



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA

**ELABORACIÓN DE UNA PELÍCULA COMESTIBLE PARA QUESOS CON ACEITE
ESENCIAL DE PALMA (*BRAHEA DULCIS*) COMO ANTIMICROBIANO.**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN ALIMENTOS

PRESENTA:

ANA PAOLA VERA GUZMÁN

DIRECTORA: DRA. MIRNA PATRICIA SANTIAGO GÓMEZ

CO-DIRECTORA: M. EN C. ALMA YADIRA SALAZAR GOVEA

Huajuapán de León, Oaxaca, México, Marzo 2024.

RESUMEN

El queso fresco es un producto elaborado a partir de leche y de enzimas para coagular, siendo uno de los alimentos de alto consumo, sin embargo, tiene una vida útil máxima de 9 días si es almacenado a 10 °C. Por otro lado, el uso de películas comestibles se ha ido implementando a lo largo de los últimos años con la intención de incrementar la vida útil de los alimentos por reducir o inhibir la carga microbiana e incluso llegan a mejorar o intensificar las propiedades sensoriales del alimento. El presente estudio se enfocó en el desarrollo de una película comestible para el recubrimiento de quesos a partir del aceite de palma (*Brahea dulcis*). Para realizar este estudio primero se realizó la extracción del aceite de *Brahea dulcis* mediante extracción Soxhlet y extracción asistida por ultrasonido, en la que se obtuvieron mejores rendimientos para Soxhlet con 5.54 ± 0.62 y 2.72 ± 0.53 % usando como disolventes etanol y hexano, respectivamente. Luego, se determinó su actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella entérica* y *Listeria monocytogenes*, encontrando halos de inhibición para *S. aureus*, *Salmonella entérica* y *L. monocytogenes* de 24, 8 y 9.5 mm, respectivamente. Posteriormente, se incorporó en una mezcla de carboximetilcelulosa, glicerol y tween 80 a diferentes concentraciones (0.004, 0.005 y 0.006 % para F1, F2 y F3, respectivamente) que se aplicaron en quesos frescos recién preparados. Finalmente, se evaluó la estabilidad de los quesos mediante pruebas microbiológicas en las que se determinó disminución de la carga microbiana del queso fresco tras aplicar la película a las concentraciones propuestas durante 252 horas de almacenamiento a 4 °C en *Salmonella spp* y coliformes totales, además se determinó diferencia significativa de las formulaciones propuestas respecto al control en *S. aureus*.

Palabras clave: palma (*Brahea dulcis*), queso fresco, recubrimiento comestible, actividad antimicrobiana.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Ciencia y Tecnología de los Alimentos del edificio de posgrado de la Universidad Tecnológica de la Mixteca.

Sonríe, sueña & brilla...

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a mi familia, papá, mamá, hermano, por creer en mí y permitirme alcanzar una meta más.

A la Universidad Tecnológica de la Mixteca por permitirme una formación con disciplina.

Agradezco al Dr. Raúl Salas Coronado, la I. A. Brenda Iris Guadalupe Licon Morán, la Dra. Daniela Barrera García por instruirme en este proyecto, por sus observaciones, comentarios y sugerencias.

A la Dra. Mirna Patricia Santiago Gómez y la M. en C. Alma Yadira Salazar Govea, por creer en mi potencial, por sus consejos y por sus enseñanzas.

A la encargada de laboratorio, la I. A. Marlitt Sánchez Cruz por sus consejos, su apoyo y por su ayuda.

A mis futuros colegas Marcos, Deysi, Anakojpkpijy, Yina, Lau, Farid, Misa, por ayudarme cada que lo necesitaba.

A mis amigos, Diana Álvarez, Diana (Ana Lilia), Eduardo, Axel, Diana Quiroz, Fabi, Víctor, Sergio, Dra. Ludmila, por ser parte de este proceso y animarme siempre que podían.

A BTS, que con su música y sus palabras me animaron a persistir por mis metas.

Gracias Abel por motivarme siempre que dudaba de mí misma, gracias por tu cariño y por tu comprensión.

Finalmente, agradezco a la vida y las oportunidades de la misma.

¡Muchas gracias a todos!

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	MARCO TEÓRICO.....	3
2.1.	<i>Brahea dulcis</i>	3
2.1.1.	DESCRIPCIÓN.....	3
2.1.2.	COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	4
2.1.3.	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.....	6
2.1.4.	USOS.....	7
2.2.	ACEITE ESENCIAL.....	9
2.2.1.	DEFINICIÓN.....	9
2.2.2.	PROPIEDADES.....	10
2.2.3.	MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	12
2.2.4.	USO EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.....	13
2.2.5.	EFFECTO EN LAS PROPIEDADES SENSORIALES DE LOS ALIMENTOS.....	14
2.3.	PELÍCULAS COMESTIBLES.....	14
2.3.1.	CARACTERÍSTICAS.....	14
2.3.2.	MATERIALES PARA LA ELABORACIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES.....	15
2.3.3.	ELABORACIÓN.....	17
2.4.	QUESO FRESCO.....	18
2.4.1.	DESCRIPCIÓN.....	18
2.4.2.	CLASIFICACIÓN DE LOS QUESOS.....	21
2.4.3.	COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	21
2.4.4.	FLORA MICROBIANA.....	22
2.4.5.	VIDA ÚTIL.....	24
2.4.6.	EMPAQUES DIRECTOS PARA QUESOS.....	25
3.	OBJETIVOS.....	26
3.1.	OBJETIVO GENERAL.....	26
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4.	JUSTIFICACIÓN.....	27
5.	ORIGINALIDAD.....	29
6.	ALCANCES Y LIMITACIONES.....	30
7.	HIPÓTESIS.....	31
8.	MARCO METODOLÓGICO.....	32

8.1.	REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPO	33
8.1.1.	ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA	33
8.2.	EXTRACCIÓN DE ACEITE POR MÉTODO CONVENCIONAL (SOXHLET)	34
8.3.	EXTRACCIÓN DE ACEITE POR EL MÉTODO DE ULTRASONIDO	35
8.4.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS	36
8.5.	DESARROLLO DE LA PELÍCULA.....	38
8.6.	APLICACIÓN DE LA PELÍCULA EN QUESO	39
8.7.	EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LOS QUESOS FRESCOS	40
8.7.1.	PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS.....	40
8.7.1.1.	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	40
8.7.1.2.	COLIFORMES TOTALES Y FECALES.....	41
8.7.1.3.	<i>SALMONELLA SPP</i>	41
8.8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	42
9.	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	44
9.1.	EXTRACCIÓN DE ACEITE DE LA PALMA UTILIZANDO LOS MÉTODOS SOXHLET Y EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO.....	44
9.2.	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	47
9.3.	EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LOS QUESOS FRESCOS	51
9.3.1.	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	51
9.3.2.	COLIFORMES TOTALES Y FECALES.....	53
9.3.3.	<i>SALMONELLA SPP</i>	56
9.4.	ANÁLISIS DE VARIANZA	59
10.	CONCLUSIONES	62
11.	PERSPECTIVAS	63
	ANEXOS	73
	ANEXO A. PREPARACIÓN DE MUESTRA DEL ALIMENTO PARA SU EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA	73
	ANEXO B. PREPARACIÓN DE CALDO LAURIL TRIPTOSA	75
	ANEXO C. PRUEBA TUKEY EN INFOSTAT 2020	76
	ANEXO D. PRUEBA DE NO PLAGIO	80

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Usos de la palma (<i>Brahea dulcis</i>) en diferentes municipios de México.	9
Tabla 2. Uso antimicrobiano de aceites esenciales en alimentos.	11
Tabla 3. Métodos de extracción de aceites esenciales.	13
Tabla 4. Clasificación de materiales para elaboración de películas comestibles.	16
Tabla 5. Límites máximos de contenido microbiano en leche.	20
Tabla 6. Clasificación de quesos.	21
Tabla 7. Condiciones óptimas de desarrollo y consecuencias de la presencia de microorganismos propios del queso.	23
Tabla 8. Formulaciones para el desarrollo de la película comestible.	38
Tabla 9. Descripción de colonias típicas según el medio.	42
Tabla 10. Diseño experimental.	42
Tabla 11. Grasa extraíble (%) por diferentes métodos usando como disolventes hexano y etanol.	44
Tabla 12. Presencia de actividad antimicrobiana de aceite de palma a diferentes concentraciones contra <i>Salmonella</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> y <i>L. monocytogenes</i> .	48
Tabla 13. Recuento de <i>S. aureus</i> presentes en queso fresco almacenados a 4 °C.	51
Tabla 14. Coliformes fecales por NMP con porciones de 0.1, 0.01 y 0.001g de muestra.	54
Tabla 15. Coliformes totales por NMP con porciones de 0.1, 0.01 y 0.001g de muestra.	54
Tabla 16. Presencia o ausencia de <i>Salmonella</i> en 25 g de muestra.	56
Tabla 17. Análisis de varianza de <i>S. aureus</i> .	59
Tabla 18. Prueba Tukey por tiempo para <i>S. aureus</i> .	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Palma (<i>Brahea dulcis</i>).	3
Figura 2. Estructura de ácido oleico.	4
Figura 3. Distribución geográfica de <i>Brahea dulcis</i> en México.	7
Figura 4. A) Estate de palma. B) Escoba de palma. C) Sombrero de palma. D) Envase de palma en quesos.	8
Figura 5. Queso fresco.	19
Figura 6. Diagrama general de metodología.	32
Figura 7. Palma en proceso de secado.	34
Figura 8. Extracción Soxhlet para palma (<i>Brahea dulcis</i>).	35
Figura 9. Extracción de aceite de palma (<i>Brahea dulcis</i>) por ultrasonido.	36
Figura 10. Determinación de actividad antimicrobiana por difusión en placa.	37
Figura 11. Aplicación de película en queso fresco.	39
Figura 12. A) Extracto–hexano. B) Extracto–etanol.	46
Figura 13. Efecto inhibitorio del aceite de palma por método de placa en SE. A) <i>Salmonella</i> . B) <i>E. coli</i> . C) <i>S. aureus</i> . D) <i>L. monocytogenes</i> .	50
Figura 14. Aspecto físico de las muestras de queso a los 7 días.	58
Figura 15. Aspecto físico de las muestras de queso a 10 días de almacenamiento.	58
Figura 16. Comportamiento del crecimiento de <i>S. aureus</i> en queso fresco almacenado a 4 °C.	60

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius.
µg	Microgramo
µL	Microlitro
AOAC	Association of Analytical Communities
g	Gramo
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
kg	Kilogramo
L	Litro
m	Metros
mg	Miligramo
mL	Mililitro
NMP	Número Más Probable
TAG	Triglicéridos
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

1. INTRODUCCIÓN

El uso de recubrimientos comestibles surge como una necesidad en el mercado para incrementar la vida útil de los alimentos y se promueve el uso de sustancias activas de plantas, semillas, hojas, flores, etc. Así mismo, la tendencia actual se basa en consumir menos aditivos químicos, de modo que, el uso de los aceites esenciales es una alternativa por poseer propiedades antimicrobianas, antioxidantes o antifúngicas que pretenden retrasar la pérdida nutrimental del alimento, de las propiedades sensoriales y evitar el desarrollo de microorganismos.

Las características sensoriales de un alimento provocan que el consumidor tenga mayor preferencia hacia un determinado producto, esto se puede notar en el queso que es un producto muy popular a nivel mundial, no obstante, en México hay mayor preferencia por el queso en fresco. Este a pesar de ser un alimento con gran demanda en el mercado, tiene el problema de su vida útil corta, lo cual se debe al proceso de elaboración que difiere del lugar donde se realice, así como a factores fisicoquímicos como la humedad, la grasa, la sal empleada y el pH (Ramírez López & Vélez Ruiz, 2012).

La conservación de los alimentos ha presentado una problemática constante entre los consumidores, quienes buscan consumir alimentos sin ser altamente procesados y que garanticen la inocuidad para su conservación. Para ello, se ha recurrido a emplear películas comestibles a partir de aceites esenciales con el propósito de aumentar la vida útil del alimento. Thielman, Muranyi, & Kazman (2019) indican que los aceites esenciales tienen actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhimurium*, aplicando el aceite esencial de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* y *Cinnamomum verum*,

aunque no se ha estudiado el incremento de la vida de anaquel, se puede estimar que esto ocurra a causa de la inhibición de microorganismos patógenos.

Los aceites esenciales se pueden aplicar en alimentos perecederos, aunque, éstos derivan de especias que pueden impregnar sabor y olor, como es el caso del orégano, hierbabuena, té de limón, etc. Sin embargo, Akanda, et al., (2012) menciona que los aceites son ideales para ser usados en alimentos debido a su composición, consistencia natural, apariencia, olor agradable y naturaleza resistente al calor.

El uso de la palma en el estado de Oaxaca destaca en artesanías, así mismo es utilizado en envases de quesos frescos, donde una posible causa de su uso es la transferencia de notas herbales al producto que resultan agradables al consumidor, por lo que se realizó el desarrollo de una película comestible con aceite esencial de la palma (*Brahea dulcis*) que se aplicó al queso y se monitoreó cada 84 h hasta las 252 h mediante pruebas microbiológicas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. *Brahea dulcis*

2.1.1. DESCRIPCIÓN

La palma (*Brahea dulcis*) (Fig. 1) es un producto forestal no maderable que a lo largo de la humanidad ha tenido diversos usos en la vida diaria, siendo desde ornamento hasta llegar a servir como envase primario de quesos en algunos mercados en el estado de Oaxaca.

Según Quero (1994), *Brahea dulcis* es una especie muy abundante y tiene una distribución muy amplia. Esta palmera puede alcanzar hasta 8 m de altura, con tallos a veces solitarios, erectos y frecuentemente de crecimiento cespitoso; en los adultos, la corona tiene de 10–15 hojas flabeladas, pecíolos con márgenes armados, inflorescencias de flores sésiles que cuelgan en racimos modificados y frutos monocárpicos, monoespermáticos en drupa. Las palmas son plantas hermafroditas con flores bisexuales, interactúan con hormigas y abejas, que pueden servir como polinizadores. Como todas las especies de este género, se le encuentra en suelos calizos en altitudes superiores a los 800 m (Pulido & Coronel-Ortega, 2015).



Figura 1. Palma (*Brahea dulcis*).¹

¹ Foto tomada por la autora (2023).

2.1.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Si bien todas las palmas de la familia *Arecaceae* se caracterizan porque sus frutos y semillas contienen 3.57 % de aceites en promedio, según Rincón, S. & Martínez, D., (2009), las de la tribu *Cocoseae* son consideradas como palmeras oleíferas por su alto contenido de aceites, tanto en el mesocarpo como en el endospermo (Pulido & Coronel-Ortega, 2015).

COMEXPALMA (2020), señala que la composición del aceite esencial de palma contempla ácidos grasos, así como los triglicéridos. Según Zaidul, Norulaini, Mohd & Smith, (2007) en Akanda et al., (2012), la proporción de ácidos grasos saturados e insaturados en el aceite de palma está bien equilibrada, ya que contiene 40 % de ácidos grasos monoinsaturados [como el ácido oleico (Fig. 2)], 10 % de ácidos grasos poliinsaturados (como el ácido linoleico), 45 % de ácido palmítico y 5 % de ácido esteárico (ácido graso saturado). Estos componentes serán los encargados de dar las características tanto físicas como químicas al aceite, como es el punto de fusión.

