

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE RECUBRIMIENTOS
COMESTIBLES A BASE DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE
Y ALMIDONES MODIFICADOS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

YANETT MARGARITA MÁRQUEZ HERNÁNDEZ

DIRIGIDA POR

Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2010.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES A BASE DE PROTEÍNA
DE SUERO DE LECHE Y ALMIDONES MODIFICADOS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

YANETT MARGARITA MÁRQUEZ HERNÁNDEZ

DIRIGIDA POR

Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

SINODALES

Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ
DIRECTOR

Dra. BLANCA GARCÍA ALMENDÁREZ
SINODAL

Dr. JUAN RAMIRO PACHECO AGUILAR
SINODAL

Dra. SILVIA AMAYA LLANO
SINODAL

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, que se llama Jehová, por la experiencia única de escudriñar, en cierto sentido, apenas una orilla de la bellísima e increíble creación. Sé que llegará el momento en el que la conoceré más a fondo. No hay palabras que puedan agradecer absolutamente todo.

A mis Padres: **Fernando Márquez** y **Margarita Hernández** pues sin su apoyo incondicional, sus palabras de aliento, sus noches sin dormir gracias a mí, su ejemplo, sus consejos, sus risas y momentos compartidos no hubiera sido posible concluir este ciclo. Son los mejores, no podría pedir nada mejor de lo que ustedes me han dado.

A mis hermanos: **Sandy**, por todo, y a **Fer**; cada uno ha dado de sí para mí, gracias por escucharme, apoyarme y aconsejarme.

Papá, Mamá, Sandy y Fer: ustedes son mis más entrañables amigos, ¡gracias!

A **mis amigos**: Esme, Rubí, Angie y Marco. Ivonne, Mary S., Familia Martínez, Familia Mendoza, Familia Ayala de la Portilla, Kerén, Carito, Moi y Magguie. Gracias por el interés sincero, por las palabras de aliento y los excelentes momentos compartidos. Muchos de ustedes, sin yo merecerlo, han depositado su confianza en mí, gracias.

Mi especial agradecimiento al M. en C. **Alfonso Pérez** pues sin sus amplios conocimientos, ayuda, diseño, asesoría, compañía y espíritu innato de investigador jamás se hubiera concluido este trabajo. Muchas gracias.

Al **Dr. Carlos Regalado** y a la **Dra. Blanca García** por la oportunidad de incursionar en el Laboratorio de Biotecnología de Alimentos y por la guía proporcionada para terminar este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Norma, Violetita, Fer, Cori, Stacy, Aldo, Eli, Dalia, Adriana, Martha y Nanci por la compañía, palabras de aliento, así como la asesoría en mis fallas técnicas. A **Luis Marco** por su excelente asesoría en la parte estadística de este trabajo.

Al **Dr. Fernando Martínez Bustos** por darse siempre el tiempo de asesorarnos y permitirnos conocer su equipo de trabajo y al **Dr. Eduardo Castaño** por los consejos oportunos para culminar este trabajo.

A la **Dra. Silvia Amaya** y al **Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar** por su excelente asesoría y valiosas opiniones en la realización de este trabajo.

A todos mis profesores a lo largo de estos años por los conocimientos, experiencias y valores transmitidos.

A mis compañeros de generación: Jesy, Brenda, Pris, Tania, Clau, Tania, Kary, Da,...ha culminado un ciclo en nuestras vidas, pero su huella en mí es memorable.

“Investigar significa ver lo que todo el mundo ve pero
pensar lo que nadie piensa”

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL.	i
ÍNDICE DE CUADROS.	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.	v
RESUMEN.	
I.INTRODUCCIÓN.	1
II.ANTECEDENTES.	
II.1.Generalidades de recubrimientos comestibles.	3
II.2.Materiales utilizados en la formulación de recubrimientos aplicados en frutas frescas y mínimamente procesadas.	5
II.2.1. Polisacáridos.	10
II.2.2. Proteínas.	10
II.2.3. Lípidos.	11
II.3.Recubrimientos comestibles a base de proteína de suero de leche.	11
II.4.Recubrimientos comestibles a base de almidones modificados.	13
II.5.Propiedades de recubrimientos a base de almidones modificados y proteína de suero de leche.	15
II.6.Incorporación de antimicrobianos a recubrimientos.	15
III.HIPÓTESIS.	17
IV.OBJETIVOS.	
IV.1.General.	18
IV.2.Específicos.	18
V.METODOLOGÍA.	
V.1.Materiales.	19
V.1.1.Material biológico.	19
V.1.2.Medios de cultivo.	19
V.1.3.Reactivos.	20
V.2.Métodos.	20

V.2.1.Modificación de almidones.	20
V.2.1.1.Fosfatación convencional.	20
V.2.1.2.Fosfatación por extrusión termoplástica.	21
V.2.1.3.Medición de grado de sustitución de almidones fosfatados.	21
V.2.2.Obtención de las soluciones filmogénicas a partir de almidones modificados y proteína.	23
V.2.3.Determinación de las propiedades <i>in vitro</i> de las películas obtenidas.	24
V.2.3.1.Determinación de permeabilidad al vapor de agua.	24
V.2.3.2.Medición de la materia soluble total de los recubrimientos.	26
V.2.3.3.Medición de la opacidad de los recubrimientos.	27
V.2.3.4.Medición del espesor de las películas.	27
V.2.4.Empleo de las soluciones filmogénicas para el recubrimiento de alimento seleccionado.	28
V.2.4.1.Evaluación de la pérdida de peso del alimento seleccionado recubierto.	28
V.2.5.Experimentos microbiológicos.	29
V.2.5.1.Preparación de inóculo de <i>Botrytis cinerea</i> ATCC 12481.	29
V.2.5.2.Concentración mínima inhibitoria de los antimicrobianos seleccionados contra <i>Botrytis cinerea</i> ATCC 12481.	29
V.2.5.3.Ensayo <i>in vitro</i> de la efectividad de los recubrimientos contra la germinación de esporas y crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> ATCC 12481.	30
V.2.5.4.Ensayo de biodegradabilidad.	31
V.3.Diseño experimental.	31
VI. RESULTADOS.	33

VI.1.Modificación y grado de sustitución de almidones.	33
VI.2.Obtención de soluciones filmogénicas a partir de almidones modificados y proteína.	34
VI.3.Propiedades <i>in vitro</i> de películas formuladas.	36
VI.3.1.Permeabilidad al vapor de agua.	36
VI.3.2.Medición de materia soluble de los recubrimientos.	37
VI.3.2.Medición de opacidad.	39
VI.3.4.Medición de espesor.	39
VI.4.Análisis estadístico y selección de mejor formulación.	40
VI.5.Recubrimiento de alimento seleccionado y evaluación de pérdida de peso.	42
VI.6.Experimentos microbiológicos.	45
VI.6.1.Concentración mínima inhibitoria de los antimicrobianos seleccionados contra <i>Botrytis cinerea</i> ATCC 12481.	45
VI.6.2.Ensayo <i>in vitro</i> de la efectividad de los recubrimientos contra la germinación de esporas y crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> ATCC 12481.	46
VI.6.3.Ensayo de biodegradabilidad.	47
VII.DISCUSIÓN.	51
VIII.CONCLUSIONES.	59
IX.BIBLIOGRAFÍA.	61
ANEXOS.	67

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Atributos de calidad de frutas y hortalizas frescas según Lin y Zhao (2007).	6
2	Ejemplos de recubrimientos aplicados en frutas y hortalizas frescas (Lin y Zhao, 2007).	8
3	Diseño de tratamientos para la producción de recubrimientos a partir de tres tipos de almidones modificados.	32
4	Resultados de fosfatación de almidones de maíz.	33
5	Valores de variables respuesta evaluadas para cada formulación.	40
6	Análisis de varianza para el porcentaje total de materia soluble.	41
7	Efecto de cada factor en el porcentaje total de materia soluble.	41
8	Monitoreo de crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> ATCC 12481 sobre películas con distinta concentración de Mirenat-LA.	47
9	Resultados de ensayo de biodegradabilidad (apariencia frontal del experimento).	48
10	Resultados de ensayo de biodegradabilidad (apariencia posterior del experimento).	49
11	Datos de la curva de calibración para determinación de fósforo.	67
12	Datos de pérdida de peso respecto al tiempo de una película formulada.	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Principales funciones de un recubrimiento comestible aplicado en un tejido vivo (adaptado de Rojas-Graü y col., 2007).	6
2	Principales materiales utilizados en recubrimientos para frutas y hortalizas frescas y mínimamente procesadas (Bárbosa-Cánovas y Olivas, 2009).	9
3	Apariencia de las muestras de almidones fosfatados.	21
4	Secado a temperatura ambiente de películas formuladas.	24
5	Celdas de vidrio para la medición de permeabilidad al vapor de agua.	25
6	Sistema de medición de permeabilidad al vapor de agua.	26
7	Medición de espesor de películas.	27
8	Recubrimiento de fresas.	28
9	Ensayo de la efectividad de los recubrimientos contra <i>Botrytis cinerea</i> ATCC 12481.	30
10	Migración del aceite hacia la superficie de una película comestible.	35
11	Apariencia de película de almidón fosfatado por extrusión, sorbitol y cera (3-3-0.3% en peso respectivamente).	36
12	Comportamiento de películas que contenían a) almidón doblemente modificado, sorbitol y cera (3-3-0.3%), b) almidón fosfatado por extrusión con aislado de proteína de suero lácteo, sorbitol y cera (1.5-1.5-3-0-3%), c) almidón fosfatado por extrusión, sorbitol, cera (3-3-0.3%) en un ambiente acuoso.	38

13	Apariencia de fresas recubiertas con a) y e) almidón fosfatado por extrusión, aislado de proteína de suero lácteo, sorbitol y cera (1.5-1.5-3-0.3%); b) y f) almidón fosfatado por extrusión, sorbitol, cera (3-3-0.3%); c) y g) almidón doblemente modificado, sorbitol y cera (3-3-0.3%); d) y h) control. Incisos e, f, g y h a los 6 días de almacenamiento.	43
14	Porcentaje de pérdida de peso de cada formulación. AFE= Almidón fosfatado por extrusión. ADM= Almidón doblemente modificado, WPI= Aislado de proteína de suero de leche.	44
15	Concentración mínima inhibitoria contra <i>Botrytis cinerea</i> ATCC 12481 de a) ϵ -poli-lisina, b) Mirenat-LA y c) Natamicina.	45
16	Curva de calibración para determinación de porcentaje de fósforo.	67
17	Gráfica de pérdida de peso con respecto al tiempo para cálculo de permeabilidad al vapor de agua.	70

