

UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS PUEBLA

**Escuela de Ingeniería
Departamento de Ingeniería Química y Alimentos**



**Estudio del Efecto de Aceite Esencial de Tomillo en Fase Vapor para Inhibir el
Crecimiento de Mohos en Tortillas de Harina de Trigo**

Tesis que, para completar los requisitos del Programa de Honores presenta la estudiante

Zyanya Bárcena Maasberg

150964

Ingeniería de Alimentos

Aurelio López-Malo Vigil

San Andrés Cholula, Puebla.

OTOÑO 2018

Hoja de firmas

Tesis que, para completar los requisitos del Programa de Honores presenta la
estudiante Zyanya Bárcena Maasberg, 150964

Director de Tesis

Aurelio Gerardo del Corazón de Jesús López-Malo Vigil

Presidente de Tesis

Enrique Palou García

Secretario de Tesis

Fatima Reyes Jurado

ÍNDICE

JUSTIFICACIÓN	1
OBJETIVOS	2
PLAN DE INVESTIGACIÓN	3
CAPÍTULO I	
MARCO TEÓRICO	3
CAPITULO II	
METODOLOGÍA	12
2.1. <u>Aceite esencial</u>	12
2.2. <u>Determinación del contenido de humedad y actividad</u> <u>de agua en la tortilla de harina de trigo</u>	12
2.3. <u>Determinación de componentes químicos del aceite esencial</u>	12
2.4. <u>Caja Petri invertida</u>	13
2.5. <u>Aislamiento y detección de mohos</u>	14
2.6. <u>Cámara hermética</u>	15
2.7. <u>Elaboración de las tortillas de harina de trigo</u>	16
2.8. <u>Efecto del aceite esencial <i>in vitro</i></u>	16

2.9. <u>Actividad antifúngica del aceite esencial aplicado en tortillas de harina de trigo</u>	17
2.10. <u>Evaluación sensorial</u>	18
CAPÍTULO III	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
3.1. <u>Contenido de humedad y actividad de agua de las tortillas de harina de trigo</u>	19
3.2. <u>Componentes químicos del aceite esencial</u>	19
3.3. <u>Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI)</u>	21
3.4. <u>Evaluación sensorial</u>	24
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	26
AGRADECIMIENTOS	27
REFERENCIAS	28
ANEXOS	31
APÉNDICE A	31
APÉNDICE B	32
APÉNDICE C	33

JUSTIFICACIÓN

En estos días las personas buscan alimentos que sean cada vez más naturales sin aditivos sintéticos que tengan un efecto para prolongar la vida de anaquel, acentuar el color, sabor u olor. Es por lo que se han realizado investigaciones con aditivos naturales que brinden las mismas características al producto y con apropiadas propiedades sensoriales.

Se ha investigado y demostrado que los aceites esenciales poseen propiedades antimicrobianas ya sea que se apliquen de manera directa o indirecta en el alimento. Dado que los aceites esenciales provienen de fuentes naturales es que se han convertido en objeto de estudio para satisfacer las exigencias de los consumidores.

Las tortillas son un alimento típico mexicano que sirve para acompañar platillos o como ingrediente importante de éstos. Una derivación de la tortilla de harina de maíz es la de harina de trigo, típica del norte de México. A pesar de que existen tortillas de harina comerciales que posibilitan la ingesta de este producto no poseen el sabor y olor característico de las que se elaboran en los estados de Sonora, Baja California, Coahuila, Nuevo León, Sinaloa. Sin embargo, el deterioro por crecimiento de mohos en la superficie de la tortilla de harina sigue siendo la principal limitante de su vida útil.

Es por esto por lo que se estudió el efecto de adicionar aceite esencial de tomillo en este producto, para poder prolongar su vida de anaquel sin necesidad de adicionar aditivos sintéticos.

OBJETIVOS

General

Evaluar y analizar la actividad antifúngica del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) en fase vapor contra mohos (*Penicillium expansum* o *Aspergillus niger*) representativos del deterioro en tortilla de harina de trigo.

Particulares

1. Determinar la actividad antifúngica y la concentración mínima inhibitoria (CMI) que posee el aceite esencial de tomillo en fase vapor mediante el método de caja Petri invertida.
2. Determinar la actividad antifúngica y la concentración mínima inhibitoria (CMI) que posee el aceite esencial de tomillo en fase vapor aplicado en tortillas de harina de trigo.
3. Realizar una evaluación sensorial de las tortillas de harina tratadas con el aceite esencial de tomillo aplicado en fase vapor para determinar la aceptabilidad del producto.

PLAN DE INVESTIGACIÓN

Se evaluará la actividad antifúngica del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) en fase vapor contra mohos representativos del deterioro en tortilla de harina de trigo dado que es un alimento típico del norte de México y acompañante de platillos típicos mexicanos.

La actividad antifúngica y la concentración mínima inhibitoria (CMI) *in vitro* se evaluará mediante el método de caja Petri invertida, determinando el crecimiento radial del

moho sobre medios de agar inoculados y expuestos al vapor generado por el aceite esencial. Para realizar las pruebas *in vivo* en tortillas de harina de trigo se usarán recipientes herméticos cerrados de aproximadamente 1.7 ℓ de capacidad.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

Aproximadamente hace 10,000 años fue que el ser humano descubrió que los granos de los cereales podían cultivarse y cosecharse para utilizarse como una reserva de alimento impulsando el desarrollo de la humanidad (Rosado, Camacho-Solís, y Bourges, 1999). Siendo el mijo y el sorgo en el norte de África, arroz en India y China, y maíz en América los primeros granos cultivados de los que se tiene registro (Cadena, 2011).

En la actualidad, los cereales son la mayor fuente de energía para el ser humano, considerándose base de su alimentación. En México, el maíz al ser nativo de América es el cereal más predominante y base de la alimentación. Antes de la conquista de los españoles en México se llevaba a cabo el proceso de nixtamalización que consiste en remojar y llevar a cocción los granos de maíz en una solución alcalina para remover fácilmente el pericarpio del grano de maíz y con esto se hacía una masa para hacer algo parecido a lo que se conoce en la actualidad como un tamal (Inglett, 1974).

Se sabe que durante la conquista musulmana de la península ibérica los españoles adquirieron conocimientos nuevos sobre ciencia, navegación, matemáticas, entre otras áreas incluyendo la gastronomía. Los musulmanes no solían comer el típico pan de trigo que se comía en el resto de la península ibérica. Ellos solían acompañar sus comidas con un pan

plano de forma circular levemente fermentado, hecho con harina de trigo y que era cocido en las paredes de los hornos. Actualmente se conoce como pan pita o pan árabe (Monroy, 2004).