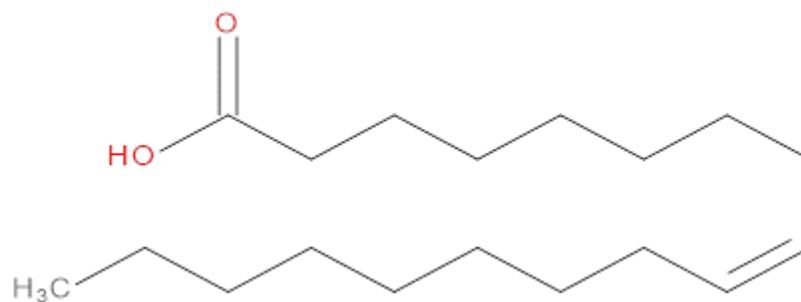


Figura 2. Estructura de ácido oleico.²

² Elaboración propia. (2022).

El aceite de palma se compone de dos categorías de constituyentes menores. La primera categoría está formada por derivados de ácidos grasos que incluyen acilglicéridos, principalmente monoglicéridos y diglicéridos, fosfátidos, ésteres y esteroides. La segunda categoría comprende compuestos no relacionados con ácidos grasos, específicamente hidrocarburos, y estos incluyen alcoholes alifáticos, esteroides libres, tocoferoles y pigmentos. El aceite de palma crudo es una de las fuentes más ricas de carotenoides biológicamente activos y la mayor fuente natural de tocotrienol, que forma parte de la familia de la vitamina E (Akanda et al., 2012). Por otro lado, estudios de Lau, Choo, Ma, Chuah (2006) en Akanda et al., (2012), indican que el aceite de fibra prensada de palma contiene un alto nivel de escualeno, fitoesteroides, carotenos y vitamina E, que van desde 1102 a 4638 mg/kg cada uno, dependiendo de si se usa fibra fresca o seca.

Los componentes del aceite de fibra prensada de palma se caracterizan por actuar como antioxidantes y antimicrobianos. El escualeno es un triterpeno que tiene propiedades antioxidantes, así como la capacidad de actuar como agente emoliente que, provoca una disminución de la pérdida de agua debido a la formación de una película delgada de carácter hidrofóbico, mientras que, los fitoesteroides son compuestos que desempeñan un papel esencial en la regulación de la fluidez y permeabilidad de la membrana (Silva et al., 2016). Asimismo, se halló actividad antimicrobiana por parte de los fitoesteroides de acuerdo al estudio de Guerra, Rodríguez & Saguir, (2018). Por otro lado, los carotenos son muy importantes por su eficiencia antioxidante que impide la formación de especies reactivas de oxígeno y por su capacidad antimicrobiana que inhibe el desarrollo de microorganismos que causan las degradaciones y apariciones de malos sabores (Boiero, et al., s. f.). La vitamina E es frecuentemente usada como antioxidante o como preservante natural,

estudios de Proaño Bastidas, Urresta Valencia & Racines Oliva, (2017), indican que este componente sustituye los preservantes químicos sin alteraciones microbiológicas hasta por 30 días.

2.1.3. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Rangel-Landa, Rivera-Lozoya & Casas, (2014), indican que la especie *Brahea dulcis* se encuentra principalmente en los estados de Sinaloa, Veracruz, Hidalgo, Guerrero y Oaxaca (Fig. 3) e incluso llega a Centroamérica en países como Guatemala y Belice, entre otros, teniendo en común que son áreas con suelos calizos en zonas semiáridas. Aunque en México se ha mostrado mayor uso de la palma en las culturas mixteca, náhuatl y tlapaneca, hay otros estados en el país que también la emplean.

En el estado de Oaxaca, se registra el cultivo de la palma criolla [*Brahea dulcis* (Kunth)], en los municipios de Santa María Ixcatlán, Jocotipac, Jaltepetongo, Santa María Texcatitlán, Santiago Chazumba, Olleras de Bustamante, San Pedro y San Pablo Tequixtepec, Tepelmeme Villa de Morelos y San Miguel Tequixtepec (García-García, 2017).



Figura 3. Distribución geográfica de *Brahea dulcis* en México.³

2.1.4. USOS

Actualmente, la palma se usa para ofrendas religiosas y para hacer una gran variedad de artículos utilitarios; de manera que se aprovechan casi todas las partes de esta planta. Las hojas tiernas se usan para hacer petates, sombreros y escobas, en cambio, las hojas más viejas se usan en flores y arreglos, y las hojas secas se utilizan como combustible. Asimismo, las raíces se usan para hacer fibras para platos, y las flores y frutos son comestibles (Quero, 1994). Particularmente en el estado de Oaxaca la palma se utiliza como un envase primario en la elaboración del queso fresco (Fig. 4).

³ Elaboración propia. (2022).



Figura 4. A) Estate de palma.⁴ B) Escoba de palma.⁵ C) Sombrero de palma.⁶ D) Envase de palma en quesos.⁷

En México, se han utilizado las palmas de muy diversas maneras; en algunos casos, las usan directamente ya sea como alimento, construcción o abrigo, o bien para la elaboración de algún producto que sea fuente de ingresos; algunas otras palmas tienen uso ornamental en casas, parques y jardines. Se puede indicar que, en México de una u otra manera, prácticamente todas las palmas son utilizadas (Pulido & Coronel-Ortega, 2015). El diverso uso de la palma varía según el lugar, tal como se muestra en la Tabla 1, donde se describe el uso de esta planta en diferentes localidades.

⁴ Dreamstime. (s. f.). Esteras coloridas de la hoja de palma.

⁵ Tenorio, Y. (2022). Fabricación rústica de escobas de palma, un oficio desaparece en San Ignacio, Sinaloa.

⁶ Museo Nacional de Antropología. (2018). Sombrero mixteco. MNA.

⁷ Xaachila. Queso petate.

Tabla 1. *Usos de la palma (Brahea dulcis) en diferentes municipios de México.*

Lugar	Uso	Referencia
Tepelmeme de Vila de Morelos, Oaxaca	Sombreros, petates, tenates, escobas, sopladores, escobetas de la raíz de la planta de palma y de las hojas de la palma, figuras de palma.	García-García, 2017.
Topiltepec, Guerrero	Sombreros, carteras, bolsas, tapetes, manteles individuales, carpetas, tortilleros, cestos, adornos navideños, figuras ceremoniales, envoltura de quesos.	Gómez et al., s. f.
San Lorenzo Albarradas, Oaxaca	Petates, sombreros, tenates.	Martínez de la Cruz et al., 2013.
Metztitlán, Hidalgo	Artesanías, adornos y ofrendas religiosas, y en el techado de las viviendas.	Pavón, Escobar & Ortíz-Pulido, 2005.
Sonora	Techos de casas, artesanías, pastoreo.	López-Toledo et al., 2015.

2.2. ACEITE ESENCIAL

2.2.1. DEFINICIÓN

Los aceites esenciales son sustancias susceptibles a la oxidación o a la transformación de resinas al emplear altas temperaturas por su diversa composición química, constan así de una mezcla de aldehídos, cetonas, ácidos, ésteres, terpenos y alcoholes (Martínez, 2001).

En diversas partes de una planta se encuentran las sustancias conocidas como aceites esenciales, como en las flores, semillas, en las hojas o en el fruto, los cuales

se caracterizan por ser líquidos aromáticos que son volátiles y de menor densidad que el agua (Iturriaga, 2009).

2.2.2. PROPIEDADES

Los aceites esenciales pueden tener diversas propiedades, sin embargo, en las últimas décadas ha tenido relevancia su función como antimicrobianos. En evaluaciones generales, la mayoría de los estudios se han centrado en un solo tipo de aceite esencial, principalmente de especies de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* o *Cinnamomum verum* en las que Thielman, Muranyi, & Kazman (2019) han determinado la actividad de estas especias contra microorganismos como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhimurium* que, comúnmente se transmiten por alimentos contaminados.

Los aceites esenciales pueden llegar a presentar más de 100 metabolitos con propiedades antioxidantes, antisépticas, antiinflamatorias, antifúngicas y antibacterianas (Domingo, 2003; Pérez-López, et al., 2020-2021), entre otras.

2.2.2.1. Actividad antimicrobiana

En el laboratorio de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad Tecnológica de la Mixteca se llevó a cabo la evaluación de la actividad antimicrobiana de aceite esencial de palma (*Brahea dulcis*) aplicado en *S. aureus* empleando la técnica de difusión en placa, donde Pérez-López et al., 2020-2021, señalan que el aceite esencial de la palma tiene actividad antimicrobiana a partir de concentraciones de 8 000 y 10 000 µg/mL, mostrando halos de inhibición de 5.5 y 9.0 mm de diámetro, respectivamente; de tal manera que, al incrementar la concentración del extracto, mayor será el efecto de inhibición.

Por otro lado, en la Universidad de Valencia, España, se han usado películas comestibles a partir del aceite esencial del extracto de orégano. Los compuestos fenólicos (como el ácido rosmarínico y derivados del ácido protocatéquico), se encuentran en el extracto de orégano y son responsables de la actividad antimicrobiana. Pandia, et al., (2021) indica que los compuestos atacan la membrana celular fosfolipídica causando el aumento de la permeabilidad y fuga de citoplasma, o interactúan con las enzimas ubicadas en la pared celular. Debido al gran impacto que han tenido los aceites esenciales en la industria alimentaria, se muestra en la Tabla 2 el uso antimicrobiano que se le ha otorgado a diversas especias en quesos.

Tabla 2. *Uso antimicrobiano de aceites esenciales en quesos.*

Aceite esencial	Aplicación	Concentración	Alimento
Jengibre Tapiero et al., 2017.	Mohos y levaduras	0.05–0.1 mL/L	Queso semimaduro
Pimpinela blanca (<i>Pimpinella saxifraga</i>) Cano García, 2021.	<i>E. coli</i> , <i>S. Typhimurim</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. cereus</i> , <i>M. luteus</i> , <i>L. Monocytogenes</i>	1–3 %	Queso fresco
Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>) Julliane de Carvalho et al., 2015.	<i>L. Monocytogenes</i> , <i>Salmonella spp</i> , <i>S. aureus</i>	5000 µL	Queso poco maduro
Moringa (<i>Moringa oleifera</i>) Lin, Yulei & Haiying, 2018.	<i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i>	20 mg/mL de moringa	Queso

Los aceites esenciales tienen características de ser biodegradables, son amigables con el ambiente por sus bajos niveles de toxicidad pese a tener una compleja composición química y un carácter aromático fuerte, además de poseer propiedades insecticidas, antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas y antivirales, por esta razón son una alternativa para el control de bacterias (Rueda–Puede, et al., 2018).

2.2.2.2. Actividad antioxidante

Los antioxidantes son compuestos que poseen la capacidad de retrasar o inhibir la oxidación de lípidos u otras moléculas, como consecuencia de la inhibición o propagación de las reacciones en cadena de oxidación. Con base en Zeng & Wang (2001) en Marín–Muñoz (2015), los compuestos fenólicos se encuentran en aceites esenciales extraídos de plantas, estos poseen propiedades antioxidantes, de tal manera que sustituyan a antioxidantes sintéticos.

2.2.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

La materia vegetal contiene micro y macro componentes, como los aceites esenciales. Estas sustancias son caracterizadas por su volatilidad y su sensibilidad a la luz; sin embargo, Martínez (2001) propone los siguientes métodos de extracción (Tabla 3) para estos compuestos sin llegar a su degradación.

Tabla 3. Métodos de extracción de aceites esenciales.

Método de extracción	Descripción
Destilación por arrastre de vapor	Es un método que ofrece altos rendimientos, consiste en colocar en un matraz de bola la materia fresca y cortada para someterla a una corriente de vapor sobrecalentado el cual se condensa, se recolecta y se separa de la fase acuosa.
Extracción con disolventes orgánicos	Este método puede extraer la esencia con impurezas, requiere de la muestra seca y molida en contacto con disolventes volátiles que la solubilizan. Sin embargo, es un método eficaz.
Enflorado o enfleurage	Requiere de aceite vegetal que se emplea como vehículo extractor, de modo que se obtiene una mezcla entre el aceite vegetal y el aceite esencial; la muestra que entra en contacto con el aceite vegetal son comúnmente flores.
Extracción con fluidos supercríticos	Ofrece muy buenos rendimientos pese a su alto costo. Es un método no convencional que requiere condiciones de operación con disolventes por encima de su punto crítico, uno de los disolventes más usados es el dióxido de carbono. La materia prima se coloca en una cámara de acero, ya sea molida o en trozos y se mantiene en contacto con el disolvente, posteriormente se realiza una despresurización del sistema para obtener el extracto libre de disolvente.

2.2.4. USO EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Los aceites esenciales son sustancias sintetizadas naturalmente en diferentes órganos de las plantas como metabolitos secundarios, se caracterizan por ser líquidos aromáticos aceitosos que son extraídos de materiales vegetales. La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales es prometedora para su uso en sistemas de conservación de alimentos (Martínez Ruíz, 2020).

Los aceites esenciales de plantas aromáticas y medicinales se han utilizado durante muchos años en todo el mundo, ya sea en el procesamiento de alimentos como potenciadores del sabor y conservantes o como remedios (Alexopoulos, et al., 2011). En la industria alimentaria se encuentran como sustancias para dar sabor y otorgar aroma o se emplean como conservadores, incluso se usan en bebidas carbonatadas, concentrados o licores, resultando atractivos para el consumidor.

2.2.5. EFECTO EN LAS PROPIEDADES SENSORIALES DE LOS ALIMENTOS

Es de gran importancia la elección que se realiza sobre los aceites esenciales y las concentraciones pues, Tserennadmid, et al., (2011) en Ceballos-Toro & Londoño-Giraldo (s. f.) sustenta que, una pequeña cantidad de estos puede causar alteraciones sensoriales en el color, sabor y aroma; sin embargo, la combinación de aceites esenciales entre ellos mismos conduce a una unión sinérgica o aditiva que puede reducir este efecto.

2.3. PELÍCULAS COMESTIBLES

2.3.1. CARACTERÍSTICAS

El recubrimiento comestible se define como una matriz delgada cuya estructura se encuentra alrededor del alimento formando un recubrimiento que por lo general se forma mediante la inmersión del alimento en una solución (Mero Plaza & Valencia Cagua, 2018).

Las películas comestibles tienen la capacidad de fortificar a la capa externa del alimento para evitar pérdidas de humedad, permitiendo a su vez el intercambio controlado selectivo de los gases importantes, como el oxígeno y el dióxido de carbono. También pueden proporcionar la esterilidad de la superficie y evitar la pérdida de componentes importantes (Pandia, Romero, Céspedes, & Solari, 2021).

2.3.2. MATERIALES PARA LA ELABORACIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES

Los recubrimientos comestibles son elaborados a partir de hidrocoloides (compuestos de polisacáridos y proteínas), así como de lípidos y resinas que forman sistemas multicomponentes que en conjunto con sustancias emulsionantes o plastificantes actúan para mejorar la conservación del alimento, o bien, en conjunto con hidrocoloides brindan un mayor efecto conservador, a los que se denomina recubrimientos compuestos (Tabla 4).