RESUMEN

Actualmente el consumidor busca alimentos frescos y mínimamente procesados, mientras que existe la necesidad de reducir la contaminación por empaques no biodegradables lo cual convierte a los recubrimientos comestibles en una alternativa viable. En la formulación de recubrimientos influyen la disponibilidad de los biomateriales y las características de barrera, por lo cual se pueden usar proteínas, polisacáridos, ceras, aceites y en recubrimientos activos agentes antimicrobianos, antioxidantes, nutrientes, entre otros. El objetivo de este trabajo fue formular y caracterizar películas comestibles a partir de un diseño experimental de tres factores con sus respectivos niveles señalados en paréntesis: concentración de almidón modificado [1.5%+1.5% de aislado de proteína de suero (WPI) o 3%], el agente hidrófobo (cera o aceite al 0.3%) y el tipo de almidón modificado (almidón de papa acetilado-entrecruzado ADM, dos almidones de maíz céreos uno fosfatado convencionalmente AFC y otro fosfatado por extrusión termoplástica AFE). La concentración de sorbitol (S) se mantuvo igual a la de los biopolímeros (3%). Las variables respuesta fueron opacidad, permeabilidad al vapor de agua (PVA), solubilidad y espesor de las películas. Las diferencias significativas ($p < 0.05$), fueron las siguientes: sólo el tipo de almidón afectó la PVA, el agente hidrófobo al espesor y opacidad, el tipo y cantidad de almidón a la solubilidad. Se recubrió fresa usando tres formulaciones: AFE-S-cera, ADM-S-cera y AFE-WPI-S-cera con la que se obtuvo menor pérdida de peso con respecto a un control por 6 días a 4°C y 98% de humedad relativa. El antimicrobiano Mirenat-LA se adicionó a éste último recubrimiento usando 15, 150 y 300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, sin observarse efecto inhibitorio del crecimiento de *Botrytis cinerea* ATCC 12481. Según la prueba de biodegradabilidad, todas las formulaciones evaluadas fueron destruidas por la mezcla de microorganismos utilizada, en 20 días. Se observó efecto inhibitorio en líquido, por lo cual se sugiere usar mayores concentraciones de Mirenat-LA en el recubrimiento.

I. INTRODUCCIÓN

Los recubrimientos comestibles son una alternativa viable para la conservación de frutas y hortalizas frescas; las investigaciones respecto a su uso están orientadas principalmente a las propiedades de barrera que pueden proporcionar en vista de que, en un tejido vivo, las reacciones que conllevan a la deshidratación y el deterioro siguen su curso después de la cosecha. Los materiales más utilizados en la formulación de recubrimientos y películas comestibles son polisacáridos y proteínas, se ha reportado que el uso de estos biopolímeros ha contribuido a proveer al alimento en cuestión de una barrera selectiva contra gases como el O_2 y el CO_2 pero una pobre barrera contra la humedad, lo cual contribuye al rápido deterioro del alimento, debido a eso, se ha formulado el uso de estos biopolímeros con agentes hidrofóbicos que proporcionen a la película formada una menor permeabilidad al vapor de agua sin dejar de lado las características sensoriales que dictarán la preferencia del consumidor así como el costo de producción por el uso de materias primas que sean accesibles. En vista de esto, ceras y aceites pueden utilizarse en la formulación, además, por sus características intrínsecas de disponibilidad y bajo costo, el almidón puede ser utilizado como material matriz en la formulación. Las modificaciones químicas en las moléculas de almidón pueden contribuir al cambio en las propiedades de barrera del recubrimiento o película comestible. La mezcla de almidón con proteína puede proporcionar a la película de estabilidad mecánica necesaria para mantener la integridad de los alimentos y una barrera contra la humedad.

Entre las propiedades más importantes evaluadas en las películas comestibles son las propiedades de barrera a gases como el oxígeno y el dióxido de carbono y al vapor de agua, el porcentaje de materia soluble que orienta las aplicaciones de la película y parámetros de apariencia, especialmente cuando las películas o recubrimientos están diseñadas para utilizarse sobre el alimento.

La tendencia de las investigaciones respecto a estas tecnologías, es la caracterización de películas fuera del alimento o sistema vivo y en base a las propiedades estudiadas adecuar las características al objeto de aplicación. El presente trabajo sigue esa caracterización y tiene como objetivo proponer formulaciones de recubrimientos comestibles con una baja permeabilidad al vapor de agua, bajos valores de opacidad y óptimos valores de solubilidad y espesor.

II. ANTECEDENTES

II.1. Generalidades de recubrimientos comestibles

Un recubrimiento comestible puede ser definido como una capa delgada de materiales comestibles que se forma sobre la superficie de un alimento, se diferencia de una película en que ésta se forma sobre un material inerte, por lo que sus aplicaciones en ocasiones son distintas, los primeros se emplean como sistemas de aumento de vida de anaquel de un determinado producto mientras que las segundas se utilizan como sistemas de empaque independiente (Regalado y col., 2006; Pavlath y Orts, 2009).

La investigación respecto al uso de recubrimientos y películas comestibles se debe, por una parte, a la necesidad básica de preservar los alimentos una vez que han sido cosechados o procesados y entonces se ven sometidos a manipulación ya sea para almacenamiento o para transporte hasta supermercados o tiendas y posterior llegada al consumidor. Debido a esta manipulación, el producto experimenta cambios que conducen al deterioro y por tanto a la pérdida de apariencia, sabor y valor nutritivo. Los recubrimientos comestibles proporcionan una protección para aquellos alimentos que de no ser recubiertos representan pérdidas económicas importantes en cuestión de días e incluso horas. Además, como respuesta a la creciente preocupación por el medio ambiente, los recubrimientos y películas comestibles ofrecen como ventaja la reducción de residuos a causa de envases que representan un grave problema ecológico debido a su falta de biodegradabilidad (Tharanathan, 2003).

Los recubrimientos comestibles, además, pueden mejorar las propiedades sensoriales de los alimentos y se sabe que pueden aplicarse en las interfaces de las distintas capas de alimentos heterogéneos y ser adaptados para evitar el deterioro a causa de la humedad y migraciones de soluto en alimentos como pizza, empanadas y dulces, también pueden usarse en el control de la tasa de difusión de

sustancias conservantes desde la superficie al interior de un alimento (Bourtoom, 2008).

El enfoque clásico en el estudio de recubrimientos comestibles consiste en estudiar sus características fuera de un sistema específico, enfoque que puede ser útil cuando se desea comparar composición de recubrimientos y el cambio de esta composición en sus propiedades mecánicas o de apariencia. Sin embargo, a veces resulta útil orientar investigaciones que tomen en cuenta la interacción entre el recubrimiento y la superficie del alimento así como la influencia de esta interacción en ambas partes. En ese sentido, y en vista de la demanda actual de los consumidores por alimentos mínimamente procesados y cambios en los hábitos alimentarios debido a su conciencia en pro de la salud, las innovaciones en investigaciones con respecto a recubrimientos comestibles están enfocadas a su aplicación en frutas y hortalizas frescas cortadas lo que permite controlar la deshidratación, cambios en la tasa respiratoria y contribuir a la calidad microbiológica del tejido vivo (Appendini y Hotchkiss, 2002; Rojas-Graü y col., 2007; Vargas y col., 2008).

Se han establecido ciertas características deseables en un recubrimiento comestible como son: no estar compuesto de tóxicos o alérgenos; proveer al alimento de estabilidad estructural y prevenir de daños mecánicos durante su transporte, manipulación y distribución; proporción de cobertura uniforme al alimento para lo cual debe contar con una buena adherencia a su superficie; mantener el contenido adecuado de humedad por lo que su composición debe diseñarse para controlar en ambos sentidos la migración del agua del alimento protegido; ser semipermeable de modo que mantenga un equilibrio de los gases implicados en la respiración y como consecuencia de este efecto retardar la senescencia; estabilizar el aroma, sabor y valor nutritivo previniendo la pérdida o absorción de componentes que afecten esos parámetros sin afectar las características organolépticas que influyan negativamente en la aceptación del consumidor; proporcionar protección contra el deterioro; servir como soporte para

aditivos deseables en el producto como antioxidantes y nutrientes y que la tecnología y materia prima involucrada en la producción de estos recubrimientos sea accesible y viable económicamente (Pavlath y Orts, 2009).

II.2. Materiales utilizados en la formulación de recubrimientos aplicados en frutas frescas y mínimamente procesadas

Los materiales utilizados en la formulación de recubrimientos comestibles son hidrocoloides como proteínas y polisacáridos, lípidos como ceras, acilglicéridos y ácidos grasos y la mezcla de hidrocoloides y lípidos. Plastificantes, emulsionantes, antioxidantes, colorantes, saborizantes y antimicrobianos pueden ser adicionados en la formulación para mejorar las propiedades mecánicas, o proveer al recubrimiento de cualidades específicas adecuadas a un producto determinado (Valencia-Chamorro, 2009).

Entre los atributos de calidad que se busca preservar en frutas y hortalizas frescas se encuentran las enlistadas en el Cuadro 1, estos atributos están determinados por la variedad y madurez del fruto, por los procedimientos de pre y post-cosecha y por el almacenamiento (Lin y Zhao, 2007).

Se busca entonces que la formulación de un recubrimiento comestible aporte o preserve atributos de calidad de frutos frescos y que además cumpla con las funciones previstas para tejidos vivos que muestra la Figura 1. En frutos frescos los recubrimientos deben proporcionar barrera contra la humedad circundante durante la pos-cosecha, controlar intercambio de gases que además de frenar la respiración retardaría la actividad enzimática y la oxidación, restringir el intercambio de compuestos volátiles y proteger de daño físico al fruto y cuando sea posible ser portador de ingredientes funcionales.

Cuadro 1. Atributos de calidad de frutas y hortalizas frescas según Lin y Zhao (2007).

Factor de calidad	Preocupación primaria
Apariencia (visual)	Tamaño Forma Color: intensidad, uniformidad Brillo
Textura	Firmeza/ Suavidad Frescura Jugosidad Consistencia
Sabor y aroma	Dulzura Acidez Astringencia Amargura Compuestos volátiles
Valor nutritivo	Vitaminas Minerales
Seguridad	Sustancias tóxicas Contaminantes químicos Contaminación microbiana

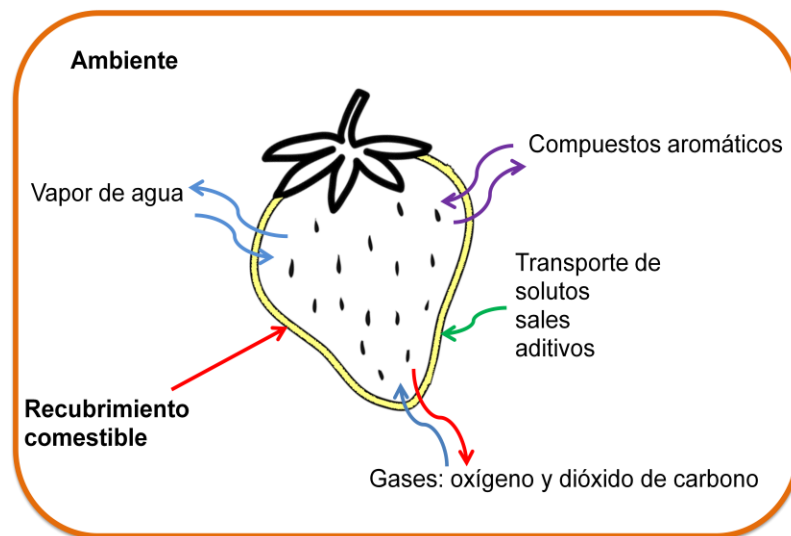


Figura 1. Principales funciones de un recubrimiento comestible aplicado en un tejido vivo (adaptado de Rojas-Graü y col., 2007).