Al llegar los españoles al territorio mexicano, trajeron consigo el trigo e influencias gastronómicas. En México, el segundo cereal más consumido es el trigo el cual fue cosechado por primera vez en la zona del Medio Oriente y el Mediterráneo aproximadamente 6700 años a.C. (Inglett, 1974). En la actualidad, el trigo es cultivado en todos los continentes, excepto en la Antártida, especialmente en Europa, Asia Occidental y el norte de África existiendo un total de más de 80 países que se dedican al cultivo de este cereal (Curtis, Rajaram, y Gómez, 2002).

En México se consumen alrededor de 57.4 kg per cápita al año de granos de trigo, constituyendo el 40% del total del gasto en cereales, dentro de los hogares mexicanos. El grano de trigo se divide en dos tipos: cristalino y harinero. El trigo cristalino es utilizado principalmente para la elaboración de pastas y el trigo harinero es utilizado primordialmente para la producción de panes, productos de repostería y harinas. En 2016 el consumo nacional de trigo harinero era de 6.19 millones de toneladas, estimándose que en 2018 fuera de 6.33 millones de toneladas (SAGARPA, 2017).

Los cinco principales estados productores de trigo son Sonora (1.8 millones de toneladas), Baja California (579 mil toneladas), Sinaloa (364 mil toneladas), Guanajuato (291 mil toneladas), y Michoacán (209 mil toneladas). En conjunto, estos estados aportan el 87.1% de la producción total de trigo, donde Sonora participa con el 49.4%, Baja California con un 15.1%, Sinaloa con un 9.5%, Guanajuato con el 7.6% y Michoacán con el 5.4% (SAGARPA, 2017). El trigo se produce en 23 entidades del país, registrando una superficie de 728 mil 900

hectáreas. Otras entidades productoras de trigo son Jalisco, Chihuahua, Nuevo León, Tlaxcala, Coahuila, Baja California Sur, Durango, Oaxaca, Estado de México, Zacatecas, Tamaulipas, Hidalgo, Puebla y Veracruz, entre otras (SAGARPA, 2017).

El trigo representa el 12.9% del volumen nacional de granos que se producen en el país estimando un valor total de 14 mil 167 millones de pesos. El 85% del volumen total se obtiene durante los meses de mayo y junio (SAGARPA, 2017). En México, el trigo es altamente consumido en forma de pastas, pan, repostería, tortillas, entre otras (Torres, y Morales, 1997).

Las tortillas de harina son parte de la comida mexicana como un acompañante en las comidas y/o como ingrediente para preparar platillos. La tortilla de harina es una adaptación de la tortilla de maíz realizada en el norte de México en la época colonial aproximadamente en el año 1519 por grupos colonizadores mesoamericanos tlaxcaltecas en el estado de Coahuila (Saráuz, y Tirira, 2011).

Las tortillas de harina de trigo son típicas en el norte del país para acompañar cualquier platillo, dado que en el resto de México generalmente son usadas para hacer quesadillas. Se cree que la tortilla de harina llegó al norte del país de la mano de los colonizadores quienes al observar que el maíz no se producía tan bien como en el centro del país comenzaron a cultivar y producir trigo (González, 1938).

Lo más probable es que la tortilla de harina fuera el resultado de dos factores: la disponibilidad de harina de trigo y la presencia de grupos colonizadores mesoamericanos occidentalizados, como los tlaxcaltecas, quienes tenían a la tortilla como elemento de su

bagaje cultural culinario. Desde 1591 estas circunstancias coincidieron con la villa de Santiago del Saltillo, que fue una de las poblaciones más antiguas y permanentes de la Nueva Vizcaya (Corona, 2008).

Lo que ahora se conoce como el sur del estado de Coahuila tuvo una influencia española y tlaxcalteca significativa, y sus famosas labores de trigo y molinos de harina datan del siglo XVI. Ejemplos de mestizaje gastronómico son las tortillas de harina y el pan de pulque (Corona, 2008). Con este cereal comenzaron a refinar los granos para convertirlos en harina y mezclarlos con agua, sal y manteca vegetal para crear la tortilla de harina. En la Parroquia de Santa María de las Parras, (1700) se tienen documentos de la época colonial, donde se registra que en el año de 1734 ya existía la tortilla de harina de trigo. Este hecho se hace evidente en una declaración fechada el 15 de enero de 1734 en la ciudad de Parras de la Fuente por parte de un reo llamado Gerónimo Camargo,

“al otro día se fueron para El Barrial a reconocer a la Voca de los Tres Ríos, y fueron a salir a Castaño; y que allí toparon a un soldado de Cuaguila llamado Miguel Ramón, y que les preguntó de dónde venían, y le dixeron que iban de Parras, y que a todos los conosió, y les dio 5 tortillas de arina como a oras de almorsar. Y que el d[ic]ho soldado se vino para el Saltillo, y el declarante y sus compañeros se estuvieron allí hasta que amanesió”

Por lo que se menciona anteriormente, las tortillas de harina de trigo tienen años de ser parte de la gastronomía en el norte del país. Actualmente el tamaño de las tortillas puede variar desde 6 hasta 30 cm de diámetro dependiendo de la región del norte del país y el platillo

para el que se pretende usar. Una de las características de este alimento es que es más resistente y elástico que la tortilla de harina de maíz (Saráuz, y Tirira, 2011).

De acuerdo con los reportado en el Sistema Mexicano de Alimentos Equivalentes (SMAE, 2008) una tortilla de aproximadamente 28 g aporta 44 kcal, 1.0 g de proteína, 1.1 g de lípidos, 7.5 g de hidratos de carbono, 0.5 g de fibra, 9.5 g de calcio, 0.1 mg de hierro, 104.5 mg de sodio, 0.3 g de azúcar. Las tortillas de harina son fáciles de elaborar solo se requiere mezclar la harina con sal y manteca vegetal, después que todo está bien mezclado se agrega agua caliente o tibia hasta formar la masa. Posteriormente se deja reposar durante 20 min y se hacen “bolitas” que después son amasadas y puestas en un sartén caliente. Las tortillas comerciales tienen conservadores que llegan a alterar el sabor y aroma característicos de las tortillas de harina caseras. Algunos de los aditivos más comunes usados para conservar tortillas son propionato de calcio, pirofosfato ácido de sodio, ácido fumárico, ácido sórbico, sulfato de aluminio y sodio, fosfato monocálcico y peróxido de calcio. En la Tabla 1 se muestran las funciones de estos aditivos en el alimento para conservarlo. Por sí solos o en combinación con otras sustancias, estos aditivos llegan a alterar las propiedades sensoriales del alimento, además de que el ver en la etiqueta tantos aditivos agregados en la formulación llega a espantar a los consumidores. Inclusive más en la actualidad que cada vez exigen productos duraderos, inocuos y más naturales, libres de aditivos sintéticos o con la menor cantidad posible de éstos.

