidad que presenta el alimento en regresar a su forma original después de ser sometido a una compresión.

\*Gomosidad (semisólidos) y la masticabilidad (sólido): Es el resultado de multiplicar la dureza por la cohesividad. Y es la energía necesaria para masticar un alimento y poder deglutirlo.

\*Adhesividad: Es el trabajo necesario para superar las fuerzas existentes entre la superficie del alimento y de otros materiales en los que esté en contacto el alimento (lengua, dientes, paladar, etc).



**Figura 2.6.** Gráfica típica del método de TPA (Tomada de Texturetechnologies.com)

Además del análisis TPA, existen pruebas sensoriales con consumidores y con jueces entrenados, que permiten conocer los atributos y características sensoriales del producto o encontrar las diferencias entre un producto reformulado o nuevo. Las pruebas que permiten determinar si dos muestras se perciben diferente se les llaman discriminativas (Lawless & Heymann, 2010b). Dentro de estas pruebas se encuentra la de “A no A”; la cual es una prueba que permite determinar si existe una diferencia sensorial entre dos productos.

### **3. HIPÓTESIS**

La aplicación de microcápsulas que contengan la mezcla de un antioxidante y un antimicrobiano mejorará la estabilidad oxidante, microbiana y sensorial de carne molida de res.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

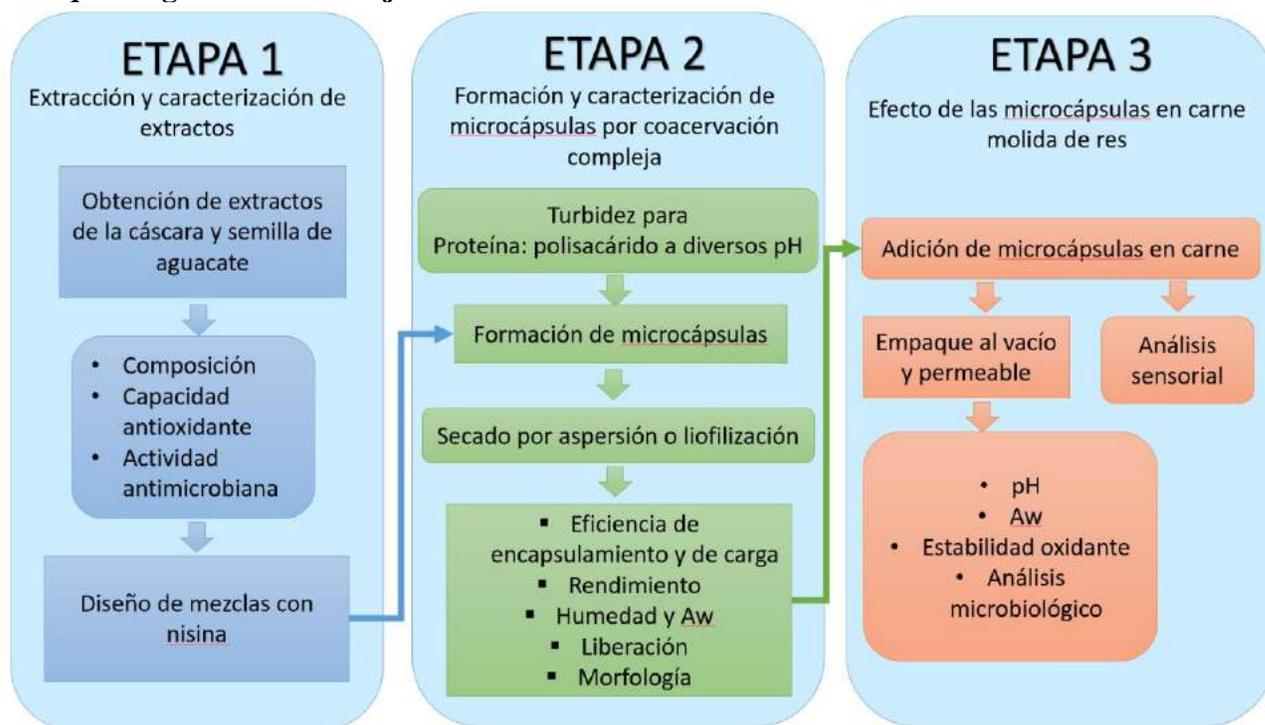
Determinar la estabilidad oxidante, microbiana y sensorial de un producto cárnico al aplicar una mezcla microencapsulada de un extracto de semilla y/o cáscara de aguacate y nisina.

#### **4.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

- ❖ Obtener y caracterizar el extracto acuoso de la semilla y cáscara de aguacate Hass.
- ❖ Evaluar la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos de aguacate.
- ❖ Diseñar, desarrollar y obtener la combinación de extractos de aguacate y de nisina, en la que se maximicen las capacidades antioxidante y antimicrobiana.
- ❖ Desarrollar y caracterizar las microcápsulas incorporando la mezcla de bacteriocina-extracto de subproductos de aguacate.
- ❖ Determinar la estabilidad de microcápsulas elaboradas con dos mezclas binarias de biopolímeros, dos formas de incorporación de material a encapsular y dos métodos de secado.
- ❖ Evaluar el efecto y las características de un sistema cárnico después de la incorporación de las microcápsulas conteniendo nisina y extracto de subproductos de aguacate.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Esquema general de trabajo



### 5.2 Materiales y reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron de Sigma-Aldrich Co. (San Luis, Misuri, EUA): Nisina (2.5% p/p balanceado con cloruro de sodio y sólidos desnaturalizados de leche, 10<sup>6</sup> IU/g), dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) (AAPH), ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), reactivo de Folin-Ciocalteu, ácido gálico, quercetina, 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), membranas de diálisis de celulosa 2000 NMWCO, cloruro de hierro (III). Colágeno hidrolizado (Peptan 5000) se compró con Rousselot (EUA). El alginato de sodio se adquirió con Danisco-Dupont (Copenhagen, Dinamarca). La pectina cítrica de bajo metoxilo y parcialmente amidada se adquirió con CP Kelco (Georgia, EUA).

### 5.3 Muestras de aguacate Hass y preparación de extractos

Los aguacates (*Persea americana*, variedad Hass) se compraron en la Central de Abastos de la Ciudad de México y se mantuvieron en temperatura ambiente (alrededor de 20°C) hasta que alcanzaran el estado idóneo de madurez para su consumo, a través de la textura

manual del fruto. Una vez maduros, la cáscara, la semilla y la pulpa se separaron de forma manual y posteriormente cada una de las partes se pesó. La cáscara y la semilla (cada una por separado) se molieron en una licuadora y se secaron a 40°C por 24 horas en un horno (Felisa FE-291, Fabricantes Feligneo SA de CV, México). Se determinó la humedad de cada una de las partes por diferencia de peso. De la cáscara o de la semilla se tomaron 50 gramos y se colocaron en 500 mL de agua destilada hirviendo. Esta mezcla se continuó hirviendo por 30 minutos más y se mantuvo con agitación magnética continua (Xu et al., 2008). El extracto resultante se filtró con papel filtro (Whatman No. 4) y el filtrado se congeló y luego se liofilizó a 5 mmHg y a -50°C (Freezone 2.5; Labconco Corp. Kansas, Misuri, EUA). El extracto resultante se guardó en congelación a -20 °C. Para las determinaciones de caracterización del extracto como color, capacidad antioxidante y composición, los extractos se disolvieron en agua destilada a una concentración de 50 mg/mL, el mismo día del ensayo.

## **5.4 Caracterización de extractos**

### **5.4.1 Determinación del color**

El color de la cáscara, semilla y pulpa del aguacate, así como de los extractos liofilizados, se determinaron empleando un colorímetro (ColorFlex EZ spectrophotometer 45°/0°; HunterLab, Reston, Virginia, EUA) fijando a 10° el ángulo del observador y D65 la fuente de luz. Se determinaron los parámetros de color en la escala CIELAB: L\*, a\* y b\* (luminosidad, verde-rojo, azul-amarillo).

### **5.4.2 Contenido de polifenoles totales**

El contenido de polifenoles en los extractos se determinó mediante el método de fenólico de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965) con algunas modificaciones. Este método se basa en la oxidación en medio básico de los grupos hidroxilo de los fenoles por el reactivo de Folin-Ciocalteu (sales del ácido molibdotungstosfosfórico). Para ello, 200 µL de extracto se mezclaron con 1 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1 N) y 0.8 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7.5%. La mezcla anterior se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. La absorbancia se determinó a 760 nm empleando un espectrofluorómetro Synergy HT (Biotek Instruments Inc., Vermont, EUA). Los resultados se expresaron como mg de equivalentes

de ácido gálico (GAE) por gramo de extracto (peso húmedo). La curva de GAE se realizó en un intervalo de 0.2-1 mg/mL.

#### 5.4.3 Contenido de flavonoides

Este parámetro se determinó mediante un ensayo colorimétrico en el que un compuesto flavonoide forma un complejo colorido (rosa) al unirse con el aluminio en medio alcalino (Zhishen et al., 1999). Se mezclaron 0.035 mL de extracto con 0.0105 mL de agua y 0.0105 mL de  $\text{NaNO}_2$  al 5%, 0.0105 mL de  $\text{AlCl}_3$  al 10% y 0.140 mL de  $\text{NaOH}$  0.5 M. La mezcla se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad (Zhishen et al., 1999) y se determinó la absorbancia a 510 nm en un espectrofluorómetro Synergy HT. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de quercetina por gramo de extracto (peso húmedo). La curva de quercetina se realizó en un intervalo de 0.006-0.03 mg/mL.

#### 5.4.4 Contenido de taninos

Esta cuantificación se determinó de acuerdo a la técnica descrita por (Makkar et al., 1993). Se mezclaron 0.2 mL de extracto con 20 mg de polivinilpolipirrolidona insoluble. Después de 15 minutos de incubación a  $4^\circ\text{C}$ , las muestras se centrifugaron a  $15,000 \times g$  por 10 minutos. Posteriormente, 0.05 mL de sobrenadante se usaron para determinar el contenido de taninos por medio de la misma técnica del contenido de polifenoles totales. La diferencia entre el contenido de polifenoles totales y los polifenoles absorbidos corresponden al contenido de taninos en la muestra. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de GAE por gramo de extracto (peso húmedo).

#### 5.4.5 Capacidad antioxidante *in vitro*

Los ensayos de capacidad antioxidante incluyeron al anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxilo ( $\text{OH}^{\cdot}$ ), oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ), peroxinitrito ( $\text{ONOO}^{\cdot}$ ), y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), los cuales se determinaron en las metodologías descritas por (Gaona-Gaona et al., 2011).

La reacción de xantina-xantina oxidasa se empleó como sistema generador de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . La actividad de la xantina oxidasa se determinó mediante la producción de ácido úrico a 295 nm y la actividad atrapadora del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  por la reducción del azul de tetrazolio medida a 560 nm. Se empleó al ácido nordihidroguayarático (NDGA) como compuesto de referencia.

La reacción de Fenton se empleó para producir  $\text{OH}^\bullet$ , el cual se detectó registrando el aumento en la fluorescencia a 326 nm de excitación y a 432 nm de emisión debido a su reacción con el tereftalato (Tang et al., 2005). La dimetiltiourea se empleó como compuesto de referencia.

La reacción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  con el hipoclorito de sodio se empleó para producir  $^1\text{O}_2$  la cual se determinó por el incremento en la fluorescencia (410 nm de excitación y 455 nm de emisión) producida por su reacción con el 1,3-difenilisobenzofurano. El NDGA se empleó como compuesto de referencia.

El  $\text{ONOO}^-$  reacciona con el diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína produciendo un producto fluorescente (485 nm de excitación y 520 nm de emisión). Se usó como compuesto de referencia a la penicilamina.

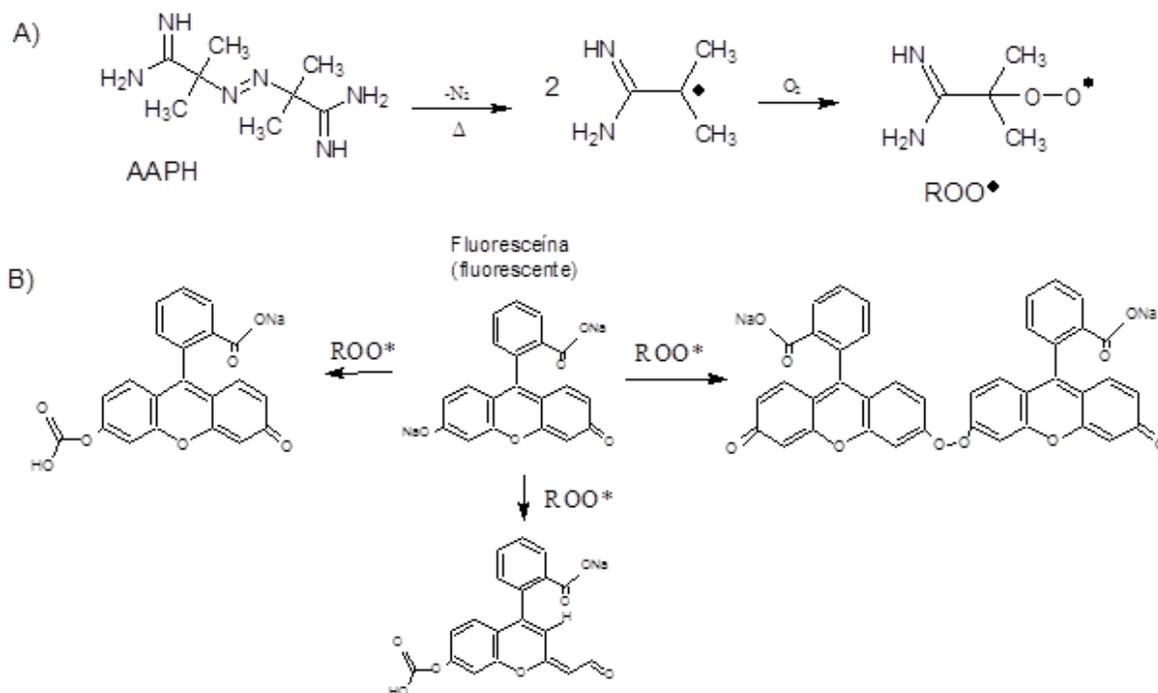
La actividad atrapadora de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se determinó usando el reactivo de peroxidasa de rábano/Amplex Red. La fluorescencia se determinó a 550 nm de excitación y 590 nm de emisión. El piruvato se usó como compuesto de referencia.

Los resultados para los ensayos de actividad antioxidante se expresaron como concentración de extracto en  $\mu\text{g}/\text{mL}$  requerido para neutralizar el 50% de las especies reactivas presentes ( $\text{CI}_{50}$ ).

#### **5.4.6 Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC)**

Este método permite analizar la capacidad de un compuesto de impedir la oxidación de la fluoresceína en presencia del radical peroxilo, el cual es originado por la descomposición térmica de un compuesto azo-iniciador (Figura 5.1) (Ou et al., 2001).

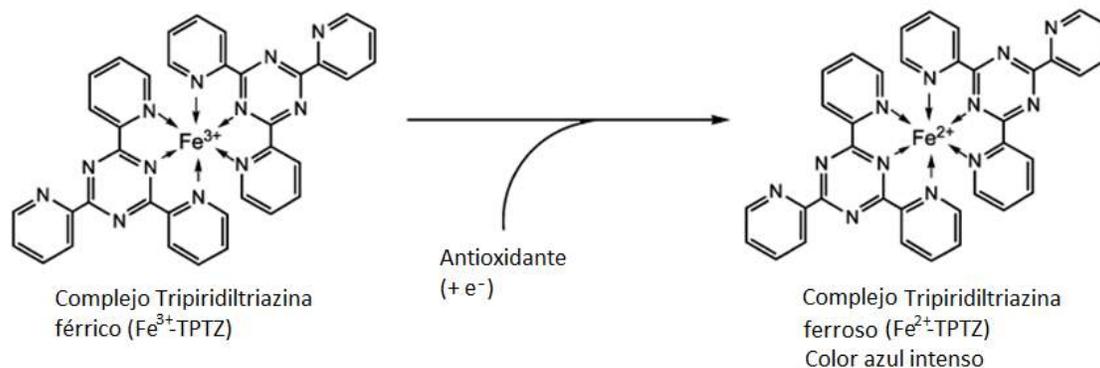
El ensayo de ORAC se realizó de acuerdo a la metodología reportada por (Huang et al., 2002). La mezcla de reacción contenía AAPH 38.5 mM (25  $\mu\text{L}$ ), fluoresceína 30 nM (150  $\mu\text{L}$ ) y la muestra o Trolox (25  $\mu\text{L}$ ). La reacción anterior se incubó y la fluorescencia a 485 nm de excitación y 526 nm de emisión se registró por 1.5 horas usando un espectrofluorómetro Sinergy HT. Las áreas bajo la curva y los equivalentes de Trolox se calcularon mediante el software Gen5™ (Biotek Instruments) usando una curva estándar de trolox. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{g}$  de equivalentes de trolox por gramo de extracto (peso húmedo). La curva de Trolox se realizó en un intervalo de 0.5-10  $\mu\text{M}$ .



**Figura 5.1. Reacciones del ORAC.** A) Reacción de descomposición del AAPH para formar el radical peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ). B) Reacción de oxidación de la fluoresceína (compuesto fluorescente) y sus posibles productos (compuestos no fluorescentes).

#### 5.4.7 Poder antioxidante reductor de hierro (FRAP)

Este ensayo se usó para determinar la capacidad de los extractos para reducir el  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  formando un complejo azul con la tripiridiltriazina en pH ácidos (Figura 5.2) (Benzie & Strain, 1996). El reactivo de FRAP se preparó minutos antes del ensayo, mezclando TPTZ 10 mM (1 mL, disuelto en HCl 40 mM),  $\text{FeCl}_3$  20 mM (1 mL) y buffer de acetatos 300 mM, pH 3.6 (10 mL). La muestra (200  $\mu\text{L}$ ) se mezcló con el reactivo de FRAP (1.5 mL). La reacción se incubó por 5 minutos a 37 °C y se determinó la absorbancia a 593 nm, usando un espectrofluorómetro Synergy HT. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de trolox por gramo de extracto (peso húmedo). La curva de Trolox se realizó en un intervalo de 4-80  $\mu\text{M}$ ).



**Figura 5.2. Reacción de un antioxidante con el reactivo de FRAP.**

#### 5.4.8 Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a la ionización por electrospray y detector de masas (HPLC-ESI-TOF)

Los extractos de la semilla y de la cáscara de aguacate se disolvieron en metanol:agua (3:1) a una concentración de 5 mg/mL. Los estándares comerciales de polifenoles (epicatequina, catequina, ácido cafeico, ácido ferúlico, quercetina, ácido gálico y rutina) se prepararon de la misma manera que los extractos. El análisis por HPLC se desarrolló en el equipo Ultimate 3000 Basic Automated (ThermoScientific-Dionex, California, EUA) y una columna Poroshell 120 EC-C18 (2.7  $\mu\text{m}$ , 4.6 x 50 mm; Agilent Technologies, Santa Clara, California, EUA). La fase móvil fue un gradiente de metanol y acetonitrilo a un flujo de 0.5 mL/minuto a 25°C. La cromatografía de líquidos se acopló a un espectrómetro de masas y electrospray ESI-MS MicroTOF (Bruker Daltonik, Bremen, Alemania), la interface del electrospray fue en modo negativo con un voltaje de 4.5 kV. La temperatura del gas inerte fue de 190°C, con un flujo de 8 L/minuto, y la presión del gas nebulizador fue de 3 bar. Los datos obtenidos a partir de los iones moleculares se procesaron a través del software Compass Data Analysis 4.1 (Bruker Daltonik) en el menú de herramientas SmartFormula Editor.

#### 5.4.9 Actividad antimicrobiana

Las cepas analizadas fueron: *Listeria innocua* (ATCC 33090), *Escherichia coli* (JMP101); *Lactobacillus sakei*, *Weissella viridescens*, y *Leuconostoc mesenteroides* las cuales fueron aisladas de productos cárnicos e identificadas a través del rDNA16S en el laboratorio S-132 de la UAM Iztapalapa. La actividad antimicrobiana de los extractos solos o en combinación

con nisina se determinó por el método turbidimétrico en caldo (Othman et al., 2011) con algunas modificaciones. Para ello, 40  $\mu\text{L}$  de inóculo ( $10^3$  unidades formadoras de colonia por mL) se mezclaron con 160  $\mu\text{L}$  de extracto, nisina o las combinaciones de nisina con los extractos, y se incubaron a  $35^\circ\text{C}$ . La densidad óptica a 600 nm se fue monitoreando cada 30 minutos, con agitación previa de 10 segundos antes de cada lectura, por 24 horas, usando el lector de placas Synergy HT. Se calculó la fase Lag y la velocidad máxima de crecimiento usando el software Gen5<sup>TM</sup>. Se consideró en el diseño de mezclas como variable respuesta a la fase Lag, porque es el tiempo en que una bacteria tarda en adaptarse al medio para poder crecer. La actividad de las combinaciones de los extractos con nisina y la nisina sola se determinaron sólo con *Listeria innocua*.

### 5.5 Optimización de la respuesta antioxidante y antimicrobiana mediante el diseño de mezclas “simplex lattice”

El diseño de mezclas “simplex lattice aumentado” se empleó para determinar el efecto antimicrobiano y antioxidante de la nisina, de los extractos de cáscara y de semilla, y de sus combinaciones. Las proporciones de cada componente en la mezcla se expresaron como la fracción de mezcla cuya suma de los componentes debe ser de uno. Las combinaciones del diseño de mezcla se diseñaron y se analizaron mediante el software Statgraphics Centurion XV, versión 15.2.6 (StatPoint Technologies, EUA). El total de 10 combinaciones se presenta en la Tabla 5.1. Las variables respuesta del diseño fueron la actividad antioxidante determinada por el método ORAC y la actividad antimicrobiana determinada por el método turbidimétrico (en fase Lag).

La siguiente ecuación polinómica de la función  $X_i$  se ajustó para cada factor evaluado en cada punto experimental, donde  $Y$  es la respuesta y  $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$  son coeficientes constantes para las interacciones lineales y no lineales:

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

Los datos se analizaron mediante un modelo lineal general. Los valores óptimos de las variables independientes se determinaron mediante el análisis de superficies de respuesta para las variables dependientes e independientes.

Tabla 5.1. Condiciones experimentales del diseño de mezcla y sus variables respuesta.

Mezcla	Proporciones y concentraciones finales en ensayo (mg/mL)			Variables respuesta	
	Nisina	Semilla	Cáscara	ORAC ( $\mu\text{g}$ trolox equivalentes/mL)	Tiempo Lag (h)
1	1	0	0	31.99	24.00
2	0.5	0.5	0	62.63	23.61
3	0.5	0	0.5	156.45	24.00
4	0	1	0	106.56	7.18
5	0	0.5	0.5	241.92	7.01
6	0	0	1	285.18	7.10
7	0.33	0.33	0.33	185.51	21.48
8	0.667	0.167	0.167	100.34	24.00
9	0.167	0.667	0.167	142.27	18.62
10	0.167	0.167	0.667	245.56	18.81

## 5.6 Preparación de microcápsulas

### 5.6.1 Soluciones formadoras de microcápsulas

Se estudiaron 2 sistemas de encapsulación: alginato-colágeno y pectina-colágeno. Para ello, se realizaron las siguientes dispersiones 24 horas antes de la preparación de las microcápsulas o de las determinaciones de los apartados siguientes: Colágeno hidrolizado (1 g; 1%, p/v), pectina (1 g; 1%, p/v) y alginato (0.5 g; 0.5%, p/v). Las dispersiones se realizaron en agua MiliQ y se dejaron en agitación a temperatura ambiente.

### 5.6.2 Potencial zeta

Se determinó el potencial zeta a diversos pH de cada una de las soluciones stock preparadas en la sección 5.6.1, esto mediante el equipo Zetasizer Nano ZPS (Malvern Instruments, Ltd., Worcestershire, RU). El pH de las soluciones se ajustó con HCl 0.1 N o NaOH 0.1 N. El valor promedio y la desviación estándar se obtuvieron con el software del mismo equipo.

### 5.6.3 Análisis turbidimétrico

El análisis turbidimétrico se realizó para encontrar la proporción de proteína/polisacárido y pH en los cuales ocurriera la separación de fases y el mayor valor de turbidez del sistema (Liu et al., 2009). El intervalo de pH estudiado fue de 2 a 4.5, con cambios de 0.5 unidades, cabe mencionar que el punto isoeléctrico del colágeno es de 5.2, por lo que la turbidez se debía a la formación de coacervados y no a la precipitación de la proteína. Los porcentajes

de proteína/polisacárido fueron combinaciones de 10 en 10% desde 0 a 100 % de cada biopolímero. La solución de polisacárido, pectina o alginato, en la proporción a estudiar, se adicionaron a la solución de colágeno y el pH a estudiar se ajustó con HCl 0.1 M. La mezcla se agitó por 30 minutos a temperatura ambiente. La turbidez se determinó, inmediatamente sin esperar la separación de fases, a 600 nm mediante el espectrofluorómetro Synergy HT.

#### **5.6.4 Preparación de microcápsulas**

##### **5.6.4.1 Microcápsulas no emulsificadas**

La nisina (0.1 g/mL) se dializó para eliminar el NaCl y otros compuestos iónicos que pudieran intervenir por el proceso de microencapsulación por coacervación. El extracto de cáscara de aguacate, como antioxidante (1.5 g), y la nisina dializada (10 mL) se disolvieron en la solución de colágeno hidrolizado (2.5 g; 1%, p/v). La mezcla anterior se homogenizó a 7,000 rpm por 2 minutos (Ultra Turrax T18 Basic, IKA, Staufen, Alemania). Después la dispersión de pectina (2.5 g; 1%, p/v) o de alginato (1.25 g; 0.5%, p/v) se adicionaron lentamente a la mezcla anterior, con agitación magnética constante. Para iniciar la microencapsulación el pH se ajustó con HCl 0.1 M, al mismo tiempo que se mantuvo la agitación y la temperatura a 25°C. Las microcápsulas en suspensión se almacenaron a 4°C por 24 horas para permitir la separación de fases. Cabe mencionar que la proporción de proteína/polisacárido y el pH de ajuste para el proceso de microencapsulación son los que se determinaron en la sección 5.6.3.