La elección del material para un recubrimiento comestible, depende del fruto destino y el éxito se basa en sus propiedades de barrera a la humedad, oxígeno y dióxido de carbono. Estas propiedades son especialmente importantes pues se trata de un tejido vivo, que sigue respirando después de cortado, y dependen de la composición química del material utilizado (Rojas-Graü, 2006; May, 2009). Se han estudiado en productos frescos los recubrimientos comestibles a base de proteínas incluyendo celulosa, caseína y zeína y se ha observado que confieren buenas propiedades de barrera al fruto en cuestión y además son inodoros, insípidos y transparentes (Lin y Zhao, 2007). El Cuadro 2 muestra algunas investigaciones desarrolladas al respecto y los resultados obtenidos en cuanto a la función primaria del recubrimiento. Sin embargo, el éxito de estos recubrimientos todavía está limitado por lo que sigue siendo imperativo diseñar recubrimientos que proporcionen mejores propiedades de barrera, dejando en claro que la permeabilidad, absorción y difusión del agua, oxígeno y dióxido de carbono son las propiedades funcionales más importantes de un recubrimiento comestible aplicado en frutas y vegetales.

Los fenómenos de migración siempre están dictados por la estructura de la película y las interacciones a nivel molecular; las moléculas de agua o gases se difunden a través de las cadenas de polímeros y las cadenas laterales que se mantienen en su lugar por interacciones como puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. En ese sentido, las cadenas laterales pueden tener influencia benéfica o perjudicial en la permeabilidad de la película pues disminuyen el espacio intramolecular disponible para la difusión lo que hace este fenómeno más difícil, empero la película puede presentar irregularidades estructurales que afectarían la calidad visual del fruto (Pavlath y Orts, 2009).

Un fenómeno de difusión muy importante es la permeabilidad al vapor de agua (PVA), definida como la razón a la que el vapor de agua atraviesa una unidad de superficie o espesor de cierto material, transmisión que es provocada por la

diferencia de presión existente a ambos lados del material, bajo ciertas condiciones de temperatura y humedad relativa. (McHuhg y Krochta, 1994).

Cuadro 2. Ejemplos de recubrimientos aplicados en frutas y hortalizas frescas (Lin y Zhao, 2007).

Producto	Material de recubrimiento	Función primaria del recubrimiento
Manzana	Caseinato; WPI	Barrera al O ₂ ; transporte de antioxidantes
Manzana (recién cortada)	HPMC Alginato; gelatina; CMC Zeína Carragenina; WPC WPI-BW emulsión Metilcelulosa	Barrera al O ₂ /agua Barrera al O ₂ /CO ₂ /agua Barrera al O ₂ /CO ₂ /agua, brillo Barrera al O ₂ /agua Barrera al O ₂ Barrera al O ₂ /CO ₂ /agua
Aguacate	Goma xanthana	Barrera al agua; transporte de Ca ²⁺ y Vit.E
Zanahoria (pelada)	Caseinato de calcio; WPI; pectina; CMC Alginato Caseinato	Barrera al agua Barrera al agua; barrera microbiana Barrera al O ₂ /CO ₂ /agua; transporte de antimicrobiano
Kiwi	Base de alginatos	Barrera al O ₂ /CO ₂
Lechuga	Alginato	Barrera al O ₂ /CO ₂ /agua
Champiñón	Cera, CMC	Barrera al agua
Durazno	HPMC/ composición de lípidos	Barrera al O ₂ /CO ₂ /agua
Ciruela	Caseinato; proteína de suero lácteo	Barrera al O ₂ ; transporte de antioxidantes
Papa	Quitosano	Barrera al agua; transporte de Ca ²⁺ y Vit.E
Frambuesa	Mucílago de cactus	Barrera al O ₂
Fresa	Caseinato-WPI Quitosano Pululano A base de almidón A base de gluten de trigo	Barrera microbiana Barrera al agua; transporte de Ca ²⁺ y Vit.E Barrera al O ₂ /CO ₂ /agua Barrera al agua; barrera antimicrobiana Barrera al O ₂ /agua

HPMC=Hidroxipropilmetilcelulosa; CMC=Carboximetilcelulosa; WPC= Concentrado de proteína de leche; WPI= Aislado de proteína de suero de leche; BW= Cera de abeja.

En frutas frescas cortadas los dos grandes grupos de materiales que suelen usarse son los polisacáridos y las proteínas (Rojas-Graü y col., 2007); la Figura 2 resume los materiales utilizados comúnmente en frutas y hortalizas frescas y mínimamente procesadas. Los siguientes apartados dan una breve semblanza de los materiales utilizados en estos recubrimientos y más adelante se tratarán de forma específica los materiales de interés para el desarrollo de este trabajo.

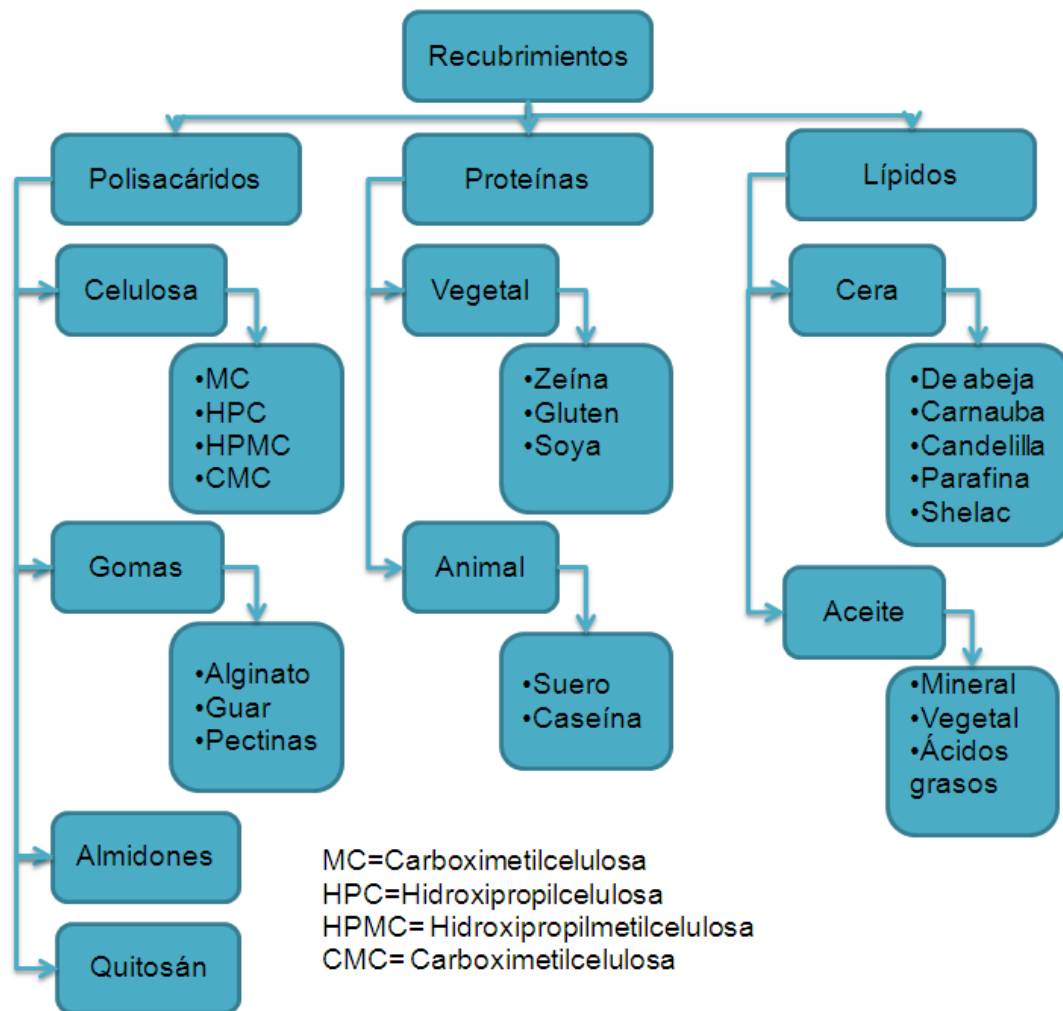


Figura 2. Principales materiales utilizados en recubrimientos para frutas y hortalizas frescas y mínimamente procesadas (Barbosa-Cánovas y Olivas, 2009).

II.2.1. Polisacáridos

Los polisacáridos son compuestos muy utilizados en la formulación de recubrimientos comestibles pues crean una barrera contra gases como el O₂ y el CO₂ sin embargo, debido a su naturaleza hidrofílica son pobres barreras contra la humedad y por tanto sus valores de PVA son altos si se comparan con películas plásticas comerciales. Los polisacáridos utilizados en la formulación de recubrimientos comestibles son el almidón y sus derivados, los derivados de celulosa como la metilcelulosa y la hidroxipropilmetilcelulosa, alginatos, carragenina, quitosano, pectina y sus derivados, extractos de algas marinas y varias gomas, que han sido utilizados también en frutas y hortalizas frescas (Vargas y col., 2008; Bourtoom, 2008; Barbosa-Cánovas y Olivas, 2009).

Las variaciones a nivel molecular de los polisacáridos, como el peso molecular, grado de ramificación, conformación en el espacio, cargas eléctricas e hidrofobicidad alterarán las propiedades fisicoquímicas y rendimiento del recubrimiento (Vargas y col., 2008).

II.2.2. Proteínas

Las proteínas pueden formar recubrimientos comestibles principalmente por su capacidad para formar enlaces intermoleculares entrecruzados y las propiedades de la película están dadas por esas interacciones. Al igual que los recubrimientos a base de polisacáridos, los recubrimientos a base de proteínas presentan propiedades de barrera contra gases, pero suelen ser pobres barreras contra el agua. Las proteínas que se han utilizado en el recubrimiento de frutas y hortalizas son la zeína, el gluten y proteína de soya, gluten de trigo, la proteína de suero de leche y la caseína e incluso la proteína de semilla de algodón (Cisneros-Zevallos y Krochta, 2003a; Barbosa-Cánovas y Olivas, 2009).