Tabla 1. Aditivos usados en la elaboración de tortillas de harina

Aditivo	Función	Dosis máxima permitida	
		FDA	Codex Alimentarius
Propionato de calcio	Es un aditivo reconocido como seguro (GRAS). Agente conservante	BPM	BPM en alimentos que no sean “Queso de proteínas del suero”
Pirofosfato ácido de sodio	Es un aditivo reconocido como seguro (GRAS). Agente leudante, mejora el color y aumenta la vida útil.	BPM	-----
Ácido fumárico	Acción antimicrobiana, no es tóxico, regulador de la acidez.	BPM	700 mg/kg
Ácido sórbico	Conservante.	<0.2% en peso de ácido sórbico en combinación con otros preservativos	Productos de panadería el límite máximo son 1000 mg/kg
Sulfato de aluminio	Regulador de acidez, retención de color, agente endurecedor, leudante y estabilizante.	BPM	La dosis máxima permitida son 100 mg/kg
Sulfato de sodio	Regulador de acidez. Considerado GRAS	BPM	200 mg/kg
Fosfato monocálcico	Regulador de la acidez, antiaglutinante, emulsionante, agente endurecedor, agente de tratamiento de la harina, humectante, leudante, estabilizante, espesante. Considerado GRAS.	Dosis máxima en productos de panadería debe ser menor a 0.75 partes /100 partes de harina. O menos a 4.5 partes incluyendo bicarbonato de sodio / 100 partes de producto de cereal	800 mg/kg como fósforo en materia seca sólo en productos deshidratados
Peróxido de calcio	Leudante y conservador.	La dosis máxima permitida debe ser <0.0075 partes por cada 100 partes en peso de harina utilizada.	-----

Es por esa tendencia que se han realizado investigaciones sobre alternativas que sustituyan el uso de aditivos sintéticos y se ha encontrado que los aceites esenciales de plantas tienen efectos antimicrobianos, convirtiéndose en una alternativa para prolongar la vida de anaquel de ciertos productos naturales y procesados. Una de estas alternativas son los aceites esenciales que son líquidos viscosos semi-volátiles extraídos de hojas, tallos, semillas, flores, hierbas, ramas y cortezas. Anteriormente eran estudiados para ser utilizados como

aromatizantes o saborizantes; sin embargo, en años recientes se ha encontrado que tienen propiedades que los hacen actuar como antimicrobianos y antioxidantes; además, muchos de estos aceites han sido reconocidos por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) como aditivos seguros o generalmente reconocidos como seguros (GRAS) (Reyes-Jurado *et al.*, 2017).

Hacer uso de estas sustancias naturales ha sido una técnica atractiva dado que puede no haber contacto directo entre el aceite y el producto que contiene el microorganismo que se desea inhibir. Esta técnica es efectiva para bacterias patógenas, Gram negativas y Gram positivas, mohos y levaduras. La técnica en fase vapor es más efectiva contra los mohos gracias a que el área de crecimiento superficial es mayor que la de las bacterias y, por lo tanto, el contacto con el aceite es mayor (Edris y Farrag, 2003).

Recientes investigaciones han encontrado que los compuestos químicos responsables de la actividad antioxidante, antimicrobiana y aroma de los aceites esenciales son los mono terpenos, sesquiterpenos, y di terpenos (Reyes-Jurado *et al.*, 2017). La actividad antimicrobiana es atribuible a tres características: la hidrofobicidad o hidrofilia del aceite esencial (AE), los componentes químicos presentes y el tipo de microorganismo que se desea atacar. Debido al gran número de compuestos químicos que contienen los aceites esenciales, no es sencillo otorgarles un objetivo celular específico ya que como típicos lipófilos pueden atravesar la pared celular y la membrana citoplasmática alterando la estructura de las diferentes capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos permeabilizándolos provocando daños a la membrana de las células (Reyes-Jurado *et al.*, 2017).

Se han realizado numerosos estudios que han demostrado que el aceite esencial de tomillo es uno de los aceites más potentes para inhibir el crecimiento microbiano, siendo el timol y el carvacrol algunos de sus componentes activos más significativos y de mayor volatilidad (Rosas-Gallo, y López-Malo, 2011).

La efectividad antimicrobiana que posee el aceite esencial de tomillo se debe a su carácter lipofílico y los daños subsecuentes que trae a la membrana microbiana. Estos daños son generados por medio de la formación de puentes hidrogeno de los constituyentes fenólicos (compuestos que conforman el aceite) a proteínas de la membrana cambiando su permeabilidad y características (Rosas-Gallo, y López-Malo, 2011).

En un estudio realizado por Jobling, (2000) se determinaron las concentraciones idóneas de aceite esencial de árbol de té para inhibir el crecimiento de *Botrytis cinerea* que fueron de 100 ppm (80% reducción de tamaño de colonia) y de 500 ppm (100% reducción de tamaño de colonia). De igual manera Gomez-Sanchez *et.al.* (2011) descubrieron que concentraciones de 294.1, 588.2 o 882.4 μl de aceite esencial de orégano mexicano/ ℓ de aire, lograron un efecto fungistático sobre *Aspergillus flavus* y un efecto fungicida si se somete el mismo moho a una cantidad de aceite esencial de 1470 μl / ℓ de aire.

Se han realizado experimentaciones con pan y aceites esenciales en los cuales se ha demostrado que el uso de éstos tiene un efecto fungistático tal y como lo mostraron Mani-López *et.al.* (2018) donde estudiaron el efecto del aceite esencial de té-limón en pan en concentraciones de 0, 125, 250, 500, 750, 1000, 2000 o 4000 μl / ℓ de aire; encontrando que a una concentración de 750 μl / ℓ de aire, se inhibe el crecimiento microbiano por 21 días a 21°C.