##### **5.6.4.2 Microcápsulas emulsionadas**

Las microcápsulas emulsionadas se prepararon de acuerdo al método reportado por Mendanha et al. (Mendanha et al., 2009) con algunas modificaciones. Se preparó una emulsión W/O usando 10 mL de una solución acuosa (extracto de cáscara de aguacate al 0.15 g/mL y de nisina 0.1 g/mL), aceite de soya en una proporción de 1:2 (p/p), y una mezcla de mono y diglicéridos al 1% (p/p) como emulsificantes. Esta primera emulsión se homogenizó a 11,000 rpm por 4 minutos a temperatura ambiente (Ultra Turrax, T18, IKA). Después, la emulsión doble (W/O/W) se formó al mezclar toda la emulsión primaria con la solución de colágeno (2.5 g; 1%, p/v) y se agitó a 7000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente (UltraTurrax, T18). La solución de pectina (2.5 g; 1%, p/v) o de alginato (1.25 g;

0.5%, p/v) se adicionaron a la emulsión doble manteniendo la agitación magnética. Se ajustó el pH (determinado en la sección 5.5.2) con HCl 0.1 M en agitación constante y a 25°C. Cabe mencionar que la proporción de proteína/polisacárido y el pH de ajuste para el proceso de microencapsulación son los que se determinaron en la sección 5.6.3.

### **5.6.5 Proceso de secado de las microcápsulas**

Las microcápsulas en suspensión formadas en la sección 5.6.3 se secaron a través de 2 métodos. El primero fue un secado por aspersión (SPD), empleando un Niro Mobile Minor Atomizer (GEA Niro, Dinamarca) con una presión de 2.8 bar. La temperatura del aire de entrada y el de salida fue de  $140 \pm 5^\circ\text{C}$  y  $70 \pm 5^\circ\text{C}$ , respectivamente, con un flujo de 15 mL/minuto. El segundo proceso fue mediante la liofilización (FRD) a 5 mmHg y a  $-50^\circ\text{C}$  (Freezone 2.5; Labconco Corp. Kansas, Misuri, EUA).

### **5.6.6 Caracterización fisicoquímica de las microcápsulas**

#### **5.6.6.1 Tamaño de partícula**

Las suspensiones de coacervados se diluyeron a razón 1:100 en agua que tenía el mismo valor de pH que la preparación de los coacervados, para la determinación del diámetro volumétrico de momento ( $D[4,3]$ ), empleando un analizador de la distribución del tamaño de partícula por difracción de rayo láser (Partica LA-950V2, Horiba Scientific, Kioto, Japón).

#### **5.6.6.2 Rendimiento de encapsulación (EY)**

El rendimiento de encapsulación se expresó como la relación de la masa obtenida del producto ( $M_{mf}$ ) con respecto a la masa inicial del material usado ( $M_{mi}$ ), considerando la masa de los materiales que conforman la pared (biopolímeros), así como el núcleo (emulsión, extracto de cáscara de aguacate y nisina).

$$EY(\%) = \frac{M_{mf}}{M_{mi}} * 100$$

#### **5.6.6.3 Eficiencia de encapsulamiento y eficiencia de carga**

La eficiencia de encapsulamiento para la nisina (EEn) y para el extracto de la cáscara de aguacate (EEx) fueron determinados mediante el método de difusión en agar y por método ORAC, respectivamente. El método de difusión en agar se desarrolló de acuerdo a (Wolf & Gibbons, 1996), usando como microorganismo indicador a *Listeria innocua* (ATCC

33090). El método de ORAC se desarrolló de acuerdo a lo reportado por (Huang et al., 2002). Antes de cada determinación, 0.1 g de microcápsulas se disolvieron en 1 mL de etanol al 70% (v/v). Se realizaron curvas de calibración a diferentes concentraciones de nisina y del extracto de la cáscara de aguacate para correlacionar la concentración con la respuesta en el ensayo de cada compuesto.

$$EE_{n \text{ or } x}(\%) = \frac{Nisina \text{ o extracto}_{encapsulado}}{Nisina \text{ o extracto}_{total}} * 100$$

Donde *Nisina o extracto<sub>encapsulado</sub>* es la concentración de cada compuesto en las microcápsulas y *Nisina o extracto<sub>total</sub>* es la concentración de cada compuesto agregado inicialmente al sistema.

La eficiencia de carga (EL<sub>n</sub> para nisina y EL<sub>x</sub> para extracto de cáscara de aguacate) se calculó como la relación entre la concentración de cada compuesto encapsulado con la masa final del producto ya seco.

$$EL_{n \text{ or } x}(\%) = \frac{Nisina \text{ o extracto}_{encapsulado}}{M_{mf}} * 10$$

#### 5.6.6.4 Humedad residual y actividad acuosa (Aw)

La humedad residual se determinó por secado en un horno de aire caliente a 70°C por 24 horas. El Aw se determinó mediante un medidor de actividad acuosa (Aqualab 4TE, Decagon Devices, Washington, EUA). Ambas determinaciones se realizaron en las microcápsulas ya secas.

#### 5.6.6.5 Liberación en agua

La liberación de los bioactivos en agua se determinó por el método gravimétrico reportado por (Eastman & Moore, 1984) con algunas modificaciones. Las microcápsulas en polvo (0.5 g) se disolvieron en 50 mL de agua MilliQ a pH 7 y se mantuvieron en agitación constante por 24 horas a temperatura ambiente. Después se centrifugaron a 6,000 x g por 5 minutos y 4°C. El sobrenadante se colocó en una caja Petri (a peso constante), la cual se colocó en un horno de secado a 70°C hasta completa evaporación. La liberación se determinó por la diferencia de peso entre el residuo de material en la caja Petri y la masa inicial, es decir se incluyó a los compuestos bioactivos como al material de pared.

#### **5.6.6.6 Morfología microscópica de los coacervados**

Las microcápsulas en suspensión (previo al proceso de secado) se observaron en un microscopio de contraste de fases Nikon Eclipse TS100F (Nikon Co., Tokyo, Japan). Las microcápsulas secas se analizaron por microscopía electrónica. Para ello las muestras se colocaron en un porta-muestras de aluminio, por medio de una cinta de doble cara, y se cubrieron con oro por 120 segundos. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido (JSM-5900LV, Jeol, Ltd., Tokio, Japón) a 10 kV.

### **5.7 Incorporación de las microcápsulas en carne molida**

#### **5.7.1 Preparación de las muestras de carne**

La composición de la carne molida de res que se empleó fue:  $18.89 \pm 0.75\%$  de proteína,  $6.58 \pm 0.65\%$  de lípidos,  $73.47 \pm 0.09\%$  de humedad, y  $1.27 \pm 0.01\%$  de cenizas. Se realizaron 10 tratamientos, los cuales se describen en la Tabla 5.2, donde se agrupan las muestras en dos tipos de empaque, al vacío y permeable al oxígeno; cápsulas vacías, cápsulas con nisina y extracto; control, extracto sin encapsular y nisina sin encapsular. Para los tratamientos que incluyeron cápsulas se escogió el sistema que presentó una mayor eficiencia de encapsulamiento para la mezcla de nisina y extracto de la cáscara de aguacate, que fue el de pectina-colágeno, emulsionado y secado por aspersión. Se adicionaron 6.1 g de microcápsulas (0.2 g de extracto de cáscara de aguacate y 25 mg de nisina pura (equivalente a 0.2 g de nisina comercial) a 200 g de carne molida de res. Esto se hizo considerando el límite máximo de uso de la nisina en carne, el cual es de 25 mg/Kg (Codex Stan 192-1995). Las microcápsulas vacías o con compuestos (extracto y a nisina solos sin encapsular) se adicionaron en la carne mediante una mezcladora (KitchenAid clásica), en condiciones asépticas para evitar contaminación cruzada.

**Tabla 5.2. Tratamientos en carne.**

Número de tratamiento	Nombre	Tipo de empaque	Tipo de tratamiento
1	Control	Permeable	----
2	Extracto sin encapsular	Permeable	0.2 g de extracto de cáscara de aguacate
3	Nisina sin encapsular	Permeable	0.2 g de nisina comercial (25 mg de nisina pura)
4	Cápsula vacía	Permeable	6.1 g de microcápsulas vacías, secadas por aspersión
5	Cápsula con extracto y nisina	Permeable	6.1 g de microcápsulas (25 mg de nisina pura y 0.2 g de extracto) secadas por aspersión
6	Control	Vacío	----
7	Extracto sin encapsular	Vacío	0.2 g de extracto de cáscara de aguacate
8	Nisina sin encapsular	Vacío	0.2 g de nisina comercial (25 mg de nisina pura)
9	Cápsula vacía	Vacío	6.1 g de microcápsulas vacías, secadas por aspersión
10	Cápsula con extracto y nisina	Vacío	6.1 g de microcápsulas (25 mg de nisina pura y 0.2 g de extracto) secadas por aspersión

Las muestras se empacaron en empaque permeable al oxígeno o al vacío, y se almacenaron en refrigeración (4°C) por 15 días. Cada tercer día, se realizó el muestreo de cada tratamiento, en el cual se determinó pH, Aw y el análisis microbiológico.

### 5.7.2 pH

Se tomaron 10 g de carne y se homogenizaron con 100 mL de agua destilada a 7,000 rpm por 1 minuto en un homogenizador (IKA, Ultra Turrax). Después se filtró por medio de papel Whatman #4. El filtrado resultante se empleó para la determinación de pH, mediante un potenciómetro (Orion, Versa Star, Thermo Fisher Scientific; Massachusetts, EUA) previamente calibrado.

### **5.7.3 Aw**

La determinación de Aw, se realizó mediante un medidor de actividad acuosa (Aqualab 4TE), colocando aproximadamente 5 g de carne en el porta-muestras y siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **5.7.4 Estabilidad oxidante**

#### **5.7.4.1 Oxidación lipídica (TBARS)**

La oxidación lipídica se determinó de acuerdo a (Rodríguez-Carpena, Morcuende, & Estévez, 2011) con algunas modificaciones. Cinco gramos de carne se homogenizaron a 11,000 rpm por 2 minutos (IKA, Ultra Turrax) en 15 mL de ácido perclórico al 4%. Durante la homogenización el tubo se mantuvo en un baño de hielo. El sistema resultante se filtró en un papel Waltham No. 1 y posteriormente se centrifugó a 1,157 x g por 10 minutos. Se tomaron 2 mL del sobrenadante resultante y se mezclaron con 2 mL de ácido 2-tiobarbitúrico (80 mM). La reacción se llevó a través de un calentamiento a baño María (aproximadamente a 100°C) por 30 minutos. La absorbancia de las muestras y de la curva estándar (1,1,3,3-tetrametoxipropano en ácido perclórico) se determinó a una longitud de onda de 530 nm. La curva de tetrametoxipropano se realizó en un intervalo de 1.5-24 µM.

#### **5.7.4.2 Oxidación proteica**

La oxidación de proteínas se determinó con la cuantificación de carbonilos totales y su derivatización con dinitrofenilhidrazina (Rodríguez-Carpena et al., 2012). Para ello, 1 g de carne se homogenizó en 10 mL de buffer de fosfatos 100 mM, pH 7.4 y se centrifugó a 1157 x g por 5 minutos. Del sobrenadante, se tomaron dos alícuotas de 0.2 mL y a cada una se le agregó 1 mL de ácido tricloroacético al 10%, para precipitar proteínas y se centrifugaron a 3,214 x g por 5 minutos. Al botón de una de las alícuotas se le adicionó 1 mL de HCl 2 M para determinar la concentración de proteínas de cada muestra. Al botón de la segunda alícuota se le adicionó 1 mL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (0.2% en HCl 2 M) para determinar el contenido de carbonilos. Ambas alícuotas se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Posteriormente se les adicionó 1 mL de ácido tricloroacético al 10%, se incubaron por 10 minutos a 4°C y centrifugaron a 10000xg por 10 minutos a 4°C. Al botón resultante se le adicionó nuevamente ácido tricloroacético al 10% y se repitió el proceso anterior. Después se realizaron 2 lavados con 1 mL de etanol-

acetato de etilo (1:1) y se centrifugaron a 10,000 x g por 10 minutos a 4°C. Los pellets se disolvieron con 1 mL de guanidina-HCl 6M (pH 6.5) y se incubaron por 10 minutos a 37°C. Posteriormente se centrifugaron a 10000 x g por 10 minutos a 4°C. La concentración de proteínas se determinó a 280 nm y la concentración de carbonilos a 370 nm, empleando un blanco de guanidina-HCl.

### **5.7.5 Estabilidad microbiológica**

Se colocaron 25 gramos de carne en 225 mL de solución salina (al 0.85% estéril) y se homogenizaron en un Stomacher 400-circulator (Seward, Reino Unido) a 230 rpm por 30 segundos. A partir de este homogenado se realizan diluciones decimales. El conteo de mesófilos aerobios, enterobacterias y bacterias ácido lácticas (BAL) se realizó en placas Rida Count (R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **5.7.6 Análisis sensorial**

#### **5.7.6.1 Evaluación con jueces no entrenados. Prueba “A no A” modificada**

La evaluación sensorial se realizó con 80 consumidores (40 mujeres, 40 hombres). La prueba se realizó en cabinas individuales, equipadas con computadoras que contenían el software FIZZ, versión 2.5 (Biosystemes, Francia). Las muestras de carne fueron cocidas en una parrilla eléctrica, hasta que el centro alcanzó los 90 °C, conservando esa temperatura por 2 minutos y se mantuvieron calientes para ser servidas así durante la prueba. Las muestras evaluadas fueron un control (sin ningún tratamiento); carne con extracto sin encapsular; carne con cápsulas vacías y carne con cápsulas de extracto y nisina.

Al consumidor se le presentó una charola con 5 muestras; una de ellas marcada como *R*, y el resto de las muestras se presentaron con códigos. Se le pidió al consumidor que probara las muestras y evaluara el parecido de cada una de las muestras codificadas con respecto a la muestra *R*, en cuanto a apariencia, olor y sabor. Las opciones de respuesta fueron: A) La muestra es igual a *R* con seguridad; B) Es igual a *R*, pero no estoy seguro; C) Es diferente a *R*, pero no estoy seguro; D) La muestra es diferente a *R* con seguridad. También el cuestionario incluía un espacio para comentar algunas observaciones acerca de las diferencias detectadas en caso de existir.

Adicionalmente se les preguntó a los jueces, si consumían carne y cuál era su frecuencia de consumo.

Para el análisis de los resultados, se calculó el índice R para cada muestra en comparación con la muestra control o referencia, así como la significancia y el valor de  $\chi^2$  para corroborar los datos obtenidos en la prueba.

#### **5.7.6.2 Análisis de textura, color y pérdida de agua por cocción**

Las muestras de carne empleadas en el análisis sensorial, se sometieron a un análisis de perfil de textura (TPA) empleando el texturómetro TAXT Plus (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido). El análisis consistió en una doble compresión, con 25% de valor meta de compresión, con una velocidad de prueba de 5 mm/s, empleando una sonda circular de compresión de 75 mm de diámetro. Mediante el software Exponent 6.1.4.0 (Stable Micro Systems versión 6,1,4,0) se obtuvieron los datos de dureza, masticabilidad, cohesividad, elasticidad y gomosidad.

Al mismo tiempo, a las muestras de carne (cocidas) se les determinó el color, siguiendo la metodología del apartado 5.4.1. Las muestras de carne, antes y después de someterse a cocción se pesaron, para determinar por diferencia de peso la pérdida de agua por cocción, y determinar de manera indirecta la jugosidad final de las diversas muestras.

#### **5.8 Análisis estadístico**

La actividad antioxidante y la caracterización de los extractos de aguacate se repitieron 6 veces y se reportaron como promedio  $\pm$  desviación estándar. Los datos se analizaron mediante una ANOVA de una vía, con posterior análisis de comparaciones múltiples por Tukey; empleando el software Prism ver. 5.0 (GraphPad, La Jolla, CA, EUA). Se consideraron estadísticamente significativos los valores de  $p < 0.05$ .

Para la sección de las microcápsulas se planteó un diseño aleatorio de  $2^3$ , cuyas variables independientes o factores fueron: a) tipo de pared o sistema encapsulador (pectina-colágeno y alginato-colágeno); b) la presencia o no de una emulsión para incluir el núcleo que contenía la nisina y al extracto; c) el proceso de secado (secado por aspersión y liofilización). Las variables respuestas o variables dependientes fueron: EEx, EEn, Ey, ELn, ELx, liberación, Aw y humedad. Cada variable respuesta se analizó mediante un ANOVA de una vía con posterior análisis de comparaciones múltiples (Tukey), usando el software

GraphPad Prism ver. 5.0 (La Jolla, CA, EUA). Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos. Por otra parte, se analizó la significancia de cada factor en el modelo y también la correlación de cada variable corrida experimental con los factores mediante un análisis de componentes principales (PCA), empleando el software XLSTAT 2015.4 (Addinsoft, Nueva York, EUA).

De la tercera etapa o de la incorporación de microcápsulas en carne, se realizó una ANOVA de una vía, con posterior análisis de comparaciones múltiples por Tukey, para las respuestas de pH, Aw, y cuenta microbiológica; empleando el software Prism ver. 5.0. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de  $p < 0.05$ . A su vez, se correlacionaron las variables respuesta (pH, Aw, microbiológico) de esta etapa con los factores (día, tratamiento y tipo de empaque) por medio de un PCA, así como por un ANOVA empleando el software XLSTAT 2015.4

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Caracterización fisicoquímica de extractos y su interacción con la nisina

#### 6.1.1 Características de las muestras de aguacate y de sus respectivos extractos

El peso promedio de los aguacates empleados para este estudio fue de  $153.89 \pm 16.06$  g, del cual el  $15.22 \pm 4.7\%$  correspondió a la semilla y el  $16.12 \pm 0.3\%$  a la cáscara (Tabla 6.1).

**Tabla 6.1. Características físicas de las muestras de aguacate.**

		<b>Fruta completa</b>	<b>Semilla</b>	<b>Pulpa</b>	<b>Cáscara</b>
<b>Peso (g)</b>		$153.89 \pm 16.06$	$28.66 \pm 14.46$	$100.44 \pm 23.89$	$24.78 \pm 2.22$
<b>Humedad (%)</b>		---	$55.40 \pm 8.30$	$76.45 \pm 12.50$	$74.99 \pm 15.30$
<b>Color</b>	<b>L*</b>	$23.85 \pm 0.65$	$31.00 \pm 1.44$	$61.72 \pm 0.93$	$23.85 \pm 0.65$
	<b>a*</b>	$1.25 \pm 0.51$	$6.15 \pm 2.09$	$-1.48 \pm 0.39$	$1.25 \pm 0.51$
	<b>b*</b>	$9.1 \pm 0.36$	$5.97 \pm 1.23$	$31.02 \pm 1.76$	$9.1 \pm 0.36$

--- No se evaluó

Los resultados obtenidos en este trabajo de las características físicas como el peso, color y humedad de los frutos de aguacate, incluidos su semilla y cáscara son muy similares a los reportados previamente por Rodríguez-Carpena et al., (Rodríguez-Carpena et al., 2011). Estos datos demuestran que la variedad de aguacate Hass posee un porcentaje considerable de residuos no comestibles (cáscara y semilla), aproximadamente del 30% del peso total del fruto, en comparación con otras frutas donde el porcentaje de residuos es menor, o la cáscara y su semilla son comestibles.

Los rendimientos en la extracción fueron de  $8 \pm 2.3\%$  para la cáscara y  $13.2 \pm 3.4\%$  para la semilla. El color final de los extractos fue diferente al del material del cual se extrajo (Tabla 6.2). Adicionalmente, el extracto de la cáscara presentó un ligero olor a tamarindo, probablemente a la presencia de carbohidratos, ácidos orgánicos y algunos terpenos o aldehídos de bajo peso molecular que sean solubles en agua; ya que se ha reportado que en la pulpa y en la semilla se han encontrado compuestos volátiles como aldehídos y terpenos (Moreno et al., 2003).

**Tabla 6.2. Color, contenido de taninos, polifenoles totales y flavonoides; capacidad antioxidante y atrapadora de radicales libres en extractos de semilla y cáscara de aguacate (*Persea americana*).**

	Extracto de semilla	Extracto de cáscara	Compuesto de referencia
<b>Color</b>	L* = 79.96±0.18 a* = 10.35±0.07 b* = 27.26±0.07	L* = 41.2±0.27 a* = 10.70±0.06 b* = 21.16±0.2	NE
<b>Polifenoles totales (mg GAE/g extracto)</b>	5.7±0.2 <sup>a</sup>	19.7±1 <sup>b</sup>	NE
<b>Flavonoides totales (mg QER/g extracto)</b>	2.8±0.8 <sup>a</sup>	10.9±1.03 <sup>b</sup>	NE
<b>Contenido de taninos (mg GAE/g extracto)</b>	0.09±0.001	0.04±0.001	NE
<b>ORAC (µg equivalentes de Trolox /g extracto)</b>	1.6±0.09 <sup>a</sup>	216.8±2.5 <sup>b</sup>	NE
<b>FRAP (mg equivalentes de Trolox /g extracto)</b>	9.5±1.6 <sup>a</sup>	23.1±5.9 <sup>b</sup>	NE
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	0.87±0.03 <sup>a</sup>	0.83±0.08 <sup>a</sup>	0.25±0.02 <sup>b</sup>
<b>OH<sup>•</sup></b>	430±86 <sup>a</sup>	26.5±1.0 <sup>b</sup>	0.49±0.04 <sup>c</sup>
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	2,854±72 <sup>a</sup>	1,741±3 <sup>b</sup>	2.9±0.6 <sup>c</sup>
<b>ONOO<sup>•</sup></b>	612±184 <sup>a</sup>	198±44 <sup>b</sup>	3.0±1.4 <sup>c</sup>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	0.8±0.03 <sup>a</sup>	0.6±0.09 <sup>a</sup>	11.0±0.2 <sup>b</sup>

Los datos se expresan como el promedio ± desviación estándar. N= 6-8 experimentos independientes. Valores con letras diferentes (a-c) dentro de la misma fila indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). GAE= equivalentes de ácido gálico, QER= equivalentes de quercetina. NE= no evaluado. Los datos de capacidad atrapadora de radicales se expresan en valores de CI50 (µg/mL).

### 6.1.2 Composición y capacidad antioxidante

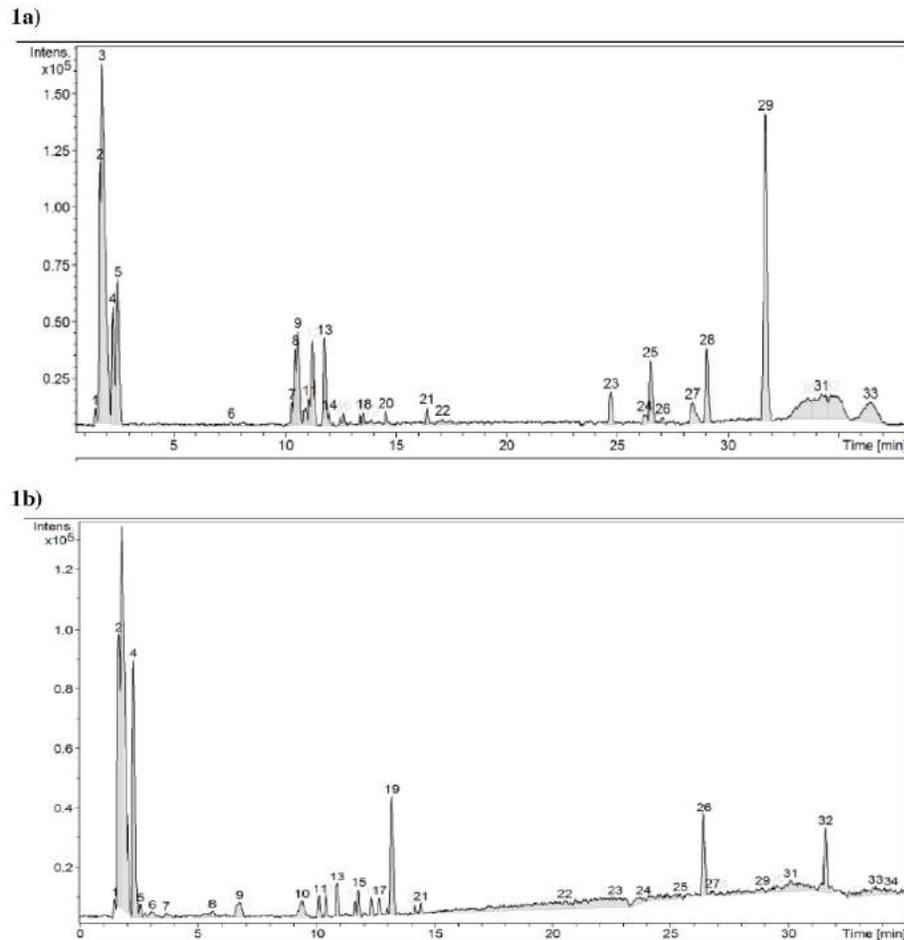
El contenido de polifenoles, taninos y flavonoides, así como la capacidad antioxidante de cada extracto se presentan en la Tabla 6.2. En todos los casos, el extracto de la cáscara de aguacate presentó un mayor porcentaje de compuestos que a su vez le pueden conferir una mayor capacidad antioxidante comparada con la del extracto de semilla, excepto en el contenido de taninos, donde no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Estos resultados son similares a los reportados por otros autores, en los cuales los extractos provenientes de la cáscara de aguacate presentan un mayor contenido de polifenoles que la

semilla, incluso aún comparándolos con extractos obtenidos con otros procesos de extracción y el uso de solventes (Rodríguez-Carpena et al., 2011; Widsten et al., 2014). En este estudio los polifenoles se extrajeron con agua caliente, debido a que es un solvente permitido en alimentos y que además posee un bajo impacto ecológico comparado con otro tipo de solventes orgánicos como el metanol y la acetona. También, se usó un extracto acuoso por compatibilidad con la mezcla de nisina.