Tabla 4. *Clasificación de materiales para elaboración de películas comestibles.*

Origen	Descripción	Referencia
Hidrocoloide	Son constituidos por polisacáridos y proteínas. Los polisacáridos poseen propiedades de adherencia y flexibilidad, que les permite actuar como barrera de gases en la superficie del alimento, son muy hidrofílicos. Por otro lado, las proteínas son menos hidrofílicas, sin embargo, sus propiedades se ven afectadas a su vez por el origen de la proteína (animal o vegetal) pues varían en peso molecular, pH y flexibilidad, aunque funcionan como buena barrera ante la humedad, gases y aceites.	Cano-García, 2021.
Lípidos	Se caracterizan por actuar como una barrera al vapor de agua, ya que es de carácter hidrofóbico y las resinas actúan como barrera a los gases, provocando alteraciones sensoriales por no transferir los gases al exterior.	Castro-Parra, 2013.
Recubrimientos compuestos	Se clasifica en laminado y emulsionado. El primero consiste en la distribución homogénea donde se sobrepone la capa lipídica sobre un hidrocoloide, mientras que el emulsionado se diferencia por una distribución heterogénea de la capa lipídica.	Castro-Parra, 2013.

2.3.3. ELABORACIÓN

Para elaborar el recubrimiento comestible hay diferentes técnicas tales como: eliminación del disolvente, gelación térmica, solidificación, fundición, electropulverización y microfluidización, las cuales se definen a continuación (Solano–Doblado, Alamilla–Beltrán & Jiménez–Martínez, 2018):

- a) **Eliminación del disolvente.** En este proceso se forma y se estabiliza una estructura molecular por interacciones físicas y químicas. La disolución formadora del hidrocoloide comestible se incorpora en un disolvente (agua, etanol, ácido acético) que contiene a los aditivos (plastificantes, agentes de reticulación o solutos); formando una capa delgada que se desprende tras eliminar el disolvente (Cagri, Ustunol & Ryser, 2004).
- b) **Gelación térmica.** Se aplica de un tratamiento térmico que permite la formación de un gel estable de estructura rígida. Esta técnica es utilizada generalmente para las películas y recubrimientos elaborados a base de proteínas, en el que ocurre la desestabilización de las moléculas de proteínas dando lugar a la formación de un entramado estable entre partículas (Carmona Gallego, et al., 2007).
- c) **Solidificación.** En este método las macromoléculas junto con el plastificante son disueltas hasta su homogeneización y son vertidas en capas finas sobre moldes (Ávila–Sosa et al., 2012).
- d) **Fundición.** Se disuelve cierta cantidad de polímero en un disolvente orgánico (acetato de etilo, cloroformo, THF). Posteriormente, esta disolución se coloca sobre una superficie especial (teflón) a temperatura ambiente (25 °C) y se deja reposar el tiempo necesario para que se lleve a cabo la evaporación del disolvente y dar origen a la película (Martínez Martínez, 2012).

- e) **Electropulverización.** La pulverización electrohidrodinámica es un método de atomización del líquido formador de la película por medio de fuerzas eléctricas, en donde el líquido sale por una boquilla con un alto potencial eléctrico. La ventaja de este método es que las gotas que se obtienen son tan pequeñas que el tamaño de partícula llega a medir incluso nanómetros, y la carga y el tamaño pueden controlarse en cierta medida por medios eléctricos (Jaworek & Sobczyk, 2008).
- f) **Microfluidización.** Es el proceso en el que las dispersiones se hacen pasar a través de microcanales, lo que permite la obtención de nanopartículas que otorgan a la película mejores características físicas (Monroy-Villagrana, et al., 2014). Se logra una distribución uniforme utilizando un microfluidizador el que consiste en una licuadora con alto poder de cizallamiento que forma una emulsión de aceite, un emulsificante y agua, mientras que, se pasan emulsiones gruesas a través del microfluidizador utilizando presión neumática, provocando el choque de la emulsión entre sí a altas velocidades, alterando así a las fuerzas de adhesión y cohesión (Rosero, Espinoza-Montero & Fernández, 2020).

2.4. QUESO FRESCO

2.4.1. DESCRIPCIÓN

El queso (Fig. 5) es un producto que puede ser blando, semiduro, duro o extraduro, madurado o no madurado, y puede estar recubierto, en este producto se debe cumplir que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior

a la de la leche (NOM-223-SCFI/SAGARPA-2018). La obtención del queso se realiza mediante el siguiente procedimiento: la coagulación total o parcial de la proteína de la leche, leche descremada, leche parcialmente descremada, crema, mantequilla, o de cualquier combinación de estos productos, por acción del cuajo u otros coagulantes y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación. Además, se caracteriza por contener nutrientes como grasas, proteínas y minerales los cuales son benéficos para la salud porque ayudan a una mayor absorción del calcio gracias a la lactosa, o bien, por el contenido de grasas saturadas que ayuda a prevenir infartos cardiovasculares, disminuir los TAG plasmáticos y aumentar el colesterol HDL (Durán-Agüero, Torres García & Sanhueza Catalán, 2015).



Figura 5. Queso fresco.⁸

Por otro lado, la NOM-247-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y

⁸ Oaxaca de mis amores. (2020). Queso fresco.

especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Señala los límites máximos en el contenido de microorganismos para este producto, como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Límites máximos de contenido microbiano en leche.⁹

Microorganismo	Límite máximo
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 000 UFC/g
<i>Escherichia coli</i>	100 UFC/g o mL
Coliformes totales	<100 UFC/g o mL
<i>Salmonella spp</i>	Ausente en 25 g o mL
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausente en 25 g o mL

Merchán Castellanos et al., (2019) indicaron que los patógenos más frecuentes en el queso fresco son *Staphylococcus aureus* (43.71 %) y *Escherichia coli* (18.51 %); y los menos frecuentes fueron, *Listeria monocytogenes* (16.26 %) y *Salmonella spp.* (11.66 %), así mismo, De la Rosa Alcaraz, (2013) sostiene que las bacterias patógenas más comunes presentes en el queso son *Salmonella*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y su enterotoxina, mientras que González-Montiel & Franco-Fernández, (2015), indican que la transmisión de enfermedades alimentarias se debe a un alto contenido de *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* en el queso fresco.

⁹ NOM-247-SSA1-2010.

2.4.2. CLASIFICACIÓN DE LOS QUESOS

Existe una gran variedad de quesos, sin embargo, una manera simple de visualizar la clasificación es como se muestra en la Tabla 6 (Ramírez-López, 2012).

Tabla 6. *Clasificación de quesos.*¹⁰

% Humedad	Tipo de coagulación	Estado de maduración
Duros (20–42%)	Coagulación enzimática	Frescos (6 días)
Semiduros (44–55%)	Coagulación ácida	Semi-madurados (40 días)
Blandos o suaves (55%)	Coagulación ácida/térmica	Madurados (>70 días)

2.4.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA

El queso es un producto elaborado a partir de la leche, por lo que su composición aporta carbohidratos, lípidos, proteínas, vitaminas y minerales, no obstante, la composición cuantitativa se ve afectada por el tipo de leche a emplear en el proceso. Sin embargo, Toledo (1998) señala una composición estandarizada para el queso fresco por cada 100 g de producto: 79 g de agua, 8.5 g de proteínas, 7.5 g de lípidos, 4 g de carbohidratos y 100 mg de calcio.

¹⁰ Ramírez-López, 2012.

2.4.4. FLORA MICROBIANA

El queso contiene una microflora natural, asimismo, la carga microbiana que contiene proviene de la leche cruda y de las condiciones de manejo e higiene con que se obtiene el producto (Cruz Velasco, 2017). Generalmente, durante la elaboración y maduración del queso, la microbiota de este puede ser dividida en dos grandes grupos según su función: bacterias ácido lácticas (BAL) del cultivo iniciador (Starter Lactic Acid Bacteria (SLAB), por su denominación inglesa), las cuales predominan en la microbiota del producto; y las BAL no pertenecientes al cultivo iniciador (NSLAB, Non Starter LAB) (Santamarina-García, Fresno, Virto, Amores, & Aranceta, 2020).

Sin embargo, existen diversos microorganismos que pueden desarrollarse en este producto lácteo, tal como se muestra en la Tabla 7, en la que se exponen las condiciones óptimas para su desarrollo y los efectos posibles al ser consumidos.

Tabla 7. Condiciones óptimas de desarrollo y consecuencias de la presencia de microorganismos propios del queso.

Microorganismo	Condiciones de desarrollo	Consecuencias alimentarias
Coliformes totales ¹¹	Temperatura óptima de 35–37 °C, se encuentran en el suelo, agua, desechos humanos y de animales.	Malestar gastrointestinal, fiebre, calambres abdominales y diarrea.
<i>Staphylococcus aureus</i> ¹²	Se asocia a buenas prácticas de manufactura y de higiene. Puede crecer a temperaturas de 7 a 48 °C, a pH de 4–10 donde el óptimo es de 6–7.	Infecciones por poseer bacterias dentro del torrente sanguíneo, infecciones en los huesos, produce infecciones del tracto respiratorio, del tracto urinario, gastrointestinales.
<i>Salmonella spp</i> ¹³	Crece en un intervalo de 7–49 °C, y a pH de 4–9; sobreviven en refrigeración y congelación.	Salmonelosis, se manifiesta con fiebre ligera, náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea, y puede complicarse con deshidratación grave.
<i>Escherichia coli</i> ¹⁴	Se desarrolla a una temperatura de 7–46 °C y a pH de 4–10 °C, se encuentra en el sistema digestivo de los animales y de los seres humanos.	Calambres abdominales, vómitos y fiebre, anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiencia renal. Incluso tiene efectos neurológicos como convulsiones o accidente cerebrovascular.
<i>Listeria monocytogenes</i> ¹⁵	Resiste condiciones de congelación, secado, acidez y frío. Se desarrolla en un intervalo de temperatura de –1.5 y 45 °C y a pH de 4 a 9.6.	Gastroenteritis febril leve, presentando diarrea, náuseas, fiebre, dolor de cabeza, fatiga, dolores musculares y somnolencia.

¹¹ PennState Extension. (2020).

¹² Cervantes-García, García-González & Salazar-Schettino. (2014).

¹³ República de Colombia, Ministerio de la Protección Social & Instituto Nacional de Salud. (2011).

¹⁴ ACHIPIA. (2017).

¹⁵ ELIKA. (s.f.).

2.4.5. VIDA ÚTIL

Respecto a la vida de anaquel del queso fresco, Carrillo–Inungaray & Mondragón–Hernández, (s. f.) determinaron una vida de anaquel de cinco días para el queso almacenado a 20 °C, mientras que, almacenado a 30 °C la vida útil fue de tres días, y almacenado a 10 °C se estableció una vida útil de 9 días. Por otro lado, Del Cid Juárez, (2017) indicó que la vida útil del queso se prolonga hasta 15 días bajo condiciones de refrigeración (4 °C) tras emplear quitosano junto al aceite esencial de hierba de té de limón.

Por otro lado, Tapiero–Cuellar et al., 2017, evaluó el crecimiento microbiano en el queso en un periodo de 24 días, observando que hay un decrecimiento lineal en la eliminación de mohos y levaduras mediante el empleo de un recubrimiento comestible de aceite esencial de jengibre en un queso semimadurado mientras que, para un queso fresco, Mendoza–Martínez, (2021), halló una vida útil de 20 días a 5 °C empleando un recubrimiento a base de proteínas de suero de leche (CWP), sorbitol, producto de la cera de abeja y tween 80.

Considerando la información de la literatura consultada, se puede indicar que el queso fresco tiene una vida de anaquel de aproximadamente de 6 a 10 días en refrigeración, sin embargo, la calidad del producto se ve afectada por la calidad de la leche, así como la coagulación enzimática. Se deben considerar factores tales como: calidad microbiológica de la leche cruda, los tratamientos de pasteurización, el uso de aditivos antimicrobianos, las buenas prácticas de manufactura y las buenas prácticas de higiene, así como el almacenamiento, donde el intervalo de 4 a 6 °C es la temperatura adecuada para lograr un máximo en la vida de anaquel en quesos (López–Orozco, 2004). Por otro lado, Ramírez–López & Vélez–Ruiz, (2012),

establecen que la composición química de los quesos es un factor de gran importancia, ya que, el contenido de humedad va de 47–52 %, mientras que el pH oscila alrededor de 6.1, las cuales son condiciones óptimas para el desarrollo de diversos microorganismos, y a su vez, contiene de 18–29 % de grasa; por lo que la vida de anaquel de quesos frescos es relativamente corta.

2.4.6. EMPAQUES DIRECTOS PARA QUESOS

En México, se han buscado alternativas de empaques de alimentos de consumo directo, como papel, plástico, aluminio e incluso materiales vegetales, siendo el queso el producto con mayor empleo de materiales vegetales como palma, hoja de plátano y hoja de totemoxtle. No obstante, Barrera García, et al., (2015), realizaron un estudio en el que encontraron que, a mayor tiempo de contacto con el empaque natural, la percepción hedónica se iguala a la que presentan los alimentos con el contacto de los empaques sintéticos; aunque se perciben notas herbales que son preferibles para el consumidor, a diferencia de otros empaques como los de plástico que presentan notas saladas.

Diversos estudios en los cuales se han desarrollado recubrimientos comestibles que han alargado la vida de anaquel del queso fresco hasta 20 días, en los que se ha empleado materia prima como: jengibre, tomillo, orégano, romero, entre otros, que imparten sabor en el producto lácteo, lo cual opaca el sabor característico del queso fresco porque proporcionan sabor, color y aroma debido a sus componentes tales como carotenoides, compuestos fenólicos y compuestos organosulfurados (Figuera Chacín et. al, 2013).

3. OBJETIVOS

3.1. *OBJETIVO GENERAL*

Desarrollar una película comestible con aceite esencial de palma (*Brahea dulcis*) como antimicrobiano para la prolongación de la vida útil de quesos frescos.

3.2. *OBJETIVOS ESPECÍFICOS*

- a) Obtener aceite de hojas de palma (*Brahea dulcis*) mediante un método convencional.
- b) Evaluar el efecto de la actividad antimicrobiana del aceite de palma mediante el uso de cepas microbianas características del queso fresco.
- c) Elaborar un recubrimiento comestible para quesos frescos empleando el aceite de palma como antimicrobiano.
- d) Evaluar el efecto de la actividad antimicrobiana de la película comestible, mediante el análisis microbiológico de los quesos.

4. JUSTIFICACIÓN

Uno de los productos más consumidos a nivel regional, estatal y nacional es el queso fresco, por año se consumen alrededor de 4.063 kg de queso per cápita, esto en el 2018 (Rendón Rendón & Brunett Pérez, 2022). El queso fresco se caracteriza por contener nutrientes benéficos para la salud, ya sea mejorar la absorción del calcio, prevenir infartos o reducir los niveles de colesterol.

El queso fresco es un alimento con un sabor característico, pero tiene como problemática su vida útil, la cual es aproximadamente de 6 días aún en refrigeración. Existen estudios en los cuales se han desarrollado recubrimientos comestibles que han alargado la vida de anaquel del queso fresco hasta por 20 días usando una temperatura de 5 °C, sin embargo, las materias primas que se han empleado tienen el problema de impartir sabor en el producto, por lo que opaca el sabor característico del queso fresco porque proporcionan además del sabor, color y aroma.

Por lo anteriormente descrito surge la pregunta ¿existirá algún producto natural con el cual se pueda formular un recubrimiento comestible capaz de aumentar la vida de anaquel del queso fresco? Estudios preliminares en el laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos han demostrado que el aceite esencial de palma (*Brahea dulcis*) presentó actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, por tal motivo y debido a la gran disposición de la palma en la comunidad de Huajuapán de León, Oaxaca, surge como alternativa el desarrollar una película comestible para mejorar la conservación del queso fresco.

