



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Facultad de Química

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

## Tesis

**“Vida de anaquel de pan de masa madre adicionado con *Lactococcus lactis* NRRL B-50307 y un recubrimiento activo conteniendo aceite esencial de canela”**

**Presenta:**

L.B. Arturo Tzintzun Torres

**Dirigido por:**

Dr. Carlos Regalado González

C.U., Querétaro, Querétaro

septiembre, 2024

La presente obra está bajo la licencia:  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

### Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

### Bajo los siguientes términos:



**Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



**SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

### Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**“Vida de anaquel de pan de masa madre adicionado con *Lactococcus lactis*  
NRRL B-50307 y un recubrimiento activo conteniendo aceite esencial de canela”**

**TESIS**

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

**Presenta:**

L.B. Arturo Tzintzun Torres

**Dirigido por:**

Dr. Carlos Regalado González

Dr. Carlos Reglado González

Presidente

Firma

Dr. Everardo Mares Mares

Secretario

Firma

Dr. Aldo Amaro Reyes

Vocal

Firma

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Suplente

Firma

M.C. Paola Itzel Bautista Espinoza

Suplente

Firma

Dr. José Santos Cruz  
Director de la Facultad de Química

Dr. Manuel Toledano Ayala  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Querétaro  
Octubre de 2024

## **DEDICATORIA**

A mis padres Libia Torres Rivera y Arturo Tzintzun Mora, por sus consejos, lecciones y acompañamiento durante esta etapa, gracias a ellos llegué hasta donde estoy y soy la persona que soy hoy en día.

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada.

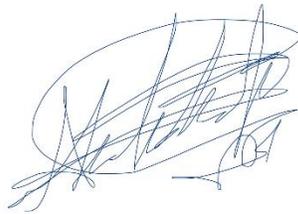
Al Dr. Carlos Regalado Gonzáles por la oportunidad y la enseñanza durante el proceso de investigación y realización de la tesis.

A mi comité de sinodales, Dr. Everardo Mares Mares, Dr. Aldo Amaro Reyes, Dra. Sofia María Arvizu Medrano y M.C. Paola Itzel Bautista Espinoza sinodal y amiga, por su pertinente retroalimentación, evaluación y consejos durante el proceso de mi investigación.

Al Dr. Eduardo Castaño Tostado por sus consejos y acompañamiento durante el proceso como tutor.

A mis padres Libia Torres Rivera y Arturo Tzintzun Mora, así como a mi hermano Máximo Emiliano Tzintzun Torres, por su apoyo, consejos y cariño incondicional.

**DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:** Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.



---

Arturo Tzintzun Torres

## RESUMEN

El pan de masa madre es tendencia en consumo debido a mejores características sensoriales, nutricionales y una mayor vida de anaquel, sin embargo, esta última puede ser extendida mediante la incorporación de compuestos antimicrobianos como la nisina y la aplicación de recubrimientos comestibles activos, evitando así el deterioro microbiano por bacterias y hongos y potencializando sus características organolépticas. Dentro de las bacterias ácido lácticas (BAL) se encuentra *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) que produce potentes antimicrobianos con efecto contra patógenos. Por otro lado, los recubrimientos comestibles pueden aplicarse para extender la vida de anaquel de los alimentos y evitar la contaminación microbiana. El objetivo de esta investigación fue evaluar la vida de anaquel del pan de masa madre formulado a base de harinas de trigo y amaranto, inoculado con *L. lactis* NRRL B-50307 y con un recubrimiento comestible activo. Se utilizó un diseño factorial 2<sup>2</sup>, siendo los factores el inóculo de *L. lactis* y la aplicación de un recubrimiento activo comestible a base de proteína de quinoa (PQ) y quitosano (QT) conteniendo aceite esencial de canela microencapsulado (AECM), en ambos casos los niveles fueron presencia o ausencia. El aceite esencial de canela (AEC) se microencapsuló mediante secado por aspersion (AECM) para su incorporación en la formulación del recubrimiento activo. Se diseñó masa madre tipo IV con población microbiana espontánea e inoculándose 5 log UFC/g de *L. lactis* y se fermentó durante 48 h, midiéndose el pH, acidez titulable total (ATT), azúcares reductores y nisina producida. El pan fue horneado a 232°C por 40 min. Se evaluó la permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas, así como la resistencia tensil (RT), elongación (E) y módulo de Young (MY). Se determinó el perfil de textura, volumen, humedad, color y recuento de población microbiana del pan de masa madre, además de su evaluación sensorial y un estudio de vida de anaquel a condiciones aceleradas de temperatura por 3 días lo que fue equivalente a 10.5 días. De acuerdo con los resultados, en la masa madre, la inoculación de *L. lactis* permitió acortar los tiempos de fermentación, además de producir nisina. El AECM permitió reforzar las propiedades mecánicas en el recubrimiento (RT=5.9±0.4 MPa, E= 42.5±16.3%, MY=21.7±0.2 MPa y PVA= 15.8±3.9), conferir actividad contra *Aspergillus niger*. Mediante evaluación sensorial por un panel no entrenado de 50 personas, se determinó que el pan elaborado con masa madre fermentada por *L. lactis* y con recubrimiento comestible activo, presentó mejor aceptación sensorial, disminución de la firmeza, ausencia de crecimiento microbiano y mayor vida útil, 7 días más que el control. Un análisis económico permitirá determinar la posibilidad de que el pan obtenido pueda comercializarse.

Palabras Clave: Masa madre, nisina, recubrimiento activo, amaranto, *Lactococcus lactis* NRRL B-50307

## ABSTRACT

Sourdough bread is a trend in consumption due to its better sensory and nutritional characteristics and longer shelf life. However, the latter can be extended by incorporating antimicrobial compounds such as nisin and applying active edible coatings, thus avoiding microbial deterioration by bacteria and fungi and enhancing its organoleptic characteristics. Among the lactic acid bacteria (BAL) is *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) that produces potent antimicrobials with an effect against pathogens. On the other hand, edible coatings can be applied to extend the shelf life of foods and prevent microbial contamination. The objective of this research was to evaluate the shelf life of sourdough bread formulated from wheat and amaranth flours, inoculated with *L. lactis* NRRL B-50307 and with an active edible coating. A 2<sup>2</sup> factorial design was used, with the factors being the inoculum of *L. lactis* and the application of an edible active coating based on quinoa protein (PQ) and chitosan (QT) containing microencapsulated cinnamon essential oil (AECM); in both cases the levels were presence or absence. Cinnamon essential oil (AEC) was microencapsulated by spray drying (AECM) for its incorporation into the active coating formulation. Type IV sourdough was designed with spontaneous microbial population and 5 log CFU/g of *L. lactis* was inoculated and fermented for 48 h, measuring the pH, total titratable acidity (ATT), reducing sugars and nisin produced. The bread was baked at 232°C for 40 min. The water vapor permeability (PVA) of the films was evaluated, as well as the tensile strength (RT), elongation (E) and Young's modulus (MY). The texture, volume, moisture, color and microbial population count profile of the sourdough bread were determined, in addition to its sensory evaluation and a shelf-life study at accelerated temperature conditions for 3 days, which was equivalent to 10.5 days. According to the results, in the sourdough, the inoculation of *L. lactis* allowed to shorten the fermentation times, in addition to producing nisin. The AECM allowed to reinforce the mechanical properties in the coating (RT = 5.9 ± 0.4 MPa, E = 42.5 ± 16.3%, MY = 21.7 ± 0.2 MPa and PVA = 15.8 ± 3.9), conferring activity against *Aspergillus niger*. Through sensory evaluation by an untrained panel of 50 people, it was determined that the bread made with sourdough fermented by *L. lactis* and with active edible coating, presented better sensory acceptance, decreased firmness, absence of microbial growth and longer shelf life, 7 days longer than the control. An economic analysis will determine the possibility that the bread obtained can be marketed.

Keywords: Sourdough, nisin, active coating, amaranth, *Lactococcus lactis* NRRL B-50307

# ÍNDICE

RESUMEN.....	IV
ABSTRACT .....	V
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Pan.....	3
2.2 Pan de masa madre.....	3
2.2.1 Transformaciones bioquímicas en el proceso de fermentación del pan de masa madre. ....	5
2.3 Amaranto .....	6
2.4 Bacterias ácido lácticas.....	7
2.4.1 <i>Lactococcus lactis</i> .....	8
2.4.2 Nisina .....	8
2.5 Empaques comestibles .....	11
2.5.1 Quinoa.....	12
2.5.2 Quitosano .....	13
2.5.3 Aceites esenciales (AE).....	15
3. JUSTIFICACIÓN.....	21
4. OBJETIVOS .....	22
4.1 Objetivo general.....	22
4.2. Objetivos específicos .....	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
5.1 Materiales .....	23
5.2 Métodos .....	23
Metodología del objetivo 1 .....	23

5.2.1 Obtención de aceite esencial de canela .....	23
5.2.2 Microencapsulación del aceite esencial de canela (AEC) .....	24
5.2.3 Eficiencia de microencapsulación del AEC .....	26
5.2.4 Actividad antifúngica del AEC y AECM .....	26
5.2.5 Obtención de la proteína de quinoa (PQ) .....	28
5.2.6 Elaboración de la solución filmogénica como película comestible .....	29
5.2.7 Caracterización de las soluciones filmogénicas como películas.	30
5.2.8 Espesor .....	30
5.2.9 Solubilidad .....	30
5.2.10 Color .....	31
5.2.11 Propiedades mecánicas .....	31
5.2.12 Permeabilidad al vapor de agua (PVA) .....	31
5.2.13 Actividad antifúngica de las películas comestibles .....	32
Metodología del objetivo 2 .....	32
5.2.14 Activación de <i>L. lactis</i> .....	32
5.2.15 Inoculación de <i>L. lactis</i> en masa madre .....	33
5.2.16 Determinación de población bacteriana en masa madre .....	34
5.2.17 Cuantificación de azúcares reductores .....	34
5.2.18 Cuantificación de pH y Acidez Titulable Total .....	35
5.2.19 Cuantificación de nisina en masa madre .....	35
Metodología del objetivo 3 .....	36
5.2.20 Diseño experimental para la elaboración de los panes. ....	36
5.2.21 Elaboración del pan de masa madre .....	37
5.2.22 Análisis Microbiológico .....	38

5.2.22	Conteo de mohos y levaduras .....	38
5.2.23	Conteo de coliformes totales .....	39
5.2.24	Conteo de mesófilos aerobios .....	39
5.2.25	Análisis sensorial de los tratamientos de pan de masa madre .	39
	Metodología para el objetivo 4 .....	40
5.2.26	Vida de anaquel.....	40
5.2.27	Análisis microbiológico .....	41
5.2.28	Perfil de Textura .....	41
5.2.29	Volumen .....	41
5.2.30	Humedad .....	41
5.2.31	Color de los panes.....	42
5.2.32	Análisis proximales.....	42
5.2.33	Vida de anaquel microbiana cualitativa .....	43
5.3	Análisis estadístico.....	43
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	44
	Resultados del objetivo 1 .....	44
6.1	Extracción del aceite esencial de canela .....	44
6.2	Microencapsulación de aceite esencial de canela .....	44
6.2.1	Rendimiento de microencapsulación.....	44
6.2.2	Eficiencia de microencapsulación.....	45
6.3	Actividad antifúngica del aceite esencial de canela en solución y microencapsulado (método de incubación de esporas).....	46
6.4	Actividad antifúngica del aceite esencial de canela en emulsión y microencapsulado (método difusión en disco).....	47
6.5	Elaboración de la solución filmogénica .....	48

6.5.1 Extracción de proteína de quinoa .....	48
6.5.2 Elaboración de película comestible a partir de la solución filmogénica del recubrimiento.....	49
6.6 Caracterización de las soluciones filmogénicas como películas .....	51
6.6.1 Espesor .....	51
6.6.2 Solubilidad.....	52
6.6.3 Color.....	54
6.6.4 Propiedades mecánicas .....	55
6.6.5 Actividad antifúngica de las películas comestibles .....	59
Resultados objetivo 2.....	62
6.7. Caracterización de la masa madre.....	62
6.7.1 Población microbiana de la masa madre.....	62
6.7.2 Población microbiana de la masa fermentada lista para hornear.....	64
6.7.3 Contenido de azúcares reductores en masa madre .....	65
6.7.4 Acidez titulable total de la masa madre .....	67
6.7.5 pH de la masa madre .....	68
6.7.6 Nisina en masa madre.....	69
Resultados objetivo 3.....	71
6.8 Análisis sensorial del pan de masa madre.....	71
Resultados para el objetivo 4.....	75
6.9 Vida de anaquel del pan de masa madre.....	75
6.9.1 Análisis microbiológico del pan obtenido.....	75
6.9.2 Perfil de textura .....	76
6.9.3 Color.....	77
6.9.3 Humedad.....	79

6.9.4 Volumen .....	80
6.10 Análisis proximal de los panes de masa madre .....	81
6.11 Vida de anaquel microbiana cualitativa .....	83
7. CONCLUSIONES .....	86
9. BIBLIOGRAFÍA.....	87
10. ANEXOS.....	103
10.1 Anexo 1. Carta responsiva.....	103
10.2 Anexo 2. Consentimiento informado. ....	106
10.3 Anexo 3. Carta de revocación del consentimiento informado .....	111
10.4 Anexo 4 Formato de Evaluación Sensorial .....	113
10.5 Anexo 5. Invitación para los participantes.....	115
10.6 Anexo 6. Certificaciones del aceite esencial de canela comercial	116

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura química de la nisina	9
2	Mecanismo de acción dual de la nisina de <i>Lactococcus lactis</i>	10
3	Estructura de la quitina y quitosano	14
4	Estructura química del cinamaldehído	16
5	Representación gráfica de los mecanismos de acción antibacterianos exhibidos por los cinamaldehídos	18
6	Efecto antifúngico del aceite esencial de canela (AEC)	47
7	Películas de proteína de quinoa y quitosano	50
8	Espesor (mm) promedio de cada película	52
9	Promedio de solubilidad (%) de cada película	53
10	Inhibición de <i>Aspergillus niger</i> por las películas comestibles	60
11	Crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> en presencia de las películas comestibles	60
12	Crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> en placas de PDA en presencia de película comestible	61
13	Concentración de azúcares reductores (g glucosa/kg de masa madre)	65
14	Acidez titulable total en función del tiempo de fermentación de masa madre inoculada con <i>L. lactis</i> (T) y control sin inocular (C)	67
15	Nivel de pH en masas madre en función del tiempo de fermentación (h) para masa madre inoculada con <i>L. lactis</i> (T) y control sin inocular (C).	68

16	Producción de nisina (UI/g de masa madre) por <i>L. lactis</i> en masa madre inoculada con <i>L. lactis</i> (T) y control sin inocular (C)	70
17	Medianas de los niveles de aceptación de los diversos atributos de los diferentes panes de masa madre	73
18	Desarrollo visible de hongos filamentosos los tratamientos de pan de masa madre a los 70 días de almacenamiento	84

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Composición proximal de las semillas de quinoa	13
2	Condiciones de secado en la microencapsulación de AEC	25
3	Factores y niveles en el diseño experimental	37
4	Parámetros de color (coordenadas L*, a* y b*) y paleta de color de las películas comestibles	54
5	Propiedades mecánicas de los tratamientos de las películas	58
6	Tiempo (días) estimado necesario para alcanzar el 20% de crecimiento (porcentaje máximo de crecimiento del mejor tratamiento, 10x) de <i>A. niger</i> en presencia de las películas comestibles.	62
7	Población microbiana (log UFC/g de masa madre) (BAL, levaduras o <i>L. lactis</i> ) de las masas madre control (C) e inoculada con <i>L. lactis</i> (T) en los diferentes tiempos de fermentación (horas).	62
8	Población microbiana total de las masas fermentadas y listas previa al horneado	64
9	Resultados de la firmeza (N) en los panes de masa madre durante la vida de anaquel acelerada.	76
10	Resultados de color de los panes de masa madre	78

11	Resultados de humedad de las muestras de pan de masa madre	79
12	Volumen de los panes de masa madre durante su vida de anaquel acelerada.	81
13	Resultados de los análisis químicos proximales de los panes de masa madre	82

## 1. INTRODUCCIÓN

El pan de masa madre es un alimento que ha sustentado a los seres humanos durante milenios; la masa madre consiste en una mezcla de agua y harina fermentada por levaduras y bacterias ácido lácticas (BAL), resultando en panes con mayor volumen, sabores característicos, diferente textura y mayor vida de anaquel en comparación con panes de fermentación corta (Albagli *et al.*, 2021; Falciano *et al.*, 2022); debido a lo anterior y a la carencia de aditivos sintéticos, en los últimos años, la popularidad del pan de masa madre ha aumentado (Catzeddu, 2019). Las BAL son el microorganismo dominante en la microbiota de las masas madre, por lo que se han utilizado como cultivos iniciadores en la elaboración de pan de masa madre, para obtener una calidad mejorada de forma controlada, lo que es deseable a nivel industrial (Korcari *et al.*, 2021).

Se han realizado estudios con la finalidad de mejorar las características nutrimentales, organolépticas e incluso bajar los costos de producción del pan de masa madre, donde se han empleado sustitutos de harina de trigo de manera completa o parcial con otras harinas como la de amaranto, la cual ha sido fundamental en la elaboración de productos con mejores beneficios para el consumidor (Vasquez-Lara *et al.*, 2016). La adición de harina de amaranto a la harina de trigo en la elaboración de pan de masa madre resulta en mayor contenido fenólico y capacidad antioxidante, así como altos niveles de calcio, hierro y zinc, comparado con panes a base de trigo, quinoa y trigo sarraceno. Además, la harina de amaranto mejora la apariencia de los panes al aumentar el volumen, simetría y forma de los poros, en comparación con panes de trigo y quinoa (Venturi *et al.*, 2019; Yeşil & Levent, 2022).

Otra de las tecnologías que permite extender la vida útil de los alimentos es la implementación de recubrimientos y películas comestibles, la cual es una alternativa a los empaques y envases de plásticos comunes en el mercado. Esto se debe a que, al ser naturales y biodegradables, su aplicación en diversos productos tiene efectos beneficiosos, ya que evita el deterioro de los alimentos, prolonga su vida útil y mejora su calidad (Kocira *et al.*, 2021). Los recubrimientos comestibles

pueden ser activos, teniendo actividad contra microorganismos patógenos, esto gracias a la incorporación de agentes con actividad antimicrobiana como los aceites esenciales (Montero-Recalde *et al.*, 2017), sin embargo, estos se deterioran por factores ambientales, por lo que pueden ser microencapsulados mediante secado por aspersión e incorporarse a la matriz polimérica de los recubrimientos (Yousuf *et al.*, 2021). El aceite esencial de canela se ha utilizado como agente antimicrobiano natural en la elaboración de películas comestibles, proporcionando mayor elongación y mejor capacidad de barrera contra vapor de agua (Uquillas, 2021).

Tomando en cuenta los aspectos anteriores, el objetivo principal de esta investigación fue incorporar la cepa de *Lactococcus lactis* NRRL B-50307 a masa madre elaborada con harina de trigo en mezcla con harina de amaranto. Adicionalmente, incorporar el recubrimiento comestible activo a base de mezclas de quitosano y quinoa, reforzado con aceite esencial de canela microencapsulado al pan horneado y determinar su vida de anaquel.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Pan**

El pan es uno de los alimentos más consumidos en todo el mundo, teniendo un mercado mundial estimado en 480.95 mil millones de dólares y en México de 2.16 mil millones de dólares (Informe de expertos, 2023). Sin embargo, se estima que cada familia, en México desperdicia alrededor de 63 kg de pan al año, que se refleja en un 16.7% del consumo total nacional debido principalmente a su corta vida de anaquel de 2-4 días (Sáez, 2015; The New Canasta, 2024).

El deterioro de los productos de panificación se divide principalmente en microbiano, causado por levaduras, mohos y bacterias; el físico causado por la pérdida de humedad y endurecimiento del pan; y el químico causado por la rancidez (Stanley & Young, 2002; Smith *et al.*, 2004). La contaminación microbiana se origina predominantemente después de la cocción a causa de esporas de hongos, que se depositan en los panes (Axel *et al.*, 2017), siendo este tipo de contaminación el más importante. Por otro lado, el pan de masa madre brinda una mayor vida de anaquel (5-7 días), aumento de volumen, disminución de la dureza, mejor contenido nutricional y sabores y olores característicos (Sakandar *et al.*, 2019).

### **2.2 Pan de masa madre**

El pan de masa madre es un alimento que ha sido parte de la alimentación humana desde milenios (Canesin & Cazarin, 2021). Ha aumentado su popularidad por ser un producto más saludable, carente de conservadores o aditivos de sabor, en comparación con panes de fermentación corta comerciales (Catzeddu, 2019).

El mercado de masa madre en 2024 mostró un estimado de 2.45 billones de dólares, siendo producido principalmente en Estados Unidos y Europa (Albagli *et al.*, 2021; Grand View Research 2024).

La masa madre se obtiene por la fermentación de harina y agua, por efecto de levaduras y bacterias ácido lácticas (BAL), comúnmente se alimenta con harina y agua en proporciones similares a las iniciales hasta la aparición de burbujas (de 1

a 7 días) y después se suministra a otra porción de masa no fermentada y se deja fermentar en conjunto, para posteriormente ser horneada (Landis *et al.*, 2021).

El consumo de pan de masa madre proporciona una mejor digestibilidad respecto al almidón del pan de fermentación corta, mayor contenido nutricional y mayor biodisponibilidad de minerales como el hierro, calcio, magnesio y zinc, que el pan tradicional, debido a que su microbiota degrada la harina en componentes más simples (Ribet *et al.*, 2022).

En España se define a la masa madre como “La masa activa compuesta por harina de trigo u otro cereal, o mezclas de ellas, y agua, con o sin adición de sal, sometida a una fermentación espontánea acidificante cuya función es asegurar la fermentación de la masa de pan”. Debe tener un pH inferior a 4.8, antes y después de su cocción u horneado, efecto únicamente debido a su microbiota. Además, puede incorporarse levadura panadera en la última fase de amasado, en dosis máxima de 0.2% del peso de la harina total utilizada en la masa final (BOE, 2019).

En México la Norma Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008, define como productos de panificación a “Los obtenidos de las mezclas de harinas de cereales o harinas integrales o leguminosas, agua potable, fermentados o no, que pueden contener: mantequilla, margarina, aceites comestibles, grasas vegetales, sal, leudantes, polvo de hornear y otros aditivos para alimentos, especias y otros ingredientes opcionales tales como, azúcares, mieles, frutas, jugos, granos y semillas comestibles, entre otros; sometidos a proceso de horneado, cocción o fritura; con o sin relleno o con cobertura, pueden ser mantenidos a temperatura ambiente, en refrigeración o en congelación según el caso”. Sin embargo, no se cuenta con legislación específica para el pan de masa madre.

En función de su fermentación y tipo de proceso, la masa madre puede clasificarse en cuatro tipos. Tipo I, cuando la fermentación ocurre espontáneamente por levaduras y las BAL en la harina; tipo II, cuando se inocula en proporción adecuada la microbiota; Tipo III, que es la forma deshidratada del tipo II; y tipo IV, que es una mezcla de tipo I y tipo II que actualmente se produce sólo a escala de laboratorio (Corsetti & Settanni, 2007; de Vuyst & Neysens, 2005).

### **2.2.1 Transformaciones bioquímicas en el proceso de fermentación del pan de masa madre.**

Las transformaciones bioquímicas durante la fermentación de la masa son catalizadas por enzimas provenientes de la gran variedad de especies de BAL y levaduras que provienen del ambiente, aire, e ingredientes. *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura que se ha reportado participa principalmente en la fermentación de la masa madre, además de *Candida milleri*, *Candida pelliculosa*, *Hansenula anomala* y *Issatchenkia orientalis* (Marqués & Lacueva, 2007; Huys *et al.*, 2012). Las levaduras requieren, condiciones óptimas: temperatura (24-30°C), pH de 3.5 a 5.5, humedad de 70 a 75% y un tiempo de 12 a 72 h para su multiplicación y fermentación de la masa (De Vuyst *et al.*, 2016).

Por otro lado, los cereales de las harinas también pueden ser fuente de bacterias como las BAL, enzimas y carbohidratos como sustrato para el crecimiento bacteriano. Las BAL hidrolizan la maltosa en dos moléculas de glucosa, excretando uno de los monosacáridos fuera de la célula; que es utilizado por la levadura para ser transformado en CO<sub>2</sub>, alcohol y otros productos intermedios. El CO<sub>2</sub> se disuelve parcialmente, dando ácido carbónico quedando retenido parcialmente en la fase gaseosa de la masa, y el resto escapa (Catzeddu, 2019).

Las BAL homofermentativas, producen ácido láctico a partir de la glucosa, mientras que las heterofermentativas producen además de ácido láctico, etanol y CO<sub>2</sub>, así como ácido acético a partir del alcohol producido por las levaduras. El ácido láctico pasa a la fase líquida incrementando la acidez en la masa y el ácido acético tiene un efecto menos significativo respecto a la acidez (Catzeddu, 2019).

El trigo contiene un 70% de almidón (base seca), el cual es degradado por las enzimas  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -amilasa y glucoamilasa. La acidificación causada por las BAL inhibe a las enzimas degradadoras del almidón, produciéndose durante la fermentación maltodextrinas, maltosa y glucosa, por ejemplo, la glucoamilasa se inhibe a pH <4.5. Las BAL también pueden formar exopolisacáridos en el pan de masa madre, mejorando el volumen y la textura del pan y aumentando el contenido

de fibra dietética, pero su efecto beneficioso puede verse mitigado por el exceso de acidez (Gänzle, 2014).

Por otro lado, la acidificación bacteriana durante la fermentación solubiliza las proteínas insolubles del trigo y del centeno, permitiendo que sus enzimas contribuyan a la degradación y despolimerización de las proteínas. Las enzimas proteolíticas endógenas de la masa convierten las proteínas en péptidos, que a su vez son convertidos por las peptidasas intracelulares de las BAL en aminoácidos, para luego formar compuestos volátiles del sabor o sus precursores y compuestos fenólicos (Gänzle, 2014; Ma *et al.*, 2021).

Normalmente se utiliza harina de trigo en la elaboración de pan de masa madre, aunque pueden utilizarse otras harinas de cereales o pseudocereales no convencionales. Así, se puede implementar la adición de harina de amaranto para mejorar el contenido nutricional, la apariencia y las características organolépticas del producto (Venturi *et al.*, 2019, Karimi *et al.*, 2021).

### **2.3 Amaranto**

El amaranto (*Amaranthus spp.*) pertenece a la familia *Amaranthaceae*, es categorizado como un pseudocereal sin gluten. Comparado con cereales como el maíz, el trigo y el sorgo, el amaranto tiene un nivel de proteína más alto (14–15.5%), menor contenido de grasa (7.5%), mayor contenido de carbohidratos (60–68%) y menos ceniza (2.5–3.1%). Tiene un alto contenido de lisina (5.2–6.1 g/100 g de proteína), aminoácido esencial carente en la mayoría de los granos de cereal, por lo tanto, además de ser rico en vitaminas y minerales como calcio y magnesio (Jan *et al.*, 2023). Además, fue designado como el mejor alimento de origen vegetal por la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos (Gobierno de México, 2016).

Por otro lado, los cultivos de amaranto son resistentes a condiciones climáticas adversas como lo son las sequías, altas temperaturas, plagas, por lo que es un cultivo prometedor que ha ganado popularidad (Jan *et al.*, 2023).

La adición de amaranto a la harina trigo en la elaboración de pan de masa madre da como resultado un pan con mayor contenido fenólico, además de mayor capacidad antioxidante. La adición de harina de amaranto al 20% (en peso) en relación a la harina de trigo, permite conservar la calidad estructural del pan de masa madre, mejorando la calidad nutricional y con aprobación sensorial. Sin embargo, a mayores concentraciones resultan sabores “terrosos”, siendo la proporción de mayor aceptación sensorial la de 9:1 trigo:amaranto (en peso) (Venturi *et al.*, 2019). Sin embargo, la harina de amaranto presenta menor aceptación en cuanto a sabor y olor comparado con panes de trigo y quinoa (Yeşil & Levent, 2022).

Las BAL pueden fermentar la harina de amaranto ocasionando diferencias significativas en sus propiedades organolépticas (Venturi *et al.*, 2019), su aplicación en la bioconservación de alimentos mediante los procesos de fermentación ha tenido gran éxito (Parra-Huertas, 2010).

#### **2.4 Bacterias ácido lácticas**

Las BAL son microorganismos Gram positivos, heterogéneos, donde el metabolito de principal producción es el ácido láctico proveniente de la fermentación de carbohidratos, generalmente son de forma bacilar o cocoide, no esporulados, microaerófilos o anaerobios facultativos (Todorov *et al.*, 2019; Arteaga-Garibay *et al.*, 2023).

Las BAL aumentan el volumen y disminuyen la firmeza de la miga en el pan; aunque la firmeza aumenta con el paso del tiempo, la suavidad de la miga es un efecto deseable que es independiente del contenido de humedad, y se atribuye al bajo nivel de pH (Korcari *et al.*, 2021).

Diversos estudios han utilizado cepas seleccionadas de BAL y/o levaduras provenientes de otros ecosistemas alimentarios en la fermentación de masa madre, con el fin de aumentar el rendimiento o de mejorar atributos específicos, donde los géneros más comunes de BAL son *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* (Arora *et al.*, 2021).

### **2.4.1 *Lactococcus lactis***

*Lactococcus lactis* es uno de los principales cultivos iniciadores de productos de fermentación lácteos (Alegría *et al.*, 2010).

Son bacterias anaerobio-facultativas, esféricas, homolácticas y no esporulantes, con cientos de cepas y biovariantes, a pesar de su asociación con productos lácteos, originalmente se aislaron de plantas (How *et al.*, 2022). El ácido láctico producido por *L. lactis*, se utiliza como conservador de alimentos, y esta cepa se ha etiquetado como “Generalmente Reconocida como Segura” (GRAS) por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de EE. UU. (FDA, 2023a).

*L. lactis* subsp. *Lactis* produce un péptido antimicrobiano (nisina A) durante su metabolismo asociado al crecimiento, que inhibe el crecimiento de una amplia gama de bacterias Gram-positivas (García-Almendárez *et al.*, 2008).

*L. lactis* subsp. Se encuentra dentro de las principales BAL que se han utilizado en la fermentación de alimentos lácteos, ya que contribuyen al sabor, calidad, textura y seguridad de estos; han sido utilizadas en la obtención de queso artesanal y comercial, leches fermentadas y cremas agrias, donde su principal aporte es la descomposición proteica de la leche y la producción de ácido láctico a partir de azúcares. *L. lactis* subsp. posee una amplia distribución ecológica desde pan de masa madre a plantas de caña de azúcar (Cavanagh *et al.*, 2015).

### **2.4.2 Nisina**

La nisina es un péptido antimicrobiano compuesto por 34 aminoácidos, con una masa molar de 3.4 kDa. Se clasifica como lantibiótico de clase I, por ser un péptido pequeño, policíclico, estable al calor, activo a nivel de membrana y con aminoácidos poco comunes en su composición como lantionina, b-metil-lantionina y deshidroalanina, formados postraduccionalmente por deshidratación de la serina y treonina (Figura 1) (Alegría *et al.*, 2010; Serna *et al.*, 2015).

La nisina A fue la primera bacteriocina en ser descubierta en productos lácteos y es la variante más estudiada, se solubiliza a pH 2 y a temperaturas de entre 50 a 100°C, tiene actividad antimicrobiana contra diferentes microorganismos

principalmente Gram positivos y formadores de esporas. Su interés principal radica en que tiene actividad contra microorganismos patógenos como *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium spp.*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* y *Streptococcus spp* (Sugrue *et al.*, 2023).

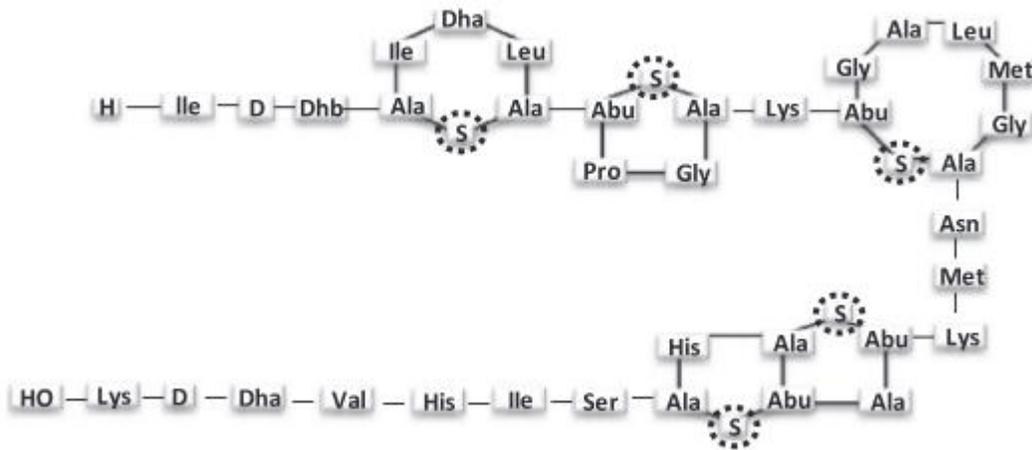


Figura 1. Estructura química de la nisina. Dha=deshidroalanina, Dhb=deshidrobutirina, Abu=anhidrobutirina (Müller-Auffermann *et al.*, 2015).