Las diferencias encontradas en la composición química de ambos extractos estudiados de los residuos de aguacate, coinciden con la capacidad antioxidante y atrapadora de radicales libres observada (Tabla 6.2). Los extractos de la semilla y cáscara de aguacate tuvieron un efecto atrapador de radicales libres de manera dependiente de la concentración, es decir, que a mayor concentración en los extractos, mayor capacidad antioxidante y atrapadora de radicales libres. Los valores de  $CI_{50}$  para  $^1O_2$ ,  $OH^\bullet$  y  $ONOO^-$  fueron diferentes para ambos extractos y para el compuesto de referencia, siendo más efectivo en la inhibición de los 3 radicales el compuesto de referencia, seguido del extracto de cáscara y la menor capacidad atrapadora se observó con el extracto de la semilla. No se observaron diferencias significativas entre los extractos con respecto a los valores de  $CI_{50}$  para  $H_2O_2$  y  $O_2^{\bullet-}$ , pero sí con el compuesto de referencia, observándose una mayor inhibición con el compuesto de referencia. Sin embargo, en los todos los casos el extracto de la cáscara presentó valores  $CI_{50}$  menores que los del extracto de la semilla, lo que sugiere una mayor capacidad antioxidante y capacidad atrapadora de radicales libres. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre el extracto de cáscara y en extracto de la semilla en la inactivación de  $OH^\bullet$ ,  $^1O_2$  y  $ONOO^-$ , siendo mayor el efecto supresor de radicales en el extracto de la cáscara de aguacate. Otros autores han reportado resultados similares, donde los extractos de cáscara de aguacate de la variedad Hass y Shepard presentaron un mayor contenido de polifenoles y capacidad antioxidante comparada con los extractos de sus semillas (Kosińska et al., 2012).

Por otra parte, el análisis de los extractos mediante la técnica de HPLC-ESI-TOF de los extractos de la cáscara y semilla de aguacate mostró similitudes en la cantidad de compuestos encontrados (Figura 6.1 y Tabla 6.3). Sin embargo, en los extractos de semilla un mayor número de compuestos se pudieron identificar, por estar reportados en las bases

de datos utilizadas. La epicatequina fue el único polifenol presente en ambos extractos. Algunos de los compuestos identificados en este estudio en ambos extractos (Tabla 6.3), coinciden con los encontrados en otros reportes como la epicatequina, procianidinas y el ácido clorogénico, en ambos extractos (Rodríguez-Carpena et al., 2011; Widsten et al., 2014). Otros compuestos identificados, como los ácidos fenólicos, se han reportado en la pulpa del aguacate (Hurtado-Fernández et al., 2011). Por otra parte, a pesar de que ambos extractos presentan compuestos similares, no tienen la misma capacidad antioxidante, y esto podría ser explicado debido a la presencia de otros compuestos no identificados en el extracto de la cáscara que pudieran tener un efecto sinérgico o inhibitorio o nulo ante la capacidad antioxidante o antimicrobiana en un extracto (Parker et al., 2010; Tabart et al., 2009).



**Figura 6.1. Cromatogramas pico base. 1a) Extracto de cáscara. 1b) Extracto de semilla.**

**Tabla 6.3. Perfil polifenólico e identificación tentativa de compuestos encontrados en el extracto acuoso de la cáscara y semilla de aguacate en modo negativo, mediante HPLC-ESI-TOF.**

Compuesto o posible compuesto	Fórmula o posible fórmula*	[M-H] <sup>-</sup> exp (m/z)	Masa teórica	T <sub>R</sub> (min)	Cáscara		Semilla	
					Área del pico	Área %	Área del pico	Área %
Ácido málico	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	133.0144	134.09	1.8			1679085.5	25.9
Ácido quínico	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	191.0183	192.17	2.3	357672	3.4	668698.5	10.3
Ácido succínico o ácido metilmalónico	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	117.0198	118.09	2.6	626470	6.0	23783.2	0.4
7-Hidroxi-6,8-di-C-metilflavona 7-O-arabinosido	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>	399.1437	400.152	3.7			25899.8	0.4
Isorhamnetina	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	315.1054	316.26	5.6			42228.5	0.7
Kaempferide	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	299.1128	300.26	9.4			100845.5	1.6
Ácido 3-O-p-coumaroilquinico	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	337.0924	338.30	10.1			51328.6	0.8
Ácido Clorogénico	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353.0835	354.31	10.96	376322	3.6	80251.6	1.2
Procianidina (A o B)	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	577.1621	578.52	11.2	342976	3.3		
Epicatequina*	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	289.0855	290.27	11.7	315636	3.0	62105.8	0.9
Quercetina-3-O-arabinosa	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	433.2306	434.37	12.6	35607	0.3		
Epicatequina galato	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	441.177	442.37	13.2			304539.3	4.7
Ácido abscisico	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	263.1429	264.32	16.4	46252	0.4		
p-coumaroil-D-glucosa	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	325.1979	326.09	28.4	161934	1.6		

TR=tiempo de retención; \*= Posible fórmula empleando el Smart Editor-Molecular formula (valores de sigma superiores a 30 y valores de error menores a 5 ppm); • = compuesto comparado con el estándar

### 6.1.3 Actividad antimicrobiana

Los extractos de cáscara y semilla de aguacate, por sí solos no presentaron actividad antimicrobiana contra las bacterias analizadas en este estudio. Los extractos presentaron los mismos valores de tiempo lag y de velocidad máxima de crecimiento que el control (cepa sin tratamiento). En el caso de *Listeria innocua*, el tiempo lag fue de 1.2±0.03 h y una velocidad máxima de crecimiento 6.66±0.14 h<sup>-1</sup> para el control como para los extractos estudiados.

Se ha reportado que la actividad antimicrobiana se correlaciona con el total de polifenoles y de flavonoides (Widsten et al., 2014), la actividad antimicrobiana no sólo depende del tipo de polifenoles, sino de la concentración y del microorganismo utilizado (Widsten et al.,

2014). Existen estudios donde los extractos acetónicos de la cáscara y semilla del aguacate Hass presentaron actividad antimicrobiana contra algunas bacterias patógenas (Rodríguez-Carpena, et al., 2011; Widsten, et al., 2014). Sin embargo, en este estudio por el tipo de polifenoles extraídos con agua, no tuvieron un efecto antimicrobiano contra las bacterias estudiadas.

Por otra parte, la nisina a la concentración de 0.78 mg/mL, presentó la concentración mínima inhibitoria contra *Listeria innocua*, calculada como la concentración en la que no presentó cambios en la densidad óptica después de 24 horas de incubación.

#### 6.1.4 Efecto de las combinaciones de nisina y de los extractos de aguacate en la actividad antioxidante y antimicrobiana

La optimización del diseño de mezclas se llevó a cabo para evaluar el desempeño de los extractos antioxidantes (semilla de aguacate y cáscara) con el antimicrobiano nisina. Los resultados de cada mezcla se muestran en la Tabla 6.4.

**Tabla 6.4. Coeficientes estimados de la regresión para las variables respuesta.**

Parámetro	Respuesta antioxidante			Respuesta antimicrobiana		
	Coefficiente	Error estándar	Valor p	Coefficiente	Error estándar	Valor p
Nisina	31.13	11.34		22.93	2.50	
Semilla	102.59	11.34		7.71	2.50	
Cáscara	284.61	11.34		7.65	2.50	
Nisina-Semilla	10.71	52.28	0.8477	35.46	11.54	0.0372
Nisina-Cáscara	35.56	52.28	0.5337	37.22	11.54	0.0321
Semilla-Cáscara	222.10	52.28	0.0132	6.12	11.54	0.6238
	R <sup>2</sup> : 99.12, R <sup>2</sup> ajustada: 98.02			R <sup>2</sup> : 94.69, R <sup>2</sup> ajustada: 88.05		

Para la respuesta antioxidante y antimicrobiana, el modelo cuadrático es el más aceptable debido a los valores de R<sup>2</sup> y R<sup>2</sup>-ajustada. La Tabla 6 presenta los valores de los coeficientes de cada uno de los compuestos en estudio en el efecto de la respuesta antioxidante y antimicrobiana, así como sus respectivos valores de *p*. Los coeficientes con los valores *p*>0.05 no son significativos en el modelo, y por lo tanto no tienen un efecto en las variables respuesta. Para el caso de la respuesta antioxidante, la cáscara presentó el

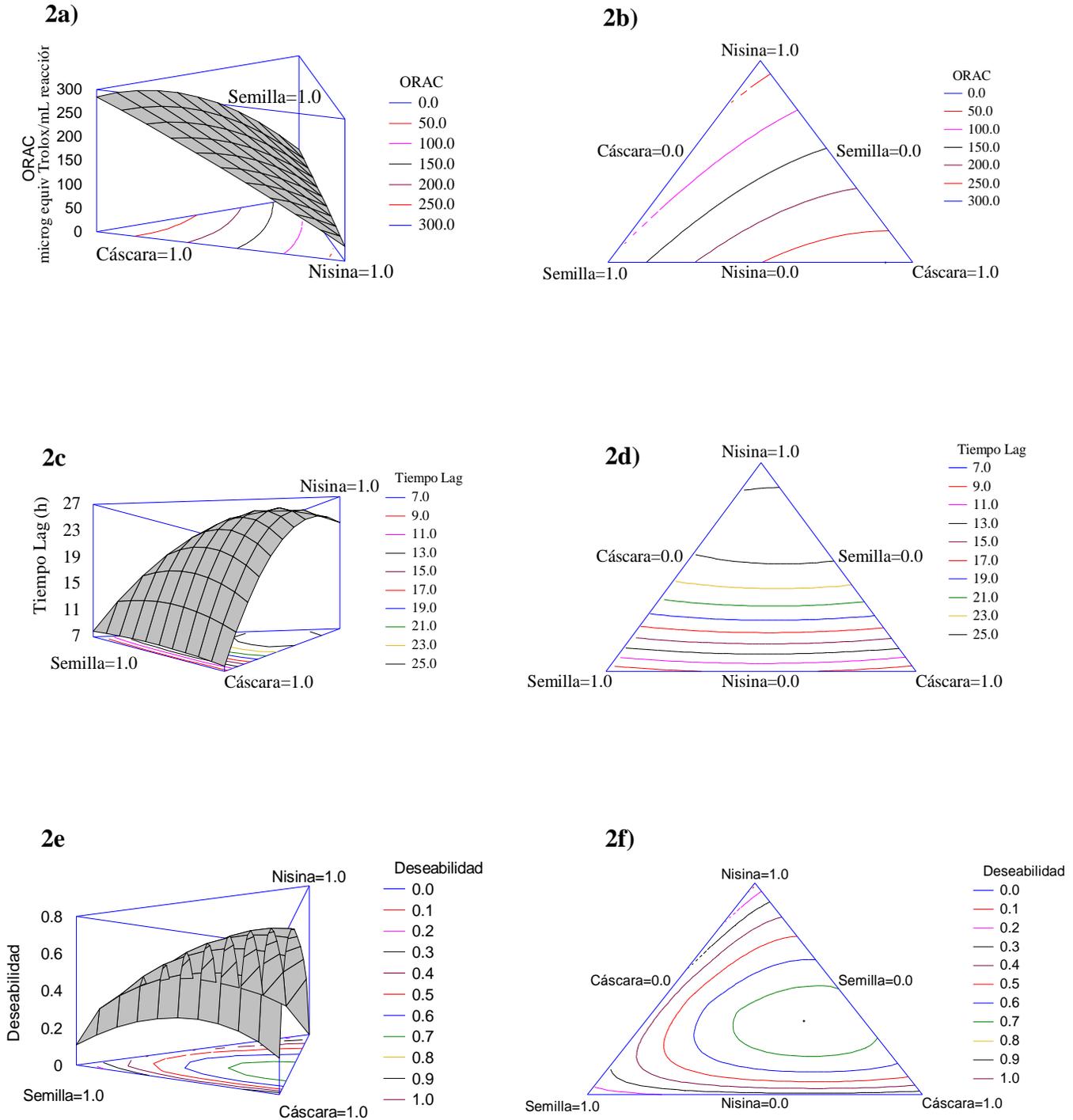
coeficiente más alto, por lo que es el compuesto de mayor importancia para la respuesta antioxidante en la mezcla de nisina, semilla y cáscara. En la representación gráfica por superficies de respuesta de los modelos del diseño de mezclas que se presentan en la Figura 6.2, se observa que la actividad antioxidante aumenta en las mezclas con un mayor porcentaje de cáscara de aguacate (Figura 6.2A y 6.2B), además que la actividad antioxidante disminuye conforme aumenta el contenido de nisina. Estos resultados, coinciden con los esperados ya que la mayor fuente de antioxidante está dada por el componente cáscara, en comparación de los otros dos componentes que conforman la mezcla, la semilla y la nisina. La combinación que presenta la máxima respuesta antioxidante es de 10% de semilla y 90% de cáscara.

Con respecto a la respuesta antimicrobiana, los coeficientes más altos se presentaron en las combinaciones de nisina-cáscara y nisina-semilla (Tabla 6.4), sugiriendo un efecto sinérgico con la mezcla de extractos y la nisina. Los extractos por sí solos no presentaron un efecto significativo en la respuesta. Las Figuras 6.2C y 6.2D demuestran que la mayor actividad antimicrobiana contra *Listeria* está dada por las combinaciones con mayor porcentaje de nisina. La combinación con el máximo valor de actividad antimicrobiana fue de 70% de nisina con 25% de cáscara y 5% de semilla. Se ha reportado que la combinación de ácidos orgánicos como ácido láctico, acético o cítrico con nisina, incrementa la actividad antimicrobiana contra algunas bacterias patógenas como *Escherichia coli* O157:H7 (Fang & Tsai, 2003). La mezcla de las sales de los ácidos orgánicos con iones quelantes, como el EDTA, inhiben el crecimiento de *Pseudomonas* sp y *Listeria monocytogenes* (Wan Norhana et al., 2012). De esta manera se supone que algunos ácidos orgánicos y sales presentes en los extractos de los residuos de aguacate pudieran ser los responsables del aumento de la actividad antimicrobiana de la nisina.

Otra posible explicación del aumento de la actividad antimicrobiana de la nisina con los extractos, podría ser la presencia de compuestos fenólicos, ya que éstos compuestos pueden alterar la membrana celular, retardar el crecimiento celular e inhibir la multiplicación de las bacterias. Además de que los polifenoles pueden atravesar la membrana celular (Juneja et al., 2012) y combinado con la habilidad de la nisina de formar poros en la membrana, aumenta la salida de pequeñas moléculas indispensables para la células.

### **6.1.5 Optimización de la interacción de los extractos de aguacate con nisina**

Para maximizar los efectos antimicrobianos y antioxidantes de las mezclas de nisina con los extractos de aguacate, se empleó la optimización por respuesta de superficie, considerando a ambas respuestas con la misma relevancia en el modelo. En las Figuras 6.2E y 6.2F se presentan la superficie de respuesta estimada y la gráfica de contornos, en las cuales se observa que el máximo efecto para las respuestas de interés está dado por la mezcla de nisina con el extracto de cáscara ( $p < 0.05$ , deseabilidad de 0.76); es decir que en la mezcla de nisina al 39% y extracto de cáscara al 61%, se maximizaron las respuestas antioxidante y antimicrobiana (valor ORAC de 194  $\mu\text{g}$  de equivalentes de trolox/mL, y tiempo lag de 22.4 h). El efecto del extracto de la semilla de aguacate se descarta de la mezcla al no causar cambios significativos en alguna de las respuestas, comparado con la nisina o el extracto de la cáscara. El extracto de la semilla podría usarse en la mezcla para darle un color, ya que este extracto es un colorante natural similar a la curcumina (Dabas et al., 2011). Debido al efecto nulo del extracto de semilla en las siguientes etapas del estudio solamente se empleó la mezcla de nisina y de cáscara de aguacate.



**Figura 6.2. Respuesta antioxidante y antimicrobiana de la mezcla de nisina con extracto de cáscara y semilla de aguacate.** Respuesta antioxidante: a) Superficie de respuesta, b) Gráfica de contornos. Respuesta antimicrobiana contra *Listeria innocua*: c) Superficie de respuesta, d) Gráfica de contornos. Optimización maximizando ambas respuestas: e) Superficie de respuesta, f) Gráfica de contornos.

## 6.2 Caracterización de las microcápsulas

### 6.2.1 Efecto del pH y la proporción proteína-polisacárido

El pH y la relación de proteína-polisacárido son factores importantes para el proceso de coacervación ya que éstos influyen directamente en las interacciones electrostáticas y por lo tanto en la estabilidad y solubilidad de las microcápsulas finales. El pH está involucrado en la atracción electrostática que permite o evita la protonación de los grupos catiónicos presentes en las proteínas y la proporción de polímeros influyen en el número y tipo de puentes intermoleculares entre las moléculas (Wang et al., 2015).

En la Figura 6.3 se observan los valores de potencial zeta de cada uno de los biopolímeros que se usaron como sistema de encapsulamiento. A pH menores a 5.5, el colágeno presenta carga positiva, lo que permitiría la interacción o la formación de coacervados con las cargas negativas de los polisacáridos. La neutralización de cargas se observó en valores de pH cercanos a 3.

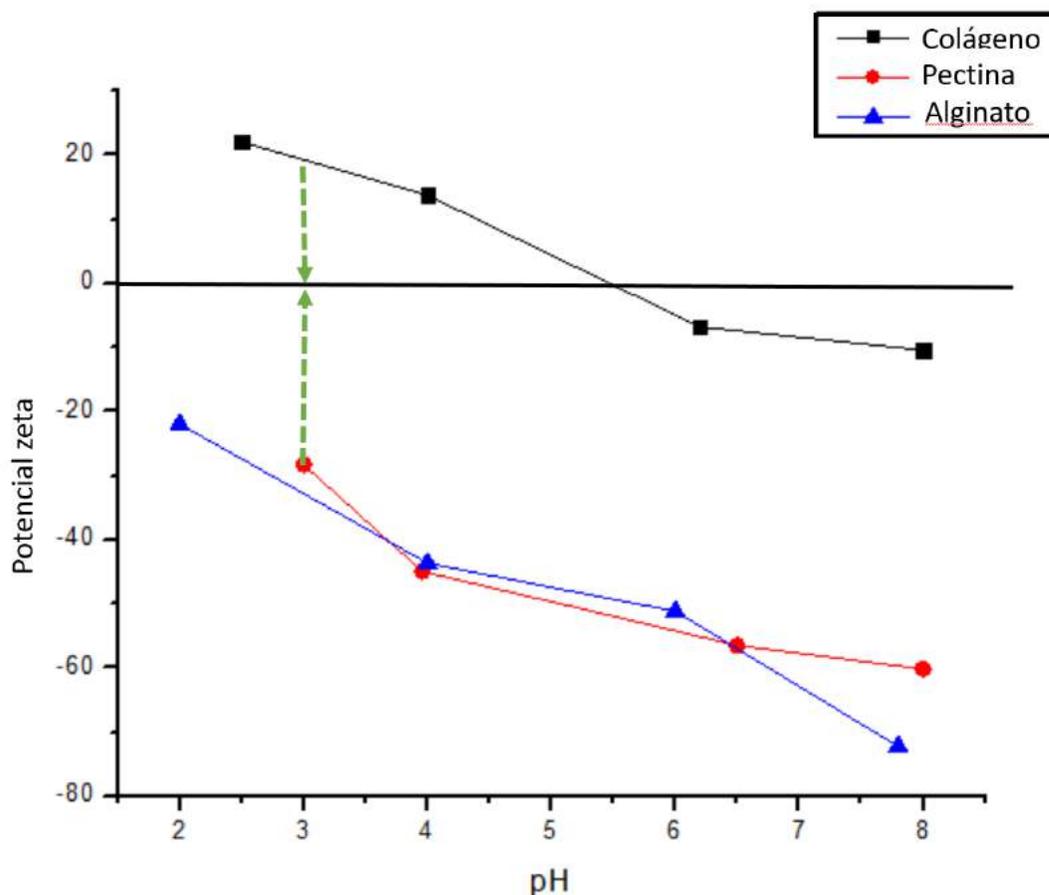
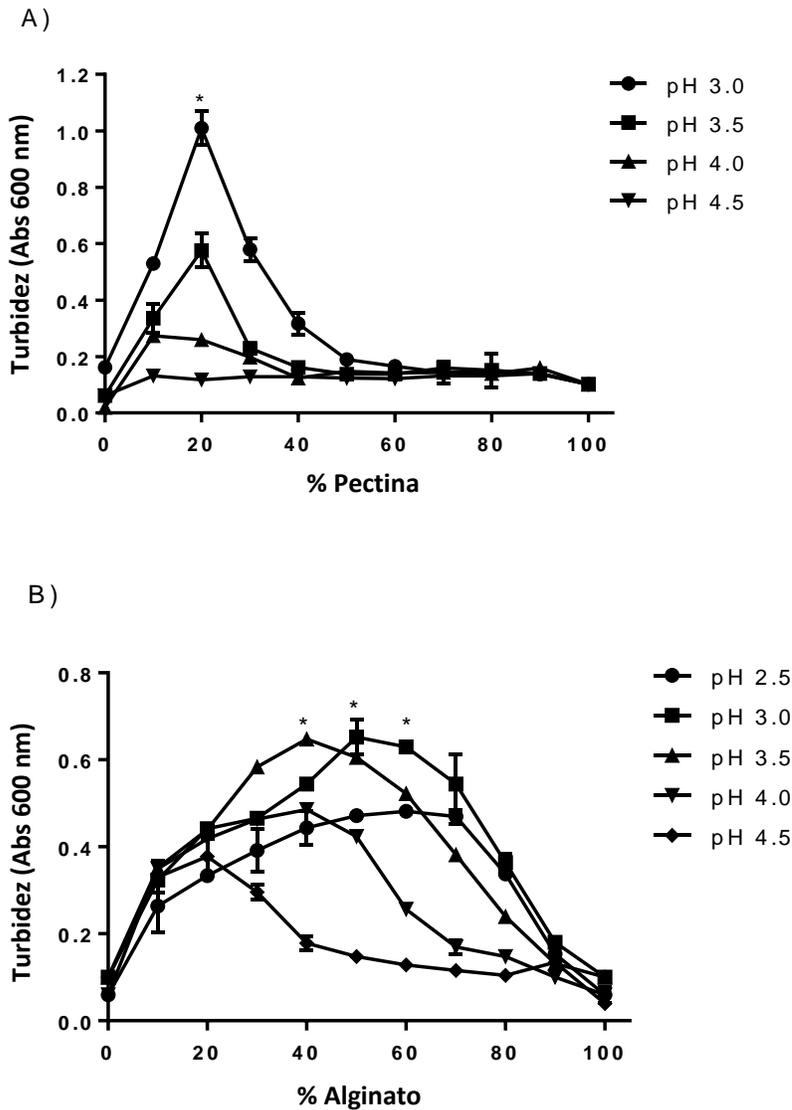


Figura 6.3. Potencial zeta de biopolímeros.

En las Figuras 6.4A y 6.4B se muestra el efecto del pH y la proporción de los sistemas pectina-colágeno y alginato-colágeno, respectivamente. Para el sistema pectina-colágeno la máxima turbidez se presenta en la proporción de 20% de pectina con 80% de colágeno a distintos valores de pH, siendo la máxima turbidez en el pH de 3. Para el caso del sistema alginato-colágeno, se obtuvieron 3 valores máximos de turbidez en los cuales no hubo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ): 40% alginato-60% colágeno a pH de 3.5; 50% alginato-50% colágeno a pH 3 y 60% de alginato-40% de colágeno a pH 3. Para los experimentos posteriores se escogió el sistema de 50-50% de alginato-colágeno a pH de 3 por presentar el máximo valor de turbidez.

Hay que señalar que la diferencia entre las proporciones de ambos sistemas de pared tiene que ver principalmente con el número de interacciones electrostáticas y el tipo de interacciones como los enlaces de hidrógeno entre los grupos catiónicos en el colágeno y los grupos carboxilo de cada polisacárido. El alginato tiene grupos carboxilo en cada unidad de azúcar (Thies, 2007), mientras que la pectina puede tener uno o más grupos carboxilo en función de su grado metoxilo.

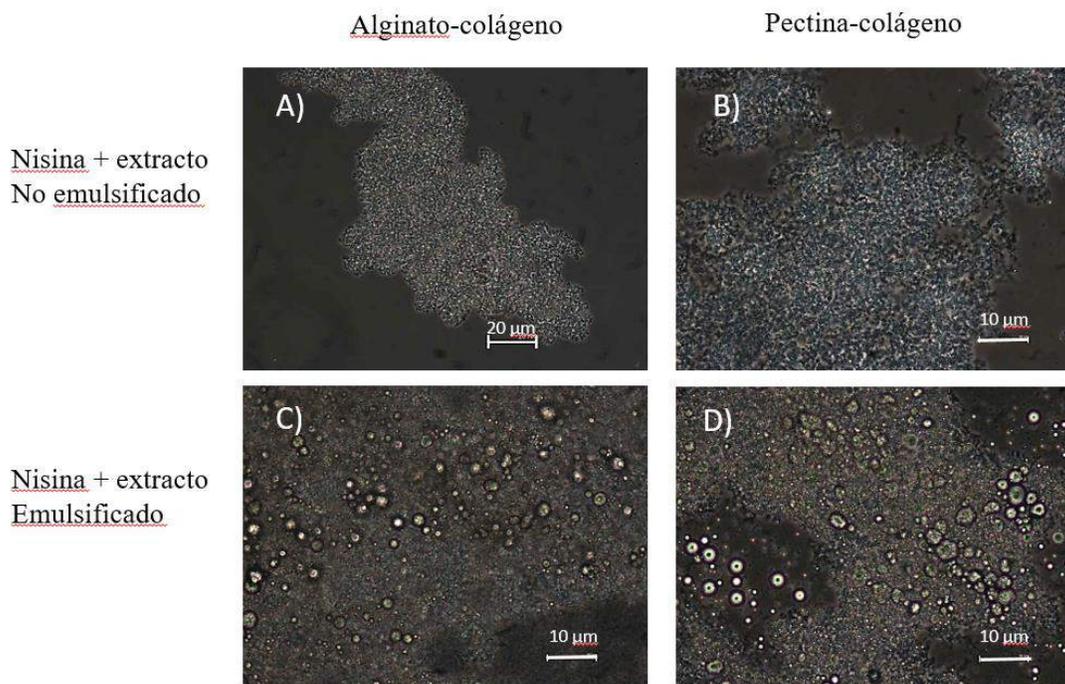


**Figura 6.4. Efecto del pH y de la proporción de colágeno-polisacárido en la absorbancia (600 nm). A) Pectina-Colágeno. B) Alginato-Colágeno. \* $p < 0.05$ .**

### 6.2.2 Efecto de los métodos de incorporación del núcleo en los coacervados

En la Figura 6.5 se presentan las micrografías en contraste de fase de las preparaciones de los coacervados con la mezcla de extracto de la cáscara de aguacate y nisina. Las Figuras 6.5A y 6.5B presentan los sistemas no emulsionados donde se observan aglomerados con formas irregulares. Las Figuras 6.5C y 6.5D muestran las micrografías de los sistemas

emulsificados, en los cuales no sólo se observan aglomerados como los en los sistemas no emulsionados, sino que también se observan gotas de aceite. El sistema pectina-colágeno (Figura 6.5D) presentó más gotas de aceite libre en comparación con el sistema alginato-colágeno (Figura 6.5C). La presencia de aglomerados en los sistemas de coacervados ha sido descrita por otros autores, quienes reportaron que esta morfología está relacionada con la eficiencia de encapsulamiento en hidrolizados de caseína (Mendanha et al., 2009). También se observó que las microcápsulas con núcleo emulsionado presentaron un mayor tamaño de partícula en suspensión que las no emulsionadas, probablemente debido a la presencia de las gotas de aceite. El promedio del tamaño de partícula de los sistemas emulsionados fue de  $213.37 \pm 1.65 \mu\text{m}$  para alginato-colágeno y  $194.41 \pm 4.5 \mu\text{m}$  para pectina-colágeno. El tamaño de partícula promedio de los sistemas con núcleo no emulsionado fue de  $181.04 \pm 0.67 \mu\text{m}$  para alginato-colágeno y  $124.21 \pm 1.5 \mu\text{m}$  para el sistema pectina-colágeno. Cabe mencionar que, hasta el momento con las micrografías no se puede asegurar que el extracto de cáscara de aguacate o nisina estén encapsulados.