En este sentido este estudio se justifica porque:

- Se determinará la influencia de una película con aceite de palma en la vida de anaquel del queso fresco.
- Se dará valor agregado a la palma.
- Se aumentarán los conocimientos en el área de películas comestibles a través del uso del aceite de palma.

5. ORIGINALIDAD

El desarrollo de películas comestibles empleando aceites esenciales de plantas o semillas se ha descrito en la literatura a excepción del uso de la palma *Brahea dulcis* donde la información es escasa, por lo tanto, la originalidad del presente trabajo reside en la elaboración de una película comestible para quesos frescos empleando el aceite esencial de la palma, lo cual aún no existe.

6. ALCANCES Y LIMITACIONES

En este estudio se lograron diversos alcances como la obtención del aceite por dos métodos convencionales mediante el uso de dos disolventes con diferente polaridad, siendo el método Soxhlet el que presentó mayor rendimiento; evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites ante *S. aureus*, *Salmonella entérica*, *E. coli* y *L. monocytogenes*; desarrollo una película comestible empleando el aceite con mayor rendimiento y mayor actividad antimicrobiana, la cual se evaluó aplicada en el queso fresco mediante pruebas microbiológicas.

Por otra parte, las limitantes que se tuvieron en el desarrollo de este trabajo de tesis fueron las siguientes: la evaluación de la actividad antimicrobiana se llevó a cabo con las cepas que se encontraban disponibles en el cepario de la Universidad Tecnológica de la Mixteca, así también, no se realizó la evaluación sensorial del alimento debido a que algunos reactivos con grado alimenticio no se encontraron disponibles en las instalaciones del Laboratorio de Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

7. HIPÓTESIS

El incremento de la concentración del extracto de palma (*Brahea dulcis*) en la película comestible, influye en el crecimiento microbiano que puede desarrollarse en el queso fresco.

8. MARCO METODOLÓGICO

En la figura 6 se presenta la metodología general que se empleó para alcanzar los objetivos establecidos en este trabajo de tesis.

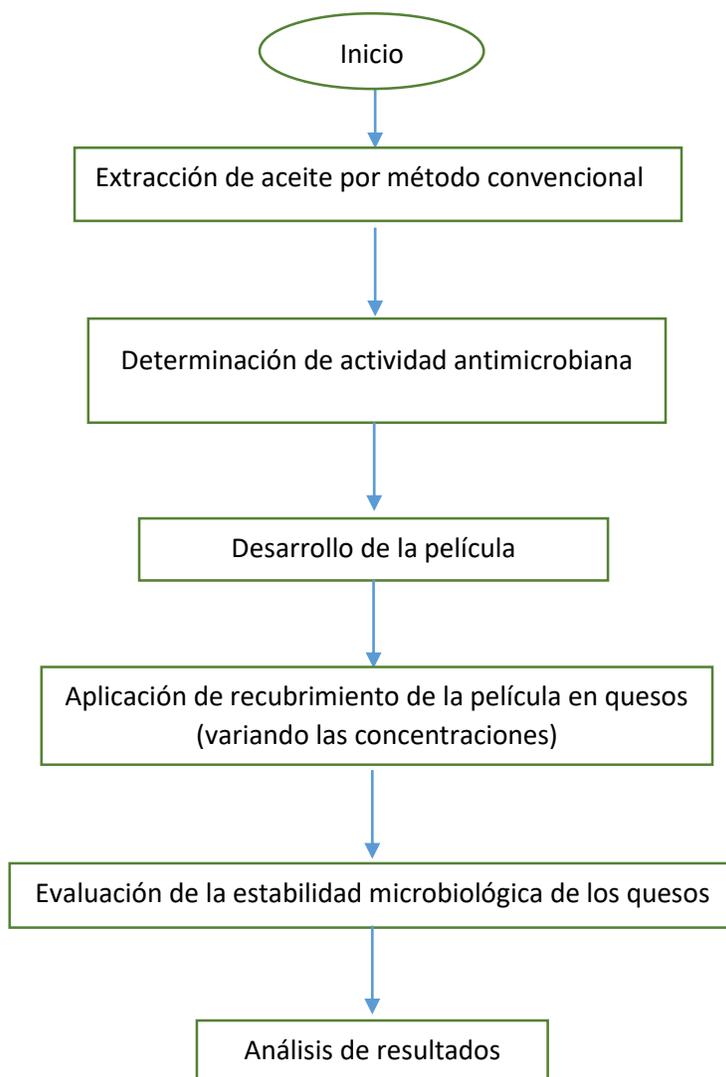


Figura 6. Diagrama general de metodología.¹⁶

¹⁶ Elaboración propia. (2022).

8.1. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPO

La materia prima consiste en la palma (*Brahea dulcis*) que se recolectó en el vivero de la Universidad Tecnológica de la Mixteca. Por otro lado, se buscó un productor de quesos frescos con la finalidad de recubrirlos con la película comestible tras su elaboración. Dentro de los equipos que se emplearon para el desarrollo del proceso se encuentran: extractor tipo Soxhlet (modelo 240771 marca KIMAX), un tamiz de número 4 (4.760 mm), un molino (KRUPS® GX4100), homogeneizador Wiggen Hauser D 500, refrigerador TOR REY, tubos eppendorf, tubos de centrifugación, vortex, reactivos (hexano, etanol), antibiótico Penicillin G sodium salt (Sigma), medios de cultivo (agar Mueller Hilton) y cepas de *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes*, del cepario de la Universidad Tecnológica de la Mixteca.

8.1.1. ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA

El proceso de secado de la palma fue empleando la metodología la propuesta de Martínez Hernández (2016), mediante sombra empleando charolas de aluminio que se colocaron dentro de la estufa a temperatura de 50 °C por 12 h, aireando la muestra cada 3 h para un secado homogéneo (Fig 7). Tras el secado total de la materia prima, se redujo el tamaño de partícula empleando un molino sinfín, después, fue tamizado en un tamiz de número 40 con la finalidad de obtener mejor interacción entre la palma y el disolvente, tras obtener la palma como harina, se almacenó en frascos ámbar y herméticos, a temperatura ambiente.



Figura 7. Palma en proceso de secado.¹⁷

8.2. EXTRACCIÓN DE ACEITE POR MÉTODO CONVENCIONAL (SOXHLET)

Para la extracción del aceite esencial de la palma (*Brahea dulcis*) se empleó el método 963.15 Soxhlet de la AOAC de 1997. Se usaron 2 g de muestra molida, la cual se colocó en cartuchos de celulosa en un equipo de extracción Soxhlet (Fig. 8). Se emplearon como disolventes: hexano y etanol sometiéndolos a reflujo durante 4 h, tras obtener el extracto, se concentró en rotavapor para así recuperar los disolventes, luego, se secó en la estufa a 50 °C por una hora para su posterior pesado. Debe considerarse que previamente se pesaron los matraces en una balanza analítica con la finalidad de determinar el rendimiento mediante la ecuación 1:

$$\text{Grasa extraíble (\%)} = \left(\frac{W_3 - W_2}{W_1} \right) \times 100 \quad \text{Ec. 1}$$

Donde W_1 : peso de la muestra antes de desecación, W_2 : peso del matraz sin grasa y W_3 : peso del matraz con grasa.

¹⁷ Foto tomada por la autora (2023).

Tras determinar el rendimiento, se recuperó el aceite extraído que se encontraba en los matraces realizando lavados con 1 mL del disolvente empleado en cada caso. El aceite extraído se almacenó a 5 °C en tubos de centrifugación de 50 mL hasta su posterior uso.



Figura 8. Extracción Soxhlet para palma (*Brahea dulcis*).¹⁸

8.3. EXTRACCIÓN DE ACEITE POR EL MÉTODO DE ULTRASONIDO

Para la extracción asistida por ultrasonido se emplearon los disolventes de hexano y etanol, para evaluar el rendimiento con respecto al método Soxhlet. A cada matraz se añadió 2 g de muestra de palma y 100 mL del disolvente. Las condiciones que se emplearon fueron con base en la metodología de Sánchez-Rodríguez (2016) a 400 vatios, a 24 kHz con temperatura de 40 °C por 30 min por triplicado (Fig. 9). Después, por filtración por gravedad se obtuvo el aceite junto al disolvente, se

¹⁸ Foto tomada por la autora (2023).

recuperó en matraces bola previamente pesados. Posteriormente, se concentró en el rotavapor, seguido del secado en la estufa a 50 °C por una hora para luego pesarlo. Para almacenar el extracto, se procedió como en el punto 8.2.



Figura 9. Extracción de aceite de palma (*Brahea dulcis*) por ultrasonido.¹⁹

8.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS

Las cepas bacterianas de *S. aureus*, *E. coli* y *Salmonella entérica* se tomaron del cepario de la Universidad Tecnológica de la Mixteca, las cuales se encontraban en glicerol. Se realizó la reactivación de las cepas transfiriéndolas del medio en el que se encontraban a caldo Mueller Hinton y se incubaron, luego, se sembró en agar Mueller Hinton y posteriormente, se depositaron colonias características al caldo Mueller Hinton. La cepa de *L. monocytogenes* se encontraba en agar sangre, por lo

¹⁹ Foto tomada por la autora (2023).

que se depositó directamente al caldo, con la finalidad de obtener la turbidez en base al estándar de McFarland 0.5 N, es decir, con 1.5×10^8 bacterias/mL, lo cual se comprobó determinando la absorbancia cumpliendo con lo indicado en la literatura, es decir, 0.08 – 0.1 (Hanna Instruments, s.f.). Alcanzada la turbidez, se determinó la actividad antimicrobiana, depositando 5 μ L de cada microorganismo en la caja de agar Mueller Hinton previamente etiquetada. De allí, se colocaron 10 μ L de extracto de cada concentración y de los siguientes disolventes: hexano, etanol, DMSO y 5 μ L de antibiótico Penicillin G sodium salt, cada uno por duplicado; se incubó a 36 °C por 24 h. Con la finalidad de descartar la posibilidad de tener un resultado favorable en la actividad antimicrobiana a causa del disolvente que se empleó en el proceso de extracción, se propuso determinar la actividad antimicrobiana como lo señala la Fig. 10. El antibiótico se empleó como un control positivo, mientras que, el DMSO se empleó para la dilución del extracto por sus propiedades como un “súper disolvente” y por su capacidad de penetrar fácilmente en los tejidos animales y vegetales (Álvarez Caro & Larqué–Saavedra, 2004).

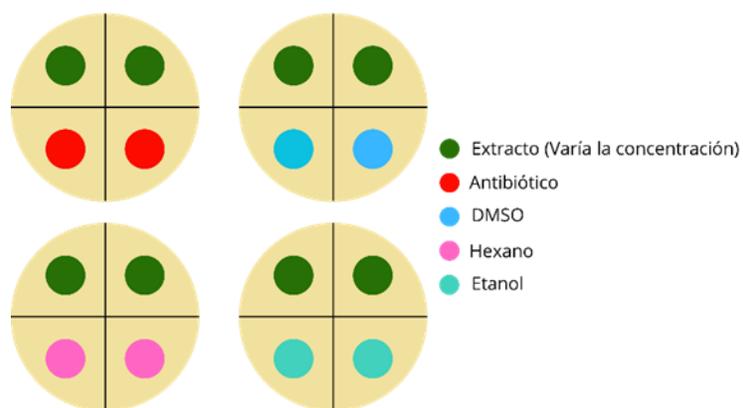


Figura 10. Determinación de actividad antimicrobiana por difusión en placa.²⁰

²⁰ Elaboración propia. (2022).

8.5. DESARROLLO DE LA PELÍCULA

Las tres formulaciones de las películas que se elaboraron se muestran en la Tabla 8, para cada formulación se realizó la mezcla de carboximetilcelulosa (0.5 %), glicerol (1 %), tween 80 (0.5 %) y 5 mL de aceite de palma (a 12 000, 10 000 y 8 000 µg/mL, respectivamente, diluidos en DMSO) en 1 L de agua hasta lograr la homogenización completa, con base en la metodología propuesta por Lira-Vargas, Trejo-Márquez & Pontigo-Suárez (2015). La carboximetilcelulosa actúa como matriz polisacárida, con el glicerol como plastificante, y el tween 80 como emulsificante. El aceite esencial que se empleó fue Soxhlet-Etanol a causa de mostrar mayor rendimiento (5.54 ± 0.62 %) y mayor actividad antimicrobiana para las concentraciones anteriormente mencionadas. La homogenización completa de la mezcla fue por 20 minutos a velocidad 7 en una parrilla de agitación.

Tabla 8. Formulaciones para el desarrollo de la película comestible.

Ingrediente	Formulación 1 (F1)	Formulación 2 (F2)	Formulación 3 (F3)
Carboximetilcelulosa (CMC)	0.5%	0.5%	0.5%
Glicerol	1%	1%	1%
Tween 80	0.5%	0.5%	0.5%
Aceite de palma (<i>Brahea dulcis</i>)	8000 µg/mL	10 000 µg/mL	12 000 µg/mL
Concentración en % (m/V)	0.004	0.005	0.006

8.6. APLICACIÓN DE LA PELÍCULA EN QUESO

Tras la elaboración de las diferentes formulaciones de las películas, se dejaron reposar. El recubrimiento del queso fresco con la película (200 mL de cada película) se realizó por inmersión durante un minuto (Fig. 11), dicha técnica es muy utilizada en diferentes alimentos como en frutas, hortalizas y productos cárnicos. Con la finalidad de recubrir completamente el queso, se dejó impregnar durante 30 segundos de cada lado, después, se dejó escurrir por un minuto más y finalmente se empacó en bolsas de polietileno de alta densidad (German–Gallardo, 2013) y se almacenó en refrigeración para su posterior análisis, esto con base en la metodología de Del Cid Juárez, (2017). Los quesos frescos fueron evaluados cada 84 h hasta un total de 252 h y almacenados a 4 °C.



Figura 11. Aplicación de película en queso fresco.²¹

²¹ Foto tomada por la autora (2023).

8.7. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LOS QUESOS FRESCOS

8.7.1. PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS

La NOM-243-SSA1-2010 dispone los métodos de prueba que se realizan para la evaluación microbiológica de leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados. La determinación de *Staphylococcus aureus* se realizó mediante una serie de diluciones (1:100 000), en cambio, la determinación de coliformes totales y fecales se realizó según la NOM-210-SSA1-2014 empleando diluciones de 1:1000. La preparación de las diluciones para *S. aureus* y coliformes totales y fecales, se realizó con 10 g de muestra en 90 mL de agua peptonada (Anexo A), se licuó hasta la homogenización completa, transfiriendo 1 mL para realizar las diluciones correspondientes. En el caso de *Salmonella*, se diluyeron 25 g de muestra en 225 mL de caldo lactosado como medio de enriquecimiento. La evaluación microbiológica se realizó cada 84 horas hasta las 252 horas para *S. aureus*, *E. coli* y *Salmonella*, considerando la evaluación del control como equivalente a la formulación F1, F2 y F3 a las cero horas, ya que, las muestras fueron obtenidas de un solo lote y proveedor.

8.7.1.1. STAPHYLOCOCCUS AUREUS

La determinación de este microorganismo se realizó mediante su crecimiento en agar Baird-Parker, agregando 100 µL de cada dilución (1.0, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 y 0.00001), respectivamente, por duplicado; el inóculo se distribuyó sobre la superficie del agar mediante varillas estériles. Luego se incubó a 35 °C por 48 h.