La investigación de Reyes-Jurado *et al.* (2017) se llevó a cabo con tortillas de maíz utilizando aceite esencial de tomillo obteniendo que a partir de 400 y 850 $\mu\text{l}/\ell$ de aire, el crecimiento de *Penicillium expansum* y *Aspergillus niger* por 20 días a una temperatura de 25°C era inhibido. Se ha encontrado que los componentes principales detectados del aceite esencial de tomillo son el linalol, timol y *p*-cimeno (Reyes-Jurado *et al.*, 2017).

Todavía no hay muchos estudios científicos que demuestren que concentraciones de aceite esencial se pueden aplicar en alimentos. Sin embargo, en vista de que los aceites esenciales en fase vapor son más efectivos para inhibir el crecimiento de mohos, se han realizado estudios para poder aplicarlos. Recientes investigaciones han observado que hay un efecto positivo al utilizar los aceites esenciales en fase vapor en empaques, siendo una opción de éstos, las películas comestibles (Reyes-Jurado, 2003). De igual manera que no se tienen muchas investigaciones del uso de los aceites esenciales en combinación directa con los alimentos, son todavía más escasas las investigaciones que estudian y evalúan los parámetros sensoriales que pueden o no agradar a los consumidores.

Mani-López *et al.* (2018) realizaron pruebas sensoriales en pan con aceite esencial de té-limón en concentraciones de 0, 500 o 1000 $\mu\text{l}/\ell$ de aire a 25 jueces obteniendo resultados favorables ya que mostraron agrado hacia los panes con aceite esencial, inclusive se observó una inclinación de preferencia hacia las muestras que contenían mayor cantidad de aceite atribuyéndose estos resultados al sabor agradable del aceite esencial de té-limón.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Aceite esencial

Los aceites esenciales de mostaza (*Brassica nigra*), orégano mexicano (*Lippia berlandieri Schauer*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*) fueron obtenidos de Laboratorios Hersol S.A de C.V. (Edo. México, México) y se mantuvieron en frascos de cristal oscuros bajo condiciones de refrigeración hasta su uso.

2.2. Determinación del contenido de humedad y actividad de agua en la tortilla de harina de trigo

El contenido de humedad se llevó a cabo siguiendo el método 44-15 (AACC, 2000), donde se colocan 2 g de muestra en un horno a 105°C durante 12 h calculando la humedad por diferencia de pesos. La actividad de agua se determinó utilizando un hidrómetro de punto de rocío Aqua Lab CX-2 (Decagon Devices, Inc., EE. UU). Las determinaciones se hicieron por triplicado (Reyes-Jurado *et al.*, 2017).

2.3. Determinación de componentes químicos del aceite esencial

Para determinar los componentes químicos del aceite esencial de tomillo se utilizó la metodología seguida por (Reyes-Jurado *et al.*, 2017) quién usó cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM), utilizando un cromatógrafo de gases 6850 Series Network GC System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) acoplado a un detector de masa de 5975C VL con detector triple eje (Agilent Technologies) con un inyector

(relación de división 1:10). También se utilizó una columna capilar HP-5MS (5% fenil-95% polidimetilsiloxano) de sílice fundida (30 m por 0.250 mm, espesor de película, 0.25 μ l). Se utilizó helio como gas acarreador a una velocidad de flujo de 1.1 ml/min. Se prepararon muestras por dilución del AE a 5:100 (vol/vol) en etanol, y el volumen de inyección fue de 1 μ l. La temperatura del horno en columna se programó desde 60°C (4 min) hasta 240°C (10 min) a 4°C / min. Las temperaturas del inyector y del detector se fijaron en 250 y 280°C, respectivamente (Gómez-Sánchez *et al.*, 2011). Los índices de retención se calcularon usando una serie homóloga de *n*-alcanos C_{8,0} a C_{18,0} (Sigma, St. Louis, MO). Los compuestos eluidos se identificaron comparando sus índices de retención con la literatura y también con el perfil de masas de los mismos compuestos disponibles en la biblioteca del Instituto Nacional de Tecnología Estándar de los Estados Unidos (Ávila-Sosa *et al.*, 2012).

2.4.Caja Petri invertida

El método de caja Petri invertida es ampliamente usado por su sencillez y rapidez para calcular la concentración mínima inhibitoria (CMI). Consiste en colocar un medio de cultivo dentro de la caja Petri y una vez que se ha formado el gel se inocula el microorganismo de interés. Enseguida, en la tapa de la caja Petri se coloca un pedazo de papel filtro impregnado con la cantidad deseada de aceite esencial. Finalmente, la caja Petri se voltea sobre la tapa para promover la evaporación del aceite esencial hacia el microorganismo inoculado en el agar. Para asegurarse que no se pierda aceite esencial, la caja Petri es sellada con *Parafilm* (Reyes-Jurado *et al.*, 2017).

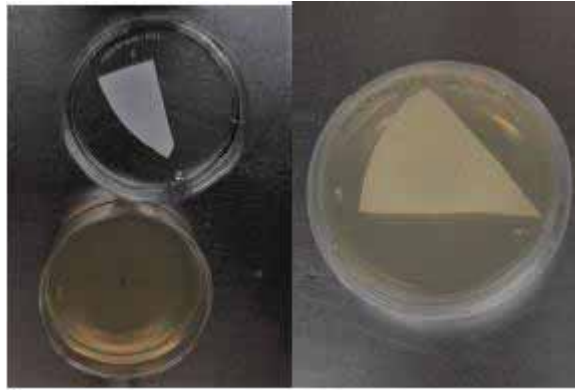


Figura 1. Técnica de caja Petri invertida

2.5. Aislamiento y detección de mohos

En aproximadamente 1 semana se observó crecimiento de mohos en las tortillas de harina de trigo realizadas por nosotros mismos. Se recolectaron dos muestras y se inocularon en agar papa dextrosa durante 7 días a 26°C. Después de analizar los mohos, se determinó que los que crecieron fueron *Penicillium expansum* y en menor cantidad *Aspergillus niger*. Se obtuvieron muestras de cada moho, se sembraron en cuñas con agar papa dextrosa y se incubaron por 7 días a 26°C. Para la obtención de esporas se hizo un lavado de superficie con 10 ml de agua destilada esterilizada y se ajustó hasta obtener 1×10^6 esporas/ml y ser usadas en experimentos posteriores. Las cepas de mohos se transfirieron a medios de cultivo y se mantuvieron en refrigeración a 4°C (Reyes-Jurado *et al.*, 2017).