**Figura 6.5. Micrografías de contraste de fases (40X) de las preparaciones de microcápsulas a pH 3.** A) Alginato-colágeno con núcleo no emulsionado. B) Pectina-colágeno con núcleo no emulsionado. C) Alginato-colágeno con núcleo emulsionado. D) Pectina-colágeno con núcleo emulsionado.

### **6.2.3 Eficiencia de encapsulamiento, carga, rendimiento, humedad, liberación y Aw.**

La Tabla 6.5 presenta los valores promedio de humedad, Aw, eficiencia de encapsulamiento, de carga y eficiencia de atrapamiento para cada uno de los sistemas en estudio. No hubo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos para el rendimiento de encapsulamiento, sugiriendo que los factores de tipo de pared, método de secado y método de incorporación del núcleo no tienen efecto en el rendimiento. Sin embargo, el método de secado parece tener una tendencia a incrementar el rendimiento de encapsulamiento (entre 69.28 y 73.69% a  $p < 0.05$ ). Los valores de rendimiento de encapsulamiento de este estudio fueron ligeramente mayores a los reportados por otros sistemas como gelatina-goma arábica, proteínas de suero-carboximetilcelulosa y aislados de proteína de soya-goma arábica (Jun-xia et al., 2011; Koupantsis et al., 2014; Wang et al., 2015) y esto es probablemente debido al tipo de pared, a las interacciones con el núcleo y otros factores como la temperatura.

Por otra parte, cuando se analizaron las significancias de factores en estudio, se observó que el método de secado y el método de incorporación del núcleo, son relevantes para el rendimiento de encapsulamiento (Tabla 6.6). El análisis de datos mediante un gráfico de PCA (Figura 6.6) en el que se describe la correlación entre las variables respuesta (vectores en rojo) y las corridas experimentales (números en azul), se observa que el rendimiento de encapsulamiento, las corridas 5 y 6 (diferente sistema de pared y mismo método de incorporación de núcleo y secado por aspersión) son las que se describen mejor para esta variable respuesta.

**Tabla 6.5. Eficiencia de encapsulamiento, rendimiento, carga, humedad, Aw y liberación de los diferentes sistemas de microcápsulas.**

Exp	Pared	Emul	Método de secado	EY (%)	EEn (%)	ELn (%)	EEx (%)	ELx (%)	Humedad (%)	Aw	Liber (%)
1	COL-ALG	Si	FRD	67.63 ± 2.47 <sup>a</sup>	72.80 ± 1.98 <sup>c</sup>	3.05 ± 0.08 <sup>d</sup>	72.80 ± 1.74 <sup>c</sup>	4.58 ± 0.19 <sup>d</sup>	6.30 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.342 ± 0.03 <sup>a</sup>	16.52 ± 0.23 <sup>a</sup>
2	COL-PEC	Si	FRD	66.95 ± 1.85 <sup>a</sup>	79.00 ± 2.13 <sup>b</sup>	3.19 ± 0.06 <sup>d</sup>	77.70 ± 1.60 <sup>b</sup>	4.70 ± 0.13 <sup>d</sup>	5.28 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.280 ± 0.03 <sup>ab</sup>	15.42 ± 0.33 <sup>b</sup>
3	COL-ALG	No	FRD	58.72 ± 5.92 <sup>ac</sup>	66.50 ± 2.31 <sup>e</sup>	13.59 ± 1.23 <sup>a</sup>	67.00 ± 2.50 <sup>d</sup>	20.54 ± 2.06 <sup>a</sup>	3.50 ± 0.07 <sup>e</sup>	0.244 ± 0.01 <sup>b</sup>	12.32 ± 0.11 <sup>f</sup>
4	COL-PEC	No	FRD	61.07 ± 5.3 <sup>abc</sup>	69.88 ± 1.10 <sup>cd</sup>	11.64 ± 1.47 <sup>b</sup>	69.64 ± 1.55 <sup>cd</sup>	17.41 ± 2.25 <sup>b</sup>	3.10 ± 0.07 <sup>f</sup>	0.256 ± 0.01 <sup>b</sup>	13.60 ± 0.19 <sup>e</sup>
5	COL-ALG	Si	SPD	71.23 ± 1.73 <sup>a</sup>	82.14 ± 1.18 <sup>ab</sup>	3.30 ± 0.07 <sup>d</sup>	81.36 ± 1.27 <sup>ba</sup>	4.91 ± 0.08 <sup>d</sup>	5.02 ± 0.08 <sup>c</sup>	0.258 ± 0.02 <sup>b</sup>	10.30 ± 0.21 <sup>g</sup>
6	COL-PEC	Si	SPD	71.79 ± 2.07 <sup>a</sup>	84.66 ± 1.20 <sup>a</sup>	3.24 ± 0.11 <sup>d</sup>	82.96 ± 1.25 <sup>a</sup>	4.76 ± 0.17 <sup>d</sup>	4.68 ± 0.08 <sup>d</sup>	0.232 ± 0.01 <sup>b</sup>	9.48 ± 0.08 <sup>h</sup>
7	COL-ALG	No	SPD	69.28 ± 2.09 <sup>ab</sup>	63.70 ± 1.31 <sup>e</sup>	11.42 ± 0.31 <sup>b</sup>	64.34 ± 2.63 <sup>d</sup>	17.30 ± 0.73 <sup>b</sup>	3.06 ± 0.05 <sup>f</sup>	0.210 ± 0.01 <sup>c</sup>	13.66 ± 0.13 <sup>d</sup>
8	COL-PEC	No	SPD	73.60 ± 0.60 <sup>a</sup>	68.28 ± 1.06 <sup>de</sup>	9.73 ± 0.11 <sup>c</sup>	67.08 ± 2.48 <sup>d</sup>	14.33 ± 0.46 <sup>c</sup>	2.46 ± 0.11 <sup>g</sup>	0.234 ± 0.07 <sup>b</sup>	14.42 ± 0.15 <sup>c</sup>

Los datos se expresan como el promedio ± desviación estándar. N= 5 experimentos independientes.

Valores con diferentes letras (a-h) dentro de la misma columna son diferentes significativamente ( $p < 0.05$ ).

Exp= número de experimento o corrida, COL= colágeno, ALG=alginato, PEC=pectina, FRD=liofilización, SPD=secado por aspersión, Emul=emulsion, EY=rendimiento de la encapsulación, EEn=eficiencia de encapsulamiento de nisina, ELn=eficiencia de carga para nisina, EEx=eficiencia de encapsulamiento del extracto de cáscara de aguacate, ELx=eficiencia de carga para el extracto de la cáscara de aguacate, Aw=actividad acuosa, Liber=Liberación en agua.

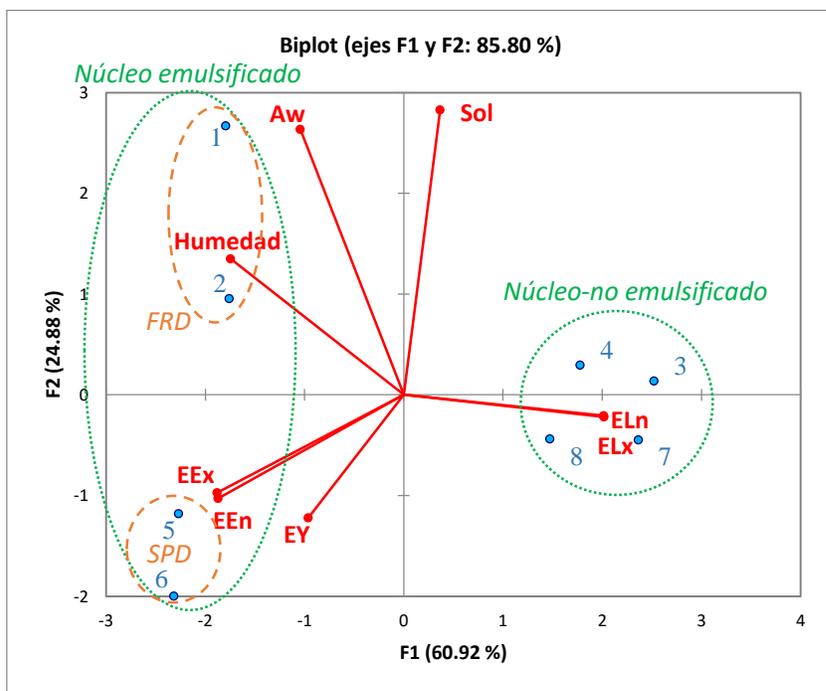
**Tabla 6.6. Significancias (valores *p*) de los factores para cada una de las variables respuesta.**

<b>Factor</b>	<b>EY</b>	<b>EEn</b>	<b>ELn</b>	<b>EEx</b>	<b>ELx</b>	<b>Moisture</b>	<b>Aw</b>	<b>Liber</b>
A	0.2601	<0.0001*	0.0001*	<0.0001*	0.0001*	<0.0001*	0.6264	0.6264
B	0.0134*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*
C	<0.0001*	<0.0001*	0.0001*	0.0015*	0.0002*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*
AB	0.2428	0.7112	0.0001*	0.6534	0.0001*	0.0052*	<0.0001*	<0.0001*
AC	0.5764	0.2318	0.9597	0.2045	0.9451	0.0004*	0.3329	0.3329
BC	0.0151*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*
ABC	0.8998	0.0225	0.6357	0.1783	0.7686	<0.0001*	0.0025	0.0025

A, B y C son los factores en estudio. A=Sistema de pared, B=método de incorporación del núcleo, C=método de secado. AB, BC y ABC son las interacciones entre los factores.

\*  $p < 0.05$ .

EY=rendimiento de encapsulamiento, EEn=eficiencia de encapsulamiento para nisina, ELn=eficiencia de carga para nisina, EEx=eficiencia de encapsulamiento para el extracto de cáscara de aguacate, ELx=eficiencia de carga para el extracto de la cáscara de aguacate, Aw=actividad acuosa, Libl=liberación.



**Figura 6.6. Gráfico de componentes principales.** Las variables respuestas se presentan en vectores rojos. Los números en azul, corresponden a las combinaciones experimentales o corridas estudiadas, de acuerdo a la Tabla 7. En círculos verdes (.....): Grupo de microcápsulas con núcleo emulsificado y no emulsificado. En círculos naranjas (----): grupo de secado por aspersión (SPD) y grupo de liofilización (FRD). EY=rendimiento de la encapsulación, EEn=eficiencia de encapsulamiento de nisina, ELn=eficiencia de carga para nisina, EEx=eficiencia de encapsulamiento del extracto de cáscara de aguacate, ELx=eficiencia de carga para el extracto de la cáscara de aguacate, Aw=actividad acuosa, Liber=Liberación en agua.

La eficiencia de encapsulamiento de la nisina y del extracto de cáscara de aguacate (EEn y EEx) son estadísticamente diferentes para los tratamientos con diferentes métodos de secado diferentes métodos de incorporación del núcleo y diferentes sistemas de pared (Tabla 6.5). Cada uno de los factores por sí solos influyen en esta variable respuesta, sin embargo, sus interacciones no son significativas (Tabla 6.6). Nuevamente los experimentos 5 y 6 (microcápsulas emulsionadas y secadas por aspersión) presentaron los mayores valores en la eficiencia de atrapamiento para ambos componentes activos a encapsular (Figura 6.6). El método de coacervación tuvo mayor eficiencia de encapsulamiento para la nisina que los otros métodos de encapsulamiento como el de secado por aspersión con zeína

(36.65-57.89%) o por atomización en alginato-goma guar (22.08-37.99%) (Narsaiah et al., 2014; Xiao et al., 2011) pero su eficiencia es menor comparada con la del encapsulamiento por liposomas (88.9-100%) (Malheiros et al., 2012) lo que sugiere que el método de coacervación puede ser una opción para encapsular bacteriocinas con buen rendimiento. Finalmente, la eficiencia de encapsulamiento del extracto antioxidante es similar a otros reportes donde la encapsulación por coacervación tiene una eficiencia de 45.9-77.3% para  $\beta$ -caroteno en un sistema de aislado de proteína de leche-goma acacia (Jain et al., 2015).

La carga de encapsulamiento (ELn y ELx) no presentó diferencias significativas para los sistemas con el mismo método de emulsión (Tabla 6.5). Sin embargo, la interacción de los tres factores en estudio si tiene un efecto (Tabla 6.6). Obteniendo los valores más altos para el sistema de alginato-colágeno con núcleo no emulsionado (Tabla 6.5, corrida 3), el cual se encuentra en el cuadrante superior izquierdo del gráfico de PCA (Figura 6.6). Los valores más altos de eficiencia de carga involucran que el núcleo esté más cerca de la superficie de la microcápsula, lo que implicaría una rápida degradación o una rápida salida del material. Los valores más bajos de eficiencia de carga confieren una mayor protección al compuesto a encapsular, lo que a su vez está relacionado con el grosor de la pared que forma la microcápsula, su morfología y tamaño final (Oxley, 2014; Vasisht, 2014a). En este estudio, los sistemas con la incorporación del núcleo emulsionado presentan los valores de carga más bajos, y fueron las corridas 1, 2, 5 y 6 (Figura 6.6).

La humedad y el Aw se determinaron como parámetros de actividad microbiológica de los productos en polvo. Las microcápsulas obtenidas por el método de secado y con incorporación del núcleo por emulsión presentaron mayores valores de humedad que los obtenidos por el método de secado por aspersión (Tabla 6.5). Sin embargo, los tres factores por sí solos y sus interacciones son significativos para la humedad (Tabla 6.6) la cual fue mayor en la corrida 2, que corresponde al sistema pectina-colágeno, a la incorporación del núcleo en emulsión y liofilización (Figura 6.6). Resultados similares fueron reportados por (Eratte et al., 2015), donde ellos sugieren que el mayor contenido de humedad en las microcápsulas liofilizadas que contienen aceite fue debido a la presencia de gotas de aceite porque reducen la evaporación del agua actuando como barrera en la evaporación con lo que se incrementa la hidrofobicidad de las microcápsulas y se limita la transferencia de las moléculas de agua.

El  $A_w$  no presentó una clara tendencia en comparación a la humedad. Sin embargo, la incorporación del núcleo, el método de secado y la interacción de ambos factores, juegan un papel muy importante en esta respuesta (Tabla 6.6). Los valores más altos de  $A_w$  los presentó la corrida 1 (alginato-colágeno, núcleo emulsificado y liofilizado).

Por otro lado, la liberación de los bioactivos es estadísticamente diferente para todas las muestras, los cuales no sobrepasan el 20% debido a que las microcápsulas obtenidas por coacervación son poco solubles en agua. El intervalo de valores para esta parámetro es muy similar a los reportados por (Comunian et al., 2013; Rocha-Selmi et al., 2013). Los valores más bajos de liberación se presentaron en los sistemas elaborados con el núcleo emulsionado y secados por aspersion (Tabla 6.5), siendo estos dos factores individuales los que presentan diferencia significativa en esta respuesta (Tabla 6.6). Las corridas experimentales 5 y 6 corresponden a las muestras que presentaron menor liberación (Figura 6.6). La menor liberación de los bioactivos de las microcápsulas podría estar relacionada con una liberación gradual del compuesto encapsulado durante el almacenamiento (Comunian et al., 2013).

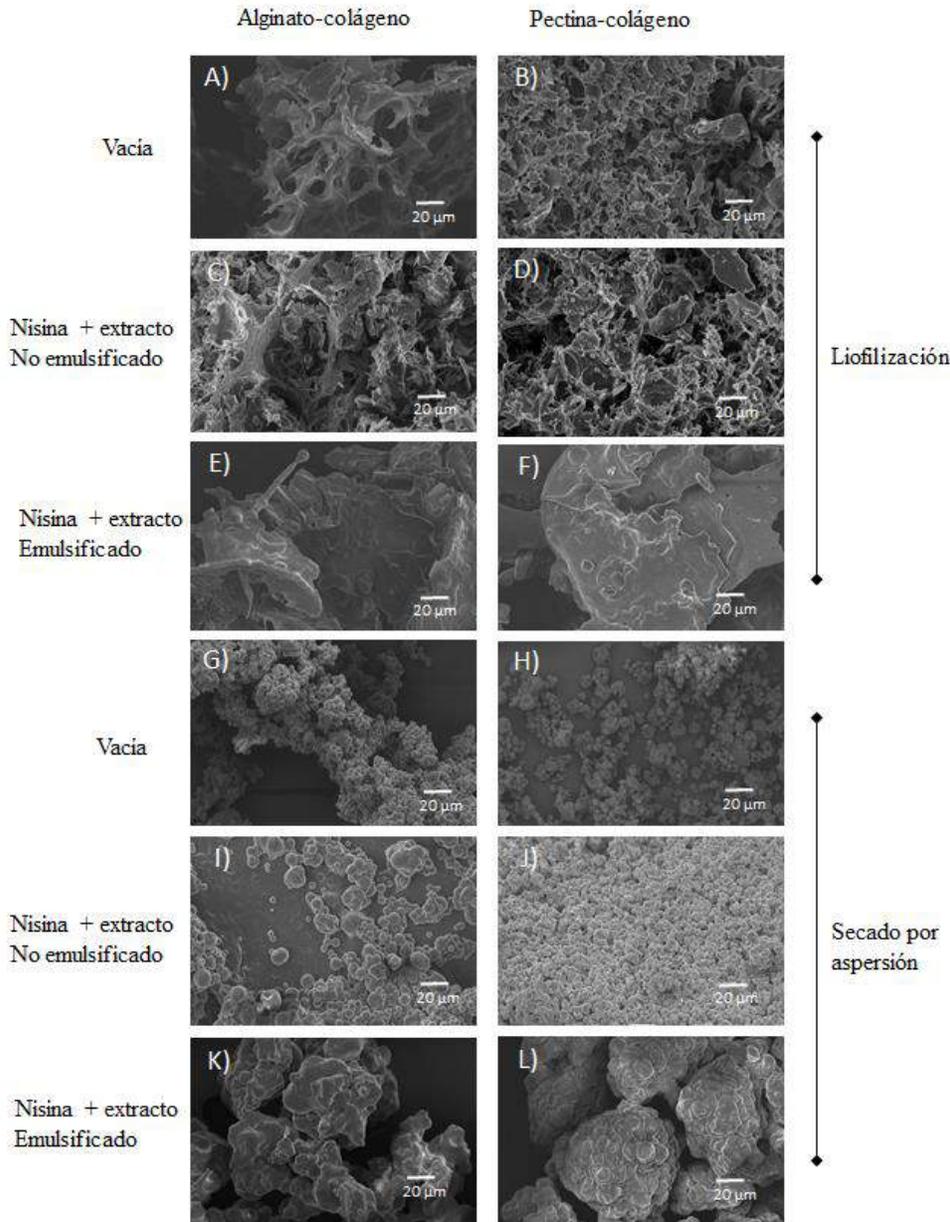
Es importante mencionar que las microcápsulas a las que se les adicionó el núcleo no emulsificado presentaron el mismo color que el del extracto de la cáscara de aguacate ( $L^*=41.2$ ,  $a^*=10.7$ ,  $b^*=21.16$ ) lo cual puede indicar que el núcleo (la nisina y el extracto) estaba en la superficie o formaba parte la pared, conformando una microesfera y no una microcápsula. El color de las microcápsulas emulsionadas, fue blanco.

#### **6.2.4 Morfología de coacervados**

La Figura 6.7 muestra las micrografías de la microscopía electrónica para los sistemas de coacervación y en ellas resalta la principal diferencia entre los métodos de secado. Las microcápsulas obtenidas por liofilización son amorfas mientras que las de secado por aspersion presentan una forma semiesférica con diversos tamaños. Las microcápsulas liofilizadas presentan una estructura parecida a una esponja, especialmente las cápsulas vacías (Figura 6.7A y 6.7B). La estructura parecida a esponja se pierde por la adición del núcleo (Figura 6.7C y Figura 6.7D), observándose esta pérdida cuando el núcleo está emulsionado (Figura 6.7E y Figura 6.7F). Las microcápsulas liofilizadas forman una red plana con bordes afilados. La morfología de las microcápsulas liofilizadas de este estudio es similar a la reportada por (Koupantsis et al., 2014) al encapsular  $\beta$ -pineno en

carboximetilcelulosa con aislado de proteína de leche. En el método de incorporación del núcleo sin emulsionar, los polifenoles presentes en el extracto de cáscara de aguacate pueden actuar como entrecruzadores al reaccionar con los residuos de los aminoácidos de las proteínas (Strauss & Gibson, 2004). Incluso la nisina puede estar formando parte de la pared del sistema, por ser una proteína, lo que significaría la formación de una microesfera y no una microcápsula. Si fuera el caso, la actividad de la nisina disminuiría, debido a que esta interaccionando con el polisacárido.

Las microcápsulas resultantes del secado por aspersion presentan cavidades y son más esponjosas que las obtenidas por el método de liofilización (Figura 6.7G y Figura 6.7H). Sin embargo, la presencia de las cavidades disminuye con la adición del núcleo (Figura 5.9I y Figura 6.7J), sobretodo con el núcleo emulsificado (Figura 6.7K y Figura 6.7L). También es importante mencionar que la incorporación del núcleo incrementa el tamaño de la microcápsula. Adicionalmente, las microcápsulas pierden la forma esférica con el núcleo, tal es el caso del sistema de alginato-colágeno. Lo anterior se puede deber a la retención de agua en el sistema (Eratte et al., 2015). Las microcápsulas que se obtuvieron por el secado por aspersion presentaron una estructura cerrada, a diferencia de las liofilizadas que formaron redes únicamente.



**Figura 6.7. Micrografías de microscopía electrónica de los coacervados en polvo (600 X).** **A)** Alginato-Colágeno, vacía y liofilizada. **B)** Pectina-Colágeno, vacío y liofilizado. **C)** Alginato-Colágeno con núcleo no emulsionado, y liofilizada (Corrida 3). **D)** Pectina-Colágeno con núcleo no emulsificado y liofilizada (Corrida 4). **E)** Alginato-Colágeno con núcleo emulsificado, y liofilizada (Corrida 1). **F)** Pectina-Colágeno con núcleo emulsificado y liofilizada (Corrida 2). **G)** Alginato-Colágeno, vacía y secada por aspersión. **H)** Pectina-Colágeno, vacía y secada por aspersión. **I)** Alginato-Colágeno con núcleo no emulsificado y secada por aspersión (Corrida 7). **J)** Pectina-Colágeno con núcleo no emulsificado y secada por aspersión (Corrida 8). **K)** Alginato-Colágeno con núcleo emulsionado y secada por aspersión (Corrida 5). **L)** Pectina-Colágeno con núcleo emulsionado y secada por aspersión (Corrida 6).

### **6.3 Incorporación de microcápsulas en un sistema cárnico.**

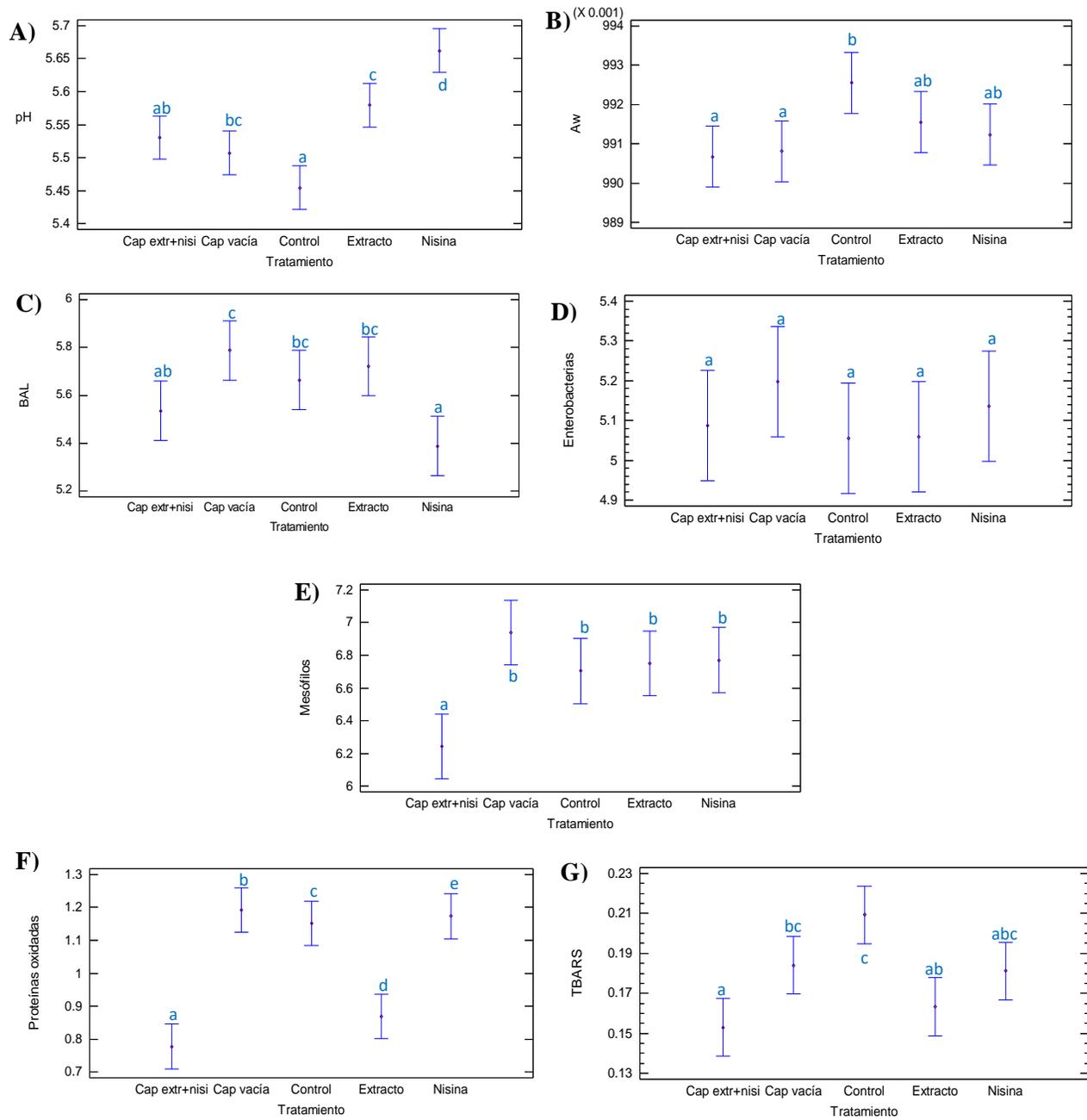
#### **6.3.1 Estabilidad fisicoquímica y microbiológica.**

En la Figura 6.8 se muestran las gráficas de medias de las variables respuestas para cada uno de los tratamientos, cabe mencionar que las microcápsulas que se incorporaron en carne molida fueron las de pectina-colágeno con núcleo emulsificado y secadas por aspersión, por ser aquellas que presentaron una mayor eficiencia de atrapamiento.