Las colonias típicas deben ser negras, circulares, brillantes, convexas, lisas y con diámetro de 1 a 2 mm.

8.7.1.2. COLIFORMES TOTALES Y FECALES

Se transfirió 1 mL de cada dilución (1.0, 0.1 y 0.01) a tubos con 10 mL de caldo lauril sulfato triptosa por triplicado (Anexo B), los cuales se incubaron por 24 h a 35 °C, se examinaron los tubos para la identificación de la formación de gas, posteriormente, los tubos positivos fueron inoculados por asada en caldo verde brillante y caldo EC, con la finalidad de realizar la determinación de coliformes totales y coliformes fecales, respectivamente, mediante la técnica del número más probable (NMP); finalmente, los tubos fueron incubados nuevamente a 35 °C por 24 h para su posterior observación.

8.7.1.3. SALMONELLA SPP

Se pesaron 25 g de muestra adicionando 225 mL de caldo lactosado, se licuó aproximadamente por 1 min, la mezcla fue depositada en un recipiente enroscado suavemente e incubado a 35 °C por 24 h. Posteriormente, se transfirió un mililitro en 10 mL de caldo tetrionato y un mililitro en 10 mL de caldo selenito cistina, para ser incubado a 35 °C por 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se estrió en los medios selectivos: agar XLD, agar verde brillante, agar *Salmonella* y *Shigella*, y agar entérico Hektoen. La identificación de las colonias típicas se hizo mediante lo descrito en la NOM-114-SSA1-1994 como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Descripción de colonias típicas según el medio.

Medio	Descripción
XLD	Colonias rosas o rojas, pueden ser transparentes con o sin punto negro.
Verde brillante	Colonias rojas o rosas que pueden ser transparentes rodeadas por medio enrojecido; las bacterias fermentadoras de la lactosa dan colonias amarillas.
<i>Salmonella y Shigella</i>	Colonias traslúcidas, ocasionalmente opacas, algunas colonias dan centro negro, las colonias fermentadoras de la lactosa son rojas.
Entérico Hektoen	Colonias verdes o azul-verdes con o sin centro negro.

8.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Con base en Arteaga, et al., (2015), se estableció el análisis de experimentos para evaluar el efecto de tiempo y temperatura en el queso recubierto con la película a 0, 84, 168 y 252 horas de almacenamiento a 4 °C para las tres formulaciones establecidas por duplicado, como se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Diseño experimental.

Temperatura (°C)	Formulación	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella spp</i>
4	0	<i>SA0_n</i>	<i>E0_n</i>	<i>S0_n</i>
	1	<i>SA1_n</i>	<i>E1_n</i>	<i>S1_n</i>
	2	<i>SA2_n</i>	<i>E2_n</i>	<i>S2_n</i>
	3	<i>SA3_n</i>	<i>E3_n</i>	<i>S3_n</i>

Donde XF_n es el código que se maneja, X se refiere al microorganismo, F es el número de formulación y n es el número de repetición.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con nivel de confianza del 5 % ($p \leq 0.05$), empleando el software Excel. Se establecieron las hipótesis: H_0 = Los tratamientos son todos iguales y H_1 = Alguno de los tratamientos es diferente, se realizaron 3 tratamientos con 2 repeticiones, para cada una de las horas de evaluación a excepción de la hora 0, ya que, se asume que lo reportado en el control es igual a F1, F2 y F3 a esta hora por provenir del mismo lote.

9. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

9.1. EXTRACCIÓN DE ACEITE DE LA PALMA UTILIZANDO LOS MÉTODOS SOXHLET Y EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO

Con respecto a los métodos de extracción de aceite se observó que por el método Soxhlet hubo mayor rendimiento, empleando tanto el etanol (5.54 %) como el hexano (2.72 %) (Tabla 11), a comparación del método de extracción asistida por ultrasonido en donde se obtuvieron menores porcentajes (5.18 y 0.70 %, para etanol y hexano, respectivamente).

Tabla 11. Grasa extraíble (%) por diferentes métodos usando como disolventes hexano y etanol.

Método	% Rendimiento	
	Hexano	Etanol
Soxhlet	2.72±0.53	5.54±0.62
Ultrasonido	0.70±0.35	5.18±0.38

Se realizaron tres réplicas para cada método con su respectivo disolvente.

Por lo que, en este estudio el método favorable para la extracción de grasa de la palma fue extracción Soxhlet, por el mayor rendimiento. Lo anterior concuerda con el trabajo de Gómez Aguas (2017), quien encontró que la extracción Soxhlet a diferencia del ultrasonido tuvo mejor eficiencia en la extracción de grasa de siete especies de palma. Así también concuerda con lo publicado por Zurita Santillán et. al., (2021) quienes obtuvieron mejores rendimientos en la extracción Soxhlet que empleando la técnica de ultrasonido para la extracción de aceite de amaranto con rendimientos de 13.09 % y 1.27 %, respectivamente. Fuentes Soriano (2019),

concuerta que el método Soxhlet brinda mejores rendimientos de grasa de amaranto (73.2 %) respecto al método de ultrasonido (55.18 %).

Con respecto al disolvente utilizado, se encontró que el etanol fue el más eficiente para la extracción de aceite de palma por ambos métodos, ya que, se obtuvo mejor solubilidad para extraerlo. En las series eleutrópicas se muestra que el hexano tiene menor polaridad que el etanol, tal diferencia de polaridad es importante debido a que influye en el carácter de los extractos, es decir, si en la muestra a extraer hay compuestos no polares, estos tendrán mayor solubilidad con un disolvente no polar debido a la interacción entre las moléculas de naturaleza similar. En este estudio, la extracción se realizó con el uso de un disolvente no polar (hexano) y otro de alta polaridad (etanol), provocando el color característico de cada extracto, al emplear hexano se obtuvo un extracto con coloración amarilla, mientras que, con etanol se observó la coloración verde (Fig. 12). La hoja de la palma presenta cloroplastos y cromoplastos, dando así, la coloración verde con notas amarillas, sin embargo, en las hojas también están presentes los oleoplastos, caracterizados por ser incoloros y por ser los responsables de almacenar aceites y lípidos en las plantas (Megías, Molist & Pombal, 2019), por lo que se puede decir que en la extracción se obtuvo una mezcla de compuestos a fines por el disolvente empleado, lo que provocó la coloración característica de cada disolvente.



Figura 12. A) Extracto–hexano. B) Extracto–etanol.²²

Los resultados indicaron que, con el etanol se obtuvo mayor porcentaje de grasas (5.54 y 5.18 % para extracción Soxhlet y por ultrasonido, respectivamente), lo cual concuerda con lo indicado por Venegas Valverde (2016), quien encontró mejores rendimientos de extracción de aceite de romero con etanol siendo de 30.66 % mientras que con el hexano se obtuvo 21.16 %. Asimismo, Villa Guerrero & Benalcázar Arroyo (2015), hallaron mayor rendimiento de extractos de aceite de semillas de guayaba tratadas con etanol (10.1 g de extracto/400 g de semilla) que con hexano (5.8 g de extracto/400 g de semilla). Sin embargo, el resultado obtenido en este estudio difiere de lo publicado por Acosta Meza & Celis Barahona (2021), quienes encontraron mejor rendimiento de aceite de borra de café utilizando hexano que utilizando etanol, con rendimiento de 13.076 % y 10.187 %, respectivamente (a una concentración de 12 mL/g), lo que pudo deberse a la composición de los extractos, así como, el tiempo de interacción con los disolventes.

²² Foto tomada por la autora (2023).

9.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

A continuación, en la Tabla 12 se muestran los resultados de la evaluación de actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos por Soxhlet y ultrasonido a diferentes concentraciones, frente a *Salmonella*, *S. aureus*, *E. coli* y *L. monocytogenes*.

Tabla 12. Presencia de actividad antimicrobiana de aceite de palma a diferentes concentraciones contra *Salmonella*, *S. aureus*, *E. coli* y *L. monocytogenes*.

Microorganismo Extracto (µg/mL)	<i>Salmonella entérica</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
	Inhibición	Diámetro (mm)	Inhibición	Diámetro (mm)	Inhibición	Diámetro (mm)	Inhibición	Diámetro (mm)
Soxhlet-Hexano								
8000	No	-	No	-	No	-	No	-
10000	Sí	4	No	-	No	-	No	-
12000	Sí	5	No	-	No	-	No	-
Soxhlet-Etanol								
8000	Sí	6	Sí	25	No	-	No	-
10000	Sí	9	Sí	23	No	-	Sí	9
12000	Sí	9	No	-	No	-	Sí	10
Ultrasonido-Hexano								
8000	Sí	2	No	-	No	-	No	-
10000	Sí	6	No	-	No	-	No	-
12000	Sí	3	No	-	No	-	No	-
Ultrasonido-Etanol								
8000	No	-	No	-	No	-	No	-
10000	No	-	No	-	No	-	No	-
12000	No	-	No	-	No	-	No	-

Con base en los resultados anteriores, se encontró que para *Salmonella* hubo inhibición con el extracto obtenido por Soxhlet–hexano, a la concentración de 10 000 y 12 000 µg/mL, con la formación de halo de 4 y 5 mm, respectivamente, aunque fue la extracción Soxhlet–etanol la que presentó mejores resultados, con la formación de halo de 6, 9 y 9 mm para las concentraciones empleadas: 8 000, 10 000 y 12 000 µg/mL. Asimismo, el método ultrasonido–hexano fue favorable pues, mostró inhibición en las tres concentraciones, aunque fue menor el diámetro del halo (2, 6 y 3 mm). Por otro lado, los resultados por ultrasonido–etanol fueron desfavorables, ya que, no hubo inhibición alguna.

Para la evaluación de *S. aureus*, el método de Soxhlet–etanol fue el único favorable a las concentraciones de 10 000 y 8 000 µg/mL, con la máxima formación de halo de 23 y 25 mm, respectivamente. Mientras que, para *L. monocytogenes*, fue favorable el mismo método que para *S. aureus*, sin embargo, difiere en las concentraciones, siendo las de 10 000 y 12 000 µg/mL las que mostraron la formación de halo de 9 y 10 mm, respectivamente.

Por otro lado, no se presentó actividad antimicrobiana para *E. coli*, siendo nula la formación de halo y con ello, la inhibición. Esto puede deberse a diversos factores como la polaridad de los compuestos extraídos, así como la composición del medio de cultivo, su pH y la solubilidad (Sánchez García, Castillo Hernández & García Palencia, 2016). En la figura 13, se muestra el efecto inhibitorio del aceite de palma a diferentes concentraciones.

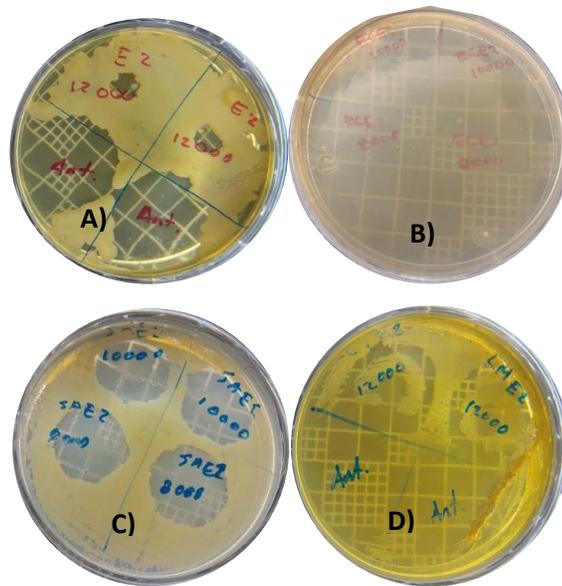


Figura 13. Efecto inhibitorio del aceite de palma por el método de placa en SE.²³ A) *Salmonella*. B) *E. coli*. C) *S. aureus*. D) *L. monocytogenes*.²⁴

Se determinó mayor eficiencia de rendimiento y actividad antimicrobiana para los extractos obtenidos mediante el método Soxhlet, particularmente usando etanol como disolvente. Esto concuerda con la investigación de Villa Guerrero & Benalcázar Arroyo (2015), quienes observaron en el extracto obtenido con etanol, la inhibición (con halos de 2.9 y 4.1 cm para 50 y 100 μ L, respectivamente) de bacterias Gram positivas y Gram negativas, en comparación del extracto obtenido con hexano en el cual la inhibición fue nula. Asimismo, la actividad antimicrobiana que se halló con el aceite de palma (*Brahea dulcis*) concuerda con lo indicado por Pérez-López et al., 2020–2021, quienes determinaron la actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*, sin embargo, dicho extracto fue obtenido por extracción supercrítica hallando halos de 5.5 y 9 mm. Por otro lado, estos resultados difieren con lo

²³ SE: Soxhlet-Etanol

²⁴ Foto tomada por la autora (2023).

publicado por Centurión-Hidalgo et al., (2013), quienes hallaron actividad antimicrobiana para extractos obtenidos con hexano respecto a los obtenidos usando etanol, frente a *S. aureus* y *B. cereus* partiendo de dos especies de palma, lo que se debe a la composición de la materia prima, al método de extracción del aceite (maceración) y el tiempo de contacto entre la materia prima y el disolvente.

9.3. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LOS QUESOS FRESCOS

9.3.1. STAPHYLOCOCCUS AUREUS

En la Tabla 13 se reporta el recuento por duplicado de UFC/g de *S. aureus* presentes en los quesos frescos almacenados en refrigeración durante 252 horas y evaluadas cada 84 horas, para tres formulaciones de película propuestas que contenían extracto de palma (*Brahea dulcis*) y el control.

Tabla 13. Recuento de *S. aureus* presentes en queso fresco almacenados a 4°C.

Formulación	UFC/g			
	0 h	84 h	168 h	252 h
F0	2.30×10^5	4.40×10^5	7.00×10^6	1.26×10^6
	2.30×10^5	3.80×10^5	7.00×10^6	1.64×10^6
F1	2.30×10^5	2.90×10^5	9.00×10^5	1.24×10^6
	2.30×10^5	2.90×10^5	5.00×10^5	6.80×10^5
F2	2.30×10^5	6.00×10^5	6.90×10^5	6.90×10^5
	2.30×10^5	3.00×10^5	6.00×10^5	6.00×10^5
F3	2.30×10^5	3.20×10^5	1.30×10^5	1.15×10^6
	2.30×10^5	4.50×10^5	6.00×10^4	5.70×10^5

Nota: F1, F2 y F3 corresponden a las diferentes concentraciones del extracto en la película.

A las cero horas, se evaluó la carga microbiana de *S. aureus* tras la elaboración de los quesos. El resultado fue 2.3×10^5 UFC/g, dicho valor se asumió como punto de partida tanto para el control como para F1, F2 y F3. Posteriormente, a las 84 horas, la muestra control incrementó el número de UFC, mientras que, las formulaciones que contenían el extracto de palma (*Brahea dulcis*) presentaron un crecimiento menor al control. Tras 168 horas de almacenamiento, se observó el punto máximo de crecimiento para el control (7.00×10^6 UFC/g), considerando que, sólo fue posible hacer la lectura en una caja de las dos réplicas a causa del crecimiento excesivo. Asimismo, hubo crecimiento exponencial en F1 y F2, en cambio, en F3 se observó disminución de microorganismos, siendo este el valor más bajo que se presentó en los diferentes tratamientos. Finalmente, a las 252 horas, hubo decrecimiento en la muestra control, sin embargo, esta carga microbiana estuvo por encima de las encontradas en las formulaciones propuestas. En F1 se contabilizó un aumento con un valor similar al del control, mientras que, F2 mantuvo (en promedio) el crecimiento igual que a las 168 horas, por otro lado, F3 indicó un crecimiento exponencial.