La nisina tiene un mecanismo de acción dual, inicialmente se une a la pared celular mediante interacciones electrostáticas, ya que al tener carga positiva es atraída por la carga negativa de las membranas. Posteriormente se une al transportador principal de las subunidades de peptidoglicano (Lípido II) desde el citoplasma hasta la pared celular, evitando la formación de pared celular y a su vez induciendo la formación de poros (Figura 2); con ello ocasiona la pérdida de material celular como aminoácidos, sales y ATP y provoca la muerte celular (López *et al.*, 2008; Serna *et al.*, 2015).

Su efectividad ha sido comprobada y tiene aplicación en más de 50 países. El Codex Alimentario lista a la nisina como la única bacteriocina dentro de los aditivos alimentarios, donde su uso se aprueba para la conservación de quesos y productos análogos, productos líquidos a base de huevo, entre otros. Se ha demostrado que incluso a dosis altas sigue siendo inocua y carente de toxicidad,

debido a que es sensible a enzimas del tracto digestivo (Batista-González *et al.*, 2022).

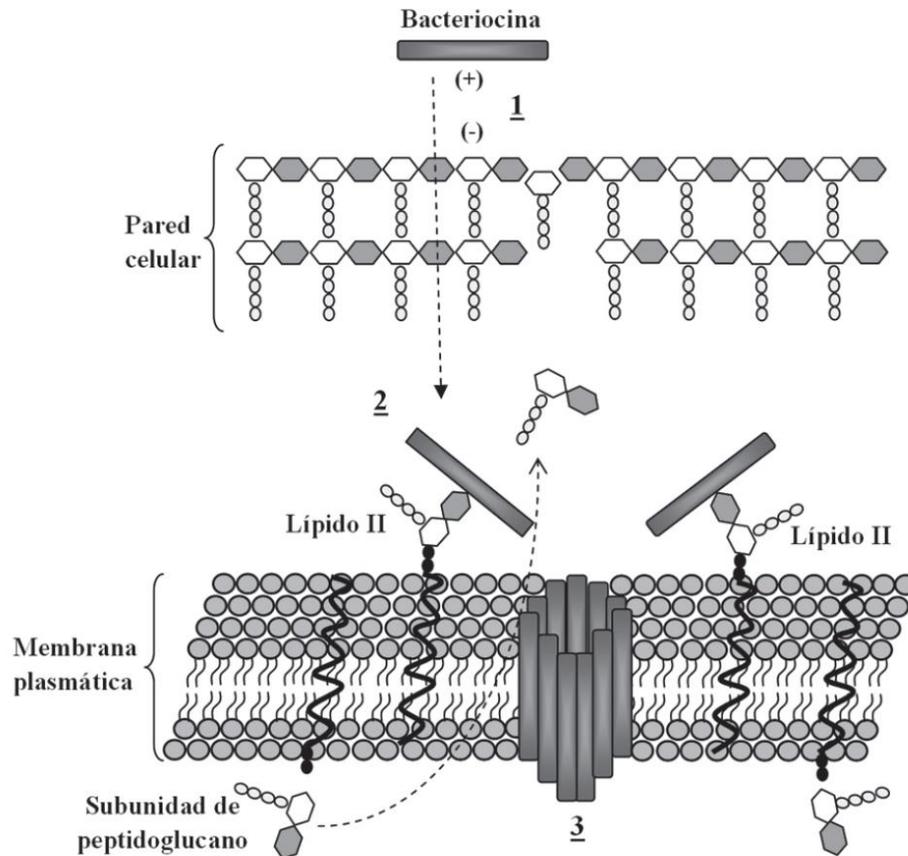


Figura 2. Mecanismo de acción dual de la nisina de *Lactococcus lactis* frente a la membrana celular de bacterias Grampositivas, 1) la nisina es atraída por los componentes de la pared celular 2), la nisina se une al lípido II (transportador de subunidades de peptidoglucano), 3) las moléculas de nisina utilizan se anclan e insertan en la membrana celular formando poros, ocasionando muerte celular (López *et al.*, 2008).

El acuerdo por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos en México clasifica a la nisina como conservador de alimentos, con límites máximo en productos lácteos 12.5 mg/kg. En otros alimentos no lácteos únicamente se requieren buenas prácticas para su uso, su numeración de SIN (Sistema Internacional de Numeración de Aditivos Alimentarios) es el 234 (Ley de Aditivos en México, 2012).

Una tecnología emergente que muestra resultados promisorios para la conservación de alimentos es la aplicación de empaques comestibles.

## **2.5 Empaques comestibles**

Los empaques comestibles son una tecnología prometedora en el campo de la conservación de los alimentos, la aplicación de estos da como resultado una mejora en la calidad y la inocuidad de los alimentos (Caiza, 2024).

El recubrimiento es una fina capa formada por componentes comestibles sobre el alimento en su superficie que se consume con el producto alimenticio. Los recubrimientos comestibles se encuentran en forma líquida y se aplican a la materia prima por inmersión, aspersado o barnizado con una solución, sin embargo, para caracterizarlos es necesaria su forma como película. Se denomina película a la capa previamente formada y colocada sobre la materia prima y se puede utilizar como contenedor o separador de superficies en un mismo alimento. Las películas comestibles tienen forma de lámina sólida y luego se aplican envolviendo o cubriendo el producto. (Kocira *et al.*, 2021).

Tanto las películas como los recubrimientos comestibles son una alternativa funcional y sostenible a los empaques o envases de plásticos comunes en el mercado, al ser naturales y biodegradables, tiene amplia aplicación en diversos productos, obteniendo efectos beneficiosos. Tales efectos beneficiosos son: el ser comestibles, propiedades de barrera a rayos UV, humedad, aceites y gases; solubilización en agua y grasas; resistencia a cambios microbiológicos, físicos y químicos; beneficios que dependen del tipo de polímero, el proceso de producción y las condiciones de formación (Šuput *et al.*, 2015).

Los recubrimientos comestibles generalmente se producen por métodos húmedos, mediante la eliminación del solvente utilizado para preparar la solución formadora de película, se disuelve el polímero en un disolvente preferentemente agua y se puede combinar con otros aditivos (Escamilla-García *et al.*, 2018).

Los materiales con los que se elaboran los recubrimientos comestibles pueden ser biopolímeros como polisacáridos y proteínas, que puedan formar una

matriz estructural, estos son de naturaleza hidrofílica. Pueden contener más de un ingrediente, ya que al usar uno suelen resultar estructuras quebradizas; por lo que además del polímero base se suelen utilizar plastificantes como polioles (glicerol, sorbitol, polietilenglicol), azúcares (glucosa, miel) y lípidos (monoglicéridos, fosfolípidos, aceites y ceras). No deben utilizarse en exceso ya que pueden deteriorar las propiedades mecánicas y aumentar la permeabilidad al vapor de agua, (Fernández-Pan & Maté-Caballero 2011).

Las proteínas de la quinoa pueden otorgar propiedades diferentes a los recubrimientos, extendiendo su uso en la industria alimentaria (Abugoch *et al.*, 2008). Por otro lado, el quitosano se ha usado en la industria alimentaria, médica, farmacéutica, agrícola y química debido a sus propiedades no tóxicas, biocompatibles, mucoadhesivas y biodegradables (Martău *et al.*, 2019).

### **2.5.1 Quinoa**

La quinoa es un pseudocereal con buenas propiedades nutricionales por su alto contenido proteico, conteniendo todos los aminoácidos esenciales. También contiene elementos traza y cantidades significativas de vitaminas C, E (tocoferoles) y B (B1, B2 y B3) junto con importantes minerales (Ca, K, Fe, Mg, Mn, P), e isoflavonas que pueden contribuir a sus propiedades antioxidantes. No contiene gluten y su testa contiene saponinas las cuales son antinutritivas e imparten sabores amargos. Sin embargo, pueden ser removidas fácilmente mediante lavados con agua (Escamilla *et al.*, 2019), la quinoa ha recibido atención especial en estudios debido a sus componentes nutricionales (Tabla 1) (Arneja *et al.*, 2015).

La quinoa es altamente nutritiva y se puede cultivar en una variedad de condiciones ambientales y es capaz de enfrentar cambios ambientales, debido a su adaptabilidad, asociada a su plasticidad genética, (Jan *et al.*, 2023).

Las fracciones proteicas de la quinoa son albúminas 2S y globulinas 11S, con porcentajes entre 35 y 37 %, respectivamente, cuya estructura se estabiliza mediante puentes disulfuro (Abugoch *et al.*, 2008), las proteínas de la quinoa se

pueden disolver a pH ácido (Abugoch *et al.*, 2011), y su punto isoeléctrico es a pH de 4 a 4.5 (Bergesse *et al.*, 2015).

Tabla 1. Composición proximal de las semillas de quinoa, según diferentes autores (Arneja *et al.*, 2015).

<b>Composición proximal (% p/p)</b>	<b>(Repo-Carrasco-valencia 2011) (g/100 g)</b>	<b>(Ramos Diaz &amp; Martin 2011) (g/100 g)</b>	<b>(Villa <i>et al.</i>, 2014) (g/100g)</b>
Humedad	10.8-12.6	11.6	14.7
Ceniza	13.9-15.5	3.2	3
Proteína	3.1-5.4	16.4	11.7
Grasa	4.7-6.8	6.3	12.4
Carbohidratos	68.8-75.8	63	55.3
Fibra cruda	1.9-3.4	11.5	2.2

La elaboración de recubrimientos comestibles con proteína de quinoa puede favorecer las características de las películas y pueden extender su uso como recubrimiento en productos alimenticios (Mir *et al.*, 2023). Cuando se utiliza en combinación con el quitosano, con ácido láctico como disolvente, la proteína muestra un efecto plastificante (Bautista-Espinoza *et al.*, 2023).

### **2.5.2 Quitosano**

El quitosano (QT) es un polisacárido policatiónico que se obtiene a partir de la desacetilación alcalina de la quitina, puede servir como matriz en la elaboración de recubrimientos comestibles gracias a sus grupos amino reactivos, y (Curbelo *et*

*al.*, 2021). La quitina se encuentra de forma natural en el exoesqueleto de los crustáceos, las paredes celulares de hongos (filamentosos y macromicetos) y otros materiales biológicos como arácnidos e insectos (Kocira *et al.*, 2021). La extracción de quitina de crustáceos comprende los procesos de despigmentación, desmineralización y desproteinización. Posteriormente se desacetila para obtener quitosano mediante hidrólisis termo alcalina con NaOH o enzimática con la quitina desacetilasa (Figura 3) hasta obtener un grupo amino ( $\text{NH}_2$ ), permitiendo así tener mayor efecto de solubilidad del polímero (Curbelo *et al.*, 2021).

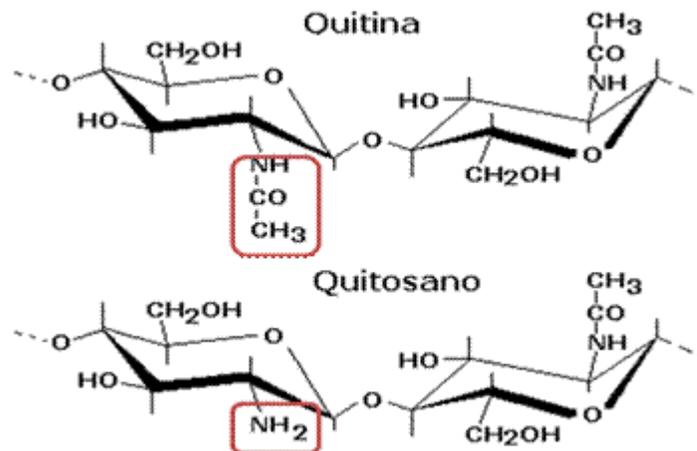


Figura 3. Estructura de la quitina y quitosano, similitudes y diferencia, en donde en el quitosano aparece el grupo amino cuando se desacetila la quitina (Curbelo *et al.*, 2021).

El quitosano no es tóxico, ni alergénico, es biodegradable por lo que no es dañino al medio ambiente, biocompatible además tiene efecto biológico antifúngico; el quitosano tiene permeabilidad selectiva a los gases ( $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ ) y buenas propiedades mecánicas (Kocira *et al.*, 2021).

Los recubrimientos comestibles se pueden usar como barrera contra la humedad en productos de panificación para evitar la reducción de la vida útil del producto, en este caso los recubrimientos basados en lípidos suelen ser más efectivos que los basados en hidrocoloides (Bautista-Espinoza, 2022).

Los recubrimientos comestibles pueden ser activos al incluir agentes antimicrobianos, los cuales pueden ser liberados de manera controlada por el

recubrimiento. Los agentes activos en función de su mecanismo de acción pueden ser aquellos en donde existe migración de compuestos activos, que pasan parcial o totalmente al alimento o a la superficie, o bien efectos no migratorios de los compuestos con actividad antimicrobiana en la superficie de la película (Vázquez-Briones & Guerrero-Beltrán, 2017). Ejemplo de agentes activos que se han utilizado en formulaciones de empaques comestibles activos se encuentran los aceites esenciales.

### **2.5.3 Aceites esenciales (AE)**

Los aceites esenciales son metabolitos secundarios de vegetales como flores, capullos, semillas, hojas, ramas, cortezas, hierbas, madera, frutos y raíces, que pueden obtenerse por destilación de vapor, mecánicamente, destilación seca o por separación de fases). Tienen propiedades fungicidas y antimicrobianas (Hernández-Hernández *et al.*, 2014). Se componen principalmente de terpenos, terpenoides y otros compuestos aromáticos (Man *et al.*, 2019).

El uso de AE ofrece numerosos beneficios como promoción de la digestibilidad, estimulación de enzimas y propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antiparasitarias, antiinflamatorias, antidiarreicas y antimicóticas (Montero-Recalde *et al.*, 2017). Sin embargo, son compuestos hidrofóbicos volátiles de fuerte aroma, sensibles a factores como oxígeno, luz, temperatura, pH, se degradan fácilmente y afectan negativamente las propiedades sensoriales de los alimentos (Shen *et al.*, 2002).

Los aceites esenciales pueden utilizarse para reforzar recubrimientos comestibles, para aumentar el tiempo de vida de anaquel de los alimentos y prevenir el crecimiento de microorganismos, por lo que se les conoce como activos. Sin embargo, un exceso puede llegar a comprometer características sensoriales o incluso pueden llegar a ser tóxicos (Yousuf *et al.*, 2021).

#### **2.5.3.1 Aceite esencial de canela (AEC)**

La canela (*Cinnamomum verum*) se obtiene a partir de la corteza interna del árbol de la canela (*Cinnamomum*) por enrollamiento, y secado, formando una canilla

o tubo y posteriormente es cortada en palitos de 5 a 7 cm (Saltos, 2021). Se puede extraer de diferentes partes del árbol, por lo que tendrán un compuesto primario diferente y en consecuencia efectos y composiciones diferentes. Por ejemplo, aceite de la corteza del tronco (cinamaldehído), de la corteza de la raíz (alcanfor) y de las hojas (eugenol), siendo el más importante el cinamaldehído (Figura 4) (Loeza-Concha *et al.*, 2022).

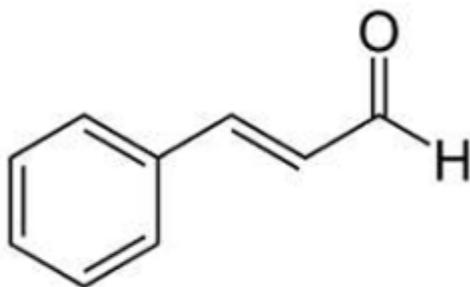


Figura 4. Estructura química del cinamaldehído (Mahmoodnia *et al.*, 2017)

El trans-cinamaldehído es el componente que da lugar a gran parte de las propiedades antimicrobianas y antifúngicas, inhibe la producción de aflatoxinas, así como una serie de propiedades medicinales. Por otro lado, tiene como desventaja, su baja solubilidad en agua (1.1 g/L) (García-Camarillo, 2006).

Dentro de los microorganismos fúngicos a los que antagoniza el cinamaldehído, se encuentran *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Trichophyton rubrum*, *Coriolus versicolor* y *Laetiporus sulfurous*, así como *A. ochraceus* y sus toxinas asociadas, así como *Candida* spp. (Doyle & Stephens, 2019).

El transcinamaldehído, principal compuesto del AEC, tiene actividad contra diferentes bacterias patógenas, tanto Gram positivas como negativas, incluidas *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Latilactobacillus sakei*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp., *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus pyogenes* y *Cronobacter sakazakii* (Doyle & Stephens, 2019).

Los mecanismos de acción y efectos del cinamaldehído en bacterias son los siguientes (Figura 5) (Doyle & Stephens, 2019):

- i) inhibición de la proteína FtsZ, clave en el proceso de división celular y se conserva en todas las especies bacterianas.
- ii) Acción contra biopelículas, ya que inhibe los genes asociados a su producción (sarA).
- iii) Efecto anti-percepción de quorum, ya que inhibe la transcripción mediada por LuxR del promotor PluxI hasta en un 70%.
- iv) Liberación de constituyentes celulares y pérdida de integridad de la membrana celular, donde el cinamaldehído actúa como electrófilo adhiriéndose a las membranas celulares, permeabilizándolas y conduciendo a la pérdida del material intracelular; y cambios morfológicos inducidos por la exposición al cinamaldehído, afectando la división de algunas células, el desarrollo de arrugas profundas y distorsión, el deterioro de la pared celular, así como la extensión celular. Este efecto está asociado a la capacidad del cinamaldehído para penetrar la envoltura celular y, en consecuencia, alterar su estructura.
- v) Disminución significativa en los niveles de ATP intracelular, después del tratamiento y sin causar un aumento en los niveles de ATP extracelular.

En el caso de los hongos, el cinamaldehído puede inhibir la germinación de esporas, el crecimiento micelial y la producción de biomasa, también puede reducir la síntesis de ergosterol (principal componente de la membrana celular de los hongos) y puede causar daño a la citomembrana (Qu *et al.*, 2019).

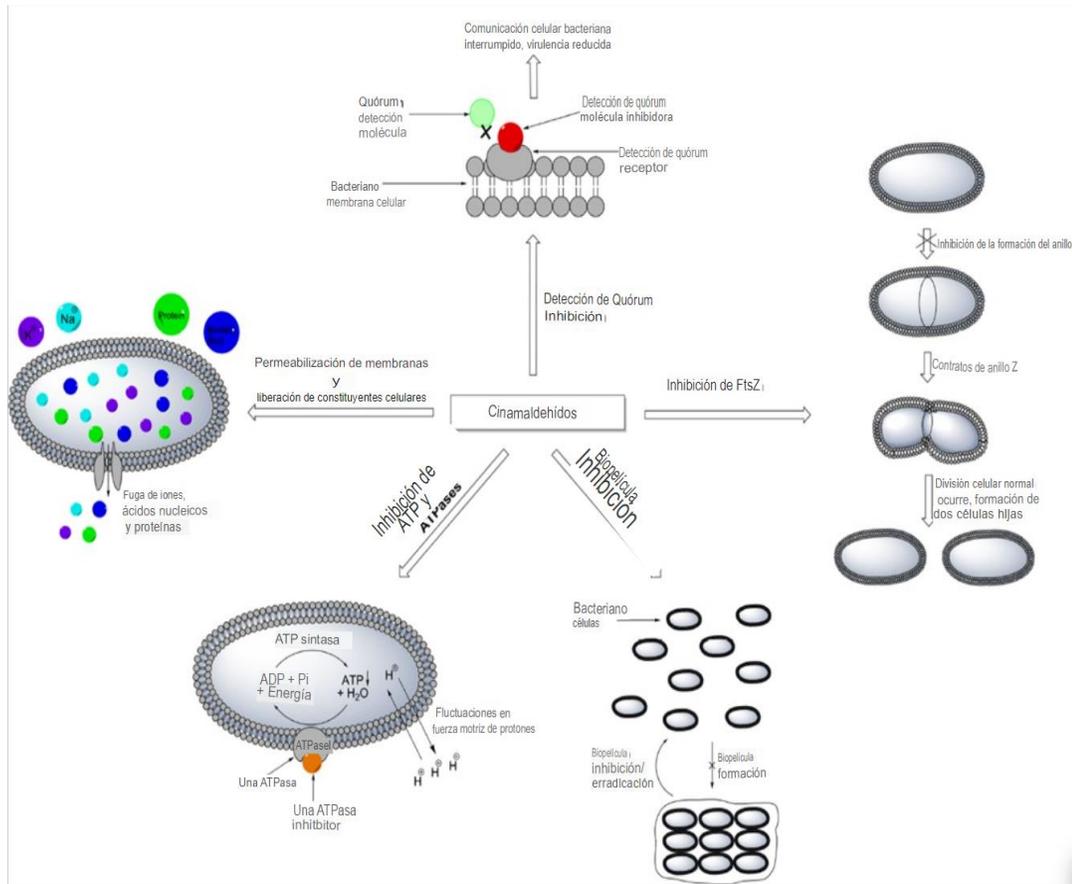


Figura 5. Representación gráfica de los mecanismos de acción antibacterianos exhibidos por los cinamaldehydos (Doyle & Stephens, 2019).

La incorporación de AEC a películas comestibles aumenta la elongación y mejora la capacidad de barrera contra el vapor de agua en comparación con películas comestibles de la misma formulación sin AEC (Uquillas, 2021), además de inactivar patógenos transmitidos por alimentos por contacto directo y/o por los vapores liberados de las películas en recipientes cerrados gracias al cinamaldehído (Doyle & Stephens, 2019).

El AEC contiene principalmente cinamaldehído, el cual contiene un grupo carbonilo ( $C=O$ ), que le proporciona un sitio reactivo para que se produzca adición nucleofílica, debido principalmente a la capacidad que posee el oxígeno para aceptar una carga negativa. Es por lo cual es susceptible al ataque por reactivos nucleofílicos ricos en electrones, como es el caso del quitosano, que debido a la presencia de grupos amino de tipo primario con un par de electrones libres, permiten

la formación de un enlace con el carbono carbonílico deficiente en electrones, mostrando afinidad con biopolímeros como el quitosano (Porrás *et al.*, 2009).

La aplicación de AE libres podría verse restringida debido a la insolubilidad en solventes polares, la baja estabilidad química y la alta volatilidad, lo que resulta en una reducción de la bioactividad o en la degradación de los compuestos activos (Danila *et al.*, 2021). Por tanto, se requiere conservar los AE mediante técnicas como la encapsulación, para mejorar su funcionalidad y protegerlos de las condiciones ambientales externas y de factores ambientales (Yamine *et al.*, 2024).

### **2.5.3.2 Microencapsulación de aceites esenciales**

La microencapsulación es un método para la conservación de propiedades fisicoquímicas y biológicas de sustancias químicas, además de proteger los sabores, la encapsulación proporciona una liberación controlada, principalmente cuando la humedad aumenta (Castañeta *et al.*, 2011).

El almidón modificado octenil succínico da como resultado mayor retención de compuestos de sabor de AE de menta en comparación con almidones hidrolizados (Baranauskienė *et al.*, 2007). El secado por aspersión consiste en la atomización de una solución o suspensión líquida en gotas diminutas, seguido de secado en una corriente de aire caliente para producir micropartículas sólidas (Turchiuli *et al.*, 2005).

El almidón nativo tiene poca capacidad emulsionante, pero el almidón modificado por esterificación con anhídrido octenilsuccínico, es un material biológico viable para encapsular AE (Romero-Hernández *et al.*, 2021). Uno de los almidones modificados más utilizados y con mejores rendimientos es el almidón modificado HI-CAP 100®, derivado del maíz ceroso y es especialmente adecuado para la encapsulación de sabores, vitaminas y especias con alta carga de aceite. Se caracteriza por una excelente resistencia a la oxidación, y se recomienda como reemplazo total de agentes encapsulantes costosos como la goma arábiga y la gelatina (Ingredion, 2021).

La incorporación del AEC en la elaboración de recubrimientos a base de polisacáridos disminuye la resistencia a la tracción, transparencia, contenido de agua y permeabilidad al vapor de agua. Una solución a esta problemática es la adición de Tween 80 como emulsionante, resultando un aumento de la estabilidad de los recubrimientos y un aumento considerable de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Chu *et al.*, 2019).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La elaboración y consumo de pan de masa madre son tendencias en producción alimenticia, por lo que es una alternativa considerada más saludable, ya que no contiene aditivos sintéticos, los cuales el consumidor trata de evitar porque los asocia con enfermedades a largo plazo. El mercado de masa madre en 2024 mostró un estimado de 2.4 billones de dólares, siendo producido principalmente en Estados Unidos y Europa, indicando buenas perspectivas del incremento de su producción en México. La adición de harina de amaranto a la harina de trigo en la elaboración de pan de masa madre permite la mejora de características como un mejor contenido nutricional y mayor contenido de compuestos fenólicos que pueden conferir sabores únicos al producto. También se promueve una mejor calidad proteica por el contenido de aminoácidos esenciales. Por otro lado, la inoculación de *Lactococcus lactis* NRRL B-50307 que produce el antimicrobiano nisina A, permitirá la prolongación de la vida de anaquel por la actividad antimicrobiana de este metabolito, además de la acidificación del medio desde el inicio de la producción. Por lo tanto, se espera una mejora de las propiedades de textura en el pan gracias al ácido láctico proporcionado por las BAL y la cepa inoculada, así como por las propiedades de la harina de amaranto que se usará en mezcla con la harina de trigo. Por otro lado, los recubrimientos comestibles permiten una mayor vida de anaquel actuando como barrera al vapor de agua, al ser la humedad un factor determinante en el deterioro del pan. Además, el uso del recubrimiento activo formulado con aceite esencial de canela garantizará en la superficie del pan una actividad antifúngica, considerando que el ataque fúngico es común en el pan durante el almacenamiento. Por lo tanto, en la presente investigación se busca lograr la adaptación de la cepa de *L. lactis* NRRL B-50307 a la formulación de la mezcla de harina de amaranto y trigo, en la elaboración de pan de masa madre esperando tener mejor aceptación por los consumidores y una mayor vida de anaquel. Además, se estará implementando un recubrimiento comestible a base de proteína de quinoa y quitosano reforzado con aceite esencial de canela microencapsulado para reducir sensiblemente el aroma del aceite esencial, pero contribuyendo a prolongar la vida útil del pan de masa madre.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Evaluar la vida de anaquel de un pan de masa madre a base de mezcla de harina de trigo con amaranto adicionada con *Lactococcus lactis* NRRL B-50307, y con un recubrimiento comestible a base de quitosano y quinoa reforzado con aceite esencial de canela microencapsulado.

### 4.2. Objetivos específicos

1. Elaborar un recubrimiento comestible activo a base de proteína de quinoa y quitosano adicionado con aceite esencial de canela microencapsulado mediante secado por aspersión y caracterizar sus propiedades mecánicas y actividad antifúngica.
2. Determinar el comportamiento de *Lactococcus lactis* NRRL B-50307 y la producción de nisina en la masa madre elaborada con mezcla de harinas de trigo y amaranto.
3. Evaluar la aceptación de pan de masa madre elaborado con mezcla de harinas de trigo y amaranto adicionado con *L. lactis* y un recubrimiento comestible a base de proteína de quinoa y quitosano, adicionado con aceite esencial de canela microencapsulado.
4. Evaluar la vida de anaquel a condiciones aceleradas del pan de masa madre elaborado con masa madre fermentada por *L. lactis* y el recubrimiento activo.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Materiales

#### Materia orgánica

Canela (*Cinnamomum zeylanicum*) obtenida de la Central de Abastos de Irapuato, Guanajuato, México (País de origen: Sri Lanka), Quinoa (*Chenopodium quinoa*) (Vivió Foods, CDMX, México), almidón modificado octenil succínico (Hi-Cap® 100) obtenido de Ingredion (Westchester, IL, EE. UU.). Aceite esencial de canela comercial grado alimenticio (Oleum Vitae, CDMX, México) (Anexo 6).

#### Reactivos

Sulfato de sodio anhidro (Hach, Loveland, CO, EE.UU.), rifampicina (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EE.UU.), Etanol, NaOH, cloruro de sodio, lactosa (Fagalab, Sinaloa, México). Cloruro de potasio, cloruro de calcio, carbonato de sodio (JT Baker Chemical, Phillipsburg, NJ, EE. UU.). Peptona bacteriológica, extracto de carne, extracto de levadura, glucosa (BD, Bioxon México). Azúcar de caña (Zulka, Sinaloa, México) y sal (La fina, CDMX, México). Los medios de cultivo fueron Agar M17, agar MRS (BD, Bioxon México), agar púrpura de bromocresol (Merck, Darmstadt, Alemania), hexano 95% (El Crisol, CDMX, México). Las cepas utilizadas fueron *L. lactis* NRRL B-50307, *Micrococcus luteus* NCIMB 8166, *Aspergillus niger* GS1 y levadura *Saccharomyces cerevisiae* comercial (Nevada, CDMX, México).

### 5.2 Métodos

#### Metodología del objetivo 1

##### 5.2.1 Obtención de aceite esencial de canela

Se utilizó canela trozada, la cual fue sometida a un tratamiento de sonicación en un procesador ultrasónico VCX 500 (Sonics Materials, Newtown, CT, EE. UU.), con una sonda de 3 mm de diámetro. Los parámetros utilizados en el proceso fueron: 100 g de materia prima/L de agua destilada, 60% de amplitud, pulsos de 28 s:32 s

prendido:apagado (On:Off), por 20 min con un intervalo de descanso de 10 minutos a los 10 min de inicio (Morsy, 2015).

Una vez terminado el proceso, se almacenó la canela y el agua usada en el proceso, cada uno por separado, en refrigeración a 4°C durante 3 días.

El proceso de hidrodestilación se realizó por el método de arrastre de vapor, utilizando el agua y la canela previamente tratadas y refrigeradas, se tomó como control canela no sometida al tratamiento de sonicación. Se utilizaron 300 g de canela/3 L de agua destilada, se sometió al proceso de destilación con arrastre de vapor a una temperatura de 100°C utilizando un hidrodestilador UAQ-001 (Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México, el cual se encuentra en solicitud de patente con número de folio Mx/E/2023/023755, ante el Instituto Mexicano de Propiedad Industrial).

Posteriormente el extracto obtenido fue centrifugado a 4000 rpm (2,580 x g) durante 20 min a 4°C, en una centrífuga Avanti J 301 (Beckman, CA, EE. UU.), el sobrenadante fue desechado y la capa oleosa (el AEC) del destilado obtenido fue recuperada y secada con sulfato de sodio anhidro (Hach). El AEC se almacenó en frascos ámbar protegidos de la luz a 4 °C para su posterior uso (Bautista-Espinoza *et al.*, 2023). En base a los resultados del rendimiento de AEC (resultados en sección 6.1) se procedió a utilizar un AEC comercial grado alimenticio (Oleum Vitae, CDMX, México).

### **5.2.2 Microencapsulación del aceite esencial de canela (AEC)**

Preparación de la solución encapsulante. Se utilizó almidón modificado octenil succínico (Hi-Cap® 100) como material de pared encapsulante del AEC comercial. Se homogenizaron 38.2 g de almidón modificado en 161.8 g de agua grado HPLC en un agitador orbital con una barra magnética durante 15 min. Posteriormente se homogeneizó la solución en un agitador orbital MaxQ™ 6000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y se mantuvo en agitación durante 12 h a 47.5 °C y 150 rpm (Hernández-Hernández *et al.*, 2014).

Después de la agitación se procedió a pesar 125 g de la solución encapsulante (almidón-agua grado HPLC) y 5 g de aceite esencial de canela

comercial, los cuales fueron homogenizados con una barra magnética y un plato de agitación. En la mezcla había 77.79% de agua HPLC, 13.37% de almidón modificado y 3.85% de AEC, posteriormente se procedió a homogeneizar con un homogeneizador de alta velocidad Ultra-Turrax® T 25 (IKA-Werke GmbH, KG, Brisgovia, Baden-Württemberg, Alemania) durante 6 min, en velocidad 2 de 9500 rpm (de Barros Fernandes, 2014).