Los tres factores de estudio (tiempo, empaque y tratamiento) y sus interacciones tienen un efecto significativo en el pH el cual cambia en función de los días de almacenamiento. Los cambios más evidentes se observaron en las muestras con empaque permeable. De los diversos tratamientos, la carne tratada con nisina sin encapsular no presentó variaciones tan drásticas en el pH comparadas con la carne control. Ese efecto que se pierde al encapsularla y estar presente con el extracto, probablemente debido a que la presencia de los extractos y de los polímeros de la cápsula acidifiquen el medio o permitan el crecimiento de bacterias ácido lácticas ya que la presencia de la cápsula vacía en la carne presentó un mayor conteo de estas bacterias, tanto en empaque permeable como al vacío. Probablemente, las cápsulas (pectina) sirvieron como fuente de nutrientes de bacterias lácticas que producen pectin esterasas o poligalacturonasas (Karam & Belarbi, 1995).

De los 3 factores en estudio, el empaque por sí solo no tuvo un efecto significativo en los valores de  $A_w$  de las muestras, sin embargo, éste (tipo de empaque) al interactuar con los dos factores en estudio, sí presentó un efecto significativo. Durante el tiempo de almacenamiento, los valores de  $A_w$  disminuyeron observándose un descenso mayor en el tratamiento con las cápsulas vacías y las que contienen el extracto y la nisina. El tratamiento control y del extracto con empaque permeable no presentó cambios significativos en los valores de  $A_w$ .

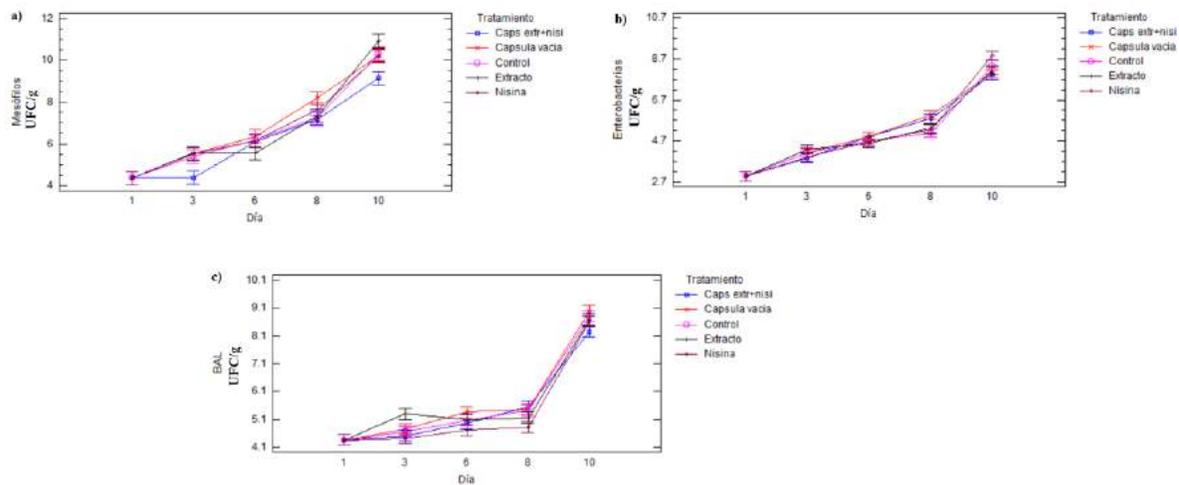
En el anexo 1 se incluyen los datos obtenidos de pH,  $A_w$ , conteo de mesófilos, enterobacterias, BAL, oxidación de lípidos y de proteínas para cada uno de los días de análisis para las muestras de carne. En el anexo 2 se presentan las gráficas de medias e interacciones de los factores para cada una de las variables respuestas y los datos del ANOVA.



**Figura 6.8. Gráficos de medias para los diferentes tratamientos y variables respuestas. A) pH, B) Aw, C) BAL, D) Enterobacterias, E) Mesófilos, F) Proteínas oxidadas, G) TBARS. Las letras (a-e) dentro de la misma gráfica son diferentes significativamente ( $p < 0.05$ ).**

La presencia de mesófilos aerobios y de enterobacterias aumentaron conforme transcurrieron los días de almacenamiento, siendo más notable este incremento en el empaque permeable debido a la presencia de oxígeno que favorece el crecimiento de estas bacterias. También se observó la tendencia de un mayor número de microorganismos en la carne que contenía cápsulas vacías. El tratamiento de las cápsulas con extracto y nisina, disminuyeron el conteo de mesófilos (Figura 6.9).

Para las BAL, también el factor tiempo fue importante para el crecimiento y desarrollo de estas bacterias, sin embargo, fue más notable en los tratamientos empacados al vacío, por ser bacterias anaerobias facultativas (Batt, 2014). También se observó una ligera disminución en la presencia de la BAL, en el tratamiento de nisina sin encapsular, ya que las bacterias lácticas son bacterias blanco de la nisina (Delves-Broughton & Weber, 2011), efecto que se ve disminuido al encapsular la nisina.

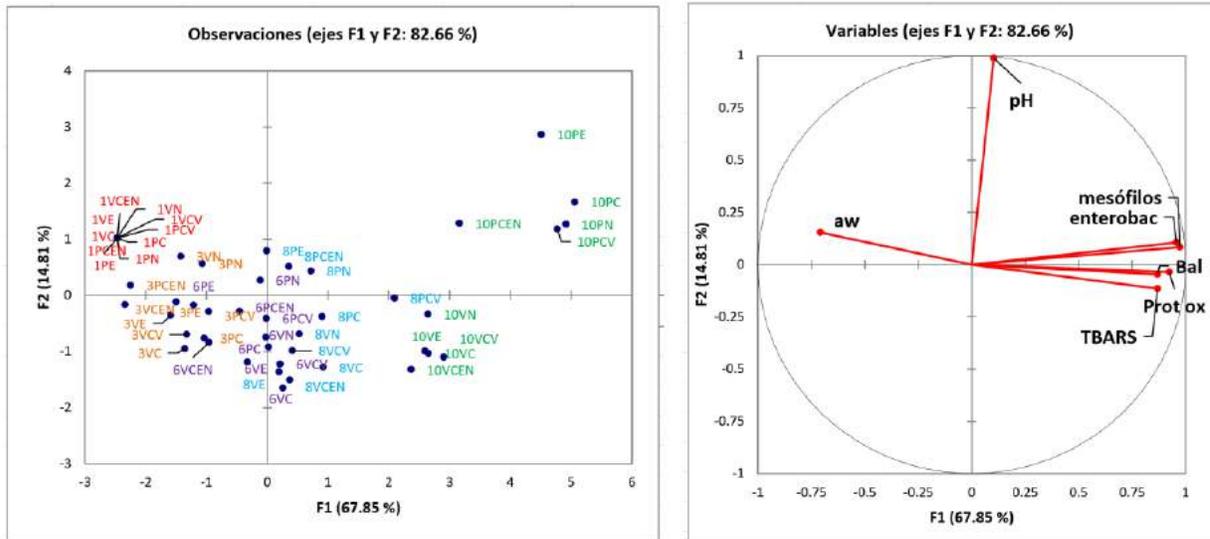


**Figura 6.9. Conteo de mesófilos, enterobacterias y BAL en carne molida, en función del tiempo.**

En la estabilidad oxidante de las muestras, los tres factores de estudio fueron estadísticamente significativos. Los valores de TBARS y de oxidación proteica fueron menores en los tratamientos con empaque al vacío, y en los que contenían cápsulas con extracto y nisina; así como con el tratamiento de extracto sin encapsular. La presencia de polifenoles en el extracto de la cáscara de aguacate disminuyó la oxidación en carne molida, mismo efecto observado en otro estudio con carne para hamburguesa (Rodríguez-Carpena, Morcuende, Andrade, et al., 2011) lo que indica que los compuestos obtenidos de los desechos agroindustriales pueden tener un uso adicional en la industria de alimentos y

en productos cárnicos como conservadores. Estudios similares en los que se emplearon otros desechos agroindustriales como fuente de antioxidantes, han indicado que disminuyó la oxidación lipídica y proteica (Monteiro et al., 2014; Zhang, 2015). Interesantemente, la oxidación lipídica y proteica fueron mucho menores en los tratamientos que contenían el extracto encapsulado, probablemente a la liberación gradual del extracto de las microcápsulas.

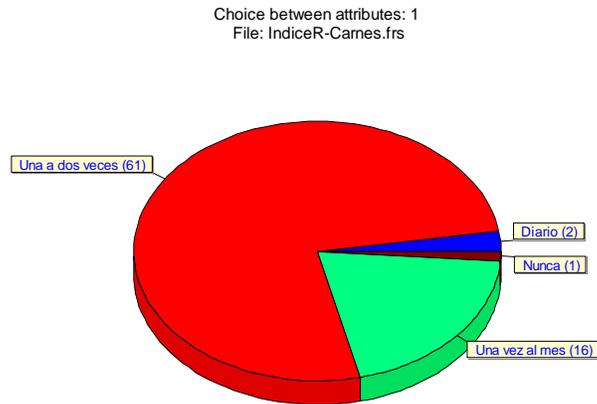
En la gráfica de PCA (Figura 6.10) se muestra que los tratamientos de los últimos días de almacenamiento (días 8 y 10) se describen mediante las variables respuestas microbiológicas y de oxidación; mientras que en los primeros días (día 1 y 3) se describen por la variable de Aw.



**Figura 6.10. PCA de las muestras de carne.** Los diferentes tratamientos se codificaron de la siguiente manera: el número indica el día de muestreo; “V” y “P” se refieren al tipo de empaque, vacío y permeable respectivamente; y las letras “E”, “C”, “N”, “CV” y “CEN” significan extracto, control, nisina, cápsula vacía y cápsula con extracto y nisina, respectivamente.

### 6.3.2 Análisis sensorial. Prueba “A no A” modificada para índice R.

De los 80 consumidores que participaron en el análisis sensorial, sólo 1 mencionó que no consumía carne mientras que 61 personas (76.25%) mencionaron que consumen carne de una a dos veces por semana. La frecuencia de consumo de carne se presenta en la Figura 6.11.



**Figura 6.11. Frecuencia de consumo de carne en los consumidores de la prueba sensorial.**

En la Tabla 6.7 se presenta el número de respuestas dadas para cada una de las muestras en la prueba y en la Tabla 6.8 se muestra el análisis estadístico (índice R y de chi-cuadrada) de los datos de la Tabla 6.7.

Los valores de índice R (mayores a 50) y de  $\chi^2$  (cercaos a 0.05) (Tabla 6.8), indican que los consumidores detectaron diferencias entre las muestras de carne con cápsulas, tanto las vacías como las que contenían el extracto y la nisina. Algunas de las observaciones que declararon los jueces durante la prueba, fue que algunas de las muestras eran más jugosas, probablemente se referían a las muestras con cápsulas, al poseer una mayor retención de agua, observada en la Tabla 6.9. La muestra que contenía el extracto sin encapsular no fue estadísticamente diferente al control, a pesar de que se ha reportado que los polifenoles presentan sabor amargo o astringencia en los alimentos (Lesschaeve & Noble, 2005).

**Tabla 6.7. Frecuencias de respuestas de la prueba sensorial.**

Muestra	Igual a “R” con seguridad	Igual a “R” pero no estoy seguro	No es igual a “R” pero no estoy seguro	No es igual a “R” con seguridad
Control o referencia (carne sin tratamiento)	18	25	19	18
Carne con cápsula vacía	8	23	21	28
Carne con cápsula de extracto y nisina	6	22	25	27
Carne con extracto sin encapsular	14	28	20	18
Total	46	98	85	91

**Tabla 6.8. Valores de índice R,  $\chi^2$  y significancia para cada muestra de carne**

	Carne con cápsula vacía	Carne con cápsula de extracto y nisina	Carne con extracto sin encapsular
Índice R	60.38	61.79	51.59
$\chi^2$	3.62	5.69	0.025
Significancia	0.057	0.016	0.874

### 6.3.3 Propiedades de textura, color y pérdida de agua por cocción de las muestras de carne cocida

En la Tabla 6.9 se presentan los datos de color, pérdida de agua por cocción y los datos del TPA para las diversas muestras de carne cocida empleadas en el análisis sensorial.

Las durezas de los diversos tratamientos no presentaron diferencias significativas entre ellas, sin embargo, sí fueron diferentes al control, siendo este último el más duro. La muestra de carne molida con extracto sin encapsular fue la única que presentó adhesividad y un menor valor de elasticidad. Los valores de cohesividad fueron iguales para todos los tratamientos mientras que la gomosidad y masticabilidad fueron diferentes para todos.

En cuanto al color, las diferencias estadísticas se presentaron principalmente en el tratamiento con cápsulas vacías, mientras que la pérdida de agua por cocción fue menor en los tratamientos que contenían cápsulas. Lo anterior se puede deber a que los tratamientos con cápsulas al no perder agua, presentaron un valor menor de luminosidad ( $L^*$ ),

comparado con las muestras que sí pierden agua, la cual se encuentra en la superficie, aumentando el valor  $L^*$ . También las muestras con cápsulas mostraron la tendencia de disminución en los valores de  $b^*$  (disminución en la intensidad del amarillo). La retención de agua en las muestras con cápsulas puede deberse a que las cápsulas están formadas con hidrocoloides, los cuales pueden interaccionar con el agua por puentes de hidrógeno entre los grupos funciones de los polisacáridos y el colágeno que no hayan participado en la formación de los coacervados.

**Tabla 6.9. Textura, color y pérdida de agua para las muestras de carne cocida.**

Parámetro	Control (carne sin tratamiento)	Carne con extracto sin encapsular	Carne con cápsulas vacías	Carne con cápsulas de extracto y nisina
Dureza (N)	146.55±5.59 <sup>a</sup>	105±7.07 <sup>b</sup>	123.53±5.0 <sup>b</sup>	108.35±2.33 <sup>b</sup>
Adhesividad	0.000 <sup>a</sup>	-0.042 <sup>b</sup>	0.000 <sup>a</sup>	0.000 <sup>a</sup>
Elasticidad	0.901±0.034 <sup>a</sup>	0.693±0.054 <sup>b</sup>	0.949±0.060 <sup>a</sup>	0.890±0.029 <sup>a</sup>
Cohesividad	0.902±0.003 <sup>a</sup>	0.861±0.009 <sup>a</sup>	0.896±0.012 <sup>a</sup>	0.832±0.033 <sup>a</sup>
Gomosidad	129.551±2.02 <sup>a</sup>	29.551±1.89 <sup>b</sup>	153.515±3.59 <sup>c</sup>	90.997±0.31 <sup>d</sup>
Masticabilidad	114.33±5.18 <sup>a</sup>	23.208±3.64 <sup>b</sup>	152.863±2.79 <sup>c</sup>	84.804±1.54 <sup>d</sup>
Color $L^*$	54.92±0.03 <sup>a</sup>	52.11±0.62 <sup>b</sup>	48.2±0.85 <sup>c</sup>	50.71±0.74 <sup>bc</sup>
$a^*$	5.04±0.007 <sup>b</sup>	5.11±0.014 <sup>b</sup>	5.77±0.035 <sup>a</sup>	5.02±0.028 <sup>b</sup>
$b^*$	13.84±0.063 <sup>a</sup>	13.88±0.014 <sup>a</sup>	12.44±0.163 <sup>b</sup>	13.59±0.424 <sup>a</sup>
Pérdida de agua por cocción (%)	29.7±1.13 <sup>ab</sup>	31.6±1.13 <sup>a</sup>	23.47±2.72 <sup>bc</sup>	19.5±1.27 <sup>c</sup>

Los datos se expresan como el promedio ± desviación estándar. N= 3 experimentos independientes.

Valores con diferentes letras (a-d) dentro de la misma fila son diferentes significativamente ( $p<0.05$ ).

## 7. CONCLUSIONES

Etapa 1. Los extractos de cáscara y semilla de aguacate presentaron actividad antioxidante siendo el de la cáscara el que presentó mayor actividad. Cuando este extracto se combinó con la nisina en una proporción de 61% de cáscara (1 mg extracto/1 mL) y 39 % de nisina (1mg/mL) se obtuvo una mezcla con capacidad antioxidante y antimicrobiana.

Etapa 2. La mezcla de nisina y cáscara de aguacate se encapsuló modificando diversos factores, obteniendo una mayor eficiencia de atrapamiento mediante el sistema pectina-colágeno (4:1 al 1%, pH 3), núcleo emulsionado (W/O) y secado por aspersion. Por otra parte, se obtuvo una mayor eficiencia de carga en el sistema alginato-colágeno (1:1, al 1 y 0.5% respectivamente, pH 3) con núcleo en suspensión y secado por liofilización.

Etapa 3. La aplicación de microcápsulas con mayor eficiencia de atrapamiento (pectina-colágeno) del extracto acuoso de cáscara de aguacate y nisina mejoraron la estabilidad oxidante de carne molida; a la vez que disminuyeron el crecimiento de bacterias lácticas, mesófilos y enterobacterias. Sin embargo, la incorporación de las cápsulas en la carne modifica sus características sensoriales y de textura.

## 8. PERSPECTIVAS

Etapa 1. Realizar la extracción de compuestos fenólicos de la cáscara y de semilla de aguacate empleando solventes de diferente polaridad para comparar y tal vez aumentar la capacidad antioxidante de los mismos, e incluso buscar alguno que presente capacidad antimicrobiana contra microorganismos patógenos.

Etapa 2. Realizar una cinética de liberación de las microcápsulas a diversos pH que se encuentren en los alimentos para conocer su comportamiento en diversas matrices alimentarias. También es recomendable hacer un estudio de estabilidad a la temperatura.

Etapa 3. Debido a que se percibió la diferencia sensorial en las muestras con microcápsulas, se debería realizar un perfil descriptivo de carne con las cápsulas para conocer cuáles son los descriptores que marcan esa diferencia con respecto a la carne sin tratamiento.

También se debería analizar el efecto fisicoquímico y microbiológico que la adición de estas microcápsulas tiene en otros productos alimenticios.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abriouel, H., Franz, C. M. A. P., Omar, N. B., & Galvez, A. (2011). Diversity and applications of Bacillus bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(1), 201-232.
- Bali, V., Panesar, P. S., & Bera, M. B. (2014). Potential of Immobilization Technology in Bacteriocin Production and Antimicrobial Packaging. *Food Reviews International*, 30(3), 244-263.
- Batt, C. A. (2014). LACTOBACILLUS | Introduction A2 - Tortorello, Carl A. BattMary Lou *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (pp. 409-411). Oxford: Academic Press.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Boon, C. S., Xu, Z., Yue, X., McClements, D. J., Weiss, J., & Decker, E. A. (2008). Factors affecting lycopene oxidation in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1408-1414.
- Burke, D. G., Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2013). 14 - Microbial production of bacteriocins for use in foods A2 - McNeil, Brian. In D. Archer, I. Giavasis & L. Harvey (Eds.), *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals* (pp. 353-384): Woodhead Publishing.
- CAC/RCP58-2005. Código de prácticas de higiene para la carne. Codex Alimentarius. Retrieved DECEMBER 14TH, 2015, from [www.codexalimentarius.org/input/download/standards/.../CXP\\_058s.pdf](http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/.../CXP_058s.pdf)
- Comunian, T. A., Thomazini, M., Alves, A. J. G., de Matos Junior, F. E., de Carvalho Balieiro, J. C., & Favaro-Trindade, C. S. (2013). Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. *Food Research International*, 52(1), 373-379.
- Charcosset, C. (2009). Preparation of emulsions and particles by membrane emulsification for the food processing industry. *Journal of Food Engineering*, 92(3), 241-249.
- Dabas, D., Elias, R. J., Lambert, J. D., & Ziegler, G. R. (2011). A Colored Avocado Seed Extract as a Potential Natural Colorant. *Journal of Food Science*, 76(9), C1335-C1341.
- Dalgleish, D. G. (2006). Food emulsions - Their structures and structure-forming properties. *Food Hydrocolloids*, 20(4), 415-422.
- De Vos, W. M., Kuipers, O. P., Van Der Meer, J. R., & Siezen, R. J. (1995). Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: Post-translationally modified antimicrobial peptides exported by Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 17(3), 427-437.
- De Vos, W. M., Mulders, J. W. M., Siezen, R. J., Hugenholtz, J., & Kuipers, O. P. (1993). Properties of nisin Z and distribution of its gene, nisZ, in Lactococcus lactis. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(1), 213-218.
- Delves-Broughton, J., & Weber, G. (2011). 3 - Nisin, natamycin and other commercial fermentates used in food biopreservation A2 - Lacroix, Christophe *Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation* (pp. 63-99): Woodhead Publishing.

- Dembitsky, V. M., Poovarodom, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Vearasilp, S., Trakhtenberg, S., & Gorinstein, S. (2011). The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. *Food Research International*, 44(7), 1671-1701.
- Desai, K. G. H., & Park, H. J. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23(7), 1361-1394.
- Ding, H., Chin, Y.-W., Kinghorn, A. D., & D'Ambrosio, S. M. (2007). Chemopreventive characteristics of avocado fruit. *Seminars in Cancer Biology*, 17(5), 386-394.
- Dreher, M. L., & Davenport, A. J. (2013). Hass Avocado Composition and Potential Health Effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(7), 738-750.
- Eastman, J. E., & Moore, C. O. (1984). Cold water soluble granular starch for gelled food composition. US Patent No. 4465702.
- Endreß, H. U., & Christensen, S. H. (2009). 12 - Pectins A2 - Phillips, G.O. In P. A. Williams (Ed.), *Handbook of Hydrocolloids (Second edition)* (pp. 274-297): Woodhead Publishing.
- Eratte, D., McKnight, S., Gengenbach, T. R., Dowling, K., Barrow, C. J., & Adhikari, B. P. (2015). Co-encapsulation and characterisation of omega-3 fatty acids and probiotic bacteria in whey protein isolate–gum Arabic complex coacervates. *Journal of Functional Foods*, 19, Part B, 882-892
- Espitia, P. J. P., Du, W.-X., Avena-Bustillos, R. d. J., Soares, N. d. F. F., & McHugh, T. H. (2014). Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties - A review. *Food Hydrocolloids*, 35, 287-296.
- Falowo, A. B., Fayemi, P. O., & Muchenje, V. (2014). Natural antioxidants against lipid-protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Research International*, 64, 171-181.
- Fang, T. J., & Tsai, H. C. (2003). Growth patterns of Escherichia coli O157:H7 in ground beef treated with nisin, chelators, organic acids and their combinations immobilized in calcium alginate gels. *Food Microbiology*, 20(2), 243-253.
- FAO. (2011). FAOSTAT. from <http://faostat.fao.org/desktopdefault.aspx?pageid=342&lang=es&country=138>
- Faustman, C., Sun, Q., Mancini, R., & Suman, S. P. (2010). Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Science*, 86(1), 86-94.
- Fu, L., Xu, B.-T., Xu, X.-R., Gan, R.-Y., Zhang, Y., Xia, E.-Q., & Li, H.-B. (2011). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry*, 129(2), 345-350.
- Gálvez, A., López, R. L., Abriouel, H., Valdivia, E., & Omar, N. B. (2008). Application of Bacteriocins in the Control of Foodborne Pathogenic and Spoilage Bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28(2), 125-152.
- Gaona-Gaona, L., Molina-Jijón, E., Tapia, E., Zazueta, C., Hernández-Pando, R., Calderón-Oliver, M., . . . Pedraza-Chaverri, J. (2011). Protective effect of sulforaphane pretreatment against cisplatin-induced liver and mitochondrial oxidant damage in rats. *Toxicology*, 286(1-3), 20-27.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107-1121.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7-8), 330-347.