2.6. Cámara hermética

La técnica de cámara hermética (Figura 2) consiste en usar recipientes (1 a 2 ℓ) con tapas que puedan cerrarse apropiadamente. Esto, con el fin de lograr una atmósfera adecuada para el crecimiento de microorganismos y se pueda evaluar el efecto inhibitorio del aceite esencial. Consiste en introducir el aceite esencial en el centro de la caja y sobre una rejilla se colocan las muestras previamente inoculadas. Las cajas se mantienen en condiciones de temperatura controladas aproximadamente a 25 °C por 72 h o a 37°C de 18 a 24 h, para mohos o bacterias, respectivamente. Así, se puede encontrar la CMI ya que la atmósfera generada es idónea para que el aceite esencial entre en contacto con la muestra y genere zonas de inhibición de crecimiento microbiano. Esta técnica es ampliamente usada para estudios con mohos debido a su lento crecimiento (Reyes-Jurado *et al.*, 2017).



Figura 2. Cámara hermética utilizada para evaluar el efecto antifúngico del aceite esencial en tortillas de harina de trigo previamente inoculadas

2.7. Elaboración de las tortillas de harina de trigo

Para realizar aproximadamente 20 tortillas de 14 cm de diámetro se utilizaron 500 g de harina de trigo y 7 g de sal que fueron incorporados a la harina. Enseguida se añadieron 30 g de manteca vegetal que se mezcló perfectamente con la harina y se agregaron 206 ml de agua caliente hasta formar la masa con la que se hicieron pequeñas bolitas que fueron finalmente pre-cocidas en una máquina tortillera eléctrica (Apéndice A) que aplanaba las bolitas para ser puestas posteriormente en un sartén hasta obtener la cocción deseada.

2.8. Efecto del aceite esencial *in vitro*

En agar papa dextrosa se inocularon 5 μ l de suspensión de esporas (1×10^6 esporas/ml). En la tapa de la caja Petri se colocó un trozo de papel filtro Whatman (3 mm) impregnado con las concentraciones, de aceite esencial, deseadas. Se invirtieron las cajas Petri, se sellaron con *Parafilm* y se incubaron a 26°C por 20 días. Durante 16 días de incubación se midió el crecimiento radial del moho con un vernier midiendo ambas direcciones perpendiculares entre sí. De igual manera, se hizo un control del crecimiento para probar que los microorganismos fueran viables. Cada experimento se hizo por triplicado y se realizó una gráfica con el tamaño de la colonia (diámetro mm) y el tiempo (días), hasta que el crecimiento del moho alcanzara el tope del tamaño de la caja Petri. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó como la mínima concentración de aceite que logra inhibir el crecimiento del moho durante 20 días (Reyes-Jurado *et al.*, 2017).

2.9. Actividad antifúngica del aceite esencial aplicado en tortillas de harina de trigo

Para llevar a cabo este experimento se utilizó la técnica de cámara hermética dado que simula las condiciones de almacenamiento del alimento en cuestión. Se usaron 5 μ l de la suspensión de esporas que se inocularon en pedazos de tortilla de aproximadamente 6 cm de diámetro. Dentro de los recipientes de plástico usados (1.7 ℓ , aproximadamente) se colocó un vaso pequeño de plástico en cada extremo para sostener una rejilla en la cual se acomodaron tres muestras de tortilla (Figura 3). Dentro de la cámara se instaló un recipiente de vidrio con la cantidad necesaria de aceite esencial junto con otro recipiente que contenía 1 ml de NaCl 30% para mantener una humedad relativa. Las cámaras herméticas se incubaron a 26°C por 20 días y se registró la CMI de aceite para cada moho. Cada experimento se realizó por triplicado y las CMI se expresaron en μ l/l de aire.

Para encontrar las CMI del aceite esencial se realizaron pruebas *in vitro* usando la técnica de caja Petri invertida. Como medio de cultivo se utilizó agar papa dextrosa que fue vertido en cajas Petri de tamaño (60 x 15 mm), enseguida se inoculó 5 μ l de solución de esporas de los hongos *Penicillium expansum* o *Aspergillus niger* en el agar. En la tapa de la caja Petri se colocó un trozo de papel al que se le agregó la cantidad de aceite. Finalmente, la caja Petri fue cerrada con *Parafilm* para evitar pérdida de vapores y/o entrada de algún contaminante.



Figura 3. Tortillas control y con las concentraciones de aceite esencial de tomillo de 250, 300 o 350 $\mu\text{l}/\ell$ de aire (izquierda a derecha).

2.10. Evaluación sensorial

Para la evaluación sensorial se utilizó una prueba hedónica la cual es un método afectivo que evalúa la preferencia o agrado sobre el color, olor, sabor, calidad en general, entre otras. Esta prueba provee información valiosa sobre la opinión de los jueces sobre el producto donde 1 representa me disgusta muchísimo y 9 representa me gusta muchísimo. En el apéndice B se muestra la hoja de evaluación presentada a los jueces.

La evaluación sensorial se llevó a cabo con el procedimiento presentado por Mani-López *et.al.* (2018) haciéndose algunas modificaciones. La evaluación se aplicó a 30 jueces no entrenados previamente, a los que se les explicó el fundamento de la prueba y cómo llevarla a cabo. A los jueces se les presentaron 2 muestras de tortilla de harina de trigo de aproximadamente 5.5 cm de diámetro (Apéndice C) de las cuales una era el control y la otra fue sometida al vapor del aceite esencial de tomillo en un recipiente hermético durante 48 h. Antes de ser presentadas a los jueces las muestras fueron calentadas en un sartén.

Siguiendo el análisis estadístico descrito por Mani-López *et.al.* (2018), se realizó un ANOVA con la prueba de comparación media de Tukey ($P \leq 0.05$) utilizando el programa Minitab versión 18 para identificar las diferencias significativas entre las muestras.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Contenido de humedad y actividad de agua de las tortillas de harina de trigo

La humedad y la actividad de agua son parámetros de suma importancia en la vida de anaquel de los alimentos, por lo que deben de conocerse para poder predecir la vida de anaquel y el tipo de almacenamiento al que debe ser sometido el alimento. El contenido de humedad de las tortillas de harina de trigo estudiadas en este trabajo fue de $27.60 \pm 0.74\%$ y su actividad de agua de 0.882 ± 0.019 indicando que tienen una textura adecuada.