Propiedades de las proteínas como el peso molecular, la conformación espacial, las características eléctricas, flexibilidad y estabilidad térmica repercutirán en última instancia en la capacidad de una determinada proteína para formar un recubrimiento y conferirle características específicas (Vargas y col., 2008).

II.2.3. Lípidos

La función primaria del uso de lípidos en recubrimientos comestibles es la barrera en contra de la humedad debido a su baja polaridad. Su uso siempre está asociado a un polímero que proporcione resistencia mecánica al recubrimiento. Lípidos neutros, ácidos grasos, ceras (candelilla, carnauba y abeja) y resinas son comúnmente utilizados en recubrimientos para productos frescos, y pueden ser adicionados como una capa lipídica dispersa en una red de hidrocoloide o como una capa secundaria, esto es, una capa lipídica sobre una capa de hidrocoloide. Las propiedades finales de los recubrimientos adicionados con lípidos dependerán de las características de estos componentes tales como su estado físico, grado de saturación y longitud de la cadena (Lin y Zhao, 2007; Bourtoom, 2008; Vargas y col., 2008; Barbosa-Cánovas y Olivas, 2009).

II.3. Recubrimientos comestibles a base de proteína de suero de leche

El suero de leche es el líquido resultante de la coagulación de la leche durante la elaboración del queso y constituye el 90% del peso de la leche. Su composición varía dependiendo de las características de la leche y de las condiciones de elaboración del queso del que proceda. Las proteínas de suero de leche son la β -lactoglobulina seguida de la α -lactoalbúmina, la seroalbúmina bovina y varias inmunoglobulinas (García-Garibay y col., 2004).

Las proteínas de suero son solubles en agua y sufren desnaturalización cuando se exponen a calor, la carga se distribuye uniformemente a lo largo de toda la cadena. La β -lactoglobulina consta de aproximadamente 160 aminoácidos y con un peso

molecular de 18.3 kDa, es termolábil y estable a cambios de pH. Para la formación de recubrimientos hay un importante grupo sulfhidrilo libre en la posición cisteína 121 y dos puentes disulfuro entre cisteína 66-cisteína 160 y cisteína 106-cisteína 119. En la forma nativa de la β -lactoglobulina, el grupo sulfhidrilo libre se encuentra oculto por la alfa-hélice, debido a eso, para la formación del recubrimiento es necesario un tratamiento de desnaturalización de tal forma que el grupo tiol quede disponible con la consecuente formación de nuevos enlaces disulfuro intermoleculares y así los recubrimientos obtenidos sean más fuertes e íntegros comparados con los formulados con proteína sin desnaturalizar (Cisneros-Zevallos y Krochta, 2003b; Fernández y col., 2005).

La α -lactoalbúmina contiene también cuatro puentes disulfuros internos que pueden ser expuestos durante la desnaturalización para un reacomodo de interacciones disulfuro intermoleculares. Los tratamientos de desnaturalización para la formación de un recubrimiento consisten en someter a la solución filmogénica a un tratamiento térmico en baño de agua de 75 a 100°C por 30 minutos (Regalado y col., 2006; Magaña, 2007; Dangaran y col., 2009).

Se ha estudiado el uso de concentrados de proteína láctea con 25% y 80% (WPC) y el uso de aislados con un 90% de contenido de proteína láctea (WPI) en distintos alimentos entre los que se incluyen las frutas y hortalizas mínimamente procesadas (Badui, 2006; Barbosa-Cánovas y Olivas, 2009). Se ha demostrado también que las películas a base de WPI y WPC son flexibles y transparentes con excelentes propiedades de barrera a aromas y al oxígeno en humedades relativas bajas. No obstante, otras investigaciones han mostrado la pobre barrera contra la humedad de las películas obtenidas a partir de aislados o concentrados de proteína láctea y han reportado que la adición de lípidos a la formulación disminuye la permeabilidad al vapor de agua (Pérez-Gago y col., 2003). La adición de lípidos afecta no solo las propiedades de barrera sino también las propiedades mecánicas del recubrimiento. Se ha reportado que el uso de ácidos saturados de cadena larga como el ácido esteárico disminuye la elasticidad y aumenta la resistencia a la tensión y además

disminuye la permeabilidad al vapor de agua (Fernández y col., 2005). El uso de plastificantes también influye en las propiedades finales de los recubrimientos a base de WPI. Por otro lado, cuando aumenta la concentración de WPI en un recubrimiento se forma una estructura con poros más grandes, estos poros son más pequeños si se usa sorbitol como plastificante en vez de glicerol y cuando el pH aumenta de 7 a 9 aumenta la tendencia a la rotura pero disminuye la permeabilidad al oxígeno (Regalado y col., 2006).

Se ha mezclado WPI con otros materiales de empaque para proporcionar barreras al oxígeno y humedad y así extender la vida del producto, por ejemplo la mezcla WPI-caseinato fue utilizada en rodajas de manzana y papas y se reportó un retardo en el oscurecimiento por la acción del recubrimiento como barrera al oxígeno (Dangaran y col., 2009).

En general, las propiedades de las películas a base de proteínas de suero de leche pueden verse afectadas por los tipos de ingredientes utilizados para formular la solución filmogénica, entre los que se incluyen plastificantes, agentes antimicrobianos y lípidos, también por las condiciones de secado de la película pues con aceleración en el secado se han reportado valores más bajos de permeabilidad al vapor de agua con respecto a las películas con un secado lento (Regalado y col., 2006; Lin y Zhao, 2007; Magaña, 2007).

II.4. Recubrimientos comestibles a base de almidones modificados

El almidón es un carbohidrato que ha formado parte de la dieta humana desde tiempos prehistóricos y en la actualidad es un componente indispensable también por el uso que se le da a nivel industrial pues casi cada industria existente utiliza almidón o sus derivados. Relativo a su función biológica el almidón es el polisacárido que se ve más involucrado en la proporción de energía a plantas. Aunque está ampliamente distribuido en la naturaleza, las fuentes más comunes del almidón son: el maíz, la papa, el trigo, la tapioca y el arroz. Químicamente el

almidón es una mezcla de dos polisacáridos: la amilosa o α -D-(1,4)-glucano que se caracteriza por largas cadenas lineales de 200-2500 unidades, cuya unidad repetitiva es la α -maltosa y que puede adquirir una conformación espacial helicoidal, en la que cada vuelta de la hélice consta de seis moléculas de glucosa; y la amilopectina que consta de una cadena lineal como la amilosa pero que además contiene ramificaciones con enlaces α -D-(1,6) localizados cada 15-25 unidades lineales de glucosa, el peso molecular de la amilopectina es mucho mayor que el de la amilosa. Cuando la planta produce moléculas de almidón, éstas son depositadas en capas sucesivas formando un gránulo fuertemente compactado; así, las moléculas de amilosa pueden asociarse a otras moléculas de amilosa y a las ramificaciones exteriores de las moléculas de amilopectina a través de puentes de hidrógeno de forma paralela, estas zonas son llamadas zonas amorfas. Las cadenas de amilopectina son las responsables de la zonas cristalinas del gránulo (Zobel, 1988). El gránulo de almidón presenta birrefringencia, lo que quiere decir que tienen dos índices de refracción produciendo la típica “cruz de malta” cuando se irradia sobre ellos luz polarizada. La amilosa es la molécula del almidón mayormente asociada con su capacidad para formar recubrimientos en vista de su naturaleza lineal. Cuando se aplica calor a un almidón y en presencia de agua los gránulos comienzan a captarla y conforme aumenta la temperatura el gránulo se hidrata más y más hasta que se hincha completamente y se pierde el orden molecular. A este fenómeno se le conoce como gelatinización y para cada almidón el intervalo de temperaturas en el que se produce es diferente (National Starch and Chemical Company, 1994; Badui, 2006; Kramer, 2009).

Se usan almidones nativos o modificados en la formulación de recubrimientos comestibles tanto por su disponibilidad y variedad como por la cantidad de amilosa y amilopectina que pueden contener. Para que este material forme la matriz del recubrimiento requiere de una gelatinización, lo cual se logra mediante el tratamiento en frío alcalino con NaOH o un tratamiento térmico acuoso que es más utilizado (Liu y Han, 2005; Singh y col., 2007).

La principal limitante en el uso de almidones nativos para recubrimientos comestibles es su naturaleza hidrofílica, las modificaciones químicas a los almidones es una alternativa viable para mejorar sus propiedades y a la postre mejorar las películas del recubrimiento. La modificación química consiste en introducir a la molécula grupos funcionales mediante reacciones de esterificación, eterificación o entrecruzamiento o someterlo a reacciones de descomposición ácida, hidrólisis enzimática u oxidación. Ya se ha reportado el uso de almidones modificados en recubrimientos comestibles e incluso en combinación con otros biopolímeros o agentes hidrofóbicos que sirven de barrera para el vapor de agua y otras aplicaciones (García y col., 2000; Kim y col., 2002; García y col., 2008; López y col., 2008).

II.5. Recubrimientos a base de almidones modificados y proteína

Recientes investigaciones están enfocadas al uso de mezclas de biopolímeros, como almidones y proteínas, con el fin de mejorar las características de recubrimientos combinando sus propiedades para adaptarlas a las necesidades de un producto específico. Debido a los re-arreglos de los enlaces disulfuro de una proteína, se obtienen películas con buenas propiedades estructurales y por separado las películas a bases de almidones tienen ventajas en el control de intercambio de gases. Cada uno de estos biopolímeros se ha utilizado en formulación en combinación de cera y lípidos, no obstante, pueden crearse recubrimientos con mezclas que disminuyan por ejemplo la permeabilidad al vapor de agua, conociendo los comportamientos de ambos materiales (Jagannath y col., 2003; Wang, 2007).

II.6. Incorporación de antimicrobianos a recubrimientos comestibles

Una forma de mejorar la funcionalidad de los recubrimientos comestibles es incorporar agentes antimicrobianos de origen natural o químico a las formulaciones, acción que permite proveer al alimento de una protección en contra del deterioro o

contra la invasión de patógenos que pueden representar un peligro para el consumidor. El uso de antimicrobianos de origen natural está actualmente en auge pues el consumidor trata de evitar el consumo de sustancias químicamente sintetizadas, y en estudios *in vitro* se ha demostrado que las películas obtenidas son eficientes contra un amplio espectro de microorganismos, sin embargo hace falta probar la eficiencia de estas formulaciones en sistemas alimentarios reales y el impacto en estos de la adición del antimicrobiano (Appendini, 2002; Mistry, 2006; Vargas y col., 2008).