Una vez formada la emulsión se sometió al proceso de microencapsulación en un Mini Spray Dryer (Buchi, B-290, Flawil, Suiza), lavando con agua destilada antes y después de secar la emulsión, operando con un aspirador (sistema de extracción de aire) de caudal máximo de gas de aproximadamente 35 m<sup>3</sup>/h y con un tubo de silicona estándar (2 mm de diámetro interior, 4 mm de diámetro exterior) para la bomba, el equipo se trabajó bajo las siguientes condiciones estandarizadas por corrida (Tabla 2):

Tabla 2. Condiciones de secado en la microencapsulación de AEC.

<b>Solución</b>	<b>Temperatura de entrada (°C)</b>	<b>Temperatura de salida (°C)</b>	<b>Aspirador (%)</b>	<b>Bomba (%)</b>	<b>Tiempo (min)</b>
Agua destilada	190	93	190	10	5
	190	106	190	15	4
Emulsión	190	124	190	15	17
	190	112	190	20	3
Agua destilada	190	106	190	20	5
	190	112	190	15	5

Posteriormente se pesó el polvo obtenido del AEC microencapsulado (AECM) y se guardó en frascos de vidrio protegidos de la luz a 4°C hasta su uso posterior.

### 5.2.3 Eficiencia de microencapsulación del AEC

Se determinó el contenido de aceite libre superficial y la eficiencia de microencapsulación del AEC, por el método de Tan *et al.*, (2005) adaptado por Bae & Lee, (2008) con algunas modificaciones.

#### 5.2.3.1 Contenido de aceite libre superficial:

Se disolvieron 1.5 g de AECM en 15 mL de hexano, se homogenizó por 2 min a velocidad 9 (3200 rpm) utilizando un mezclador de vórtice Vortex-Genie2® (Scientific Industries, NY, EE. UU.), posteriormente se filtró la solución utilizando papel filtro Whatman grado 1® (Cytiva, Maidstone, Reino Unido), el polvo filtrado se enjuagó tres veces con 20 mL de hexano cada vez pasándolo a través del polvo. Posteriormente se secó el polvo residual a 60 °C hasta peso constante. Luego se calculó el contenido de aceite libre superficial como porcentaje de la diferencia de peso en el polvo antes y después de la extracción y lavado con hexano.

#### 5.2.3.2 Contenido de aceite total

Para obtener la eficiencia de microencapsulación se repitió el proceso del contenido de aceite libre superficial, pero usando como tiempo de homogenización 1 h. El objetivo fue liberar todo el aceite contenido en las microcápsulas, es decir el aceite total sería la suma del aceite libre superficial y el aceite microencapsulado, siendo el contenido de aceite microencapsulado la diferencia de peso del polvo seco obtenido en el método de aceite libre superficial y el de eficiencia de microencapsulación. La eficiencia de microencapsulación (EM) se calculó usando la ec. (1):

$$\% EM = \left( \frac{\text{Aceite total} - \text{Aceite libre superficial}}{\text{Aceite total}} \right) \times 100 \text{ --- (Ec. 1)}$$

#### 5.2.4 Actividad antifúngica del AEC y AECM

Para la determinación de la actividad antifúngica se probaron dos métodos, siendo el primero el método de incubación de esporas descrito por Ochoa *et al.*, (2017). Al ser *A. niger* el microorganismo causante del moho negro del pan (Axel *et al.*, 2017), se utilizó este microorganismo como indicador de actividad antifúngica

contra el AEC y AECM. Se activó la cepa *A. niger* GS1 en agar PDA durante 6 días, hasta que la caja Petri se cubrió de esporas, posteriormente se agregó a la caja de esporas una solución estéril de Tween 80 al 10% (v/v) y se barrió con un asa de vidrio estéril. Se recuperó la solución de esporas y se depositó en un tubo Falcón que se almacenó a 4 °C, posteriormente se ajustó la solución de esporas a una concentración  $10^6$  esporas/mL mediante una cámara de Neubauer.

Se inocularon 100  $\mu$ L de la solución de *A. niger* (ajustada a una concentración de  $10^6$  esporas/mL) en 1900  $\mu$ L de medio papa dextrosa, y se probaron concentraciones del AEC de 500, 700 y 1000 ppm, un control positivo (inóculo de esporas sin AEC o AECM), dos controles negativos (AEC y AECM sin inóculo de esporas). Considerando que el AECM tuviese un 100% de eficiencia de microencapsulación y recuperación de los sólidos totales (previo al resultado de eficiencia de microencapsulación), se usaron concentraciones de 500, 700 y 100 ppm de AECM, equivalentes a 2.88, 4.04 y 5.77 mg de AEC, respectivamente. Se tomó como punto de partida la concentración mínima inhibitoria del AEC contra *A. niger* (500 ppm) reportada por Mahdi *et al.*, (2021) y se incubaron los tratamientos durante 24 h, a 30°C.

Después se sembraron 100  $\mu$ L del medio previamente inoculado e incubado de cada uno de los tratamientos por el método de extensión en superficie, con asa estéril en agar rosa de bengala (RBC), suplementado con cloranfenicol (0.1%, p/v) y se monitoreó durante 5 días.

También se utilizó el método de difusión en disco descrito por Lima *et al.*, (1993) con modificaciones. La suspensión de esporas de *A. niger* se inoculó a una concentración de  $10^5$  esporas/mL en placas de PDA por extensión en superficie. Inmediatamente después se colocaron membranas Durapore® de 0.45  $\mu$ m de tamaño de poro y 25 mm de diámetro (Millipore, MA, EE. UU.), sobre la superficie del agar para cada uno de los tratamientos por separado y por triplicado. Se adicionó una solución de AEC y Tween 80 al 10% (v/v) a concentraciones de 500, 700 y 1000 ppm del AEC en 100  $\mu$ L, así como 2.88, 4.04 y 5.77 mg en 100  $\mu$ L de una solución de Tween 80 al 10% (v/v) del AECM, seguido de incubación a 30°C por 48 h. Se

analizó el área inhibida (carente de crecimiento micelial) mediante el software ImageJ (Versión 1.54f, 2023).

### **5.2.5 Obtención de la proteína de quinoa (PQ)**

La proteína de quinoa fue obtenida por el método descrito por Bautista-Espinoza *et al.*, (2023) con modificaciones. Se utilizó quinoa de la variedad *Chenopodium quinoa*, los granos se lavaron con agua destilada hasta la ausencia de burbujas, para remover las saponinas naturales, para luego secar a 50°C en horno (Quincy Lab, Burr Ridge, IL, EE. UU.) durante 24 h. Los granos secos se molieron usando un molino de café (Krups, CDMX, México) hasta obtener harina (alrededor de 0.4 mm de diámetro).

Se obtuvo un extracto proteico, preparando una suspensión de harina:agua destilada en relación 1:10 (p/v), se ajustó el pH a 11.0 con NaOH 1 N y se agitó durante una h en un agitador magnético. La suspensión se centrifugó a 4000 rpm (2,580 x g) durante 20 min a 4°C y se recuperó únicamente el sobrenadante (fracción de las proteínas de quinoa solubilizadas). El sobrenadante se sometió a precipitación isoeléctrica ajustando el pH a 4.0 con HCl 1 N y se agitó durante 30 min en agitador magnético; después la solución se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min a 4°C y se recuperó el precipitado (fracción de las proteínas de quinoa con carga neutra).

El precipitado se sometió a un proceso de desgrasado con etanol al 96% (v/v) (Toapanta, 2016), usando 100 mL de etanol por g de extracto obtenido; la solución se homogenizó por agitación a 300 rpm en un frasco de vidrio cerrado herméticamente a temperatura ambiente por 24 h. Posteriormente, la solución se centrifugó a 4000 rpm por 20 min a 4°C y el precipitado obtenido se secó en un horno a 50°C por 24 h. Se determinó el contenido de proteína (Nx6.25) usando el método Kjeldahl (AOAC 2023). La proteína obtenida (PQ) se empleó para la elaboración del recubrimiento.

### **5.2.6 Elaboración de la solución filmogénica como película comestible**

Se elaboraron películas comestibles bajo la metodología descrita por Bautista-Espinoza *et al.*, (2023) con modificaciones. Se llevó a cabo un diseño unifactorial con la concentración de plastificante como único factor. Se preparó una solución de PQ con agua destilada al 2% (p/v), y se le ajustó el pH alcalino a 11.0 para la solubilización de las proteínas y se agitó durante 1 h en plato de agitación.

Paralelamente se preparó una solución de quitosano (QT) en agua destilada al 1% (p/v), se agregó ácido láctico a una concentración de 0.5% (p/v) y se homogenizó durante 30 min en plato de agitación.

Posteriormente se mezclaron ambas soluciones en relación 4:1 PQ:QT (p/p) en base a los sólidos totales, es decir 28 mL de solución de PQ al 2% y 14 mL de solución QT al 1%, para obtener 42 mL de solución filmogénica, con la cual se produce una película de 90 mm de diámetro. La mezcla se homogenizó y se agregó el plastificante, glicerol a concentraciones de 20, 30 y 40% en base a los sólidos totales, para lo cual se usaron volúmenes de 0.11. 0.166 y 0.22 mL respectivamente, y agitación por 30 min.

Posteriormente todos los tratamientos se sometieron a homogenización de alta velocidad por 3 min a 9500 rpm, usando el equipo Ultra-Turrax® T 25 (IKA-Werke). Después se redujo el tamaño de partícula mediante un baño ultrasónico Digital Bath 3800 (Emerson, MI, EE. UU.) durante 15 min a 60% de amplitud.

Una vez obtenidas las soluciones, se vaciaron en cajas Petri, y se secaron en un horno por 12 h a 36°C (Ríos-de-Benito *et al.*, 2021).

Con la mejor concentración de plastificante, se repitió el mismo proceso utilizando únicamente la mejor concentración de plastificante (30%), en otro diseño unifactorial con la concentración de AECM como factor. Se usó la concentración con mejor efecto antifúngico obtenida por el método de difusión en disco de 25 mm de diámetro (4.52 cm<sup>2</sup>), para proceder a escalar la concentración al área de las películas de 90 mm de diámetro (58.08 cm<sup>2</sup>). La concentración inicial 74.47 mg de AECM se incrementó por un factor de 5 y 10, equivalentes a 379 y 744.7 mg, ya que

los componentes de la matriz polimérica pueden interactuar con el agente activo y en consecuencia no obtener el efecto inicialmente observado (Ochoa *et al.*, 2017). Se añadieron las diferentes concentraciones de AECM previo a la adición del plastificante, siguiendo la misma metodología.

### **5.2.7 Caracterización de las soluciones filmogénicas como películas.**

Se caracterizaron las películas previamente formuladas bajo un diseño unifactorial, variando la concentración de AECM, siendo los tratamientos la película control (sin AECM adicionado), 0.1g de AECM/g de película seca, 0.52 g de AECM/g de película seca (5x), 1 g de AECM/g de película seca (10x).

### **5.2.8 Espesor**

El espesor fue medido con un micrómetro digital (Mitutoyo, Kanagawa, *Japón*), realizándose 10 mediciones aleatorias en cada película (Giosafatto *et al.*, 2014).

### **5.2.9 Solubilidad**

La solubilidad de las películas se determinó siguiendo el método de García *et al.* (2004), con modificaciones. Se cortaron aleatoriamente 3 porciones de 2x3 cm<sup>2</sup> de las películas previamente elaboradas, se llevaron a peso constante a 50°C durante 18 h y se pesaron (peso inicial).

Posteriormente, las porciones previamente secadas y pesadas se pasaron a un agitador orbital MaxQ™ 6000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) durante 1 h a 25°C a 180 rpm, para luego llevarse a peso constante a 50°C por 18 h y se registró el peso (peso final). El porcentaje de solubilidad se determinó usando la ec. (2):

$$\%Solubilidad = \left( \frac{Peso\ inicial - peso\ final}{peso\ inicial} \right) \times 100 \text{ --- (Ec. 2)}$$

### **5.2.10 Color**

Se determinó el color de las películas comestibles mediante la metodología descrita por Escamilla-García *et al.*, (2019), utilizando un colorímetro portátil NR60CP (Shenzen, China). Se usó la escala CIELab, evaluando luminosidad ( $L^*$  blanco a negro), el espectro verde a rojo ( $a^*$ ) y el espectro amarillo a azul ( $b^*$ ). El equipo fue calibrado con un fondo blanco y se tomaron como mediciones 10 puntos de cada película.

### **5.2.11 Propiedades mecánicas**

Las propiedades mecánicas de las películas comestibles se determinaron según Bautista-Espinoza *et al.*, (2023). La resistencia a la tensión, porcentaje de elongación y el módulo de Young se midieron usando un equipo Instron Universal modelo 5543A (Instron, MA, EE. UU.). Las películas fueron cortadas en tiras de 7 cm de largo y 1 cm de ancho, se sometieron a humedad relativa de 70% por 4 h a temperatura ambiente, antes de realizar las mediciones.

Se empleó un analizador de textura TA-XT (TA Plus, Lloyd Instruments, West Sussex, UK) equipado con pinzas mecánicas con separación inicial de 50 mm y operando a una velocidad de desplazamiento de 1 mm/s. De los datos de fuerza-desplazamiento generados en el equipo, se determinaron los valores de esfuerzo y deformación, a partir de los cuales se determinó el esfuerzo a la tensión y el porcentaje de elongación a la fractura.

### **5.2.12 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)**

La permeabilidad al vapor de agua de las películas se determinó siguiendo el método estándar ASTM E96-00 (Bautista-Espinoza *et al.*, 2023). Las muestras se cortaron en forma circular con diámetro de 40 mm; se cargó la celda de permeabilidad con agua, se colocó la muestra de película circular y la celda fue sellada utilizando su tapadera horadada colocando la película entre empaques de silicón. El área total para la transferencia de vapor de agua fue de 9 cm<sup>2</sup>.

La celda conteniendo la película se introdujo en la cámara de permeabilidad con control de temperatura, a 30 °C. Para mantener un gradiente de humedad

relativa a través de la película, dentro de la cámara de permeabilidad se colocó sílica gel (previamente desecada). La pérdida de peso se determinó gravimétricamente durante un lapso de 12 h.

### **5.2.13 Actividad antifúngica de las películas comestibles**

La actividad antifúngica de las películas se determinó en base a la metodología descrita por Olicón-Hernández *et al.*, (2019) con modificaciones. Se inoculó *A. niger* GS1 en placas con PDA por el método de picadura, al cabo de 7 días de crecimiento del micelio y esporas, se cortó el agar con micelio usando un horador estéril de 10 mm de diámetro. Se prepararon nuevas películas de los tratamientos control, 1x, 5x y 10x, con diámetro de 100 mm, y se colocaron sobre placas con agar PDA y sobre las películas se colocó con ayuda de pinzas estériles el círculo previamente escindido. Paralelamente se creció *A. niger* en una placa nueva a la cual se le colocó el mismo diámetro del agar con micelio escindido (10 mm) y se tomó como control positivo. Se tomaron fotos del crecimiento desde la hora cero hasta el día 6 (momento en que el control positivo cubrió la caja al 100%), y se analizó el área de crecimiento mediante el software ImageJ. El porcentaje de inhibición antifúngica se calculó usando la ec. (3):

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = \left( 100 - \left( \frac{100}{AT} \times AC \right) \right) \text{ --- (Ec. 3)}$$

Donde: AT= Área total de la placa, AC= Área de crecimiento de *A. niger*

## **Metodología del objetivo 2**

### **5.2.14 Activación de *L. lactis***

La activación de la cepa *L. lactis* NRRL B-50307 se realizó usando la metodología descrita por Bautista-Espinoza *et al.*, (2024) con modificaciones. Se realizaron 3 activaciones de *L. lactis* NRRL B-50307, primeramente, se colocaron chaquiras de una conserva de -70°C en 10 mL de medio M17 adicionado al 0.5% (p/v) con una solución estéril de lactosa al 10% (p/v) y se incubó por 24 h a 30°C. La segunda activación consistió en inocular el primer cultivo de *L. lactis* al 1% (v/v)

en 20 mL de caldo M17, adicionado al 0.5% de lactosa y se incubó a 30°C durante 12 h. La tercera activación se realizó en 1 L de caldo M17 adicionado con 0.5% de lactosa y se incubó a 30°C por 8 h.

Posteriormente la muestra se centrifugó en una centrífuga Avanti J 301 (Beckman, CA, EE. UU.) a 2,580 x g por 20 min a 4°C, se recuperó la pastilla celular y se lavó con agua peptonada, y luego se homogenizó en un mezclador de vórtice Vortex-Genie® (Scientific Industries, NY, EE. UU.) por 2 min a velocidad 9 (3200 rpm). Posteriormente, se volvió a centrifugar en las mismas condiciones y se recuperó la pastilla celular ya lavada, la cual se volvió a homogenizar con agua peptonada. Después, se determinó la población de la suspensión de *L. lactis* en agua peptonada, por el método de Miles-Misra (1938) en agar M17 suplementado con 1% de lactosa al 10% (p/v), 0.004% de purpura de bromocresol (BCP) y 100 µg/L de rifampicina. Las placas se incubaron a 30°C durante 48 h.

La suspensión de *L. lactis* fue almacenada a 4°C (por no más de una semana ya que la viabilidad celular disminuye) y previo a su uso se verificó la viabilidad por el método de siembra previamente descrito.

### **5.2.15 Inoculación de *L. lactis* en masa madre**

La inoculación de *L. lactis* en masa madre se realizó según Venturi *et al.*, (2019) con modificaciones.

Las condiciones estandarizadas en la elaboración de la masa madre tipo IV fueron: T:A en relación 9:1 (p/p) y agua destilada, teniendo esta mezcla de harinas una hidratación del 75-80% aproximadamente, llegando a una textura manipulable, sin llegar a ser seca, pero tampoco líquida. Se realizaron experimentos exploratorios preliminares, donde se inocularon 4, 5, 6, 7 y 10 log UFC/g de *L. lactis* y se utilizó que la concentración donde crecía en mayor concentración *L. lactis*, 5 log UFC/g. Por tanto, en esta investigación se inocularon 5 log UFC/g de *L. lactis* en masa madre con relación T:A 9:1 (p/p), con 75-80% de agua destilada; el control se elaboró sin el inóculo. Se realizó un único refresco o alimentación a las 24 h de fermentación, sin eliminar masa ya fermentada y agregando la misma cantidad que

al inicio de la elaboración de la masa madre (duplicando la cantidad de masa), bajo la proporción de condiciones estandarizadas, fermentando 24 h más, 48 h en total desde el inicio de la fermentación.

#### **5.2.16 Determinación de población bacteriana en masa madre**

Las evaluaciones para la determinación de población bacteriana se realizaron a la masa madre a las 0 y 24 h después de la inoculación (antes del refresco), a las 48 horas de fermentación desde la elaboración inicial, siguiendo los procedimientos establecidos en el Manual Analítico Bacteriológico (BAM, 2024).

Para la determinación de población de levaduras, se diluyó 1 g de muestra con 9 mL de agua peptonada, y se realizaron diluciones decimales hasta  $10^{-9}$ . Se inoculó 1 mL de cada dilución por el método de vaciado en placa en cajas con agar YPD suplementado con 0.05 g/L de cloranfenicol para la inhibición de bacterias ácido lácticas y se incubaron durante 48 h a 25°C.

La determinación de las bacterias ácido lácticas (BAL), se usó el método de Miles-Misra (1938), realizando diluciones decimales hasta  $10^{-9}$  de las muestras de masa madre. Después se inocularon en agar MRS suplementado con 0.1g/L de natamicina para la inhibición de levaduras, se incubaron a 30°C por 48 h.

La población de *L. lactis* se cuantificó usando la misma metodología que para las BAL, pero usando el medio M17 suplementado con 1% de lactosa y 100 µg/L de rifampicina, ya que *L. lactis* NRRL B-50307 es resistente a este antibiótico.

#### **5.2.17 Cuantificación de azúcares reductores**

Los azúcares reductores se determinaron usando el método descrito por Deshavath *et al.*, (2020). Primero se realizó una curva estándar de glucosa, obteniendo la siguiente ecuación de la recta (Ec. 4), con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) = 0.990:

$$y = 392.04x + 73.889 \text{ --- (Ec. 4)}$$

Donde y indica azúcares reductores (glucosa, mg/L) y x indica la absorbancia

Se analizaron las muestras de masa madre y control a las 0, 24 (previo al refresco) y 48 h de fermentación, las cuales se diluyeron con agua destilada, se homogenizaron en un mezclador vórtice y se centrifugaron a 2,580 x g por 15 min a 4°C. Posteriormente, se adicionó en partes iguales a cada muestra diluida una solución del reactivo DNS: ácido 3,5 dinitrosalicílico 10 g, tartrato de sodio y potasio 30 g, NaOH 16 g, agua destilada 1 L. Las muestras se sometieron a ebullición por 5 min, se enfriaron con agua y hielo, y se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Genesys 10UV (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Los azúcares reductores se cuantificaron de acuerdo con la ec. (4) y el valor obtenido se multiplicó por la dilución efectuada.

#### 5.2.18 Cuantificación de pH y Acidez Titulable Total

La acidez titulable total se determinó usando el método de Kingamkono *et al.*, (1994). Se usó 1.0 g de muestra de la masa madre de los diferentes tratamientos a las 0, 24 (previo al refresco) y 48 h (después de la fermentación). Se añadieron 9.0 mL de agua destilada, las muestras se homogenizaron usando un mezclador de vórtice y se midió el pH con un potenciómetro EDGE® BLU I2202-01 (Hannah® instruments, Smithfield, RI EE. UU.). La titulación potenciométrica se realizó con NaOH 0.1 M, hasta alcanzar un pH de 8.5, el resultado se expresó en g de ácido láctico/100 g de muestra, según la ec. (5):

$$\% \text{ ácido láctico} = \frac{N \times V \times M}{D \times 100} \text{ --- (Ec. 5)}$$

Dónde N= Cantidad utilizada en mL de NaOH; B= Normalidad del NaOH; C=: Peso equivalente en gramos de ácido láctico; D= Peso de la muestra en g

#### 5.2.19 Cuantificación de nisina en masa madre

La cuantificación de nisina se realizó usando el método British Standard BSI 4020, (1974). Se utilizó *Micrococcus luteus* NCIMB 8166 como microorganismo indicador, el cual se incubó durante 48 h a 30 °C en medio assay: peptona 1%, extracto de carne 0.3%, sal 0.3%, extracto de levadura 0.15%, azúcar de caña 0.1%,

agar 1%, ajustado a pH de 7.5. Posteriormente se inoculó mediante extensión en superficie en agar assay y al cabo de 48 h a 30°C, se recuperó la biomasa utilizando un asa estéril de vidrio y solución ringer ¼: cloruro de sodio 0.225 %, cloruro de potasio 0.0105%, cloruro de calcio 0.012% y carbonato de sodio 0.005%. Seguidamente, se ajustó con dicha solución hasta obtener una absorbancia de  $A_{650} = 0.3$ , y se almacenó a 4°C.

Se analizaron muestras de masa madre de los tratamientos a los tiempos (h) de 0, 6, 24 (previo al refresco), 30 y 48 (al finalizar la fermentación). Diez g de cada muestra se homogenizaron con una solución estéril de HCl 0.02 N, utilizando un mezclador de vórtice, para luego ajustar el pH a 2.0 con HCl 1 N y se aforó la muestra a 50 mL. Las muestras se llevaron a ebullición por 60 s, y se centrifugaron por 15 min a 4°C, a  $2,580 \times g$ , el sobrenadante se ajustó a pH 5.0 con solución estéril de NaOH 1 N, con el fin de inactivar los ácidos orgánicos (ácido láctico) y evitar su contribución en la inhibición del microorganismo indicador. Finalmente, las soluciones con nisina extraída se filtraron a través de una unidad portafiltro Swinnex estéril de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Millipore, Burlington, MA, EE. UU.) utilizando una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (Millipore).

Se inoculó por vaciado en placa la suspensión de *M. luteus* (2% en volumen/placa) previamente ajustada a una  $A_{650}$  de 0.3, en 40 mL agar assay (agar 1%, 1.25% Tween 20), en placas de 180 mm. Luego se realizaron orificios con un horador estéril de 7-9 mm de diámetro y dentro de cada uno se añadieron 60  $\mu\text{L}$  de la nisina extraída de cada tratamiento, por separado, se mantuvieron por 30 min hasta secarse. Después se almacenaron de forma invertida por 48 h a 30°C, para luego observar los halos de inhibición para determinar la concentración de nisina, usando una curva estándar previamente elaborada (Patiño-Galvan 2014).

### **Metodología del objetivo 3**

#### **5.2.20 Diseño experimental para la elaboración de los panes.**

Se realizó un diseño experimental  $2^2$ , aleatorizando el orden de elaboración de las unidades experimentales, usando el software Minitab v. 21.3 (2022). Los

factores fueron el inóculo de *L. lactis* en masa madre y el recubrimiento comestible activo, siendo los niveles de ambos factores la presencia y ausencia de cada uno de ellos (Tabla 3).

Tabla 3. Factores y niveles en el diseño experimental para elaboración de los panes

Factor	Nivel	
	1	-1
Inoculación de <i>L. lactis</i> en masa madre	Presencia	Ausencia
Recubrimiento comestible	Presencia	Ausencia

Los tratamientos de los panes de masa madre fueron, (C) pan de masa madre control ausencia de inoculación de *L. lactis* y de recubrimiento comestible, (CR) pan de masa madre con ausencia de inoculación de *L. lactis* en masa madre y presencia del recubrimiento comestible, (L) pan de masa madre con presencia de la inoculación de *L. lactis* en masa madre y ausencia de recubrimiento comestible, (LR) pan de masa madre con presencia de inoculación de *L. lactis* en masa madre y recubrimiento comestible.

### 5.2.21 Elaboración del pan de masa madre

El pan de masa madre fue elaborado en base a la metodología descrita por Jekle *et al.*, (2010) con las modificaciones correspondientes a partir de pruebas preliminares. Se utilizaron las masas madre previamente obtenidas, con los tratamientos ya mencionados: 66% en peso de masa no fermentada (9:1 T:A, con 75-80% en peso de agua destilada) y 33% en peso de masa madre inoculada o no con 5 log UFC/g de *L. lactis*, 28 g de sal/kg de masa total, levadura liofilizada oro Nevada® (Lesaffre, Toluca, México) 2 g/kg de masa total (0.2%).

Se procedió a mezclar y amasar los ingredientes hasta tener una masa de consistencia moldeable, elástica y no pegajosa, se dejó reposar en bandejas tapadas con una tela a temperatura ambiente por 45 min, posteriormente se hicieron dobleces desde las orillas hasta al centro y se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente, repitiendo el último paso 3 veces. Posteriormente se procedió a guardar las masas pre-fermentadas en refrigeración a 4°C durante 18 h. Posteriormente, se reposaron las masas a temperatura ambiente por 1.0 h y se evaluó la población de BAL, levaduras y *L. lactis* (sección 5.2.16).

Se hornearon los panes en un horno Ninja DT201 (SharkNin, MA, EE. UU.) a 232°C durante 25 min en moldes tapados, posteriormente se destaparon y se hornearon a 232°C por 15 min. Después de enfriar, se aplicó el recubrimiento previamente formulado a los tratamientos que lo requerían, usando el método de barnizado con una brocha de cocina, con la formulación 10x, hasta el paso previo al secado, en condiciones asépticas siguiendo las buenas prácticas de higiene según la NOM-251-SSA1-2009 (Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios).

### **5.2.22 Análisis Microbiológico**

Todos los panes destinados a la evaluación sensorial se sometieron a análisis microbiológico para garantizar la inocuidad de las muestras y que no representasen riesgo a los panelistas, en base a las Normas Oficiales Mexicanas (NOM-111-SSA1-1994; NOM-092-SSA1-1995; NOM-247-SSA1-2008; NOM-147-SSA1-1996.) los grupos microbianos analizados se describen a continuación. El análisis microbiológico también se realizó a los tratamientos para determinación de vida de anaquel durante los días 0, 3.5, 7, y 10.5.

### **5.2.22 Conteo de mohos y levaduras**

Se pesaron 10 g de cada muestra y se adicionaron 90 mL de agua peptonada (peptona de caseína 0.1%) y posteriormente se homogenizaron. Se realizaron diluciones decimales para luego inocular 1 mL de cada dilución por vaciado en placa, usando 25-30 mL de agar papa-dextrosa, para luego homogenizar

manualmente, dejar solidificar e incubar a  $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . El recuento de colonias se realizó a los 3, 4 y 5 días de incubación, reportándose la población a los 5 días (NOM-111-SSA1-1994).

### **5.2.23 Conteo de coliformes totales**

A partir de las diluciones preparadas como se describe en la sección 5.2.22, se realizó el recuento de coliformes totales, mediante vaciado en placa de 1 mL de cada dilución y 15-20 mL de agar bilis rojo violeta. Se homogenizaron, se dejaron solidificar y se agregaron 5-10 mL más del mismo medio en una sobre capa, se incubó a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24 h, para luego contar las colonias (NOM-247-SSA1-2008).

### **5.2.24 Conteo de mesófilos aerobios**

A partir de las diluciones previamente preparadas, se cuantificaron las bacterias mesófilas aerobias mediante vaciado en placa de 1 mL de cada dilución, añadiendo 25-30 mL de agar para cuenta estándar. Se homogenizó manualmente, se dejó solidificar y se incubó a  $35^{\circ}\text{C}$  por 48h, para luego efectuar el recuento de la población (NOM-092-SSA1 1994).

### **5.2.25 Análisis sensorial de los tratamientos de pan de masa madre**

Para llevar a cabo el análisis sensorial, los resultados del análisis microbiológico para las muestras de pan fueron como máximo permisible: 1000 UFC/g de mesófilos aerobios, 10 UFC/g coliformes totales y 20 UFC/g de hongos y levaduras, para garantizar la inocuidad de las muestras (NOM-147-SSA1-1996).

La evaluación sensorial de los panes de masa madre, se realizó con un panel no entrenado de 50 evaluadores, considerando la diversidad de gustos por parte de los consumidores, confiriendo mayor precisión y menor sesgo a la evaluación (Hough & Garitta 2012).

Los criterios de inclusión del reclutamiento de los consumidores fueron: personas que consumiesen pan habitualmente (1 vez por semana) y edad entre 18 a 70 años. Los criterios de exclusión fueron: personas que no gusten del pan o no lo consuman habitualmente (1 vez por semana), personas con alergias a trigo,

amaranto, nisina, quitosano (ó crustaceos como camarón), canela o intolerantes al gluten (celiacos) (Anexo 2) (Hernández, 2005; Cainapa, 2020). El reclutamiento de los consumidores que conformaron el panel evaluador se llevó a cabo mediante la invitación gráfica (Anexo 5) difundida en línea en redes sociales (WhatsApp e Instagram) y de manera física utilizando posters y carteles en la Facultad de Química en la Universidad Autónoma de Querétaro (Anexo 4).

El análisis sensorial llevado a cabo fue uno degustativo afectivo, ya que los panelistas probaron muestras de los panes en rebanadas de aproximadamente 5 cm<sup>3</sup>, se les presentaron de forma aleatoria y codificada en un laboratorio de análisis sensorial, donde no tenían comunicación con otros panelistas y tenían una luz adecuada que no interfiriera con la apreciación visual de la muestra.

Las variables respuesta a evaluar fueron: color, olor, sabor, textura y aceptación general utilizando una escala hedónica de 9 puntos, y se determinó cuál fue el mejor tratamiento y posteriormente se evaluó la vida de anaquel de los tratamientos (Anexo 4) (Hough, 2010).

## **Metodología para el objetivo 4**

### **5.2.26 Vida de anaquel**

Se determinó la vida de anaquel de los tratamientos C, CR, L y LR de los panes de masa madre obtenidos a partir de la metodología del objetivo 3. Los panes se sometieron a un diseño básico de vida de anaquel acelerada, donde las unidades experimentales fueron almacenadas en bolsas herméticas (Ziploc®, WI, EE. UU.) en una cámara climática Climacell CLC-B2V-M/CLC 111-TV (MMM Group, Munich, Alemania) por 3 días a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $55 \pm 5\%$  de humedad relativa, 10% de aire. A los días, 0, 1, 2 y 3, equivalentes a 0, 3.5, 7 y 10.5 días en almacén a temperatura ambiente, respectivamente, se midieron las siguientes variables: perfil de textura, volumen, humedad, color y las poblaciones microbianas.

### **5.2.27 Análisis microbiológico**

El análisis microbiológico se realizó según la sección 5.2.22-5.2.24 se aplicó a muestras de los tratamientos en los días 0, 3.5, 7 y 10.5.