3.2. Componentes químicos del aceite esencial

Todos los aceites esenciales tienen muchos compuestos químicos que otorgan el poder antimicrobiano característico llegando a tener desde 20 hasta alrededor de 60 compuestos en diferentes concentraciones. Sin embargo, en la mayoría de los casos solamente dos o tres componentes son los que se encuentran en mayor cantidad y son los principales responsables de inhibir el crecimiento microbiano (Reyes-Jurado *et al.*, 2017). Para el presente trabajo se llevó a cabo por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) el análisis del aceite esencial de tomillo utilizado, encontrando un total de 15 compuestos siendo los compuestos con mayor concentración el *p*-cimeno (19.80%), el linalol (14.61%) y el timol

(12.13%). En la Tabla 2 se muestran los compuestos encontrados. Estos resultados difieren un poco con lo reportado por Marqués (2015) quién encontró 13 compuestos de los cuáles el timol (51.34%), *p*-cimeno (35.16%), γ -terpineno (3.5%) y carvacrol (3.5%) fueron los que se registraron en mayor proporción. No obstante, se debe de tener en cuenta que la composición del aceite esencial es variable según la época y lugar de la cosecha (Rosas-Gallo y López-Malo, 2011).

Tabla 2. Compuestos encontrados en el aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) utilizado.

Compuestos detectados	%	TR
<i>p</i> -cimeno	19.8	17.37
Linalol	14.61	20.23
Timol	12.13	27.87
γ -terpineno	9.86	17.81
α -pineno	7.55	10.23
Carvacrol	7.11	29.32
Isoborneol	6.72	24.14
Cariofileno	6.23	30.12
Borneol	3.81	24.3
Camfeno	3.49	11.2
Terpineol	2.4	26.19
β -mirceno	2.15	14.04
α -terpineol	2.81	26.19
β -pineno	0.96	12.97
Óxido de cariofileno	0.37	34.67

*TR: tiempo de retención

3.3. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI)

Las CMIs encontradas en las pruebas *in vitro* se muestran en la Tabla 3 donde se utilizaron tres aceites esenciales para determinar su efectividad contra el crecimiento de mohos los cuales mostraron gran sensibilidad al aceite esencial de mostaza obteniendo una CMI de 12 y 20 $\mu\text{l}/\ell$ de aire; seguido del aceite esencial de tomillo alcanzando una CMI de 160 y 200 $\mu\text{l}/\ell$ de aire; siendo el aceite esencial de orégano el que obtuvo mayores valores de CMI de 260 y 280 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de aire, para los mohos *Penicillium expansum* y *Aspergillus niger*, respectivamente.

Tabla 3. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) obtenidas en pruebas *in vitro* con distintos aceites esenciales en fase vapor

Moho	CMIs de Aceites Esenciales ($\mu\text{l}/\ell$ de aire)		
	Mostaza	Tomillo	Orégano
<i>Penicillium expansum</i>	12	160	260
<i>Aspergillus niger</i>	20	200	280

A partir de los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro* se decidió trabajar con el aceite esencial de tomillo dado que fue el segundo aceite que mostró tener buen efecto antifúngico sin proveer al alimento de un olor tan fuerte y característico como el de mostaza, ya que en pruebas anteriores realizadas con tortillas de maíz resultaba un poco desagradable el olor del aceite.

Para saber que concentraciones de aceite esencial usar en las pruebas *in vivo* se tomaron en cuenta las CMI obtenidas en las pruebas de caja Petri invertida. Con el aceite

esencial de tomillo se obtuvieron concentraciones mínimas inhibitorias de 160 y 200 $\mu\text{l}/\ell$ de aire para *Penicillium expansum* y *Aspergillus niger*, respectivamente.

Las curvas de crecimiento muestran que mientras aumenta la concentración de aceite esencial, más tiempo tardan en crecer los mohos. En las figuras 4 y 5 se puede apreciar que por debajo de las CMI's mencionadas anteriormente, el crecimiento de los mohos alcanza el máximo crecimiento radial (48 mm). Se puede observar que *A. niger* fue el moho más resistente a las concentraciones del aceite al igual que en un estudio realizado por Tequida-Meneses (2002) quienes obtuvieron que de los 14 aceites evaluados todos tuvieron buen efecto antifúngico sobre 6 mohos con excepción de *A. niger*, *A. flavus* y *F. moniliforme* quienes solamente fueron inhibidos por dos aceites siendo los que mostraron más resistencia a los aceites usados en el experimento.

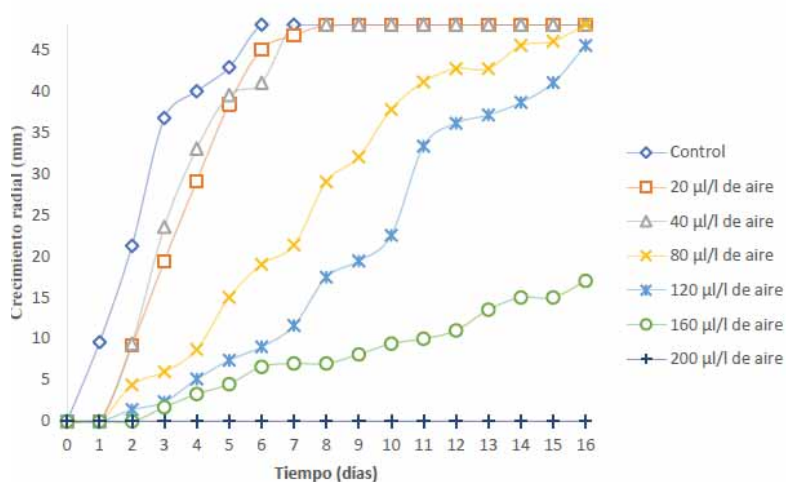


Figura 4. Concentraciones ($\mu\text{l}/\ell$ de aire) de aceite esencial de tomillo en fase vapor para inhibir el crecimiento de *A. niger* usando el método de caja Petri invertida