III. HIPÓTESIS

Las propiedades de los recubrimientos comestibles obtenidos a partir de almidones modificados en mezcla con aislado de proteína de suero lácteo, agentes hidrófobos y antimicrobianos posibilitan su aplicación en alimentos.

IV. OBJETIVOS

IV.1. General

Diseñar y caracterizar recubrimientos comestibles a base de almidones modificados en mezcla con aislado de proteína de suero lácteo, adicionados de agentes hidrófobos y antimicrobianos, para una posible aplicación en alimentos.

IV.2. Específicos

- Formular recubrimientos a base de almidones-proteína de suero lácteo, incorporando aceite o emulsión de cera.
- Evaluar la permeabilidad al vapor de agua, espesor, opacidad y solubilidad de los recubrimientos formulados.
- Aplicar los recubrimientos formulados a un alimento seleccionado para conocer su pérdida de peso bajo estas condiciones.
- Determinar el efecto antimicrobiano de los recubrimientos formulados adicionados de un antimicrobiano de origen natural contra el hongo deteriorador *Botrytis cinerea* ATCC 12481.

V. METODOLOGÍA

V.1. Material

V.1.1. Material biológico

Fresas (Catarina produce, E.U.A.), *Botrytis cinerea* ATCC 12481. *Aspergillus niger* ATCC 9642, *Penicillium pinophilum* ATCC 11797, *Chaetomium globosum* ATCC 6205, *Gliocadium virens* ATCC 9645, *Aureobasidium pullulans* ATCC 15233.

V.1.2. Medios de cultivo

Medio V8 cuya composición es (g/L): carbonato de calcio (Sigma, E.U.A.), 3; agar bacteriológico (Bioxon, México), 15; jugo V8 (Herdez, México), 200 mL/L.

Medio rosa de bengala-cloranfenicol (RBC), cuya composición es (g/L): peptona de caseína (Bioxon), 5; glucosa (Sigma), 10; KH_2PO_4 (Sigma), 1; Mg_2SO_4 (Sigma), 0.5; rosa de bengala (Bioxon), 0.05; cloranfenicol (Sigma), 0.1; agar bacteriológico, 15.5.

Agar papa-dextrosa (Bioxon), que contiene 2% (w/v) de agar bacteriológico y 2% (w/v) de glucosa.

Agar nutrientes-sales, cuya composición es (g/L): KH_2PO_4 (Sigma), 0.7; Mg_2SO_4 (Sigma), 0.7; NH_4NO_3 (Baker, México), 1.0; NaCl (Baker, México), 0.005; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Baker, México), 0.002; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma), 0.002; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Baker, México), 0.001; agar bacteriológico, 15; K_2HPO_4 (Sigma), 0.7.

Caldo fresa: 5 fresas de tamaño regular obtenidas del mercado local molidas en 100 mL de agua destilada con cloranfenicol (Sigma), 0.1 g/L.

V.1.3. Reactivos

Aislado de proteína de suero lácteo al 90% (w/w) (WPI, New Foods, EUA), almidones modificados [acetilado-entrecruzado (muestra obsequiada por el Dr. Arturo Bello, Ceprobi, IPN), fosfatado convencionalmente y fosfatado por extrusión (muestras procesadas bajo la asesoría del Dr. Fernando Martínez, Cinvestav-Querétaro), sorbitol no cristalizable (CPIngredientes), cera de abeja (Grupo Aselac), ácido esteárico (Baker, México), morfolina (Sigma), aceite alto en trioleína (Oleico, México), carbonato de potasio (Sigma), natamicina (Nutrer, EUA), Mirenat-LA (Vedeqsa, España), ϵ -poli-lisina (Handary, Holanda), Tween 20 (Sigma), acetato de zinc (Baker, México), ácido nítrico (Baker, México), vanadato de amonio (Sigma), molibdato de amonio (Sigma), tripolifosfato de sodio (Sigma), fosfato diácido de potasio (Sigma).

V.2. Métodos

V.2.1. Modificación de almidones

V.2.1.1. Fosfatación convencional

A una suspensión de almidón de maíz céreo (100 g/167 mL de agua destilada) se adicionó una solución que contenía 12.6 g de tripolifosfato de sodio por cada 100 g de almidón en base seca, cuyo pH para completa disolución se ajustó a 4.5. La suspensión se agitó por 20 minutos a temperatura ambiente, después se agitó y centrifugó por 10 min a 6,500 rpm. El residuo se secó en una estufa a 45°C por 24 h, después se pulverizó en molino de café (Braun). El polvo seco se colocó en una estufa a 65°C/90 min y posteriormente a 155°C/20 min, después se lavó dos veces con agua destilada, se centrifugó (6,500 rpm/10 min) y se secó en una estufa a 45°C. El sólido se pulverizó en un molino Pulvex, (México 200) usando una malla con una apertura de 500 μ m (U.S. No. 40) para posterior uso en la formulación de las películas.

V.2.1.2. Fosfatación por extrusión termoplástica

Se ajustó el contenido de humedad de un kg de almidón céreo de maíz a 18% (p/p) con una solución de tripolifosfato de sodio, adicionando 4 g de la sal por cada 100 g de almidón en base seca. La muestra fue almacenada a 4°C por 12 h en bolsas de polietileno de alta densidad para posterior tratamiento en un extrusor diseñado y manufacturado por Cinvestav-IPN. Las temperaturas de barril fueron 70°C para la zona de alimentación, 140°C para la zona de transición y 175°C para la zona de alta presión. La velocidad de tornillo utilizada fue de 80 rpm y la velocidad de alimentación de 20 rpm. La relación de compresión del tornillo fue de 3:1 y el diámetro del dado de salida fue de 4.0 mm. Después de la extrusión la muestra se pulverizó en molino de martillos (Pulvex) y fue almacenada para posterior uso.

V.2.1.3. Medición de grado de sustitución de almidones fosfatados

Para medir el grado de sustitución de almidones fosfatados se siguió el método descrito por Smith y Carusso (1964), que se basa en la reacción de Misson, en la cual el fósforo, presente como ortofosfato, reacciona con un reactivo de vanadato-molibdato en condiciones ácidas, dando lugar a un complejo estable naranja-amarillo de ácido vanado-molibdo-fosfórico ($H_3PO_4, VO_3, 11MoO_3, nH_2O$) (Kirk y col., 1996) (Figura 3).



Figura 3. Apariencia de las muestras de almidones fosfatados.

Se preparó una curva de calibración a partir de una solución estándar de fósforo, para lo cual se utilizó KH_2PO_4 que se secó a 105°C por 24 h. Se preparó una solución estándar de 0.2 g de fósforo/mL, y se transfirieron volúmenes de 0, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40, y 50 mL a matraces aforados de 100 mL (0-10 mg de fósforo en 100 mL). Se acidificó cada solución con 10 mL de HNO_3 al 29% (p/p) con adición posterior de 20 mL de reactivo de vanadato-molibdato, se aforó a 100 mL, se dejó reposar por 10 min cada solución y se midió absorbancia a 460 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10 UV, E.U.A.). Se preparó también un blanco aforando a 100 mL con agua destilada una solución que contenía solamente 10 mL de HNO_3 al 29% y 20 mL de reactivo vanadato-molibdato.

El reactivo de vanadato-molibdato se preparó mezclando cuidadosamente una solución de molibdato de amonio al 5% (p/v) y una solución de vanadato de amonio al 0.25% (p/v) en relación 1:1.

Para determinar el contenido de fósforo de cada almidón, se pesaron 10 g de muestra y fueron adicionados 10 mL de solución de acetato de zinc al 10% (p/p) al crisol contenedor. La solución se evaporó y se llevó a ignición en mufla a 550°C por 2 h. Después, se enfrió el crisol contenedor hasta temperatura ambiente y el residuo fue humedecido con 3 mL de una solución de ácido nítrico al 29% que también se evaporó. Se colocó nuevamente la muestra en la mufla a 550°C por 30 min. Se dejó enfriar el crisol contenedor y se lavó la muestra con 10 mL de ácido nítrico al 29% y 15 mL de agua destilada, solución que se llevó a ebullición por 10 min, se enfrió, se filtró en papel filtro Whatman No. 4 sobre un matraz volumétrico de 100 mL. A cada matraz volumétrico se adicionaron 10 mL de la solución de HNO_3 al 29% y 20 mL del reactivo de vanadato-molibdato agitando vigorosamente y se aforó, se dejó reposar 10 min antes de medir la absorbancia a 460 nm. La determinación se hizo por triplicado para cada almidón fosfatado.

El porcentaje de fosforo en base seca de cada almidón se utilizó para determinar el grado de sustitución (DS) con la ecuación 1.

$$DS = \frac{162 P}{(3100 - 102 P)} \quad [1]$$

Donde: P = Porcentaje de fósforo en el almidón fosfatado (en base seca).

V.2.2. Obtención de soluciones filmogénicas a partir de almidones modificados y proteína.

Las películas de almidones se prepararon a partir de dispersiones acuosas del almidón respectivo en agua destilada, que se calentaron a 75 °C durante 20 min. Después se enfrió la solución en baño de hielo y posteriormente se llevó a cabo un tratamiento en autoclave por 15 min a 121°C, 15 libras de presión, después de lo cual, las soluciones filmogénicas se agitaron con la ayuda de un agitador magnético y se enfriaron en baño de hielo. Se adicionó el agente hidrofóbico de acuerdo al diseño experimental que se describe en el apartado V.2.6. La emulsión de cera se incorporó a la solución filmogénica con la ayuda de un agitador magnético, en cambio, después de adicionar el aceite, la solución filmogénica se trató con un mezclador de alta velocidad a 21,500 rpm durante 3 min. Cada solución se desgasificó al vacío por 10 min. Se extendieron las soluciones filmogénicas en una superficie de vidrio o acrílico de 20x20 cm (Figura 4). El volumen añadido fue de 120 µL por cm². Se dejaron secar por 48 horas a temperatura ambiente. Para preparar soluciones filmogénicas a partir de aislado proteína de suero lácteo (WPI), ésta se disolvió previamente en agua, se ajustó el pH de la solución a 8.5 y se calentó en baño de agua por 25 min para desnaturalizar la proteína sin que se precipite, se enfrió en baño de hielo y se adicionó en la cantidad requerida a la solución filmogénica del almidón correspondiente.

La emulsión de cera y ácido esteárico se preparó según lo expuesto por Hagenmaier y Baker (1994). Se mezclaron 100 g de cera de abeja, 15 g de ácido esteárico y se fundieron a 128 °C se añadieron 15 g de morfolina y la mezcla

obtenida se adicionó a 350 mL de agua en ebullición bajo la acción de un mezclador de alta velocidad a 21,500 rpm por 3 min. Inmediatamente se enfrió en baño de hielo y se filtró a través de tela tipo manta de cielo, la emulsión se mantuvo en refrigeración hasta su uso en la elaboración de películas comestibles.