### **5.2.28 Perfil de Textura**

Se analizaron los 4 tratamientos de pan de masa madre mediante la metodología descrita por Bautista-Espinoza *et al.*, (2023), utilizando un analizador de textura TA-XT2Plus (Texture Analyzer, Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido) para la evaluación de firmeza expresada en Newtons (N). Se utilizó una sonda de 20 mm de diámetro y una velocidad de cabezal de 10 mm/s, penetrando 2 veces a una distancia de 10 mm a partir de la superficie de la muestra, durante un intervalo de tiempo de 10 segundos para determinar el punto de ruptura del producto.

### **5.2.29 Volumen**

El volumen de los tratamientos se evaluó por el método de desplazamiento de azúcar (Ragae & Abdel-Aal, 2006). El pan se colocó en un recipiente de volumen conocido, luego se llenó el recipiente con azúcar; posteriormente se retiró el pan y se registró el volumen del azúcar. El volumen del pan fue calculado como la diferencia entre el volumen total menos el volumen del azúcar contenido al retirar el pan.

### **5.2.30 Humedad**

La humedad de los panes se determinó por el método de la AOAC (2023), utilizando rebanadas con corteza y miga. Se pesaron 10 g (peso inicial) y se secaron en un horno a 50°C durante 24 h, posteriormente se registró el peso (peso final), y el contenido de humedad se calculó usando la ec. (6):

$$\%Humedad = \left( \frac{Pi - Pf}{Pi} \times 100 \right) \text{ --- (6)}$$

Donde Pi= peso inicial; Pf= peso final.

### **5.2.31 Color de los panes**

Se determinó el color de los panes de masa madre la metodología descrita por Escamilla-García *et al.*, (2019) con modificaciones, utilizando un colorímetro portátil NR60CP (Shenzen, China). Se usó la escala CIELab, evaluando luminosidad ( $L^*$  blanco a negro), el espectro verde a rojo ( $a^*$ ) y el espectro amarillo a azul ( $b^*$ ). El equipo fue calibrado con un fondo blanco y se tomaron como mediciones 10 puntos de cada pan de masa madre, tratando de tomar las mediciones en las distintas tonalidades de los panes.

### **5.2.32 Análisis proximales**

Se realizaron los análisis proximales a los tratamientos inmediatamente después de su elaboración, usando la metodología del AOAC (2023), y se determinó la humedad, proteína, grasa, fibra, ceniza y carbohidratos.

La humedad (método 925.09) se determinó en muestras de 5 g de pan por calentamiento directo, utilizando un horno (Quincy Lab, Burr Ridge, IL, EE. UU) a 50°C por 18 h, hasta peso constante.

La proteína se determinó en pan previamente secado por el Método macro Kjeldahl (método 954.01) (AOAC, 2023). El método incluye digestión con ácido sulfúrico y sulfato de sodio, para aumentar el punto de ebullición del ácido, y sirvió como catalizador para acelerar la reacción.

La grasa se determinó por el método Soxhlet (método 920.39), con muestras de pan previamente secas y trituradas (3 g), utilizando éter de petróleo (200 mL) en equipo tipo soxhlet durante 6 h (AOAC, 2023).

La fibra cruda (método 962.09) se evaluó en muestras secas y desengrasadas, utilizando la separación de los materiales solubles en  $H_2SO_4$  (1.25% p/v) y después en solución alcalina (NaOH) (1.25 % p/v). La fibra cruda se estimó como la pérdida por calcinación del residuo de las digestiones ácidas y alcalinas de la muestra (AOAC, 2023).

Las cenizas se cuantificaron mediante incineración de las muestras secas (método 923.03), mediante una mufla a 500-600°C durante 2-6 h aproximadamente (hasta que la muestra estuvo libre de carbón blanco o gris) (AOAC, 2023).

El contenido de carbohidratos se obtuvo por la diferencia de 100 menos los porcentajes de los componentes previamente obtenidos (AOAC, 2023).

### **5.2.33 Vida de anaquel microbiana cualitativa**

Al no observarse crecimiento microbiano en los panes de masa madre en la vida de anaquel acelerada, se procedió a someter los panes elaborados bajo la misma metodología (sección 5.2.21) en bolsas herméticas, en condiciones ambientales normales, con un máximo de hasta 31°C y un mínimo de 14°C, hasta la aparición de desarrollo microbiano de hongos visible, lo cual fue documentado con fotografías.

### **5.3 Análisis estadístico**

Todos los análisis fueron realizados por triplicado, se reportó la media de tres experimentos independientes  $\pm$  la desviación estándar. Para determinar diferencias significativas entre medias, se usó la prueba de Tukey con  $\alpha= 0.05$ . Se usaron las pruebas de Dunnett cuando se comparó contra el control y Kruskal-wallis en el análisis sensorial para establecer diferencias entre tratamientos. Para el análisis estadístico se utilizó el software Minitab v. 21.3, (2022).

## 6.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Resultados del objetivo 1

#### 6.1 Extracción del aceite esencial de canela

El AEC se extrajo mediante destilación por arrastre de vapor. El pretratamiento asistido por ultrasonido permitió acortar el tiempo de extracción de 3 h a 2 h, debido a que las ondas sonoras rompen las células vegetales y liberan su contenido al entorno de extracción (Belhachat *et al.*, 2018).

El rendimiento obtenido fue bajo y con una alta variabilidad, siendo de  $0.09 \pm 0.07\%$  en peso, menor a lo reportado por Bautista-Espinoza *et al.* (2023), quienes obtuvieron el  $1.33 \pm 0.12\%$  en peso, usando los mismos parámetros que en la metodología de esta investigación (10 min, 60% de amplitud, pulsos de 27:33 segundos on:off), aunque la canela fue de diferentes cultivos. El bajo rendimiento se debe probablemente al lote de canela utilizado, ya que, según Bernard *et al.*, (1989) la posición geográfica, el cultivo, la variedad de canela, la época de cosecha y el método de extracción, afectan significativamente el rendimiento de extracción de los AE.

Sin embargo, el resultado obtenido concuerda con Zekaria & Calier (2014), quienes mencionan que el rendimiento de extracción de los AE varía del 0.01% al 2%. Por lo anterior, se optó por utilizar aceite esencial de canela comercial de grado alimenticio (*Oleum Vitae*) para seguir con el estudio.

#### 6.2 Microencapsulación de aceite esencial de canela

##### 6.2.1 Rendimiento de microencapsulación

El rendimiento de la microencapsulación del AEC, basado en la recuperación de sólidos totales, fue del  $83.7 \pm 1.2\%$ , similar al valor reportado por Hernández-Hernández *et al.* (2014), para AE de orégano, siendo del 80.7%. Estos autores usaron los mismos parámetros del presente estudio (temperatura de entrada del aire  $190^{\circ}\text{C}$  y de salida  $100\text{-}110^{\circ}\text{C}$ ). Por otro lado, el manual de operación del equipo

Mini Spray Dryer B-290, especifica hasta un 70% de rendimiento en el secado por aspersión.

Por su parte, Van *et al.*, (2024) obtuvieron un rendimiento de  $64.1 \pm 3.1$  % con *Citrus latifolia* (limón Tahití) microencapsulado con maltodextrina, al utilizar una temperatura de entrada de 180°C. Sin embargo, al descender la temperatura del aire de entrada a 140°C aumentaba el rendimiento hasta 89.6%, lo cual se atribuyó a que mayores temperaturas podrían ocasionar grietas al material de pared. Por otro lado, Millinia *et al.*, (2024) microencapsularon antocianinas de *Hibiscus sabdariffa* L. (flor de Jamaica) con maltodextrina, obteniendo un rendimiento máximo de  $73.6 \pm 5.1$  % (en peso).

El alto rendimiento obtenido en la presente investigación se debe a que la relativamente alta temperatura del aire de entrada permite una mayor eficiencia al proceso de transferencia de masa, lo cual resulta en un alto rendimiento (Tee *et al.*, 2012).

### **6.2.2 Eficiencia de microencapsulación**

El proceso de microencapsulación no es 100% eficiente, ya que se pierde una fracción del material encapsulado durante el proceso y queda cierto porcentaje de aceite libre o encapsulado de manera superficial sobre las microcápsulas, lo cual se define como aceite libre superficial (Tan *et al.*, 2005; Bae & Lee, 2008) por lo que se determinó la fracción de AEC encapsulado y superficial.

La recuperación total (aceite superficial más aceite encapsulado) del AEC después del proceso de microencapsulación fue de  $87.02 \pm 8.82$  %, mientras que la recuperación del AEC superficial (no encapsulado) fue de  $23.9 \pm 6.6$  %. Por lo tanto, la eficiencia de microencapsulación del AEC (contenido dentro de las cápsulas) fue del  $63.1 \pm 2.2$  %. Esta eficiencia fue menor que la reportada por Van *et al.*, (2014) que fue del  $89.6 \pm 0.2$  % al utilizar una temperatura de aire de entrada de 180°C, que es ligeramente inferior a la utilizada en este trabajo. Estos autores observaron que un aumento en la temperatura de entrada acelera el proceso de secado, pero

con el riesgo de que el material de pared presente grietas, provocando así la pérdida del AE contenido dentro de la capa externa.

Por otro lado, Millinia *et al.*, (2024) obtuvieron una eficiencia de 50.3 % en la microencapsulación de antocianinas con maltodextrina, lo cual pudiera atribuirse a que la temperatura del aire de entrada fue de 120°C, menor a la de este trabajo. De acuerdo con Van *et al.*, (2014), la menor velocidad de secado produjo una menor eficiencia de microencapsulación.

La vida útil del AEC aumenta al microencapsularse, debido a la protección del compuesto activo principal, el cinamaldehído, de factores ambientales (Shahidi-Noghabi & Molaveisi, 2020). Por lo anterior, se concluye que se realizó una microencapsulación eficaz, al obtener un rendimiento mayor al de diversos estudios, lo que indica, que el almidón octenil succínico (HI-CAP 100®) es un buen emulsionante y material de pared del AEC.

### **6.3 Actividad antifúngica del aceite esencial de canela en solución y microencapsulado (método de incubación de esporas).**

Se determinó la actividad antifúngica del AEC (Oleum vitae®), en solución y microencapsulado mediante el método de incubación de esporas, para su posterior uso en la formulación de un recubrimiento comestible. Las concentraciones (mg/mL) de 0.5 (500 ppm), 0.7 (700 ppm) y 1 (1000 ppm) del AEC, en solución y microencapsulado mostraron inhibición contra *Aspergillus niger*.

Tomando en cuenta que el AEC es un producto comercial, es posible que el tiempo transcurrido entre su producción, venta y uso actual, resultara en menor efecto antifúngico. Por lo anterior, se partió de la concentración mínima fungicida reportado por Soliman & Badeaa, (2002) y de Mahdi *et al.* (2021), de 500 ppm.

Usando esta concentración del AEC en solución y microencapsulado contra las esporas de *A. niger*, no se observó crecimiento con 0.5 mg/mL de AEC (Figura 6b) ni con 1 mg/mL (Figura 6d). No obstante, el control positivo (sin AEC) sí mostró crecimiento del micelio (Figura 6a). De manera similar, en todos los tratamientos donde se agregó la misma concentración de AEC microencapsulado (AECM) y en

el control negativo, no se observó crecimiento alguno (Figura 6 e-h) después de 7 días de incubación.

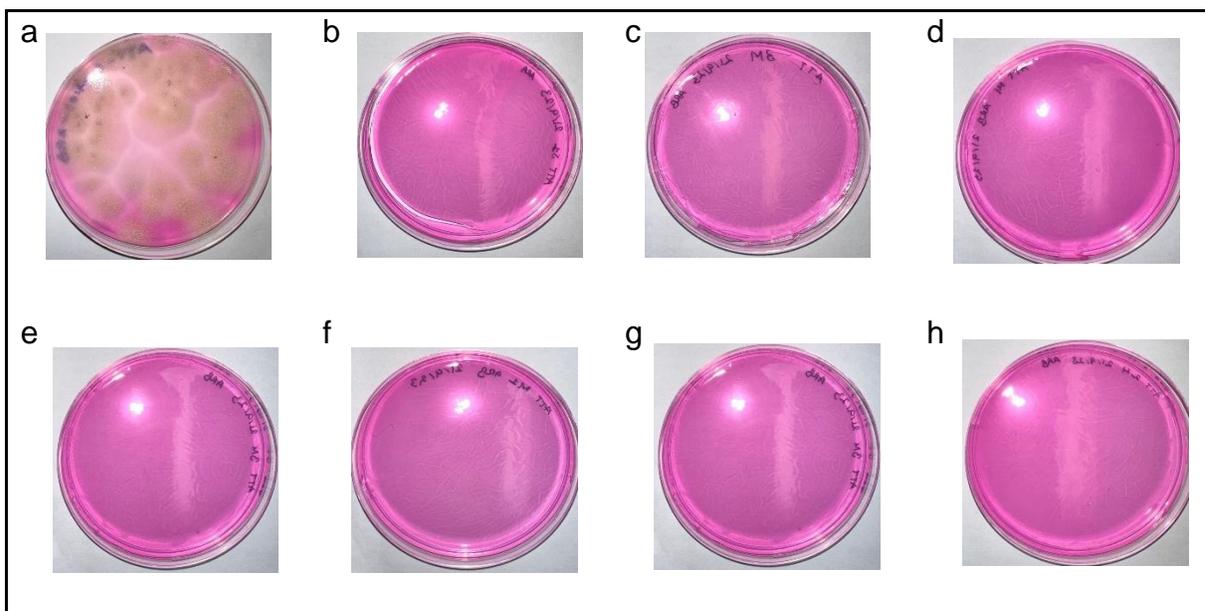


Figura 6: Efecto antifúngico del aceite esencial de canela (AEC), en solución y microencapsulado (AECM). Donde: AEC en solución: (a) control positivo sin AEC, (b) 0.5 mg/mL, (c) 0.7 mg/mL, (d) 1 mg/mL. AECM: (e) 0.5 mg/mL, (f), 0.7 mg/mL, (g) 1 mg/mL, control negativo (h).

#### 6.4 Actividad antifúngica del aceite esencial de canela en emulsión y microencapsulado (método difusión en disco).

Al evaluar la actividad antifúngica del AECM contra *A. niger* por el método de difusión en disco, se observó que la concentración con mayor efecto fue la de 0.1 mg/membrana de PVDF de 25 mm de diámetro, con área de inhibición de  $31.7 \pm 3.4 \%$  ( $20.3 \text{ cm}^2 \pm 1.1 \text{ cm}^2$ ).

La concentración de AEC en el AECM fue estimada por un balance de materia entre el AEC inicial y el recuperado en las microcápsulas, tomando en cuenta los sólidos totales y que el porcentaje de AEC total en el AECM es de 17.6% en peso. Por lo anterior, se necesitarían 74.2 mg de AECM para obtener una concentración aproximada de 12.8 mg de AEC por película de 90 mm de diámetro, lo que sirvió como punto de partida, denominada como 1x.

Sin embargo, el AEC en emulsión bajo la misma concentración (0.1 mg/membrana tuvo un área de inhibición de  $41.2 \pm 2.9$  % ( $26.4 \pm 1.9$  cm<sup>2</sup>). Esto pudiera estar relacionado con algún tipo de interacción entre el AEC y el material de pared (almidón octenil succínico) por lo que fue necesario realizar pruebas con mayores concentraciones. El AEC en emulsión y el AECM se compararon usando el método de difusión en disco, ya que se deseaba evaluar el efecto contra *A. niger* bajo las mismas concentraciones estimadas. El menor efecto del AECM podría deberse a que el proceso y eficiencia de microencapsulación no fue 100% efectivo por lo que pueden existir interacciones entre el material de pared y el AEC, aunque por sí solo puede conferir sabores amargos, degradarse y volatilizarse.

Elgayyar *et al.*, (2001), efectuaron un estudio antifúngico con diferentes AE, obteniendo la máxima inhibición con AE de albahaca y orégano (cada uno por separado). El área de inhibición fue de 59.44 cm<sup>2</sup> (87 mm diámetro) contra *A. niger*, utilizando una concentración de 24 mg de AE (de orégano o de albahaca) /membrana, es decir se inhiben 2.47 cm<sup>2</sup> por mg de AE de orégano o albahaca. Este resultado se obtuvo utilizando 24 veces mayor concentración de cada uno de los AE por separado, por membrana que, en el presente estudio, además mencionan que puede que no sean útiles como conservantes alimenticios ya que estos tienden a evaporarse al estar libres.

En la presente investigación se obtuvo un área de inhibición mayor por mg de aceite (se inhibieron  $29.74 \pm 0.26$  cm<sup>2</sup> por 5.77 mg de AECM), donde la cantidad que estimamos de AEC fue de 1 mg, por lo que el AECM resulta ser más efectivo contra *A. niger* que el AE de orégano o el AE de albahaca.

## **6.5 Elaboración de la solución filmogénica**

### **6.5.1 Extracción de proteína de quinoa**

Se obtuvo un rendimiento de extracción de proteína a partir de harina de quinoa de  $5.4 \pm 0.4$  % en peso, una vez realizado el método de precipitación isoeléctrica y desgrasado con etanol. La cantidad de proteína en el extracto proteico seco fue de  $75.8 \pm 1.12$  % en peso, mientras que el porcentaje de proteína en la

harina de quinoa fue del  $6.4 \% \pm 1.0 \%$  en peso, por lo tanto, el rendimiento del proceso de extracción (proteína total en el extracto) fue del  $85.2 \pm 1.0 \%$  y la eficiencia de extracción de proteína (proteína total recuperada de la harina) fue del  $68.8 \pm 1.0\%$ .

Los resultados obtenidos en el presente estudio fueron mejores que lo reportado por Quelal *et al.*, (2019), quienes trabajando con harina de quinoa previamente desgrasada con etanol obtuvieron un  $73.4 \pm 0.7 \%$  de proteína (base seca) en su extracto. En este estudio se desgrasó la harina con etanol antes de someterse a la precipitación isoeléctrica. De acuerdo con Gonçalves *et al.*, (1997) el lavado con etanol es un paso para purificar las proteínas solubles de compuestos insolubles no proteicos. Por otro lado, L'hocine *et al.*, (2006), informan que el etanol ha mostrado gran eficacia en cuanto el proceso de desgrasado de extractos proteicos, similar al hexano. En otro estudio, Toapanta, (2016), obtuvo un extracto de quinoa con  $65.0 \%$  de proteína, mientras que Bautista-Espinoza *et al.*, (2023) reportaron  $63.0\%$  de proteína en su extracto. En estos dos últimos estudios no se realizó un desgrasado, por lo cual se obtuvo menor porcentaje de proteína.

### **6.5.2 Elaboración de película comestible a partir de la solución filmogénica del recubrimiento**

Se obtuvieron 3 películas comestibles mediante el método de eliminación de solvente a  $35^{\circ}\text{C}$  durante 12 h, donde al inicio el único factor fue el plastificante glicerol, a tres concentraciones: 20, 30 y 40 % en peso, en relación a los sólidos totales (0.7 g de PQ:QT; relación 4:1 p/p por 42 mL de solución). La concentración del 20 % de plastificante resultó en películas quebradizas y difíciles de despegar, mientras que la concentración del 40 % resultó en películas un poco viscosas y húmedas. El 30% de concentración del plastificante fue la mejor formulación, pues se logró obtener películas fáciles de manipular y flexibles (Figura 7).



Figura 7. Películas de proteína de quinoa y quitosano en proporción 4:1 (p/p) respectivamente, 30% de glicerol en relación a sólidos totales. Sus características superficiales fueron de apariencia translúcida, homogéneas y manipulables.

Después de determinar la concentración óptima de glicerol, se procedió a tomar como concentración de AECM la que tuvo mejor actividad antifúngica contra *A. niger*. La mejor actividad antifúngica fue la de 1 mg de AEC estimado (previo al resultado de eficiencia de microencapsulación), es decir 5.77 mg de AECM por 4.52 cm<sup>2</sup> de área en la prueba de difusión en disco (considerando para el cálculo el 100% de los sólidos totales, y que todo el AEC se encontraba en las microcápsulas) por membrana de 25 mm de diámetro.

De acuerdo con Bautista-Espinoza, (2023), se requieren 42 mL de solución filmogénica de proteína de quinoa y quitosano (PQ:QT 4:1) para que después de vaciarse en una caja Petri y una vez seca ( $85.93 \pm 3.02\%$  de sólidos), se obtenga una superficie de 90 mm de diámetro (con un espesor de  $0.19 \pm 0.029$  mm). Por lo tanto, se utilizaron 74.17 mg de AECM (1x) por cada película comestible, a partir de 42 mL de solución filmogénica con el fin de obtener un área de 90 mm de diámetro (58.08 cm<sup>2</sup>). Se determinó un aproximado de 12.97 mg de AEC por película considerando que hubiese un 100% de AEC tomando en cuenta los sólidos totales

previo al proceso de microencapsulación, a sabiendas que una fracción del AEC se pudo haber evaporado durante el proceso.

En el caso de las películas 5x se utilizaron 370.87 mg de AECM para obtener un estimado de 64.5mg de AEC y en el caso de las películas 10x se utilizaron 741.74 mg de AECM para obtener un estimado de 129.8 mg de AEC.

## **6.6 Caracterización de las soluciones filmogénicas como películas**

### **6.6.1 Espesor**

Los resultados de espesor indican que no hubo diferencias significativas ( $p>0.05$ ), entre las películas control (sin AECM) y tratamientos 1x y 5x (74.17 y 370 mg de AECM /película), siendo de  $190 \pm 30 \mu\text{m}$ ,  $200 \pm 2 \mu\text{m}$  y  $215 \pm 18 \mu\text{m}$ , respectivamente. Sin embargo, si hubo diferencias significativas ( $p<0.05$ ) con el tratamiento 10x (741.7 mg de AECM/película) teniendo un grosor de  $399 \pm 4 \mu\text{m}$  (Figura 8), por lo que esta última se consideraría como lámina al sobrepasar el máximo grosor que se tiene como aceptado para considerarse película, que es de  $250 \mu\text{m}$  (Skurtys *et al.*, 2011; Jooyandeh, 2011). Otros autores consideran como de un recubrimiento o película comestible si presenta un máximo de  $330 \mu\text{m}$  (Embuscado & Huber, 2009).

El aumento de grosor se debe que la adición del AECM a las soluciones filmogénicas, incrementó los sólidos en cada película o lámina, que equivalen a 10 %, 50 % y 100 % de aumento de sólidos totales para las películas 1x, 5x y 10x respectivamente. El grosor depende principalmente de la naturaleza de los polímeros que conforman la película (Di Pierro *et al.*, 2006).

Por lo tanto, el espesor no se vio afectado por el AE, aunque el exceso de material inerte junto con el AECM sí modificó significativamente ( $p<0.05$ ) el espesor cuando se pasó de obtener películas 5x a 10 x de contenido de AEC. Esto probablemente debido al acomodo de los sólidos dentro de la estructura tridimensional de la película.

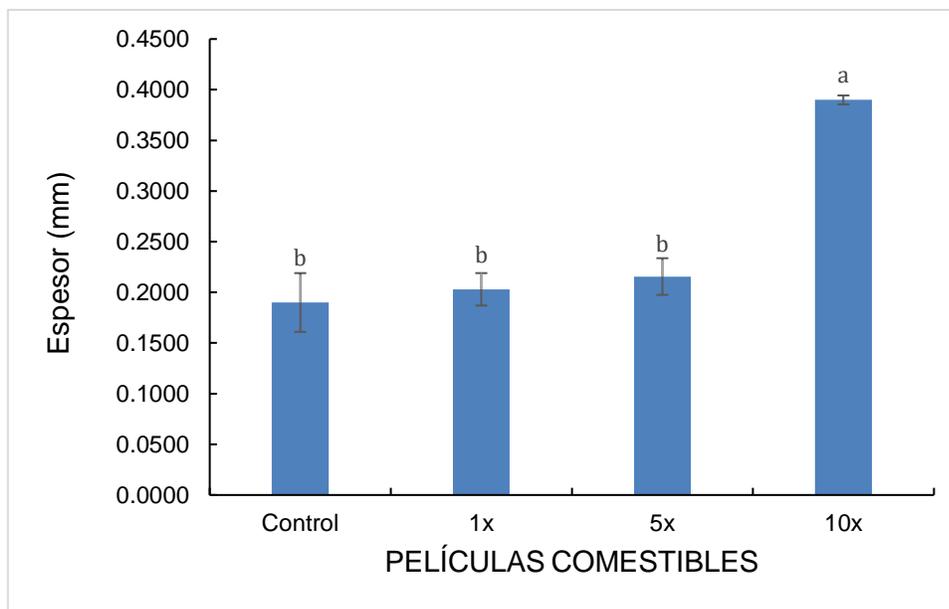


Figura 8. Espesor (mm) promedio de cada película, control (sin AECM), 1x (74.17 mg de AECM), 5x (370 mg de AECM) y 10x (741.17 mg de AECM). Letras diferentes indican diferencias significativas, el espesor de la película 10x es dependiente de la concentración de AECM.

### 6.6.2 Solubilidad

El porcentaje de solubilidad de las películas control y 1x, fue igual ( $p>0.5$ ), mientras que las películas 1x, 5x y 10x no mostraron diferencias significativas ( $p>0.5$ ). Por otro lado, la solubilidad de las películas 5x y 10x fue diferente a las películas control (Figura 9).

El aumento de la solubilidad de las películas control fue probablemente debido a que el AECM refuerza la red de polímeros, en concordancia con Bautista-Espinoza *et al.*, (2023), quienes trabajaron con películas de proteína de quinoa (PQ)-quitosano (QT). No obstante, estos investigadores reportaron una mayor solubilidad (73%) de una película de PQ:QT en relación 9:1 (p/p). Este efecto fue probablemente debido al menor contenido de proteína del extracto de PQ que utilizaron, por lo que, PQ representó el 90 % de los sólidos de estos dos biopolímeros, mientras que en este trabajo la PQ representó el 80%.

Los resultados de la presente investigación indican que el porcentaje de solubilidad es dependiente de la concentración de AECM, pues al aumentar la

concentración de AECM la solubilidad tiende a disminuir, lo cual es un atributo favorable ya que se busca una red polimerica resistente y que no tienda a perderse o solubilizarse con el agua o el vapor de agua.

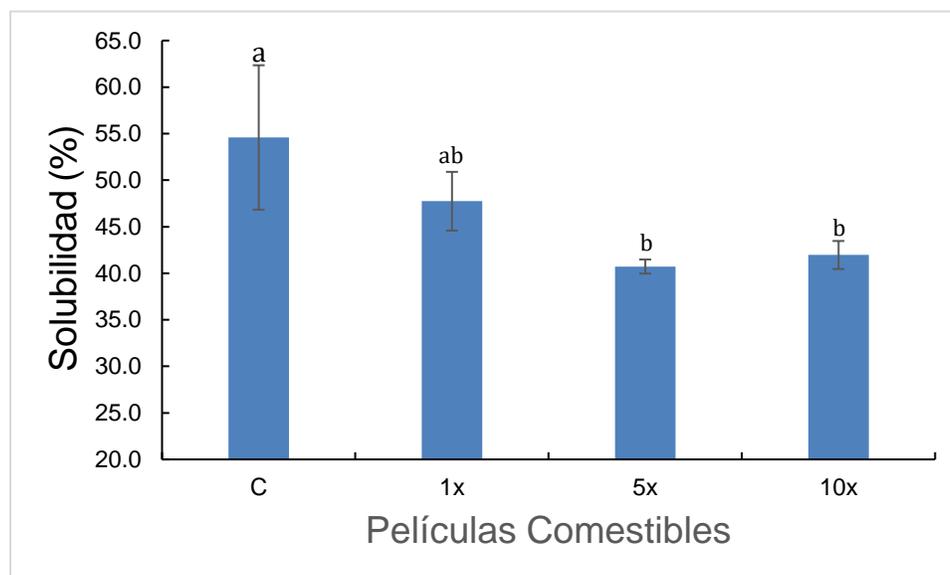


Figura 9. Promedio de solubilidad (%) de cada película, control (sin AECM), 1x (74.17 mg de AECM), 5x (370 mg de AECM) y 10x (741.17 mg de AECM). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Por otro lado, la solubilidad de las películas a base de alginato reportado por Alarcón-Moyano *et al.*, (2017) fue del  $88 \pm 3\%$ , aunque de acuerdo con Lupo *et al.* (2012), dependiendo de su pH pueden llegar a ser muy solubles. En esta investigación se obtuvieron valores de solubilidad menores a los reportados, probablemente debido al tipo de interacción que hay entre los polímeros, ya que la solubilidad está limitada por las interacciones iónicas y puentes de hidrógeno entre la PQ y el QT (Abugoch *et al.*, 2011).

La solubilidad es un factor importante para la biodegradabilidad cuando se utiliza como medio para proteger los alimentos. Aunque se requiere una baja solubilidad de las películas durante el almacenamiento, una alta solubilidad podría ser ventajosa durante la cocción de alimentos con cubiertos por películas (Laohakunjit & Noomhorm, 2004). Por lo tanto, en este caso al ser aplicado el recubrimiento después del horneado del pan, se requiere una baja solubilidad.

### 6.6.3 Color

Los parámetros de opacidad y color se determinaron de acuerdo con la escala CIE-  $L^*$   $a^*$   $b^*$ , donde los valores de  $L^*$  representan la luminosidad,  $a^*$  las coordenadas de rojo a verde (+a rojo, -a verde) y  $b^*$  las coordenadas de amarillo a azul (+b amarillo, -b azul).

En la Tabla 4 se muestran los índices de color obtenidos para las películas, obteniendo tonalidades de color café, mostrando diferencias significativas en cuanto a las películas 5X y 10X en comparación con el control, que fue similar a las películas 1X. No obstante, se aprecia menor luminosidad de las películas conteniendo el AEC, ocasionando menor paso de luz. Las películas 5X y 10X se presentan tonalidades más opacas, debido a que hay mayor cantidad de AECM, el cual tiene un color café oscuro y pudiese estar impartiendo mayor opacidad al tono de las películas.

Tabla 4. Parámetros de color (coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ) y paleta de color de las películas comestibles.

Tratamiento	$L^*$	$a^*$	$b^*$	Paleta de colores
Control	$66.9 \pm 2.6^a$	$2.2 \pm 0.5^a$	$29.3 \pm 1.6^a$	
Película 1x	$64.5 \pm 4.5^a$	$2.9 \pm 1.4^a$	$30.9 \pm 2.9^a$	
Película 5x	$57.4 \pm 3^b$	$11 \pm 2^b$	$54.7 \pm 4.9^b$	
Película 10X	$57.8 \pm 2.7^b$	$11.2 \pm 3.3^b$	$58 \pm 3.4^b$	

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) por columna.

Los valores que aquí se reportan difieren de los reportados por Vera *et al.*, (2020), quienes elaboraron una película comestible a partir de PQ y QT (1:3 v/v en peso, respectivamente) y nanopartículas de QT y timol. Se reportaron tonalidades amarillentas con diferencias significativas entre las películas con y sin nanopartículas, probablemente debido a que trabajaron con una relación PQ:QT diferente a la de este trabajo. El uso de menor concentración de PQ conduce a una

menor opacidad o bien mayor luminosidad, lo cual aunado a la adición de nanopartículas conduce a diferencias significativas en el color.

El impacto que pudiera ocasionar esta diferencia en la aceptación sensorial de la película o recubrimiento aplicado en el alimento dependerá de la matriz alimentaria y de las preferencias del consumidor. En este caso se considera un color adecuado, ya que es similar al del pan por lo cual no habría diferencias ni desagrado.

#### **6.6.4 Propiedades mecánicas**

Las películas con y sin el AEC mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en cuanto al módulo de Young, resistencia a la tensión y permeabilidad al vapor de agua. Por otro lado, el porcentaje de elongación no mostró diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre ninguna de las películas (Tabla 5).

Los resultados indican que la mejor película es el tratamiento 10x, ya que tiene el módulo de Young más bajo, es decir, es la película menos rígida y más elástica. A pesar de que en el factor de elongación no hay diferencias ( $p > 0.5$ ) la tendencia es a tener mayor elongación en las películas 10x. Por otro lado, la resistencia a la tensión es mayor en las películas 5x, pero al ser de carácter más rígido se prefieren las del tratamiento 10x las cuales presentan mayor resistencia a la tensión que las películas control.

La permeabilidad al vapor de agua fue el único factor que presentó un efecto no deseable (mayor valor) para los tratamientos 10x. A continuación, se discuten a mayor profundidad los resultados de las propiedades mecánicas y permeabilidad al vapor de agua.

