

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD QUÍMICA

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO
DE LA REPÚBLICA (PROPAC)

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**DISEÑO DE UN RECUBRIMIENTO ACTIVO COMESTIBLE USANDO CERA DE
ABEJA Y MEZCLA DE PROTEÍNA DE QUINUA-QUITOSANO ENTRECruzADA CON
TRANSGLUTAMINASA Y SU APLICACIÓN EN TUNA (*Opuntia ficus-indica*).**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

I.A. Maaya Tonantzin Oliver Cadena

Dirigido por:

Dr. Carlos Regalado González

Co dirigido por

Próspero Di Pierro



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD QUÍMICA

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**DISEÑO DE UN RECUBRIMIENTO ACTIVO COMESTIBLE USANDO CERA DE ABEJA
Y MEZCLA DE PROTEÍNA DE QUINUA-QUITOSANO ENTRECruzADA CON
TRANSGLUTAMINASA Y SU APLICACIÓN EN TUNA (*Opuntia ficus-indica*).**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

I.A. Maaya Tonantzin Oliver Cadena

Dirigido por:

Dr. Carlos Regalado González

Co-Dirigido por:

Dr. Próspero Di Pierro

Dr. Carlos Regalado González
Presidente


Firma

Dr. Próspero Di Pierro
Secretario

Rúbrica

Firma

Dra. Blanca E. García Almendárez
Vocal


Firma

Dra. Monserrat Escamilla García
Suplente


Firma

Dra. Teresita Arredondo Ochoa
Suplente


Firma


Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Directora de la Facultad de Química


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

RESUMEN

En México, una de las frutas más producidas y que genera grandes ingresos económicos es la tuna. Es un alimento nutritivo que se comercializa en fresco. Para garantizar la calidad de alimentos en fresco, han surgido diversas tecnologías entre las que destacan los recubrimientos activos comestibles. El objetivo de este trabajo fue diseñar y caracterizar un recubrimiento activo usando una mezcla de quitosano (Q) y proteína de quinua (QP) (1:5 y 1:10 Q:QP) entrecruzada con transglutaminasa (TG), adicionada con cera de abeja (BW) (0, 0.1 y 0.2 % p/v) y aceite esencial de limón (AEL) y evaluar su aplicación en tuna mínimamente procesada. Se realizó un diseño factorial completo 3x2x2, donde las películas comestibles (PC) obtenidas se caracterizaron fisicoquímicamente. Se determinó la actividad antimicrobiana y la concentración inhibitoria (CI) del AEL. El mejor potencial zeta (ζ) ($<|30|$ mV) lo obtuvieron las suspensiones filmogénicas (SF) con una relación 1:5, el tratamiento que con el menor tamaño de partícula e índice de polidispersión fue la película 1:5 sin TG y con 0.2 % de BW. El grosor de las PC se encuentra en el rango de 100-120 μm . Las PC son de color amarillento, teniendo significativamente menor luminosidad ($\alpha > 0.05$) aquellas con BW añadida. Se realizó un gel de electroforesis desnaturizante para observar el porcentaje de entrecruzamiento de la TG. Las PC mostraron un menor porcentaje de entrecruzamiento (8.5 %) con respecto a la QP (27 %). La fuerza de tensión aumentó con la TG y disminuyó con la adición de BW. La permeabilidad al vapor de agua fue menor en comparación con otros recubrimientos comerciales. La actividad antimicrobiana y CI del AEL contra *Saccharomyces cerevisiae*, *Micrococcus luteus* y *Leuconostoc mesenteroides* fue 5 $\mu\text{L/mL}$ para todos los microorganismos. Las micrografías muestran películas homogéneas y sin poros. En las tunas mínimamente procesadas el recubrimiento disminuyó la pérdida de peso y el cambio de color y retardó el crecimiento de bacterias y levaduras. En conclusión, el recubrimiento a base de una mezcla de proteína de quinua, cera de abeja y aceite esencial de limón puede ser una buena alternativa para el mantenimiento de la calidad de la tuna mínimamente procesada durante un periodo de almacenamiento de 9 días.

Palabras clave: Recubrimiento comestible, proteína de quinua, quitosano, cera de abeja, transglutaminasa, tuna (*Opuntia ficus-indica*).

ABSTRACT

In Mexico, one of the most produced fruits and that generates large economic income is the tuna. It is a nutritious food that is marketed fresh. In order to guarantee the quality of fresh foods, various technologies have emerged, among which active edible coatings stand out. The objective of this work was to design and characterize an active coating using a mixture of chitosan (Q) and quinoa protein (QP) (1:5 and 1:10 CH QP) cross-linked with transglutaminase (TG) and added with beeswax (BW) (0, 0.1 and 0.2% w/v) and lemon essential oil (AEL) and evaluate its application in minimally processed tuna. A complete 3x2x2 factorial design was carried out, where the edible films (PC) obtained were characterized physicochemically. The antimicrobial activity and inhibitory concentration (IC) of the AEL were determined. The best potential ζ ($< |30|$ mV) was obtained by the filmogenic suspensions (SF) with a ratio of 1: 5, the treatment. The thickness of the PCs is in the range of 100-120 μm . The PCs are yellowish, having significantly lower luminosity ($\alpha > 0.05$) than those with BW added. An SDS-PAGE gel was made to observe crosslinking percentage of crosslinking of the TG. CP showed a lower percentage of crosslinking (8.5%) with respect to the protein (27%). The tensile strength increased with TG and decreased with the addition of beeswax. The water permeability was lower compared to commercial coatings. The antimicrobial and CI activity of the AEL against *Saccharomyces cerevisiae*, *Micrococcus luteus* and *Leuconostoc mesenteroides* was 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ for all microorganisms. The micrographs show homogenous films without pores. In minimally processed prickly pears the coating decreased the weight loss and color change and delayed the growth of bacteria and yeasts. In conclusion, the coating based on a mixture of quinoa protein, beeswax and lemon essential oil can be a good alternative for maintaining the quality of the minimally processed tuna during a storage period.

Key words: Edible coating, quinoa protein, chitosan, beeswax, transglutaminase, prickly pear (*Opuntia ficus-indica*).

*No debo buscar mi dignidad en el espacio,
sino en el gobierno de mi pensamiento.
No tendré más aunque posea muchos mundos.
Si fuera por el espacio, el universo me rodearía
y me tragaría como un átomo;
pero por el pensamiento yo abrazo al mundo.*

Blaise Pascal

DEDICATORIA

A mi familia, sin ustedes nada.

AGRADECIMIENTOS

A México, que a través de CONACYT me otorgó una beca para realizar mis estudios de Maestría.

A AMEXCID que por medio del convenio México-Italia me becó para realizar una estancia en Italia.

Al Dr. Carlos Regalado, por aceptarme en su grupo de trabajo, guiarme y compartir conmigo sus conocimientos para poder culminar con éxito este proyecto.

Al Dr. Prospero Di Pierro, por su aceptación para realizar la estancia en la Universidad de Nápoles, Italia, por su calidez humana, guía y valiosas enseñanzas para la realización de este proyecto.

A la Dra. Blanca García, la Dra. Monserrat Escamilla y la Dra. Teresita Arredondo Ochoa por sus enseñanzas diarias, por compartir conmigo sus conocimientos y experiencia que fortalecieron este trabajo.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, al Programa de Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química, a los doctores y personal administrativo, por el apoyo y facilidades otorgadas.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de Biotecnología de la UAQ y del posgrado, sin ustedes la experiencia de realizar una maestría no hubiese sido la misma. Un placer compartir con ustedes el día a día.

A mis amigos y al personal del Grupo de Biotecnología, Bioquímica y Enzimología de la Universidad de Nápoles, por recibirme en su grupo de trabajo, brindarme su amistad y compartir su experiencia y sus conocimientos.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	página
RESUMEN	ii
ABSTRACT	iv
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
ÍNDICE GENERAL	viii
ÍNDICE DE CUADROS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Alimentos mínimamente procesados	3
2.2 Películas y recubrimientos comestibles	3
2.2.1 Propiedades funcionales	4
2.2.2 Composición	6
2.2.3 Quitosano	8
2.2.3.1 Obtención del quitosano	8
2.2.3.2 Utilización de quitosano en la formación de películas comestibles	9
2.2.4 Proteína de quínoa	9
2.2.4.1 Proteína de quina en recubrimientos comestibles	10
2.2.5 Transglutaminasa	11
2.2.5.1 Transglutaminasa en películas comestibles	12
2.2.6 Cera de abeja	12
2.2.6.1 Cera de abeja en recubrimientos comestibles	13
2.2.7 Aceites esenciales	14
2.3 Tuna (<i>Opuntia ficus-indica</i>)	14
2.3.1 Distribución y producción	14
2.3.2 Taxonomía y características morfológicas	15
2.3.3 Composición química	16
	viii

3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVOS	19
4.1 Objetivo General	19
4.2 Objetivos Particulares	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS	20
5.1 Materiales	20
5.1.1 Reactivos	20
5.1.2 Medios de cultivo	20
5.1.3 Tunas	20
5.2 Métodos	20
5.2.1 Diseño experimental	20
5.2.2 Extracción de proteína de quinua	21
5.2.3 Preparación de la suspensiones filmogénicas	22
5.2.4 Determinación de las propiedades fisicoquímicas, de barrera, mecánicas, estructurales y antimicrobianas de las películas comestibles	22
5.2.4.1 Potencial ζ y tamaño de partícula	22
5.2.4.2 Espesor/ Grosor	23
5.2.4.3 Color y Opacidad	23
5.2.4.4 Propiedades mecánicas	23
5.2.4.5 Permeabilidad a gases	24
5.2.4.6 Análisis de la actividad enzimática de la enzima transglutaminasa	24
5.2.4.7 Determinación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de limón	25
5.2.4.8 Determinación de la concentración inhibitoria del aceite esencial de limón	25
5.2.4.9 Actividad antimicrobiana de las películas comestibles	26
5.2.5 Determinación de propiedades fisicoquímicas de las PC y/o RC con AEL	26
5.2.5.1 Mojabilidad y ángulo de contacto	26

5.2.5.2 Microestructura	27
5.2.6 Aplicación del recubrimiento comestible	27
5.2.6.1 Pérdida de peso	28
5.2.6.2 Color	28
5.2.6.3 pH	29
5.2.6.4 Acidez total	29
5.2.6.5 Ácido ascórbico	29
5.2.6.6 Sólidos solubles totales	30
5.2.6.7 Actividad antimicrobiana del fruto con el recubrimiento comestible	30
5.2.7 Análisis estadístico	30
6 RESULTADOS	32
6.1 Extracción y caracterización de los biopolímeros formadores PC y/o RC	32
6.1.1 Extracción de proteína de quinua	32
6.1.2 Potencial ζ y tamaño de partícula de QP y Q	32
6.2 Formación de películas comestibles	35
6.3 Propiedades fisicoquímicas y estructurales de las películas comestibles	35
6.3.1 Potencial ζ , tamaño de partícula e índice de polidispersión de las suspensiones filmogénicas	35
6.3.2 Espesor	37
6.3.3 Opacidad	38
6.3.4 Color	38
6.3.5 Actividad enzimática de la enzima transglutaminasa (SDS-page)	40
6.3.6 Propiedades mecánicas de las películas comestibles	41
6.3.7 Propiedades de barrera	42
6.3.8 Actividad antimicrobiana del aceite esencial de limón	44
6.3.9 Concentración inhibitoria del aceite esencial de limón (AEL)	45
6.3.10 Actividad antimicrobiana de las películas comestibles	46
6.4 Propiedades fisicoquímicas de las películas y recubrimientos comestibles con AEL	47
6.4.1 Angulo de contacto y mojabilidad	47

6.4.2 Microscopía electrónica de barrido	49
6.5 Aplicación del recubrimiento	50
6.5.1 Pérdida de Peso	52
6.5.2 Color	53
6.5.3 pH	56
6.5.4 Acidez total y sólidos solubles totales	56
6.5.5 Ácido ascórbico	57
6.5.6 Análisis microbiológicos	58
7. CONCLUSIONES	62
8. ANEXOS	63
9.REFERENCIAS	67

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Recubrimientos y/o películas comestibles	4
2. Materiales usados para la elaboración de películas y recubrimientos comestibles	7
3. Composición de aminoácidos de aislado de PQ	10
4. Taxonomía de la tuna	16
5. Composición nutrimental de la tuna	17
6. Diseño experimental para el diseño de las películas comestibles	21
7. Diseño experimental de las suspensiones filmogénicas	21
8. Potencial ζ , tamaño de partícula e índice de polidispersión de las suspensiones filmogénicas	36
9. Parámetros de color L^* , a^* y b^* de las películas comestibles.	40
10. Propiedades mecánicas de las películas comestibles	42
11. Determinación de permeabilidad al CO_2 , O_2 y vapor de agua, de las películas comestibles	43
12. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de limón	44
13. Concentración inhibitoria del AEL	45
14. . Diámetro de la zona de inhibición de las películas activas comestibles de Q-PQ, BW Y AEL	46
15. . Tensión superficial y ángulo de contacto de las suspensiones filmogénicas	48
16. Fuerzas adhesivas, fuerzas cohesivas y coeficiente de mojabilidad de las suspensiones filmogénicas.	49
17. Acidez total y sólidos solubles de las tunas mínimamente procesadas	57
18. Contenido de ácido ascórbico en tunas mínimamente procesadas	58
19. Propiedades microbiológicas de las tunas mínimamente procesadas.	59

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
1. Funciones de las películas y recubrimientos comestibles	5
2. Estructura química del quitosano completamente desacetilado	8
3. Reacciones catalizadas por transglutaminasa a) Acil transferencia	
4. b) Entrecruzamiento de residuos de glutamina y lisina. c) Desaminación	11
5. Termograma de la cera de abeja. Proceso de cristalización (línea continua), proceso de fusión (línea punteada)	13
6. Aplicación del recubrimiento sobre tunas (<i>Opuntia ficus-indica</i>).	28
7. Electroforesis desnaturante (SDS-PAGE) del extracto de proteína de quinua	32
8. Potencial y tamaño de partícula de A) Quitosano y B) Proteína de quinua.	33
9. A) Potencial ζ y tamaño de partícula de suspensión filmogénica. B) Películas comestibles elaboradas a pH3 y pH 4	34
10. Películas comestibles obtenidas del diseño experimental para las suspensiones filmogénicas.	35
11. Espesor de las películas comestibles.	37
12. Opacidad de las películas comestibles.	38
13. Escala CIE lab. Parámetros *L, a*, b*(Konica Minolta, 2017).	39
14. Color de las películas comestibles	39
15. SDS PAGE de proteína de quinua y suspensiones filmogénicas adicionada con transglutaminasa	41
16. Actividad antimicrobiana del AEL. 1) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2) <i>Micrococcus luteus</i> 3) <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	44
17. Actividad antimicrobiana de las películas comestibles con cera añadida	46
18. Suspensión filmogénica sobre la superficie de un alimento	47
19. Microscopía electrónica de barrido	50
20. Evaluación de la aplicación del recubrimiento en tunas mínimamente procesadas	51
21. Porcentaje de pérdida de peso en tunas (<i>Opuntia ficus-indica</i>).	52
22. Parámetros de color. A) Luminosidad, B) Cambio de color (ΔE), C) Hue.	55
23. pH de tunas mínimamente procesadas	56

24. Cuenta total de A) mesófilos aerobios, B) levaduras y C) mohos de tunas mínimamente procesadas.

61

1. INTRODUCCIÓN

El término “mínimamente procesado” se utiliza para designar a alimentos que se han sometido a algún proceso que permita obtener un producto fresco, inocuo, con características sensoriales aceptables y de fácil consumo. Sin embargo, las operaciones de procesamiento mínimo (OPM) alteran la integridad de los alimentos, produciendo efectos negativos sobre la calidad de los mismos. En las frutas y hortalizas, las OPM generan estrés fisiológico en los tejidos afectando la calidad y reduciendo la vida de anaquel de los productos (Ghidelli y Pérez-Gago, 2016).

Se pueden implementar diversas estrategias con el objetivo de reducir la tasa de deterioro de los productos frescos. Tales estrategias incluyen las bajas temperaturas y la aplicación de tratamientos físicos y químicos. Otras tecnologías como las películas y recubrimientos comestibles han ganado gran interés como una posibilidad de extender la vida útil de las frutas y hortalizas mínimamente procesadas (Allende *et al.*, 2006). Estos empaques comestibles son una barrera selectiva a los gases (O_2 , CO_2 , C_2H_4), disminuyen la pérdida de agua, reducen los procesos oxidativos (pardeamiento enzimático), inhiben o disminuyen el deterioro microbiano y mejoran la resistencia mecánica del alimento. Además, las películas y recubrimientos comestibles pueden incorporar en la matriz polimérica aditivos como antimicrobianos, antioxidantes, reafirmantes de textura, nutrientes o ingredientes bioactivos, con el objetivo de incrementar la seguridad y las características sensoriales, nutricionales y funcionales de los alimentos mínimamente procesados (De Ancos *et al.*, 2015).

Los recubrimientos o revestimientos comestibles han sido aplicados en una gran diversidad de alimentos elevando la calidad de los mismos y prolongando su vida útil. Se ha reportado su uso en frutas y verduras altamente perecederas como fresas, guayabas, mangos, papaya, aguacates, jitomates, chiles, pepinos, etc. En productos de origen animal se han utilizado para recubrir o proteger salchichas, quesos, carne, pescado entre otros.

En México, una de las frutas más producidas y que genera grandes ingresos económicos es la tuna, al año se producen 408,445.05 toneladas de

tuna a lo largo de la República Mexicana, siendo los principales estados productores: Puebla, Estado de México, Hidalgo, San Luis Potosí y Zacatecas (SAGARPA, 2015). La tuna es un producto que se ha valorado más en años recientes debido a que su composición y características nutrimentales pueden ser benéficas para la salud. Los principales componentes de este fruto son agua (85-90 %), azúcares (11 %) y fibra cruda (1.8 %). La tuna también es rica en vitamina A, vitamina C, calcio y magnesio (Cantwell, 1995). Debido a factores como el elevado contenido de agua y azúcares, es un alimento muy susceptible a sufrir deterioro durante y después de su cosecha. Es por este motivo que en este trabajo se formulará un recubrimiento comestible que permita alargar la vida de anaquel de la tuna sin cáscara, conservando sus características fisicoquímicas, sensoriales y propiedades nutrimentales por un tiempo más prolongado, permitiendo así comercializar este producto como un alimento listo para consumo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Alimentos mínimamente procesados

El objetivo de los alimentos mínimamente procesados es proveer al consumidor un producto similar al fresco, con una vida útil prolongada y al mismo tiempo garantizar la inocuidad de los mismos, manteniendo una sólida calidad nutritiva y sensorial (Andrade *et al.*, 2016).

El procesamiento mínimo de alimentos incluye principalmente las operaciones de selección, lavado, pelado, rebanado, rayado y cortado (Baldwin *et al.*, 1995). Se ha demostrado que estas operaciones unitarias producen efectos no deseados en la calidad del producto, tales como el pardeamiento enzimático, el desarrollo de sabores desagradables, ablandamiento y aumento de la respiración (Ghidelli y Pérez-Gago, 2016). Dichos efectos negativos se producen debido a que con este procesamiento se generan deterioros fisiológicos a los tejidos, las células son severamente dañadas y los productos intracelulares tales como enzimas oxidativas son liberados acelerando así el decaimiento del producto. Adicionalmente, las superficies cortadas de cualquier vegetal procesado son más susceptibles al deterioro microbiano. De hecho, cada paso en el procesamiento afecta la calidad de los productos frescos procesados (Allende *et al.*, 2006).

Si se considera que los consumidores suelen juzgar la calidad del producto en función de su apariencia y frescura en el momento de la compra, es de suma importancia desarrollar tecnologías que permitan mantener las características sensoriales, nutrimentales y microbiológicas de los alimentos mínimamente procesados. Una de las alternativas que está teniendo más éxito es el uso de empaques comestibles.

2.2 Películas y recubrimientos comestibles

Los empaques comestibles son materiales de envoltura delgados que se emplean para extender la vida de anaquel de los productos alimenticios. Pueden ser consumidos como parte del mismo alimento debido a que provienen de polímeros biodegradables, no tóxicos y que son seguros para la salud humana (Embuscado y Huber, 2009).

Un recubrimiento comestible (RC) se puede definir como una matriz transparente continua y delgada, que se distribuye alrededor de un alimento con la finalidad de preservar su calidad. Por otra parte, una película comestible (PC) es una matriz preformada, obtenida por moldeo, cuyo espesor es siempre mayor al de los recubrimientos comestibles y que posteriormente será utilizada en forma de envoltura del alimento o estará ubicada entre los componentes del mismo (Del-Valle *et al.*, 2005).

2.2.1 Propiedades funcionales

En el área de alimentos, las PC y RC comestibles funcionan como barreras selectivas para la transferencia de gases, humedad y nutrientes; son utilizadas porque disminuyen el deterioro de productos alimenticios causado por factores ambientales. De igual forma se busca que eviten o disminuyan la oxidación y pérdida de compuestos volátiles responsables de sabores y propiedades específicas de los alimentos. Las PC y RC pueden ser usados como acarreadores de nutrientes, sabores, antimicrobianos y antioxidantes (Espino-Díaz *et al.*, 2010). En el Cuadro 1 se muestran diversas aplicaciones de las PC y RC y sus propiedades funcionales.