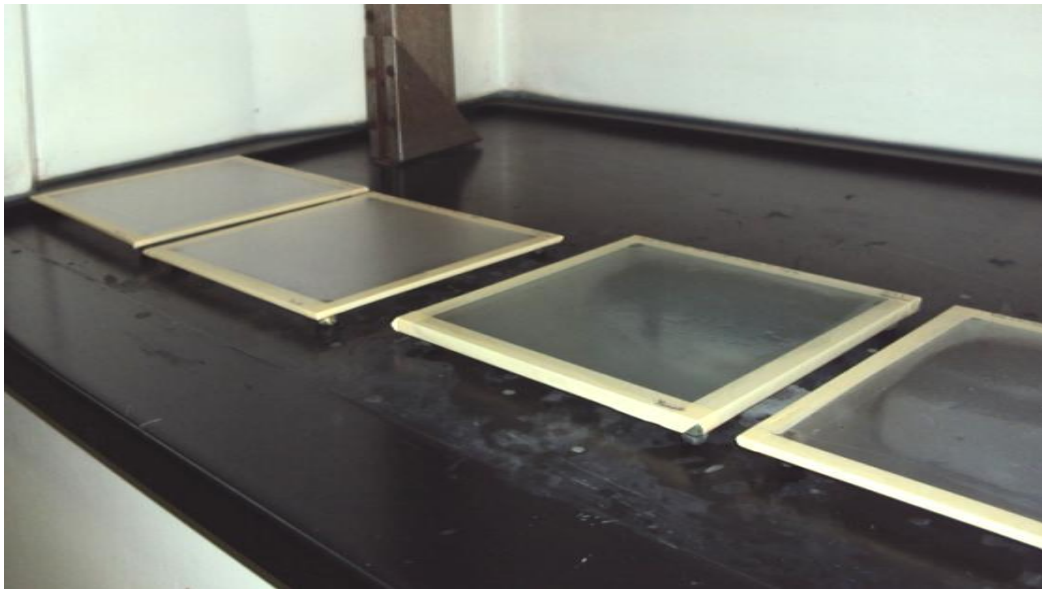


Figura 4. Secado a temperatura ambiente de películas formuladas.

V.2.3. Determinación de las propiedades *in vitro* de las películas obtenidas

V.2.3.1. Determinación de permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) se midió de acuerdo al método propuesto por Magaña (2007), que es una modificación del método ASTM: E96-00 (2000) y que se basa en la aplicación de la ley de Fick (Ecuaciones 2 y 3). Consistió en tapar, con las películas obtenidas, celdas de vidrio que contenían agua destilada (Figura 5). Previamente, a cada película se determinó su área de transferencia midiendo su espesor. Las celdas se equilibraron por 1 h en un desecador cuya humedad fue del 43% (Figura 6).

$$PVA = \frac{G/t \cdot x}{A \Delta P} \quad [2]$$

$$\Delta P = \frac{P^*}{100} (HR_2 - HR_1) \quad [3]$$

- Donde:
- PVA = Permeabilidad al vapor de agua
 - $\frac{G/t}{A}$ = Permeanza
 - x = Espesor medio de la película
 - A = Área de la película
 - P* = presión de vapor del agua a la temperatura del experimento
 - HR₁ = Humedad al interior de la celda
 - HR₂ = Humedad del interior de la cámara

El término G/t de la ecuación (2), se obtiene como la pendiente de la línea recta resultante de graficar la pérdida de peso con respecto al tiempo, para lo cual se registró la pérdida de peso de las celdas a las 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 24 horas. En cada determinación se registró también la humedad relativa y la temperatura. El anexo muestra un ejemplo del cálculo de PVA de una película correspondiente a una formulación.

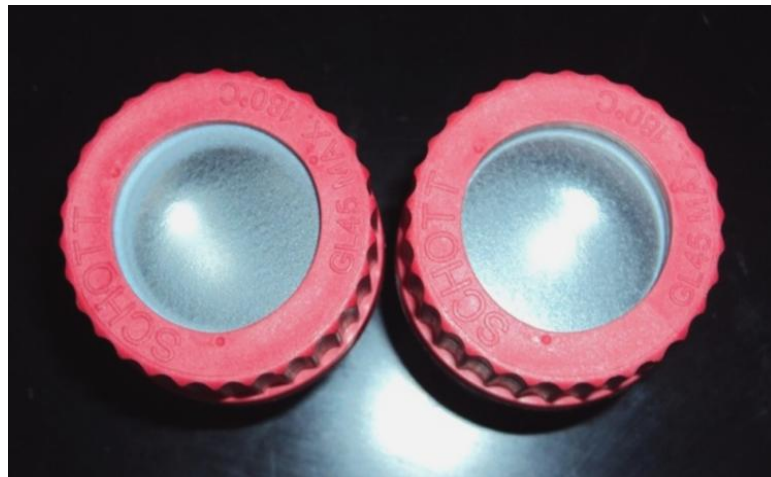


Figura 5. Celdas de vidrio para la medición de permeabilidad al vapor de agua.



Figura 6. Sistema de medición de permeabilidad al vapor de agua.

V.2.3.2. Medición de la materia soluble total de los recubrimientos

Se midió el porcentaje de materia soluble total en base a lo expuesto por Romero-Bastida y col. (2005) y López y col. (2008) con algunas modificaciones. Una vez obtenidas las películas se cortaron cuadros de 3x4 cm aproximadamente, los cuales se secaron a 60 °C hasta peso constante. Se pesó cada película con una precisión cercana a 0.1 mg, se colocaron en frascos de vidrio de 100 mL con 80 mL de agua destilada por 24 h con agitación ocasional y a temperatura ambiente. Se recuperó la película no disuelta sacando cuidadosamente el agua de los frascos de vidrio con una pipeta serológica, la película no disuelta se secó hasta peso constante a 60°C. Se calculó el porcentaje de materia soluble (%MS) con la ecuación 4:

$$\% \text{ MS} = \frac{P_o - P_f}{P_o} \quad [4]$$

Donde: P_o = Peso seco inicial de la película.

P_f = Peso seco final de la película.

Las mediciones se hicieron por triplicado para cada experimento.

V.2.3.3. Medición de la opacidad de los recubrimientos

Se determinó usando un espectrofotómetro UV-Vis (Genesys 10UV) para lo cual se cortó un rectángulo de cada película del tamaño de uno de los lados internos por los que pasa el haz de luz en una celda espectrofotométrica. Se hizo un barrido de absorbancia de 400 a 700 nm para cada muestra, la opacidad es definida como el área bajo la curva de este barrido y se expresó como unidades de absorbancia x micrómetro ($AU \cdot \mu m$). Lo anterior en base a lo expuesto por López y col. (2008) y Hu y col. (2009).

V.2.3.4. Medición del espesor de las películas

El espesor de cada película se midió en cinco puntos al azar con un micrómetro digital (Figura 7) y el promedio de las mediciones realizadas se expresó en micrómetros \pm desviación estándar (DE).



Figura 7. Medición de espesor de películas.

V.2.4. Empleo de las soluciones filmogénicas para el recubrimiento de alimento seleccionado

De acuerdo al análisis con el paquete estadístico JMP versión 5.0.1, la mejor formulación fue utilizada para recubrir un alimento modelo seleccionado. De acuerdo a lo expuesto por García y col. (1998), se eligieron fresas de tamaño uniforme, sin daños mecánicos o infecciones fúngicas visibles, las cuales se sanitizaron siendo sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio a 250 ppm por 1 min, se secaron en campana de flujo laminar por 30 min. Después se sumergieron en la solución filmogénica correspondiente por un min, según se muestra en la Figura 8, con posterior secado en campana de flujo laminar por 2 h y se evaluó la pérdida de peso.

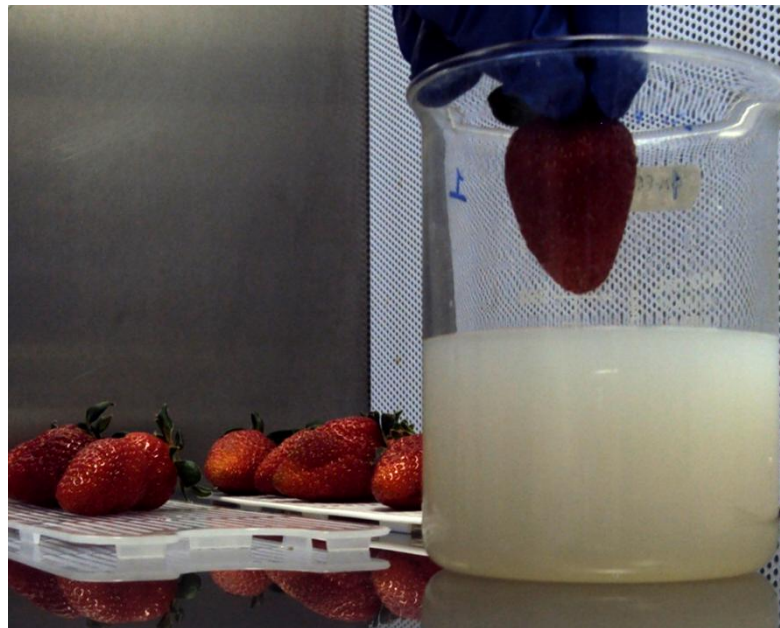


Figura 8. Recubrimiento de fresas.

V.2.4.1. Evaluación de la pérdida de peso del alimento seleccionado recubierto

Se utilizaron lotes de 5 fresas para recubrirlas con las soluciones filmogénicas seleccionadas y un control en el que el paso del recubrimiento se sustituyó por inmersión en agua destilada estéril. Se almacenaron a 4°C y a una humedad

relativa de 98% y se registró su pérdida de peso a 1, 2, 3, 4, 5 y 6 días de almacenamiento, los resultados fueron expresados como porcentaje de pérdida de peso con respecto al peso inicial. El experimento se realizó por duplicado.

V.2.5. Experimentos microbiológicos

V.2.5.1. Preparación de inóculo de *Botrytis cinerea* ATCC 12481

Botrytis cinerea se sembró en matraces de 250 mL con 50 mL de medio V8 y se incubó por 10 días a 25°C o hasta que el micelio cambió de color que indicaba esporulación. Las esporas se recuperaron adicionando al matraz 10 mL de solución estéril de Tween 20 al 0.1% y un agitador magnético también estéril, se contaron en una cámara Neubauer (como se muestra en los anexos) y se ajustó a la concentración deseada con agua destilada estéril.