Con base en los resultados anteriores, se puede indicar que el control tuvo una carga microbiana mayor que la de las formulaciones propuestas, pero, sólo F2 logró controlar el crecimiento de *S. aureus* a las 168 y 252 horas, el resultado anterior coincide con el obtenido en la determinación de actividad antimicrobiana, en donde se presentaron halos de inhibición de 23 mm para este microorganismo. Por otro lado, F3 mostró el recuento más bajo incrementándose en las últimas 84 horas de monitoreo, esto pudo deberse a que todavía se encontraban sustratos que permitieron el desarrollo de *S. aureus*, aunque, hay que considerar que F3 no inhibió este microorganismo en la determinación de actividad antimicrobiana (Tabla

11) pese a la máxima concentración de aceite de palma en el extracto. Se puede indicar también que las buenas prácticas de manufactura son un factor importante en el manejo de alimentos, considerando tanto los resultados de este trabajo como los indicados en la literatura. El resultado de este estudio difiere con el obtenido por Torres Avellan (2019) quien determinó la inhibición de *S. aureus* en quesos frescos, mediante la aplicación de aceite esencial de tomillo a las concentraciones 0.1, 0.2 y 0.3 % y evaluados cada dos días durante 8 días. Asimismo, difiere con lo obtenido por Valverde Deza (2022) quien determinó la efectividad del aceite esencial de orégano con la ausencia de *S. aureus* en concentraciones del 40 y 60 % en la determinación en queso mantecoso tras 24 horas, mientras que, Ocampo Cachay (2019), determinó el aumento de la carga microbiana (153 UFC/g) en el tercer día de evaluación tras emplear una película con aceite esencial de orégano a la concentración de 0.10 % para queso fresco. Sin embargo, es imprescindible considerar la carga microbiana inicial, ya que, en los diferentes estudios que se usan para comparar los resultados del presente trabajo, no se indica la determinación de la carga microbiana inicial del alimento, lo que sí se hizo en este proyecto.

9.3.2. COLIFORMES TOTALES Y FECALES

En las Tablas 14 y 15 se resume el NMP de coliformes fecales y totales que se obtuvieron a las 0, 84, 168 y 252 horas para cada formulación y el control, lo que permitió evaluar la efectividad de la película.

Tabla 14. Coliformes fecales por NMP con porciones de 0.1, 0.01 y 0.001g de muestra.

Formulación	NMP/g de muestra			
	0 h	84 h	168 h	252 h
Control	1100	1100	1100	1100
F1	1100	1100	1100	1100
F2	1100	1100	1100	1100
F3	1100	1100	1100	1100

Nota: F1, F2 y F3 corresponden a las diferentes concentraciones del extracto en la película.

Tabla 15. Coliformes totales por NMP con porciones de 0.1, 0.01 y 0.001g de muestra.

Formulación	NMP/g de muestra			
	0 h	84 h	168 h	252 h
Control	1100	1100	1100	1100
F1	1100	1100	1100	1100
F2	1100	290	1100	1100
F3	1100	1100	1100	53

Nota: F1, F2 y F3 corresponden a las diferentes concentraciones del extracto en la película.

Para el caso del análisis de los coliformes fecales, en la Tabla 14 se observa que los resultados obtenidos en la formulación F1, F2 y F3 fueron iguales a los del control desde el tiempo 0 hasta la última hora de monitoreo, por lo tanto, no hubo una mejora al aplicar la película en los quesos.

Con respecto a los coliformes totales (Tabla 15) se observó una similitud para F1 y el control, mientras que, en F2 y F3 el NMP difirió respecto al control a las 84 y 252 h, respectivamente (290 NMP/g para F2 y 53 NMP/g para F3) observando que en las demás horas coincidió con lo hallado en el control.

La aplicación de la película permitió observar que se prolongó el proceso de adaptación de la interacción película–muestra en F2, sin embargo, en las demás evaluaciones aumentó el crecimiento de microorganismos tras encontrar los sustratos necesarios para su desarrollo. Por lo contrario, en F3 decreció la carga microbiana a causa de la escasez de nutrientes tras 252 horas de almacenamiento. Pese a que en la actividad antimicrobiana no se observó inhibición para *E. coli*, han sido las concentraciones de F2 y F3 las que mejor se han adaptado a la muestra, ya que, F1 al poseer menor concentración de extracto no presentó una mejora.

Por otro lado, se considera la efectividad de los resultados obtenidos a causa de la carga microbiana de la materia prima, lo que concuerda con los resultados obtenidos en un análisis de queso adobera y queso fresco (Soria Herrera, 2020), en ese análisis se determinó que seis empresas diferentes rebasan el límite permitido tanto en coliformes fecales como en coliformes totales (1100 NMP/g). Otro factor a considerar es la concentración en la que se encuentra el aceite y el origen del mismo, según lo establecido por Arteaga Rojas (2020) se determinó que a los 12 días la carga microbiana en queso fresco fue de 210 y 23 NMP/mL de coliformes totales para 0.25 y 0.30 % de aceite esencial de jengibre, respectivamente, comparado con el presente estudio con una carga microbiana de 53 NMP/g a las 252 h para 0.006 % de aceite de palma (F3). Además, los resultados mostrados aquí difieren de los obtenidos por Ocampo Cachay (2019) quien determinó que para una película de aceite esencial de orégano a 0.10 % se alcanzó el límite de coliformes totales, considerando como tal la carga microbiana del control (500 NMP/g) con base en la Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA) al tercer día, mientras que, en este estudio el límite se alcanzó desde el día cero, lo que se puede atribuir

a las condiciones de buenas prácticas e inocuidad desde el manejo de las materias primas como en las diferentes etapas experimentales.

9.3.3. *SALMONELLA SPP*

En la Tabla 16 se indica la presencia o ausencia de *Salmonella* en las formulaciones F1, F2 y F3, así como en el control, en diferentes horas de monitoreo.

Tabla 16. *Presencia o ausencia de Salmonella en 25 g de muestra.*

Formulación	0 h	84 h	168 h	252 h
Control	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
F1	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
F2	Presencia	Ausente	Presencia	Ausente
F3	Presencia	Presencia	Presencia	Ausente

Nota: F1, F2 y F3 corresponden a las diferentes concentraciones del extracto en la película.

A las 0 horas se determinó la presencia de *Salmonella* en el queso, sin embargo, a las 84 horas se tuvo ausencia de *Salmonella* para F2, posteriormente, a las 168 horas se detectó al microorganismo en las tres formulaciones incluyendo el control. A las 252 horas de monitoreo se observó la ausencia para F2 y F3, en cambio, la presencia de *Salmonella* fue constante durante todo el tiempo de evaluación para el control y F1.

La ausencia de *Salmonella* en F2 a las 84 horas pudo ser causada por la adaptación de la película a la muestra, sin embargo, el crecimiento a las 168 horas indicó que hubo suficiente sustrato para el desarrollo del microorganismo. No obstante, a las

252 horas nuevamente se observó su ausencia, indicando la limitación de sustratos, este comportamiento también se presentó en la formulación F3. Considerando también que, como se explicó en secciones anteriores, hubo mayor actividad antimicrobiana en las concentraciones de 10 000 y 12 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (F2 y F3, respectivamente) se puede indicar que a mayor concentración, mayor inhibición.

En otros estudios se encontró ausencia de *Salmonella*, como es el caso de Arteaga Rojas (2020) quien tras aplicar aceite esencial de jengibre en quesos frescos a 0.30 % determinó su ausencia tras 12 días de almacenamiento en refrigeración. Así también, Navarrete Palma & Saltos Zambrano (2022) determinaron la ausencia de *Salmonella* cada 24 h por 72 h en quesos frescos que fueron tratados con aceite esencial de albahaca a las concentraciones de 0.1, 0.2 y 0.3 %, esta diferencia puede deberse a que la concentración empleada por Navarrete Palma & Saltos Zambrano es mayor a la empleada en el presente estudio (0.004 %, 0.005 % y 0.006 % para F1, F2 y F3, respectivamente).

Adicionalmente, se notaron cambios en el aspecto físico del queso una vez que se le impregnó la película comestible (Fig. 14). El queso inicialmente se mostró firme, blanco, con buena apariencia, sin embargo, a los 7 días de almacenamiento el control se observó con mayor porosidad, con tonalidades amarillas y opacas, mientras que la muestra F1 presentó ligera firmeza con tonalidades amarillas, por otro lado, las muestras F2 y F3 se veían más frescas y con la firmeza característica de un queso fresco.

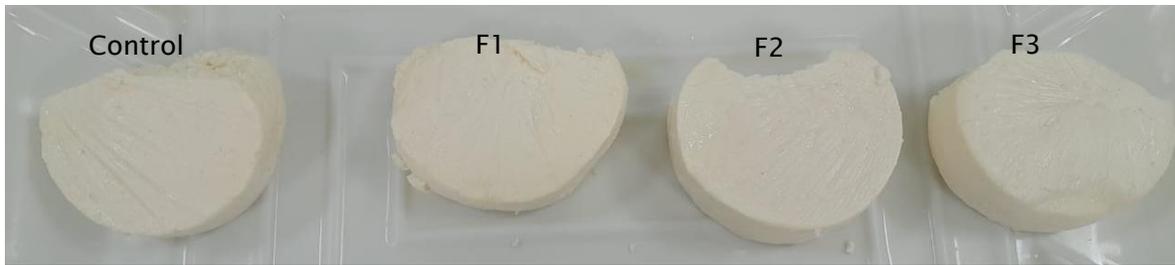


Figura 14. *Aspecto físico de las muestras de queso a los 7 días.*²⁵

Nota: F1, F2 y F3 corresponden a las diferentes concentraciones del extracto en la película.

Al décimo día de almacenamiento, el control tuvo una apariencia desagradable, la coloración fue amarillenta y se formó una costra en la superficie, aunque, en los lados y en el centro del queso se presentó una textura blanda y viscosa (Fig. 15). En F1, la coloración fue menos oscura que el control, con textura viscosa. Para F2 y F3, el queso mantuvo su color, con ligeras notas amarillas, la textura comenzó a tener partes viscosas a excepción de que en F2 se observó un hongo en la superficie.

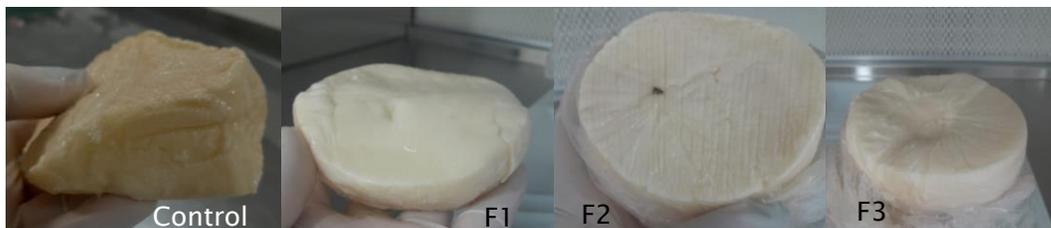


Figura 15. *Aspecto físico de las muestras de queso a 10 días de almacenamiento.*²⁶

Nota: F1, F2 y F3 corresponden a las diferentes concentraciones del extracto en la película.

²⁵ Foto tomada por la autora (2023).

²⁶ Foto tomada por la autora (2023).

9.4. ANÁLISIS DE VARIANZA

Los quesos frescos que se estudiaron fueron tratados de la siguiente manera: Formulación 0, corresponde a la muestra control, las demás formulaciones (F1, F2 y F3) variaron en la concentración del aceite de palma que contenía la película, así la formulación 1, 2 y 3 contenían 0.004, 0.005 y 0.006 %, respectivamente. El análisis de varianza se realizó únicamente para *S. aureus* debido a que fue el microorganismo que se pudo cuantificar en caja Petri (Tabla 12).

En la Tabla 17 se muestra el análisis de varianza de dos factores (formulación y tiempo) realizado en el software Excel, en el cual se analizó el comportamiento del microorganismo cada 84 horas para cada formulación, comparándolo respecto al control, asimismo, se evaluó el comportamiento del crecimiento microbiano para cada formulación a lo largo del período de almacenamiento en refrigeración, es decir, se evaluó tanto filas como columnas de la Tabla 13. El análisis de varianza determinó que se rechaza la hipótesis nula pues, $F_{calculada} > F_{crítica}$, por lo tanto, alguno de los tratamientos es diferente.

Tabla 17. Análisis de varianza de *S. aureus*.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	1.94E+13	3	6.48E+12	190.99	9.78E-13	3.24
Columnas	1.75E+13	3	5.82E+12	171.54	2.25E-12	3.24
Interacción	4.55E+13	9	5.05E+12	148.94	1.05E-13	2.54
Dentro del grupo	5.43E+11	16	3.39E+10			
Total	8.29E+13	31				

En la figura 16 se muestra el comportamiento del crecimiento microbiano de *S. aureus* en el queso fresco almacenado durante 252 h. En la hora inicial, el comportamiento fue igual para las 4 muestras por lo mencionado anteriormente, mientras que las 84 h de almacenamiento hubo crecimiento especialmente en el control, pero fue hasta la hora 168 que se alcanzó el mayor crecimiento para el queso sin tratamiento (F0), en cambio, la formulación 3 obtuvo el valor más bajo; tras 252 h de almacenamiento, la F2 se mantuvo constante, mientras que, la F0 presentó valores por encima de las demás formulaciones.

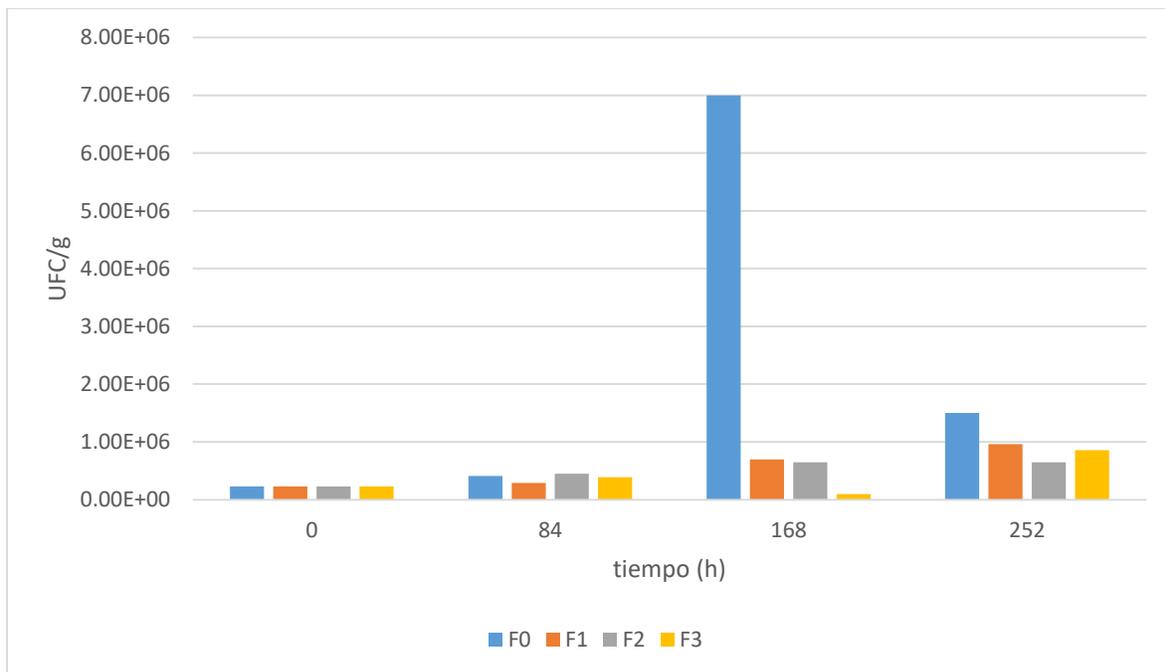


Figura 16. Comportamiento del crecimiento de *S. aureus* en queso fresco almacenado a 4 °C.²⁷

Nota: F1, F2 y F3 corresponden a las diferentes concentraciones del extracto en la película.