Cuadro 1. Recubrimientos y/o películas comestibles

Alimento	Película y /o recubrimiento	Propiedades funcionales	
Arándano	Proteína de quinua, quitosano y aceite de girasol	Antimicrobiana Retraso de la maduración	(Abugoch <i>et al.</i> , 2016)
Fresa	Quitosano-cera	Disminuye senescencia del fruto Antifúngica Reduce pérdida de agua Disminuye tasa de respiración	(Velickova <i>et al.</i> , 2013)
Aguacate	Extracto de hojas de moringa, quitosano y carboximetilcelulosa	Disminuye de tasa de respiración Proporciona firmeza Disminuye pérdida de agua Disminuye senescencia del fruto	(Tesfay y Magwaza, 2017)
Queso Port Salut	Almidón, nisina, natamicina	Antimicrobiana Antifúngica	(Ollé Resa <i>et al.</i> , 2016)
Pollo	Carboximetilcelulosa, alcohol polivinílico, aceite de ajo.	Buenas propiedades mecánicas y de barrera Antimicrobiana	(Muppalla <i>et al.</i> , 2014)

La calidad de la mayoría de los productos alimenticios se deteriora a través de fenómenos de transferencia de masa, incluyendo la absorción de humedad, permeabilidad al oxígeno, pérdida de sabor, absorción indeseable de olor y la migración de componentes del empaque al alimento. Estos fenómenos pueden ocurrir entre los alimentos y el ambiente atmosférico, los alimentos y los materiales de envasado, o entre los ingredientes heterogéneos en el propio producto alimenticio.

La transferencia de vapor de agua depende fuertemente de la temperatura, de la humedad relativa predominante en cualquier lado de la barrera interpuesta y de la capacidad de hidratación de dicha barrera.

La Figura 1 presenta la transferencia de los diferentes componentes que puede ser controlada mediante barreras comestibles. Las propiedades de barrera al oxígeno de las películas y los recubrimientos (que pueden ser multicapas) pueden prevenir la oxidación de ingredientes lipídicos, colorantes y sabores. El crecimiento de microorganismos en la superficie de productos alimenticios se puede contrarrestar usando compuestos antimicrobianos en los PC y RC (Hun y Gennadios, 2005).

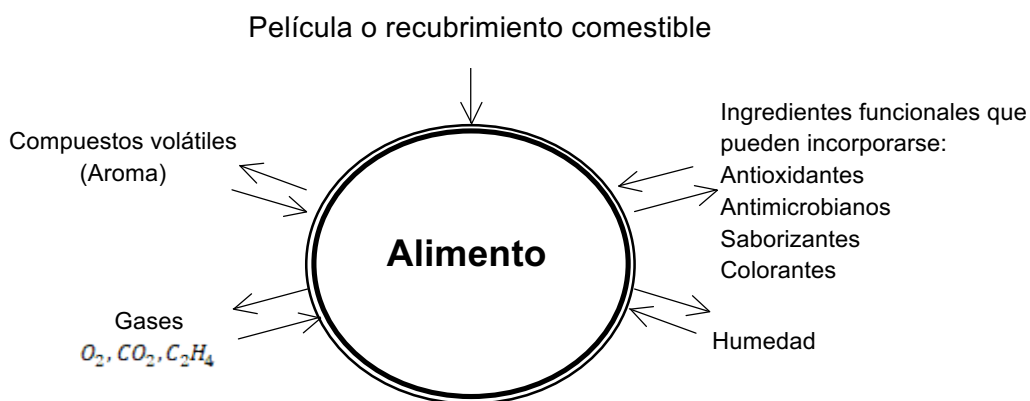


Figura 1. Funciones de las películas y recubrimientos comestibles(Hun y Gennadios, 2005).

Las PC Y RC protegen a alimenticios de los daños físicos causados por impacto mecánico, presión, vibraciones entre otros. Las películas deben ser resistentes a la rotura y abrasión y además deben ser flexibles para adaptarse a la

posible deformación del alimento a recubrir. Las propiedades mecánicas de las PC Y RC dependen del tipo de biopolímero formador y especialmente de su cohesión estructural. Dichas propiedades mecánicas están también relacionadas con las condiciones de formación de película, por ejemplo, tipo de proceso y disolvente, velocidad de enfriamiento o evaporación, y la técnica de recubrimiento (pulverización, barnizado o inmersión) (Guilbert *et al.*, 1996).

2.2.2 Composición

La formulación de cada PC o RC está basada en la aplicación para la que se requiere, la cual determina su funcionalidad, las propiedades mecánicas y de barrera. Se han investigado diversos materiales tanto de forma individual o en sistemas con más de un compuesto, para su utilización en la elaboración de dichos empaques comestibles (Domínguez y Jiménez, 2012).

Los biopolímeros formadores de películas y recubrimientos pueden ser proteínas, polisacáridos (carbohidratos e hidrocoloides) o lípidos. Como regla general, los lípidos son usados para reducir la transferencia de agua, los polisacáridos se usan en el control de la transmisión de oxígeno y otros gases, mientras que las proteínas proveen estabilidad mecánica al empaque comestible (Embuscado y Huber, 2009). Plastificantes y otros aditivos se combinan con los biopolímeros formadores de película para modificar las propiedades físicas o la funcionalidad de las películas o recubrimientos. De igual manera, se pueden añadir compuestos bioactivos con el objetivo de incrementar la calidad del producto, entre los que se encuentran antimicrobianos, antioxidantes, mejoradores de textura, nutrientes, entre otros (Hun y Gennadios, 2005). En el Cuadro 2 se mencionan algunos de los materiales que se han utilizado en la elaboración PC y RC.

La materia prima utilizada para la formación de los empaques comestibles se obtiene de fuentes naturales, principalmente de origen vegetal y animal. Los materiales más utilizados incluyen celulosa y sus derivados, almidón de diversas fuentes, gomas, carrageninas, alginatos, proteínas y lípidos (Guilbert *et al.*, 1996). Por otra parte se busca que la materia prima provenga de una fuente renovable,

abundante y económica, para que el uso industrial sea factible (Domínguez y Jiménez, 2012).

Cuadro 2. Materiales usados para la elaboración de películas y recubrimientos comestibles (Hun y Gennadios, 2005).

Componentes funcionales	Materiales
Biopolímeros formadores de película	<p>Proteínas: colágeno, gelatina, caseína, proteína de suero, cebada de maíz, gluten de trigo, proteína de soya, proteína de salvado de arroz, proteína de semilla de algodón, queratina.</p> <p>Polisacáridos: almidón, almidón modificado, celulosa modificada, alginato, carragenina, pectina, pululano, quitosano, goma gelana, goma xantana.</p> <p>Lípidos: ceras (abeja, parafina, carnauba, candelilla, cascarilla de arroz) resinas (shellac, terpeno), acetoglicéridos</p>
Plastificantes	Glicerina, propilenglicol, sorbitol, sacarosa, polietilenglicol, jarabe de maíz, agua
Aditivos funcionales	Antioxidantes, antimicrobianos, nutrimentos, nutracéuticos, colorantes y saborizantes.
Otros aditivos	Emulsificantes (lecitina, detergentes no iónicos como polisorbatos y ésteres de sorbitán), emulsiones, lípidos (ceras, ácidos grasos).

Los mecanismos formadores de PC y RC incluyen fuerzas intermoleculares tales como enlaces covalentes y/o interacciones electrostáticas, hidrófobas o iónicas:

Coacervación simple: Cuando un hidocoloide disperso en agua es precipitado o sufre un cambio de fase después de la evaporación del disolvente; o bien después de la adición de un no-electrolito hidrosoluble en el cual el hidocoloide es insoluble, o cuando se ajusta el pH después de la adición de un electrolito utilizado para inducir precipitación o el entrecruzamiento.

Coacervación compleja: Donde se mezclan dos soluciones de hidrocoloides con carga eléctrica opuesta, provocando así la interacción y precipitación del complejo polimérico.

Gelatinización o coagulación térmica: Cuando el calentamiento de la macromolécula, el cual conduce a su desnaturalización, es seguido por la gelatinización o precipitación. Incluso el enfriamiento de una dispersión hidrocoloidal causa gelatinización (Guilbert *et al.*, 1996).

2.2.3 Quitosano

El quitosano (Q) es un polímero biodegradable derivado de fuentes naturales y con aplicaciones en diversos campos, uno de los cuales es el área de PC Y RC. Este polímero está formado por unidades de β -(1-4)-2-acetamido-D-glucosa y β -(1-4)-2-amino-D-glucosa (Figura 2). El Q es descrito en términos del grado de desacetilación y peso molecular y su importancia reside en sus propiedades antimicrobianas en conjunción con su capacidad para empaques comestibles (Elsabee y Abdou, 2013).

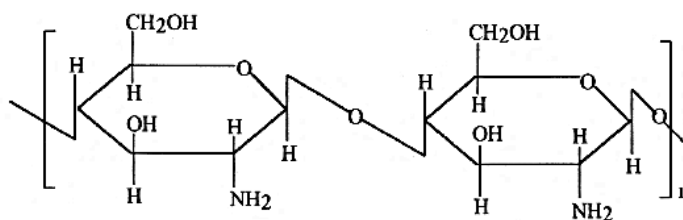


Figura 2. Estructura química del quitosano completamente desacetilado (Sagheer *et al.*, 2009).

2.2.3.1 Obtención del quitosano

La quitina es el polisacárido más abundante después de la celulosa. Puede tener orígenes diferentes, tales como exoesqueletos de crustáceos, moluscos, insectos y hongos. Entre los derivados de la quitina se encuentra el Q, que se obtiene mediante la desacetilación de la quitina (Sagheer *et al.*, 2009). Se han reportado diferentes técnicas para obtener quitina. El método más común es el método químico. Este proceso consiste básicamente en las siguientes etapas: un tratamiento ácido para eliminar compuestos inorgánicos tales como carbonato de

calcio, seguido de un tratamiento alcalino con NaOH para solubilizar proteínas. Una vez que se han realizado estos pasos, el Q es obtenido de la quitina mediante destilación usando una solución de NaOH con NaBH₄. El grado de acetilación determina la solubilidad y reactividad del Q, y el peso molecular influye en las propiedades físico-químicas y biológicas (Lago *et al.*, 2011).

2.2.3.2 Utilización de quitosano en la formación de películas comestibles

El Q ha mostrado ser un excelente material formador de película. Las películas de Q tienen una permeabilidad selectiva a los gases (CO₂ y O₂), buenas propiedades mecánicas, amplia actividad antimicrobiana y compatibilidad con otras sustancias, como vitaminas, minerales y agentes antimicrobianos (Embuscado y Huber, 2009). Sin embargo, el hecho de que las películas de Q sean altamente permeables al vapor de agua limita su uso debido a que un control eficaz de la transferencia de humedad es una propiedad deseable para la mayoría de los alimentos, especialmente en ambientes húmedos. El aumento de la hidrofobicidad se ha obtenido mediante la adición de lípidos neutros, ceras de ácidos grasos y arcilla, aunque a menudo comprometen su estabilidad mecánica, química y/o de sus atributos organolépticos (Elsabee y Abdou, 2013).

Se cree que la actividad antifúngica y antimicrobiana del Q se origina de su naturaleza policatiónica (cualquier catión que tiene más de una carga positiva). El Q aumenta la permeabilidad de la membrana interna y externa e irrumpe las membranas celulares bacterianas, con la posterior liberación de los contenidos celulares. Este daño es probablemente causado por la interacción electrostática entre grupos NH₃⁺ del Q y los grupos acetato y fosforilo de los fosfolípidos de las membranas celulares (Liu *et al.*, 2004). El número de grupos amino protonados (NH₃⁺) presentes en el Q aumenta conforme aumentan los grados de desacetilación (Elsabee y Abdou, 2013). Se ha reportado la inhibición de *E. coli*, *Fusarium*, *Alternaria* y *Helmithosporium* en presencia de Q (Kumar, 2000).

2.2.4 Proteína de quínoa

La semilla de quinua (*Chenopodium quinoa*) es un grano pequeño (aproximadamente 3 mm de diámetro) que se encuentra típicamente en las tierras

altas andinas de América del Sur (Ahamed *et al.*, 1996) y está compuesto por cantidades significativas de proteína (12-23 %). Las fracciones proteicas principales de ésta semilla son las albúminas y las globulinas; ambas proteínas, estabilizadas por puentes disulfuro (Brinegar *et al.*, 1996). Se ha reportado que las proteínas de quínoa (PQ) son solubles a pH ácido y básico lo cual les da una amplia posibilidad de interactuar y formar complejos con diversos compuestos (Abugoch *et al.*, 2008). En el Cuadro 3 se muestra la composición de aminoácidos del aislado de PQ.

Cuadro 3. Composición de aminoácidos de aislado de PQ
(Abugoch *et al.*, 2008)

Aminoácido	mg/g proteína
Arginina	89.4 ± 1.7
Ácido aspártico	70.6 ± 0.9
Cistina	6.8 ± 0.5
Glicina	50.5 ± 0.7
Ácido glutámico	145.4 ± 0.4
Histidina	23.0 ± 0.6
Isoleucina	39.1 ± 0.7
Leucina	69.2 ± 1.3
Lisina	52.1 ± 1.0
Metionina	23.5 ± 0.7
Fenilalanina	41.4 ± 0.7
Serina	47.6 ± 0.2
Treonina	42.7 ± 0.4
Triptófano	35.6 ± 0.0
Tirosina	35.6 ± 0.3
Valina	47.5 ± 0.9
Alanina	2.4 ± 0.6

2.2.4.1 Proteína de quina en recubrimientos comestibles

El uso de PQ como componente de PC Y RC se ha estudiado muy poco y por lo tanto se tiene poca información al respecto. Abugoch *et al.* (2011)

formularon y caracterizaron películas con una mezcla de PQ y Q, la mezcla entre ambos polímeros permitió la elaboración de una película comestible con alta elongación sin el uso de plastificantes, sin embargo, la PC fue de carácter hidrofílico. Con el objetivo de reducir el carácter hidrofílico de la película, Valenzuela *et al.* (2013) elaboraron una película comestible a base de una mezcla de PQ y Q añadiendo aceite de girasol. Con esta formulación lograron disminuir la permeabilidad al vapor de agua de la película.

2.2.5 Transglutaminasa

La transglutaminasa (TG) (E.C. 2.3.2.13) es una enzima que puede modificar proteínas catalizando reacciones de aminación, desaminación y entrecruzamiento. Promueve la polimerización de proteínas a través de enlaces intermoleculares de ϵ -(γ -glutamil)-lisina. La TG utiliza el grupo γ -carboxiamida de residuos de glutamina unidos a péptidos como donador de acilo, teniendo así una especificidad amplia para los sustratos aceptores (Giosafatto *et al.*, 2014). La reacción general para la formación de entrecruzamiento de ϵ -(γ -glutamil)-lisina se presenta en la Figura 3.

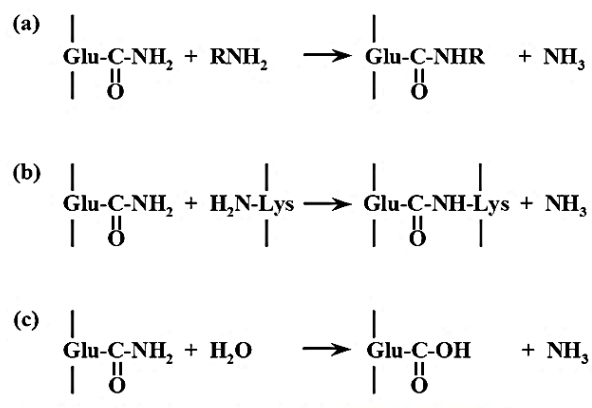


Figura 3. Reacciones catalizadas por transglutaminasa a) Acil transferencia b) Entrecruzamiento de residuos de glutamina y lisina. c) Desaminación (Yokoyama, 2004).

El aceptor puede ser el grupo ϵ -amino de lisina, bien como péptido/proteína ligada o como lisina libre. También se ha reportado que las aminas primarias actúan como aceptores y son preferidas sobre el agua (con la cual también puede reaccionar), todo dependiendo del pH al que se encuentren. La TG puede

obtenerse de diversas fuentes entre las que se encuentran los mamíferos, diversos microorganismos (*Streptoverticillium spp.*, *Physarum polycephalu*, *Streptomyces lividans*), peces y plantas (Nielsen, 1995).

2.2.5.1 Transglutaminasa en películas comestibles

La TG ha sido utilizada para entrecruzar varias proteínas, tales como caseinatos, proteínas de suero de leche, proteínas de soja, clara de huevo y gelatina (Giancone *et al.*, 2008).

Rossi Márquez *et al.* (2017) elaboraron PC a base de pectina y proteína de suero, ambas entrecruzadas con TG. Las películas se evaluaron en manzanas, papas y zanahorias con un mínimo procesamiento. Las PC formuladas con proteína de suero y TG mostraron valores menores de permeabilidad al vapor de agua en comparación con las películas de pectina y TG. Los dos tipos de películas entrecruzadas con TG inhibieron el crecimiento microbiano en todas las muestras analizadas. Porta *et al.* (2016), realizaron PC a partir de mezclas de pectina y arveja amarga (*Vicia ervilia*) añadiendo la enzima TG. La mezcla de proteína y pectina produjo películas con mejores propiedades de barrera en comparación con películas elaboradas únicamente de proteína. La reacción de entrecruzamiento catalizada por la TG mejoró las características mecánicas de la película y aumentó sus propiedades de barrera frente a los gases.

2.2.6 Cera de abeja

La cera de abeja (BW) es el producto de las glándulas ceríparas de las abejas (*Apis mellifera*) y se obtiene de los panales de dichas abejas. Al igual que otros lípidos, la BW está compuesta por una mezcla de ésteres de ácidos grasos saturados y alcoholes de cadena larga (principalmente hidrocarburos, monoésteres, diésteres, trióteres, ácido mirístico libre, hidroxiácidos y dioles) (Tulloch, 1980).

La conducta térmica de la BW fue evaluada mediante calorimetría diferencial de barrido, mostrando el termograma de la Figura 4 (Arredondo-Ochoa *et al.*, 2017). Del proceso endotérmico la temperatura de inicio de la cristalización (Toc) fue de 61.47°C, con un pico de cristalización dominante (Tc) de 57.15°C. Por

otro lado, la temperatura de inicio de la fusión (T_{om}) fue de 50.64°C , mientras que el máximo pico de fusión (T_m) fue de 63.09°C . La presencia de diferentes picos en el termograma se atribuyó a la composición heterogénea de la BW.

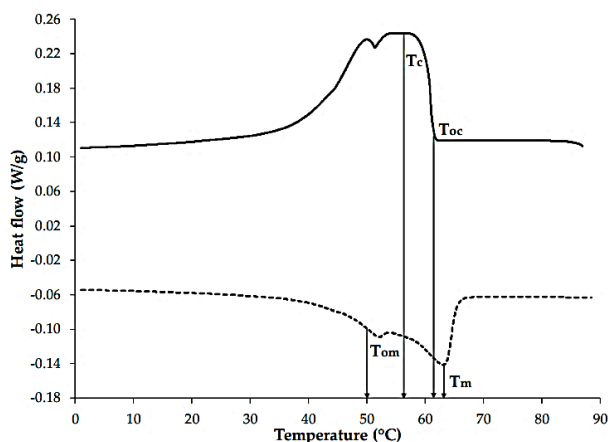


Figura 4. Termograma de la cera de abeja. Proceso de cristalización (línea continua), proceso de fusión (línea punteada) (Arredondo-Ochoa *et al.*, 2017).

2.2.6.1 Cera de abeja en recubrimientos comestibles

Los hidrocoloides y lípidos pueden interactuar favorablemente, dando como resultado películas comestibles con propiedades estructurales y funcionales mejoradas, ya que las propiedades mecánicas y de barrera dependen no sólo de los compuestos usados en la matriz polimérica, sino también de su compatibilidad (Altenhofen *et al.*, 2009). Para mejorar las propiedades de barrera al agua de las películas basadas en hidrocoloides, se incorporan frecuentemente compuestos lipídicos, provocando una disminución de los valores de permeabilidad al vapor de agua (Valenzuela *et al.*, 2013).

Cecchini *et al.* (2017) reportaron el uso de BW en un recubrimiento elaborado con proteína de suero. El recubrimiento mostró disminución a la permeabilidad de vapor de agua en comparación con las películas elaboradas sin BW. Sin embargo, también se observó que la BW afectó las propiedades mecánicas de la película.

Arredondo *et al.* (2016) elaboraron un RC utilizando almidón de maíz, BW y antimicrobianos naturales. Los recubrimientos con 1 % de BW mostraron una reducción en la permeabilidad de vapor de agua y buenas propiedades mecánicas.

2.2.7 Aceites esenciales

Las plantas, hierbas y especias, así como los aceites esenciales y compuestos derivados de ellas contienen un gran número de sustancias que se sabe inhiben diversas actividades metabólicas de bacterias, levaduras y mohos. Los compuestos antimicrobianos en los materiales vegetales se encuentran comúnmente en la fracción de aceite esencial de hojas (romero, salvia), flores y capullos (clavo), bulbos (ajo, cebolla), rizomas (asafoétida) y frutos (pimienta, cardamomo). Estos compuestos pueden ser letales para las células microbianas o pueden simplemente inhibir la producción de metabolitos (Lopez-Malo *et al.*, 2005). Entre los aceites esenciales que han destacado por su actividad antimicrobiana se encuentran los aceites derivados de cítricos: limón, naranja, mandarina, lima. Este tipo de aceites contienen un 85-99% de compuestos volátiles. y de 1-15% de componentes no volátiles. Los constituyentes volátiles. son una mezcla de monoterpenos (limoneno) e hidrocarburos sesquiterpénicos y sus derivados oxigenados que incluyen: aldehídos (citrinal), cetonas, ácidos, alcoholes (linalool). La mezcla y proporciones de los diferentes componentes determinan las propiedades fisicoquímicas y antimicrobianas de los aceites y es específica y exclusiva de cada especie de donde sean extraídos (Fisher y Phillips, 2008).