V.2.5.2. Concentración mínima inhibitoria de los antimicrobianos seleccionados contra *Botrytis cinerea* ATCC 12481

Para establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) se evaluaron tres antimicrobianos a distintas concentraciones; natamicina a 5, 10, 15, 25 y 50 ppm; Mirenat-LA y ϵ -poli-lisina a 250, 500, 1,000, 2,000 y 3,000 ppm, se prepararon tubos de ensaye con caldo fresa adicionados del antimicrobiano con la concentración deseada que además contenían una concentración de 1×10^5 de esporas/mL para un volumen total de 4 mL en cada tubo. A las 24 h de incubación, se sembraron 100 μ L de cada tubo de ensaye por extensión en agar RBC. Se monitoreó el crecimiento del hongo a los 1, 3 y 5 días y por triplicado según lo expuesto por López-Malo y col. (2005).

V.2.5.3. Ensayo *in vitro* de la efectividad de los recubrimientos contra la germinación de esporas y crecimiento de *Botrytis cinerea* ATCC 12481

De acuerdo al efecto del antimicrobiano observado se eligió Mirenat-LA como antimicrobiano para adicionar a la formulación seleccionada, el proceso de obtención de las películas fue el descrito en el apartado V.2.1 y la formulación elegida con la que los lotes de fresa presentaron menor pérdida de peso. Después de desmoldar las películas, se cortaron círculos de 8 mm de diámetro que se esterilizaron con una lámpara de luz ultravioleta por 12 h. Se colocaron sobre una caja petri con agar papa dextrosa preparado con Tween 20 al 50% (2mL/ 100mL de agar) como se muestra en la Figura 9. Se probaron tres concentraciones de Mirenat-LA en base al experimento de la CMI, las concentraciones adicionadas a 50 mL de solución filmogénica fueron la CMI obtenida mediante dilución en caldo, 10 y 20 veces la CMI. Se incubó por 5 días y el experimento se hizo por duplicado.

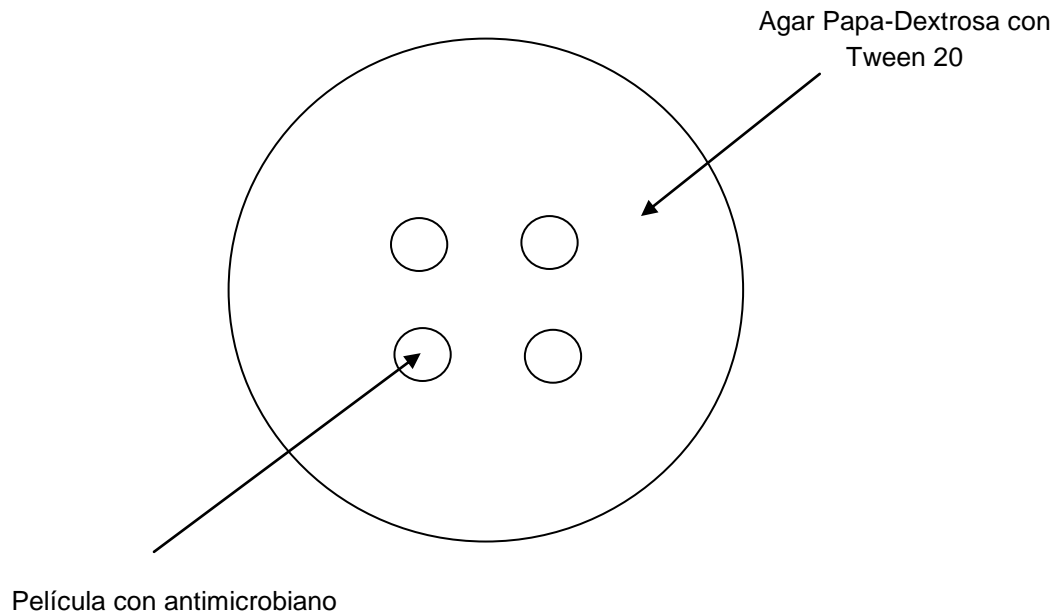


Figura 9. Ensayo de la efectividad de los recubrimientos contra *Botrytis cinerea* ATCC 12481.

V.2.5.4. Ensayo de biodegradabilidad

Se llevó a cabo con tres formulaciones escogidas a partir de los resultados del diseño experimental. Se siguió la técnica ASTM D618 (ver anexos) con algunas modificaciones. Se prepararon suspensiones de esporas de los siguientes microorganismos: *Aspergillus niger*, *Penicillium pinophilum*, *Chaetomium globosum*, *Gliocadium virens*, *Aureobasidium pullulans*, que previamente se cultivaron a partir de conservas en sílica gel usando agar papa-dextrosa; las suspensiones se ajustaron a 1×10^6 esporas/mL. Volúmenes iguales de cada suspensión (400 μ L) se mezclaron para obtener la suspensión final a partir de la cual se inocularon 150 μ L en cada placa que contenía un volumen suficiente de agar nutrientes-sales y se extendió por superficie. Todas las películas (rectángulos de 5x5 cm) se esterilizaron con luz UV por 12 h, posteriormente fueron puestas cuidadosamente sobre la placa de agar nutrientes-sales previamente inoculado. Se colocó también un control que consistió en un rectángulo de papel filtro del mismo tamaño que el de las películas. Se monitoreó visualmente el crecimiento a 25°C de todas las formulaciones y el control a 1, 6, 12 y 20 días. El experimento se hizo por duplicado.

V.2.6. Diseño experimental

Se empleó un diseño experimental completamente aleatorizado (2x2x3) de tres factores con sus respectivos niveles. Los factores fueron (1) la concentración de almidón, con niveles de 100% y 50% respecto a la concentración total de biopolímeros filmogénicos que fue siempre del 3% (se usó aislado de proteína de suero, WPI, para mantener dicha concentración); (2) el agente hidrofóbico, al 0.3% en base a experimentos, cuyos niveles fueron una emulsión de cera o de aceite y (3) el tipo de almidón, donde los niveles fueron de papa doblemente modificado, céreo de maíz fosfatado por extrusión y céreo fosfatado convencionalmente. Se usó una concentración de plastificante (sorbitol) del 3%. Las variables respuesta fueron la PVA, la opacidad, solubilidad y el espesor. En el Cuadro 3 se muestra el diseño experimental. Se hizo cada experimento y su réplica, y cada variable

respuesta se midió por triplicado, expresándose los resultados como la media \pm DE y se analizaron mediante el paquete estadístico JMP versión 5.0.1.

Cuadro 3. Diseño de tratamientos para la producción de películas a partir de tres tipos de almidones modificados.

Experimento	Tipo de almidón	Cantidad de almidón (%)	Tipo de agente hidrófobo
1	DM	100	Aceite
2	DM	100	Cera
3	DM	50	Cera
4	DM	50	Aceite
5	FC	100	Aceite
6	FC	100	Cera
7	FC	50	Cera
8	FC	50	Aceite
9	FE	100	Aceite
10	FE	100	Cera
11	FE	50	Cera
12	FE	50	Aceite

DM=Doblemente Modificado (acetilado-entrecruzado); FC=Fosfatado convencionalmente;
FE=Fosfatado por extrusión termoplástica.

VI. RESULTADOS

VI.1. Modificación y grado de sustitución de almidones

Se modificó almidón de maíz céreo y almidón de maíz normal, y de todas las muestras se midió el porcentaje de fósforo y a partir de éste el grado de fosfatación, los resultados se muestran en el cuadro 4. En los anexos se muestra la curva de calibración utilizada para la determinación.

Para la formulación de las películas se utilizó sólo el almidón céreo que se compone por un 99% de amilopectina y hasta el 1% de amilosa (Badui, 2006). Se sabe que la amilosa juega un papel importante en la formación de un recubrimiento debido a su orientación molecular lineal y por tanto su alta tendencia a interactuar con moléculas de su misma naturaleza creando puentes de hidrógeno en dispersiones acuosas que han sido gelatinizadas, sin embargo, López y col., (2008) utilizaron almidones modificados cuya caracterización mostró que aquéllos con un contenido de amilosa menor al porcentaje encontrado en el almidón de maíz normal (~30%) también tienen capacidad para formar recubrimientos. Además Liu y Han (2005) utilizaron almidón céreo en sus investigaciones sobre el re-arreglo microestructural que se da durante el secado de soluciones de distintos tipos de almidón. De modo que el uso de almidón céreo en la formulación de recubrimientos comestibles provee una perspectiva interesante y en este trabajo se eligió el uso de almidones céreos fosfatados. No obstante, el almidón doblemente modificado (ADM), acetilado-entrecruzado utilizado, fue un almidón de papa.

Cuadro 4. Resultados de fosfatación en almidones de maíz.

Fosfatación	Almidón de maíz	Fósforo (% p/p)	Grado de sustitución (% p/p)
Por Extrusión Termoplástica	Normal	0.0638 ± 0.0026	0.33 ± 0.01
	Céreo	0.0552 ± 0.0040	0.29 ± 0.02
Convencional	Normal	0.0715 ± 0.0091	0.37 ± 0.05
	Céreo	0.0648 ± 0.0051	0.34 ± 0.03

VI.2. Obtención de soluciones filmogénicas a partir de almidones modificados y proteína.

De acuerdo al diseño experimental, se obtuvieron dispersiones acuosas de los almidones a probar y después a cada dispersión se le adicionó el resto de los ingredientes correspondientes a su formulación.

La concentración de almidón seleccionada para preparar todas las soluciones filmogénicas fue del 3% (p/p), en base al comportamiento observado del ADM que fue el utilizado en los experimentos iniciales a distintas concentraciones en la solución. Una concentración del 8% (p/p) resultó ser una concentración muy elevada provocando una viscosidad que dificultó totalmente el manejo, el 4% de almidón en la solución disminuyó la viscosidad pero de difícil manejo especialmente durante el paso de extensión de la solución en las placas de acrílico, situación que mejoró al bajar la concentración finalmente al 3% en peso de almidón. A esta misma concentración, se observó que las dispersiones que contenían el almidón fosfatado por extrusión (AFE) y el fosfatado convencionalmente (AFC) presentaban una menor viscosidad, por las características intrínsecas debido a las modificaciones a los que se vieron expuestos.

La concentración de plastificante fue seleccionada a partir de estudios previos hechos en el Laboratorio de Biotecnología de Alimentos en los que se observó que utilizando una relación 1:1 de plastificante con WPI se obtienen películas con aceptables propiedades de barrera.

La cera de abeja se eligió como agente hidrófobo pues estudios previos hechos en el laboratorio mostraron que el uso de esta cera disminuía significativamente la PVA de películas hechas a partir de WPI (Magaña, 2007), lo cual también es referido por Shellhammer y Krochta (1997) quienes obtuvieron valores más bajos de PVA utilizando cera de abeja, candelilla y carnauba en películas de WPI. Se adicionó la cera a partir de una emulsión de ésta con ácido esteárico y morfolina,

que contenía el 20% sólidos, decidiendo adicionarla de esta forma pues las películas obtenidas a partir de las soluciones filmogénicas adicionadas directamente de cera de abeja sólida no eran homogéneas en su apariencia. Como segundo agente hidrofóbico se usó aceite de cártamo con un alto contenido en ácido oleico pues se supuso que la longitud de su cadena, su punto de fusión y la insaturación presente podía afectar la flexibilidad y permeabilidad de las películas (Fernández y col., 2007).