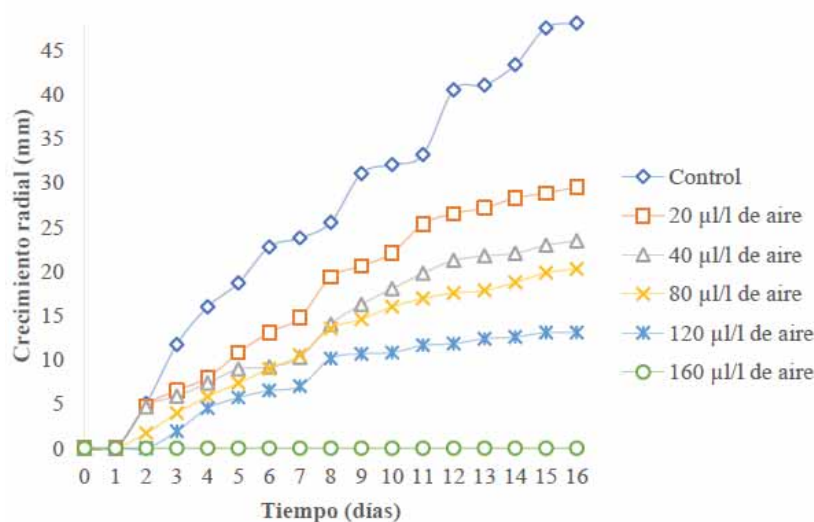


Figura 5. Concentraciones ($\mu\text{l}/\ell$ de aire) de aceite esencial de tomillo en fase vapor para inhibir el crecimiento de *P. expansum* usando el método de caja Petri invertida

Para las pruebas de inhibición del aceite esencial de tomillo en las tortillas de harina de trigo se evaluaron las CMI's encontradas en las pruebas del método de caja Petri invertida para cada moho. Como se observa en las figuras anteriores para *P. expansum* la CMI fue de $160 \mu\text{l}/\ell$ de aire y para *A. niger* fue de $200 \mu\text{l}/\ell$ de aire. Con esto, para las pruebas *in vivo* se decidió usar las concentraciones de 200, 250, 300 o $350 \mu\text{l}/\ell$ de aire para *P. expansum* mientras que para *A. niger* se usaron concentraciones de 250, 300, 350 o $400 \mu\text{l}/\ell$ de aire.

Como era de esperarse desde lo observado en las pruebas *in vitro* el moho más sensible al efecto del aceite esencial fue *P. expansum* ($300 \mu\text{l}/\ell$ de aire) ya que necesitó concentraciones de aceite más pequeñas para no crecer en contraste con *A. niger* ($350 \mu\text{l}/\ell$ de aire), como se puede observar en la Tabla 4.

Tabla 4. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para los dos mohos estudiados en pruebas *in vitro* (Caja Petri) e *in vivo* (Tortilla) con aceite esencial de tomillo en fase vapor

Moho	Caja Petri invertida	Recrecimiento	Tortilla de harina de trigo	Recrecimiento
<i>Penicillium expansum</i>	160 μ l/L	-----	300 μ l/L	-----
<i>Aspergillus niger</i>	200 μ l/L	-----	350 μ l/L	-----

Para asegurar que no hubiera un recrecimiento del moho, las muestras se observaron 10 días más después, evaluando los efectos fungicidas del aceite esencial (Tabla 4). Se pudo demostrar que los mohos fueron altamente sensibles al aceite dado que no hubo recrecimiento en los 10 días posteriores.

3.4. Evaluación sensorial

Los resultados obtenidos de la prueba sensorial (Tabla 5) mostraron que los jueces prefirieron ligeramente el sabor de la muestra de tortilla de harina de trigo con el aceite esencial de tomillo que la muestra sin el aceite, obteniendo un promedio de 7.43 y 7.40 respectivamente. El olor y la aceptabilidad general de la tortilla de harina de trigo sin aceite fue ligeramente mayor con promedios de 7.20 y 7.43, en contraste con las muestras sometidas al vapor del aceite esencial obteniendo un promedio de 7.13 y 7.27, respectivamente. Los resultados de la prueba se muestran en la Tabla 5. Sin embargo, los resultados obtenidos en la prueba de

Tukey para Sabor, Olor y Aceptabilidad general mostraron no tener diferencia significativa ($P \leq 0.05$) para las dos muestras de tortilla de harina de trigo. Puntuaciones a partir del 6 son consideradas aceptables.

Tabla 5. Resultados de evaluación sensorial de tortillas de harina de trigo y aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*)

Concentración de A.E. ($\mu\text{l/L}$ de aire)	Sabor	Olor	Aceptabilidad general
0	7.40 \pm 1.32 A	7.2 \pm 2.12 A	7.43 \pm 1.30 A
300	7.43 \pm 1.56 A	7.13 \pm 1.71 A	7.26 \pm 1.57 A

Valores que comparten la misma letra en una columna no son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$)

Los resultados de sabor obtenidos son favorables al igual que la investigación realizada por Mani-López *et.al.* (2018) quienes observaron que los jueces prefirieron el pan sometido al pan de té-limón por el buen sabor que les impartió. Los comentarios acerca de las tortillas de harina de trigo sometidas al vapor del aceite esencial de tomillo son variables dado que hubo algunas (pocas) personas que no disfrutaron del sabor; sin embargo, hubo comentarios positivos argumentando que a pesar de que el olor no era tan agradable, el sabor sí. Inclusive algunos jueces recomendaban presentar y comer la tortilla con carne árabe para realzar su sabor, asegurando que comprarían el producto para este fin.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De manera *in vitro* el aceite esencial de tomillo tuvo una inhibición exitosa a partir de 160 $\mu\text{l}/\ell$ de aire para *Penicillium expansum* y 200 $\mu\text{l}/\ell$ de aire para *Aspergillus niger*. Para las pruebas *in vivo* se obtuvieron rangos de entre 300 y 350 $\mu\text{l}/\ell$ de aire para *Penicillium expansum* y entre 350 y 400 $\mu\text{l}/\ell$ de aire para *Aspergillus niger* en las tortillas de harina de trigo almacenadas a 26°C por 20 días.

Los resultados obtenidos mostraron que los aceites esenciales evaluados, en especial el de tomillo (*Thymus vulgaris*) es efectivo para inhibir el crecimiento de los mohos representativos en tortillas de harina de trigo por más de 20 días, demostrando que los aceites esenciales pueden usarse como antimicrobianos naturales. De igual forma, los resultados con respecto a los comentarios de la mayoría de los jueces fueron positivos demostrando que el aceite esencial de tomillo en fase vapor otorgó un sabor agradable a las muestras de tortilla de harina de trigo.

A pesar de que no hubo mucho rechazo de sabor hacia las tortillas podría evaluarse la posibilidad de utilizar aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia berlandieri*) para evaluar si se obtienen resultados sensoriales con mayor diferencia significativa entre las muestras como también mayor agrado del consumidor o evaluar algún aceite esencial como de nuez para analizar la posibilidad de obtener un producto dulce que se pueda acompañar con cajeta, lechera u otro alimento.