2.3 Tuna (*Opuntia ficus-indica*)

2.3.1 Distribución y producción

El cactus *Opuntia* (género *Opuntia*, subfamilia *Opuntioideae*, familia *Cactaceae*) es un xerofito que produce cerca de 200-300 especies y que crece principalmente en zonas áridas (menos de 250 mm de precipitación anual) y semiáridas (250-450 mm de precipitación anual). Debido a su notable variabilidad genética, las plantas del género *Opuntia* muestran una alta adaptabilidad

ecológica y por lo tanto pueden encontrarse en lugares de prácticamente todas las condiciones climáticas (Florian *et al.*, 2005). En América se cultiva en México, Chile, Perú y Estados Unidos, en Europa se localiza en España e Italia Mediterránea y en África se encuentra principalmente en Marruecos, Argelia, Túnez, Sudáfrica y Egipto.

En México han sido reconocidas 104 especies de *Opuntia ficus-indica*, lo que lo coloca como el principal país productor de América latina. Una de las grandes ventajas que posee nuestro país en la producción de tuna es la riqueza genética del nopal; ésta permite ofrecer al mercado frutos con una diversidad de tonalidades (rojo, blanco, amarillo) y con una amplia estacionalidad, frutos de maduración temprana (mayo), intermedia (agosto) y tardía (noviembre), con lo cual se puede tener presencia en el mercado la mayor parte del año. Además, la diversidad de cultivares brinda tunas con diferentes características, como la forma, sabores (ácidos y dulces) y el tamaño, porcentaje de semillas, presencia de antioxidantes, etc. Por el contrario, en la mayor parte de los países donde se produce tuna comercialmente, la producción depende de uno o dos cultivares (Gallegos y Herrera, 2006).

En México, la producción de tuna, ocupa una superficie aproximada de 47,688.04 ha y se concentra principalmente en tres regiones: Puebla (Acatzingo y Quecholác), Valle de México (Estado de México e Hidalgo) y el Altiplano Potosino-Zacatecano (Aguascalientes, Jalisco, Guanajuato, San Luis Potosí y Zacatecas). La producción total de tuna en el país es de 408,445.05 t/año, generando ingresos de \$ 1,478,936,420.00 M.N. Los estados con mayor producción son el Estado de México con 179,858.37 t de tuna, seguido del Estado de Zacatecas con 66,939.21 t y en tercer lugar el Estado de Puebla con una producción de 87,726.5 t (SAGARPA, 2015).

2.3.2 Taxonomía y características morfológicas

Al fruto perteneciente a la familia cactaceae se le denomina genéricamente *Opuntia spp.* y en México es conocido con el nombre de tuna (Cuadro 4). La tuna es una baya carnosa y ovoide, de dimensiones variables, con la epidermis

normalmente poblada de pequeñas espinas llamadas gloquidas y cuya pulpa jugosa puede ser blanca, amarilla, roja, naranja, púrpura, y con numerosas semillas. Las principales especies de tuna cultivadas en México son: *Opuntia amyclaea*, *O. ficus-indica*, *O. joconoxtle*, *O. megacantha* y *O. streptocantha* (Barreiro, 1999). En México se cultiva una gran cantidad de variedades entre las que destacan: Villanueva, Alfajayucan, Burrón, Cristalina, Reyna, Gavia, Esmeralda, Rojo Pelón, Rubí Reyna, Torreña, Morada, Amarilla Montezuma, Miquihuana, Amarillo Huesona, Picochulo y Cardón (Barreiro, 1999).

Cuadro 4. Taxonomía de la tuna (Flores-Valdez *et al.*, 1995)

Reino	<i>Plantae</i>
Sub reino	<i>Embryophyta</i>
División	<i>Angiosperma</i>
Clase	<i>Dicotyledoneae</i>
Sub clase	<i>Dialipetalas</i>
Orden	<i>Opuntiales</i>
Familia	<i>Cactaceae</i>
Tribu	<i>Opuntiae</i>
Sub Familia	<i>Opuntioideae</i>
Género	<i>Opuntia</i>

2.3.3 Composición química

Las tunas son frutos no climatéricos y dependiendo de su especie presentan diferentes características. Generalmente llegan a pesar de 0.1 a 0.25 kg y están formadas por una cáscara gruesa y carnosa, la cual llega a representar del 30-40 % del total del peso de la fruta. Dicha cáscara envuelve a una pulpa jugosa que constituye del 60-70 % del peso total de la fruta, la pulpa contiene varias semillas que conforman del 5-10 % del peso de la pulpa (Cantwell, 1995). En el Cuadro 5 se muestra la composición nutrimental de la tuna.

Cuadro 5. Composición nutrimental de la tuna (Cantwell, 1995).

Componente	Resultado
Agua (%)	85.0
Carbohidratos totales (%)	11.0
Fibra cruda (%)	1.8
Lípidos (%)	0.1
Proteínas (%)	0.5
Cenizas (%)	1.6
Calcio (mg 100 g ⁻¹)	60
Vitamina C (mg 100 g-1)	30
Vitamina A (IU)	50

3. HIPÓTESIS

Es posible obtener un recubrimiento activo comestible a base de cera de abeja, y una mezcla de proteína de quinua-quitosano entrecruzada con transglutaminasa y adicionado con aceite esencial de limón que permita ser utilizado para prolongar la vida de anaquel de tuna mínimamente procesada.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Diseñar un recubrimiento comestible activo a base de una mezcla de proteína de quinua-quitosano, cera de abeja y transglutaminasa y evaluar sus características fisicoquímicas, antimicrobianas, propiedades mecánicas y de barrera y su aplicación en tuna (*Opuntia ficus-indica*).

4.2 Objetivos Particulares

- A) Diseñar la formulación de las películas comestibles a base de una mezcla de proteína de quinua-quitosano, cera de abeja y transglutaminasa.
- B) Evaluar las características fisicoquímicas, propiedades mecánicas y propiedades de barrera de las películas comestibles.
- C) Determinar la actividad antimicrobiana y concentración mínima bactericida del aceite esencial de limón.
- D) Aplicar el recubrimiento adicionado con el antimicrobiano y evaluar su efecto en las características de calidad en tuna mínimamente procesada.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Reactivos

El quitosano, la cera de abeja y el D-sorbitol se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), el aceite esencial de limón fue donado por Frulider S. de P.R. de R.L (Michoacán, México). La quinua peruana (*Chenopodium quinoa*) se obtuvo de Hanseatik S.A. de C.V. (Ciudad de México, México). El Tween 80 se compró en J.T. Baker (Center Valley, PA, EUA), mientras que la enzima transglutaminasa microbiana, derivada de cultivo de *Streptoverticillium* sp, con 92 UI/ g de aislado se obtuvo de Activa WM, Ajinomoto (Tokio, Japón).

5.1.2 Medios de cultivo

Agar y caldo MRS, peptona bacteriológica, extracto de carne, agar cuenta estándar y agar papa dextrosa se adquirieron en Bioxon (Cuautitlán Izcalli, Estado de México), el extracto de levadura y D-(+)- glucosa fueron comprados en Sigma Aldrich, mientras que el agar bacteriológico se obtuvo de MCD Lab (Tlalnepantla, Estado de México, México).

5.1.3 Tunas

Las tunas verdes de la variedad Relna se adquirieron en un mercado local de Santiago de Querétaro, México.

5.2 Métodos

5.2.1 Diseño experimental

Se evaluó el efecto de una mezcla de PQ-Q, BW y TG en el potencial ζ , tamaño de partícula e índice de polidispersión, de las suspensiones obtenidas, así como las propiedades fisicoquímicas, de barrera, mecánicas, antimicrobianas y estructurales en las PC. Se probaron dos concentraciones de BW (0.1 y 0.2 % p/p en base a los sólidos totales de la película), dos proporciones de la mezcla proteína de quinua:quitosano PQ-Q (1:5, 1:10 p/p) y la presencia o ausencia de la

enzima TG. Se realizó un diseño factorial completo con 3 réplicas, y los tratamientos se aleatorizaron (Cuadro 6).

Cuadro 6. Diseño experimental para el diseño de las películas comestibles

Factor	Niveles	
Proteína de quinua: quitosano	1:5	1:10
Transglutaminasa	Presencia	Ausencia
Cera de abeja	0 % (p/v)	0.1 % (p/v) 2 % (p/v)

En el Cuadro 7 se observan los doce tratamientos utilizados en este proyecto.

Cuadro 7. Diseño experimental de las suspensiones filmogénicas

Tratamiento	Q:PQ	Cera de abeja	Transglutaminasa
1	1:10	0	Presencia
2	1:10	0.10%	Presencia
3	1:10	0.05%	Presencia
4	1:10	0	Ausencia
5	1:10	0.10%	Ausencia
6	1:10	0.05%	Ausencia
7	1:05	0	Presencia
8	1:05	0.10%	Presencia
9	1:05	0.05%	Presencia
10	1:05	0	Ausencia
11	1:05	0.10%	Ausencia
12	1:05	0.05%	Ausencia

5.2.2 Extracción de proteína de quinua

Para realizar la extracción de proteína se trituraron las semillas de quinua con un molino de café (Krupps ,Ciudad de México, México) y se colocaron en agua destilada en proporción 1:10 (PQ-agua). Esta suspensión se ajustó a pH 11 durante 1 h para solubilizar las proteínas presentes y posteriormente se centrifugó a 3,200 rpm durante 20 min a 4 °C en una centrifuga Avanti J 301(Beckman, Indianápolis, EUA). Se recuperó el sobrenadante y se ajustó a pH 4.5 para precipitar la proteína. La suspensión se centrifugó nuevamente (3,200 rpm, 20 min 4 °C). Se recuperó el precipitado mismo que se secó a 30 °C en un horno (Binder, Herrenberg, Alemania). Se repitió el procedimiento para obtener mayor

concentración de proteína. Mediante el método Kjeldahl se determinó la cantidad de proteína total (Abugoch *et al.*, 2008).

5.2.3 Preparación de la suspensiones filmogénicas

Se realizó una suspensión de PQ-Q a dos diferentes proporciones, 5:1 y 10:1 (PQ: Q). Primero se preparó una solución de PQ en agua destilada (2 % p/p) y se ajustó a 11 el pH para lograr la solubilización de la proteína, posteriormente se adicionó sorbitol como plastificante (40 % p/p con respecto al porcentaje de proteína). Al mismo tiempo se realizó una solución de Q (0.5% p/p) en ácido cítrico (1 % p/p). El Q se añadió a la solución de proteína utilizando una bomba peristáltica (4.6 mL/min) (Gilson, Wisconsin, EUA.). Por otra parte, se realizó una emulsión de BW en agua 1 % (p/v), utilizando Tween 80 (2.5 g Tween 80:1 g cera) como emulsificante (Arredondo *et al.*, 2016). Las soluciones de PQ-Q y la emulsión de BW se mezclaron para formar la SF. A las SF a las cuales se les adicionó TG (20 U/g proteína) se les ajustó el pH a 7, las demás solo se ajustaron a pH 4. Las SF se incubaron 2 h a 37 °C para que la TG realizara la reacción de entrecruzamiento. Al finalizar este periodo de tiempo las SF con pH 7 se ajustaron a pH 4.

Todas las SF se homogenizaron 2 min a 6500 rpm y 1 min a 9500 rpm en un homogenizador de alta velocidad IKA T25-Ultra-Turrax (Wilmington, Delaware, EUA). Para reducir el tamaño de partícula se utilizó un sonicador de alta intensidad (Sonics, Connecticut, EUA), con una sonda de 3 mm de diámetro (Vibra-Cell VCX 500, Newtown, CT, EUA). Se aplicaron 2 pulsos de 150 s con periodo de reposo de 150 s a 75% de amplitud utilizando un baño de hielo. Las SF se secaron a 25 °C y 45 % HR.

5.2.4 Determinación de las propiedades fisicoquímicas, de barrera, mecánicas, estructurales y antimicrobianas de las películas comestibles

5.2.4.1 Potencial ζ y tamaño de partícula

Se utilizó el equipo Zetasizer Nano-ZSP (Malvern, Worcestershire, RU) para medir el potencial ζ , tamaño de partícula e índice de polidispersión de las SF. Se realizaron tres mediciones independientes para cada muestra de SF (1 mL). Las

mediciones se realizaron a 25 °C aplicando un voltaje de 200 mV. El equipo determina el diámetro medio de las partículas utilizando dispersión de luz dinámica (Porta *et al.*, 2016).

5.2.4.2 Espesor/ Grosor

El espesor de las PC se midió utilizando un micrómetro digital (Mitutoyo, Kanagawa, Japón.) Se realizaron mediciones aleatorias de diez puntos de cada película. El valor final se calculó con el promedio de dichas mediciones (Longares *et al.*, 2004).

5.2.4.3 Color y Opacidad

Se utilizó un colorímetro CM 600-d (Konica Minolta, Osaka, Japón) para evaluar los parámetros L^* (luminosidad, blanco- negro), a^* (verde-rojo) y b^* (amarillo-azul). Se tomó la medición de 3 puntos por cada película.

Para obtener el valor de opacidad de las PC se evaluó el parámetro L^* tanto en un fondo blanco como en un fondo negro. Se realizaron seis mediciones por cada película y se utilizó la siguiente ecuación (1) (Cecchini *et al.*, 2017):

$$\text{Opacidad} = \frac{L^* (\text{fondo negro})}{L^* (\text{fondo blanco})} \times 100 \quad (1)$$

5.2.4.4 Propiedades mecánicas

Se utilizó un texturómetro Instron Universal modelo 5543A (Instron, Norwood, MA, EUA) para medir la resistencia a la tensión (TS), elongación al punto de rotura (EF) y módulo elástico (EM) de acuerdo al método ASTM D882-10 (2010) con modificaciones utilizando el método de ensayo A, peso estático, velocidad de separación constante. La separación inicial de agarre fue de 40 mm, y la velocidad de separación de la cruceta fue de 5 mm/min en el modo de tensión (Giosafatto *et al.*, 2014; Porta *et al.*, 2016).

Se cortaron rectángulos de película de 10 mm de ancho por 50 mm de largo. Las muestras se mantuvieron en equilibrio durante 2 h a 50 % HR y 25 °C antes de realizar la medición. La TS se calculó a partir de la relación entre la

fuerza máxima ejercida sobre la película durante la fractura y el área de la sección transversal, la EF se expresó como el porcentaje del aumento de la longitud de la película en la rotura y el EM se determinó con el valor de la pendiente de los datos iniciales (zona lineal) de la curva esfuerzo-deformación (Figura y Teixeira, 2004).

5.2.4.5 Permeabilidad a gases

La permeabilidad al oxígeno (O₂), dióxido de carbono (CO₂) y vapor de agua se midieron utilizando un permeabilímetro diferencial MultiPerm (ExtraSolution S.R.I., Pisa, Italia). Antes de la medición las muestras se acondicionaron a 53 % HR durante 2 h. Se utilizaron máscaras de aluminio para reducir el área ensayada de las películas (5 cm²). La prueba se realizó a 25 °C y 70 % HR (Porta *et al.*, 2015).

5.2.4.6 Análisis de la actividad enzimática de la enzima transglutaminasa

Se evaluó el uso de la enzima TG en las SF. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE al 4-20 % de acrilamida, utilizando geles prefabricados (Biorad, Hércules, California).

Se tomaron alícuotas de 10 µL de muestra que se mezclaron con 90 µL para tener una concentración aproximada de proteínas de 2 mg/ mL. Posteriormente se añadieron 25 µL de amortiguador de muestra: 15 mM Tris-HCl, pH= 6.8, que contenía 0.5 % p/v de SDS, 2.5 % v/v de glicerol, 200 mM de mercaptoetanol y 0.003 % p/v de azul de bromofenol. Todas las muestras se colocaron en baño María a 90 °C por 5 min. El volumen de muestra utilizado en el gel fueron 15 µL. La electroforesis se llevó a cabo utilizando buffer de corrida 1x, a voltaje constante (80 V por 2-3 h) y las proteínas fueron teñidas con azul de Coomassie R250. Se utilizaron estándares de bajo peso molecular como marcadores (Biorad) (Di Pierro *et al.*, 2006).

5.2.4.7 Determinación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de limón

Se utilizó el método de difusión en disco sobre agar para determinar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de limón (AEL) contra tres microorganismos: *Saccharomyces cerevisiae*, *Micrococcus luteus* y *Leuconostoc mesenteroides*. Estos microorganismos se eligieron ya que el objetivo del recubrimiento es ser aplicado en tuna mínimamente procesada y en la literatura se ha reportado que los principales microorganismos asociados a este fruto son las bacterias y levaduras, destacando a *Leuconostoc mesenteroides* como principal microorganismo deteriorador (Corbo *et al.*, 2004). Diez mililitros de agar correspondiente para cada microorganismo (YPD, Assay, MRS, respectivamente) (0.8 % p/v) fue mezclado con 200 µL de una solución de Tween 80 (50 % v/v). Este agar se inoculó con 10⁵ UFC /mL de cada microorganismo por separado. Después se vertió en cajas petri que contenían agar solidificado (1.5 % p/v).

Círculos de papel filtro Whatman 4 (Buckinghamshire, RU) de 13 mm de diámetro fueron impregnados con 40 µL de AEL previamente esterilizado por filtración con membranas de fluoruro de polivinilideno de 0.45 µm (Milipore, MA, EUA). Los círculos (Whatman 4) se colocaron en la superficie de las cajas petri con el agar y éstas se colocaron 2 h a 4 °C para permitir la difusión del aceite. Posteriormente se incubaron a 30 °C por 48 h. El efecto antimicrobiano se determinó midiendo el diámetro de la zona de inhibición (Hernández-Hernández *et al.*, 2014).

5.2.4.8 Determinación de la concentración inhibitoria del aceite esencial de limón

Para determinar la concentración inhibitoria se utilizó el método de dilución en agar (Wiegand *et al.*, 2008). Se probaron cuatro diferentes concentraciones de AEL: 1, 2.5, 5 y 7.5 µL/ mL disueltas en el agar correspondiente para cada microorganismo (*Saccharomyces cerevisiae*, *Micrococcus luteus* y *Leuconostoc mesenteroides*) (0.8 % p/v).

El AEL se incorporó al agar suave (0.8%), así como el Tween 80 (10 %) como agente emulsificante (YPD, Assay o MRS, según correspondiera el microorganismo). El agar conteniendo el aceite se vertió sobre placas petri con agar al 1.5 % p/v. Posteriormente por el método de estriado se inocularon 10^5 UFC /mL de los microorganismos ensayados. Las cajas petri se incubaron a 30 °C durante 24 h (López-Malo *et al.*, 2005).

5.2.4.9 Actividad antimicrobiana de las películas comestibles

La actividad antimicrobiana se evaluó poniendo en contacto directo PC de 10 mm de diámetro sobre la placa de agar correspondiente para cada microorganismo, conteniendo 10^5 UFC/mL de los microorganismos, seguido de incubación a 30 ± 1 °C durante 24 h. El efecto antimicrobiano se determinó midiendo el diámetro de la zona de inhibición (Arredondo *et al.*, 2016; Siddique *et al.*, 2017).

5.2.5 Determinación de propiedades fisicoquímicas de las PC y/o RC con AEL

5.2.5.1 Mojabilidad y ángulo de contacto

La mojabilidad de un sólido por un líquido se determina por el balance de fuerzas de adhesión (trabajo de adhesión, W_a) del líquido en el sólido y fuerzas de cohesión (trabajo de cohesión, W_c) del propio líquido. El coeficiente de mojabilidad (W_s) es obtenido mediante la ecuación (2), esta fuerza siempre será ≤ 0 , en donde más cercano al cero mejor será el mojado de la superficie (Zisman, 1964).

$$W_s = W_a - W_c \quad (2)$$

Young (1805), propone que la relación entre el trabajo de adhesión, el ángulo de contacto y la tensión superficial del líquido debe ser determinada utilizando la siguiente ecuación (3):

$$W_a = \gamma_{lv}(1 + \cos \theta) \quad (3)$$

Dónde:

γ_{lv} = tensión líquido vapor y θ = ángulo de contacto

El trabajo de cohesión está determinado por (4):

$$W_s = 2\gamma_{lv} \quad (4)$$

En este trabajo se determinó el ángulo de contacto de las SF utilizando un equipo analizador de gota DSA30 (KRÜSS, Hamburgo, Alemania). El volumen de la gota fue 20 μ L y la medición se realizó 40 s después de que la gota entró en contacto con el material de superficie (tuna).

La tensión líquido-vapor de las SF se determinó utilizando un tensiómetro K6 (KRÜSS, Hamburgo, Alemania) y un anillo (KRÜSS, Hamburgo, Alemania). El valor obtenido en las mediciones se multiplicó por un factor de corrección proporcionado por el equipo (Anexo 8.1).

5.2.5.2 Microestructura

Las PC se cubrieron de oro (EM-ACE200, Leica, Wetzlar, Alemania) y se analizaron en un microscopio electrónico de barrido (SEM) (EVO-50, Carl Zeiss UltraPlus, Oberkochen, Alemania) para poder visualizar su microestructura (Arredondo *et al.*, 2016).