#### **Resistencia a la tensión**

Los valores de resistencia a la tensión (RT) oscilaron entre  $2.3 \pm 0.5$  y  $10.8 \pm 0.6$  MPa, por lo que hubo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) únicamente en los tratamientos 5x y 10x. Este resultado se asoció a la mayor cantidad de AECM que permitió un refuerzo de la película; sin embargo, el uso de grandes cantidades

tiende a disminuir la RT, pero no significativamente pues se mantuvo una mayor RT que el control (Tabla 5).

Bautista-Espinoza *et al.*, (2023), reportaron diferencia significativa en la RT de películas basadas en los mismos biopolímeros, pero utilizando nanopartículas de sílice mesoporoso, que mejoran la RT. Por otro lado, Vera *et al.*, (2020) no encontraron diferencia significativa en películas de dichos biopolímeros adicionadas de nanopartículas de quitosano-timol. Por lo tanto, se concluye que la RT depende de las proporciones de los biopolímeros que forman la película comestible, así como la metodología de incorporación del AE u otros materiales.

### **Porcentaje de elongación**

El porcentaje de elongación se refiere al estiramiento longitudinal de la muestra justo antes de su ruptura, dividido por la longitud inicial del material y multiplicado por cien (Bourtoom, 2008). La incorporación de las microcápsulas del AEC no mostró diferencias significativas respecto al control (Tabla 5), lo cual concuerda con Vera *et al.*, (2020), quienes adicionando nanopartículas de quitosano-timol, reportaron mayores % de elongación ( $59.3 \pm 1.3\%$ ) que el control del presente estudio. Esto se atribuyó a que no utilizaron sonicación al elaborar la película de PQ:QT (1:3), además de usar mayor proporción de QT que de PQ comparado con este estudio (4:1, PQ:QT, p/p).

El uso de ultrasonido probablemente reduce la elongación de las películas, por la inducción de cambios estructurales en la proteína, lo cual podría facilitar una mayor interacción proteína/hidrocoloide, comparado con los enlaces de hidrógeno con moléculas de agua (Vera *et al.*, 2020). Por su parte Bautista-Espinoza *et al.*, (2023), obtuvieron una significativamente menor elongación ( $2.3 \pm 0.4 \%$ ) que, en esta investigación, lo cual se atribuyó a que el extracto de PQ utilizado contenía menor porcentaje de proteína.

En este estudio el mayor porcentaje de proteína en el extracto de PQ, ocasiona interacciones con el QT y con el AECM, y por tanto una mayor elongación. Esto sugiere que la combinación de PQ y QT mejora las propiedades mecánicas de

las películas preparadas en este estudio, debido a las excelentes propiedades de elongación y adherencia de la PQ (Abugoch *et al.*, 2011).

### **Módulo de Young**

El módulo de Young es un parámetro que caracteriza el comportamiento de un material elástico cuando se deforma longitudinalmente, y representa la rigidez del material. Si el material presenta un alto valor del módulo elástico, se considera quebradizo y, por el contrario, valores pequeños indican un material dúctil. Únicamente hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para el tratamiento 5x, ya que el resto de los tratamientos fueron similares, aunque el tratamiento 10x tuvo valores ligeramente menores (Tabla 5). Esto sugiere que los tratamientos de películas 5x son más rígidos que los demás.

De Medeiros *et al.*, (2019) concuerdan con nuestros resultados, ya que al adicionar AE de oregano microencapsulado con alginato de sodio, a la matriz de almidón de yuca con poli adipato-co-tereftalato de butileno (PBAT), disminuyó el módulo de Young. Esto se atribuyó a la presencia de las microcápsulas, que produjeron puntos de concentración de tensiones que ocasionaron una disminución del módulo de Young.

Por lo anterior, las películas del tratamiento 5x son elásticas, mientras que las películas control y de los tratamientos 1x y 10x son plásticas. Esto es preferible para un material como el pan, que puede manipularse sin que el recubrimiento afecte su volumen o textura, ya que un material elástico al regresar a su forma original después de manipularse podría ocasionar un maltrato a la corteza y forma del pan.

### **Permeabilidad al vapor de agua**

La permeabilidad al vapor de agua es la capacidad que tiene la humedad para penetrar y atravesar un material (Dong *et al.*, 2018). Las películas adicionadas con AECM mostraron una mayor permeabilidad al vapor de agua (PVA) que las películas control (Tabla 5). No obstante, Bautista-Espinoza *et al.*, (2023) reportaron menor PVA cuando se adicionaron nanopartículas de la mezcla de AEC-hierba

limón (1:2 p/p). Esto puede estar asociado a una mayor hidrofobicidad AECM que podría formar agregados, facilitando de este modo el paso del vapor de agua a través de la película.

Bautista-Espinoza *et al.*, (2024) adicionaron una mezcla de hierba limón y AEC encapsulado con nanopartículas de sílice mesoporoso a la base de PQ:QT, produciendo un reforzamiento de la de las películas y disminuyendo la permeabilidad al vapor de agua. Esto concuerda con Aboul-Anean (2018), quien encontró diferencia significativa entre películas control y aquellas adicionadas con nanopartículas de PQ, probablemente debido al tipo material de pared utilizado en la encapsulación del agente de interés.

Los resultados del presente estudio concuerdan con Shao *et al.*, (2021), quienes observaron un aumento de PVA en papel bioactivo a base de almidón con AECM, ya que la PVA disminuyó cuando no había AECM. El aumento de la PVA observado en nuestro trabajo puede deberse a una asimetría en la microestructura de la red polimérica ocasionando burbujas por el AECM adicionado y gotas en la matriz polimérica, ocasionando un debilitamiento en la interacción entre los biopolímeros (Basaglia *et al.*, 2021). Alternativamente, este efecto puede asociarse a la presencia de microagregados del AECM, ya que Ríos-de-Benito *et al.* (2021), al adicionar partículas de AE de orégano microencapsulado con partículas de sílice mesoporoso, reportaron microagregados en la matriz de una película de caseinato de sodio y QT.

Tabla 5. Propiedades mecánicas de los tratamientos de las películas

Tratamiento/ Parámetro	Resistencia a la tensión (Mpa)	Elongación (%)	Módulo de Young (Mpa)	PVA (g/día*m*Pa) x10 <sup>5</sup>
Control	2.3±0.5 <sup>c</sup>	35.0±3.5 <sup>a</sup>	18.24±6.1 <sup>a</sup>	5.0±0.1 <sup>b</sup>
1x	2.5±0.3 <sup>c</sup>	36.0±5.5 <sup>a</sup>	27.8±7. <sup>a</sup>	6.3±0.5 <sup>b</sup>

<b>5x</b>	10.9±0.6 <sup>a</sup>	23.4±7.5 <sup>a</sup>	160.3±29.5 <sup>a</sup>	7.3±1.6 <sup>b</sup>
<b>10x</b>	5.9±0.4 <sup>b</sup>	42.5±16.3 <sup>a</sup>	21.7±0.2 <sup>b</sup>	15.8±3.9 <sup>a</sup>

---

Control: Control: PQ:QT (4:1, p/p); Tratamiento 1x: PQ:QT (4:1, p/p) adicionada con AEC (0.1 g/g película seca); Tratamiento 5x: PQ:QT (4:1, p/p) adicionada con AEC (0.52 g/g película seca); Tratamiento 10x: PQ:QT (4:1, p/p) adicionada con AEC (1 g/g película seca); PVA (Permeabilidad al vapor de agua). Letras iguales indican que no hubo diferencias significativas, con n=3, usando la prueba de Tukey con  $p < 0.05$ .

#### **6.6.5 Actividad antifúngica de las películas comestibles**

Es probable que puedan existir interacciones entre los polímeros que constituyen la película y el AECM, por lo que el AECM no tendría el mismo efecto antifúngico al constituir parte de la película que por sí solo, por lo que se aumentó su concentración. Como se muestra en la Figura 10, la película con mayor actividad antifúngica fue la de AECM 10x, obteniéndose un índice de inhibición de  $92.6 \pm 5.4$  %, lo que se atribuyó a la mayor concentración de AEC. El efecto antifúngico fue mayor al  $52.7 \pm 1.8$  %, reportado por Rux *et al.*, (2023) utilizando una matriz basada solo en polisacáridos. Debe recordarse que el AEC utilizado en este trabajo es un agente antifúngico natural.

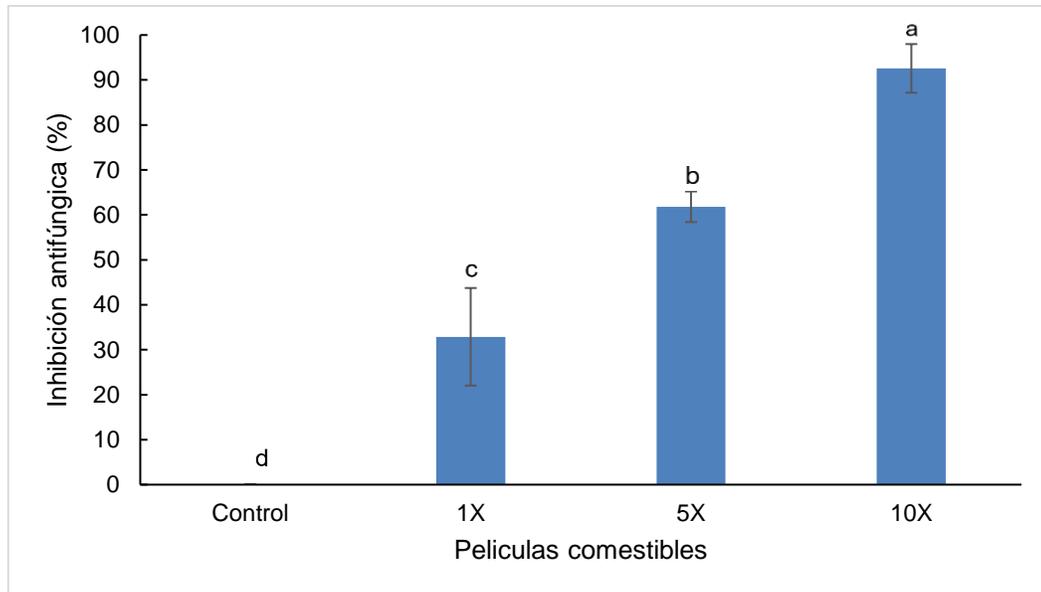


Figura 10. Inhibición de *Aspergillus niger* adicionado en un disco de agar de 72 mm<sup>2</sup> con micelio y esporas, por las películas comestibles control: sin AECM; 1x, con 0.1 g AECM/g película seca; 5x, con 0.52 g AECM/g de película seca; 10x, con 1 g AECM/g de película seca. Letras iguales indican que no hubo diferencias significativas, con n=3, usando la prueba de Tukey con  $p < 0.05$ .

Por otro lado, cuando *A. niger* logró crecer en presencia de las películas, mostró una morfología diferente en comparación al control positivo (micelio de *A. niger* en PDA sin película), ya que esporuló al segundo día de incubación, mientras que el control negativo esporuló hasta el quinto día (Figura 11.) Esta situación sugiere que en presencia de la película el hongo experimenta cierto nivel de estrés, por lo que esporula como mecanismo de sobrevivencia (Müller *et al.*, 2022).

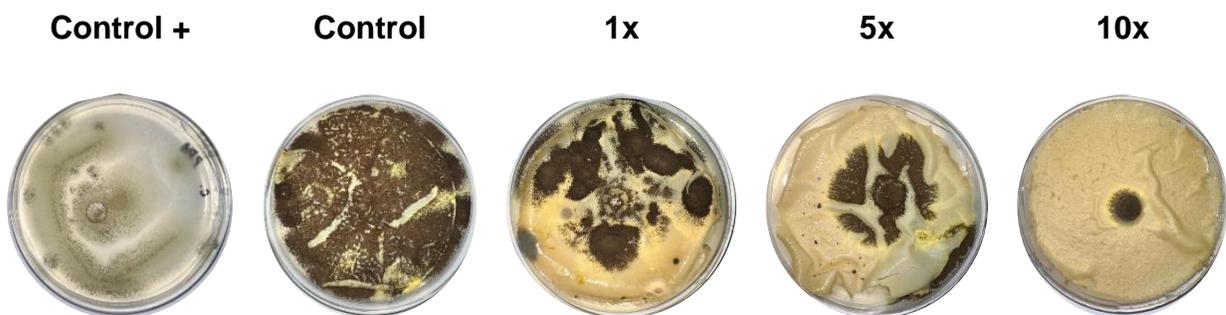


Figura 11. Crecimiento de *Aspergillus niger* en presencia de las películas comestibles; 1x, con 0.1 g AECM/g película seca; 5x, con 0.52 g AECM/g de película seca; 10x, con 1 g AECM/g de película seca y dos controles, control+, placa de PDA con *A. niger* sin película y película control sin AECM adicionado.

Como se aprecia en la Figura 12 el crecimiento de *A. niger* en placas de PDA fue mucho más lento en presencia de la película 10x, pues tardó 8 días en llegar al 20% de crecimiento, lo cual ocurrió en menos de 3 días cuando no se utilizó algún antimicrobiano (Control +, 34.45±4.4 %, Tabla 6). Por lo tanto, el material de empaque comestible sería una buena opción para aplicarse en alimentos que sufran principalmente de deterioro fúngico.

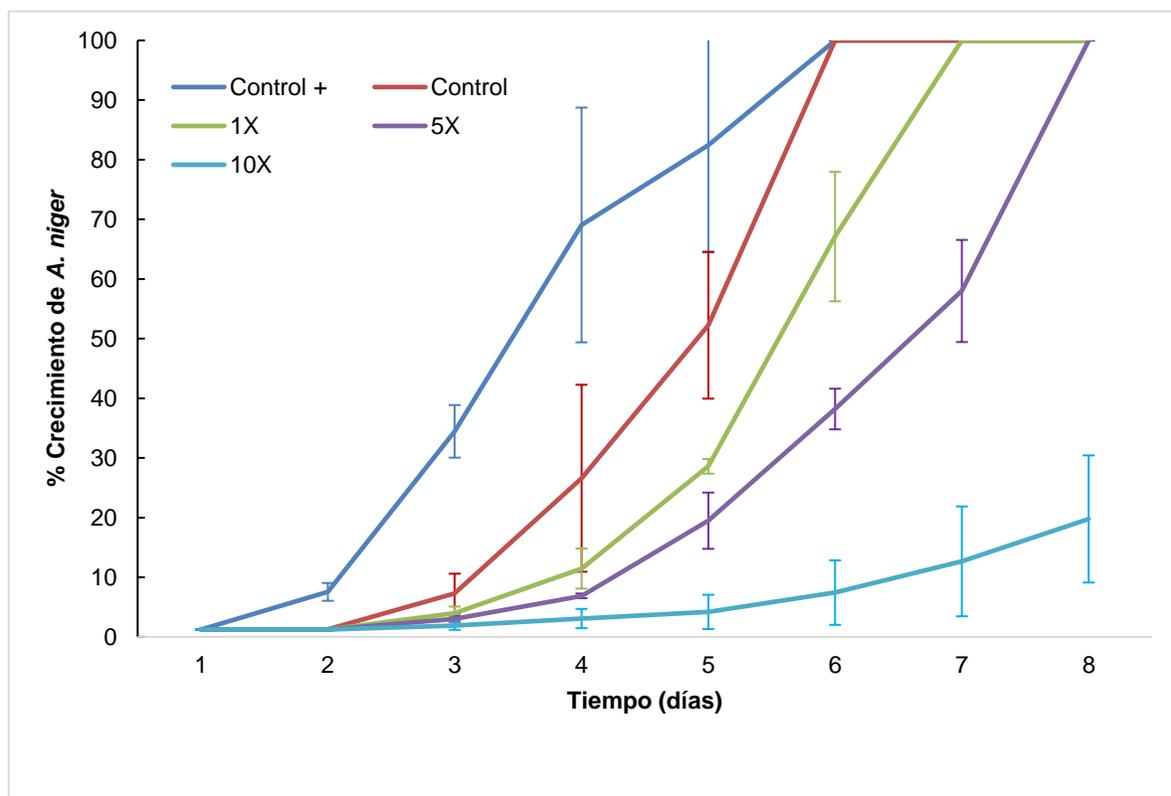


Figura 12. Crecimiento de *Aspergillus niger* en placas de PDA en presencia de película comestible a base PQ: QT (4:1, pp). 1x, con 0.1 g AECM/g película seca; 5x, con 0.52 g AECM/g de película seca; 10x, con 1 g AECM/g de película seca, control +, sin película comestible; control, con película comestible sin AECM adicionado, n=3.

Tabla 6. Tiempo (días) estimado necesario para alcanzar el 20% de crecimiento (porcentaje máximo de crecimiento del mejor tratamiento, 10x) de *A. niger* en presencia de las películas comestibles.

Tratamiento	Control+	Control	1x	5x	10x
Tiempo (días)	1.9	3.5	3.3	4.5	8

1x, con 0.1 g AECM/g película seca; 5x, con 0.52 g AECM/g de película seca; 10x, con 1 g AECM/g de película seca; control +, sin película comestible; control, con película comestible sin AECM adicionado, n=3.

## Resultados objetivo 2

### 6.7. Caracterización de la masa madre

#### 6.7.1 Población microbiana de la masa madre

La concentración de *L. lactis* llegó a un poco menos de 9 log UFC/g a las 24 h de haber sido inoculado en masa madre con 5 log UFC/g y se mantuvo en esa concentración después del refresco hasta las 48 h de fermentación; sugiriendo que la bacteria se adaptó de manera exitosa. Por otro lado, en presencia de *L. lactis* las levaduras crecen en menor medida al igual que las BAL, ya que en el conteo de BAL totales no se inhibe *L. lactis* y en los resultados la población de BAL es ligeramente mayor que la de *L. lactis*. A partir de las 48 h de fermentación no se observa crecimiento de levaduras cuando se inocula *L. lactis*, en contraste cuando no se inocula (Tabla 7). Este efecto es probablemente debido a que existe competencia por nutrientes y espacio, además de la presencia de los metabolitos antimicrobianos.

Tabla 7. Población microbiana (log UFC/g de masa madre) (BAL, levaduras o *L. lactis*) de las masas madre control (C) e inoculada con *L. lactis* (T) en los diferentes tiempos de fermentación (horas).

Horas / Población microbiana (tratamiento)	0	24	48
<i>L. Lactis</i> NRRL-B 50307 (T)	5.25 ± 0.5 <sup>c</sup>	8.7 ± 0.8 <sup>a</sup>	8.2 ± 0.8 <sup>a</sup>
BAL (T)	5.23 ± 0.5 <sup>c</sup>	8.5 ± 0.8 <sup>a</sup>	8.7 ± 0.9 <sup>a</sup>
Levaduras (T)	<1 <sup>d</sup>	5.2 ± 0.5 <sup>c</sup>	<1 <sup>d</sup>
BAL (C)	<1 <sup>d</sup>	7.8 ± 0.8 <sup>ab</sup>	9.1 ± 0.9 <sup>a</sup>
Levaduras (C)	<1 <sup>d</sup>	6.5 ± 0.6 <sup>b</sup>	5.2 ± 0.5 <sup>c</sup>

Letras iguales indican que no hubo diferencias significativas, entre filas y columnas, con n=3, usando la prueba de Tukey con  $p < 0.05$ .

De acuerdo con Ma *et al.*, (2021) la masa madre de la presente investigación es del tipo IV, ya que es una combinación de masa madre tipo I (masa madre espontánea) y masa madre tipo II (fermentación a partir de la inoculación microbiana). En este trabajo, una parte consistió en dejar fermentar la masa madre (control), y otra parte se usó para inocular *L. lactis* en cada refresco (tratamiento), durante 2 días.

No se pudieron detectar levaduras tanto al inicio como a las 48 h de fermentación (Tabla 7). Esto probablemente debido a que la nisina también es efectiva, aunque en menor medida, contra estas, como lo mencionan Serna *et al.*, (2015) ya que en la industria de vinificación se emplea la nisina como un inhibidor de levaduras.

Arora *et al.*, (2021) reportaron que una población de BAL media, independientemente de la elaboración de la masa madre suele estar alrededor de 6.5 UFC/g, mientras que para levaduras es alrededor de 8.5 log UFC/g.

### 6.7.2 Población microbiana de la masa fermentada lista para hornear

Una vez que ambas masas madre cumplieron con los parámetros (acidez titulable total y pH) para ser consideradas como tal (Sección 6.7.4 y 6.7.5), se adicionó a una nueva mezcla de masa, aún no fermentada, en proporción 1:3 (p/p) masa madre:masa no fermentada. Además, se agregó levadura *Saccharomyces cerevisiae* comercial tanto a la masa madre no inoculada como inoculada (2 mg/g de masa madre), de acuerdo con lo establecido en el Real Decreto 308/2019 (BOE, 2019). Esto se realizó debido porque a las 48 h de fermentación no se detectaron levaduras en el tratamiento y una baja población en el control, considerando que Arora *et al.* (2021) mencionan que debe presentarse una población > 5 log UFC/g, para obtener una buena capacidad leudante (Arora *et al.*, 2021).

Al cabo de 24 h de haberse realizado la mezcla arriba citada, la cuenta bacteriana en la masa madre control lista para hornear y adicionada con la levadura comercial, fue de 7 log UFC/g para BAL y 6 log UFC/g para levaduras. La masa madre fermentada inoculada con *L. lactis*, lista para hornear, mostró 7 log UFC/g para *L. lactis*, 7.5 log UFC/g para BAL y 7 log UFC/g para levaduras (Tabla 8).

Arora *et al.*, (2021) reportaron que la proporción de las poblaciones de BAL:levaduras en masa madre puede ser de 100:1, pudiendo descender hasta 10:1, por lo cual en esta investigación dicha relación solo se cumplió por la fermentación control, no así para el tratamiento con inoculación de *L. lactis*.

Tabla 8. Población microbiana total de las masas fermentadas y listas previa al horneado.

Microorganismo/Tratamiento	Tratamiento (T) (log UFC/g)	Control (C) (log UFC/g)
Levaduras	7.1 ± 0.6 <sup>a</sup>	6.1 ± 0.5 <sup>b</sup>
BAL	7.15 ± 0.6 <sup>a</sup>	7.1 ± 0.6 <sup>a</sup>
<i>L. Lactis</i> NRRL B-50307	7.2 ± 0.6	----

Letras iguales indican que no hubo diferencias significativas, con n=3, usando la prueba de Tukey con  $p < 0.05$ .

El crecimiento de las levaduras en la masa lista para hornear puede deberse a que había una porción de masa no fermentada, que en el corto tiempo de fermentación y a 4°C, fue suficiente para que las levaduras y las poblaciones bacterianas, lograran obtener sustrato suficiente para aumentar su población.

### 6.7.3 Contenido de azúcares reductores en masa madre

A partir de las 24 h se registró un aumento de los azúcares reductores en la masa madre sin inocular (Figura 13). Sin embargo, fue mayor la disponibilidad de azúcares reductores en la masa madre inoculada con *L. lactis*, indicando que esta cepa da comienzo a la degradación del almidón a azúcares simples inmediatamente a partir de la inoculación.

Al cabo de 48 h de fermentación a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C), se obtuvo un mayor contenido de azúcares reductores en la masa madre control comparada con la inoculada (Figura 13). Esto puede deberse a que en la fermentación control hay una mayor población de BAL (9.1 log UFC/g) en comparación con la masa madre inoculada (8.7 log UFC/g), y no hay competencia por nutrientes de microorganismos propios de la harina contra una cepa externa como ocurre con la inoculada con *L. lactis* (tratamiento T). Sin embargo, en el tratamiento al cabo de 24 h de fermentación hay mayor contenido de azúcares reductores que en el control.

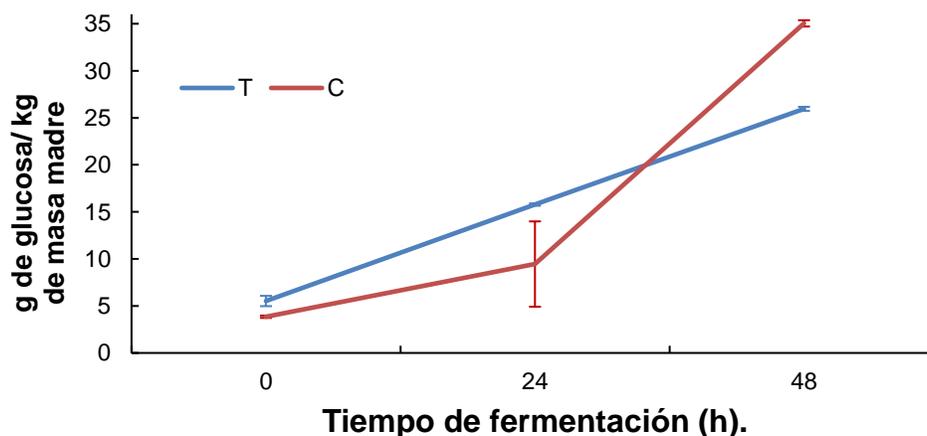


Figura 13. Concentración de azúcares reductores (g glucosa/kg de masa madre) en función del tiempo de fermentación (h). Masa madre inoculada con *L. lactis* (T); control sin inocular (C). Las barras de error muestran la desviación estándar.

En el presente estudio se obtuvo una concentración de azúcares reductores a las 48 h de fermentación de  $25.9 \pm 0.21$  mg/g y de  $35.0 \pm 0.3$  mg/g para la masa madre inoculada y control, respectivamente. Nie *et al.*, (2023) trabajando con masa madre inoculada con *L. lactis* CGMCC1.2030, reportaron una concentración de glucosa de 3 mg/g al cabo de 24 h de fermentación, la cual se cuantificó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Cabe resaltar que en este trabajo no se detectó glucosa como tal.

Por otro lado, los resultados de esta investigación son de difícil comparación con los obtenidos por Gunduz *et al.*, (2022), quienes determinaron concentraciones de glucosa desde  $7.8 \pm 0.5$  g/kg hasta  $10.0 \pm 1.0$  g/kg, y de  $2.3 \pm 0.0$  g/kg hasta  $3.2 \pm 0.2$  g/kg de fructosa en masas madre. Sin embargo, existe concordancia con el mayor contenido de azúcares reductores en masas madre inoculadas con *L. lactis* al cabo de 24 h de fermentación, en comparación con masa madre no inoculada.

#### 6.7.4 Acidez titulable total de la masa madre

Los resultados de acidez titulable total indican que comienza la producción de ácido láctico desde el momento en el que se inocula *L. lactis* (Figura 14). Esto concuerda con los resultados de azúcares reductores, pues la fermentación comienza desde que se inocula *L. lactis* obteniendo una acidez titulable de  $7.7 \pm 0.6$  y  $8.9 \pm 1.9$  g de ácido láctico/kg de masa madre, para las 24 y 48 h de fermentación, respectivamente. La masa madre control mostró valores de  $2.5 \pm 0.1$  y  $9.5 \pm 1.6$  g de ácido láctico/kg de masa madre, a las 24 h y 48 h de fermentación respectivamente. Sin embargo, no se considera masa madre hasta alcanzar una acidez titulable total  $\geq$  de 6 g/kg; por lo cual la inoculación de *L. lactis* acorta los tiempos de fermentación, pues desde las 24 h se puede considerar masa madre a diferencia del control que rebasa la acidez titulable total de 6 g/kg hasta las 48 h.

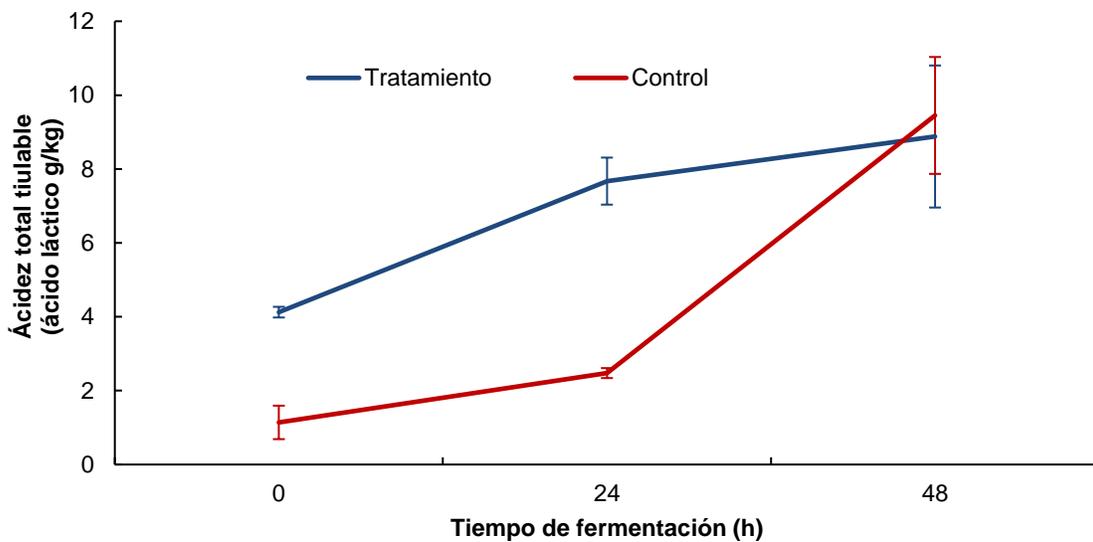


Figura 14. Acidez titulable total en función del tiempo de fermentación (h) de masa madre inoculada con *L. lactis* (T) y control sin inocular (C), expresada como g de ácido láctico por kg de masa madre. Las barras de error muestran la desviación estándar.

Los resultados obtenidos en la presente investigación concuerdan con los obtenidos por Elsanhoty *et al.*, (2017) quien hizo diferentes masas madre inoculadas con *L. acidophilus*, *L. plantarum* y *Bifidobacterium lactis*, y determinó que al inocular

una cepa externa en la masa madre aumentaba más rápido la acidez titulable total a diferencia de hacer masa madre tipo I, obteniendo valores de 8.5 a 13.1 g de ácido láctico por kg de masa madre.

Los resultados obtenidos al final de la fermentación concuerdan con lo obtenido por Simsek *et al.*, (2006) quienes encontraron que los valores de acidez de las muestras de masa madre oscilan entre 7.6 y 19.3 g de ácido láctico por kg de masa madre.

### 6.7.5 pH de la masa madre

Los resultados de pH concuerdan con los resultados de azúcares reductores y acidez titulable total, los tiempos de fermentación se acortan al inocular *L. lactis*, alcanzando pH de 4.5 a las 24 h (Figura 15). La masa no inoculada (control) no se puede considerar masa madre hasta las 48 h por lo que se explicó en la sección anterior. Sin embargo, a las 48 h la masa madre control tiene un pH más ácido,  $3.64 \pm 0.38$ , que la masa madre inoculada,  $4.08 \pm 0.05$ , por lo que impartiría una acidez mayor en el pan y sabores desagradables, lo que indica que la presencia de *L. lactis* puede regular el pH y la acidez del sustrato.

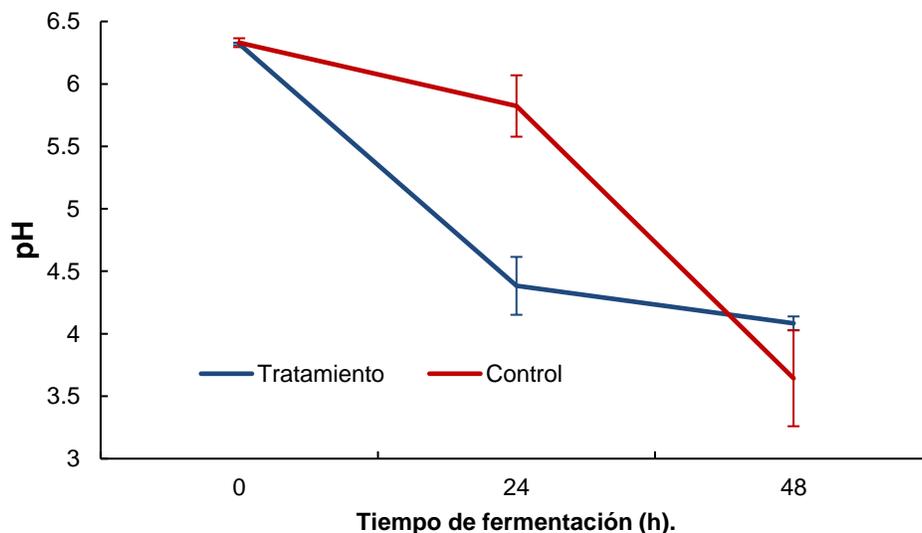


Figura 15. Nivel de pH en masas madre en función del tiempo de fermentación (h) para masa madre inoculada con *L. lactis* (T) y control sin inocular (C). Las barras de error muestran la desviación estándar.