- Hayes, J. E., Stepanyan, V., Allen, P., O'Grady, M. N., O'Brien, N. M., & Kerry, J. P. (2009). The effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on lipid oxidation and oxymyoglobin oxidation in bovine and porcine muscle model systems. *Meat Science*, *83*(2), 201-208.
- Hernández-Hernández, E., Ponce-Alquicira, E., Jaramillo-Flores, M. E., & Guerrero Legarreta, I. (2009). Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. *Meat Science*, *81*(2), 410-417.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Prior, R. L. (2002). High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(16), 4437-4444.
- Hurtado-Fernández, E., Carrasco-Pancorbo, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2011). Profiling LC-DAD-ESI-TOF MS method for the determination of phenolic metabolites from avocado (*Persea americana*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(6), 2255-2267.
- Irkin, R., & Esmer, O. K. (2015). Novel food packaging systems with natural antimicrobial agents. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(10), 6095-6111.
- Jain, A., Thakur, D., Ghoshal, G., Katare, O. P., & Shivhare, U. S. (2015). Microencapsulation by Complex Coacervation Using Whey Protein Isolates and Gum Acacia: An Approach to Preserve the Functionality and Controlled Release of  $\beta$ -Carotene. *Food and Bioprocess Technology*, *8*(8), 1635-1644.
- Jun-xia, X., Hai-yan, Y., & Jian, Y. (2011). Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chemistry*, *125*(4), 1267-1272.
- Juneja, V. K., Dwivedi, H. P., & Yan, X. (2012). Novel natural food antimicrobials. *Annual Review of Food Science and Technology*, *3*(1), 381-403.
- Karam, N. E., & Belarbi, A. (1995). Detection of polygalacturonases and pectin esterases in lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *11*(5), 559-563.
- Kawagishi, H., Fukumoto, Y., Hatakeyama, M., He, P., Arimoto, H., Matsuzawa, T., . . . Sugiyama, K. (2001). Liver injury suppressing compounds from avocado (*Persea americana*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(5), 2215-2221.
- Kosińska, A., Karamać, M., Estrella, I., Hernández, T., Bartolomé, B., & Dykes, G. A. (2012). Phenolic compound profiles and antioxidant capacity of *persea americana* mill. peels and seeds of two varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(18), 4613-4619.
- Koupantsis, T., Pavlidou, E., & Paraskevopoulou, A. (2014). Flavour encapsulation in milk proteins – CMC coacervate-type complexes. *Food Hydrocolloids*, *37*, 134-142.
- Kubow, S. (1992). Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. *Free Radical Biology and Medicine*, *12*(1), 63-81.
- Laridi, R., Kheadr, E. E., Benech, R. O., Vuillemand, J. C., Lacroix, C., & Fliss, I. (2003). Liposome encapsulated nisin Z: Optimization, stability and release during milk fermentation. *International Dairy Journal*, *13*(4), 325-336.
- Lawless, T. H., & Heymann, H. (2010a). Color and Appearance *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices* (pp. 283-301). New York, NY: Springer New York.

- Lawless, T. H., & Heymann, H. (2010b). Discrimination Testing *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices* (pp. 79-100). New York, NY: Springer New York.
- Lee, S. Y., Kim, H. W., Hwang, K. E., Song, D. H., Choi, M. S., Ham, Y. K., . . . Kim, C. J. (2015). Combined effect of kimchi powder and onion peel extract on quality characteristics of emulsion sausages prepared with irradiated pork. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35(3), 277-285.
- Leite, J. J. G., Brito, É. H. S., Cordeiro, R. A., Brillhante, R. S. N., Sidrim, J. J. C., Bertini, L. M., . . . Rocha, M. F. G. (2009). Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42(2), 110-113.
- Lesschaeve, I., & Noble, A. C. (2005). Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1 Suppl), 330S-335S.
- Liu, S., Low, N. H., & Nickerson, M. T. (2009). Effect of pH, Salt, and Biopolymer Ratio on the Formation of Pea Protein Isolate–Gum Arabic Complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1521-1526.
- Lu, R. (2013). 4 - Principles of solid food texture analysis\* A2 - Kilcast, David *Instrumental Assessment of Food Sensory Quality* (pp. 103-128): Woodhead Publishing.
- Lund, M. N., Heinonen, M., Baron, C. P., & Estévez, M. (2011). Protein oxidation in muscle foods: A review. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55(1), 83-95.
- Makkar, H. P. S., Blümmel, M., Borowy, N. K., & Becker, K. (1993). Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61(2), 161-165.
- Malheiros, P. d. S., Sant'Anna, V., Barbosa, M. d. S., Brandelli, A., & Franco, B. D. G. d. M. (2012). Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* growth in Minas frescal cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 156(3), 272-277.
- McAuliffe, O., Ross, R. P., & Hill, C. (2001). Lantibiotics: Structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(3), 285-308.
- McMullen, L. M., & Stiles, M. E. (1996). Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. *J Food Prot*, 59(3 SUPPL.), 64-71.
- Mendanha, D. V., Molina Ortiz, S. E., Favaro-Trindade, C. S., Mauri, A., Monterrey-Quintero, E. S., & Thomazini, M. (2009). Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. *Food Research International*, 42(8), 1099-1104.
- Moll, G. N., Konings, W. N., & Driessen, A. J. M. (1999). Bacteriocins: Mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 76(1-4), 185-198.
- Monteiro, S. S., Copetti, C., Nogara, G., Dalla Nora, F. M., Prestes, R. C., & da Rosa, C. S. (2014). Natural antioxidant from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) peel in the production of sausage. *International Food Research Journal*, 21(5), 1963-1970.
- Moreno, A. O., Dorantes, L., Galíndez, J., & Guzmán, R. I. (2003). Effect of Different Extraction Methods on Fatty Acids, Volatile Compounds, and Physical and Chemical Properties of Avocado (*Persea americana* Mill.) Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2216-2221.

- Mulders, J. W. M., Boerrigter, I. J., Rollema, H. S., Siezen, R. J., & De Vos, W. M. (1991). Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *European Journal of Biochemistry*, 201(3), 581-584.
- Narsaiah, K., Jha, S. N., Wilson, R. A., Mandge, H. M., & Manikantan, M. R. (2014). Optimizing microencapsulation of nisin with sodium alginate and guar gum. *Journal of Food Science and Technology*, 51(12), 4054-4059.
- NOM-194-SSA1-2004. Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos.
- Nørrung, B., Andersen, J. K., & Buncic, S. (2009). Main Concerns of Pathogenic Microorganisms in Meat. In F. Toldrá (Ed.), *Safety of Meat and Processed Meat* (pp. 3-29). New York, NY: Springer New York.
- Othman, M., Loh, H. S., Wiart, C., Khoo, T. J., Lim, K. H., & Ting, K. N. (2011). Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 84(2), 161-166.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619-4626.
- Oxley, J. (2014). Chapter 4 - Overview of Microencapsulation Process Technologies. In A. G. Gaonkar, N. Vasisht, A. R. Khare & R. Sobel (Eds.), *Microencapsulation in the Food Industry* (pp. 35-46). San Diego: Academic Press.
- Parker, T. L., Miller, S. A., Myers, L. E., Miguez, F. E., & Engeseth, N. J. (2010). Evaluation of synergistic antioxidant potential of complex mixtures using oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and electron paramagnetic resonance (EPR). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 209-217.
- Pegg, A. M. (2012). 8 - The application of natural hydrocolloids to foods and beverages. In D. Baines & R. Seal (Eds.), *Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings* (pp. 175-196): Woodhead Publishing.
- Quintero-Salazar, B., Vernon-Carter, E. J., Guerrero-Legarreta, I., & Ponce-Alquicira, E. (2005). Incorporation of the antilisterial bacteriocin-like inhibitory substance from *Pediococcus parvulus* VKMX133 into film-forming protein matrices with different hydrophobicity. *Journal of Food Science*, 70(9), M398-M403.
- Richards, M. P. (2010). 4 - Heme proteins and oxidation in fresh and processed meats A2 - Decker, Eric A *Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications* (pp. 76-104): Woodhead Publishing.
- Rocha-Selmi, G. A., Bozza, F. T., Thomazini, M., Bolini, H. M. A., & Fávaro-Trindade, C. S. (2013). Microencapsulation of aspartame by double emulsion followed by complex coacervation to provide protection and prolong sweetness. *Food Chemistry*, 139(1-4), 72-78.
- Rodríguez-Carpena, J., Morcuende, D., Andrade, M. J., Kylli, P., & Estevez, M. (2011). Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, In Vitro antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5625-5635.
- Rodríguez-Carpena, J. G., Morcuende, D., Andrade, M. J., Kylli, P., & Estevez, M. (2011). Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, in vitro antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5625-5635.

- Rodríguez-Carpena, J. G., Morcuende, D., & Estévez, M. (2011). Avocado by-products as inhibitors of color deterioration and lipid and protein oxidation in raw porcine patties subjected to chilled storage. *Meat Science*, 89(2), 166-173.
- Rodríguez-Carpena, J. G., Morcuende, D., Petró, M. J., & Estévez, M. (2012). Inhibition of cholesterol oxidation products (COPs) formation in emulsified porcine patties by phenolic-rich avocado (*Persea americana* Mill.) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(9), 2224-2230.
- SAGARPA. (2016). Monografía de cultivos. Retrieved March. 2016, from <http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/pablo/Documentos/Monografias/Monograf%C3%ADa%20del%20aguacate.pdf>
- Sánchez-Escalante, A., Torrescano, G., Djenane, D., Beltrán, J. A., Giménez, B., & Roncalés, P. (2011). Effect of antioxidants and lighting conditions on color and lipid stability of beef patties packaged in high-oxygen modified atmosphere. *CYTA - Journal of Food*, 9(1), 49-57.
- Schmitt, C., Aberkane, L., & Sanchez, C. (2009). 16 - Protein—polysaccharide complexes and coacervates. In G. O. Phillips & P. A. Williams (Eds.), *Handbook of Hydrocolloids (Second edition)* (pp. 420-476): Woodhead Publishing.
- Serpen, A., Gökmen, V., & Fogliano, V. (2012). Total antioxidant capacities of raw and cooked meats. *Meat Science*, 90(1), 60-65.
- Shahidi, F., & Han, X. Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33(6), 501-547.
- SIAP-SAGARPA. (2014). from <http://www.aguacate.gob.mx/index.php?portal=aguacate>
- Simpson, C. A., & Sofos, J. N. (2009). Antimicrobial Ingredients. In R. Tarté (Ed.), *Ingredients in Meat Products: Properties, Functionality and Applications* (pp. 301-377). New York, NY: Springer New York.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Snyder, A. B., & Worobo, R. W. (2014). Chemical and genetic characterization of bacteriocins: Antimicrobial peptides for food safety. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(1), 28-44.
- Soong, Y.-Y., & Barlow, P. J. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, 88(3), 411-417.
- Strauss, G., & Gibson, S. M. (2004). Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. *Food Hydrocolloids*, 18(1), 81-89.
- Szczesniak, A. S. (2002). Texture is a sensory property. *Food Quality and Preference*, 13(4), 215-225.
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., & Dommes, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113(4), 1226-1233.
- Tang, B., Zhang, L., & Geng, Y. (2005). Determination of the antioxidant capacity of different food natural products with a new developed flow injection spectrofluorimetry detecting hydroxyl radicals. *Talanta*, 65(3), 769-775.
- Thies, C. (2007). Microencapsulation of Flavors by Complex Coacervation. In J. M. Lakkis. (Ed.), *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems* (pp. 149-170). Iowa, USA: Blackwell Publishing.

- Vasisht, N. (2014a). Chapter 2 - Factors and Mechanisms in Microencapsulation. In A. G. Gaonkar, N. Vasisht, A. R. Khare & R. Sobel (Eds.), *Microencapsulation in the Food Industry* (pp. 15-24). San Diego: Academic Press.
- Vasisht, N. (2014b). Chapter 16 - Selection of Materials for Microencapsulation. In A. G. Gaonkar, N. Vasisht, A. R. Khare & R. Sobel (Eds.), *Microencapsulation in the Food Industry* (pp. 173-180). San Diego: Academic Press.
- Wan Norhana, M. N., Poole, S. E., Deeth, H. C., & Dykes, G. A. (2012). Effects of nisin, EDTA and salts of organic acids on *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and native microflora on fresh vacuum packaged shrimps stored at 4 °C. *Food Microbiology*, *31*(1), 43-50.
- Wang, L., Cao, Y., Zhang, K., Fang, Y., Nishinari, K., & Phillips, G. O. (2015). Hydrogen bonding enhances the electrostatic complex coacervation between  $\kappa$ -carrageenan and gelatin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *482*, 604-610.
- Wang, W., Bostic, T. R., & Gu, L. (2010). Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. *Food Chemistry*, *122*(4), 1193-1198.
- Weiss, J., Gibis, M., Schuh, V., & Salminen, H. (2010). Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. *Meat Science*, *86*(1), 196-213.
- Widsten, P., Cruz, C. D., Fletcher, G. C., Pajak, M. A., & McGhie, T. K. (2014). Tannins and Extracts of Fruit Byproducts: Antibacterial Activity against Foodborne Bacteria and Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(46), 11146-11156.
- Wolf, C. E., & Gibbons, W. R. (1996). Improved method for quantification of the bacteriocin nisin. *Journal of Applied Bacteriology*, *80*(4), 453-457.
- Xiao, D., Davidson, P. M., & Zhong, Q. (2011). Release and antilisterial properties of nisin from zein capsules spray-dried at different temperatures. *LWT - Food Science and Technology*, *44*(10), 1977-1985.
- Xiao, Z., Liu, W., Zhu, G., Zhou, R., & Niu, Y. (2014). A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *94*(8), 1482-1494.
- Xu, G. H., Chen, J. C., Liu, D. H., Zhang, Y. H., Jiang, P., & Ye, X. Q. (2008). Minerals, phenolic compounds, and antioxidant capacity of citrus peel extract by hot water. *Journal of Food Science*, *73*(1), C11-C18.
- Zhang, C. (2015). In vitro Antioxidant Properties of *Euryale ferox* Seed Shell Extracts and their Preservation Effects on Pork Sausages. *Journal of Food Processing and Preservation*, *39*(6), 1172-1182.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, *64*(4), 555-559.
- Zuidam, N. J., & Shimoni, E. (2010). Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them. In N. J. Zuidam & V. Nedovic (Eds.), *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing* (pp. 3-29). New York, NY: Springer New York.

### 10. ANEXO 1. Resultados del análisis fisicoquímico y microbiológico de carne durante 10 días de almacenamiento a 4°C

Código	pH	Aw	Mesófilos (log UFC/g)	Enterobacterias (log UFC/g)	BAL (log UFC/g)	Proteínas	TBARS
						oxidadas (nM carbonilos/mg proteína)	(mg MDA/kg)
1PC	5.83±0.06 <sup>bcde</sup>	0.9955±0.004 <sup>abcd</sup>	4.37±0.21 <sup>no</sup>	2.97±0.14 <sup>l</sup>	4.36±0.18 <sup>hi</sup>	0.375±0.035 <sup>m</sup>	0.125±0.035 <sup>bc</sup>
1PE	5.83±0.06 <sup>bcde</sup>	0.9955±0.004 <sup>abcd</sup>	4.37±0.21 <sup>no</sup>	2.97±0.14 <sup>l</sup>	4.36±0.18 <sup>hi</sup>	0.375±0.035 <sup>m</sup>	0.125±0.035 <sup>bc</sup>
1PN	5.83±0.06 <sup>bcde</sup>	0.9955±0.004 <sup>abcd</sup>	4.37±0.21 <sup>no</sup>	2.97±0.14 <sup>l</sup>	4.36±0.18 <sup>hi</sup>	0.375±0.035 <sup>m</sup>	0.125±0.035 <sup>bc</sup>
1PCV	5.83±0.06 <sup>bcde</sup>	0.9955±0.004 <sup>abcd</sup>	4.37±0.21 <sup>no</sup>	2.97±0.14 <sup>l</sup>	4.36±0.18 <sup>hi</sup>	0.375±0.035 <sup>m</sup>	0.125±0.035 <sup>bc</sup>
1PCEN	5.83±0.06 <sup>bcde</sup>	0.9955±0.004 <sup>abcd</sup>	4.37±0.21 <sup>no</sup>	2.97±0.14 <sup>l</sup>	4.36±0.18 <sup>hi</sup>	0.375±0.035 <sup>m</sup>	0.125±0.035 <sup>bc</sup>
1VC	5.83±0.06 <sup>bcde</sup>	0.9955±0.004 <sup>abcd</sup>	4.37±0.21 <sup>no</sup>	2.97±0.14 <sup>l</sup>	4.36±0.18 <sup>hi</sup>	0.375±0.035 <sup>m</sup>	0.125±0.035 <sup>bc</sup>
1VE	5.83±0.06 <sup>bcde</sup>	0.9955±0.004 <sup>abcd</sup>	4.37±0.21 <sup>no</sup>	2.97±0.14 <sup>l</sup>	4.36±0.18 <sup>hi</sup>	0.375±0.035 <sup>m</sup>	0.125±0.035 <sup>bc</sup>
1VN	5.83±0.06 <sup>bcde</sup>	0.9955±0.004 <sup>abcd</sup>	4.37±0.21 <sup>no</sup>	2.97±0.14 <sup>l</sup>	4.36±0.18 <sup>hi</sup>	0.375±0.035 <sup>m</sup>	0.125±0.035 <sup>bc</sup>
1VCV	5.83±0.06 <sup>bcde</sup>	0.9955±0.004 <sup>abcd</sup>	4.37±0.21 <sup>no</sup>	2.97±0.14 <sup>l</sup>	4.36±0.18 <sup>hi</sup>	0.375±0.035 <sup>m</sup>	0.125±0.035 <sup>bc</sup>
1VCEN	5.83±0.06 <sup>bcde</sup>	0.9955±0.004 <sup>abcd</sup>	4.37±0.21 <sup>no</sup>	2.97±0.14 <sup>l</sup>	4.36±0.18 <sup>hi</sup>	0.375±0.035 <sup>m</sup>	0.125±0.035 <sup>bc</sup>
3PC	5.29±0.02 <sup>hijklm</sup>	0.9948±0.000 <sup>abcde</sup>	5.48±0.09 <sup>ijklmno</sup>	4.01±0.16 <sup>ijkl</sup>	4.49±0.02 <sup>fghi</sup>	0.84±0.57 <sup>fghijklm</sup>	0.199±0.001 <sup>abc</sup>
3PE	5.47±0.05 <sup>fghij</sup>	0.9935±0.001 <sup>abcdefg</sup>	5.61±0.01 <sup>ijklmno</sup>	4.07±0.04 <sup>hijkl</sup>	4.85±0.08 <sup>efghi</sup>	0.517±0.024 <sup>klm</sup>	0.142±0.011 <sup>abc</sup>
3PN	5.73±0.07 <sup>cdef</sup>	0.9946±0.000 <sup>abcde</sup>	5.59±0.38 <sup>ijklmno</sup>	3.77±0.38 <sup>ijkl</sup>	4.26±0.02 <sup>i</sup>	0.735±0.191 <sup>ghijklm</sup>	0.206±0.062 <sup>abc</sup>
3PCV	5.46±0.03 <sup>fghijk</sup>	0.9935±0.001 <sup>abcdefg</sup>	5.55±0.07 <sup>ijklmno</sup>	4.04±0.05 <sup>ijkl</sup>	4.80±0.10 <sup>efghi</sup>	0.73±0.042 <sup>ghijklm</sup>	0.191±0.054 <sup>abc</sup>
3PCEN	5.57±0.06 <sup>efghi</sup>	0.9948±0.000 <sup>abcde</sup>	3.73±0.28 <sup>o</sup>	3.65±0.04 <sup>kl</sup>	4.27±0.07 <sup>i</sup>	0.525±0.035 <sup>klm</sup>	0.137±0.018 <sup>bc</sup>
3VC	5.2±0.05 <sup>ijklm</sup>	0.9969±0.000 <sup>ab</sup>	5.34±0.15 <sup>mno</sup>	4.27±0.05 <sup>hijkl</sup>	4.84±0.1 <sup>efghi</sup>	0.575±0.106 <sup>ijklm</sup>	0.191±0.008 <sup>abc</sup>
3VE	5.36±0.07 <sup>hijklm</sup>	0.9960±0.000 <sup>abc</sup>	5.50±0.21 <sup>ijklmno</sup>	4.50±0.10 <sup>ghijk</sup>	5.75±0.1 <sup>de</sup>	0.425±0.035 <sup>lm</sup>	0.128±0.030 <sup>bc</sup>
3VN	5.73±0.08 <sup>cdef</sup>	0.995±0.000 <sup>abcde</sup>	5.45±0.46 <sup>klmno</sup>	4.05±0.21 <sup>ijkl</sup>	4.58±0.09 <sup>efghi</sup>	0.625±0.035 <sup>ijklm</sup>	0.162±0.053 <sup>abc</sup>
3VCV	5.29±0.07 <sup>hijklm</sup>	0.9936±0.000 <sup>abcdefg</sup>	5.51±0.03 <sup>ijklmno</sup>	4.21±0.21 <sup>hijkl</sup>	4.71±0.11 <sup>efghi</sup>	0.685±0.262 <sup>hijklm</sup>	0.155±0.064 <sup>abc</sup>
3VCEN	5.38±0.09 <sup>ghijklm</sup>	0.9983±0.000 <sup>a</sup>	5.05±0.26 <sup>mno</sup>	4.08±0.3 <sup>hijkl</sup>	4.77±0.22 <sup>efghi</sup>	0.425±0.035 <sup>lm</sup>	0.110±0.013 <sup>c</sup>
6PC	5.26±0.01 <sup>ijklm</sup>	0.9953±0.000 <sup>abcd</sup>	6.47±0.28 <sup>ghijklm</sup>	4.62±0.08 <sup>ghijk</sup>	4.85±0.00 <sup>efghi</sup>	1.3±0.141 <sup>cdefgh</sup>	0.238±0.003 <sup>abc</sup>
6PE	5.46±0.02 <sup>fghijk</sup>	0.9944±0.000 <sup>abcdef</sup>	5.12±0.71 <sup>mno</sup>	4.34±0.44 <sup>hijk</sup>	4.70±0.00 <sup>efghi</sup>	0.94±0.085 <sup>fghijklm</sup>	0.156±0.33 <sup>abc</sup>
6PN	5.68±0.02 <sup>defg</sup>	0.9894±0.001 <sup>cdefghijklmn</sup>	5.95±0.54 <sup>ijklmn</sup>	4.35±0.49 <sup>hijk</sup>	4.25±0.07 <sup>i</sup>	1.4±0.141 <sup>cdef</sup>	0.191±0.083 <sup>abc</sup>
6PCV	5.43±0.06 <sup>fghijkl</sup>	0.9905±0.001 <sup>bcdefghijkl</sup>	6.51±0.07 <sup>ghijklm</sup>	4.61±0.25 <sup>ghijk</sup>	5.07±0.1 <sup>defghi</sup>	1.3±0.141 <sup>cdefgh</sup>	0.181±0.027 <sup>abc</sup>
6PCEN	5.48±0.11 <sup>fghij</sup>	0.9879±0.000 <sup>efghijklmn</sup>	6.16±0.68 <sup>hijklmn</sup>	4.75±0.92 <sup>ghijk</sup>	4.88±0.53 <sup>efghi</sup>	0.8±0.00 <sup>fghijklm</sup>	0.159±0.001 <sup>abc</sup>