5.2.6 Aplicación del recubrimiento comestible

Se realizó un diseño experimental con un factor en dos niveles: frutos recubiertos y frutos sin recubrir. Las unidades experimentales se conformaron por 3 tunas y cada tratamiento se realizó aleatoriamente y por triplicado. Las mediciones se realizaron a los 0, 3, 6 y 9 días. Todos los frutos fueron pelados manualmente y se desinfectaron utilizando agua electrolizada neutra a 200 ppm durante 5 min (Arevalos-Sánchez *et al.*, 2013), posteriormente los frutos se recubrieron mediante la técnica de inmersión (Figura 5).



Figura 5. Aplicación del recubrimiento sobre tunas (*Opuntia ficus-indica*).

Se sumergieron dos veces en la SF durante 2 min y se almacenaron en cajas de polietileno (18.3 cm x 25 cm x 9.5 cm) a 5° C y 87 % HR. Para realizar las mediciones fisicoquímicas se obtuvo el jugo del fruto utilizando un procesador de alimentos (Moulinex, Alençon, Francia).

5.2.6.1 Pérdida de peso

Las muestras de tunas se pesaron cada 3 días durante 9 días para poder evaluar la pérdida de peso en función del tiempo. El porcentaje de pérdida de peso se calculó con la siguiente ecuación (5):

$$Wl = \frac{w_i - w_f}{w_i} \times 100 \quad (5)$$

Donde Wl es porcentaje de pérdida de peso, w_i (g) y w_f (g) son los pesos iniciales y finales respectivamente (Ochoa-Velasco y Guerrero-Beltrán, 2014).

5.2.6.2 Color

Se midieron los parámetros de color L^* , a^* y b^* en cuatro puntos de cada fruto durante nueve días. Con estos parámetros se determinaron los valores de cambio de calor (ΔE) y tono (Hue) mediante las siguientes ecuaciones (6) y (7):

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_i^*)^2 + (a^* - a_i^*)^2 + (b^* - b_i^*)^2} \quad (6)$$

$$\text{Hue} = 180 + \left(\tan^{-1} \frac{b^*}{a^*}\right) \quad (7)$$

Donde L^* , a^* , b^* son los parámetros iniciales de color y L^* , a^* , b^* son los parámetros en cada periodo de tiempo (Ochoa-Velasco y Guerrero-Beltrán, 2014; Xing *et al.*, 2011).

5.2.6.3 pH

El valor de pH se determinó utilizando un potenciómetro Orion star a211 (Thermo Scientific, MA, EUA). Esta medición se realizó por triplicado en el jugo del fruto (AOAC 981.12, 1990).

5.2.6.4 Acidez total

La acidez total se determinó de acuerdo al AOAC 942.15 (1990). Se obtuvo el jugo de 3 tunas correspondientes a cada tratamiento y se tomaron 15 mL de jugo para titularse con NaOH 0.1 N hasta alcanzar un pH final de 8.1 utilizando fenolftaleína como indicador. Los resultados se expresaron como gramos de ácido cítrico/gramos de fruto fresco (8).

$$\text{Acidez total} \left(\frac{\text{mg. ácido cítrico}}{100 \text{ g de muestra}} \right) = \frac{(\text{mL gastados (NaOH)} \times N(\text{NaOH}) \times 64(\text{mg/meq NaOH}))}{\text{g muestra}} \times 100 \quad (8)$$

5.2.6.5 Ácido ascórbico

Para la determinación de ácido ascórbico se titularon 2 mL de jugo de tuna con una solución estándar de 2,6 diclorofenolindofenol (DIF) hasta obtener un ligero color rosa tenue que persistió 15 s. La cantidad de colorante usado en la titulación se determinó volumétricamente y se utilizó en el cálculo del contenido de vitamina C (9) que se reportó como mg de ácido ascórbico / g de fruto (Nielsen, 2010).

$$F = \frac{\text{mg de ácido ascórbico en el volumen de la sol. estándar titulada}}{[(\text{mL de colorante utilizado en la titulación de estándares}) - (\text{mL de colorante utilizado en la titulación de blanco})]} \quad (9)$$

Para calcular el contenido de ácido ascórbico en la muestra de jugo en mg/mL se utilizó la siguiente ecuación (10) y el volumen de titulación de cada una de las réplicas.

$$\text{mg de ácido asc./g} = (X - B) \times \frac{(F)}{E} \times \left(\frac{V}{Y}\right) \quad (10)$$

Donde:

X = mL promedio usados en la titulación de la muestra

B = mL promedio usados en la titulación del blanco

F = titulación del colorante (=mg ácido ascórbico equivalentes a 1.0 mL de solución. de infofenol)

E = g de muestra

V = volumen de solución de ensayo inicial (=7mL)

Y = volumen de alícuota de muestra titulada (=7mL)

5.2.6.6 Sólidos solubles totales

Los sólidos solubles totales se midieron utilizando un refractómetro Hi 96813 (Hanna Instruments, RI, EUA) y se expresaron en °Brix, siguiendo la metodología descrita por la AOAC-932.14 (1990).

5.2.6.7 Actividad antimicrobiana del fruto con el recubrimiento comestible

Para evaluar la actividad antimicrobiana del recubrimiento RC se pesaron diez gramos de tuna recubierta, se mezclaron con 90 mL de agua peptonada estéril y se maceraron, posteriormente se tomó una alícuota de este macerado y se inoculó en cajas petri utilizando la técnica de cuenta estándar (NOM-092-SSA1-1994) y conteo de mohos y levaduras (NOM-111-SSA1-1994).

5.2.7 Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron por triplicado y se reportó el promedio \pm desviación estándar. Se utilizó el análisis de varianza para determinar diferencias entre los tratamientos y el análisis de regresión lineal para determinar diferencias a lo largo de los días. Para determinar diferencias entre las medias se efectuó la

prueba de Tukey, con un nivel de significancia $\alpha < 0.05$, utilizando el programa JMP.

6 RESULTADOS

6.1 Extracción y caracterización de los biopolímeros formadores PC y/o RC

6.1.1 Extracción de proteína de quinua

De acuerdo con la cuantificación del contenido de proteína extraída mediante el método Kjeldahl, se obtuvo 80% de proteína total en el extracto final. Mediante un gel de electroforesis (Figura 6) se determinó el perfil proteico de la proteína de quinua (*Chenopodium quinoa*). De acuerdo con lo reportado por Abugoch *et al.* (2008) la fracción proteica con masa molecular entre 20-25 y 30-40 kDa corresponde a las globulinas, llamadas quenoproteínas. Todas las bandas menores de 20 kDa corresponden a albuminas de quinua (Brinegar *et al.* 1996).

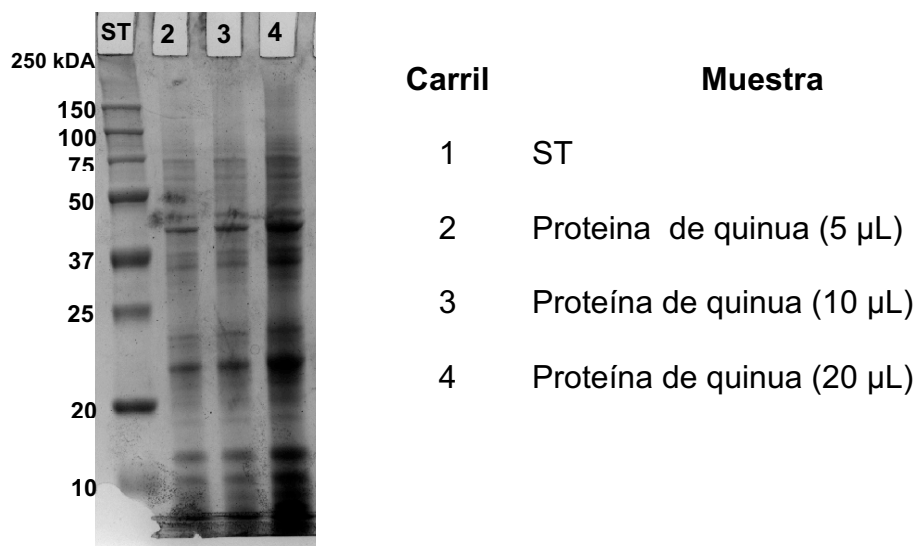


Figura 6. Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) del extracto de proteína de quinua

6.1.2 Potencial ζ y tamaño de partícula de QP y Q

Se evaluó el potencial ζ y tamaño de partícula de las soluciones de PQ y Q (Figura 7) utilizadas para la elaboración de los recubrimientos comestibles. Sabbah *et al.* (2016), mencionan que entre más grande sea el valor absoluto del potencial ζ mayor será la estabilidad de las suspensiones ensayadas. Hunter (2013), mencionó que suspensiones con potencial ζ arriba de un valor absoluto de 30 mV presentan en general buena estabilidad.

En los resultados obtenidos se puede observar que el Q (Figura 7A) muestra mayor potencial ζ y menor tamaño de partícula en valores ácidos de pH debido a que sus grupos aminos se encuentran protonados en pHs ácidos (Saïed y Aider, 2014). En cuanto a la PQ (Figura 7B), ésta presenta el mayor potencial ζ y menor tamaño de partícula en pH=11 ya que sus aminoácidos mayoritarios se encuentran cargados negativamente en pHs básicos, observando su punto isoeléctrico alrededor de pH=4.5. Estos comportamientos ya han sido ampliamente descritos tanto para la PQ como para el Q (Abugoch *et al.*, 2008; Lee y Hong, 2009).

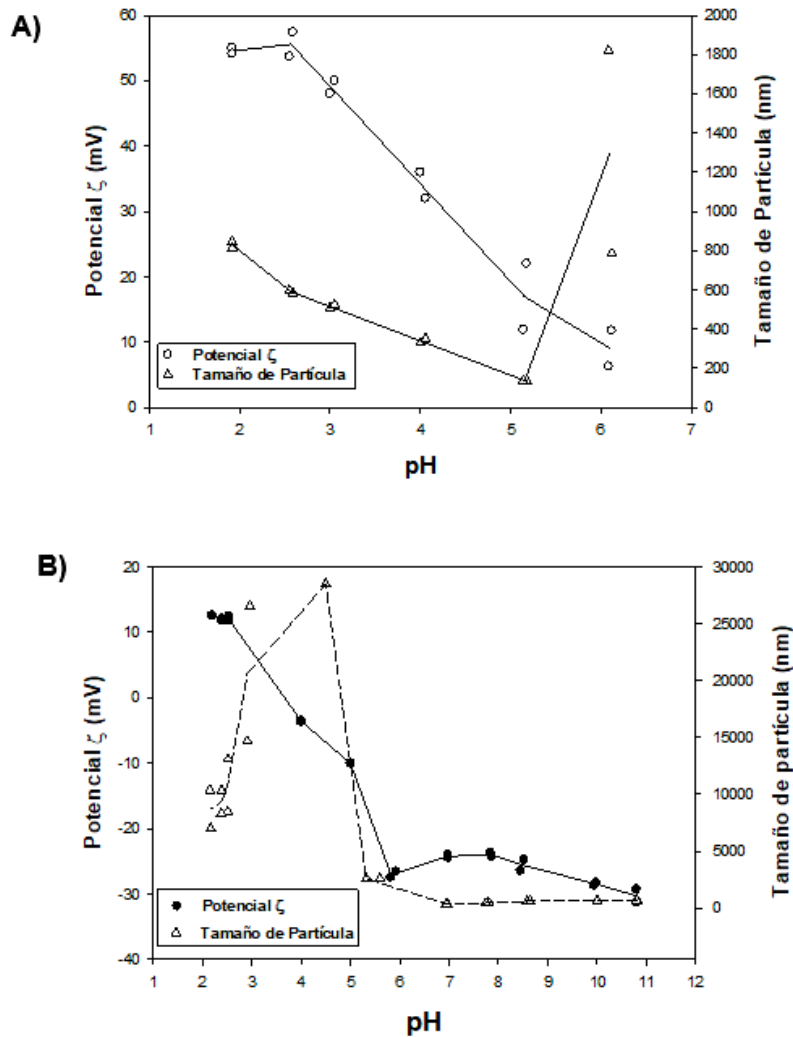


Figura 7. Potencial y tamaño de partícula de A) Quitosano y B) Proteína de quinua.

La formación de complejos electrostáticos y coacervados entre las proteínas y los polisacáridos se producen naturalmente en una diversidad de sistemas de seres vivos. Las interacciones proteína-polisacárido juegan un papel importante en el control de la estructura, textura y estabilidad de los RC. Bajo condiciones adecuadas las mezclas de proteínas y polisacáridos pueden mejorar las propiedades fisicoquímicas de los recubrimientos comestibles. Se ha reportado que parámetros como pH, fuerza iónica, concentración y proporción entre los polímeros, así como la distribución de la densidad de carga de los mismos pueden afectar la coacervación entre los biopolímeros (Moschakis *et al.*, 2010; Schmitt y Turgeon, 2011; Huang *et al.*, 2012). Por este motivo se realizó una titulación de la SF (Figura 8A) para conocer el pH más adecuado para elaborar los RC (mayor potencial ζ y el menor tamaño de partícula). Se puede observar que el mayor potencial ζ se encuentra a valores de $3 < \text{pH} < 4$, por lo que se eligieron estos valores de pH para la elaboración de los recubrimientos, siendo el pH 4 el que mostró formar mejores películas comestibles (observación macroscópica) (Figura 8B).

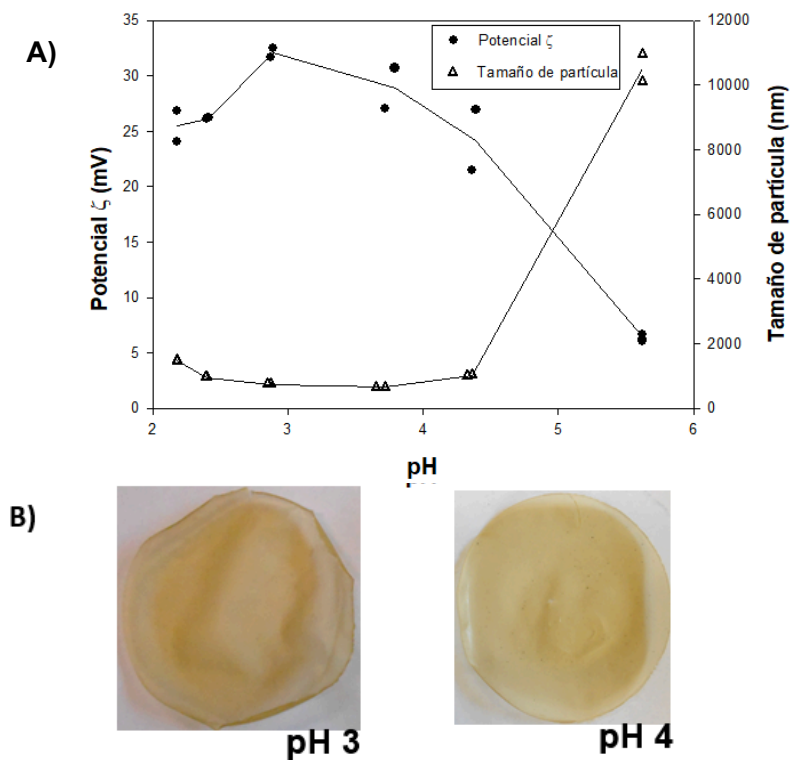


Figura 8. A) Potencial ζ y tamaño de partícula de suspensión filmogénica. B) Películas comestibles elaboradas a pH3 y pH 4

6.2 Formación de películas comestibles

Se obtuvieron doce PC a partir de la mezcla de los tres factores utilizados y sus respectivos niveles (PQ-Q, BW Y TG) (Figura 9).

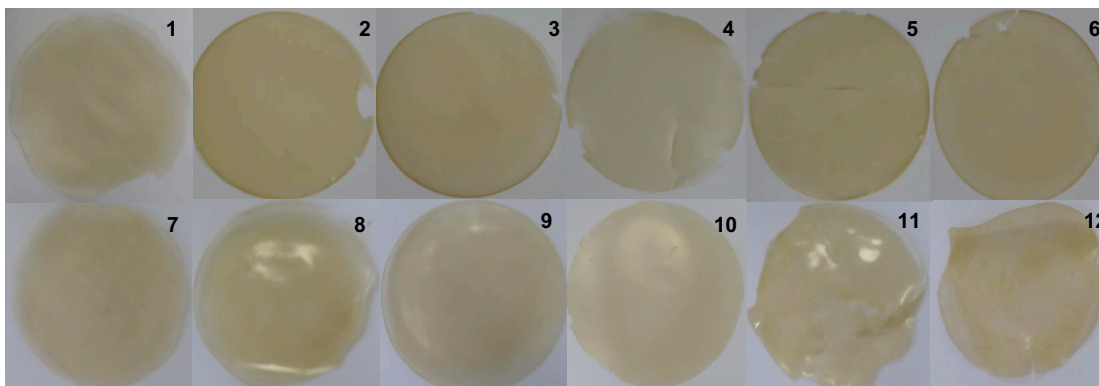


Figura 9. Películas comestibles obtenidas del diseño experimental para las suspensiones filmogénicas, según el Cuadro 7. Los números corresponden a los tratamientos que se mencionan en dicho cuadro.

6.3 Propiedades fisicoquímicas y estructurales de las películas comestibles

6.3.1 Potencial ζ , tamaño de partícula e índice de polidispersión de las suspensiones filmogénicas

El potencial ζ es un factor importante que nos brinda una estimación de la estabilidad de SF. Éste valor nos indica la carga de las películas en suspensión, entre más cargadas estén, tanto positiva o negativamente mayor repulsión tendrán y se mantendrán en suspensión más tiempo (Sabbah *et al.*, 2016). En el Cuadro 8 se presentan los resultados de potencial ζ , tamaño de partícula e índice de polidispersión de los 12 tratamientos.

Se puede observar que en general las suspensiones elaboradas con una proporción de Q-PQ 1:5 presentaron los potenciales ζ más elevados, en comparación con las suspensiones filmogénicas elaboradas con una proporción Q-PQ 1:10. Esto puede deberse a que en las suspensiones 1:5 Q-PQ se reduce el contenido de proteína, por lo tanto también se reduce su interacción con el Q, prevaleciendo mayoritariamente la carga positiva del Q (Cuadro 8).

Cuadro 8. Potencial ζ , tamaño de partícula e índice de polidispersión de las suspensiones filmogénicas

		Potencial ζ (mV)	Tamaño promedio de partícula (d.nm)	Índice de polidispersión	
1:10 Q:PQ	+TG	%BW (p/v)			
		0	20.93±0.21 ^f	3573.33±150.87 ^a	0.48±0.02 ^a
		0.1	32.73±0.83 ^c	312.93±2.94 ^f	0.61±0.05 ^f
	-TG	0.2	31.43±0.90 ^c	616.70±7.10 ^{bc}	0.53±0.05 ^{bc}
		0	44.20±0.26 ^a	291.50±2.88 ^f	0.27±0.01 ^f
		0.1	28.10±1.25 ^d	297.60±3.81 ^{de}	0.46±0.02 ^{de}
1:5 Q:PQ	+TG	0.2	23.00±0.35 ^{ef}	309.77±4.92 ^f	0.31±0.04 ^f
		0	38.67±1.10 ^b	453.73±10.56 ^e	0.27±0.02 ^e
		0.1	36.33±0.76 ^b	528.63±7.88 ^d	0.46±0.04 ^d
	-TG	0.2	32.10±0.80 ^c	543.97±0.85 ^{cd}	0.54±0.00 ^{cd}
		0	33.63±1.01 ^c	641.47±9.84 ^b	0.40±0.03 ^b
		0.1	33.23±0.87 ^c	284.93±4.08 ^f	0.26±0.02 ^{cd}
		0.2	23.80±0.87 ^e	256.83±6.24 ^f	0.28±0.01 ^f

Los resultados se reportan como la media \pm la desviación estándar (n=3).

Letras iguales indican que no existe diferencia significativa por la prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$).

En la mayoría de los casos la enzima TG estabilizó las SF observándose un incremento significativo ($\alpha < 0.05$) en el potencial ζ . Este mismo comportamiento lo observaron Porta *et al.* (2016) en películas elaboradas con una proteína extraída de una leguminosa (*Vicia ervila*) y pectina. Los autores comprobaron que al añadir TG el valor del potencial se incrementaba logrando una mayor estabilidad en las SF.

El tamaño de partícula generalmente se reporta como el valor promedio de tamaño de todas las partículas presentes en una suspensión. Este valor es el diámetro de una partícula hipotética que representa el número total de partículas en la muestra (Pérez-Gago y Krochta, 2001). El índice de polidispersión indica la variación relativa en la distribución del tamaño de partícula. Si todas las partículas dentro de una suspensión poseen el mismo tamaño de partícula se le llama suspensión monodispersa mientras que si existe un rango de tamaños de partícula se le denomina suspensión polidispersa (McClements, 2016; Sabbah *et al.*, 2016).

En este sentido, las SF evaluadas presentaron un comportamiento polidisperso debido a que en su composición está presente una mezcla de materiales de diferentes tamaños de partícula (PQ, Q, BW, TG). En cuanto a la relación entre tamaño de partícula e índice de polidispersión, se observó un incremento debido al uso de la enzima TG, ya que ésta forma redes poliméricas de mayor tamaño al entrecruzar los residuos de lisina y glutamina de la PQ.

Mediante el análisis estadístico se observó (Anexo 8.2) que la interacción entre los tres factores es significativa ($\alpha < 0.05$) por lo que es notorio observar que existe un efecto significativo en las variables respuesta al cambiar los niveles de dichos factores.