A partir de las 24 h la masa madre inoculada con *L. lactis* tiene niveles de pH óptimos 4.6-4.0, en comparación con el control, el cual desciende desde 6.1 hasta 3.2 entre las 24 h y las 48 h de fermentación (Figura 15). Por lo tanto, la masa madre inoculada podría considerarse más adecuada utilizando este parámetro de comparación, tomando en cuenta lo establecido por Ma *et al.*, (2021) sobre el nivel de pH óptimo en masa madre que debe fluctuar entre 4.3 y 4.6.

Elsanhoty *et al.*, (2017) inocularon cepas de *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *B. lactis*, en diferentes masas madre, observando al igual que en este trabajo, un descenso del pH más rápido y constante para la obtención de masa madre tipo IV, en comparación con la masa madre tipo I.

#### **6.7.6 Nisina en masa madre**

El pico máximo de producción de nisina en masa madre inoculada con *L. lactis*, se presentó 24 h después de haberse inoculado, con una producción máxima de nisina de  $149.5 \pm 35.1$  UI/g a las 48 h de fermentación (Figura 16) (1 UI= 1 µg de nisina pura). Posterior a las 24 h de fermentación y realizado el refresco correspondiente, se detectó a las 30 h una reducción en la concentración de nisina, ocasionada por la dilución realizada entre la masa madre inicial y el refresco de ésta. Sin embargo, siguió existiendo producción de nisina, hasta llegar nuevamente a su máxima concentración a las 48 h.

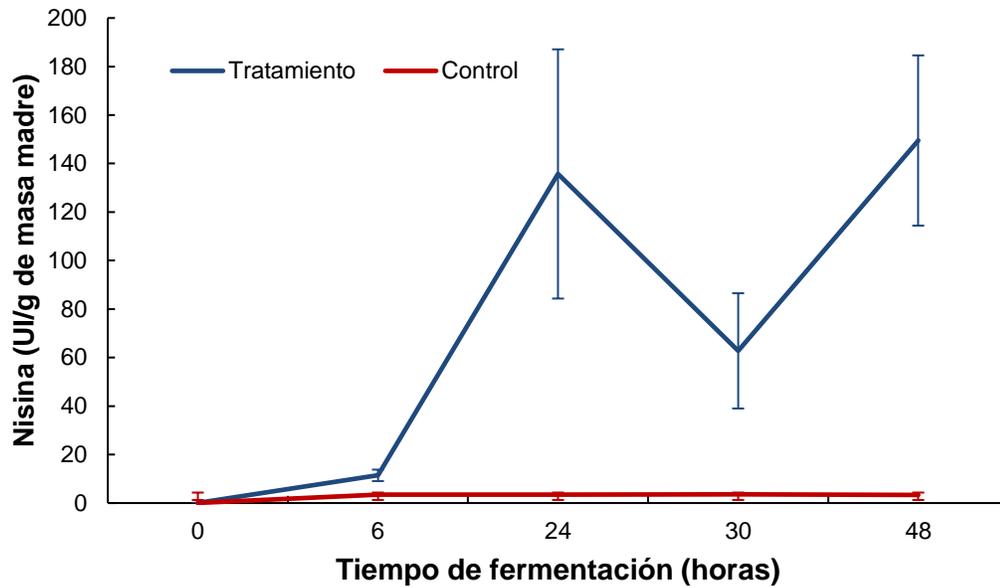


Figura 16. Producción de nisina (UI/g de masa madre) durante 48 h por *L. lactis* en masa madre inoculada con *L. lactis* (T) y control sin inocular (C). Las barras de error muestran la desviación estándar.

Patiño-Galván (2014), reportó una producción máxima de nisina a las 12 h de fermentación de suero lácteo, con la misma cepa, obteniendo hasta 444 UI/mL con una población de *L. lactis* de 8.3 log UFC/mL, la concentración de la bacteria es similar a la observada en nuestro trabajo, pero se produjo una menor cantidad de nisina. Por su parte, González-Toledo *et al.*, (2010), usando la misma cepa para encontraron las condiciones óptimas de producción de nisina utilizando suero lácteo, obteniendo una concentración de 178 UI/mL en 6 h de fermentación.

La masa madre es una matriz alimentaria distinta al suero lácteo, donde las distintas poblaciones microbianas se mantienen una competencia por nutrientes, y al no tener óptimas condiciones para la producción de nisina su producción es menor. Por otro lado, la baja producción de nisina se puede deber a que puede interactuar con algunos componentes de la masa madre como grasa, proteínas y enzimas perdiendo su máxima efectividad (Serna *et al.*, 2015)

En este estudio la población microbiana es considerable comparada con el suero lácteo que, al ser sometido a pasteurización, se limita la carga microbiana del sustrato, mientras que la masa madre mantiene una comunidad microbiana activa. Sin embargo, en este estudio la cepa presente en la comunidad microbiana es dominante en la masa madre, y está en mayor proporción a diferencia del resto de diferentes géneros y especies de BAL, así como de levaduras.

Nie *et al.*, (2023) inocularon una cepa de *L. lactis* en la fermentación de masa madre de harina de trigo para elaborar fideos frescos, obteniendo una concentración máxima de nisina a las 6 h de fermentación con un pico máximo de 400 UI/g, y a las 24 h 125 UI/g, lo cual es menor a lo obtenido en el presente estudio. Sin embargo, la cuantificación de nisina no se realizó con un método estandarizado como el British Standard BSI 4020, (1974), además no se inactivaron los ácidos orgánicos de la masa madre (ácido láctico) como en este trabajo. Esto debido a que en su forma no disociada  $pka=3.86$ , podría inhibir al microorganismo indicador.

Si bien los microorganismos viables no sobreviven al horneado de la masa en la producción de pan, si pueden existir microorganismos productores de toxinas en la masa madre, las cuales no tienen gran reducción en el proceso de horneado. Los principales riesgos pueden asociarse a hongos formadores de esporas, *Clostridium botulinum* y *Bacillus cereus* (Axel *et al.*, 2017), que al ser inhibidos por la nisina A se podría prevenir la formación de las toxinas. En particular en *Clostridium botulinum* sería relevante entre las primeras 24 h de fermentación, cuando el pH es mayor a 4.6, aplicando la bioconservación desde el proceso de la fermentación de la masa madre.

### **Resultados objetivo 3**

#### **6.8 Análisis sensorial del pan de masa madre**

Los consumidores prefieren panes de amaranto y trigo en proporciones menores a 4:1 trigo:amaranto (T:A), en peso (Sanz-Penella *et al.*, 2013), aunque Venturi *et al.*, (2019) reportaron que la sustitución del 20% de la harina de trigo

produjo un pan con evaluación sensorial desventajosa. Por tanto, se decidió para este estudio realizar panes de trigo y amaranto únicamente en relación 9:1 T:A, además, el volumen de los panes disminuye al aumentar la proporción de harina de amaranto.

Se realizó un análisis sensorial del pan de masa madre recién horneado, mediante una escala hedónica de 9 puntos (Anexo 4). Los resultados se analizaron usando la metodología del análisis no paramétrico Kruskal-Wallis, el cual analiza las medianas de tres o más grupos de datos independientes que no suponen normalidad y que es un mejor indicador de tendencia central que la media, ya que al ser un análisis sensorial influyen diversos factores, además de tener mayor robustez en cuanto a datos atípicos por lo que no se analizaron barras de error, ya que están más asociadas con datos paramétricos (Hough, 2010).

Los resultados mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), para todos los atributos (Figura 17). Para el atributo del color, el tratamiento que fue diferente al resto fue el pan de masa madre LR (con presencia de *L. lactis* y del recubrimiento) probablemente debido a un oscurecimiento de la corteza al aplicar el recubrimiento. Para el atributo del olor los panes de masa madre que tuvieron mayor puntuación y que fueron diferente al resto fue el pan de masa madre LR y CR, (ausencia de *L. lactis* y presencia del recubrimiento), lo que indica que el recubrimiento este aportando notas de olor agradables, debido al AECM. Por su parte el atributo del sabor tuvo mayor puntuación para el pan LR, seguido por la misma calificación entre los panes CR y L (pan con presencia de *L. lactis* y ausencia de recubrimiento). El pan que tuvo menor puntuación fue el C (ausencia de *L. lactis* y de recubrimiento), lo que indica que la fermentación de la masa madre con *L. lactis* y el recubrimiento estén proporcionando sabores agradables al pan de masa madre.

Por su parte la textura en el pan de masa madre tuvo menor puntuación cuando estaba presente el recubrimiento, este efecto se atribuyó a que el recubrimiento tuvo un impacto directo sobre la textura del pan, ya que al ser muestras con miga y corteza únicamente por arriba y abajo, el recubrimiento humedeció la miga. Sin embargo, en un producto final se esperaría que no tuviera

mayor impacto, ya que la corteza evitaría el humedecimiento directo de la miga (Altamirano-Fortoul *et al.*, 2012).

Por otro lado, el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis dio como resultado que el mejor tratamiento fue el pan elaborado con masa madre inoculada con *L. lactis* y recubrimiento comestible (LR), para todos los atributos a excepción de la textura, además, el recubrimiento comestible con AECM, da como resultado una mejora al ser aplicado en pan, en cuanto a los atributos de olor, sabor y aceptación (Figura 17).

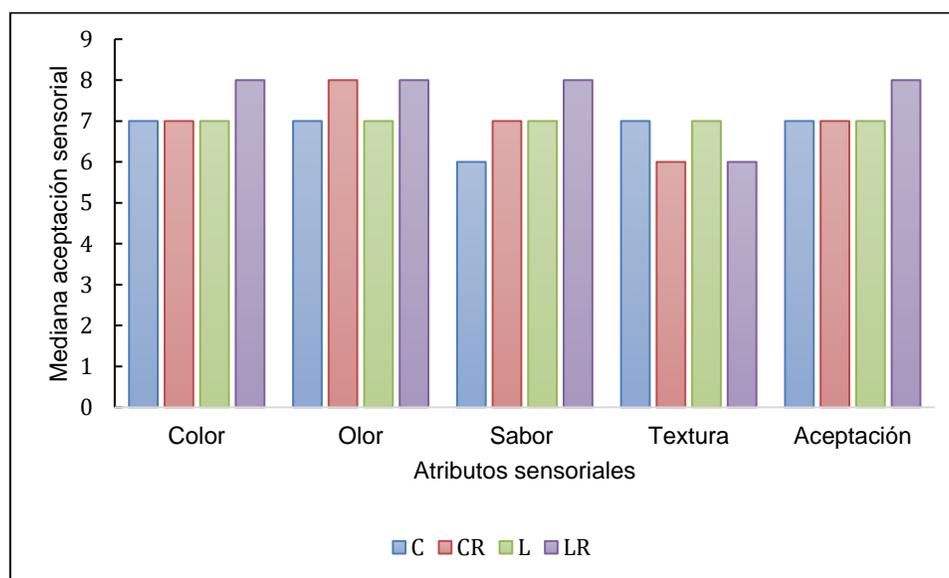


Figura 17. Medianas de los niveles de aceptación de los diversos atributos de los diferentes panes de masa madre elaborados y aceptación general del mismo en una escala hedónica de 9 puntos. Control: C; Control con recubrimiento: CR; Control inoculado con *L. lactis*: L; Control inoculado con *L. lactis* y con recubrimiento: L(R).

Además de mejorar las propiedades tecnológicas del pan, la masa madre se utiliza principalmente para mejorar el sabor del pan. Este parámetro proviene de la proteólisis de las BAL, y posterior conversión microbiana de aminoácidos que proporciona compuestos precursores de volátiles aromáticos y sabor durante el horneado (Arendt *et al.*, 2007). Por tanto, *L. lactis* resultó capaz de proporcionar compuestos de sabor con mayor agrado del consumidor, que la microbiota propia de la harina del trigo y amaranto.

Bautista-Espinoza *et al.*, (2023) obtuvieron una puntuación de 6.9 en un análisis sensorial con la misma metodología. Usaron pan de masa madre de trigo adicionado con un recubrimiento de PQ:QT con AE de hierba limón y/o canela encapsulado, sin encontrar diferencias significativas. En el presente trabajo, el promedio de la aceptación de todos los panes fue de  $6.7 \pm 1.5$ ; sin embargo, el inoculado con *L. lactis* y con recubrimiento, obtuvo una aceptación promedio de  $7.1 \pm 1.7$ : La puntuación depende en gran medida de la asociación al producto y el tipo de masa madre, donde la adición de amaranto pudo conferir sabores más agradables, además del recubrimiento comestible, y la inoculación de *L. lactis*. La tecnología de barreras múltiples usada, consistió en la inoculación de *L. lactis* y el uso del recubrimiento comestible activo de PQ:QT con AECM. La puntuación obtenida que involucró estos dos factores fue en su mayoría “me gusta bastante”, mientras que el resto de las muestras al igual que los panes de masa madre del estudio de Bautista-Espinoza *et al.*, (2023) fue puntuado con un “me gusta ligeramente”.

Mariotti *et al.*, (2014) elaboraron pan de masa madre con harina de trigo y de cebada, realizando una evaluación sensorial afectiva mediante un panel entrenado de 10 evaluadores y una escala hedónica de 9 puntos. El pan de harina de trigo obtuvo una calificación de 5.33, mientras que al pan combinando harina de trigo y cebada obtuvo 4.78 y 4.44 el de cebada. Estos resultados pueden explicarse por el sabor de la cebada y los jueces entrenados que son más estrictos. Usualmente este tipo de estudios se realizan con consumidores habituales del pan, siendo deseable un mayor número de panelistas para evitar sesgos y tener una calificación más representativa del producto (Hough, 2010).

Los resultados observados en la evaluación sensorial permiten concluir que *L. lactis*, además de acelerar el proceso de fermentación en masa madre, produjo precursores de sabor agradable durante la fermentación.

## **Resultados para el objetivo 4**

### **6.9 Vida de anaquel del pan de masa madre**

Los principales cambios que ocurren después del horneado de los panes son la redistribución de la humedad, la retrogradación del almidón, el aumento de la dureza y la pérdida de aroma y sabor. Se ha sugerido que el mecanismo principal de degradación es la migración de humedad de la miga a la corteza, impactando en la dureza del producto, volumen, color. Estos factores propician el deterioro fúngico, que es el más predominante en este tipo de productos (Smith *et al.*, 2004)

El perfil microbiológico, de textura, volumen, humedad y color, son los principales factores del deterioro microbiano, físico y químico. Los análisis proximales se realizaron inmediatamente después de horneado el pan.

#### **6.9.1 Análisis microbiológico del pan obtenido**

Se evaluó la población microbiana, observando que en todos los tratamientos se mantuvo el número de colonias por debajo de los límites máximos permitidos por la norma. En ninguno de los tratamientos se observó crecimiento microbiano, incluyendo el control, atribuyendo dicho efecto a la acidez propia del consorcio microbiano de la masa madre desde el inicio de la producción del pan y a que los panes se elaboraron en condiciones asépticas. El recuento de hongos y levaduras, coliformes totales y mesófilos aerobios fue en todos los tratamientos < 10 UFC/g. La Norma oficial Mexicana NOM-147-SSA1-1996, establece una cantidad máxima de mesófilos aerobios de 1000 UFC/g, < 20 UFC/g tanto para mohos como levaduras y < 10 UFC/g para coliformes totales, por lo que se concluye que los panes fueron realizados con buenas prácticas de manufactura. Valores similares fueron reportados por Bautista-Espinoza *et al.*, (2023) en su estudio de vida de anaquel de pan de masa madre a base de trigo.

En un estudio realizado por Seiler, (1976) a 46 panaderías, determinó que la aparición de moho en pan almacenado en bolsas de plástico a temperatura ambiente es de 5-6 días, siendo *Penicillium* spp. el contaminante en la mayoría de

los panes, así como *Aspergillus* spp. y *Cladosporium* spp. los contaminantes en la mitad de ellos.

### 6.9.2 Perfil de textura

La firmeza es uno de los atributos que caracteriza el envejecimiento del pan, debido a que la humedad de la miga migra hacia el exterior a la corteza con el paso del tiempo aumenta la dureza paralelamente a la pérdida de la frescura, lo que resulta en la pérdida de aceptación por parte de los consumidores (Arendt *et al.*, 2007).

La Tabla 9 muestra los resultados de textura (dureza, N) de los diferentes panes de masa madre a lo largo del estudio de vida de anaquel acelerada. Se observa un aumento de la dureza en el equivalente al día 3.5 (en condiciones de temperatura ambiente) únicamente en el pan tratamiento CR (ausencia de *L. lactis* y presencia del recubrimiento). La dureza aumentó en el equivalente al día 7 en todos los tratamientos. Finalmente, todos los tratamientos aumentaron su dureza a excepción del tratamiento LR (presencia de *L. lactis* y de recubrimiento), por lo tanto, hubo un retraso de 3.5 días en el aumento de la dureza únicamente en el pan elaborado a partir de masa madre inoculada con *L. lactis* y uso de un recubrimiento activo.

Tabla 9. Resultados de la firmeza (N) en los panes de masa madre durante la vida de anaquel acelerada, C, control (ausencia de *L. lactis* y de recubrimiento); CR, (ausencia de *L. lactis* y presencia de recubrimiento); L, (presencia de *L. lactis* y ausencia de recubrimiento); LR, (presencia de *L. lactis* y de recubrimiento).

Días	0	3.5	7	10.5
Tratamiento				
C	13.1±3.1 <sup>c</sup>	14.8±1.6 <sup>c</sup>	18.4±3.6 <sup>bc</sup>	80.5±37.7 <sup>a</sup>
CR	15.0±5.5 <sup>c</sup>	20.6±7.9 <sup>bc</sup>	26.2±7.4 <sup>bc</sup>	73.5±21.1 <sup>a</sup>
L	11.4±3.2 <sup>c</sup>	14.5±4.8 <sup>c</sup>	22.6±6.8 <sup>bc</sup>	59.3±19.1 <sup>a</sup>

LR	9.6±3.1 <sup>c</sup>	12.6±2.6 <sup>c</sup>	17.2±2.5 <sup>bc</sup>	37.4±9.9 <sup>b</sup>
----	----------------------	-----------------------	------------------------	-----------------------

---

Letras iguales indican que no hubo diferencias significativas, con  $n=3$ , usando la prueba de Tukey con  $p<0.05$ .

Bautista-Espinoza *et al.*, (2023) obtuvieron resultados similares para pan de masa madre de trigo fermentado con la misma cepa de *L. lactis* y un recubrimiento comestible de PQ:QT adicionado con AEC y AE de hierba limón. Observaron mayor dureza en el pan de masa madre control con valor similar al del pan de masa madre control de la presente investigación. Suárez-Pilicita (2024) estudió el efecto de la masa madre en pan tipo tapado, obteniendo mayor aceptación sensorial el pan con dureza de  $38.45 \pm 0.67$  N, similar similar a la del pan fermentado con *L. lactis* y con recubrimiento (LR) del presente trabajo.

La mejora en la reología de la masa y la textura en el pan de masa madre es efecto de los expolisacáridos producidos por las BAL, además de tener actividad prebiótica (Arendt *et al.*, 2007). Algunas cepas de *L. lactis* son productoras de exopolisacáridos (Werning, 2010).

Se observó una mayor disminución de la firmeza por el efecto combinado de *L. lactis* y el recubrimiento. Esto asociado a una probable disminución de la migración de humedad del recubrimiento y probable producción de exopolisacáridos por parte de *L. lactis*, lo cual pudo haber impactado en la firmeza del producto, por consecuente el deterioro fisicoquímico, aumento de la dureza, fue menor en el tratamiento LR que en el resto de tratamientos (C, CR y L) al día 10.5 posterior a la elaboración, donde no hubo efecto combinado de *L. lactis* y recubrimiento.

### 6.9.3 Color

Durante el envejecimiento del pan paralelamente a la pérdida de la frescura y aumento de la dureza, ocurre el fenómeno de oscurecimiento de la miga (Arendt *et al.*, 2007). Los panes no tuvieron diferencias significativas en los parámetros de color desde el fin del horneado (hora cero) hasta el final del estudio en el día 10.5 (Tabla 10).

Tabla 10. Resultados de color de los panes de masa madre elaborados en esta investigación.

Tratamientos	Escala de color	C	CR	L	LR	Promedio de color de los panes obtenidos
Días vida de anaquel						
0	L	57±10	60±4	56±9	59±7	
	a	12±5	12±4	13±3	10±3	
	b	23±7	23±5	25±3	25±4	
3.5	L	54±8	56±6	57±8	53±9	
	a	15±5	14±3	12±5	13±3	
	b	28±2	27±3	26±4	30±13	
7	L	53±1	49±8	47±12	55±7	
	a	13±4	14±3	11±3	14±4	
	b	25±6	26±8	22±4	28±3	
10.5	L	57±1	54±7	55±12	52±8	
	a	11±2	12±2	12±3	11±1	
	b	23±2	24±2	24±35	25±4	

Control (C); pan de masa madre control con recubrimiento (CR); pan de masa madre de *L. lactis* (L); pan de masa madre inoculada con *L. lactis* y con recubrimiento (LR). Todos los resultados fueron estadísticamente iguales ( $p>0.05$ ).

Bautista-Espinoza *et al.*, (2023) encontraron diferencias entre los parámetros de color entre los tratamientos de panes de masa madre de harina de trigo y la fermentada con *L. lactis* con recubrimiento activo. Ellos no usaron harina de amaranto, mientras que encapsularon con nanopartículas de sílice mesoporoso y de ahí las diferencias en los resultados de color.

Los resultados mostraron desviaciones estándar muy altas, debido a las diferentes tonalidades de color café, ya que el horneado no es un proceso uniforme, por lo que hay zonas claras y oscuras en el pan.

### 6.9.3 Humedad

La humedad se mantuvo con el paso del tiempo de manera significativa, sin embargo, el tratamiento C (control, ausencia de *L. lactis* y de recubrimiento) mostro una tendencia a tener menor humedad, por su parte el tratamiento CR (ausencia de *L. lactis* y presencia de recubrimiento) mostro mayor humedad respecto al tratamiento C, al igual que el tratamiento L (presencia de *L. lactis* y ausencia de recubrimiento).

La masa madre control tuvo una fermentación mayor a las 48 horas, al presentar mayor acidez, menor pH y mayor cantidad de azúcares reductores, por lo que pudiese existir menor cantidad de gluten, el cual está compuesto por gluteninas y gliadinas, las cuales absorben el agua y la fase gaseosa desprendida por bacterias y levaduras. Por lo tanto, es posible que la masa madre control tuviera menor cantidad de gluten que la masa madre fermentada por *L. lactis*, la cual presentó una fermentación más rápida (inicio desde las 24 horas posfermentación) y estable (menos ácida que el control) y por lo tanto esta última absorbiera mayor cantidad de agua respecto al control (sin *L. lactis*).

Por su parte el recubrimiento pudo haber proporcionado cierta cantidad de humedad que contribuyó con el humedecimiento del pan, sin embargo, no fue una diferencia significativa.

Tabla 11. Resultados de humedad de las muestras de pan de masa madre a lo largo de la vida de anaquel acelerada.

Tratamiento/día	0	3.5	7	10.5
C	57.7±4.5 <sup>b</sup>	69.1±1.4 <sup>ab</sup>	67.3±1.2 <sup>ab</sup>	69.0±2.9 <sup>ab</sup>
CR	67.4±2.6 <sup>ab</sup>	72.1±5.1 <sup>a</sup>	66.9±1 <sup>ab</sup>	72.6±5.2 <sup>a</sup>

L	66.8±1.6 <sup>ab</sup>	66.6±2.6 <sup>ab</sup>	61.2±3 <sup>ab</sup>	72.6±1.5 <sup>a</sup>
LR	67.1±3 <sup>ab</sup>	67.2±3.9 <sup>ab</sup>	68.3±1.9 <sup>ab</sup>	68.9±1.5 <sup>ab</sup>

Control (C); masa madre control con recubrimiento (CR); masa madre de *L. lactis* (L); masa madre inoculada con *L. lactis* y con recubrimiento (LR). Letras diferentes en superescrito indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre filas (tiempo) y columnas (tratamientos).

Por otro lado, la humedad no disminuyó con el paso del tiempo, esto debido a que, al endurecerse la corteza en el proceso de horneado de pan, esta evita la migración de agua de la miga hacia el exterior del pan, evitando tener un pan seco, el cual es rechazado por los consumidores.

El único tratamiento que tuvo menor contenido de humedad fue el pan control, esto gracias a que la acidificación en la masa madre ejerce efecto sobre los gránulos de almidón ocasionando que tengan mayor capacidad de retención de agua (Arendt *et al.*, 2007). La acidificación a pesar de haber sido mayor en la masa madre control, fue más estable y aparentemente de mejor calidad en la masa madre fermentada por *L. lactis*, ocasionando un efecto directo sobre la retención de agua en los gránulos de almidón y del gluten.

Si bien no existió disminución de la humedad con el paso del tiempo, si existió aumento de humedad en los tratamientos C, CR, y L, a excepción del tratamiento LR, donde la humedad se mantuvo constante en el tiempo. El aumento de humedad o la disminución de esta es un factor indeseable para los consumidores, existiendo un deterioro químico en los tratamientos C, CR y L a los días 3.5, 3.5 y 10.5, respectivamente. Además, de mostrar mayor impacto en la estabilidad de la humedad del producto cuando es inoculado *L. lactis* en la masa madre.

#### 6.9.4 Volumen

El volumen de los panes al paso del tiempo no mostró diferencia significativa (Tabla 12). Sin embargo, las variaciones son bastante amplias, debido a que el volumen depende mucho del área del horno, si las masas para elaborar pan son colocadas en puntos estratégicos o en las orillas del horno.

Tabla 12. Volumen de los panes de masa madre durante su vida de anaquel acelerada.

Tratamiento/día	0	3.5	7	10.5
C	137.5±11.4 <sup>a</sup>	171.4±36.4 <sup>a</sup>	175.9±6.1 <sup>a</sup>	148.3±16.1 <sup>a</sup>
CR	185.0±17.3 <sup>a</sup>	160.5±5.5 <sup>a</sup>	180.3±23.7 <sup>a</sup>	126.5±17 <sup>a</sup>
L	183.2±16.2 <sup>a</sup>	153.8±36.6 <sup>a</sup>	142.7±36 <sup>a</sup>	158.3±20.5 <sup>a</sup>
LR	176.6±40.4 <sup>a</sup>	188.6±7.3 <sup>a</sup>	214.8±32 <sup>a</sup>	191±36.6 <sup>a</sup>

Control (C); masa madre control con recubrimiento (CR); masa madre de *L. lactis* (L); masa madre inoculada con *L. lactis* y con recubrimiento (LR). Todas las letras en superescrito son iguales, por lo que no hubo diferencia significativa ( $p>0.05$ ).

El volumen de los panes aumenta, cuando la masa se coloca inicialmente tapada, esto para no secar la corteza y permitir el aumento de volumen de la miga, por lo que los panes se colocan en el horno inicialmente tapados y posteriormente se destaparon para obtener la corteza dura y crujiente característica del pan de masa madre.

Aplevicz *et al.*, (2013) determinaron la influencia de dos cepas de *L. paracasei* y dos cepas de *S. cerevisiae* en la fermentación de harina de trigo para la obtención del pan de masa madre. Encontraron que cuando aumentaba la acidez titulable total de la masa madre, obtenían panes de menor volumen, probablemente debido a que las levaduras no sobrevivieron en ambientes muy ácidos. Además, no mencionaron el uso de algún antibiótico en sus recuentos, para no confundir las BAL y levaduras, las cuales tienen morfología similar y pueden crecer en ambos medios.

### 6.10 Análisis proximal de los panes de masa madre

Los panes de masa madre control (C) no presentaron diferencias en humedad al utilizar el recubrimiento, siendo la misma para el pan inoculado con *L.*

*lactis* (L). Sin embargo, la tendencia es que la humedad aumenta ligeramente al utilizar el recubrimiento, el cual es el mismo caso al utilizar masa madre de *L. lactis*. Los panes de *L. lactis*, que pudieran tener mayor cantidad de gluten, pudieran retener mayor humedad y gas (CO<sub>2</sub>).

Tabla 13. Resultados de los análisis químicos proximales de los panes de masa madre.

Tratamiento/Parámetro	Humedad (%)	Proteína (%)	Grasa (%)	Fibra (%)	Ceniza (%)	Carbohidratos (%)
C	25.4±0.6 <sup>b</sup>	13.7±0.1 <sup>a</sup>	2.2±0.9 <sup>a</sup>	1.7±0.1 <sup>a</sup>	1.6±0 <sup>a</sup>	55.5±1.7 <sup>a</sup>
CR	28.7±2.5 <sup>b</sup>	13.6±0.1 <sup>b</sup>	6.0±1.4 <sup>b</sup>	2.0±0.1 <sup>a</sup>	1.5±0.1 <sup>a</sup>	48.2±4.2 <sup>b</sup>
L	29.4±1.9 <sup>ab</sup>	14.4±0.4 <sup>a</sup>	2.4±0.5 <sup>a</sup>	1.8±0.1 <sup>a</sup>	1.5±0.1 <sup>a</sup>	50.5±3 <sup>b</sup>
LR	33.6±1.1 <sup>a</sup>	13.5±0.2 <sup>b</sup>	2.9±2.3 <sup>ab</sup>	1.7±0.1 <sup>a</sup>	1.5±0.1 <sup>a</sup>	46.7±3.8 <sup>b</sup>

Control (C); masa madre control con recubrimiento (CR); masa madre de *L. lactis* (L); masa madre inoculada con *L. lactis* y con recubrimiento (LR). Letras diferentes en superescrito indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

En cuanto a los niveles de proteína fueron muy similares entre si mostrando diferencias estadísticas únicamente entre los tratamientos cuando se aplica el recubrimiento. Sin embargo, no hay diferencias en cuanto a los tratamientos de los panes con los distintos tipos de masa madre.

Los niveles de grasa en los panes únicamente aumentaron cuando se adicionaba el recubrimiento con aceite esencial de canela, el cual pudo ser solubilizado en el proceso de desgrasado con Soxhlet. Para el contenido de fibra y ceniza tampoco hubo diferencias significativas en los panes. El contenido de carbohidratos disminuyó al estar presente el recubrimiento, el cual tiene mayor proporción de proteína que de polisacáridos además de contener aceite.

### 6.11 Vida de anaquel microbiana cualitativa

Al no observarse crecimiento microbiano en la vida de anaquel con condiciones aceleradas se procedió a elaborar panes bajo la misma metodología y dejarlo en condiciones ambientales en bolsas de plástico herméticas y se procedió a observar las muestras de panes, las cuáles desde su elaboración nunca fueron abiertas de sus empaques.

Se observó crecimiento de moho verde (probablemente *Penicillium* spp.) al día 9 de almacenamiento únicamente en el pan control (masa madre C y sin recubrimiento), posteriormente el moho se expandió rápidamente durante los siguientes 4 días y se siguió observando crecimiento hasta el día 70 únicamente en esa muestra de pan (Figura 18).

En la industria algunas de las prácticas en la conservación del pan es la adición de propionato o la acidificación de la masa. Sin embargo, el moho difícilmente se inhibe usando alguna de estas dos prácticas, por lo que se buscan alternativas más eficaces y naturales como el uso de aceites esenciales, los cuales si tienen efecto inhibitorio frente al moho (Axel *et al.*, 2017). Además, la nisina también tiene efecto inhibidor contra mohos y levaduras (Naidu, 2000).

En el resto de los tratamientos CR (ausencia de *L. lactis* y presencia de recubrimiento), L (presencia de *L. lactis* y ausencia de recubrimiento) y LR (presencia de *L. lactis* y de recubrimiento), no hubo crecimiento visible de ningún microorganismo desde la elaboración hasta el día 70 postelaboración. Esto indica que el recubrimiento comestible y la inoculación de *L. lactis* en masa madre evitan la proliferación del moho en el pan y tienen propiedades antimicrobianas por si solas y en combinación.

La aparición de moho en pan tradicional de panadería se da en el quinto día postelaboración (Seiler, 1976), sin embargo, en el pan de masa madre control elaborado en la presente investigación se dio en el noveno día, por lo que la masa madre sin inóculo ni recubrimiento, puede aumentar la vida de anaquel microbiana 3 días más.

La aparición de moho en el pan control pudo deberse a que en los otros tratamientos se aplicó la inoculación de *L. lactis* productora de nisina en el inicio de la fermentación de la masa, mientras que al pan horneado se le aplicó el recubrimiento con AECM, por lo que no hubo contaminación de algún moho antes o después del horneado del pan y en caso de haber existido este fue eficazmente inhibido por la biconservación aplicada.