²⁷ Elaboración propia (2023).

Al observar los resultados, se planteó realizar la prueba de Tukey usando el software InfoStat 2020 para evaluar las medias entre los tratamientos y comprobar si la hipótesis nula se acepta o se rechaza. La prueba de Tukey se realizó comparando la relación del tiempo y formulación (Anexo C), donde los resultados concluyeron que la hipótesis nula se rechaza (Tabla 18).

Tabla 18. Prueba Tukey por tiempo para *S. aureus*.

Formulación	UFC/g			
	0 h	84 h	168 h	252 h
0	$2.3 \times 10^5_{ac}$	$4.1 \times 10^5_{ac}$	$7.0 \times 10^6_{aa}$	$1.5 \times 10^6_{ab}$
1	$2.3 \times 10^5_{aa}$	$2.9 \times 10^5_{aa}$	$7.0 \times 10^5_{ba}$	$9.6 \times 10^5_{aa}$
2	$2.3 \times 10^5_{aa}$	$4.5 \times 10^5_{aa}$	$6.5 \times 10^5_{ba}$	$6.5 \times 10^5_{aa}$
3	$2.3 \times 10^5_{aa}$	$3.9 \times 10^5_{aa}$	$9.5 \times 10^4_{ba}$	$8.6 \times 10^5_{aa}$

Nota: F1, F2 y F3 corresponden a las diferentes concentraciones del extracto en la película. Medias con una letra común no son significativamente diferentes por columnas y filas ($p > 0.05$) donde el primer subíndice es por columnas y el segundo por fila.

De acuerdo con los resultados en la Tabla 18, se determinó que a las 0, 84 y 252 horas no se observó diferencia significativa en las diferentes formulaciones y el control, aunque fue a las 168 h que se presentó diferencia significativa del control respecto a F1, F2 y F3. En los resultados obtenidos para cada formulación respecto al tiempo, se determinó diferencia significativa únicamente en el control, observando que, a las 168 y 252 h, se halló un mayor crecimiento microbiano, mientras que para las demás formulaciones en cada intervalo de tiempo no se determinó diferencia significativa.

10. CONCLUSIONES

En este trabajo se presenta por primera vez, el desarrollo de una película comestible con aceite esencial de palma (*Brahea dulcis*) extraído mediante el método Soxhlet y etanol como disolvente, el cual fue usado como agente antimicrobiano como antimicrobiano, permitiendo la reducción de la carga microbiana en quesos frescos.

La extracción Soxhlet con etanol como disolvente fue más eficiente con rendimiento del 5.54 ± 0.62 % en grasa extraíble de las hojas de palma (*Brahea dulcis*) en lugar del hexano como disolvente (2.72 ± 0.53 %).

El aceite de palma extraído mediante Soxhlet-Etanol tuvo actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*, *Salmonella entérica* y *Listeria Monocytogenes*, con halos de 24, 8 y 9.5 mm, respectivamente, mientras que, para *E. coli* no presentó actividad antimicrobiana a las concentraciones estudiadas aquí.

La elaboración de recubrimientos comestibles empleando el aceite de palma en quesos frescos a diferentes concentraciones permitió evaluar el comportamiento microbiológico de *S. aureus*, coliformes fecales y totales y *Salmonella spp* presentes en quesos frescos.

Se observó diferencia significativa en las formulaciones propuestas respecto al control en *S. aureus*, siendo menores a la carga microbiana del control a las 168 h de almacenamiento.

Se redujo el contenido de carga microbiana de coliformes totales y *Salmonella spp* en F2 y F3, lo que puede deberse a que estas formulaciones contenían mayor concentración de aceite de palma, en comparación con F1.

11. PERSPECTIVAS

Se sugiere incrementar la concentración del extracto de palma en la formulación de la película, con la finalidad de aumentar la actividad antimicrobiana que alargue la vida útil del queso fresco.

Identificar el compuesto activo en el aceite esencial de palma (*Brahea dulcis*) y evaluar su efecto en la actividad antimicrobiana.

Para evaluar la película, se recomienda estudiar sus características fisicoquímicas con la finalidad de conocer su interacción con el producto y cómo afecta al desarrollo de microorganismos.

Realizar la evaluación sensorial del queso fresco con película para conocer la preferencia del consumidor.

Realizar las pruebas de normalidad y homocedasticidad para determinar si los datos generados en el análisis microbiológico tienen una distribución normal y la misma varianza.

LISTA DE REFERENCIAS

- ACHIPIA. (2017). *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC).
- Acosta Meza, Z. L., & Celis Barahona, N. M. (2021). Evaluación de dos disolventes en la extracción de aceite a partir de borra de café. Tesis de licenciatura. Universidad de la Salle, Bogotá, Colombia. Recuperado de https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_alimentos/726
- Akanda, M. J. H., Sarker, M. Z. I., Ferdosh, S., Manap, M. Y. A., Ab Rahman, N. N. N., & Ab Kadir, M. O. (2012). Applications of supercritical fluid extraction (SFE) of palm oil and oil from natural sources. *Molecules*, 17(2), 1768–1770.
- Alexopoulos, A., Kimbaris, A. C., Plessas, S., Mantzourani, I., Theodoridou, I., Stavropoulou, E., Polissiou, M. G., & Bezirtzoglou, E. (2011). Antibacterial activities of essential oils from eight Greek aromatic plants against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Anaerobe*, 17, 399–402.
- Álvarez Caro, D. M. & Larqué-Saavedra, A. (2004). La supermolécula, el dimetil sulfóxido: ¿un nuevo regulador del crecimiento vegetal? *Ciencia*, 55 (3), 20–24. https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/55_3/
- Arteaga Rojas, E. Y. (2022). Efecto del aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*) en la aceptación y vida útil del queso fresco. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza De Amazonas, Perú.
- Arteaga, M., Espitia, R., Ramírez, E., Hernández, C., Chams, L., Espitia, D., & Martínez, W. (2015). Estudio del efecto de una película antimicrobiana en la vida útil del queso Costeño. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 6 (1), 036–056.
- Barrera García, V. D., Contreras Martínez, P., Quintero Salazar, B. & Santiago Gómez, M. P. (2015). Percepción sensorial del queso de aro tradicional empleando como envase natural la hoja de palma del género *Brahea dulcis*. En B. A. Cavalloti Vázquez, B. Ramírez Valverde, A. Cesín Vargas & J. Ramírez Juárez (Eds.). Estudios socioeconómicos y ambientales de la ganadería. México, México: UACH.
- Boiero, M. L., González Estévez, V., Allasia, M., Sarmiento, P. V. (s. f.). Capacidad antimicrobiana de microencapsulados de goma arábica en leche, frente a microorganismos mesófilo y psicrótrofo.

- Cano García, M. (2021). Recubrimientos activos para alargar la vida útil de quesos. Tesis de maestría. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.
- Carrillo–Inungaray, M. L., & Mondragón–Hernández, F. M. (2011). Estudio de vida útil del queso asadero. *Revista Salud Pública Y Nutrición*, 12(3). Recuperado a partir de <https://respyn.uanl.mx/index.php/respyn/article/view/291>
- Centurión–Hidalgo, D., Espinosa–Moreno, J., Mayo–Mosqueda, A., Frías–Jiménez, A. & Velázquez–Martínez, J. R. (2013). Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos hexánicos de las inflorescencias de palmas comestibles de la sierra de tabasco, México. *Polibotánica*, 35, 133–142.
- Cervantes–García, E., García–González, R., Salazar–Schettino, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Latinoamericana de Patología Clínica Medicina de Laboratorio*, 61, 28–40.
- Cesín–Vargas, Alfredo. (2014). La leche y los quesos artesanales en México. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 11(2), 243–248. Recuperado en 31 de enero de 2024, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-54722014000200008&lng=es&tlng=es.
- Consejo Mexicano Para el Desarrollo de la Palma de Aceite (COMEXPALMA). (2020). Composición de triglicéridos, ácidos grasos y vitaminas del aceite crudo de palma.
- Cruz Velasco, N. (2017). Caracterización genética de la microbiota del queso fresco artesanal en la región de la Cuenca del Papaloapan. Tesis de maestría. Universidad del Papaloapan, Oaxaca, México.
- De la Rosa Alcaraz, M. de los A. (2013). Dinámica poblacional de la microbiota del queso de poro de balancán durante su proceso de fabricación artesanal. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., Sonora, México.
- Del Cid Juárez, A. R. (2017). Comparación de la vida útil de un queso fresco procesado sin conservadores y quesos frescos con recubrimientos comestibles de quitosano y aceites esenciales. Tesis de licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala, Mazatenango, Guatemala.
- Durán–Agüero, S., Torres García, J. & Sanhueza Catalán, J. (2015). Consumo de queso y lácteos y enfermedades crónicas asociadas a obesidad, ¿amigo o enemigo? *Nutrición Hospitalaria*, 32 (1), 61–68.

- Farías Campomanes, A. M. & Matos Chamorro, A. (2009). Influencia de la temperatura y tamaño de partícula en el proceso de extracción de aceite de semilla de uva (*vitis vinífera*).
- Fereidoun Forghani, C. G. & Diez-Gonzalez, F. (2020). Evaluation of single and combined antimicrobial treatments to inhibit Salmonella in queso fresco. *Food Microbiology*, 85, Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103286>.
- Fernández Ramírez, A., Izquierdo Córser, P., Valero Leal, K., Allara Cagnasso, M., Piñero González, M. & García Urdaneta, A. (2006). Efecto del Tiempo y Temperatura de Almacenamiento Sobre la Calidad Microbiológica de Carne de Hamburguesa. *Revista Científica*, 16(4), 315-324.
- Figuera Chacín, Y. J., Malavé Acuña, A. del C., Cordero Mendoza, J. J. & Méndez Natera, J. R. (2013). Constituyentes químicos de las hierbas y especias: Efectos sobre la salud humana. *Revista Científica UDO Agrícola*, 13 (1), 1-16.
- Franco Anaya, P., Ramírez Medina, L. M., Orozco Ugarriza, M. E. & López Gutiérrez, L. A. (2013). Determinación de *Escherichia Coli* e identificación del serotipo O157:H7 en carne de cerdo comercializada en los principales supermercados de la ciudad de Cartagena. *Lasallista de investigación*, 10, 91-100.
- García-García, M. E. (2017). Diagnóstico de la situación social y económica de los recolectores y artesanos de la palma (*Brahea nítida*, André) en el municipio de Tepelmeme Villa de Morelos, Oaxaca. Universidad Autónoma de Chapingo, México, México.
- German Gallardo, M. F. (2013). Evaluación del empaçado y sellado al vacío en fundas de polietileno de alta densidad en la vida de anaquel de quesos frescos y semiduros. Tesis de licenciatura. Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.
- Gil-Castaño, G. & Cardona, R. (2020). Emolientes: beneficios, elementos clave y aplicación clínica. *Revista alergia México*, 67(2), 128-141.
- Gil Quintero, N. M. (2005). Importancia de *Vibrio cholerae* y otros vibrios como causantes de ETA's. Tesis de licenciatura. Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.
- Gómez Aguas, S. I. (2017). Análisis del contenido de grasa y perfil de ácidos grasos del aceite de la semilla de siete especies de palmas de la Estación Científica Yasuní-PUCE por cromatografía de gases con detector de ionización de llama. Tesis de licenciatura. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador.

- Cómez, T., Díaz, L., Velasco, G., Flores, J., Morales, P., García, J. & Aguilar, J. Proyecto de comercialización de productos forestales no maderables: factores de éxito y fracaso palma soyate (*Brahea dulcis*).
- González– Montiel, L. & Franco–Fernández, M. J. (2015). Perfil microbiológico del queso de aro consumido en la Cañada Oaxaqueña. *Brazilian Journal of Food Technology*, 18 (3), 250–257.
- HANNA instruments. (s.f.). Control de la densidad óptica en estándares de McFarland mediante espectrofotometría visible. Recuperado de <https://www.hannacolombia.com/>
- Instituto Nacional de Salud. (2011). Evaluación de riesgos de *Staphylococcus Aureus* enterotoxigénico en alimentos preparados no industriales en Colombia.
- Iturriaga, L (2009). Utilización de los aceites esenciales en la conservación de alimentos.
- Julliane de Carvalho, R., Targino de Souza, G., Gonçalves Honorio, V., Pereira de Sousa, J., Lúcia da Conceição, M., Maganani, M. & Leite de Souza, E. (2015). Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. *Food Microbiology*, 52, 59–65.
- Lau, HLN; Choo, YM; Ma, AN; Chuah, CH. Calidad del aceite residual de fibra de mesocarpio prensada de palma (*Elaeis guineensis*) usando CO2 supercrítico con y sin etanol. Mermelada. *Química del aceite*, 83, 893–898.
- Lin Lin, Yulei Gu & Haiying Cui. (2019). Moringa oil/chitosan nanoparticles embedded gelatin nanofibers for food packaging against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* on cheese. *Food Packaging and Shelf Life*, 19, 86–93.
- Lira–Vargas, A. A., Trejo–Márquez, M. A. & Pontigo–Suárez, A. G. (2015). Desarrollo de un recubrimiento con efecto antifúngico y antibacterial a base de aceite esencial de orégano para conservación de papaya 'maradol'. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 16 (1), 58–63.
- López–Orozco, M. (2004). Mejoramiento de vida de anaquel en queso tradicional ranchero y queso de pasta hilada (Oaxaca). Tesis de maestría. Universidad Iberoamericana, México, México.
- López–Toledo, L., Espinosa–Hidalgo, C., Horn, C., & Endress, B. (2015). Efectos del manejo tradicional sobre la palma *Brahea Aculeata* en una selva seca del sur de Sonora, México. *Botanical Sciences*, 93, 461–471.