6.3.2 Espesor

Se midió el espesor de PC en 10 puntos de cada película (Figura 10). Los resultados de muestran que los doce tratamientos se encuentran en un rango de espesor entre 100-160 μm . Valenzuela *et al.* (2013), elaboraron películas a base de PQ-Q y obtuvieron espesores entre 101-126 μm , valores semejantes a los tratamientos sin BW.

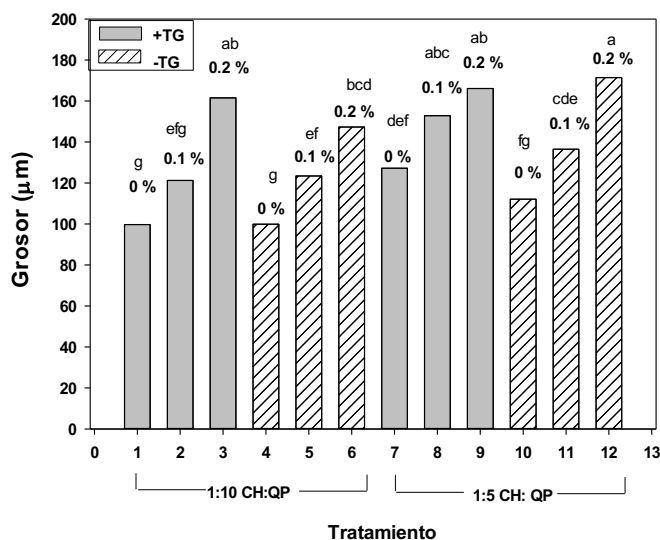


Figura 10. Espesor de las películas comestibles.

Los niveles de cera se presentan en la parte superior de cada barra
Se muestran las medias \pm la desviación estándar (n=3).

Letras iguales indican que no existe diferencia significativa por la prueba Tukey ($\alpha < 0.05$).

Se puede observar que existe una notoria tendencia a incrementar el grosor conforme se incrementa el porcentaje de BW, esto debido a que al incrementar la BW se aumentan la cantidad de sólidos por cm² en la película. Este comportamiento ya había sido reportado por Arredondo *et al.* (2016), en la elaboración de RC a base de almidón modificado y cera de abeja.

6.3.3 Opacidad

Se determinó el valor de opacidad para las películas comestibles (Figura 11), las cuales se encuentran en un rango del 55-65 %. Cecchini *et al.* (2017) elaboraron PC a base de proteína de suero y BW y obtuvieron un rango de valores de opacidad similares (51-65 %).

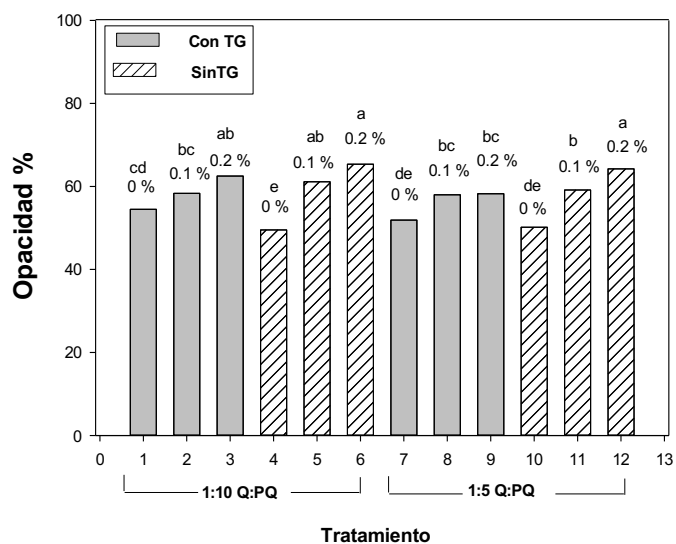


Figura 11. Opacidad de las películas comestibles.

Los niveles de cera se presentan en la parte superior de cada barra

Se muestran las medias \pm la desviación estándar (n=3).

Letras iguales indican que no existe diferencia significativa por la prueba Tukey ($\alpha < 0.05$).

6.3.4 Color

Se determinó el color de las PC mediante el uso de un colorímetro. Se utilizó la escala CIE Lab donde L* es la luminosidad y los parámetros de cromaticidad son a* (rojo-verde) y b* (amarillo-azul) (Figura 12) (Velickova *et al.*, 2013).

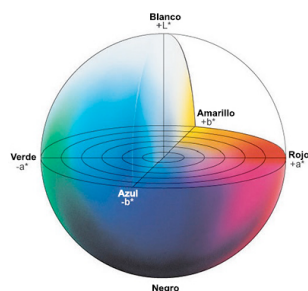


Figura 12. Escala CIE lab. Parámetros L^* , a^* , b^* (Konica Minolta, 2017).

En los resultados obtenidos se puede observar que, en general, las PC son de color amarillento (Figura 13). Además conforme aumentó la cantidad de cera en las películas, el valor de a^* y b^* también aumentó lo que se traduce en un incremento del color amarillo.

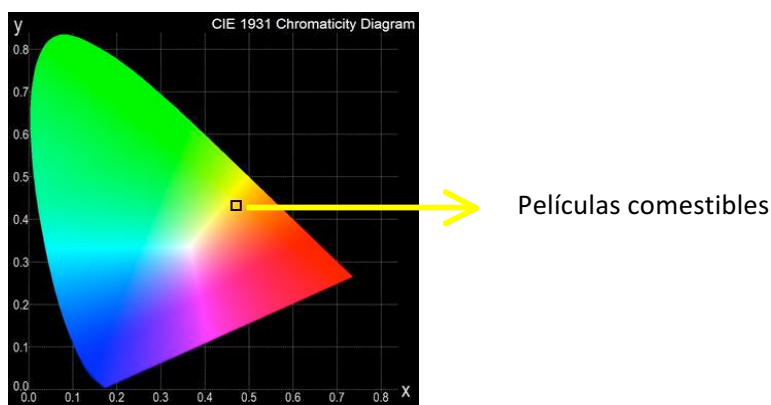


Figura 13. Color de las películas comestibles

La luminosidad en todos los tratamientos disminuyó conforme el porcentaje de cera aumentó. Este resultado confirma el resultado de opacidad, en el que vemos que la opacidad incrementa conforme aumenta la cantidad de BW (Cuadro 9). El mismo comportamiento lo obtuvieron Cecchini *et al.* (2017), en películas formuladas con proteína de suero y cera de abeja.

Cuadro 9. Parámetros de color L*, a* y b* de las películas comestibles.

			L*	a*	b*
			% BW (p/v)		
1:10 Q:QP	+ TG	0	81.02 ± 0.10 ^{abcd}	-0.95 ± 0.00 ^{cdef}	21.31 ± 0.29 ^a
		0.1	80.66 ± 0.08 ^{bcd}	-0.82 ± 0.02 ^{bcd}	23.88 ± 0.02 ^a
		0.2	80.29 ± 0.46 ^{bcd}	-0.51 ± 0.04 ^{bcd^{ef}}	26.06 ± 0.46 ^a
	- TG	0	83.08 ± 1.45 ^{ab}	-1.32 ± 0.10 ^{ef}	19.39 ± 1.79 ^a
		0.1	81.02 ± 0.72 ^{cd}	-1.20 ± 0.14 ^b	24.81 ± 0.52 ^a
		0.2	79.27 ± 0.01 ^{abcd}	-0.22 ± 0.00 ^{ef}	28.74 ± 0.10 ^a
1:5 Q:QP	+ TG	0	82.72 ± 1.57 ^{ab}	-1.17 ± 0.42 ^{def}	26.86 ± 2.41 ^a
		0.1	80.80 ± 0.41 ^d	-0.72 ± 0.10 ^a	26.20 ± 0.14 ^a
		0.2	78.43 ± 0.30 ^{bcd}	0.48 ± 0.08 ^{bcd^e}	30.68 ± 0.20 ^a
	- TG	0	83.90 ± 0.44 ^a	-1.45 ± 0.03 ^f	15.45 ± 0.10 ^a
		0.1	82.50 ± 0.23 ^{abc}	-0.98 ± 0.32 ^{bc}	25.51 ± 0.05 ^a
		0.2	82.07 ± 0.86 ^{ab}	-0.44 ± 0.17 ^{cdef}	27.43 ± 0.35 ^a

Los resultados se reportan como la media ± la desviación estándar (n=3).
Letras iguales indican que no existe diferencia significativa por la prueba Tukey(α<0.05).

6.3.5 Actividad enzimática de la enzima transglutaminasa (SDS-page)

Mediante un gel de electroforésis se evaluó el entrecruzamiento realizado por la enzima transglutaminasa en la PQ y las SF. En la Figura 14 se puede observar, en la banda 2, a la proteína de quinua y en la banda 3 a la PQ entrecruzada por efecto de la catálisis por la enzima TG. La PQ es un buen substrato para la enzima ya que las subunidades proteicas de pesos moleculares entre 10-37 kDa se desvanecieron y apareció una subunidad de 250 kDa formada debido al entrecruzamiento enzimático (Mariniello *et al.*, 2003; Di Pierro *et al.*, 2006).

En cuanto a las suspensiones filmogénicas, se observa que la actividad de la enzima se ve disminuida, pudiendo deberse al impedimento estérico debido a la complejación entre la PQ y el Q. Mediante el software Image Lab (Biorad, Hércules, California) se calculó que el porcentaje de proteína entrecruzada fue 27.2 % mientras que para las suspensiones filmogénicas se

redujo a 8.5 % (1:5 Q: PQ), 12.5 % (1:10 Q:PQ), 8.5 % (1:5 Q:PQ+cera) y 12.5 % (1:10 Q:PQ+ cera).

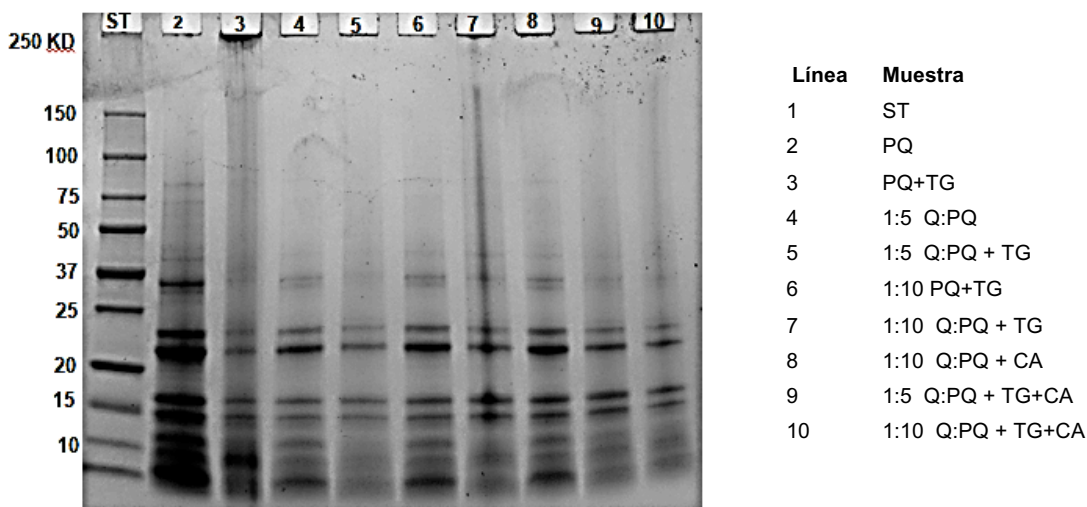


Figura 14. SDS PAGE de proteína de quinua y suspensiones filmogénicas adicionada con transglutaminasa

6.3.6 Propiedades mecánicas de las películas comestibles

Debido a que las PC formadas con una proporción de Q-PQ 1:5 mostraron los valores de potencial ζ más altos así como también las mejores características macroscópicas se decidió continuar incluyendo únicamente la caracterización de éstos tratamientos .

Se evaluaron la resistencia a la tensión y la elongación al punto de quiebre, así como también el módulo elástico (módulo de Young). Estos parámetros son un indicador de la rigidez del material (Giosafatto *et al.*, 2014). Un alto valor del módulo elástico indica que el material es rígido, mientras que un bajo valor de este parámetro indica un material elástico. Es decir que mientras más elástico es un objeto, es mucho menos rígido.

En los resultados obtenidos (Cuadro 10) se observa que en todos los casos la tensión al punto de ruptura y la elongación disminuyeron conforme el porcentaje de BW aumento. De hecho, cabe destacar que las películas elaboradas con 0.2 % de BW no pudieron ser medidas debido a sus pobres propiedades mecánicas.

Cecchini *et al.* (2017) reportaron que las propiedades mecánicas de PC a base de proteína de suero y BW disminuyeron drásticamente sus propiedades mecánicas en comparación con aquellas únicamente elaboradas con proteínas de suero. Según los autores, la causa de la disminución en estos parámetros se debe a una disrupción en la matriz continua del biopolímero, que induce una estructura heterogénea en las películas.

Cuadro 10. Propiedades mecánicas de las películas comestibles

Tratamiento	Tensión (MPa)	Elongación (%)	Módulo de Young (MPa)
1:5 Q:PQ 0 % BW-TG	1.24 ± 0.09 ^a	18.26 ± 1.5 ^a	25.717 ± 0.99 ^a
1:5 Q:PQ 0.1 % BW -TG	0.61 ± 0.07 ^b	6.209 ± 0.03 ^b	28.750 ± 0.89 ^b
1:5 Q:PQ 0.2 % BW -TG	-	-	-
1:5 Q:QPQ 0.0 % BW +TG	1.86 ± 0.27 ^c	11.49 ± 0.56 ^c	91.04 ± 15.1 ^c
1:5 Q:QP 0.1 % BW +TG	0.35 ± 0.01 ^d	5.49 ± 0.02 ^d	27.769 ± 1.69 ^d
1:5 Q:QP 0.2 % BW +TG	-	-	-

Los resultados se reportan como la media ± la desviación estándar (n=3).

Letras iguales indican que no existe diferencia significativa por la prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$).

6.3.7 Propiedades de barrera

La funcionalidad de las PC esta basada en sus propiedades fisicoquímicas, mecánicas y de permeabilidad. Estas propiedades dependen de la composición de la película, su proceso de formación y el método de aplicación sobre el alimento modelo. (García *et al.*, 2018).

La permeabilidad al vapor de agua, oxígeno y dióxido de carbono son de los factores mas importantes de un recubrimiento, ya que, en gran medida, de ella depende la modulación de transferencia de masa entre el alimento recubierto y su medio ambiente. En el Cuadro 11 se presentan los valores de permeabilidad obtenidos para cada recubrimiento. No se evaluó la permeabilidad de los recubrimientos con 0.2 % de BW debido a sus pobres propiedades mecánicas.

Se puede observar que no existe diferencia significativa en los recubrimientos con y sin cera (sin entrecruzamiento) en cuanto a permeabilidad de

vapor de agua. En la permeabilidad al oxígeno y dióxido de carbono si existe diferencia significativa, observándose que la TG incrementó la permeabilidad de las PC e inclusive en algunos casos la permeabilidad fue tan alta que el equipo no pudo medirla. Porta *et al.* (2015) reportan el mismo comportamiento para la permeabilidad al vapor de agua en películas elaboradas a base de proteína (*Vicia ervilia*) y pectina entrecruzadas con TG. Sin embargo, los autores obtuvieron una reducción en la permeabilidad al O₂ y CO₂. Ellos concluyen que este efecto se debió a la acción entrecruzante de la TG la estructura de las PC se vuelve más compacta. En este trabajo se observó un comportamiento contrario con respecto al O₂ y CO₂. La adición de la enzima aumentó la permeabilidad para estos gases. Esto podría deberse a que la interacción entre la proteína de quinua y quitosano es una coacervación compleja (Gontard *et al.*, 1992) de dos polímeros con cargas eléctricas opuestas y la transglutaminasa podría estar entrecruzando a la proteína entre sí y reduciendo la complejación de ésta con el Q afectando así las propiedades de barrera.

Cuadro 11. Determinación de permeabilidad al CO₂, O₂ y vapor de agua, de las películas comestibles

Tratamiento	Vapor de agua	O ₂	CO ₂
	$X 10^{-6} \frac{\text{cm}^3 * \text{mm}}{\text{m}^2 * \text{s} * \text{kPa}}$		
1:5 Q:PQ	1.09 ± 0.01 ^a	15.73 ± 3.07 ^b	13.26 ± 0.91 ^a
1:5 Q:PQ + BW	1.64 ± 0.12 ^a	164.527 ± 21.16 ^a	292.02 ± 1.55 ^b
1:5 Q:PQ +TG	-	-	-
1:5 Q:PQ +BW+TG	2.69 ± 0.33 ^b	207.69 ± 7.77 ^a	-
Mater-BI*	22.69 ± 0.11	8.35 ± 0.23	15.68 ± 0.11
Polietileno de baja densidad**	7	1	0.2
Polietileno de alta densidad**	1	0.03	0.04

Los resultados se reportan como la media ± la desviación estándar (n=3).

Letras iguales indican que no existe diferencia significativa por la prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$).

- Tratamientos en los que no fue posible medir la permeabilidad.

* Películas de almidón y poliésteres biodegradables. Comercializada por Novamont Spa.

(Novara, Italia)(Di Pierro *et al.*, 2006).

** Polietileno de baja y alta densidad (Goodfellow, 2018)

A pesar de que las PC mostraron alta permeabilidad al O₂ y CO₂ cabe resaltar que son una excelente barrera al vapor de agua ya presentan valores muy bajos de permeabilidad (aproximadamente 20 veces menor a Mater Bi y 7 veces menor que el polietileno de baja densidad). Esta propiedad de barrera es muy importante en las PC ya que al ser aplicadas como un recubrimiento sobre una matriz alimentaria pueden disminuir la transferencia de agua entre el alimento y su ambiente, provocando menor deterioro del mismo y alargando su vida de almacenamiento

6.3.8 Actividad antimicrobiana del aceite esencial de limón

Se determinó la actividad antimicrobiana del AEL contra tres microorganismos: *Saccharomyces cerevisiae*, *Micrococcus luteus* y *Leuconostoc mesenteroides*. Se puede apreciar (Figura 15) que el microorganismo más sensible al agente antimicrobiano fue *Saccharomyces cerevisiae*, seguido de *Micrococcus luteus*. *Leuconostoc mesenteroides* mostró una menor sensibilidad al agente antimicrobiano lo que se aprecia en la reducción significativa del diámetro de la zona de inhibición ($\alpha < 0.05$)

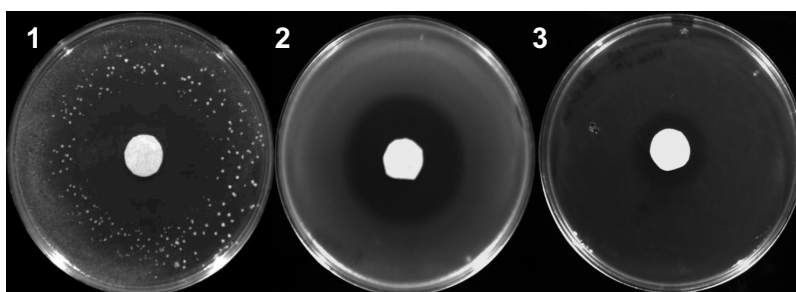


Figura 15. Actividad antimicrobiana del AEL. 1) *Saccharomyces cerevisiae* 2) *Micrococcus luteus* 3) *Leuconostoc mesenteroides*

Cuadro 12. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de limón

Microorganismo	Diámetro de la zona de inhibición (mm)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43.18 ± 0.35 ^a
<i>Micrococcus luteus</i>	35.21 ± 1.10 ^b
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	20.56 ± 0.19 ^c

Los resultados se reportan como la media ± la desviación estándar (n=3).
Letras iguales indican que no existe diferencia significativa por la prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$)

Debido a su naturaleza lipofílica, los aceites esenciales pasan a través de la pared celular y de la membrana citoplasmática, provocando una disrupción en la estructura de sus diferentes capas de ácidos grasos y fosfolípidos y por lo tanto la permeabilizan. En las bacterias la permeabilización de la membrana se asocia con pérdida de iones, reducción del potencial de membrana y colapso de la bomba de protones (Jing *et al.*, 2014).

En células eucariotas, los aceites esenciales pueden provocar la despolarización de la membrana mitocondrial debido a la disminución del potencial de membrana lo cual afecta a los canales de calcio y otros iones y reduce el gradiente de pH, afectando al igual que en bacterias, la bomba de protones (Bakkali *et al.*, 2008).

6.3.9 Concentración inhibitoria del aceite esencial de limón (AEL)

Se determinó la concentración inhibitoria (concentración en la cual se inhibió el crecimiento visible) del AEL contra los microorganismos seleccionados (*Saccharomyces cerevisiae*, *Micrococcus luteus*, *Leuconostoc mesenteroides*).

Para los tres microorganismos la concentración inhibitoria fue 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Cuadro 13). En esta concentración no se observó crecimiento visible para ninguno de los microorganismos ensayados. Hammer *et al.* (1999) reportaron una concentración mínima inhibitoria de AEL similar a la obtenida en este trabajo, para *Candida albicans* de 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$, para *E. faecalis*, *P. aeuroginosa* y *S. aureus* la concentración mínima inhibitoria reportada fue > 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Cuadro 13. Concentración inhibitoria del AEL

Microorganismo	Concentración $\mu\text{L mL}^{-1}$			
	1	2.5	5	7.5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	+	+	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	+	-	-

+ =crecimiento - = inhibición de crecimiento

Los resultados se reportan como la media \pm la desviación estándar (n=3).

Letras iguales indican que no existe diferencia significativa por la prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$).