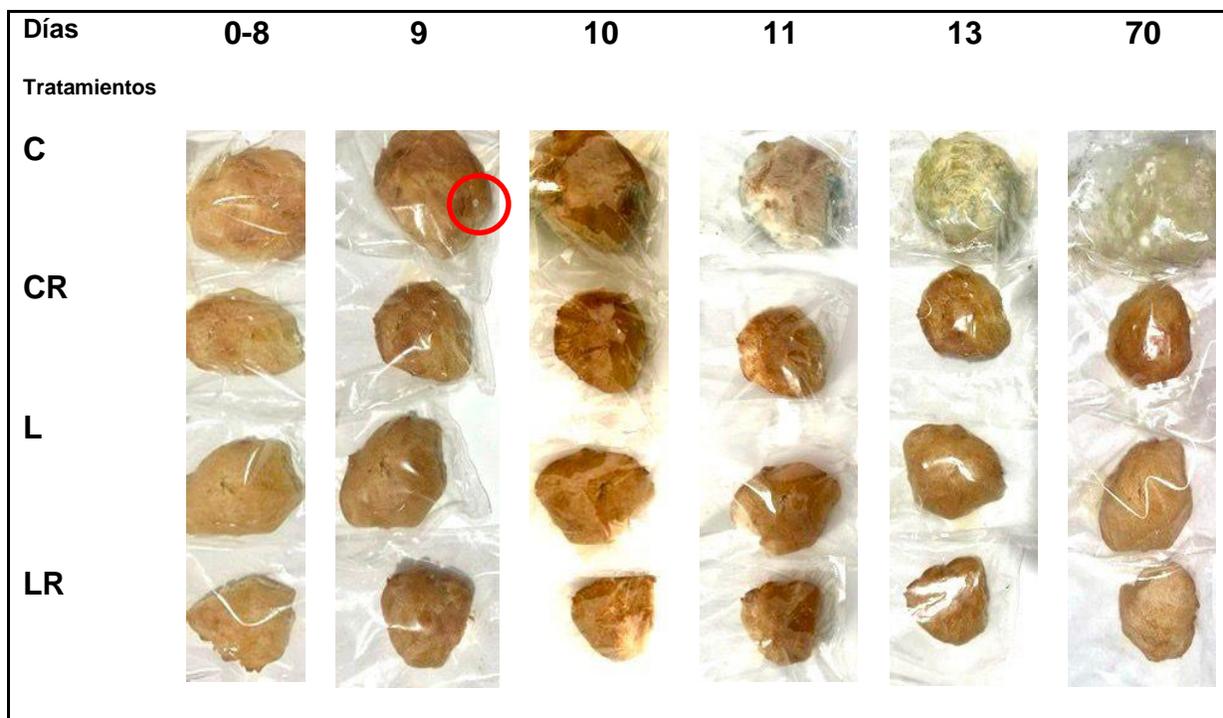


Figura 18. Desarrollo visible de hongos filamentosos los tratamientos de pan de masa madre a los 70 días de almacenamiento, control (C), control con recubrimiento (CR), con masa madre de *L. lactis* (L) y con masa madre de *L. lactis* y recubrimiento (LR). El círculo rojo indica el inicio de la proliferación microbiana.

Si bien no existió crecimiento microbiano en los panes de masa madre elaborados con *L. lactis* y/o la aplicación del recubrimiento, si existió deterioro fisicoquímico, en el perfil de textura, siendo el límite de aceptación el día 7 poselaboración en los tratamientos C, CR y L y el día 10.5 en el tratamiento LR basado en lo reportado por Suárez-Pilicita (2024). También existió deterioro fisicoquímico en la cantidad de humedad en los panes, obteniendo un aumento de

humedad antes del día 3.5 poselaboración en los panes C y CR, y de 7 días en el tratamiento L, teniendo una humedad constante en el tratamiento LR.

Existió proliferación microbiana en el tratamiento C al día 9 poselaboración por lo que su vida útil (previo a algún cambio indeseable por parte de los consumidores) para los panes de masa madre C y CR, tiene como límite el día 3.5 poselaboración.

Por su parte el tratamiento L (presencia de *L. lactis* y ausencia de recubrimiento) tiene una vida útil de 7 días pues es el límite antes de tener un cambio fisicoquímico o microbiano, que a pesar de no existir el último, si hubo cambio en el perfil de textura y humedad teniendo como día límite antes de cambiar significativamente estos factores el día 7.

Finalmente, el tratamiento LR (presencia de *L. lactis* y de recubrimiento) tiene al menos una duración en la vida útil de más de 10.5 días, pues hasta ese tiempo no hubo cambio significativo, en el perfil de textura (algún cambio indeseable para el consumidor), además de mantenerse constante el perfil de humedad, color, volumen y microbiano.

La aplicación de la tecnología de las barreras múltiples, inicialmente la inoculación de *Lactococcus lactis* NRRL B-50307 en la masa madre (inicio de la producción de pan de masa madre) y posteriormente la aplicación del recubrimiento con actividad antifúngica en el pan obtenido, permite extender la vida de anaquel del pan de masa madre más de 7 días.

## 7. CONCLUSIONES

- El almidón modificado octenil succínico es buen material de pared en la microencapsulación del aceite esencial de canela en el proceso de secado por aspersión
- La obtención de proteína de quinoa es más eficaz y con mayor porcentaje de proteína si se realiza un desgrasado con etanol posterior a la precipitación isoeléctrica de la proteína.
- La adición de aceite esencial de canela microencapsulado confiere actividad antifúngica a la película comestible resultante contra *Aspergillus niger* GS1, además, refuerza las propiedades mecánicas.
- La cepa *L. lactis* NRRL B-50307 se adaptó a la masa madre elaborada con harina de trigo y amaranto (9:1 p/p) además de acortar los tiempos de fermentación, estabilizar el pH y producir nisina A.
- Las levaduras propias de la harina de trigo y amaranto pueden ser inhibidas por la nisina A producida por *L. lactis* NRRL B-50307, sin embargo, la levadura *S. cerevisiae* puede crecer aún en frío si es añadida posterior al proceso de fermentación de la masa madre.
- El pan elaborado con masa madre inoculada con *L. lactis* y recubierto por una solución filmogénica de proteína de quinoa y quitosano reforzado con aceite esencial de canela microencapsulado tiene mejor aceptación sensorial, mejor calidad fisicoquímica, y mayor vida de anaquel que el pan de masa madre tradicional. Adicionalmente favorece la inocuidad del producto por la actividad de *L. lactis* y la presencia del recubrimiento activo.
- Esta investigación puede enriquecerse con el análisis de los compuestos de sabor producidos, la posible presencia de compuestos bioactivos, así como la identificación de las poblaciones bacterianas y de levaduras que mayoritariamente están presentes en la masa madre fermentada.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Aboul-Anean, H. E. D. (2018). Using quinoa protein and starch nano particles to produce edible films. *J Nut Health Food Eng*, 8, 297-308. DOI: 10.15406/jnhfe.2018.08.00286
- Abugoch, L. E., Romero, N., Tapia, C. A., Silva, J., & 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. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf703689u>
- Abugoch, L. E., Tapia, C., Villamán, M. C., Yazdani-Pedram, M., & Díaz-Dosque, M. (2011). Characterization of quinoa protein–chitosan blend edible films. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 879-886. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.08.008>
- Alarcón-Moyano, J. K., Bustos, R. O., Herrera, M. L., & Matiacevich, S. B. (2017). Alginate edible films containing microencapsulated lemongrass oil or citral: Effect of encapsulating agent and storage time on physical and antimicrobial properties. *Journal of food science and technology*, 54, 2878-2889. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2726-1>
- Albagli, G., do Monte Schwartz, I., Amaral, P. F., Ferreira, T. F., & Finotelli, P. V. (2021). How dried sourdough starter can enable and spread the use of sourdough bread. *LWT- Food Science and Technology*, 149, 111888. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111888>
- Alcantara-Gonzalez, L. (2004) MANUAL DE PRACTICAS DE ANÁLISIS DE ALIMENTOS. Instituto de Ciencias Agrícolas. Universidad de Guanajuato.
- Alegria, Á., Delgado, S., Rocas, C., López, B., & Mayo, B. (2010). Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. *International journal of food microbiology*, 143(1-2), 61-66. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.029>
- Altamirano-Fortoul, R., Moreno-Terrazas, R., Quezada-Gallo, A., & Rosell, C. M. (2012). Viability of some probiotic coatings in bread and its effect on the crust mechanical properties. *Food Hydrocolloids*, 29(1), 166-174. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.02.015>
- AOAC (2023) Official Methods of Analysis 22n ed. DOI: <https://doi.org/10.1093/9780197610145.002.001>
- Aplevicz, K. S., Ogliari, P. J., & Sant'Anna, E. S. (2013). Influence of fermentation time on characteristics of sourdough bread. *Brazilian journal of pharmaceutical sciences*, 49, 233-239. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-82502013000200005>
- Arendt, E. K., Ryan, L. A., & Dal Bello, F. (2007). Impact of sourdough on the texture of bread. *Food microbiology*, 24(2), 165-174. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.011>
- Arneja, I., Tanwar, B., & Chauhan, A. (2015). Nutritional composition and health benefits of golden grain of 21 st Century, Quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.): A

- review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 14(12), 1034. DOI: <https://doi.org/10.3923/pjn.2015.1034.1040>
- Arora, K., Ameer, H., Polo, A., Di Cagno, R., Rizzello, C. G., & Gobbetti, M. (2021). Thirty years of knowledge on sourdough fermentation: A systematic review. *Trends in Food Science & Technology*, 108, 71-83. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.008>
- Arteaga-Garibay, R. I., Delgado-Macuil, R. J., Gómez-Godínez, L. J., Cruz-Cárdenas, C. I., Villagrán, Z., Giono-Cerezo, S., ... & Ruvalcaba-Gómez, J. M. (2023). Identification, Viability, and Membrane Potential during the Cryopreservation of Autochthonous Lactic-Acid Bacteria Isolated from Artisanal Adobera Cheese from Los Altos de Jalisco. *Microbiology Research*, 14(4), 1820-1833. DOI: <https://doi.org/10.3390/microbiolres14040124>
- Axel, C., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2017). Mold spoilage of bread and its biopreservation: A review of current strategies for bread shelf life extension. *Critical Reviews in food science and nutrition*, 57(16), 3528-3542. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.007>
- Bacteriological Analytical Manual, BAM (2024) Food and Drug Administration. Consultado en 2024: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam>
- Bae, E. K., & Lee, S. J. (2008). Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. *Journal of microencapsulation*, 25(8), 549-560. DOI: <https://doi.org/10.1080/02652040802075682>
- Baranauskienė, R., Bylaitė, E., Žukauskaitė, J., & Venskutonis, R. P. (2007). Flavor retention of peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil spray-dried in modified starches during encapsulation and storage. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(8), 3027-3036. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf062508c>
- Basaglia, R. R., Pizato, S., Santiago, N. G., de Almeida, M. M. M., Pinedo, R. A., & Cortez-Vega, W. R. (2021). Effect of edible chitosan and cinnamon essential oil coatings on the shelf life of minimally processed pineapple (Smooth cayenne). *Food Bioscience*, 41, 100966. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100966>
- Batista-González, A., Muñoz-González, R., Yasky, S., & Contreras, R. A. (2022). Evaluación teórica de la exposición dietaria a la bacteriocina nisina como conservante natural para aderezos de tipo mayonesa vegetal en Chile. *Revista chilena de nutrición*, 49(4), 494-501. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182022000500494>.
- Bautista-Espinoza, P. (2022). Uso de bioconservación y recubrimientos comestibles con aceites esenciales en la elaboración de pan artesanal. Tesis de maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Química, UAQ.
- Bautista-Espinoza, P. I., Di Pierro, P., Amaya-Llano, S. L., García-Almendarez, B. E., Mares-Mares, E., Escamilla-García, M., ... & Regalado-González, C. (2023). Impact

- of edible coatings reinforced with mesoporous silica nanoparticles added with cinnamon and lemongrass essential oils applied on sourdough bread. *Food Bioscience*, 55, 102992. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102992>
- Bautista-Espinoza, P. I., Reynoso-Camacho, R., Mares-Mares, E., Granados-Arvizu, J. A., García-Almendárez, B. E., & Regalado-González, C. (2024). Revalorization of agave bagasse in the obtention of type II sourdough inoculated with *Lactococcus lactis* NRRL B-50307. *Food Bioscience*, 58, 103803. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.103803>
- Belhachat, D., Mekimene, L., Belhachat, M., Ferradji, A., & Aid, F. (2018). Application of response surface methodology to optimize the extraction of essential oil from ripe berries of *Pistacia lentiscus* using ultrasonic pretreatment. *Journal of applied research on medicinal and aromatic plants*, 9, 132-140. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.04.003>
- Bergesse, A. E., Boiocchi, P. N., Calandri, E. L., Cervilla, N. S., Gianna, V., Guzmán, C. A., ... & Mufari, J. R. (2015). Aprovechamiento integral del grano de Quinoa. Aspectos tecnológicos, fisicoquímicos, nutricionales y sensoriales. ISBN:978-987-33-8871-2
- Bernard, T., Perineau, F., Delmas, M., & Gaset, A. (1989). Extraction of essential oils by refining of plant materials. II. Processing of products in the dry state: *Illicium verum* Hooker (fruit) and *Cinnamomum zeylanicum* Nees (bark). *Flavour and fragrance journal*, 4(2), 85-90. DOI: <https://doi.org/10.1002/ffj.2730040211>
- Bhanwar, S., Bamnia, M., Ghosh, M., & Ganguli, A. (2013). Use of *Lactococcus lactis* to enrich sourdough bread with  $\gamma$ -aminobutyric acid. *International journal of food sciences and nutrition*, 64(1), 77-81. DOI: <https://doi.org/10.3109/09637486.2012.700919>
- BOE, (2019). Real Decreto 308/2019, de 26 de abril, por el que se aprueba la norma de calidad para el pan. Boletín oficial del estado. Ministerio de la presidencia, relaciones con las cortes e igualdad. Num. 113. Sección 1 pp. 50169-50174
- Bourtoom, T. (2008) Edible films and coatings: characteristics and properties *International Food Journal* 15 237-48
- Brandt, M. J. (2007). Sourdough products for convenient use in baking. *Food Microbiology*, 24(2), 161-164. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.010>
- British standard Institution (1974) Methods for the estimation on differentiation of nisin in procesed cheese. BSI 4020 pp 5
- Cainapa (2020) Cámara Nacional de la Industria Panificadora y Similares de México. Panaderos de México. Recuperado de: <https://canainpa.org.mx/home/noticias>
- Caiza, C. (2024). AVANCES Y PERSPECTIVAS EN LA TECNOLOGÍA DE RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES DE ALIMENTOS: UNA REVISIÓN DE SU APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA. *RECIENA*, 4(1), 15-26. DOI: <https://doi.org/10.47187/tvbyk29>

- Canesin, M. R., & Cazarin, C. B. B. (2021). Nutritional quality and nutrient bioaccessibility in sourdough bread. *Current Opinion in Food Science*, 40, 81-86. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.007>
- Castañeta, H., Gemio, R., Yapu, W., & Nogales, J. (2011). Microencapsulación, un método para la conservación de propiedades fisicoquímicas y biológicas de sustancias químicas. *Revista Boliviana de Química*, 28(2), 135-140. ISSN: 0250-5460
- Catzeddu, P. (2019). Sourdough breads. In flour and breads and their fortification in health and disease prevention (pp. 177-188). *Academic press*. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814639-2.00014-9>
- Cavanagh, D., Fitzgerald, G. F., & McAuliffe, O. (2015). From field to fermentation: the origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. *Food microbiology*, 47, 45-61. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.001>
- Cevallos PAP, Buera MP, Elizalde BE (2010) Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in  $\beta$ -cyclodextrin: effect of interactions with water on complex stability. *J Food Eng* 99(1):70–75. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.039>
- Chu, Y., Xu, T., Gao, C., Liu, X., Zhang, N. I., Feng, X., ... & Tang, X. (2019). Evaluations of physicochemical and biological properties of pullulan-based films incorporated with cinnamon essential oil and Tween 80. *International journal of biological macromolecules*, 122, 388-394. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.194>
- Coronado, ACM, Herrera, MAC y Coronado, YM (2017). Caracterización de la diversidad genética de una colección de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 15 (2), 49-56. DOI: [http://dx.doi.org/10.18684/BSAA\(15\)49-56](http://dx.doi.org/10.18684/BSAA(15)49-56)
- Corsetti, A., & Settanni, L. (2007). Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Research International*, 40(5), 539–558. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.11.001>
- Cruz-Díaz, K., Cobos, Á., Fernández-Valle, M. E., Díaz, O., & Cambero, M. I. (2019). Characterization of edible films from whey proteins treated with heat, ultrasounds and/or transglutaminase. Application in cheese slices packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 22, 100397. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100397>
- Curbelo Hernández, C., Palacio Dubois, Y., & Fanego Hernández, S. (2021). Desacetilación de quitina obtenida por vía química de exoesqueletos de camarón *litopenaeus vannamei*. *Centro Azúcar*, 48(3), 53-61. ISSN: 2223-4861
- Danila, A., Muresan, E. I., Ibanescu, S. A., Popescu, A., Danu, M., Zaharia, C., ... & Staras, A. I. (2021). Preparation, characterization, and application of polysaccharide-based emulsions incorporated with lavender essential oil for skin-friendly cellulosic

- support. *International Journal of Biological Macromolecules*, 191, 405-413. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.090>
- de Barros Fernandes, R. V., Borges, S. V., & Botrel, D. A. (2014). Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydrate polymers*, 101, 524-532. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.083>
- de Medeiros, J. A. S., Blick, A. P., Galindo, M. V., Alvim, I. D., Yamashita, F., Ueno, C. T., ... & Sakanaka, L. S. (2019). Incorporation of oregano essential oil microcapsules in starch-poly (butylene adipate co-terephthalate)(PBAT) films. In *Macromolecular Symposia* (Vol. 383, No. 1, p. 1800052). DOI: <https://doi.org/10.1002/masy.201800052>
- de Vuyst, L., Harth, H., Van Kerrebroeck, S., & Leroy, F. (2016). Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities. *International Journal of Food Microbiology*, 239, 26-34. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.018>
- de Vuyst, L., & Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: Biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1–3), 43–56. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.012>
- Deshavath, N. N., Mukherjee, G., Goud, V. V., Veeranki, V. D., & Sastri, C. V. (2020). Pitfalls in the 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay for the reducing sugars: Interference of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. *International journal of biological macromolecules*, 156, 180-185. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.045>
- Di Pierro, P., Chico, B., Villalonga, R., Mariniello, L., Damiao, A. E., Masi, P., & Porta, R. (2006). Chitosan– whey protein edible films produced in the absence or presence of transglutaminase: Analysis of their mechanical and barrier properties. *Biomacromolecules*, 7(3), 744-749. DOI:10.1021/bm050661u
- Diaz, R., & Martin, J. (2011). University of Helsinki, Department of Food and Environmental Sciences. *EKT Series*, 1522, 1-86.
- Dong, Z., Xu, F., Ahmed, I., Li, Z., & Lin, H. (2018). Characterization and preservation performance of active polyethylene films containing rosemary and cinnamon essential oils for Pacific white shrimp packaging. *Food Control*, 92, 37–46. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.052>
- Doyle, A. A., & Stephens, J. C. (2019). A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents. *Fitoterapia*, 139, 104405. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104405>
- Elgayyar, M., Draughon, F. A., Golden, D. A., & Mount, J. R. (2001). Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of food protection*, 64(7), 1019-1024. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.7.1019>

- Elsanhoty, R. M., Ghonamy, A. G., El-Adly, N. A., & Fawzy Ramadan, M. (2017). Impact of lactic acid bacteria and bifidobacterium on the survival of bacillus subtilus during fermentation of wheat sourdough. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(4), e13086. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpp.13086>
- Embuscado, M. E., & Huber, K. C. (2009). *Edible films and coatings for food applications* (Vol. 9). New York, NY, USA:Springer.
- Escamilla-García, M., Rodríguez-Hernández, M. J., Hernández-Hernández, H. M., Delgado-Sánchez, L. F., García-Almendárez, B. E., Amaro-Reyes, A., & Regalado-González, C. (2018). Effect of an edible coating based on chitosan and oxidized starch on shelf life of Carica papaya L., and its physicochemical and antimicrobial properties. *Coatings*, 8(9), 318. DOI: <https://doi.org/10.3390/coatings8090318>
- Escamilla-García, M., Delgado-Sánchez, L. F., Ríos-Romo, R. A., García-Almendárez, B. E., Calderón-Domínguez, G., Méndez-Méndez, J. V., ... & Regalado-González, C. (2019). Effect of transglutaminase cross-linking in protein isolates from a mixture of two quinoa varieties with chitosan on the physicochemical properties of edible films. *Coatings*, 9(11), 736. DOI: <https://doi.org/10.3390/coatings9110736>
- Falciano, A., Romano, A., García-Almendárez, B.E., Regalado-González, C., Di Pierro, P., Massi, P. 2022. Effect of the refreshment on the liquid sourdough preparation. *Italian Journal of Food Science*. 34(3), 99-104. DOI: <https://doi.org/10.15586/ijfs.v34i3.221>
- FDA, (2023a). Microorganisms & Microbial-Derived Ingredients Used in Food (Partial List). U.S. Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/microorganisms-microbial-derived-ingredients-used-food-partial-list>
- FDA, (2023b). Food Additive Status List. U.S. Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/food-additive-status-list>
- Fernández-Pan, I. & Maté-Caballero, J. I. (2011). Biopolymers for edible films and coatings in food applications. *Biopolymers–New materials for sustainable films and coatings*, 233-254. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119994312.ch11>
- Gänzle, M. G. (2014). Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. *Food microbiology*, 37, 2-10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.007>
- García, M. A., Pinotti, A., Martino, M. N., & Zaritzky, N. E. (2004). Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydrate polymers*, 56(3), 339-345. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.03.003>
- García-Almendárez, B. E., Cann, I. K., Martin, S. E., Guerrero-Legarreta, I., & Regalado, C. (2008). Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control*, 19(7), 670-680. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.07.015>

- García-Camarillo, E. A., Quezada-Viay, M. Y., Moreno-Lara, J., Sánchez-Hernández, G., Moreno-Martínez, E., & Pérez-Reyes, M. C. J. (2006). Actividad antifúngica de aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y orégano (*Origanum vulgare* L.) y su efecto sobre la producción de aflatoxinas en nuez pecanera [*Carya illinoensis* (FA Wangenh) K. Koch]. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(1), 8-12. ISSN: 0185-3309
- García-Parra, m. d., Campelo, a. b., García-Almendárez, b. e., Regalado-gonzález, c., Rodríguez, a., & Martínez, b. (2010). Enhancement of nisin production in milk by conjugal transfer of the protease-lactose plasmid pLP712 to the wild strain *Lactococcus lactis* UQ2. *International journal of dairy technology*, 63(4), 523-529. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00618.x>
- Giosafatto, C. V. L., Di Pierro, P., Gunning, P., Mackie, A., Porta, R., & Mariniello, L. (2014). Characterization of citrus pectin edible films containing transglutaminase-modified phaseolin. *Carbohydrate Polymers*, 106, 200-208. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.015>
- Gobierno de México (2016) Amaranto, el mejor alimento de origen vegetal, Gobierno de México, recuperado de: <https://www.gob.mx/siap/articulos/amaranto-el-mejor-alimento-de-origen-vegetal>
- Gonçalves, N., Vioque, J., Clemente, A., Sánchez Vioque, R., Bautista-Gallego, J., & Millán, F. (1997). Obtención y caracterización de aislados proteicos de colza. *Grasas y aceites*, 48(5), 282-289. DOI: <http://dx.doi.org/10.3989/gya.1997.v48.i5.804>
- González-Toledo, S. Y., Domínguez, J., GarcíaAlmendárez, B. E., Prado, L. A., Regalado, C. (2010). Optimization of nisin production by *Lactococcus lactis* UQ2 using supplemented whey as alternative culture medium. *Journal of Food Science*. Vol. 75: M347-M353. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01670.x>
- Grand View Research (2024). Tamaño del mercado de masa madre y análisis de participación tendencias de crecimiento y pronósticos (2024-2029) Recuperado de: <https://www.mordorintelligence.com/es/industry-reports/sourdough-market>
- Gunduz, C. P. B., Agirman, B., Gaglio, R., Franciosi, E., Francesca, N., Settanni, L., & Erten, H. (2022). Evaluation of the variations in chemical and microbiological properties of the sourdoughs produced with selected lactic acid bacteria strains during fermentation. *Food Chemistry*. X, 14, 100357. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100357>
- Hernández, E. (2005). Evaluación sensorial. Bogotá, DC. Centro Nacional de Medios para el Aprendizaje.
- Hernández-Hernández, E., Regalado-González, C., Vázquez-Landaverde, P., Guerrero-Legarreta, I., & García-Almendárez, B. E. (2014). Microencapsulation, chemical characterization, and antimicrobial activity of Mexican (*Lippia graveolens*

- HBK) and European (*Origanum vulgare* L.) oregano essential oils. *The Scientific World Journal*, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/641814>
- Hough, G. (2010) *Sensory Shelf Life Estimation of Food Products*. Crc Press. United States of America. Taylor and Francis Group, LLC. ISBN: 978-1-4200-9291-2
- Hough, G., & Garitta, L. (2012). Methodology for sensory shelf-life estimation: A review. *Journal of Sensory Studies*, 27(3), 137-147. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.2012.00383.x>
- How, Y. H., Teo, M. Y. M., In, L. L. A., Yeo, S. K., & Pui, L. P. (2022). Development of fermented milk using food-grade recombinant *Lactococcus lactis* NZ3900. *NFS Journal*, 28, 1-14. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2022.07.001>
- Huys, G., Daniel, H. M., & De Vuyst, L. (2012). Taxonomy and biodiversity of sourdough yeasts and lactic acid bacteria. In *Handbook on sourdough biotechnology* (pp. 105-154). New York, NY: Springer US. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5425-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5425-0_5)
- ImageJ (2023) Image J, version 1.54f, dominio público [software] recuperado de: <https://imagej.net/ij/>
- Informes de expertos (2023) *Perspectiva del Mercado de Productos de Panadería*. Informes de Expertos. Recuperado de: <https://www.informesdeexpertos.com/informes/mercado-de-productos-de-panaderia>
- Ingredion (2021) HI-CAP® 100 – 32336104, © 2024 Ingredion. All Rights Reserved. Westchester, IL. Recuperado de: <https://www.ingredion.com/na/en-us/ingredient/hicap-100-32336104.html>
- Jan, N., Hussain, S. Z., Naseer, B., & Bhat, T. A. (2023). Amaranth and quinoa as potential nutraceuticals: a review of anti-nutritional factors, health benefits and their applications in food, medicinal and cosmetic sectors. *Food Chemistry: X*, 100687. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100687>
- Jekle, M., Houben, A., Mitzscherling, M., & Becker, T. (2010). Effects of selected lactic acid bacteria on the characteristics of amaranth sourdough. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(13), 2326-2332. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.4091>
- Jooyandeh, H. (2011). Whey protein films and coatings: a review. *Pakistan Journal of Nutrition* 10(3):296-301. DOI: 10.3923/pjn.2011.296.301
- Karimi, N., Zeynali, F., Rezazad Bari, M., Nikoo, M., Mohtarami, F., & Kadivar, M. (2021). Amaranth selective hydrolyzed protein influence on sourdough fermentation and wheat bread quality. *Food Science & Nutrition*, 9(12), 6683-6691. DOI: <https://doi.org/10.1002/fsn3.2618>
- Kingamkono, R., Sjögren, E., Svanberg, U., & Kaijser, B. (1994). pH and acidity in lactic-fermenting cereal gruels: effects on viability of enteropathogenic microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10, 664-669. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00327955>

- Kocira, A., Kozłowicz, K., Panasiewicz, K., Staniak, M., Szpunar-Krok, E., & Horthyńska, P. (2021). Polysaccharides as edible films and coatings: Characteristics and influence on fruit and vegetable quality—A review. *Agronomy*, 11(5), 813. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy11050813>
- Korcari, D., Secchiero, R., Laureati, M., Marti, A., Cardone, G., Rabitti, N. S., ... & Fortina, M. G. (2021). Technological properties, shelf life and consumer preference of spelt-based sourdough bread using novel, selected starter cultures. *LWT*, 151, 112097. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112097>
- L'hocine, L., Boye, J. I., & Arcand, Y. (2006). Composition and functional properties of soy protein isolates prepared using alternative defatting and extraction procedures. *Journal of food science*, 71(3), C137-C145. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb15609.x>
- Landis, E. A., Oliverio, A. M., McKenney, E. A., Nichols, L. M., Kfoury, N., Biango-Daniels, M., ... & Wolfe, B. E. (2021). The diversity and function of sourdough starter microbiomes. *Elife*, 10, e61644. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.61644>
- Laohakunjit, N., & Noomhorm, A. (2004). Effect of plasticizers on mechanical and barrier properties of rice starch film. *Starch-Stärke*, 56(8), 348-356. DOI: <https://doi.org/10.1002/star.200300249>
- Ley de Aditivos en México, (2012). Acuerdo por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias. Secretaría de Salud. Diario Oficial de la Federación Fecha de consulta 20 de abril de 2023: [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5437267&fecha=16/05/2016#gsc.tab=0](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5437267&fecha=16/05/2016#gsc.tab=0)
- Li, W., Ren, M., Duo, L., Li, J., Wang, S., Sun, Y., ... & Sun, T. (2020). Fermentation characteristics of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from naturally fermented dairy products and screening of potential starter isolates. *Frontiers in microbiology*. 11, 1794. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01794>
- Lima, E. O., Gompertz, O. F., Giesbrecht, A. M., & Paulo, M. Q. (1993). In vitro antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes: Antimycetische Aktivität ätherischer Öle von Heilpflanzen in vitro gegen Dermatophyten. *Mycoses*, 36(9-10), 333-336. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1993.tb00777.x>
- Loeza-Concha, H., Gutiérrez-Leyva, R., Dzib-Cauich, D., Martínez-González, S., López-Rosas, I., & Escalera-Valente, F. (2022). Uso del aceite esencial de canela en los sistemas de producción pecuaria. *Abanico Agroforestal*, 4, 1-34. DOI: <http://dx.doi.org/10.37114/abaagrof/2022.3>
- López, J. E., Ochoa, A., Santoyo, G., Anaya, J. L., Medina, E., Martpinez, M., & Loeza, P. D. (2008). Bacteriocins of gram positive bacteria: a potential source of new biomedical treatments. *Rev Mex Cien Farm*, 39, 49-57.