6VC	5.12±0.03 <sup>lm</sup>	0.9844±0.001 <sup>lmn</sup>	5.87±0.01 <sup>ijklmn</sup>	4.80±0.01 <sup>ghijk</sup>	5.29±0.01 <sup>defghi</sup>	0.85±0.071 <sup>fghijklm</sup>	0.209±0.013 <sup>abc</sup>
6VE	5.21±0.02 <sup>ijklm</sup>	0.9849±0.000 <sup>ijklmn</sup>	5.99±0.01 <sup>hijklmn</sup>	4.82±0.10 <sup>ghijk</sup>	5.50±0.00 <sup>defgh</sup>	0.75±0.071 <sup>ghijklm</sup>	0.141±0.012 <sup>abc</sup>
6VN	5.35±0.00 <sup>hijklm</sup>	0.9859±0.000 <sup>ijklmn</sup>	6.32±0.72 <sup>hijklm</sup>	5.02±0.64 <sup>efghij</sup>	5.17±0.39 <sup>defghi</sup>	1.05±0.354 <sup>defghijkl</sup>	0.153±0.023 <sup>abc</sup>
6VCV	5.2±0.01 <sup>ijklm</sup>	0.9863±0.000 <sup>hijklmn</sup>	6.21±0.43 <sup>hijklmn</sup>	5.23±0.00 <sup>defghi</sup>	5.65±0.07 <sup>def</sup>	1.25±0.354 <sup>cdefghi</sup>	0.154±0.065 <sup>abc</sup>
6VCEN	5.2±0.17 <sup>ijklm</sup>	0.9907±0.000 <sup>bcdefghijkl</sup>	6.07±0.76 <sup>hijklmn</sup>	5.07±0.56 <sup>efghij</sup>	5.05±0.78 <sup>defghi</sup>	0.825±0.035 <sup>fghijklm</sup>	0.115±0.021 <sup>c</sup>
8PC	5.46±0.02 <sup>efghij</sup>	0.9930±0.000 <sup>bcdefghi</sup>	7.17±0.10 <sup>fghijkl</sup>	4.89±0.58 <sup>fghijk</sup>	5.36±0.06 <sup>defghi</sup>	1.75±0.071 <sup>bc</sup>	0.241±0.001 <sup>abc</sup>
8PE	5.74±0.13 <sup>cdef</sup>	0.9941±0.000 <sup>bcdefgh</sup>	7.87±0.43 <sup>defgh</sup>	5.38±0.54 <sup>cdefgh</sup>	4.94±0.09 <sup>defghi</sup>	1.25±0.354 <sup>cdefghi</sup>	0.162±0.003 <sup>abc</sup>
8PN	5.7±0.04 <sup>cdef</sup>	0.99±0.000 <sup>bcdefghijklm</sup>	8.21±0.02 <sup>defg</sup>	4.79±0.01 <sup>ghijk</sup>	4.45±0.07 <sup>ghi</sup>	1.775±0.106 <sup>abc</sup>	0.189±0.016 <sup>abc</sup>
8PCV	5.6±0.02 <sup>efgh</sup>	0.9869±0.000 <sup>ghijklmn</sup>	8.69±0.27 <sup>cde</sup>	6.18±0.53 <sup>cdef</sup>	5.33±0.04 <sup>defghi</sup>	1.75±0.071 <sup>bc</sup>	0.254±0.006 <sup>ab</sup>
8PCEN	5.72±0.03 <sup>cdef</sup>	0.9872±0.000 <sup>fghijklmn</sup>	7.27±1.08 <sup>fghijk</sup>	5.76±0.37 <sup>cdefg</sup>	5.07±0.38 <sup>defghi</sup>	1.1±0.141 <sup>defghijk</sup>	0.159±0.001 <sup>abc</sup>
8VC	5.19±0.01 <sup>ijklm</sup>	0.9888±0.000 <sup>cdefghijklm</sup>	7.35±0.35 <sup>fghij</sup>	5.29±0.29 <sup>cdefghi</sup>	5.50±0.00 <sup>defgh</sup>	1.35±0.212 <sup>cdefg</sup>	0.227±0.01 <sup>abc</sup>
8VE	5.15±0.01 <sup>klm</sup>	0.9861±0.000 <sup>ijklmn</sup>	6.81±0.78 <sup>ghijklm</sup>	5.25±0.49 <sup>defghi</sup>	5.39±0.01 <sup>defghi</sup>	1.0±0.00 <sup>efghijklm</sup>	0.165±0.021 <sup>abc</sup>
8VN	5.34±0.01 <sup>hijklm</sup>	0.9883±0.000 <sup>defghijklm</sup>	7.07±0.09 <sup>fghijkl</sup>	5.74±0.61 <sup>cdefg</sup>	5.21±0.29 <sup>defghi</sup>	1.4±0.283 <sup>cdef</sup>	0.171±0.041 <sup>abc</sup>
8VCV	5.19±0.05 <sup>ijklm</sup>	0.9918±0.000 <sup>bcdefghijk</sup>	7.69±0.27 <sup>fghi</sup>	5.76±0.46 <sup>cdefg</sup>	5.60±0.00 <sup>defg</sup>	1.35±0.212 <sup>cdefg</sup>	0.1675±0.028 <sup>abc</sup>
8VCEN	5.07±0.04 <sup>m</sup>	0.9878±0.000 <sup>efghijklmn</sup>	7.12±0.01 <sup>fghijkl</sup>	5.79±0.41 <sup>cdefg</sup>	6.07±0.8 <sup>d</sup>	0.9±0.000 <sup>fghijklm</sup>	0.168±0.002 <sup>abc</sup>
10PC	6.12±0.02 <sup>b</sup>	0.9852±0.000 <sup>ijklmn</sup>	11.02±0.65 <sup>ab</sup>	10.14±0.00 <sup>a</sup>	8.40±0.00 <sup>bc</sup>	2.35±0.071 <sup>ab</sup>	0.277±0.004 <sup>a</sup>
10PE	6.48±0.14 <sup>a</sup>	0.9863±0.000 <sup>hijklmn</sup>	12.18±1.03 <sup>a</sup>	9.75±0.00 <sup>a</sup>	8.76±0.23 <sup>abc</sup>	1.65±0.212 <sup>cd</sup>	0.247±0.024 <sup>abc</sup>
10PN	6.0±0.14 <sup>bc</sup>	0.9848±0.000 <sup>klmn</sup>	11.55±1.5 <sup>a</sup>	9.71±0.00 <sup>a</sup>	8.13±0.75 <sup>bc</sup>	2.4±0.141 <sup>a</sup>	0.259±0.001 <sup>ab</sup>
10PCV	6.0±0.00 <sup>bc</sup>	0.9822±0.000 <sup>n</sup>	10.83±0.08 <sup>ab</sup>	9.54±0.00 <sup>a</sup>	8.35±0.07 <sup>bc</sup>	2.35±0.071 <sup>ab</sup>	0.240±0.013 <sup>abc</sup>
10PCEN	5.94±0.27 <sup>bcd</sup>	0.9859±0.000 <sup>ijklmn</sup>	10.54±0.18 <sup>abc</sup>	9.54±0.00 <sup>a</sup>	7.92±0.17 <sup>c</sup>	1.2±0.000 <sup>cdefghij</sup>	0.203±0.004 <sup>abc</sup>
10VC	5.21±0.01 <sup>ijklm</sup>	0.9959±0.000 <sup>abc</sup>	9.58±0.02 <sup>bcde</sup>	6.60±0.00 <sup>c</sup>	9.19±0.27 <sup>ab</sup>	1.75±0.354 <sup>bc</sup>	0.261±0.044 <sup>ab</sup>
10VE	5.27±0.04 <sup>ijklm</sup>	0.9891±0.000 <sup>cdefghijklmn</sup>	9.66±0.29 <sup>bcd</sup>	6.54±0.00 <sup>cd</sup>	8.60±0.71 <sup>abc</sup>	1.40±0.141 <sup>cdef</sup>	0.240±0.057 <sup>abc</sup>
10VN	5.42±0.03 <sup>fghijkl</sup>	0.9932±0.000 <sup>bcdefghi</sup>	8.82±0.1 <sup>def</sup>	8.00±0.00 <sup>b</sup>	9.09±0.4 <sup>abc</sup>	1.6±0.000 <sup>cde</sup>	0.229±0.029 <sup>abc</sup>
10VCV	5.22±0.03 <sup>ijklm</sup>	0.9922±0.000 <sup>bcdefghij</sup>	9.63±0.05 <sup>bcd</sup>	6.48±0.00 <sup>cd</sup>	9.65±0.2 <sup>a</sup>	1.75±0.071 <sup>bc</sup>	0.246±0.005 <sup>abc</sup>
10VCEN	5.25±0.02 <sup>ijklm</sup>	0.9829±0.000 <sup>mn</sup>	7.75±0.1 <sup>efghi</sup>	6.30±0.00 <sup>cde</sup>	8.59±0.01 <sup>abc</sup>	1.25±0.354 <sup>cdefghi</sup>	0.226±0.005 <sup>abc</sup>

Los datos se expresan como el promedio ± desviación estándar. N= 3 experimentos independientes.

Valores con diferentes letras (a-m) dentro de la misma columna son diferentes significativamente ( $p < 0.05$ ).

Códigos: El número indica el día de muestreo. La primera letra el tipo de empaque: “P” para permeable y “V” para vacío. El resto de las letras corresponden al tipo de tratamiento: “C” =control, “E”=extracto sin encapsular, “N” nisina sin encapsular, “CV”=cápsula vacía, “CEN”=cápsula con extracto y nisina.

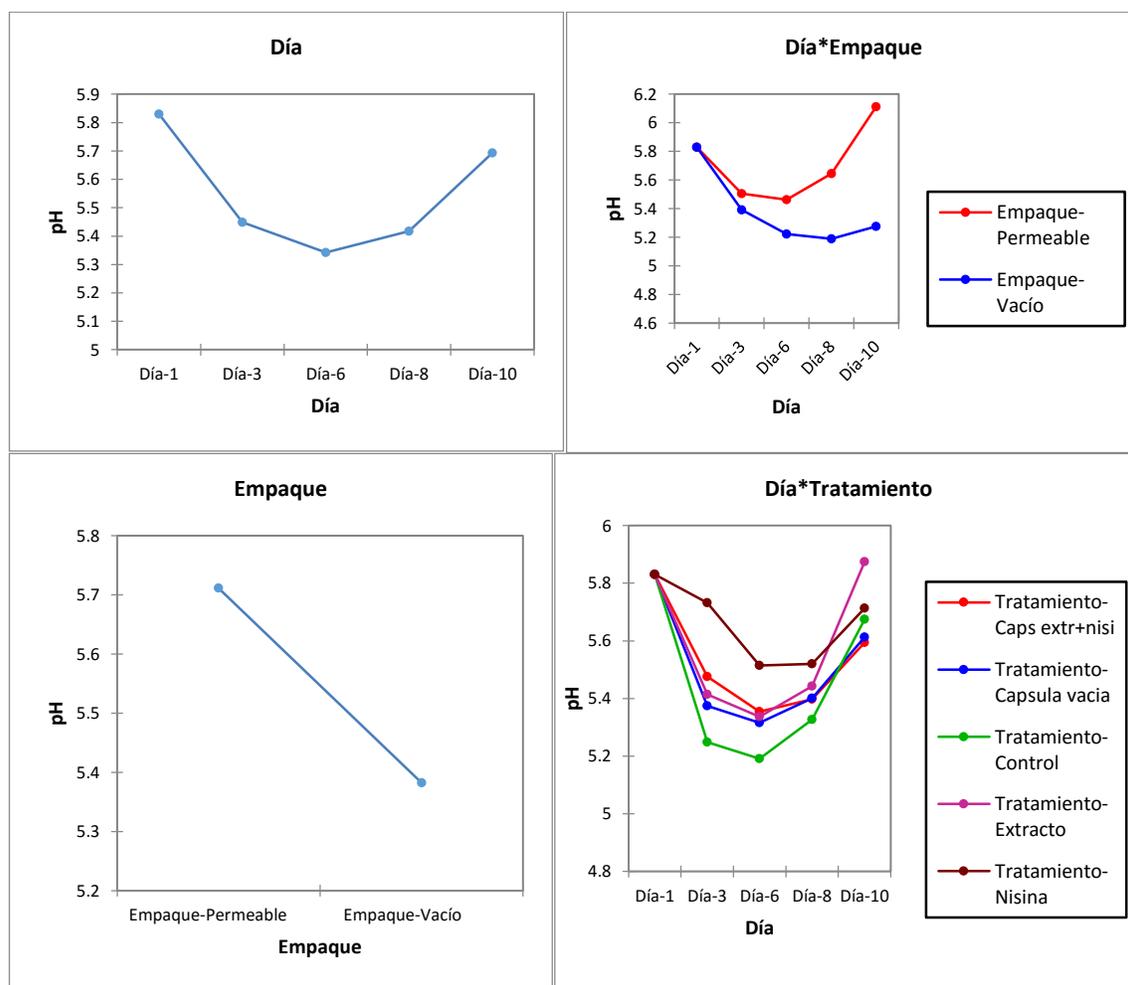
## 11. ANEXO 2. ANOVAS Y GRÁFICOS DE MEDIAS DE LA ETAPA 3.

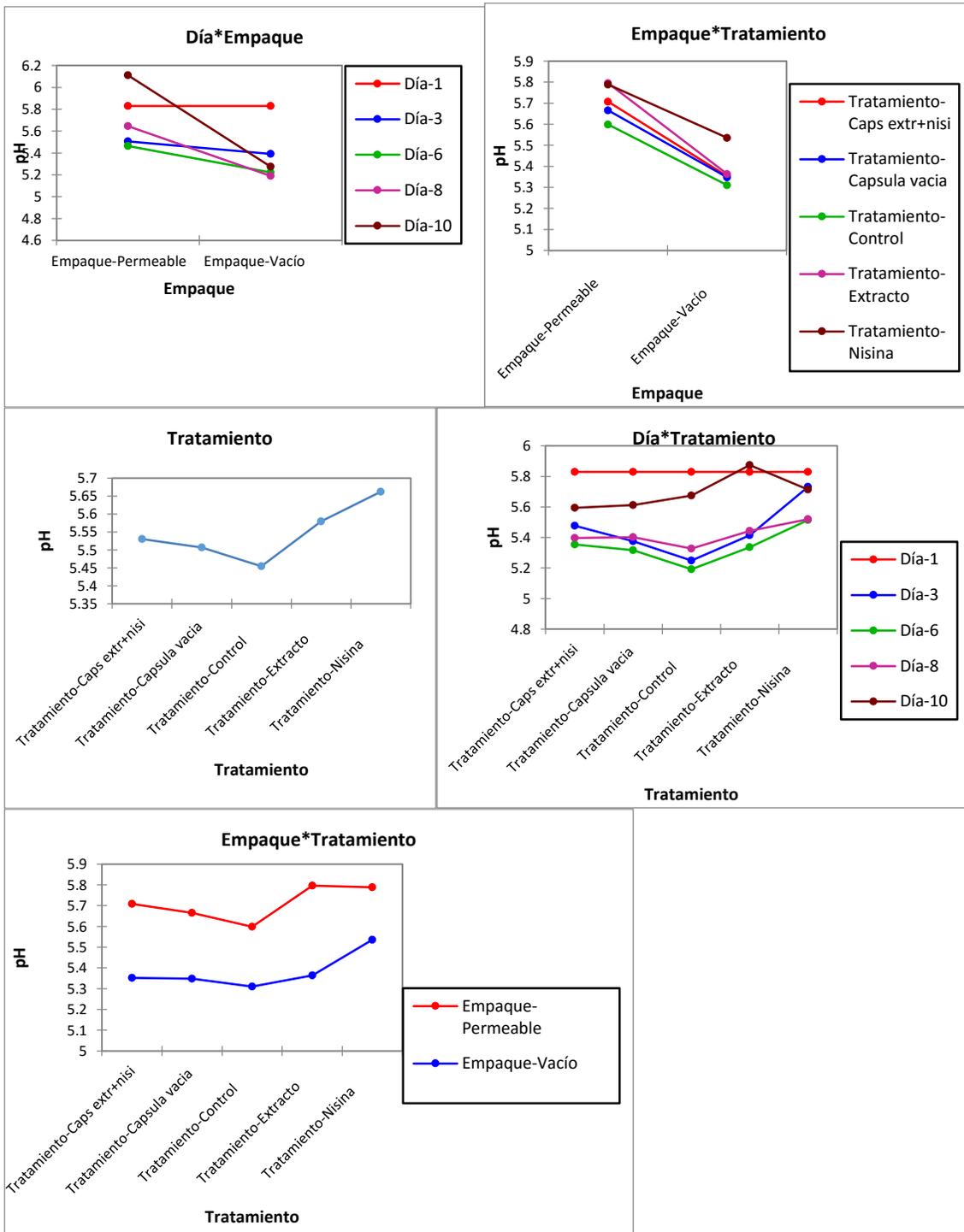
### A2.1 Variable respuesta pH

#### Análisis de Varianza para pH - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Día	3.39634	4	0.849085	155.03	0.0000
B:Empaque	2.70816	1	2.70816	494.48	0.0000
C:Tratamiento	0.495339	4	0.123835	22.61	0.0000
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	2.18047	4	0.545119	99.53	0.0000
AC	0.5092	16	0.031825	5.81	0.0000
BC	0.0942929	4	0.0235732	4.30	0.0045
ABC	0.280649	16	0.0175406	3.20	0.0008
RESIDUOS	0.273842	50	0.00547684		
TOTAL (CORREGIDO)	9.9383	99			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual





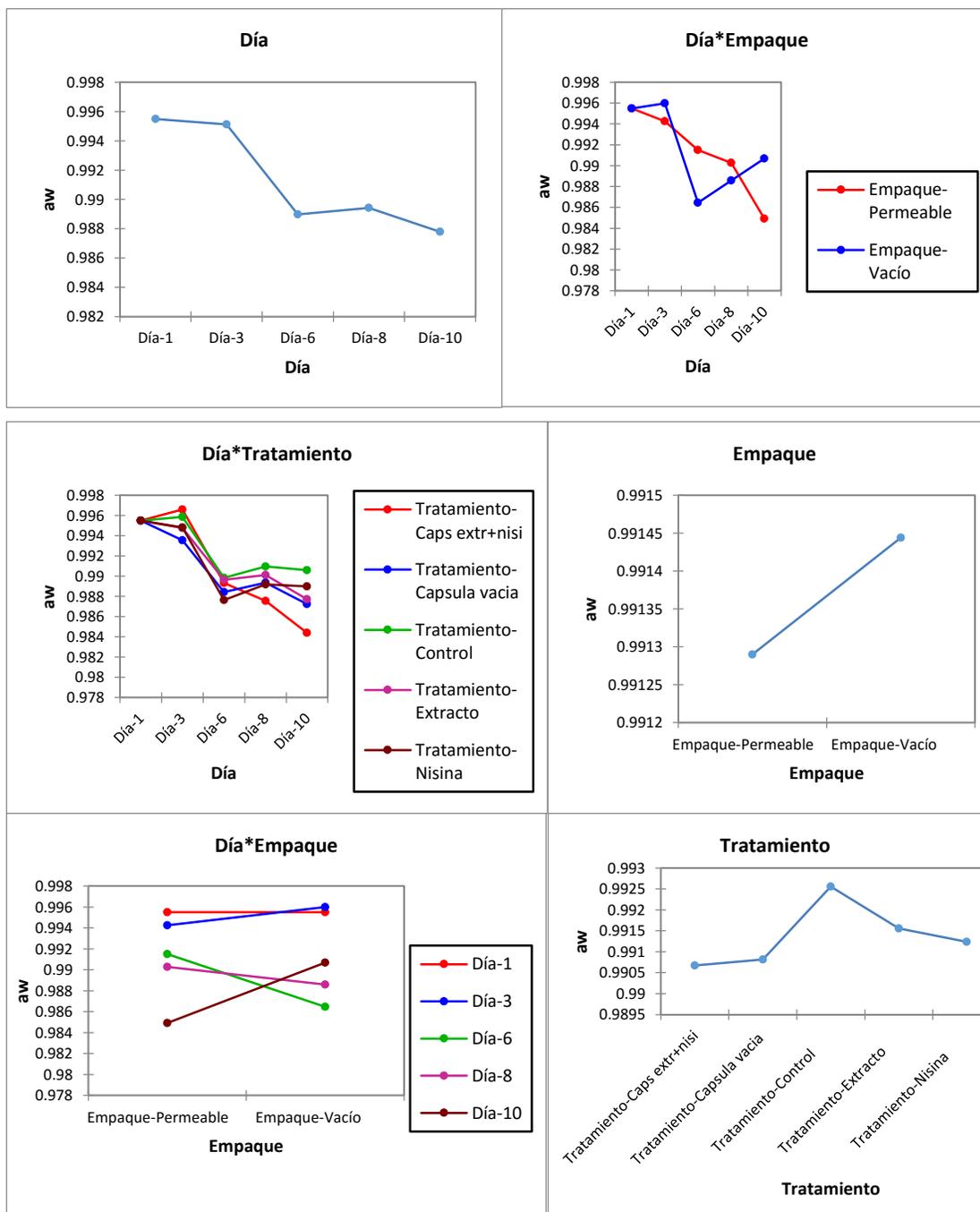
**A2.2** Variable respuesta Aw

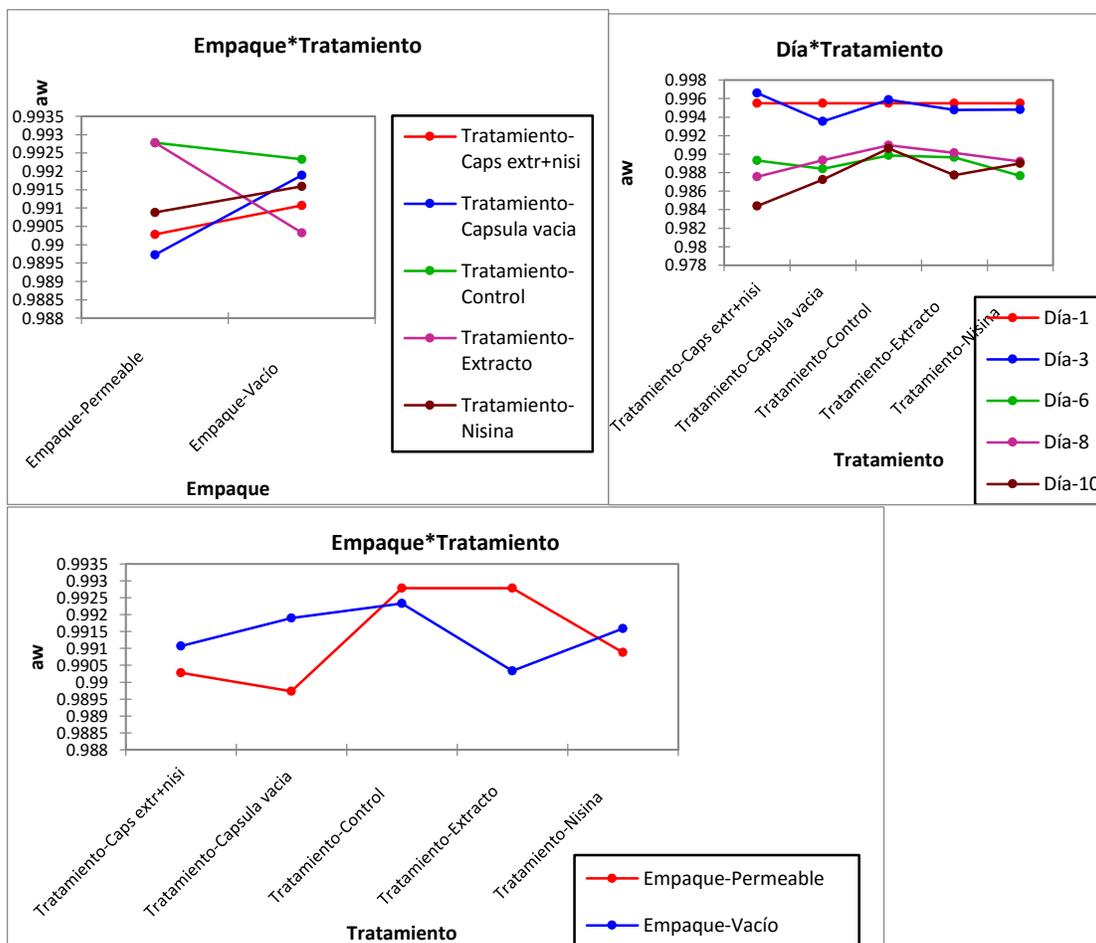
**Análisis de Varianza para Aw - Suma de Cuadrados Tipo III**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Día	0.00106788	4	0.000266969	88.54	0.0000
B:Empaque	5.929E-7	1	5.929E-7	0.20	0.6594

C:Tratamiento	0.0000449536	4	0.0000112384	3.73	0.0099
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	0.000322125	4	0.0000805311	26.71	0.0000
AC	0.000100518	16	0.0000062824	2.08	0.0248
BC	0.0000596176	4	0.0000149044	4.94	0.0019
ABC	0.000299142	16	0.0000186964	6.20	0.0000
RESIDUOS	0.000150755	50	0.0000030151		
TOTAL (CORREGIDO)	0.00204558	99			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual



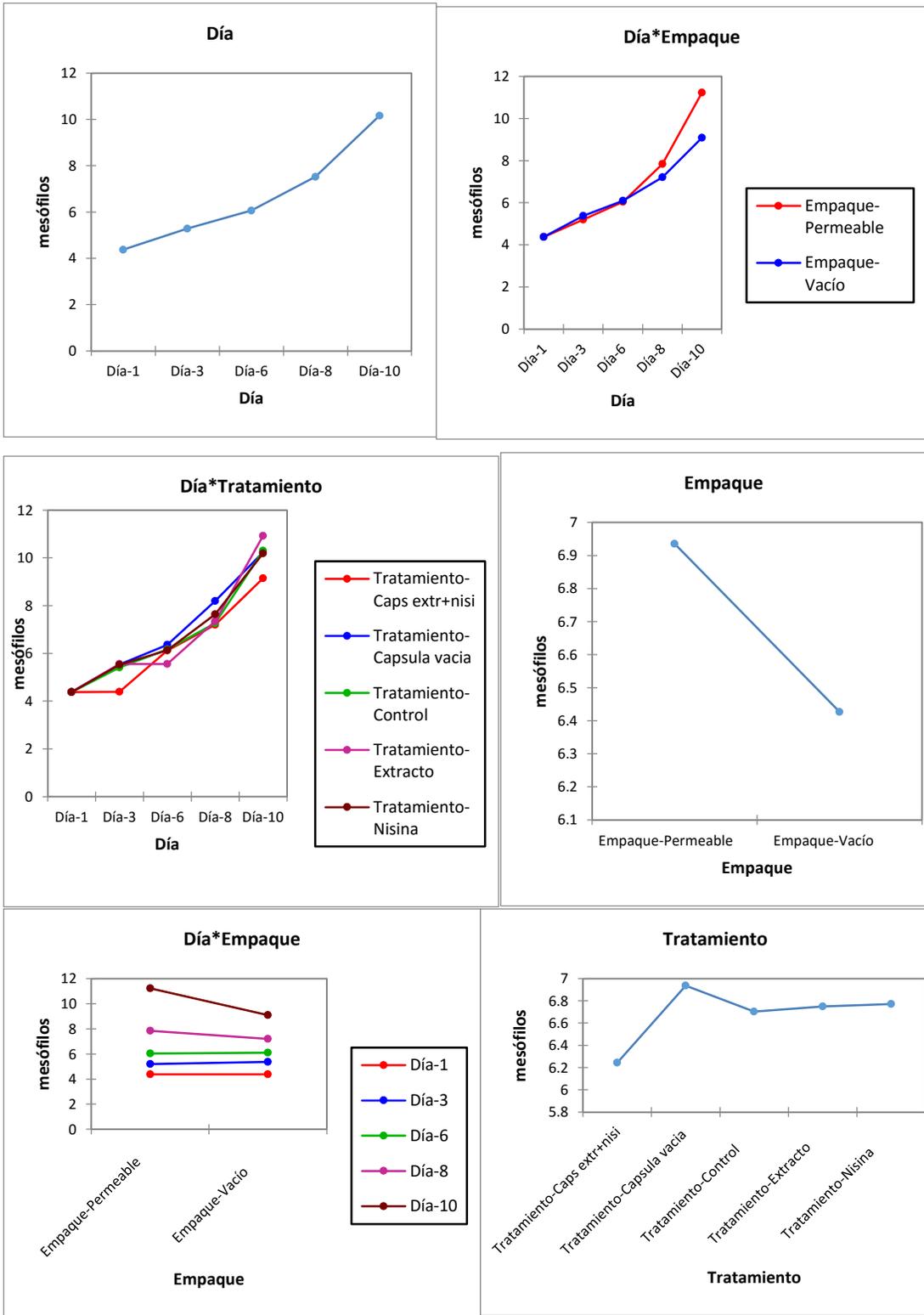


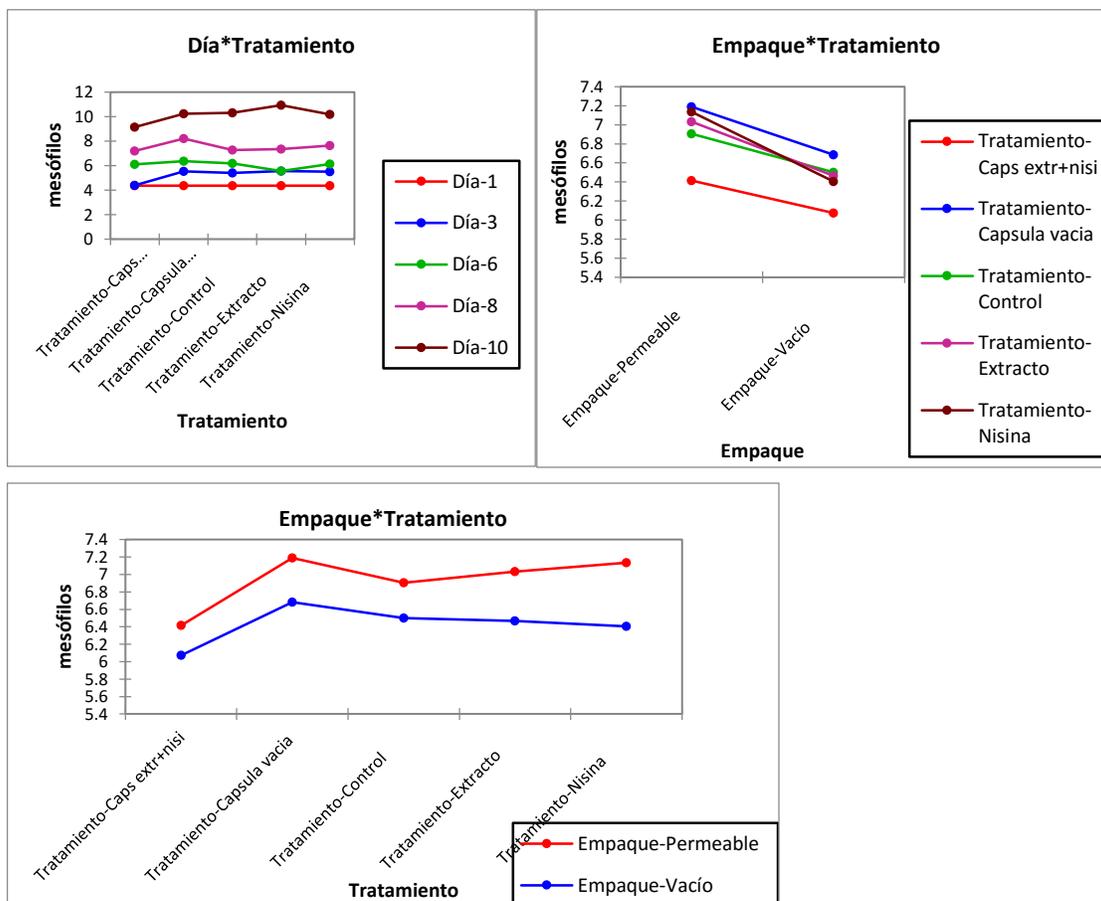
### A2.3 Variable respuesta mesófilos

#### Análisis de Varianza para Mesófilos - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFEKTOS PRINCIPALES</b>					
A:Día	409.352	4	102.338	522.21	0.0000
B:Empaque	6.47688	1	6.47688	33.05	0.0000
C:Tratamiento	5.39246	4	1.34811	6.88	0.0002
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	18.5178	4	4.62944	23.62	0.0000
AC	9.3003	16	0.581269	2.97	0.0017
BC	0.458261	4	0.114565	0.58	0.6752
ABC	6.30569	16	0.394106	2.01	0.0309
RESIDUOS	9.79848	50	0.19597		
TOTAL (CORREGIDO)	465.601	99			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual



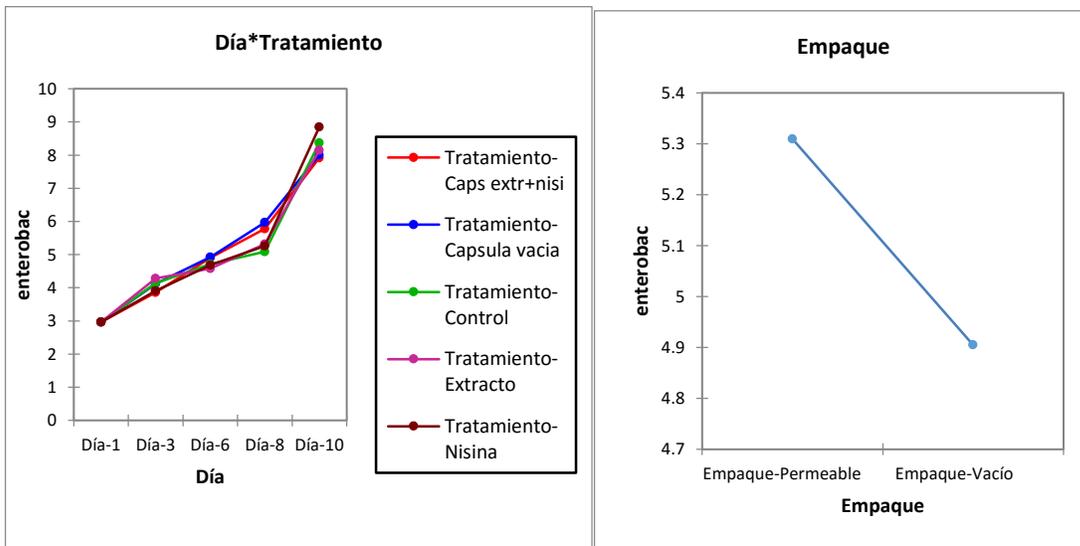
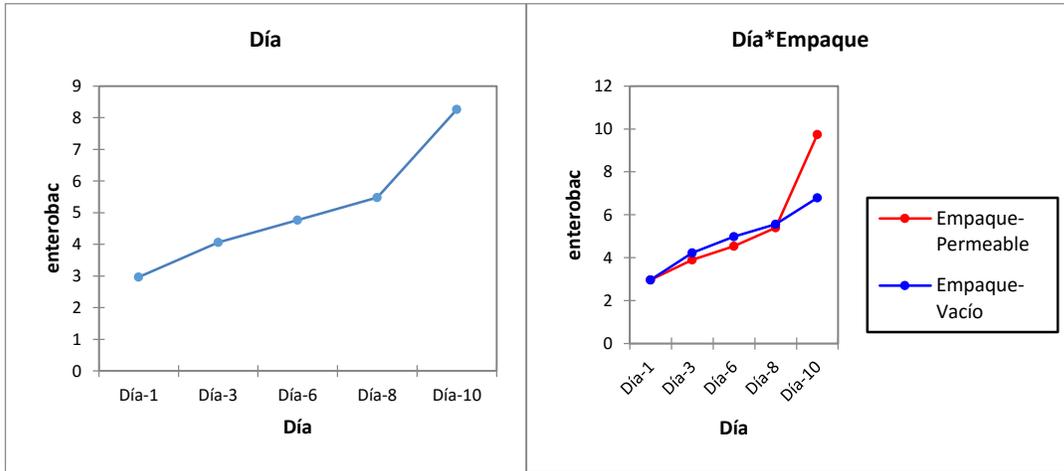


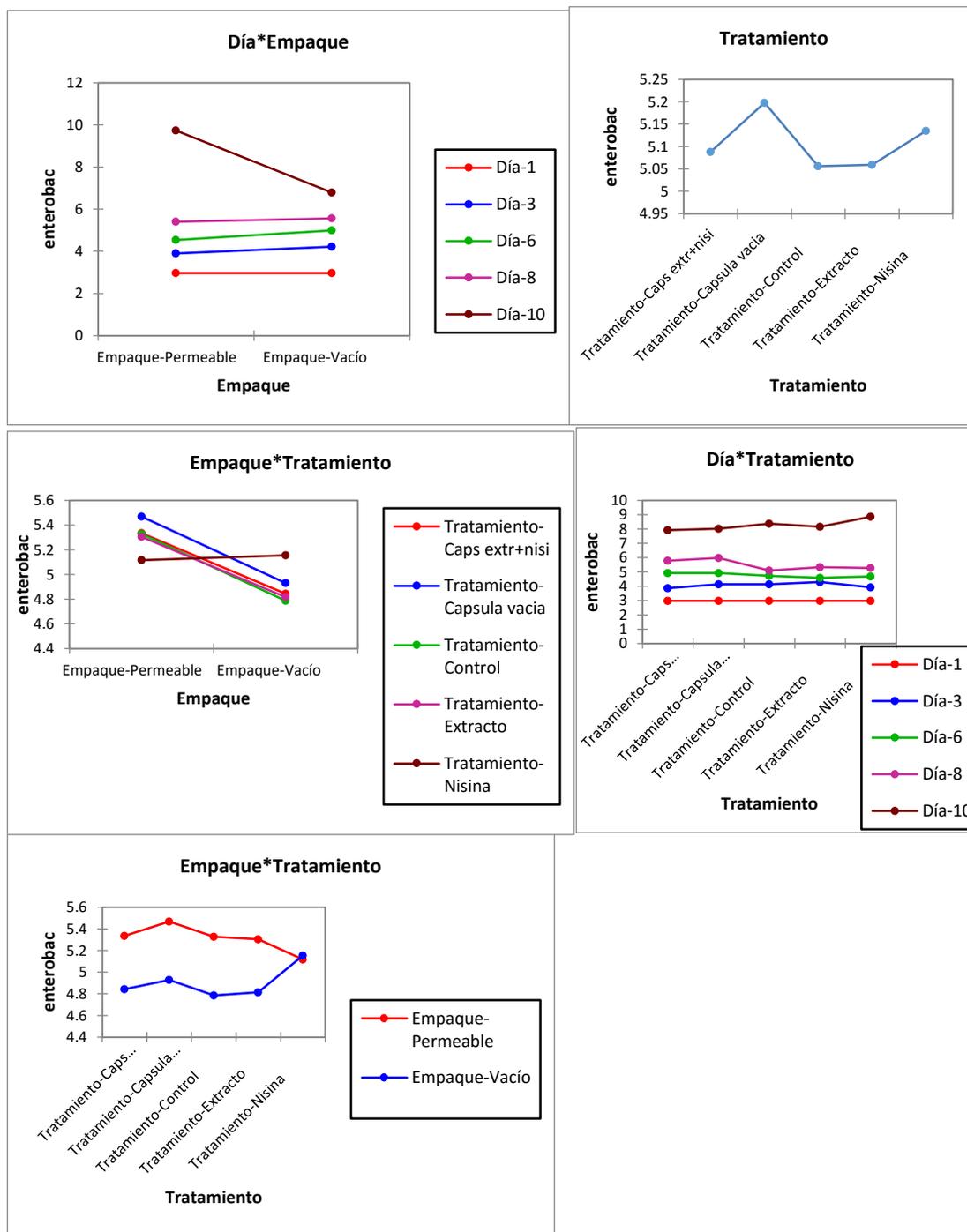
#### A2.4 Variable respuesta enterobacterias

##### Análisis de Varianza para Enterobacterias - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Día	317.37	4	79.3425	826.64	0.0000
B:Empaque	4.08819	1	4.08819	42.59	0.0000
C:Tratamiento	0.28556	4	0.0713899	0.74	0.5667
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	41.1267	4	10.2817	107.12	0.0000
AC	4.98337	16	0.311461	3.25	0.0007
BC	1.2326	4	0.308151	3.21	0.0201
ABC	2.16001	16	0.135	1.41	0.1772
RESIDUOS	4.79906	50	0.0959813		
TOTAL (CORREGIDO)	376.045	99			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual





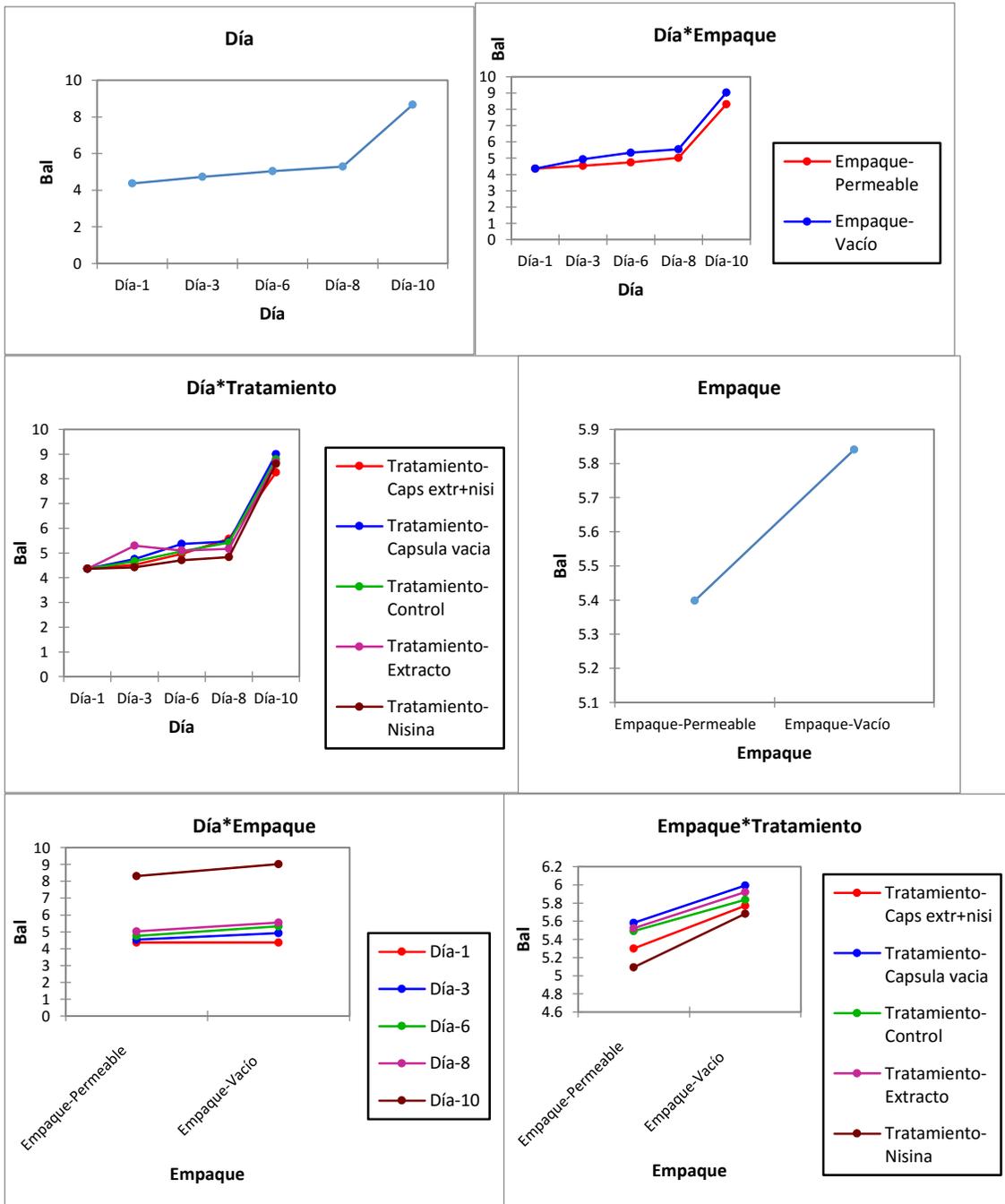
**A.2.5 Variable respuesta bacterias ácido lácticas**

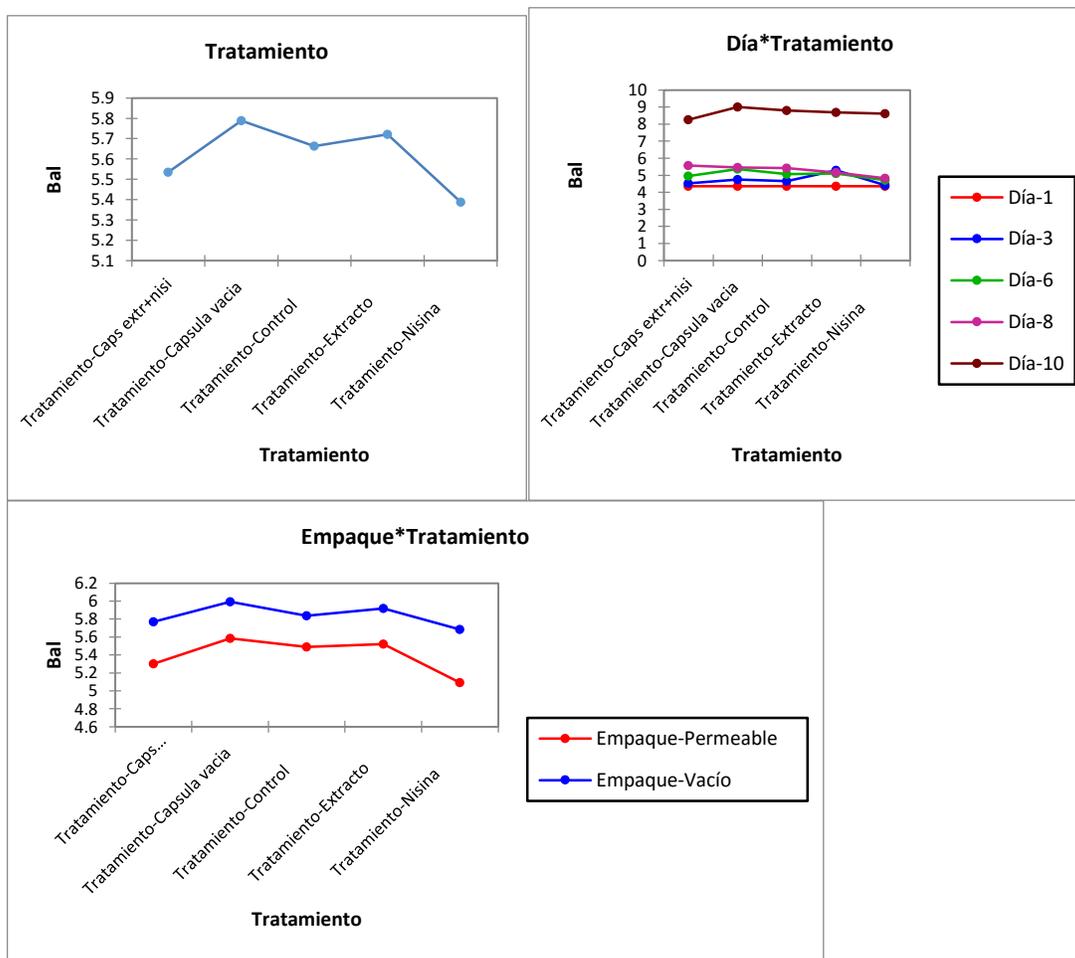
**Análisis de Varianza para BAL - Suma de Cuadrados Tipo III**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Día	241.97	4	60.4925	788.01	0.0000
B:Empaque	4.89756	1	4.89756	63.80	0.0000
C:Tratamiento	2.03054	4	0.507634	6.61	0.0002
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	1.47939	4	0.369847	4.82	0.0023

AC	3.32037	16	0.207523	2.70	0.0037
BC	0.175644	4	0.0439109	0.57	0.6842
ABC	2.36362	16	0.147726	1.92	0.0401
RESIDUOS	3.83831	50	0.0767662		
TOTAL (CORREGIDO)	260.076	99			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual



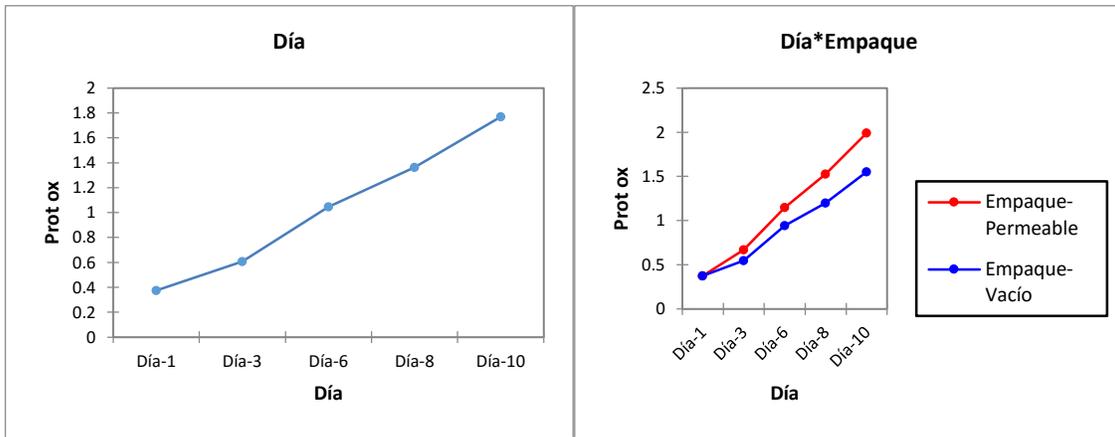


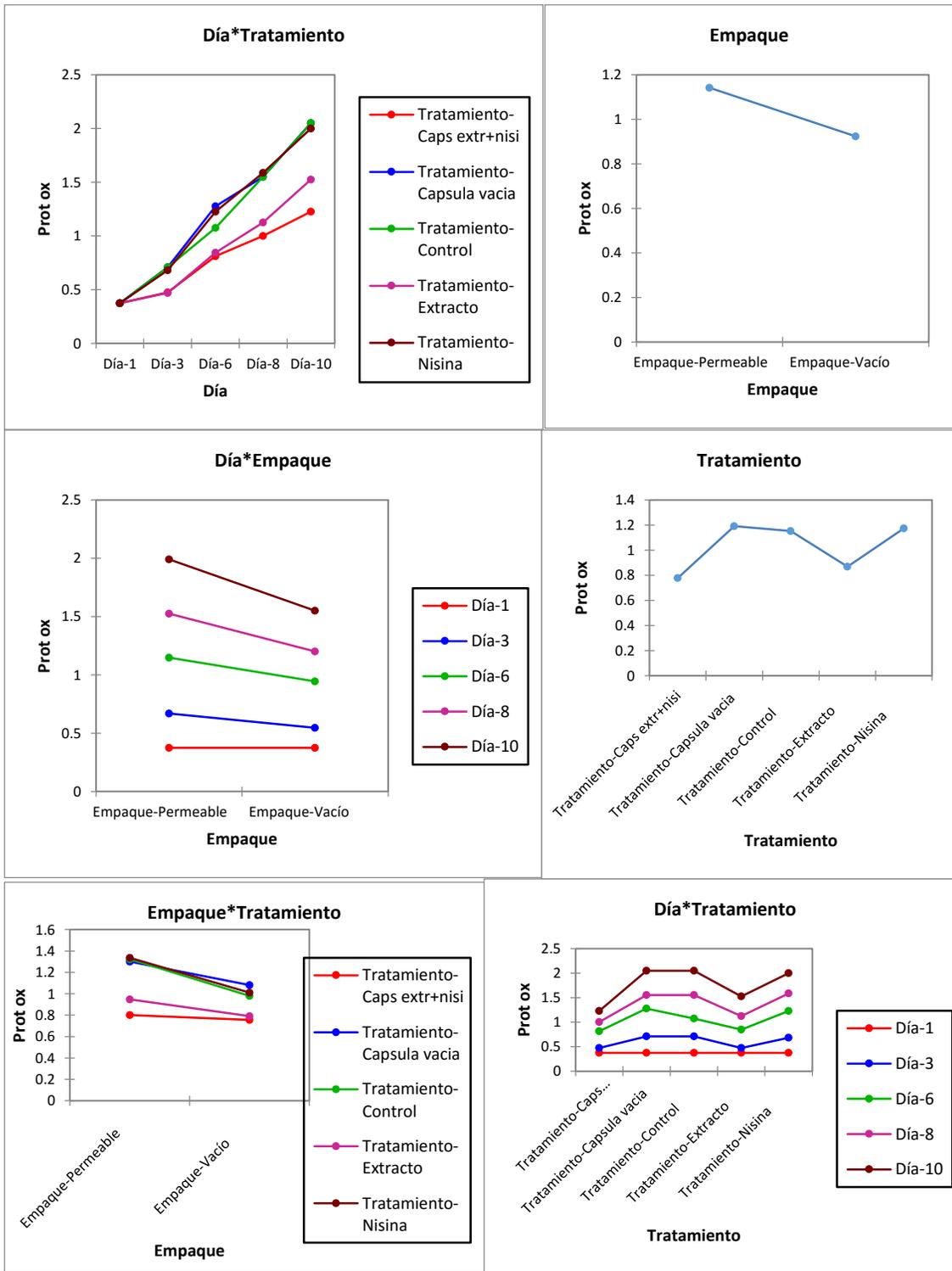
## A2.6 Variable respuesta proteínas oxidadas

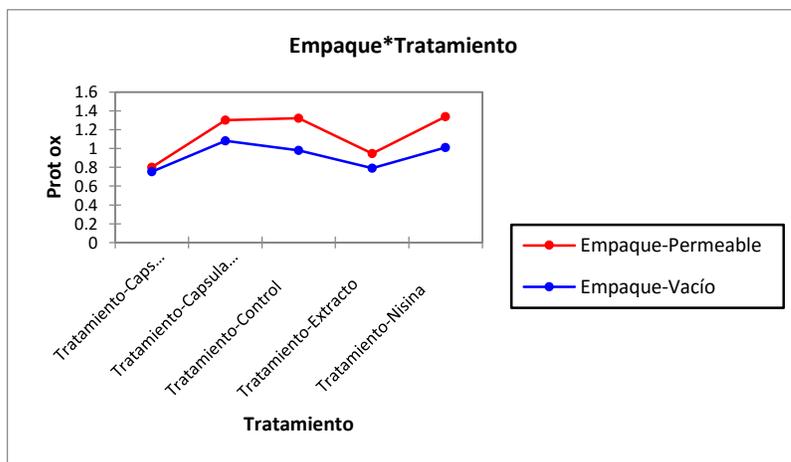
### Análisis de Varianza para Prot ox - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Día	25.3068	4	6.32669	274.14	0.0000
B:Empaque	1.18897	1	1.18897	51.52	0.0000
C:Tratamiento	3.02685	4	0.756712	32.79	0.0000
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	0.588107	4	0.147027	6.37	0.0003
AC	1.4419	16	0.0901187	3.90	0.0001
BC	0.306153	4	0.0765382	3.32	0.0174
ABC	0.371933	16	0.0232458	1.01	0.4650
<b>RESIDUOS</b>					
TOTAL (CORREGIDO)	33.3846	99			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual







**A2.7** Variable respuesta oxidación lipídica

**Análisis de Varianza para TBARS - Suma de Cuadrados Tipo III**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Día	0.150232	4	0.037558	35.95	0.0000
B:Empaque	0.00674041	1	0.00674041	6.45	0.0142
C:Tratamiento	0.0374061	4	0.00935152	8.95	0.0000
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	0.00358754	4	0.000896885	0.86	0.4953
AC	0.0170539	16	0.00106587	1.02	0.4525
BC	0.00217354	4	0.000543385	0.52	0.7213
ABC	0.00682726	16	0.000426704	0.41	0.9738
RESIDUOS	0.0522335	50	0.00104467		
TOTAL (CORREGIDO)	0.276254	99			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