6.3.10 Actividad antimicrobiana de las películas comestibles

Se determinó la actividad antimicrobiana de las PC adicionadas con AEL (Cuadro 14). Las PC con enzima TG se descartaron del estudio para los análisis posteriores debido a sus bajas propiedades mecánicas y de barrera (apartados 6.3.6, 6.3.7). Se probaron tres concentraciones diferentes de AEL partiendo de la concentración inhibitoria obtenida en el apartado 6.3.9. Se observó que las tres concentraciones ensayadas mostraron zonas de inhibición de crecimiento de los tres microorganismos (Figura 16), sin embargo, se eligió la concentración 7.5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ debido a que a partir de esta concentración se obtuvo una mayor difusión del aceite esencial de limón.

Cuadro 14 . Diámetro de la zona de inhibición de las películas activas comestibles de Q-PQ, BW Y AEL

Concentración de AEL ($\mu\text{L mL}^{-1}$)		Microorganismo		
		<i>S. cerevisiae</i>	<i>M. luteus</i>	<i>L. mesenteroides</i>
5	Sin cera	1.68 \pm 0.27 ^b	2.11 \pm 0.42 ^{ab}	1.4 \pm 0.00 ^c
	Con cera	1.62 \pm 0.23 ^b	1.62 \pm 0.23 ^b	1.40 \pm 0.00 ^c
7.5	Sin cera	2.27 \pm 0.23 ^{ab}	2.38 \pm 0.25 ^{ab}	2.31 \pm 0.02 ^a
	Con cera	2.09 \pm 0.12 ^{ab}	2.27 \pm 0.32 ^{ab}	2.09 \pm 0.05 ^b
10	Sin cera	2.57 \pm 0.32 ^a	2.57 \pm 0.11 ^a	2.12 \pm 0.17 ^{ab}
	Con cera	2.26 \pm 0.30 ^{ab}	2.28 \pm 0.22 ^{ab}	2.11 \pm 0.08 ^{ab}

Los resultados se reportan como la media \pm la desviación estándar.

Letras iguales (vertical) indican que no existe diferencia significativa por la prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$).

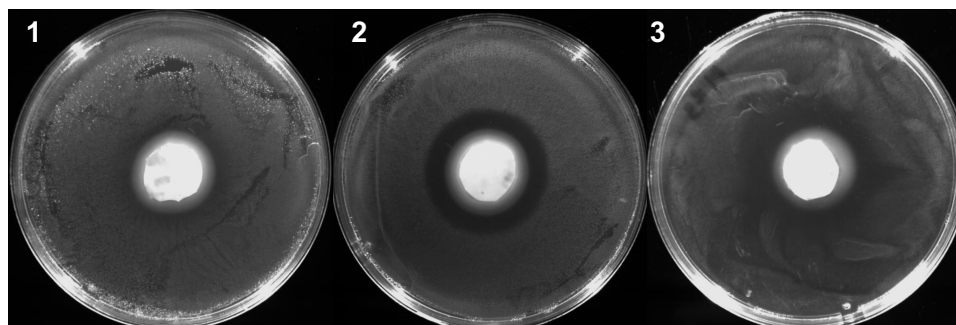


Figura 16. Actividad antimicrobiana de las películas comestibles con cera añadida y 7.5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de AEL. 1) *Saccharomyces cerevisiae* 2) *Micrococcus luteus* 3) *Leuconostoc mesenteroides*

Otro aspecto considerado para elegir esta concentración es el reportado por Arredondo-Ochoa *et al.* (2017) ya que la actividad del agente antimicrobiano se ve reducida cuando se incorpora a un recubrimiento comestible a causa de la presencia de otros compuestos que pueden reducir la difusión del mismo. El microorganismo más sensible a la actividad de las películas comestibles fue *M. luteus* seguido de *S. cerevisiae* y *L. mesenteroides*.

6.4 Propiedades fisicoquímicas de las películas y recubrimientos comestibles con AEL

6.4.1 Angulo de contacto y mojabilidad

En el área de RC, la mojabilidad puede ser definida como la tendencia que tiene el recubrimiento a dispersarse sobre la superficie de un alimento (Andrade *et al.*, 2014). En el proceso de recubrir los alimentos mínimamente procesados la medición de la mojabilidad es muy importante ya que es un indicativo de la compatibilidad entre una SF y el alimento a recubrir (Hun y Gennadios, 2005).

En general, cuando se coloca un recubrimiento líquido sobre la superficie de un alimento, el recubrimiento puede extenderse sobre la superficie del alimento, es decir, lo moja completamente o bien forma un contacto finito con la superficie del alimento. Cuando el ángulo de contacto está entre 0° y 90° , la situación se denomina mojado parcial, mientras que si el ángulo de contacto es mayor que 90° , se considera que el líquido no moja la superficie (Figura 17). (Andrade *et al.*, 2014).

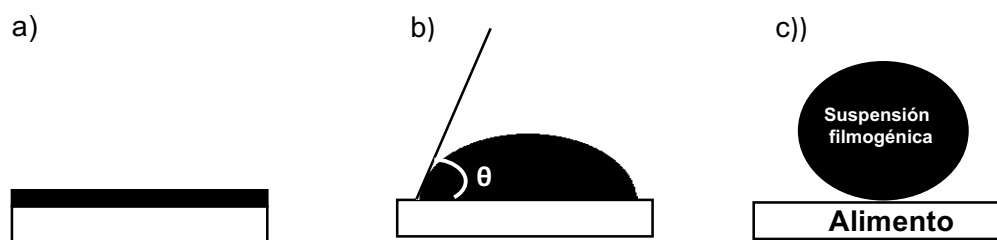


Figura 17. Suspensión filmogénica sobre la superficie de un alimento. a) Mojado total ($\theta=0$), b) Mojado parcial ($0 < \theta < 90^\circ$), c) Mojado nulo ($\theta > 90^\circ$) (Ricardo Andrade *et al.*, 2016)

Todos los tratamientos evaluados presentaron ángulos de contacto menores a 90 °, siendo significativamente diferentes entre sí. Los factores BW y AEL presentaron una interacción significativa ($\alpha < 0.05$) (Anexo 8.2) lo que significa que su efecto sobre la variable respuesta cambia al modificar los niveles de dichos factores (Cuadro 15). Se puede observar que el ángulo de contacto de las suspensiones filmogénicas con AEL es mayor debido a que su hidrofobicidad aumentó con la adición del AEL. En cuanto a la tensión superficial, todas las suspensiones son significativamente diferentes, la BW y el AEL tienen una interacción significativa ($\alpha < 0.05$). La tensión superficial de las SF disminuye con la adición de lípidos (BW y AEL).

Cuadro 15 . Tensión superficial y ángulo de contacto de las suspensiones filmogénicas

Tratamiento	Tensión superficial mN/m	Angulo de contacto °
1:5 Q:QP	49.11 ± 0.51 ^a	16.20 ± 0.40 ^a
1:5 Q:QP 0.1% BW	43.25 ± 0.00 ^b	14.40 ± 0.21 ^b
1:5 Q:QP + AEL	35.49 ± 0.62 ^c	18.20 ± 0.10 ^c
1:5 Q:QP 0.1% BW + AEL	33.73 ± 0.30 ^d	22.50 ± 0.06 ^d

Los resultados se reportan como la media ± la desviación estándar (n=3).

Letras iguales indican que no existe diferencia significativa por la prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$).

Resolviendo las ecuaciones 2, 3 y 4 se obtuvo el coeficiente de mojabilidad presentado en el Cuadro 16. Recordando que entre más cercano a cero sea este coeficiente, la superficie evaluada se mojará más por el líquido (Sánchez-Ortega, *et al.*, 2016). En este sentido, todas las suspensiones filmogénicas presentaron valores muy cercanos a cero por lo que se puede inferir que la superficie de la tuna es altamente mojable por las suspensiones filmogénicas. El análisis estadístico (anexo 8.3) muestra que la interacción entre el AEL y la BW influye en el coeficiente de mojabilidad.

Cuadro 16. Fuerzas adhesivas, fuerzas cohesivas y coeficiente de mojabilidad de las suspensiones filmogénicas.

Tratamiento	Fuerzas adhesivas mN/m	Fuerzas cohesivas mN/m	Coefficiente de Mojabilidad mN/m
1:5 Q:QP	96.16 ± 1.09 ^a	98.22 ± 1.02 ^a	-2.06 ± 0.08 ^a
1:5 Q:QP 0.1% BW	85.17 ± 0.04 ^b	86.49 ± 0.00 ^b	-1.32 ± 0.04 ^b
1:5 Q:QP + AEL	69.22 ± 1.22 ^c	70.98 ± 1.23 ^c	-1.76 ± 0.02 ^c
1:5 Q:QP 0.1% BW + AEL	64.90 ± 0.56 ^d	67.46 ± 0.59 ^d	-2.56 ± 0.03 ^d

Los resultados se reportan como la media (n=3) ± la desviación estándar.

Letras iguales indican que no existe diferencia significativa por la prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$).

6.4.2 Microscopía electrónica de barrido

La morfología de las PC se evaluó utilizando un microscopio electrónico de barrido. La microscopía muestra que las películas comestibles elaboradas presentan, en general una superficie homogénea, lisa y continua que es comparable a la de otras películas elaboradas base de quitosano y proteína de quinua (Figura 18) (Abugoch *et al.*, 2011; Valenzuela *et al.*, 2013).

Se puede observar claramente que las películas adicionadas con BW presentan algunas partículas más grandes y menor homogeneidad, esto puede deberse a la interacción entre los diversos componentes de las películas: PQ, Q y BW. Las PC adicionadas con aceite AEL muestran superficies menos rugosas en comparación con las películas sin AEL demostrando que el aceite esencial se emulsificó de manera adecuada en la matriz polimérica. Las PC con AEL pueden presentar una superficie más lisa y homogénea debido a que la PQ, la BW y el AEL pueden interactuar mediante sus grupos hidrófobos ocasionando una inmovilización de las cadenas proteicas en la interfase lipídica lo que se traduce en la formación de una estructura más compacta y ordenada (Pérez-Gago y Krochta, 2001).

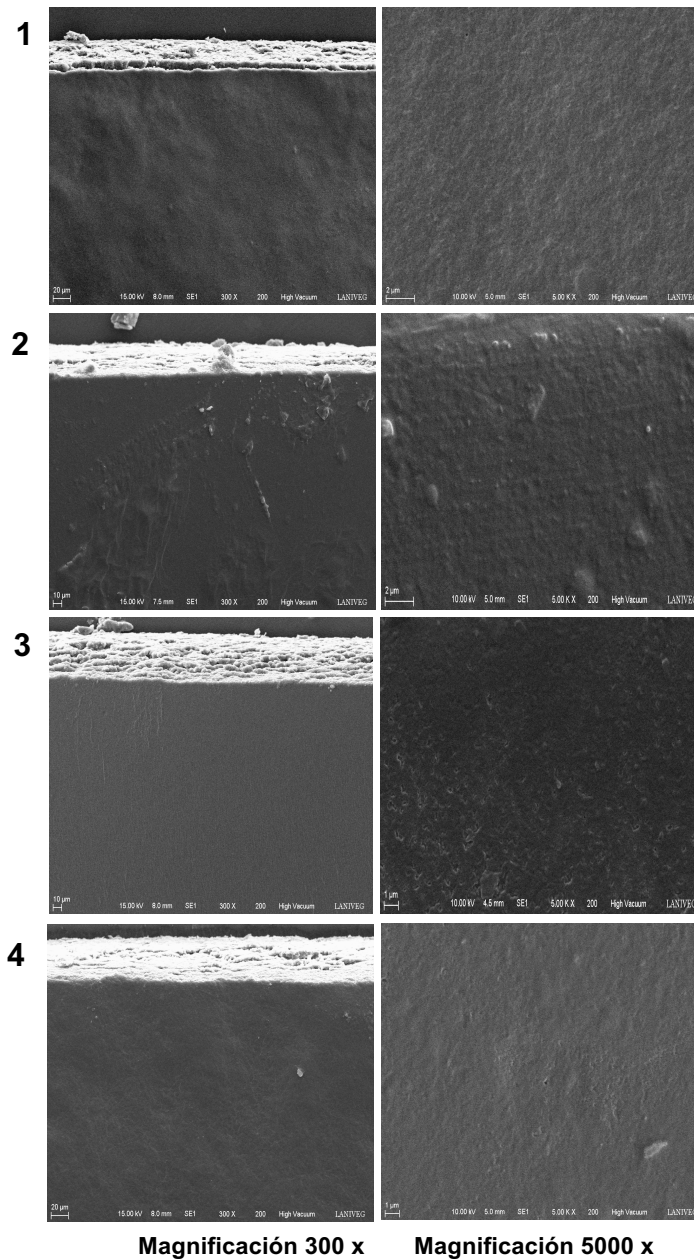


Figura 18. Microscopía electrónica de barrido. 1) PQ-Q 2) PQ-Q+ cera 3) PQ-Q + AEL 4) PQ-Q + cera + AEL

6.5 Aplicación del recubrimiento

Las frutas y verduras mínimamente procesadas han ganado mayor popularidad debido a la demanda por parte de los consumidores de alimentos frescos listos para el consumo. Estos productos se preparan y manejan para mantener su condición fresca, pero al mismo tiempo para conveniencia del

consumidor. Desafortunadamente el procesamiento mínimo acelera el deterioro del producto (Piga *et al.*,2000). Las operaciones de pelado, cortado o rebanado alteran la integridad del fruto e incrementan la susceptibilidad del mismo a la contaminación microbiana (Nobile *et al.*, 2009) .

La tuna (*Opuntia* spp.) es una fruta nativa de México. En Italia se puede encontrar en las regiones del sur y está disponible de agosto a diciembre. A pesar de que México es el principal país productor de éste fruto, Italia es el país líder en exportaciones debido a que posee mayor tecnología que le permite mantener la calidad por un tiempo más prolongado (SAGARPA, 2015).

La tuna es apreciada por su sabor y jugosidad. Sin embargo el principal problema para su comercialización es que es un producto altamente perecedero debido a su bajo contenido de acidez y alto contenido de azúcar lo que la hace susceptible al deterioro microbiano y limita su almacenamiento en fresco.(Ochoa-Velasco y Guerrero-Beltrán, 2014). En este trabajo se realizó la evaluación del efecto antimicrobiano de películas comestible PC adicionadas con AEL y se evaluó su aplicación en tuna mínimamente procesada. Para la aplicación del recubrimiento se eligió la SF 1:5 Q-PQ con 0.1 % BW adicionada con 7.5 μ L/mL de AEL. Esta SF se eligió debido a las propiedades fisicoquímicas y antimicrobianas descritas en los apartados anteriores. El RC se evaluó a lo largo de 9 días de almacenamiento (Figura 19) .

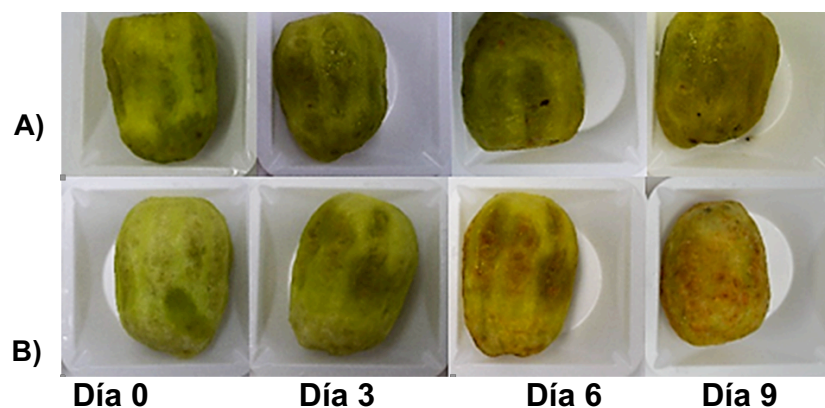


Figura 19. Evaluación de la aplicación del recubrimiento en tunas mínimamente procesadas A) Control B) Recubrimiento

6.5.1 Pérdida de Peso

En la Figura 20 se muestra el porcentaje de pérdida de peso en función del tiempo de almacenamiento. Se observa claramente que la pérdida de agua (pérdida de peso) incrementó a lo largo del periodo de almacenamiento tanto para el control como para las muestras con recubrimiento. Los valores de porcentaje de pérdida de peso entre el control y el recubrimiento muestran diferencias significativas ($\alpha > 0.05$) (Anexo 8.3). Las muestras control perdieron 4.98 % (p/p) de su peso, mientras que las muestras con recubrimiento perdieron 3.8 % (p/p) de peso durante los nueve días de almacenamiento. Esto puede deberse a que el RC aplicado presenta bajos valores de permeabilidad al agua (Cuadro 11) y está actuando como una barrera que disminuye la transferencia de agua del alimento al exterior.

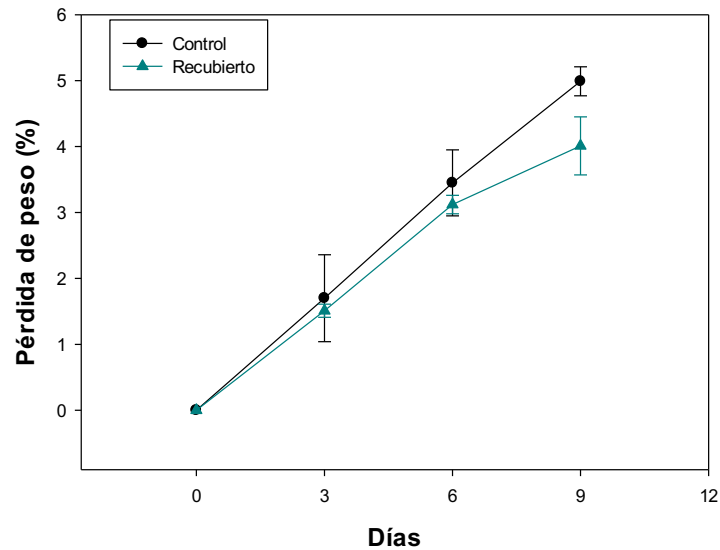


Figura 20. Porcentaje de pérdida de peso en tunas (*Opuntia ficus-indica*).

La pérdida de peso que presenta la tuna en poscosecha depende de varios factores, dentro de los cuales los más importantes son la temperatura y humedad relativa de almacenamiento, estado de madurez del fruto y variedad del mismo (Ramírez-Villa, 2012).

Ochoa-Velasco y Guerrero-Beltrán (2014) obtuvieron el mismo comportamiento en tunas utilizando un recubrimiento a base de quitosano y ácido acético, su recubrimiento redujo el porcentaje de pérdida de peso en comparación

con las muestras control. Ellos concluyeron que el quitosano crea una barrera estable y uniforme en la mayoría de las frutas y vegetales impidiendo la transferencia de masa en los mismos.

Abugoch *et al.* (2016) realizaron un recubrimiento con una mezcla de PQ-Q y aceite de girasol y posteriormente lo aplicaron en frutillas, sin embargo, observaron que su recubrimiento aumentaba la pérdida de peso en los frutos al igual que disminuía la firmeza y modificaba el color. Este resultado pudo deberse a que las frutillas presentan una elevada tasa de respiración y el recubrimiento interfirió en la transferencia de gases provocando su deterioro

6.5.2 Color

La Figura 21 muestra la luminosidad, cambio de color (ΔE) y Hue de las tunas mínimamente procesadas. Los tres parámetros presentan un cambio significativo a través del tiempo ($\alpha > 0.05$). Solo los parámetros cambio de color (ΔE) y Hue son diferentes significativamente entre los frutos control y los frutos con recubrimiento (Anexo 8.4). Las tunas tenían un color verde pálido inicialmente, sin embargo, apareció un ligero oscurecimiento debido al pardeamiento enzimático lo que contribuyó a que se originara una disminución en la luminosidad y un cambio de color.

Desde el día 0 los frutos recubiertos presentaron mayores valores de luminosidad (Figura 21A) en comparación con las tunas control, esto pudo ser debido a la diferencia del estado de madurez de los frutos seleccionados, sin embargo, estadísticamente no se encontró diferencia significativa entre el control y el recubrimiento, lo que significa que ambos disminuyeron en la misma proporción con respecto al tiempo. Kader y Pelayo-Zaldivar, (2002) mencionan que el pardeamiento enzimático es uno de los principales problemas fisiológicos de los productos mínimamente procesados que influye negativamente en la luminosidad del producto. Es el resultado de la oxidación de los sustratos fenólicos por la enzima polifenoloxidasas. El grado de oxidación depende de la concentración de enzima en el fruto, concentración de compuestos fenólicos, pH, oxígeno y presencia de compuestos antioxidantes. Se han propuesto diversos métodos que

pueden disminuir o inhibir la acción de la enzima polifenol oxidasa. El ácido ascórbico, ácidos orgánicos y sales de calcio han sido aplicados con éxito (Ramírez-Villa, 2012; Ochoa-Velasco y Guerrero-Beltrán, 2014), logrando reducir el pardeamiento enzimático por lo que se recomienda que antes de aplicar cualquier recubrimiento se realice una inmersión del fruto en alguno de estos compuestos.

En la Figura 21 B) se muestra un cambio significativo de color a través del tiempo de medición, al igual que se observan diferencias significativas entre el control y el recubrimiento. Se puede observar que el recubrimiento retarda y disminuye el cambio total de color en los frutos.