- Lupo P. B., González A.C. y Maestro G. A. 2012. Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 3 (1): 130-151. ISSN: 2218-4384
- Ma, S., Wang, Z., Guo, X., Wang, F., Huang, J., Sun, B., & Wang, X. (2021). Sourdough improves the quality of whole-wheat flour products: Mechanisms and challenges—A review. *Food Chemistry*, 360, 130038. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130038>
- Mahdi, A. A., Al-Maqtari, Q. A., Mohammed, J. K., Al-Ansi, W., Cui, H., & Lin, L. (2021). Enhancement of antioxidant activity, antifungal activity, and oxidation stability of Citrus reticulata essential oil nanocapsules by clove and cinnamon essential oils. *Food Bioscience*, 43, 101226. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101226>
- Mahmoodnia, L., Aghadavod, E., & Rafieian-Kopaei, M. (2017). Ameliorative impact of cinnamon against high blood pressure; an updated review. *Journal of Renal Injury Prevention*, 6(3), 171-176. DOI: <https://10.15171/jrip.2017.3>
- Man, A., Santacroce, L., Iacob, R., Mare, A., & Man, L. (2019). Antimicrobial activity of six essential oils against a group of human pathogens: A comparative study. *Pathogens*, 8(1), 15. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens8010015>
- Manual, O. (2018) Operation Manual (Original), Mini Spray Dryer B-290
- Mariotti, M., Garofalo, C., Aquilanti, L., Osimani, A., Fongaro, L., Tavoletti, S., ... & Clementi, F. (2014). Barley flour exploitation in sourdough bread-making: A technological, nutritional and sensory evaluation. *LWT-Food Science and Technology*, 59(2), 973-980. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.052>
- Marqués, C. B., Albiñana, M. L., & Lacueva, C. P. (2007). La masa madre: el secreto del pan. *Alimentaria*, 380, 51.
- Martău, G. A., Mihai, M., & Vodnar, D. C. (2019). The use of chitosan, alginate, and pectin in the biomedical and food sector—biocompatibility, bioadhesiveness, and biodegradability. *Polymers*, 11(11), 1837. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym11111837>
- Miles, A. A., Misra, S. S., & Irwin, J. O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Epidemiology & Infection*, 38(6), 732-749. DOI: 10.1017/S002217240001158X
- Millinia, B. L., Mashithah, D., Nawatila, R., & Kartini, K. (2024). Microencapsulation of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) anthocyanins: Effects of maltodextrin and trehalose matrix on selected physicochemical properties and antioxidant activities of spray-dried powder. *Future Foods*, 9, 100300. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2024.100300>
- Minitab (2022) Minitab Inc. (Versión 21.3), [Software] recuperado de: <https://www.minitab.com/es-mx/>
- Mir, N. A., Riar, C. S., & Singh, S. (2023). Effect of film forming solution pH on antibacterial, antioxidant and structural characteristics of edible films from modified

- quinoa protein. *Food Hydrocolloids*, 135, 108190. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108190>
- Montero-Recalde, M., Revelo, J., Avilés-Esquivel, D., Valle, E., & Guevara-Freire, D. (2017). Efecto antimicrobiano del aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) sobre cepas de *Salmonella*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(4), 987-993. DOI: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v28i4.13890>
- Morsy, N. F. (2015). A short extraction time of high quality hydrodistilled cardamom (*Elettaria cardamomum* L. Maton) essential oil using ultrasound as a pretreatment. *Industrial Crops and Products*, 65, 287-292. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.12.012>
- Müller, H., Barthel, L., Schmieder, S., Schütze, T., Meyer, V., & Briesen, H. (2022). From spores to fungal pellets: A new high-throughput image analysis highlights the structural development of *Aspergillus niger*. *Biotechnology and bioengineering*, 119(8), 2182-2195. DOI: <https://doi.org/10.1002/bit.28124>
- Müller-Auffermann, K., Grijalva, F., Jacob, F., & Hutzler, M. (2015). Nisin and its usage in breweries: a review and discussion. *Journal of the Institute of Brewing*, 121(3), 309-319. DOI: <https://doi.org/10.1002/jib.233>
- Naidu, A. S. (Ed.). (2000). *Natural food antimicrobial systems*. CRC press.
- Nie, A., Qi, X., Hong, T., Jin, Y., Fan, H., Xu, X., & Xu, D. (2023). Extending shelf life of fresh noodles with nisin producer *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* fermented sourdough and characteristic changes during storage. *Food Control*, 151, 109818. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109818>
- NOM-092-SSA1-1994. NORMA Oficial Mexicana, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Recuperado de: [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4886029&fecha=12/12/1995#gsc.tab=0](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4886029&fecha=12/12/1995#gsc.tab=0)
- NOM-111-SSA1-1994. NORMA Oficial Mexicana, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Recuperado de: [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4881226&fecha=13/09/1995#gsc.tab=0](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4881226&fecha=13/09/1995#gsc.tab=0)
- NOM-147-SSA1-1996. PROYECTO de Norma Oficial Mexicana, Bienes y servicios. Cereales y sus productos. Harinas de cereales, alimentos a base de cereales, de semillas comestibles, harinas o sus mezclas y productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Recuperado de: [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4891221&fecha=15/08/1997#gsc.tab=0](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4891221&fecha=15/08/1997#gsc.tab=0)
- NOM-247-SSA1-2008. NORMA Oficial Mexicana. Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y

nutrimentales. Métodos de prueba. recuperado de:  
[https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5100356&fecha=27/07/2009#gsc.tab=0](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5100356&fecha=27/07/2009#gsc.tab=0)

- Ochoa, T. A., Almendárez, B. E. G., Reyes, A. A., Pastrana, D. M. R., López, G. F. G., Belloso, O. M., & González, C. R. (2017). Design and characterization of corn starch edible films including beeswax and natural antimicrobials. *Food and bioprocess technology*, 10, 103-114. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1800-4>
- Olicón-Hernández, D. R., Acosta-Sánchez, Á., Monterrubio-López, R., & Guerra-Sánchez, G. (2019). Chitosan and Opuntia ficus-indica mucilage as the base of a polymeric edible film for the protection of tomatoes against Rhizopus stolonifer. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 22(1), 1-9.
- Parra-Huertas, R. A. (2010). Bacterias ácido-lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 8(1), 93-105. SSN 1692-3561 DOI: 10.22201/fesz.23958723e.2019.0.194
- Patiño-Galvan, H. (2014). *Microencapsulación de nisina a partir de Lactococcus lactis UQ2 y su incorporación en queso tipo panela* (Maestría). Universidad Autónoma de Querétaro.
- Porras, G., Esquivel, M., Ballesteros, M. R. S., Madrigal, S., & Calvo, M. (2009). Quitosano n-acilado con cinamaldehído: Un potencial bioplaguicida contra agentes patógenos en el campo agrícola. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 10(3), 170-176. ISSN-e 0121-6651
- Qu, S., Yang, K., Chen, L., Liu, M., Geng, Q., He, X., ... & Tian, J. (2019). Cinnamaldehyde, a promising natural preservative against Aspergillus flavus. *Frontiers in microbiology*, 10, 2895. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02895>
- Quelal, M., Nazate, K., Villacrés, E., & Cuarán, J. (2019). Obtención y caracterización de un hidrolizado proteico de quinua Chenopodium quinoa Willd. *Enfoque UTE*, 10(2), 79-89. DOI: <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v10n2.424>
- Ragae, S., & Abdel-Aal, E. S. M. (2006). Pasting properties of starch and protein in selected cereals and quality of their food products. *Food Chemistry*, 95(1), 9-18. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.012>
- Repo-Carrasco-Valencia, R. A. M., & Serna, L. A. (2011). Quinoa (Chenopodium quinoa, Willd.) as a source of dietary fiber and other functional components. *Food Science and Technology*, 31, 225-230. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000100035>
- Ribet, L., Dessalles, R., Lesens, C., Brusselaers, N., & Durand-Dubief, M. (2022). Nutritional benefits of sourdoughs: A systematic review. *Advances in Nutrition*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.advnut.2022.10.003>
- Ríos-de-Benito, L. F., Escamilla-García, M., García-Almendárez, B., Amaro-Reyes, A., Di Pierro, P., & Regalado-González, C. (2021). Design of an active edible coating based on sodium caseinate, chitosan and oregano essential oil reinforced with silica

- particles and its application on panela cheese. *Coatings*, 11(10), 1212. DOI: <https://doi.org/10.3390/coatings11101212>
- Romero-Hernandez, H. A., Sánchez-Rivera, M. M., Alvarez-Ramirez, J., Yee-Madeira, H., Yañez-Fernandez, J., & Bello-Pérez, L. A. (2021). Avocado oil encapsulation with OSA-esterified taro starch as wall material: Physicochemical and morphology characteristics. *LWT*, 138, 110629. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110629>
- Rux, G., Labude, C., Herppich, W. B., & Geyer, M. (2023). Investigation on the potential of applying bio-based edible coatings for horticultural products exemplified with cucumbers. *Current Research in Food Science*, 6, 100407. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.100407>
- Sáez, L. (2015). En “Pérdidas y Desperdicios de Alimentos en América Latina y El Caribe”, FAO. Boletín, 2.
- Sakandar, H. A., Hussain, R., Kubow, S., Sadiq, F. A., Huang, W., & Imran, M. (2019). Sourdough bread: A contemporary cereal fermented product. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(3), e13883. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpp.13883>
- Saltos Urgiles, I. M. (2021). Efecto antimicrobiano del aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) en productos cárnicos. Tesis de Ingeniería. Escuela superior politécnica de chimborazo. Riobamba 202 Ecuador
- Sanz-Penella, J. M., Wronkowska, M., Soral-Smietana, M., & Haros, M. (2013). Effect of whole amaranth flour on bread properties and nutritive value. *LWT-Food science and technology*, 50(2), 679-685. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.031>
- Seiler DAL, (1976) The stability of intermediate moisture foods with respect to mould growth. In: Davies R, Birch GG, Parker KJ (eds) *Intermediate Moisture Foods*. Applied Science, London, pp. 166.
- Serna, D. C., Marín, A. G., Gallego, V. O., & Osorio, L. A. R. (2015). Nisina como conservante de alimentos: revisión sistemática de la literatura. *Hechos microbiológicos*, 6(1-2), 52-64. DOI: <https://doi.org/10.17533/udea.hm.335279>
- Settanni, L., Massitti, O., Van Sinderen, D., & Corsetti, A. (2005). In situ activity of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strain. Influence on the interactions between lactic acid bacteria during sourdough fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), 670-681. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02647.x>
- Shahidi-Noghabi, M., & Molaveisi, M. (2020). Microencapsulation optimization of cinnamon essential oil in the matrices of gum Arabic, maltodextrin, and inulin by spray-drying using mixture design. *Journal of Food Process Engineering*, 43(2), e13341. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpe.13341>
- Shen, C., Chen, W., Li, C., Aziz, T., Cui, H., & Lin, L. (2022). Topical advances of edible coating based on the nanoemulsions encapsulated with plant essential oils for

- foodborne pathogen control. *Food Control*, 109419. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109419>
- Shao, P., Yu, J., Chen, H., & Gao, H. (2021). Development of microcapsule bioactive paper loaded with cinnamon essential oil to improve the quality of edible fungi. *Food Packaging and Shelf Life*, 27, 100617. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.100617>
- Şimşek, Ö., Çon, A. H., & Tulumog˘lu, Ş. (2006). Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough processes. *Food Control*, 17(4), 263-270. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.10.011>
- Skurtys, O; Acevedo, C; Pedreschi, F; Enrione, J; Osorio, F; Aguilar, JM. (2011). *Food hydrocolloid edible films and coatings*. 1-11 p.
- Smith, J. P., Daifas, D. P., El-Khoury, W., Koukoutsis, J., & El-Khoury, A. (2004). Shelf life and safety concerns of bakery products—a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44(1), 19-55. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408690490263774>
- Soliman, K. M., & Badeaa, R. I. (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and chemical toxicology*, 40(11), 1669-1675. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00120-5](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00120-5)
- Stanley P.C. y Young L.J., (2002). Fabricación de pan Editorial Acribia S.A. 1era Edición Zaragoza (España).
- Suárez-Pilicita, D. E. (2024). *Efecto del tiempo de fermentación de la masa madre sobre las características organolépticas del pan tipo tapado* (Bachelor's thesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. Carrera de Alimentos).
- Sugrue, I. D. Hill, P. M. O'Connor, L. Day, C. Stanton, C. Hill and R. Paul Ross. (2023). Nisin E Is a novel nisin variant produced by multiple *Streptococcus equinus* strains. *Microorganisms*, 11(2), 427; DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020427>
- Šuput, D. Z., Lazić, V. L., Popović, S. Z., & Hromiš, N. M. (2015). Edible films and coatings—sources, properties and application. *Food and Feed Research*, 42(1), 11-22. DOI: 10.5937/FFR1501011S
- Tan, L. H., Chan, L. W., & Heng, P. W. S. (2005). Effect of oil loading on microspheres produced by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, 22(3), 253-259. DOI: <https://doi.org/10.1080/02652040500100329>
- Tee, L. H., Chuah, A. L., Pin, K. Y., Rashih, A. A., & Yusof, Y. A. (2012). Optimization of spray drying process parameters of Piper betle L. (Sirih) leaves extract coated with maltodextrin. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* ISSN: 0975-7384
- The New Canasta (2024) ¿Cuánto dura el pan? *Restaurante de la casa*. Recuperado de: <https://restaurantelacanasta.com/cuanto-dura-pan/>
- Toapanta Paredes, M. A. (2016). Caracterización de Aislados proteicos de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) y su Digestibilidad gástrica y duodenal (in vitro)

(Bachelor's thesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería en Alimentos.)

- Todorov, S. D., de Melo Franco, B. D. G., & Tagg, J. R. (2019). Bacteriocins of Gram-positive bacteria having activity spectra extending beyond closely-related species. *Beneficial microbes*, 10(3), 315-328. DOI: <https://doi.org/10.3920/BM2018.0126>
- Turchiuli, C., Fuchs, M., Bohin, M., Cuvelier, M. E., Ordonnaud, C., Peyrat-Maillard, M. N., & Dumoulin, E. (2005). Oil encapsulation by spray drying and fluidised bed agglomeration. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(1), 29-35. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.11.005>
- Uquillas Guanulema, S. F. (2021). Efecto de los aceites esenciales en biopelículas elaboradas a partir de matrices poliméricas naturales obtenidas mediante técnica de casting Tesis de Licenciatura. Riobamba Universidad Nacional de Chimborazo, Ecuador.
- Van, C. K., Nguyen, P. T. N., Nguyen, T. T. T., & Bach, L. G. (2024). Microencapsulation of Citrus latifolia peel essential oil by spray-drying using maltodextrin: Characterization, antimicrobial activities, and release profile. *LWT*, 197, 115825. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.115825>
- Vasquez-Lara, F., Verdú Amat, S., Islas, A. R., Barat Baviera, J. M., & Grau Meló, R. (2016). Efecto de la sustitución de harina de trigo con harina de quinoa (*Chenopodium quinoa*) sobre las propiedades reológicas de la masa y texturales del pan. *Revista iberoamericana de tecnología postcosecha*, 17(2), 307-317. ISSN: 1665-0204
- Vázquez-Briones, M. D. C., & Guerrero-Beltrán, J. Á. (2017). Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* sobre propiedades fisicoquímicas en películas de quitosano. *Scientia Agropecuaria*, 8(4), 401-409. DOI: <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.04.11>
- Venturi, M., Galli, V., Pini, N., Guerrini, S., & Granchi, L. (2019). Use of selected lactobacilli to increase  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) content in sourdough bread enriched with amaranth flour. *Foods*, 8(6), 218. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods8060218>
- Vera, A., Tapia, C., & Abugoch, L. (2020). Effect of high-intensity ultrasound treatment in combination with transglutaminase and nanoparticles on structural, mechanical, and physicochemical properties of quinoa proteins/chitosan edible films. *International journal of biological macromolecules*, 144, 536-543. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.120>
- Villa, D. Y. G., Russo, L., Kerbab, K., Landi, M., & Rastrelli, L. (2014). Chemical and nutritional characterization of *Chenopodium pallidicaule* (cañihua) and *Chenopodium quinoa* (quinoa) seeds. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 26(7), 609. DOI: <https://doi.org/10.9755/ejfa.v26i7.18187>

- Werning Hernández, M. L. (2010). *Caracterización de la síntesis del (1, 3)(1, 2)- $\beta$ -glucano y de las bacterias lácticas productoras* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Madrid).
- Yamine, J., Chihib, N. E., Gharsallaoui, A., Ismail, A., & Karam, L. (2024). Advances in essential oils encapsulation: Development, characterization and release mechanisms. *Polymer Bulletin*, 81(5), 3837-3882. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00289-023-04916-0>
- Yeşil, S., & Levent, H. (2022). The influence of fermented buckwheat, quinoa and amaranth flour on gluten-free bread quality. *LWT-Food Science and Technology*, 160, 113301. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113301>
- Yousuf, B., Wu, S., & Siddiqui, M. W. (2021). Incorporating essential oils or compounds derived thereof into edible coatings: Effect on quality and shelf life of fresh/fresh-cut produce. *Trends in Food Science & Technology*, 108, 245-257. DOI: [doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.016](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.016)
- Zekaria, D., & Calier, L. (2014). Los aceites esenciales. *Una alternativa a los antimicrobianos*. Laboratorios Calier. Asociación Española de Ciencia Avícola.

## 10. ANEXOS

### 10.1 Anexo 1. Carta responsiva



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Facultad de Química

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Carta Responsiva”

Título del protocolo:

**“Vida de anaquel de pan de masa madre adicionado con *Lactococcus lactis* NRRL B-50307 y un recubrimiento activo conteniendo aceite esencial de canela”**



Investigador principal: Dr. Carlos Regalado González

Estudiante encargado del estudio: L.B. Arturo Tzintzun Torres

Sede donde se realizará el estudio: Parque biotecnológico. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro.

### 1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La elaboración de pan de masa madre con harina de trigo y amaranto permite mejorar la calidad del pan de masa madre, además la inoculación de la bacteria *Lactococcus lactis* NRRL B-50307 y la implementación de un recubrimiento activo antimicrobiano permite extender la vida útil del pan. La evaluación sensorial determinará cuál es la mejor formulación, para posteriormente determinar la vida útil del producto.

### 2. OBJETIVO DEL ESTUDIO

Incorporar la bacteria *Lactococcus lactis* NRRL B-50307 a masa madre a base de mezclas de harinas de trigo con amaranto, y posteriormente aplicar un recubrimiento comestible a base de quitosano y quinoa reforzado con aceite esencial de canela, al pan elaborado, para extender su vida de anaquel y garantizar su inocuidad.

### 3. BENEFICIOS DEL ESTUDIO

Este estudio determinará cuál es el mejor tratamiento aceptado por los consumidores, además de caracterizar los atributos sensoriales, para realizar las pruebas pertinentes mediante las cuales será determinada su vida de anaquel.

### 4. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

1. Se presentarán rebanadas de pan organizadas de manera aleatoria y enumeradas de manera aleatoria con 3 números para su identificación, junto con las muestras se repartirán boletas donde los consumidores evaluarán las muestras.
2. Se pedirá que se pruebe cada muestra y se registre en la boleta sus impresiones con respecto a los atributos sensoriales de la misma. Entre cada muestra el evaluador limpiará su paladar con trozos de manzana y agua natural purificada, además de pedir a los evaluadores que no hablen entre si durante la evaluación.
3. Una vez finalizado el estudio, se pedirá que se entreguen las boletas al evaluador externo.

### 5. RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

Todos los tratamientos serán realizados siguiendo las buenas prácticas de higiene solicitadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009 (Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios) y las recomendaciones de las buenas prácticas solicitadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos.

Los ingredientes utilizados en el presente estudio serán: Para el pan: harina de amaranto y trigo, agua, sal, puede contener o no nisina, producida por *Lactococcus lactis*, la cual es una bacteria presente en la flora intestinal, ampliamente utilizada en la industria de alimentos como agente conservante. Para el recubrimiento comestible: aceite esencial de canela, almidón modificado, proteína de quinoa, quitosano (compuesto extraído principalmente de los caparazones de crustáceos como camarones o langostinos).

**6. DURACIÓN DEL ESTUDIO:** 15 minutos aproximadamente.

### 7. ACLARACIONES

- La decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- Los participantes podrán retirarse en el momento que lo deseen, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar o no las razones, la cual será respetada en su integridad.

- El estudio es completamente gratuito.
- No se recibirá apoyo económico por participar.
- En el transcurso del estudio los participantes podrán solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.
- La información recabada en el estudio será confidencial.
- En el caso de que el participante lo solicite, se compartirán los resultados derivados de su participación, incluyendo los resultados que garantizan la inocuidad de las muestras del alimento sujeto a evaluación.
- Previa a la evaluación el participante indicará un número telefónico de emergencia, en el caso de haber emergencia derivada de la intervención de la evaluación sensorial.

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

## **7. INFORMACIÓN DE CONTACTO**

Si tiene alguna pregunta acerca de la participación o busca la opinión de otra persona fuera del estudio, puede consultar al médico de su confianza. Cualquier duda con respecto a este estudio, comunicarse con:

**Arturo Tzintzun Torres.**

Evaluador

Correo: [1416607g@umich.mx](mailto:1416607g@umich.mx)

**Dr. Carlos Regalado Gonzalez.**

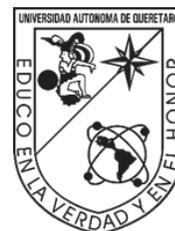
Investigador responsable

Correo: [regcarlos@gmail.com](mailto:regcarlos@gmail.com)

## 10.2 Anexo 2. Consentimiento informado.



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO



## Facultad de Química

### Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Carta consentimiento para participar en un proyecto de investigación”

#### Título del protocolo:

“Vida de anaquel de pan de masa madre adicionado con *Lactococcus lactis* NRRL B-50307 y un recubrimiento activo conteniendo aceite esencial de canela”

#### INVITACIÓN

Estimado/a participante:

Se extiende la cordial invitación a participar en el presente estudio de investigación sobre la evaluación sensorial de pan de masa madre. La evaluación consistirá en probar diferentes tipos de pan y responder algunas preguntas. Antes de tomar la decisión si participa o no, debe conocer cada apartado del documento. Este proceso se conoce como **consentimiento informado**. Está en toda libertad y derecho de preguntar o extender sus dudas sobre cualquier aspecto o inquietud sobre la actividad de esta investigación.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pide que firme dicho documento de consentimiento informado, del cual se le entregará una copia firmada y fechada.

#### 1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La elaboración de pan de masa madre con harina de trigo y amaranto permite mejorar la calidad del pan de masa madre, además la inoculación de la bacteria *Lactococcus lactis* NRRL B-50307 y la implementación de un recubrimiento activo antimicrobiano permite extender la vida útil del pan. La evaluación sensorial determinará cuál es la mejor formulación, para posteriormente determinar la vida útil del producto.

#### 2. OBJETIVO DEL ESTUDIO

Incorporar la bacteria *Lactococcus lactis* NRRL B-50307 a masa madre a base de mezclas de harinas de trigo con amaranto, y posteriormente aplicar un recubrimiento comestible a base de quitosano y quinoa reforzado con aceite esencial de canela, al pan elaborado, para extender su vida de anaquel y garantizar su inocuidad.

### **3. BENEFICIOS DEL ESTUDIO**

Este estudio determinará cuál es el mejor tratamiento aceptado por los consumidores, además de caracterizar los atributos sensoriales, para realizar las pruebas pertinentes mediante las cuales será determinada su vida de anaquel.

### **4. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO**

1. Se presentarán rebanadas de pan organizadas de manera aleatoria y enumeradas de manera aleatoria con 3 números para su identificación, junto con las muestras se repartirán boletas donde los consumidores evaluarán las muestras.
2. Se pedirá que se pruebe cada muestra y se registre en la boleta sus impresiones con respecto a los atributos sensoriales de la misma. Entre cada muestra el evaluador limpiará su paladar agua natural purificada, en caso de requerir más solicitarla, además de pedir a los evaluadores que no hablen entre si durante la evaluación.
3. Una vez finalizado el estudio, se pedirá que se entreguen las boletas al evaluador externo.
- 4.

### **5. CRITERIOS PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO**

#### **5.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Los participantes forzosamente deberán ser personas que consuman pan habitualmente (1 vez por semana), para garantizar una calificación adecuada por parte del consumidor, así como la detección apropiada de atributos.
- Edad entre 18 a 70 años, ya que el pan es un alimento de gran consumo en México por personas de todas las edades, lo cual evitará sesgos en la calificación de las muestras y por lo tanto se obtendrá una calificación representativa.

#### **5.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

Las personas con los siguientes criterios serán rechazadas en la participación del presente estudio por las razones correspondientes;

- Personas que no gusten del pan o no lo consuman habitualmente (1 vez por semana), ya que no podrían realizar una calificación adecuada y no podrían detectar los atributos entre las muestras de forma apropiada, por el consumo inhabitual del alimento.

- Personas con alergias al trigo, amaranto, nisina, quitosano (o crustáceos como camarón), canela o intolerantes al gluten (celiacos) ya que las muestras contendrán todos los ingredientes mencionados y se requiere garantizar el bienestar de los consumidores.

## 6. RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

El riesgo a los participantes es mínimo, todos los tratamientos serán realizados siguiendo las buenas prácticas de higiene solicitadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009 (Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios) y las recomendaciones de las buenas prácticas solicitadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos.

Los ingredientes utilizados en el presente estudio serán:

Para el pan: harina de amaranto y trigo, agua, sal y nisina. *Lactococcus lactis* es una bacteria presente en la flora intestinal, ampliamente utilizada en la industria de alimentos como agente conservante, sin embargo, la bacteria *L. lactis* no estará presente en el pan, ya que será eliminada en la elaboración del pan cuando este sea horneado pero quedará presente la nisina producida la se ha etiquetado “Generalmente Reconocida como Segura” (GRAS) por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA).

Para el recubrimiento comestible: aceite esencial de canela, almidón modificado, proteína de quinoa, quitosano (compuesto extraído principalmente de los caparzones de crustáceos como camarones o langostinos).

En el caso de que el participante sea alérgico a alguno de los ingredientes y no tenga conocimiento previo, deberá notificar a los evaluadores y para ser transferido a la unidad de cuidados médicos de la Universidad Autónoma de Querétaro.

**7. DURACIÓN DEL ESTUDIO:** 15 minutos aproximadamente.

**8. UBICACIÓN DEL ESTUDIO:** Parque Biotecnológico, en la Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro Cerro de las Campanas, Centro Universitario, 76010 Santiago de Querétaro, Qro.

## 9. ACLARACIONES

- La decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- Los participantes podrán retirarse en el momento que lo deseen, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar o no las razones, la cual será respetada en su integridad.
- El estudio es completamente gratuito.
- No se recibirá apoyo económico por participar.

- En el transcurso del estudio los participantes podrán solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.
- La información recabada en el estudio será confidencial.
- En el caso de que el participante lo solicite, se compartirán los resultados derivados de su participación, incluyendo los resultados que garantizan la inocuidad de las muestras del alimento sujeto a evaluación.
- Previa a la evaluación el participante indicará un número telefónico de emergencia, en el caso de haber emergencia derivada de la intervención de la evaluación sensorial.

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

## **10. INFORMACIÓN DE CONTACTO**

Si tiene alguna pregunta acerca de la participación o busca la opinión de otra persona fuera del estudio, puede consultar al médico de su confianza. Cualquier duda con respecto a este estudio, comunicarse con:

**L. B. Arturo Tzintzun Torres.** Evaluador

Correo: [1416607g@umich.mx](mailto:1416607g@umich.mx)

Número telefónico: 4431047494

**Dr. Carlos Regalado Gonzalez.** Investigador responsable

Correo: [regcarlos@gmail.com](mailto:regcarlos@gmail.com)

Número telefónico: 4421238332

## **11. CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Yo, \_\_\_\_\_ he leído la información anterior y he aceptado participar en la evaluación sensorial de pan de masa madre, en el caso de tener dudas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Recibiré una copia firmada y fechada de este formato de consentimiento.

---

**Firma del Participante**

---

**Fecha**

---

**Testigo 1**

---

**Fecha**

---

**Testigo 2**

---

**Fecha**

Se ha explicado al Sr(a). \_\_\_\_\_ la naturaleza y los propósitos de la investigación; se ha explicado acerca de los riesgos (en el caso de haber) y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas y resuelto las inquietudes del participante de manera clara y concisa. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

---

**Firma del investigador**

---

**Fecha**

10.3 Anexo 3. Carta de revocación del consentimiento informado

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**



**Facultad de Química**

**Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

**“Carta revocación del consentimiento informado”**

**Título del protocolo:**

**“Vida de anaquel de pan de masa madre adicionado con *Lactococcus lactis* NRRL B-50307 y un recubrimiento activo conteniendo aceite esencial de canela”**

Investigador principal: Dr. Carlos Regalado González

Estudiante encargado del estudio: L.B. Arturo Tzintzun Torres

Sede donde se realizará el estudio: Parque biotecnológico. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro.

**Nombre del participante:**

\_\_\_\_\_

Estimado/a responsable del estudio:

Por medio de la presente, quiero revocar mi consentimiento para participar en la evaluación sensorial de pan de masa madre de la investigación: “Vida de anaquel de pan de masa madre adicionado con *Lactococcus lactis* NRRL B-50307 y un recubrimiento activo conteniendo aceite esencial de canela”. He decidido retirarme de la evaluación por las siguientes razones: (Puede dejarlo en blanco si no desea mencionar las razones.)

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Si el participante lo desea, podrá solicitar que le sea entregada toda la información que se haya recabado sobre el/ella con motivo de su participación en el proyecto de investigación.

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del paciente

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
día mes año

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del testigo

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
día mes año

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del testigo

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
día mes año

Con copia para el participante (se deberá elaborar por duplicado, quedando una copia en poder del participante).

## 10.4 Anexo 4 Formato de Evaluación Sensorial

### EVALUACIÓN DE PAN DE MASA MADRE

Fecha: \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_

¿Es usted consumidor frecuente de pan? Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

Antes de comenzar la evaluación, lea cuidadosamente las instrucciones:

#### Introducción

El pan de masa madre es un tipo de pan elaborado utilizando masa madre como agente leudante. La masa madre es una mezcla de harina y agua fermentada por levaduras y bacterias presentes en el medio ambiente. Este proceso de fermentación le otorga al pan de masa madre un sabor único, una textura más característica y una mejor conservación. Este tipo de pan se utiliza en una variedad de comidas, desde desayunos hasta cenas. Es común encontrarlo en panaderías artesanales y en restaurantes de alta cocina. Se puede disfrutar solo, con aceite de oliva y sal, o acompañado de quesos, embutidos, patés, sopas, ensaladas y otros platos.

Una de las principales diferencias entre el pan de masa madre y el pan común es su proceso de fermentación. El pan de masa madre requiere un proceso de fermentación más largo, que puede durar varias horas o incluso días. Esto contribuye a su sabor más complejo y su textura característica. Además, el pan de masa madre tiende a tener una corteza más crujiente y un interior con alvéolos más grandes y una miga más densa. En términos nutricionales, el pan de masa madre también puede tener beneficios adicionales, ya que la fermentación natural puede aumentar la digestibilidad y la disponibilidad de nutrientes.

#### Instrucciones

Frente a usted se encuentran cuatro muestras de pan, cada una con un código diferente. Tome una muestra y, de acuerdo con su preferencia, evalúe los atributos que se le solicitan, marcando el número correspondiente a la calificación según corresponda su preferencia para cada uno de los atributos y anotando en la boleta el código de la muestra correspondiente, entre muestras de pan deberá tomar agua como limpiador de paladar.



Puntaje	Calificación
9	Me gusta muchísimo
8	Me gusta mucho
7	Me gusta bastante
6	Me gusta ligeramente
5	Ni me gusta ni me disgusta
4	Me disgusta ligeramente
3	Me disgusta bastante
2	Me disgusta mucho
1	Me disgusta muchísimo

Atributo	Muestra:	Muestra:	Muestra:	Muestra:
Color				
Olor				
Sabor				
Textura				
Aceptación				
Descripción				

## 10.5 Anexo 5. Invitación para los participantes.

# INVITACIÓN



Jueves 22 de  
Febrero del 2024



12:30 - 2:30 p.m.



Laboratorio de  
evaluación  
sensorial ubicado  
en el Centro  
Académico de  
Innovación y  
Desarrollo de  
Productos  
(2° piso parque  
biotecnológico)



Facultad de Química

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
QUERÉTARO



Se extiende la cordial invitación a participar en el estudio de investigación:

**“Vida de anaquel de pan de masa madre adicionado con *Lactococcus lactis* NRRL B-50307 y un recubrimiento activo conteniendo aceite esencial de canela”**

La actividad consiste en formar parte de un panel de consumidores en la evaluación sensorial de muestras de pan de masa madre a base de trigo y amaranto.

Para poder participar en el estudio deberás:

- ✓ Ser consumidor habitual de pan (1 vez por semana)
- ✓ Tener entre 18-70 años
- ✗ No ser alérgico a: trigo, gluten, amaranto, nisina, canela, quinoa, lactosa, quitosano (o crustáceos como camarón).



## 10.6 Anexo 6. Certificaciones del aceite esencial de canela comercial

# Canela



*/CINNAMOMUM ZEYLANICUM/*

● El aceite de Canela es uno de los más utilizados para aromatizar ambientes y es un elemento recurrente en la gastronomía y aromaterapia, gracias a su olor y sabor inconfundible y versátil.

 <p><b>MÉTODO DE EXTRACCIÓN</b> Destilación por arrastre de vapor</p>	 <p><b>PAÍS DE ORIGEN</b> India</p>	 <p><b>PARTE DE LA PLANTA</b> Cortiza</p>	 <p><b>COMPONENTES QUÍMICOS</b> Cinamaldehído y Eugenol</p>
 <p><b>MEZCLAS IDEALES</b> Romero, Geranio, Cardamomo y Limón</p>	 <p><b>AROMA</b> Fresco, dulce, fuerte y herboso</p>	 <p><b>FAMILIA BOTÁNICA</b> Lauráceas</p>	 <p><b>APLICACIÓN</b> Aromático, Extremo, Intenso</p>

### BELLEZA

- Efecto humectante
- Ayuda a la disminución de manchas de la piel
- Ayuda en la caída del cabello
- Promueve la hidratación del cabello

### VITALIDAD

- Ayuda a disminuir o prevenir los dolores de cabeza
- Ayuda a reducir los dolores abdominales
- Ayuda en la sensación de náuseas

### BIENESTAR

- Ayuda al incremento de energía
- Ayuda a repeler insectos de forma natural
- Ayuda a refrescar el aliento
- Promueve la relajación

## NUESTRAS CERTIFICACIONES

Extraemos el poder de cuidar cada detalle para mantenerlo puro e intacto.

Creamos producto a base de ingredientes orgánicos y naturales, con certificaciones que avalan nuestro proceso productivo.



Estados Unidos  
Departamento De  
Agricultura



UK Cert  
Limitado Un  
Organismo De  
Certificación



ISO 9001



ISO 22001