- Marín–Muñoz, I. (2015). Actividad antioxidante y antibacteriana de aceites esenciales ecológicos de hinojo, perejil y lavanda. Tesis de licenciatura. Universidad Miguel Hernández, Elche, España.
- Martínez Hernández, E. D. (2012). Diseño y aplicación de un recubrimiento comestible de quitosano para alargar la vida de anaquel del queso Oaxaca. Tesis de licenciatura.
- Martínez Hernández, U. P. (2016). Diseño, construcción y validación experimental de un equipo de extracción supercrítica a escala laboratorio. Tesis de Licenciatura. Universidad Tecnológica de la Mixteca, Oaxaca, México.
- Martínez Martínez, H. (2012). Elaboración de nanopartículas de polímero biodegradable estabilizadas con la mezcla poli (alcohol vinílico)–dodecil sulfato de sodio: efecto de la relación molar láctido/glicólido. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Química Aplicada, Coahuila, México.
- Martínez Ruíz, L. (2020). Inmovilización de antimicrobianos de origen natural y su aplicación en la industria alimentaria. Tesis de licenciatura. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Martínez, A. (2001). Aceites esenciales. Universidad de Antioquia.
- Mendoza Martínez, G. C. (2021). Efecto del tiempo de almacenamiento sobre las características fisicoquímicas y sensoriales del queso fresco con recubrimiento comestible (a base de proteína concentrada de suero de leche, sorbitol y cera de abeja). Tesis de licenciatura. Universidad César Vallejo, Trujillo, Perú.
- Merchán Castellanos, N., Pineda Gómez, L., Cárdenas Parra, A., González Neiza, N., Otálora Rodríguez, M., & Sánchez Neira, Y. (2019). Microorganismos comúnmente reportados como causantes de enfermedades transmitidas por el queso fresco en las Américas, 2007–2016. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 56 (1).
- Ministerio de Salud. (2011). Análisis microbiológico de los alimentos. Metodología analítica oficial. Microorganismos patógenos.
- Navarrete Palma, A. L. & Saltos Zambrano, D. K. (2022). Evaluación del aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum*) como inhibidor del crecimiento microbiano en queso fresco. Tesis de licenciatura. Universidad Técnica de Manabí, Ecuador.
- NOM–114–SSA1–1994. Bienes y servicios. Método para la determinación de salmonella en alimentos.

- NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.
- NOM-223-SCFI/SAGARPA-2018, Queso-Denominación, especificaciones, información comercial y métodos de prueba.
- NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
- NOM-247-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
- Ocampo Cachay, N. (2019). Obtención de una película antimicrobiana biodegradable a partir de suero de leche y aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*), para envasado de queso fresco. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza De Amazonas, Perú.
- Pandia, S., Romero, R., Céspedes, R. & Solari, A. (2021). Películas comestibles a base de gelatina obtenida de piel de mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) y extracto de orégano: Características fisicoquímicas, antimicrobianas, estructurales y de superficie. *Scientia Agropecuaria*, 12, 229-237.
- Parra Aedo, M. I. (2017). Desarrollo de películas comestibles con incorporación de aceite esencial de anís mediante método de emulsificación. Tesis de licenciatura. Universidad técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile.
- Pavón, N., Escobar, R. & Ortíz-Pulido, R. (2005). Extracción de hojas de la palma *Brahea dulcis* en una comunidad otomí en Hidalgo, México: efecto sobre algunos parámetros poblacionales. *Interciencia*, 31, 1-5.
- PennState Extension. (2020). Bacterias Coliformes.
- Pérez-López, N. Y., Santiago-Gómez, M. P., Salazar-Govea, A. Y., Bravo-Villa, M. G. & López-Luis, A. (2020-2021). Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de palma (*Brahea dulcis*).
- Poveda E., E. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Revista Chilena de Nutrición*, 40(4), 397-403.

- Proaño Bastidas, J., Urresta Valencia, P. & Racines Oliva, M. (2017). Efecto antimicrobiano de la vitamina C, vitamina E y aceite esencial de romero (*rosmarinus officinalis*) en salchichas de pollo tipo Frankfurt. *Diseño y Tecnología*, 20 (2), 27–36.
- Pulido, M. & Coronel-Ortega, M. (2015). Ethnoecology of the palm *Brahea dulcis* (Kunth) Mart. in central Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 11, 2–16.
- Quero, H. (1994). Palms of Mexico: present and future. *Botanical Sciences*, 55, 123 – 127.
- Ramírez López, C. & Vélez Ruiz, J. F. (2012). Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6 (2): 131 – 148.
- Rangel-Landa, S., Rivera-Lozoya, E., & Casas, A. (2014). Uso y manejo de las palmas *Brahea spp.* (Arecaceae) por el pueblo ixcateco de Santa María Ixcatlán Oaxaca, México. *Gaia Scientia*, 62–78.
- Rendón-Rendón, M. C. & Brunett-Pérez, L. (2022). Características y preferencias del consumo de quesos en hogares del Valle de Toluca, Estado de México. Estudios sociales. *Revista de alimentación contemporánea y desarrollo regional*, 32 (59). Recuperado de <https://doi.org/10.24836/es.v32i59.1219>
- República de Colombia, Ministerio de la Protección Social & Instituto Nacional de Salud. (2011). Perfil de riesgo *Salmonella spp.* (no tifoideas) en pollo entero y en piezas.
- Rincón, S. & Martínez, D. (2009). Análisis de las propiedades del aceite de palma en el desarrollo de su industria. *Palmas*, 30 (2), 11–24.
- Rodríguez-Rodríguez, J., Amaya, C. A., Caballero, P., Alanís, M. G., Aguilera, C., Báez, J. G., Moreno, S., & Núñez, M. A. (2015). Factores que influyen en el contenido de escualeno, fitoesteroles totales y esterificados en el subproducto ácidos grasos destilados de soya para su potencial aprovechamiento. *Nova scientia*, 7 (14), 268–285.
- Rosero, A., Espinoza-Montero, P. & Fernández, L. (2020). Recubrimientos comestibles con materiales micro/nanoestructurados para la conservación de frutas y verduras: una revisión. *Revista infoAnalítica*, 8 (2), 149–178.
- Rueda-Puente, E. O., Juvera, J., Romo, I., & Holguín, R. (2018). Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales de orégano y tomillo contra *Ralstonia solanacearum*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 20, 4251–4261.

- Sánchez-García, E., Castillo-Hernández, S.L., & García-Palencia, P. (2016). Actividad antimicrobiana. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 77-100. <http://dx.doi.org/10.3926/oms.334>
- Sánchez Rodríguez, A. (2016). Evaluación del contenido fenólico y su capacidad antioxidante de extractos de hojas de aguacate criollo (*Persea americana var. Drymifolia*) obtenidos mediante ultrasonido de alta intensidad. Tesis de licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma De Puebla, México.
- Santamarina-García, G; Fresno, J; Virto, M; Amores, G & Aranceta, J. (2020). La microbiota del queso y su importancia funcional. *Revista española de nutrición comunitaria*, 26 (4).
- Silva, P., Pinheiro, A. C., Rodríguez, L., Figueroa, V. & Baginsky, C. (2016). Fuentes naturales de fitoesteroles y factores de producción que lo modifican. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 16 (1).
- Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de plagas. (s. f.). *Xanthomonas citri subsp. Citri*.
- Solano Doblado LG, Alamilla Beltran L, Jiménez Martínez C. Películas y recubrimientos comestibles funcionalizados. *Revista especializada en ciencias químico-biológicas* 2018;21(2):30-42.
- Soria Herrera, R. J. (2020). Evaluación de la calidad microbiológica en queso fresco y adobera, de la región Tierra Caliente del Estado de Michoacán. Tesis de maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México.
- Thielman, J., Muranyi, P. & Kazman, P. (2019). Screening essential oils for their antimicrobial activities against the foodborne pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Heliyon*, 5, 1-6.
- Torres Avellan, D. A. (2019). Efecto de la concentración del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre la vida útil del queso fresco artesanal. Tesis de maestría. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria De Manabí Manuel Félix López, Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.esпам.edu.ec/handle/42000/1070>
- Tserennadmid, R., Takó, M., Galgóczy, L., Papp, T., Pesti, M., Vágvölgyi, C., Almássy, K., Krisch, J. (2011). Anti-yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *Food Microbiol.* 144 (3), 480 -486.

- Valverde Deza, A. C. (2022). Efecto de la concentración de aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* en queso mantecoso. Tesis de licenciatura. Universidad Privada Antenor Orrego, Perú.
- Venegas Valverde, P. A. (2016). Evaluación de las condiciones experimentales para la extracción de aceite esencial de romero para su uso como antioxidante en aceites comerciales. Tesis de licenciatura. Universidad de Costa Rica, Costa Rica. <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/handle/123456789/4008>
- Villa Guerrero, V. A. & Benálcazar Arroyo, J. K. (2015). Evaluación de la extracción etanólica y con hexano de las semillas de guayaba y su acción inhibitoria. Tesis de licenciatura. Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador.
- Zaidul, ISM; Norulaini, NAN; Mohd Omar, Alaska; Smith, RL, Jr. (2007). Extracción de dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂) de aceite de palmiste a partir de palmiste. *J. Ing. de Alimentos*, 79, 1007-1014.
- Zurita Santillán, A., Köller Claire, A. & Zabalaga Dávila, R. (2021). Extracción de aceite de amaranto utilizando la técnica Soxhlet y extracción asistida por Ultrasonido. *Acta Nova*, 10 (2), 246-255.

ANEXOS

ANEXO A. PREPARACIÓN DE MUESTRA DEL ALIMENTO PARA SU EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA

Pesar una cantidad de 10 u 11 g de la muestra por analizar en un recipiente o bolsa plástica estériles de tamaño adecuado. Adicionar un volumen de 90 a 99 mL del diluyente llevado a una temperatura similar a la de la muestra. Operar la licuadora o el homogeneizador peristáltico de 1 a 2 minutos hasta obtener una suspensión completa y homogénea según se indique en la técnica correspondiente para cada alimento. Aun en los equipos más lentos, este tiempo no debe exceder de 2.5 minutos.

Permitir que las partículas grandes se sedimenten, y transferir la cantidad deseada tomando de las capas superiores de la suspensión. Cuando la dilución primaria es muy viscosa o pegajosa, adicionar más diluyente, lo cual debe tomarse en cuenta para las operaciones subsecuentes o expresión de resultados. El homogeneizador peristáltico (Stomacher) puede no ser adecuado para algunos productos (por ejemplo, aquellos con partículas agudas o constituyentes que no se dispersen fácilmente). Debe ser utilizado sólo cuando exista

evidencia (publicada o por ensayos comparativos) de que los resultados obtenidos no difieren significativamente con aquellos obtenidos con licuadora (NOM-210-SSA1-2014).

ANEXO B. PREPARACIÓN DE CALDO LAURIL TRIPTOSA

NOM-210-SSA1-2014

Inóculo (mL)	Cantidad de medio por tubo (mL)	Volumen de medio más inóculo (mL)	Caldo lauril triptosa requerido (g/L)
1	10 o más	11 o más	35.6
10	10	20	71.2
10	20	30	53.4
20	10	30	106.8
100	50	150	106.8
100	35	135	137.1
100	20	120	213.6

ANEXO C. PRUEBA TUKEY EN INFOSTAT 2020

ANÁLISIS DE VARIANZA Y COMPARACIÓN DE MEDIAS POR TUKEY DE S. AUREUS POR TIEMPO

0 horas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
UFC/g	8	sd		sd	0.00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.00	4	0.00	sd	sd
Formulación	0.00	3	0.00	sd	sd
Réplica	0.00	1	0.00	sd	sd
Error	0.00	3	0.00		
Total	0.00	7			

84 horas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
UFC/g	8	0.41		0.00	33.18

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	34350000000.00	4	8587500000.00	0.53	0.7273
Formulación	27737500000.00	3	9245833333.33	0.57	0.6720
Réplica	6612500000.00	1	6612500000.00	0.41	0.5685
Error	48637500000.00	3	16212500000.00		
Total	82987500000.00	7			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=614444.29760

Error: 16212500000.0000 gl: 3

Formulación	Medias	n	E.E.
2	450000.00	2	90034.72 A
0	410000.00	2	90034.72 A
3	385000.00	2	90034.72 A
1	290000.00	2	90034.72 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

168 horas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
UFC/g	8	1.00	1.00	5.95

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	6425250000000.00	4	1606312500000.00	1018.80	<0.0001
Formulación	6421330000000.00	3	2140443333333.30	1357.58	<0.0001
Réplica	3920000000.00	1	3920000000.00	2.49	0.2129
Error	4730000000.00	3	1576666666.67		
Total	6429980000000.00	7			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=605936.99184

Error: 1576666666.6668 gl: 3

Formulación	Medias	n	E.E.	
0	700000.00	2	88788.14	A
1	700000.00	2	88788.14	B
2	645000.00	2	88788.14	B
3	95000.00	2	88788.14	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

252 horas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
UFC/g	8	0.72	0.34	32.89

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	78615000000.00	4	19653750000.00	1.90	0.3131
Formulación	69583750000.00	3	23194583333.33	2.24	0.2627
Réplica	9031250000.00	1	9031250000.00	0.87	0.4194
Error	31093750000.00	3	10364583333.33		
Total	109708750000.00	7			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1553579.37638

Error: 10364583333.3333 gl: 3

Formulación	Medias	n	E.E.	
0	145000.00	2	227646.47	A
1	96000.00	2	227646.47	A
3	86000.00	2	227646.47	A
2	64500.00	2	227646.47	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

ANÁLISIS DE VARIANZA Y COMPARACIÓN DE MEDIAS POR TUKEY DE S. AUREUS POR
FORMULACIÓN

F0

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
UFC/g	8	1.00	1.00	6.29

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	61345750000000.00	4	15336437500000.00	751.79	0.0001
Hora	61332950000000.00	3	20444316666666.70	1002.17	0.0001
Réplica	12799999999.98	1	12799999999.98	0.63	0.4861
Error	61200000000.00	3	20400000000.00		
Total	61406950000000.00	7			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=689243.38592

Error: 20400000000.0000 gl: 3

Hora	Medias	n	E.E.	
168	7000000.00	2	100995.05	A
252	1450000.00	2	100995.05	B
84	410000.00	2	100995.05	C
0	230000.00	2	100995.05	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

F1

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
UFC/g	8	0.87	0.70	36.94

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	836200000000.00	4	209050000000.00	5.16	0.1045
Hora	721000000000.00	3	240333333333.33	5.93	0.0889
Réplica	115200000000.00	1	115200000000.00	2.84	0.1904
Error	121600000000.00	3	40533333333.33		
Total	957800000000.00	7			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=971546.70598

Error: 40533333333.3333 gl: 3

Hora	Medias	n	E.E.	
252	960000.00	2	142361.04	A
168	700000.00	2	142361.04	A
84	290000.00	2	142361.04	A
0	230000.00	2	142361.04	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

F2

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
UFC/g	8	0.88	0.73	20.79

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	229050000000.00	4	57262500000.00	5.72	0.0918
Hora	210037500000.00	3	70012500000.00	6.99	0.0722
Réplica	19012500000.00	1	19012500000.00	1.90	0.2620
Error	30037500000.00	3	10012500000.00		
Total	259087500000.00	7			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=482868.40329

Error: 10012500000.0000 gl: 3

Hora	Medias	n	E.E.
168	645000.00	2	70754.86 A
252	600000.00	2	70754.86 A
84	450000.00	2	70754.86 A
0	230000.00	2	70754.86 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

F3

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
UFC/g	8	0.83	0.60	56.07

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	700850000000.00	4	175212500000.00	3.62	0.1596
Hora	667050000000.00	3	222350000000.00	4.59	0.1213
Réplica	33800000000.00	1	33800000000.00	0.70	0.4648
Error	145300000000.00	3	48433333333.33		
Total	846150000000.00	7			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1062012.68304

Error: 48433333333.3333 gl: 3

Hora	Medias	n	E.E.
252	860000.00	2	155617.05 A
84	385000.00	2	155617.05 A
0	230000.00	2	155617.05 A
168	95000.00	2	155617.05 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

ANEXO D. PRUEBA DE NO PLAGIO