El ángulo Hue sirve para identificar el espacio de color. En otras palabras el valor Hue se refiere a los colores del espectro de la luz visible, desde el rojo al púrpura, donde no intervienen los valores de luminosidad (Selva, 2011). En la Figura 21 C) se observa un cambio significativo de los tratamientos con respecto al tiempo. También se observa que el recubrimiento disminuye el ángulo Hue, lo que significa que las tunas disminuyen el color verde y se inclinan a los tonos rojizos. Este es un resultado contrario a lo que se esperaba, ya que el cambio de color total en las tunas con recubrimiento fue menor que en las tunas recubiertas. La discrepancia entre estos dos resultados es debido a que en el (ΔE) se toma en cuenta el valor de luminosidad, el cual fue mayor para los frutos recubiertos contrarrestando así el cambio total de color. Por este motivo es importante recalcar la importancia de la inhibición de la enzima polifenoloxidas antes de aplicar cualquier recubrimiento.

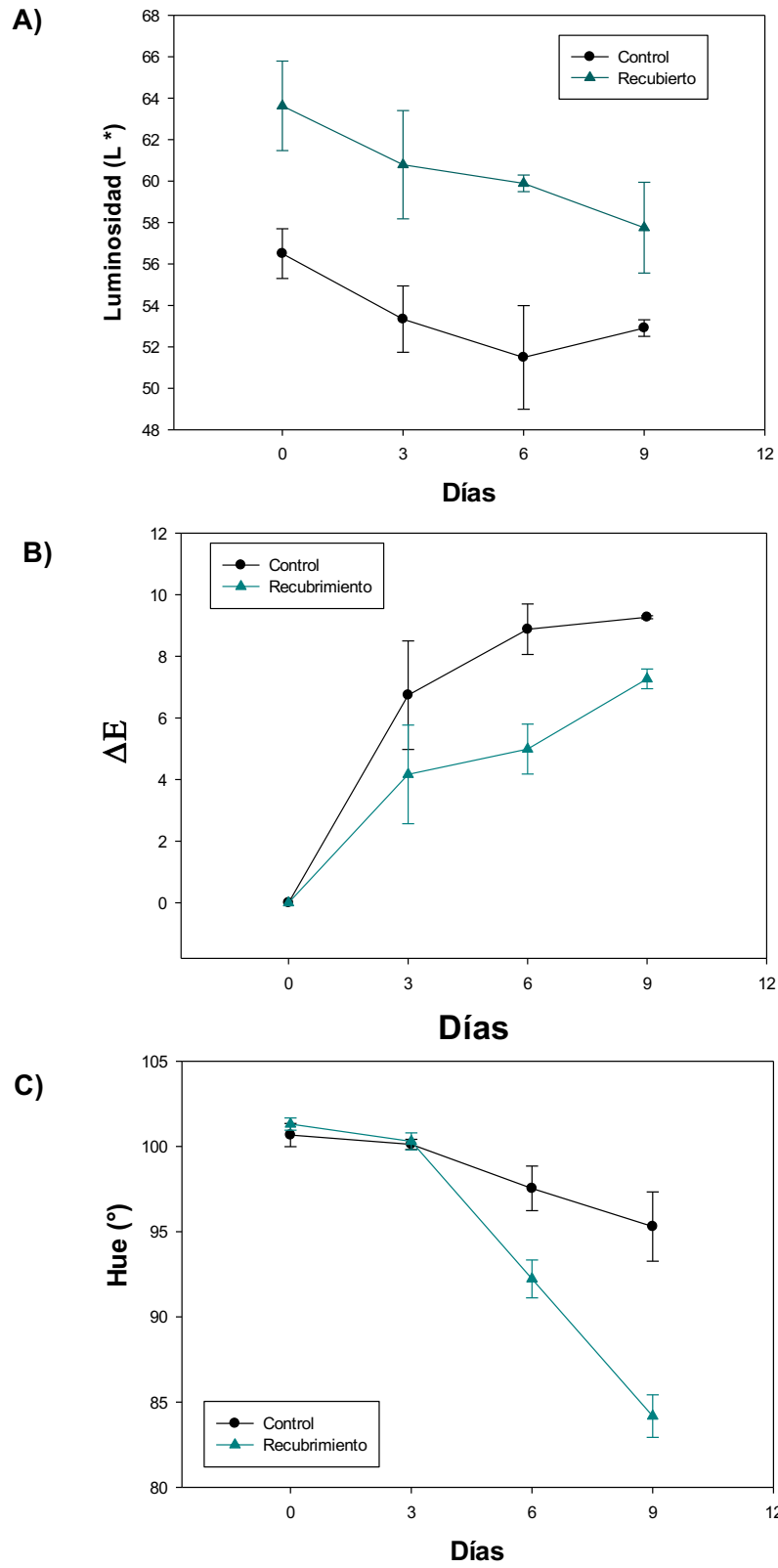


Figura 21. Parámetros de color. A) Luminosidad, B) Cambio de color (ΔE), C) Hue.

6.5.3 pH

El pH de las tunas control y recubiertas está reportado en la Figura 22. Como puede observarse no existe diferencia significativa ($\alpha > 0.05$) entre los frutos control y los frutos recubiertos (Anexo 8.6). En general el valor del pH se redujo a lo largo del tiempo en aproximadamente dos unidades. Ochoa-Velasco y Guerrero-Beltrán, (2014) también reportaron un comportamiento similar en tunas mínimamente procesadas con inmersión en ácido acético, ellos obtuvieron una disminución de una unidad a lo largo de doce días de almacenamiento.

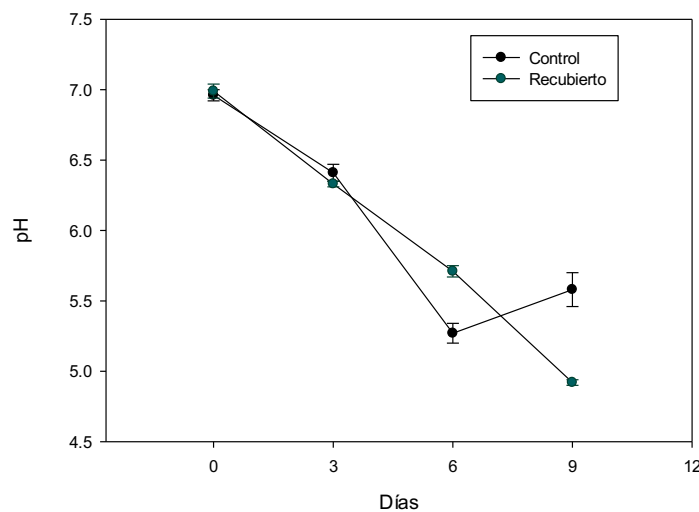


Figura 22. pH de tunas mínimamente procesadas

Nobile *et al.* (2009) reportaron una disminución en el pH de las tunas evaluadas bajo diferentes métodos de conservación (recubrimiento de alginato, agar y gel de proteína de pescado) argumentando que la disminución del pH fue debida al crecimiento microbiano, principalmente de levaduras. El mismo comportamiento reportan Piga *et al.* (2003) en tunas mínimamente procesadas almacenadas a diferentes temperaturas, atribuyendo este cambio al incremento de población microbiana, específicamente levaduras.

6.5.4 Acidez total y sólidos solubles totales

La acidez total y los sólidos solubles de las tunas mínimamente procesadas se presentan en el Cuadro 16. Se puede observar que la acidez total mostró un cambio significativo ($\alpha > 0.05$) a través del tiempo tanto para los frutos control

como para los frutos con recubrimiento. En los sólidos solubles totales se observa que en general no existe diferencia significativa entre las tunas control y las tunas recubiertas, tampoco existe diferencia entre los días de almacenamiento. Piga *et al.* (2003) evaluaron los cambios en ácido ascórbico, contenido de polifenoles y actividad antioxidante de tunas mínimamente procesadas. Ellos también observaron un aumento en la acidez total correlacionado con una disminución del pH y lo atribuyen principalmente al crecimiento microbiano.

Cuadro 17. Acidez total y sólidos solubles de las tunas mínimamente procesadas

Días de almacenamiento	Acidez Total (mg ácido cítrico/100 g muestra)		Sólidos solubles totales (°Brix)	
	Control	Recubrimiento	Control	Recubrimiento
0	41.64 ± 2.0 ^{aA}	39.56 ± 2.8 ^{aA}	14.40 ± 0.2 ^{aA}	13.46 ± 0.35 ^{aA}
3	42.91 ± 2.8 ^{aA}	46.78 ± 0.6 ^{abA}	13.38 ± 0.0 ^{bA}	15.35 ± 0.40 ^{bB}
6	75.89 ± 1.6 ^{bA}	55.58 ± 2.0 ^{bB}	14.13 ± 0.2 ^{abA}	13.45 ± 0.49 ^{aA}
9	63.66 ± 6.4 ^{bA}	89.78 ± 6.9 ^{cB}	13.95 ± 0.1 ^{abA}	13.78 ± 0.45 ^{abA}

Los resultados se reportan como la media (n=3) ± la desviación estándar.

Letras mayúsculas iguales indican que no existe diferencia significativa entre tratamientos, letras minúsculas iguales indican que no existe diferencia significativa entre los días de almacenamiento mediante la prueba t de student ($\alpha < 0.05$).

En cuanto a sólidos solubles totales no observaron cambio significativo a lo largo del periodo de medición (9 días). De la misma manera, Ramírez-Villa, (2012) atribuye el aumento de acidez de tunas con procesamiento mínimo al incremento de la población microbiana. Con respecto a los sólidos solubles, el autor reporta un incremento de los mismos debido a la hidrólisis de carbohidratos complejos.

6.5.5 Ácido ascórbico

La vitamina C o ácido ascórbico es uno de los compuestos que más rápido se degradan. Por lo que general los frutos y vegetales recién cosechados contienen más vitamina C que aquellos que ya están almacenados (Kader y Pelayo-Zaldivar, 2002) .

Contrario a lo que se esperaba, el ácido ascórbico no mostró variaciones significativas a lo largo del tiempo ni entre los tratamientos. Se esperaba una

disminución el contenido de ácido ascórbico debido al proceso de oxidación. Piga *et al.* (2000, 2003) obtuvieron el mismo resultado, no observaron diferencias significativas en el contenido de vitamina C. Los autores concluyen que este resultado pudo deberse a que los compuestos fenólicos en la tuna tienen un efecto protector sobre la vitamina C, retardando su degradación en el proceso de oxidación.

Cuadro 18. Contenido de ácido ascórbico en tunas mínimamente procesadas

Días de almacenamiento	Ácido ascórbico (mg ácido ascórbico/100 g muestra)	
	Control	Recubrimiento
0	22.27 ± 0.97 ^{abA}	25.68 ± 0.65 ^{aA}
3	21.26 ± 0.24 ^{abA}	24.64 ± 0.34 ^{abB}
6	23.90 ± 0.99 ^{Aa}	22.17 ± 0.43 ^{abA}
9	20.09 ± 0.48 ^{bA}	21.03 ± 2.35 ^{aA}

Los resultados se reportan como la media (n=3) ± la desviación estándar. Letras mayúsculas iguales indican que no existe diferencia significativa entre tratamientos, letras minúsculas iguales indican que no existe diferencia significativa entre los días de almacenamiento mediante la prueba t de student ($\alpha < 0.05$).

6.5.6 Análisis microbiológicos

Los frutos mínimamente procesados tienen muchas ventajas para el consumidor. Sin embargo, el deterioro microbiano a menudo limita el uso de esta tecnología. El procesamiento mínimo puede aumentar la contaminación microbiana de la fruta debido a que durante la manipulación y procesamiento existen diversas fuentes de contaminación (humano, utensilios, ambiente etc.).

Recientemente, el uso de aceites esenciales en recubrimientos comestibles se ha convertido en una de las prácticas más importantes en la conservación de la calidad de los alimentos mínimamente procesados. Se han realizado numerosas investigaciones en las que se comprueba el efecto antimicrobiano de los recubrimientos comestibles adicionados con aceites esenciales y se ha confirmado su eficaz aplicación en matrices alimentarias (Sánchez-González, *et al.*, 2011; Jing *et al.*, 2014)

En este estudio se utilizó AEL debido a que ya ha sido reportado su efecto antimicrobiano contra una variedad de bacterias y hongos (Bakkali *et al.*, 2008; Espina *et al.*, 2011; Jing *et al.*, 2014).

Se realizó el ensayo cuenta estándar y mohos y levaduras a lo largo de los 9 días de almacenamiento (Cuadro 19). Se observa que en general, tanto para bacterias como para hongos existe un incremento de UFC/mL a lo largo del tiempo. Este resultado está relacionado con la disminución de pH y el incremento de acidez en los frutos probablemente debido a la fermentación microbiana (Nobile *et al.*, 2009).

Al inicio del experimento (día 0) el recuento de bacterias mesófilas fue menor al límite de detección (25 UFC/mL). A partir del día 3 la población microbiana aumentó tanto para el control como para el tratamiento, sin embargo, se observa un menor crecimiento de bacterias en las tunas con recubrimiento.

Cuadro 19. Propiedades microbiológicas de las tunas mínimamente procesadas.

Días	Tratamiento	Mesófilos aerobios	Levaduras	Mohos
		log UFC/g		
0	Control	<1 ^t	1.89 ± 0.16 ^{abc}	1.00 ± 0.00 ^{abc*}
	Recubierto	<1 ^t	2.08 ± 0.00 ^{abc}	<1 ^c
3	Control	4.30 ± 0.01 ^d	2.43 ± 0.19 ^{ab}	1.54 ± 0.09 ^{abc*}
	Recubierto	3.73 ± 0.11 ^e	1.15 ± 0.21 ^{c*}	1.15 ± 0.21 ^{abc*}
6	Control	6.40 ± 0.07 ^a	2.64 ± 0.10 ^a	1.00 ± 0.00 ^{c*}
	Recubierto	4.30 ± 0.18 ^d	1.50 ± 0.28 ^{bc*}	1.45 ± 0.21 ^{bc*}
9	Control	6.14 ± 0.06 ^b	2.75 ± 0.09 ^a	2.33 ± 0.18 ^{ab}
	Recubierto	4.75 ± 0.14 ^c	1.59 ± 0.16 ^{c*}	2.30 ± 0.06 ^a

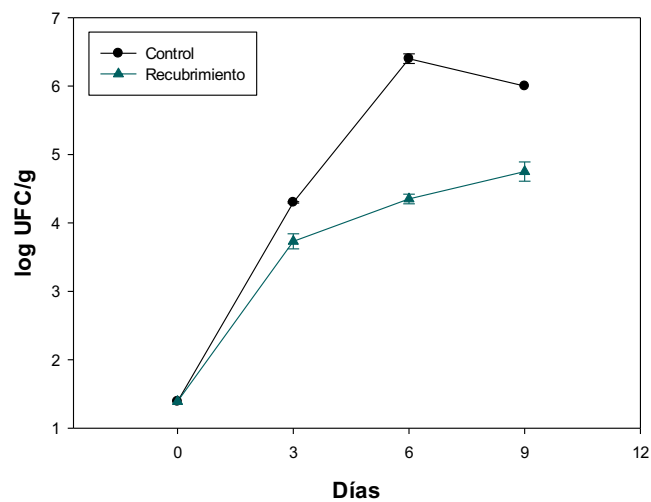
Los resultados se reportan como la media (n=3) ± la desviación estándar.

Letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre tratamientos por la prueba t de student ($\alpha < 0.05$).

*Valor estimado en referencia a la NOM-092-SSA1-1994

En cuanto al recuento de hongos también se observa un incremento de UFC/mL a través del tiempo. Se puede observar que en el experimento la población de bacterias fue mayor con respecto a la población de hongos. Es visible que el recubrimiento tuvo efecto antimicrobiano contra las levaduras ya que a lo largo de los nueve días de almacenamiento existió diferencia significativa entre las tunas control y las tunas con recubrimiento, presentando éstas últimas una menor concentración de UFC/mL. En el recuento de mohos no existió diferencia significativa entre el control y el recubrimiento. Esto puede deberse a que en los ensayos microbianos de la incorporación del aceite esencial de limón a la película (6.13, 6.14) no se evaluó su efecto antimicrobiano contra mohos debido a que ha sido reportado que la presencia de estos microorganismos en la tuna es menor en comparación con las bacterias y levaduras (Corbo *et al.*, 2004). Es probable que se necesite incrementar la concentración de AEL adicionado a las películas, con el fin de inhibir el crecimiento de hongos filamentosos. Perdonés *et al.* (2012) reportan una concentración mínima inhibitoria mayor a la usada en este trabajo (2%-3% v/v) para lograr tener un efecto inhibitorio en el crecimiento de *Botrytis cinerea*

A)



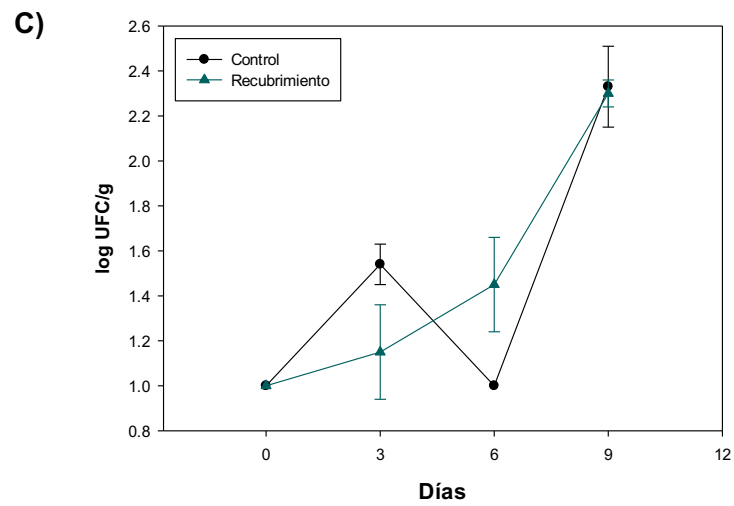
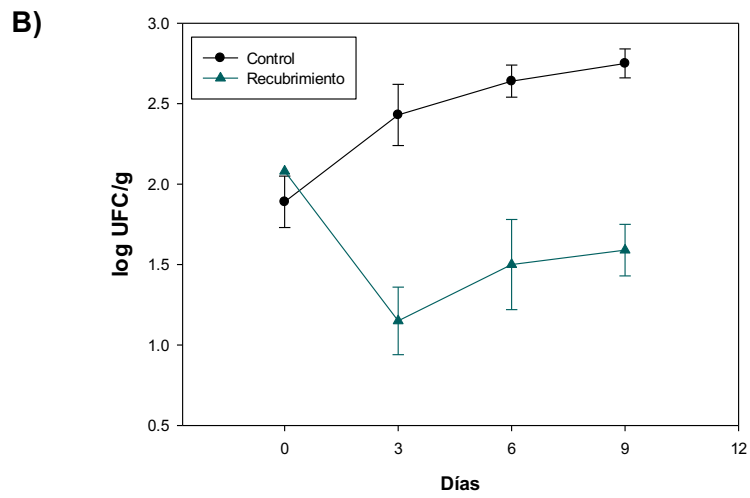


Figura 23. Cuenta total de A)mesófilos aerobios, B) levaduras y C) mohos de tunas mínimamente procesadas.

7. CONCLUSIONES

Se diseñaron recubrimientos activos comestibles a base de una mezcla de proteína de quinua-quitosano, cera de abeja, transglutaminasa y aceite esencial de limón.

Se evaluaron el potencial ζ y el tamaño de partícula de las suspensiones filmogénicas, mostrando ser un buen parámetro para determinar la estabilidad de las mismas. Las suspensiones filmogénicas con proporción 1:5 Q:PQ tuvieron los mayores valores de potencial ζ .

Se logró realizar el entrecruzamiento de la proteína de quinua con la enzima transglutaminasa, sin embargo, su acción catalítica disminuyó en las suspensiones filmogénicas. La fuerza de tensión incrementó al añadir transglutaminasa. La cera de abeja afectó las propiedades mecánicas.

Las películas comestibles presentaron valores bajos de permeabilidad en comparación otros recubrimientos comerciales y polímeros plásticos, lo que las convierte en una buena alternativa para su uso como recubrimiento en alimentos mínimamente procesados. Debido a que la TG aumento la permeabilidad de las películas comestibles se decidió eliminarla de la formulación de las SF.

Se determinó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de limón y se incorporó a las películas comestibles mostrando efecto antimicrobiano contra bacterias y levaduras.

Los recubrimientos comestibles presentaron un carácter hidrofílico. La microscopía electrónica de barrido mostró que las películas son homogéneas, continuas y sin poros. Las PC con aceite esencial de limón presentaron superficies con mayor homogeneidad.

El recubrimiento aplicado en tuna mínimamente procesada disminuyó la pérdida de peso de los frutos y redujo el cambio de color, así mismo retardó el crecimiento de bacterias y levaduras. Por lo tanto, el recubrimiento a base de una mezcla de proteína de quinua, cera de abeja y aceite esencial de limón puede ser

una buena alternativa para el mantenimiento de la calidad de la tuna durante un periodo de almacenamiento

A.1 Factor de corrección

Harkins y Jordan

El tensiómetro K6 está compensado linealmente de modo que el factor de corrección para una medición del agua pura a 20 ° C es 1; esto corresponde a un valor de la literatura para la tensión superficial del agua de 72.8 mN / m. En todas las demás condiciones, el valor de medición se debe multiplicar por un factor de corrección.