También se sugiere hacer una modelación de los resultados obtenidos en las Figuras 4 y 5 con el modelo de Gompertz modificado.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de las Américas Puebla por brindarme el espacio y recursos para hacer las investigaciones necesarias y por otorgarme una beca académica que me permitió realizar mis estudios universitarios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme una beca de Ayudante de Investigador que me permitió hacer proyectos de investigación con el Dr. Aurelio López Malo.

Al Dr. Aurelio López Malo por su apoyo, asesoría, conocimientos transmitidos y sobre todo por la confianza que deposito en mi persona y trabajo. De igual manera, por permitirme trabajar con él en un proyecto conjunto con el CONACYT en el que adquirí nuevos conocimientos.

Al Dr. Enrique Palou García por su apoyo, conocimientos y guía durante la elaboración del presente trabajo.

A la Dra. Fatima Reyes Jurado por transmitirme sus conocimientos, apoyo, confianza y sobre todo por su colaboración en este proyecto.

A mis profesores que durante mis estudios universitarios me apoyaron, orientaron, brindaron conocimiento y sobre todo impulsaron a ser mejor persona, a no tener límites y a dar siempre lo mejor de mí.

A mis papás, mi hermano y mis amigos por siempre darme ánimos en seguir adelante, apoyarme y por brindarme su confianza.

REFERENCIAS

Chorruca, A. *Archivo parroquial de santa maría de las parras documento de 1645-1775*. Jun 3 de 1645.

Cadena, G. (2011). Ingeniería y Agro. *Revista de Ingeniería*, 33(1), pp. 70-87

Corona, S. (2008). El mestizaje gastronómico: Las tortillas. *Centro de Investigaciones Históricas de la UIA Laguna*, 115(1), pp. 2-3

Curtis, B.C., Rajaram, S., y Gómez, H. (2002). Bread Wheat: Improvement and Production. Roma, Italia: FAO

Edris, A., y Farrag, E. (2003). Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase. *Molecular Nutrition and Food Research*, 47(2), pp. 117-121 doi: 10.1002/food.200390021

Gómez-Sánchez, A., Palou, E., y López-Malo, A. (2011). Antifungal Activity Evaluation of Mexican Oregano (*Lippia berlandieri Schauer*) Essential Oil on the Growth of *Aspergillus flavus* by Gaseous Contact. *Journal of Food Protection*, 74(12), pp. 2192-2198. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-308

Gonzalez, G. (1938). *El trigo en México*. Ciudad de México, México: Banco Nacional de Crédito Agrícola

Inglott, G. (1974). *Wheat: Production and utilization*. Connecticut, United States of America: The Avi Publishing Company, Inc

- Jobling, J. (2000). Essential Oils: A new idea for postharvest disease control. *Good Fruit and Vegetables magazine*, 11(3) pp. 50-52
- Mani-López, E., Valle-Vargas, G., Palou, E., y López-Malo, A. (2018). Penicillium expansum Inhibition on Bread by Lemongrass Essential Oil in Vapor Phase. *Journal of Food Protection*, 81(3), pp. 467-471. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-17-315
- Marqués, M. (2015). Composición química de los aceites esenciales de Lavanda y Tomillo. Determinación de la actividad antifúngica (Tesis de Licenciatura, Universitat Politècnica de València, Valencia, España).
- Monroy, P. (2004). Introducción a la gastronomía. Ciudad de México, México: LIMUSA
- Pérez, A., Palacios, B., y Castro, A. (2008). *Sistema Mexicano de Alimentos Equivalentes* (3ra ed.). Ciudad de México, México: FNS
- Reyes-Jurado, F., Bach, H., López-Malo, A., y Palou, E. (2017). Actividad Antimicrobiana De La Fase Gaseosa De Los Aceites Esenciales De Orégano Mexicano (*Lippia berlandieri Schauer*), Tomillo (*Thymus vulgaris*) y Mostaza (*Brassica nigra*) (Tesis de doctorado, Universidad de las Américas Puebla, Puebla, México).
- Rosado, J., Camacho-Solís, R., y Bourges, H. (1999). Adición de vitaminas y minerales a harinas de maíz y de trigo en México. *Salud Pública de México*, 41(2), pp. 130-137.
- Rosas-Gallo, A., y López-Malo, A. (2011). Actividad antimicrobiana de aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*). *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 5(1), pp. 41-50.

SAGARPA. (2017). Planeación agrícola nacional 2017-2030: Trigo grano cristalino y harinero mexicano. Ciudad de México, México: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

SAGARPA. (2017, Abril 28). Se incrementa producción de trigo “Hecho en México” 14.6 en 2016. *Gobierno de México*, 163(1).

Saráuz, J. y Tirira, F. (2011). Diseño y construcción de una máquina para la elaboración de tortillas de harina de trigo para la empresa Taquito's (Tesis de grado, Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador). Recuperado de <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/4008/3/CD-3771.pdf>

Tequida-Meneses, M., Cortez-Rocha, M., Rosas-Burgos, E., López-Sandoval, S., y Corrales-Maldonado, C. (2002). Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 19(1), pp. 84-88

Torres, G., y Morales, M. (1997). Maíz-tortilla. Políticas y alternativas. Ciudad de México, México: UNAM

ANEXOS

Apéndice A: Tortilladora eléctrica (Máquinas Tortilladoras González S.A.)



Apéndice B: Hoja de evaluación sensorial presentada a los jueces para la evaluación del producto

Nombre: _____ Fecha: _____

Producto: tortillas de harina de trigo

Instrucciones: se le están proporcionando dos muestras tortillas de harina de trigo, de las cuales, una está sometida al vapor de aceite esencial de tomillo y la otra no. Favor de indicar el grado de gusto o disgusto por cada una de las muestras.

	Muestra		
	Sabor	Olor	Aceptabilidad general
Me gusta muchísimo			
Me gusta mucho			
Me gusta moderadamente			
Me gusta ligeramente			
No me gusta ni me disgusta			
Me disgusta ligeramente			
Me disgusta moderadamente			
Me disgusta mucho			
Me disgusta muchísimo			

Puede tomar agua y/o tomar una paleta

Gracias

Apéndice C: Prueba sensorial de muestras de tortilla de harina de trigo presentadas a los jueces