<i>Density difference</i>	<i>0.65</i>	<i>0.8</i>	<i>1.0</i>	<i>1.2</i>	<i>1.4</i>
50	1.004	0.988	0.972	0.957	0.945
48	1.001	0.985	0.967	0.954	0.943
46	0.998	0.980	0.964	0.951	0.941
44	0.994	0.978	0.960	0.948	0.938
42	0.990	0.975	0.957	0.944	0.935
40	0.987	0.972	0.954	0.941	0.931
38	0.981	0.968	0.951	0.938	0.929
36	0.979	0.963	0.946	0.935	0.923
34	0.975	0.958	0.942	0.931	0.919
32	0.970	0.954	0.940	0.926	0.915
30	0.964	0.950	0.935	0.921	0.911
28	0.959	0.944	0.930	0.916	0.906
26	0.954	0.940	0.924	0.911	0.904
24	0.949	0.935	-	-	-
22	0.942	0.929	-	-	-
20	0.937	0.921	-	-	-
19	0.933	0.918	-	-	-
18	0.930	0.914	-	-	-
17	0.924	0.911	-	-	-
16	0.920	0.906	-	-	-
15	0.915	0.902	-	-	-

Density difference	0.65	0.8	1.0	1.2	1.4
σ [mN/m]	Factor	Factor	Factor	Factor	Factor
100	1.070	1.049	1.026	1.011	0.998
97	1.065	1.043	1.023	1.008	0.995
94	1.063	1.040	1.020	1.005	0.993
91	1.058	1.037	1.018	1.003	0.991
88	1.054	1.034	1.014	1.000	0.988
85	1.052	1.031	1.012	0.998	0.986
82	1.049	1.029	1.009	0.995	0.984
79	1.043	1.024	1.006	0.991	0.980
76	1.040	1.023	1.003	0.988	0.977
73	1.037	1.018	1.000	0.986	0.974
70	1.033	1.014	0.996	0.982	0.972
67	1.028	1.011	0.993	0.979	0.968
64	1.023	1.006	0.990	0.976	0.964
61	1.019	1.003	0.985	0.973	0.960
58	1.015	0.999	0.982	0.969	0.956
55	1.012	0.996	0.978	0.964	0.953
52	1.007	0.990	0.974	0.959	0.950

A.2 Factores significativos en la caracterización fisicoquímica de suspensiones filmogénicas

Respuesta	Factor	N. parámetros	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Razón F	Prob > F
Potencial Z	PQ- Q*Transglutaminasa* Cera	2	2	425.11056	308.299 4	<.0001*
Tamaño de partícula	PQ- Q*Transglutaminasa* Cera	2	2	6841615.3	1722.98 3	<.0001*
Índice de polidispersión	PQ- Q*Transglutaminasa* Cera	2	2	0.0888983	10.321	0.0006*

A.3 Factores significativos en la mojabilidad de las suspensiones filmogénicas

Fuente	N. parámetros	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Razón F	Prob > F
Cera	1	1	0.0021333	0.8707	0.3781
Aceite	1	1	0.6627000	270.4898	<.0001*
cera*aceite	1	1	1.8096333	738.6259	<.0001*

A.4 ANDEVA Pérdida de peso

ANDEVA obtenido a partir del análisis estadístico de regresión lineal.

ANDEVA Pendientes

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Columna 1	1	0.01577646	0.015776	11.8924	0.0261*
Error	4	0.00530638	0.001327		
C. Total	5	0.02108284			

A.5 Hue y ΔE

Hue

ANDEVA obtenido a partir del análisis estadístico de regresión lineal.

ANDEVA Pendientes

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Columna 1	1	2.8345632	2.83456	107.7886	0.0005*
Error	4	0.1051898	0.02630		
C. Total	5	2.9397530			

ΔE .

ANDEVA Pendientes

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Columna 1	1	0.08954817	0.089548	30.5564	0.0052*
Error	4	0.01172236	0.002931		
C. Total	5	0.10127053			

A.6 pH

ANDEVA obtenido a partir del análisis estadístico de regresión lineal.

ANDEVA Pendientes

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Columna 1	1	0.00060000	0.000600	0.3023	0.6117
Error	4	0.00793822	0.001985		
C. Total	5	0.00853822			

9.REFERENCIAS

- Abugoch, L. E., Romero, N., Tapia, C. A., Silva, J., y Rivera, M. (2008). Study of some physicochemical and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd) protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 4745–4750.
- Abugoch, L. E., Tapia, C., Plasencia, D., Pastor, A., Castro-Mandujano, O., López, L., y Escalona, V. H. (2016). Shelf-life of fresh blueberries coated with quinoa protein/chitosan/sunflower oil edible film. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(2), 619–626.
- Abugoch, L. E., Tapia, C., Villamán, M. C., Yazdani-Pedram, M., y Díaz-Dosque, M. (2011). Characterization of quinoa protein-chitosan blend edible films. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 879–886.
- Ahamed, N. T., Singhal, R. S., Kulkarni, P. R., y Pal, M. (1996). Physicochemical and functional properties of *Chenopodium quinoa* starch. *Carbohydrate Polymers*, 31, 99–103.
- Allende, A., Tomás-Barberán, F. A., y Gil, M. I. (2006). Minimal processing for healthy traditional foods. *Trends in Food Science and Technology*, 17(9), 513–519.
- Altenhofen, M., Krause, C., y Kieckbusch, T. G. (2009). Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca^{2+} ions: Effect of the plasticizer concentration. *Carbohydrate Polymers*, 77(4), 736–742.
- Andrade, R., Pérez, C., y Luján, D. (2016). Development and application of edible coatings in minimally processed fruit. *Revista de La Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias*, (9), 9–10.
- AOAC. 1990 Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. Rockville, EUA
- Andrade, R., Skurtys, O., Osorio, F., Zuluaga, R., Gañán, P., y Castro, C. (2014). Wettability of gelatin coating formulations containing cellulose nanofibers on banana and eggplant epicarps. *LWT - Food Science and Technology*, 58(1), 158–165.
- Arevalos-Sánchez, M., Regalado, C., Martín, S. E., Meas-vong, Y., y Cadena-Moreno, E. (2013). Effect of neutral electrolyzed water on lux -tagged *Listeria monocytogenes* EGDe bio films adhered to stainless steel and visualization with destructive and non-destructive microscopy techniques. *Food Control*, 34(2), 472–477.
- Arredondo-Ochoa, T., García, B. E., Escamilla-García, M., Martínez, O., Rossi-M, G., Medina-Torres, L., y Regalado-González, C. (2017). Physicochemical and antimicrobial characterization of beeswax – starch food grade nanoemulsions incorporating natural antimicrobials. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(12), 2712.
- Arredondo-Ochoa, T., García, B., Amaro, A., Rivera, D., López, G., Martín, O., y

- Regalado-González, C. (2016). Design and characterization of corn starch edible films including beeswax and natural antimicrobials. *Food and Bioprocess Technology*, 1–12.
- ASTM. 2002. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Standard Designation D882-02. West Conshohocken, EUA.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., y Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–475.
- Baldwin, E. A., Nisperos-Carriedo, M. O., y Baker, R. A. (1995). Edible coatings for lightly processed fruits and vegetables. *HortScience*, 35–38(1), 472.
- Barreiro, M. (1999). La tuna: base del desarrollo de las culturas mesoamericanas. *Claridades Agropecuarias*, 71: 3–28.
- Brinegar, C., Sine, B., y Nwokocha, L. (1996). High-cysteine 2S seed storage proteins from Quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(7), 2–4.
- Cantwell, M. (1995). Agro ecology cultivation and uses of cactus pear. (G. Barbera, P. Inglese, y E. Pimienta-Barrios Eds.), *FAO Plant production and protection* (pp. 120–141). California. FAO.
- Cecchini, J. P., Spotti, M. J., Piagentini, A. M., Milt, V. G., y Carrara, C. R. (2017). Development of edible films obtained from submicron emulsions based on whey protein concentrate, oil/beeswax and brea gum. *Food Science and Technology International*, 23 (4), 371–381.
- Corbo, M. R., Altieri, C., Amato, D. D., Campaniello, D., Nobile, M. A. Del, y Sinigaglia, M. (2004). Effect of temperature on shelf life and microbial population of lightly processed cactus pear fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 31, 93–104.
- Davidson, M., Sofos, J., y Branen, A. (2005). Antimicrobials in food. (M. Davidson, J. Sofos, y A. Branen, Eds.), *Antimicrobials in Food*. Florida: Taylor and Francis.
- De Ancos, B., González-Peña, D., Colina-Coca, C., y Sánchez-Moreno, C. (2015). Uso de películas/recubrimientos comestibles en los productos de IV y V gama. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 16(1), 8–17.
- Del-Valle, V., Hernández-Muñoz, P., Guarda, A., y Galotto, M. J. (2005). Development of a cactus-mucilage edible coating (*Opuntia ficus indica*) and its application to extend strawberry (*Fragaria ananassa*) shelf-life. *Food Chemistry*, 91(4), 751–756.
- Di Pierro, P., Chico, B., Villalonga, R., Mariniello, L., Damiao, A. E., Masi, P., ... Gussone, P. (2006). Chitosan - whey protein edible films produced in the absence or presence of transglutaminase: Analysis of their mechanical and barrier properties. *Biomacromolecules*, (00), 744–749.
- Domínguez, M., y Jiménez, M. (2012). Películas comestibles formuladas con

- polisacáridos : propiedades y aplicaciones. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 2, 110–121.
- Elsabee, M. Z., y Abdou, E. S. (2013). Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science and Engineering C*, 33(4), 1819–1841.
- Embuscado, M., y Huber, K. (Eds.). (2009). *Edible Films and Coatings for Food Applications*. Nueva York. Springer.
- Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García, D., y Pagán, R. (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, 22(6), 896–902.
- Espino-Díaz, M., Ornelas-Paz, J. de J., Martínez-Téllez, M. A., Santillán, C., Barbosa-Cánovas, G. B., Zamudio-Flores, P. B., y Olivas, G. (2010). Development and characterization of edible films based on mucilage of *Opuntia ficus-indica*. *Journal of Food Science*, 75(6), 347–352.
- Figura, L., y Teixeira, A. (2004). *Food Physics*. Berlín: Springer.
- Fisher, K., y Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in Food Science and Technology*, 19(3), 156–164.
- Flores-Valdez, C., Luna-Esquivel, J., y Ramírez-Moreno, P. (1995). Mercado mundial de la tuna. Chapingo: UACH, ACERCA, CUESTAAM.
- Florian, C., Carle, S., y Carle, R. (2005). Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49(2), 175–194.
- Gallegos, S. J. M., y Herrera, J. G. (2006). La tuna: producción y diversidad. Comisión Nacional Para El Conocimiento y Uso de La Biodiversidad (CONABIO), 68, 1–5.
- García, M., Delgado, F., Escamilla, M., García, B., Regalado, C. (2018). Métodos modernos para la caracterización de películas y recubrimientos comestibles. *BioTecnología*, 22(1), 37–54.
- Ghidelli, C., y Pérez-Gago, M. B. (2016). Recent advances in modified atmosphere packaging and edible coatings to maintain quality of fresh-cut fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 8398.
- Giancone, T., Torrieri, E., Pierro, P. Di, Mariniello, L., Moresi, M., Porta, R., y Masi, P. (2008). Role of constituents on the network formation of hydrocolloid edible films. *Journal of Food Engineering*, 89(2), 195–203.
- Giosafatto, C. V. L., Di Pierro, P., Gunning, P., Mackie, A., Porta, R., y Mariniello, L. (2014). Characterization of citrus pectin edible films containing transglutaminase-modified phaseolin. *Carbohydrate Polymers*, 106, 200–208.
- Gontard, N., Guilbert, S., y Cuq, J. (1992). Edible wheat gluten films : influence of the main process variables on film properties using response surface

- methodology. *Journal of Food Science*, 57(1).
- Goodfellow. (2018). Polietileno de baja densidad. Recuperado Octubre 23, 2018, de <http://www.goodfellow.com/S/Polietileno-Baja-Densidad.html>
- Guilbert, S., Gontard, N., y Gorris, L. G. M. (1996). Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *LWT - Food Science and Technology*, 29, 10–17.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., y Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), 985–990.
- Hernández-Hernández, E., Regalado-González, C., Vázquez-Landaverde, P., Guerrero-Legarreta, I., y García-Almendárez, B. E. (2014). Antimicrobial activity of mexican (*Lippia graveolens*) and european (*Origanum vulgare* L) oregano essential oils. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Huang, G., Sun, Y., Xiao, J., y Yang, J. (2012). Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan. *Food Chemistry*, 135(2), 534–539.
- Hun, J. H., y Gennadios, A. (2005). Edible and coatings. A review. *Innovations in Food Packaging*, (0-12-3 1 1632-5), 239–259.
- Hunter, R. J. (2013). *Zeta Potential in colloid science*. (R. Otewill y L. Rowell, Eds.). Londres: Academic Press.
- Jing, L., Zhentian, L., Ligai, L., Rangjin, X., Wanpeng, X., Guan, Y., ... Zhou, Z. (2014). Antifungal activity of citrus essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31(3), 255–267.
- Kader, A. A., y Pelayo-Zaldivar, C. (2002). *Tecnología Postcosecha de Cultivos Hortofrutícolas*. California: Universidad de California.
- Konica Minolta. (2017). Entendiendo el espacio CIE lab. Recuperado Octubre 27, 2018, <http://sensing.konicaminolta.com.mx/2014/09/entendiendo-el-espacio-de-color-cie-lab/>
- Kumar, M. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive y Functional Polymers*, 46(1), 1–27.
- Lago, M., Rodríguez, A., Sendón, R., Sanches-Silva, A., Costa, H., Sánchez-Machado, D., ... Paseiro, P. (2011). Compilation of analytical methods to characterize and determine chitosan , and main applications of the polymer in food active packaging. *CyTA- Journal of Food*, 9(4), 319-328.
- Lee, A., y Hong, Y. (2009). Coacervate formation of alfa-lactalbumin-chitosan and beta-lactoglobulin-chitosan complexes. *Food Research International*, 42(5–6), 733–738.
- Liu, H., Du, Y., Wang, X., y Sun, L. (2004). Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International Journal of Food Microbiology*, 95, 147–155.
- Longares, A., Monahan, F. J., Riordan, E. D. O., y Sullivan, M. O. (2004). Physical

- properties and sensory evaluation of WPI films of varying thickness. *LWT-Food Science and Technology*, 37, 545–550.
- López-Malo, A., Palou, E., Parish, M., y Davidson, M. (2005). Methods for activity assay and evaluation of results. In M. Davidson (Ed.), *Food Antimicrobials* (pp. 654–677). Florida.
- Mariniello, L., Di Pierro, P., Esposito, C., Sorrentino, A., Masi, P., y Porta, R. (2003). Preparation and mechanical properties of edible pectin - soy flour films obtained in the absence or presence of transglutaminase. *Journal of Biotechnology*, 102, 191–198.
- McClements, D. J. (2016). *Food Emulsions*. Boca Raton: Taylor y Francis.
- Moschakis, T., Murray, B. S., y Biliaderis, C. G. (2010). Food hydrocolloids modifications in stability and structure of whey protein-coated o/w emulsions by interacting chitosan and gum arabic mixed dispersions. *Food Hydrocolloids*, 24(1), 8–17.
- Muppalla, S. R., Kanatt, S. R., Chawla, S. P., y Sharma, A. (2014). Carboxymethyl cellulose-polyvinyl alcohol films with clove oil for active packaging of ground chicken meat. *Food Packaging and Shelf Life*, 2(2), 51–58.
- Nielsen, P. M. (1995). Reactions and potential industrial applications of transglutaminase. Review of literature and patents. *Food Biotechnology*, 9(3), 119–156.
- Nielsen, S. (2010). *Food analysis laboratory manual*. West Lafayette USA: Springer.
- Nobile, M. A., Conte, A., Scrocco, C., y Brescia, I. (2009). New strategies for minimally processed cactus pear packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(3), 356–362.
- NOM-092-SSA1-1994. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Diario Oficial de la Federación. México.
- NOM-111-SSA1-1994. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Diario Oficial de la Federación. México.
- Ochoa-Velasco, C. E., y Guerrero-Beltrán, J. Á. (2014). Postharvest quality of peeled prickly pear fruit treated with acetic acid and chitosan. *Postharvest Biology and Technology*, 92, 139–145.
- Ollé Resa, C., Gerschenson, L., y Jagus, R. (2016). Starch edible film supporting natamycin and nisin for improving microbiological stability of refrigerated argentinian Port salut cheese. *Food Control*, 59(August), 737–742.
- Perdones, A., Sánchez-González, L., Chiralt, A., y Vargas, M. (2012). Effect of chitosan-lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 70, 32–41.
- Pérez-Gago, M., y Krochta, J. (2001). Lipid particle size effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein/beeswax emulsion

- films. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 996–1002.
- Piga, A., Aquino, S. D., Agabbio, M., Emonti, G., y Farris, G. A. (2000). Influence of storage temperature on shelf-life of minimally processed cactus pear fruits. *LWT - Food Science and Technology*, 20, 15–20.
- Piga, A., Caro, A. Del, Pinna, I., y Agabbio, M. (2003). Changes in ascorbic acid , polyphenol content and antioxidant activity in minimally processed cactus pear fruits, 36, 257–262.
- Porta, R., Di Pierro, P., Rossi-Marquez, G., Mariniello, L., Kadivar, M., y Arabestani, A. (2015). Microstructure and properties of bitter vetch (*Vicia ervilia*) protein films reinforced by microbial transglutaminase. *Food Hydrocolloids*, 50, 102–107.
- Porta, R., Di Pierro, P., Sabbah, M., Regalado-González, C., Mariniello, L., Kadivar, M., y Arabestani, A. (2016). Blend films of pectin and bitter vetch (*Vicia ervilia*) proteins: Properties and effect of transglutaminase. *Innovative Food Science y Emerging Technologies*, 36, 241–251.
- Ramírez-Villa, M. (2012). Inmersiones de calcio en tuna mínimamente procesada. Universidad Autónoma de Chapingo.
- Reyes-Avalos, M. C., Femenia, A., Minjares-Fuentes, R., Contreras-Esquivel, J. C., Aguilar-González, C. N., Esparza-Rivera, J. R., y Meza-Velazquez, J. A. (2016). Improvement of the quality and the shelf life of figs (*Ficus carica*) using an alginate-chitosan edible film. *Food and Bioprocess Technology*, 1–11.
- Rossi Márquez, G., Di Pierro, P., Mariniello, L., Esposito, M., Giosafatto, C., y Porta, R. (2017). Fresh-cut fruit and vegetable coatings by transglutaminase-crosslinked whey protein/pectin edible films. *LWT - Food Science and Technology*, 75, 124–170.
- Sabbah, M., Esposito, M., Pierro, P. Di, Giosafatto, C. V. L., Mariniello, L., y Porta, R. (2016). Insight into zeta potential measurements in biopolymer film preparation. *Journal of Biotechnology and Biomaterials*, 6, e128.
- SAGARPA. (2015a). Anuario estadístico de la producción agrícola. Recuperado Enero 1, 2017, http://infosiap.siap.gob.mx/agricola_siap_gb/icultivo/index.jsp
- SAGARPA. (2015b). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Recuperado Enero 31, 2017, http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp
- Sagheer, F. A. Al, Al-sughayer, M. A., Muslim, S., y Elsabee, M. Z. (2009). Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydrate Polymers*, 77(2), 410–419.
- Saïed, N., y Aider, M. (2014). Zeta potential and turbidimetry analyzes for the evaluation of chitosan/phytic acid complex formation. *Journal of Food Research*, 3(2), 71.
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., y Cháfer, M. (2011). Use of essential oils in bioactive edible coatings: A review. *Food*

Engineering Reviews, 3(1), 1–16.

- Sánchez-Ortega, I., García-Almendárez, B. E., Santos-López, E. M., Reyes-González, L. R., y Regalado, C. (2016). Characterization and antimicrobial effect of starch-based edible coating suspensions. *Food Hydrocolloids*, 52, 906–913.
- Schmitt, C., y Turgeon, S. L. (2011). Protein / polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167(1–2), 63–70.
- Selva, E. (2011). Tono, saturación, luminosidad. Recuperado Octubre 20, 2018, <https://naturapixel.com/2011/08/17/tono-saturacion-y-luminosidad/>
- Siddique, S., Parveen, Z., Firdaus-e-Bareen, Mazhar, S., Chaudhary, M. N., y Saeed, K. (2017). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil from *Callistemon viminalis* (Gaertn.) G. don leaves. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 20(2), 524–534.
- Tesfay, S. Z., y Magwaza, L. S. (2017). Evaluating the efficacy of moringa leaf extract, chitosan and carboxymethyl cellulose as edible coatings for enhancing quality and extending postharvest life of avocado (*Persea americana* Mill.) fruit. *Food Packaging and Shelf Life*, 11, 40–48.
- Tulloch, A. P. (1980). Beeswax—Composition and Analysis. *Bee World*, 61(2), 47–62.
- Valenzuela, C., Abugoch, L. E., y Tapia, C. (2013). Quinoa protein-chitosan sunflower oil edible film: mechanical , barrier and structural properties. *LWT - Food Science and Technology*, 50(2), 531–537.
- Velickova, E., Winkelhausen, E., Kuzmanova, S., Alves, V. D., y Moldão-Martins, M. (2013). Impact of chitosan-beeswax edible coatings on the quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa cv Camarosa*) under commercial storage conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 52(2), 80–92.
- Xing, Y., Li, X., Xu, Q., Yun, J., Lu, Y., y Tang, Y. (2011). Effects of chitosan coating enriched with cinnamon oil on qualitative properties of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Food Chemistry*, 124(4), 1443–1450.
- Yokoyama, M. K. (2004). Properties and applications of microbial transglutaminase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 447–454.
- Zisman, W. A. (1964). Relation of the equilibrium contact angle to liquid and solid constitution. En R.F. Gould (ed). *Contact Angle, Wettability, and Adhesion* (pp. 1–51). *Advances in Chemistry Vol. 43*, ACS: Washington.