Las películas de cada formulación mostraron diferencias en aspecto. Las que contenían aceite de cártamo en su formulación mostraron migración del mismo hacia la superficie, lo cual dio a la película una heterogeneidad no deseada. La Figura 10 muestra el aspecto de la formulación de almidón doblemente modificado con sorbitol y aceite que no logró incorporarse. Las formulaciones que contenían WPI mostraron mejor manejo y menor cohesividad. En general se observó mayor cohesividad en las películas con 100% de almidón en su formulación. Las películas que contenían cera eran más brillosas que el resto de las formulaciones, pero las de almidón fosfatado convencionalmente adicionadas con cera fueron las más cohesivas de todas las formulaciones del diseño experimental, ya que se pegaban entre sí y eran de difícil manipulación. La Figura 11 muestra la apariencia de una película de almidón fosfatado por extrusión con cera cuyo brillo y manejabilidad fueron los más apropiados.



Figura 10. Migración del aceite hacia la superficie de una película comestible.



Figura 11. Apariencia de película elaborada a base de almidón fosfatado por extrusión, sorbitol y cera (3-3-0.3% en peso, respectivamente).

VI.3. Propiedades *in vitro* de películas formuladas

VI.3.1. Permeabilidad al vapor de agua

Los valores de PVA de las distintas formulaciones realizadas en el presente trabajo se muestran en el cuadro 5.

En base a la definición de PVA, valores mayores de esta propiedad, indicarían mayor transferencia de vapor de agua a través de la película y, en términos prácticos, esto constituiría una pobre barrera para el alimento en cuestión, por lo que, en base al análisis estadístico que se detalla más adelante, la mejor formulación para aplicar en el alimento en cuestión es la que presente menor permeabilidad al vapor de agua.

Los valores de PVA de películas comestibles pueden contribuir a la predicción de la vida útil del producto en el que se desee usar esta aplicación. En el caso de las frutas frescos y mínimamente procesados, con el uso de recubrimientos comestibles se pretende aumentar la vida útil y preservar la calidad; para que tal fin

se logre, el recubrimiento debe funcionar como un medio de control de reacciones fisiológicas, por lo que evaluar sus propiedades de barrera, como la permeabilidad al vapor de agua, es muy importante, éstas propiedades a su vez dependerán de los materiales utilizados en la formulación.

VI.3.2. Medición de porcentaje total de materia soluble de los recubrimientos

Según los valores mostrados en el Cuadro 5, las formulaciones que presentaron menor solubilidad fueron las que contenían ADM con cera (Figura 12a). Dichos materiales al contacto con el agua mantuvieron su integridad pero conforme aumentó el tiempo de exposición (24 h), ésta se perdió completamente. Las películas que presentaron mayor solubilidad fueron las compuestas de AFE con WPI y cera (Figura 12b), que se desintegraron completamente tras el primer contacto con el agua, de alrededor de 5 min. Por otro lado, las películas compuestas de AFE con cera presentaron un comportamiento parecido al ADM solo que perdieron su integridad tras ser sometidas a la primera agitación ocasional (a los 15 min) por un tiempo de 5 s (Figura 12c).

En general, las películas que contenían WPI y cera en su formulación perdieron completamente su integridad tras el primer contacto con el agua, en cambio, las que contenían aceite en su formulación mantuvieron mayor tiempo su integridad aunque la fueron perdiendo poco a poco hasta perderla completamente después del tiempo total de contacto, que fue de 24 h, exceptuando las formulaciones de aceite con AFE cuya pérdida de integridad fue también inmediata.

El comportamiento de las películas ante la presencia de agua determina sus aplicaciones. Menor solubilidad es deseable cuando se desea limitar el exudado durante el almacenamiento de alimentos congelados o en productos frescos que se almacenarán a altas humedades relativas (Tapia y col., 2007), mayor solubilidad se prefiere cuando la película desea utilizarse en alimentos cuya cubierta es deseable que se funda en la boca del consumidor (Pérez-Gago y col., 1999).

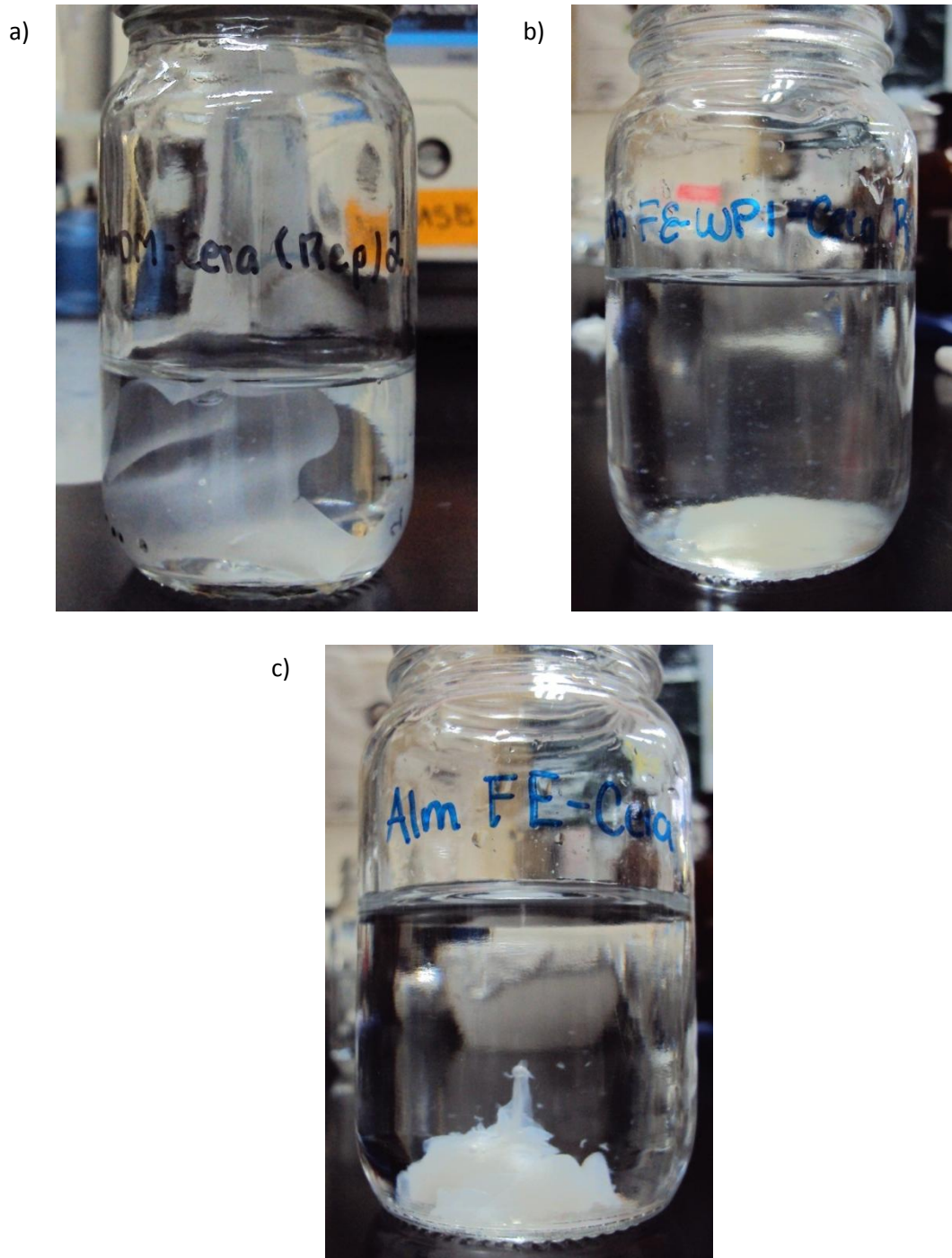


Figura 12. Comportamiento de películas que contenían a) almidón doblemente modificado, sorbitol y cera (3-3-0.3%), b) almidón fosfatado por extrusión con aislado de proteína de suero lácteo, sorbitol y cera (1.5-1.5-3-0-3%), c) almidón fosfatado por extrusión, sorbitol, cera (3-3-0.3%) en un ambiente acuoso.

Según la aplicación de este trabajo, la menor solubilidad presentaría una ventaja por la baja temperatura y alta humedad relativa de almacenamiento, pero una solubilidad alta constituye una ventaja de consumo, pues si un recubrimiento es disuelto rápidamente en la boca del consumidor será menos perceptible pero seguirá cumpliendo sus funciones para las que fue aplicado.

VI.3.3. Medición de opacidad

La opacidad se determinó conociendo el área bajo la curva de un barrido de absorción en la región visible del espectro electromagnético (400 a 700 nm), mayor área bajo la curva incidirá en mayor opacidad o menor transparencia de la película. Los valores de opacidad están reportados en ($UA \cdot \mu m$) y los menores valores de opacidad se obtuvieron cuando se utilizó cera como agente hidrófobo y almidón fosfatado por extrusión, según lo mostrado en el Cuadro 5.

El parámetro de aceptación más importante en los frutos frescos es la apariencia. La opacidad puede predecir la perceptibilidad del recubrimiento por el ojo humano y dado que las formulaciones propuestas en este trabajo serán aplicadas como recubrimiento en la superficie de un alimento, se vuelve importante determinarla.

VI.3.4. Medición de espesor.

Según los datos del Cuadro 5, se observa una tendencia general de valores de espesor de 39 a 62 μm . El espesor de la película es importante pues influye directamente en la tasa de transferencia de gases, como el vapor de agua, que afectaría la apariencia del producto. Además, dado que las formulaciones son propuestas para un recubrimiento que será consumido deben ser aplicadas con un espesor mínimo a fin de que no modifiquen las propiedades de sabor y apariencia del producto original (Pavlath y Orts, 2009).

Cuadro 5. Valores de variables respuesta evaluadas para cada formulación.

Experimento- Composición	PVA ± DE [(g-mm)/ (m ² ·h·KPa)]	% MS ± DE	Espesor ± DE (µm)	Opacidad ± DE (UA·µm)
1 ADM-a	0.627 ± 0.10	48.14 ± 1.25	39.63 ± 4.55	0.457 ± 0.03
2 ADM-c	0.747 ± 0.10	35.36 ± 1.57	59.73 ± 7.65	0.297 ± 0.03
3 ADM-WPI-c	0.550 ± 0.05	66.36 ± 4.72	55.37 ± 2.91	0.437 ± 0.06
4 ADM-WPI-a	0.665 ± 0.03	45.61 ± 1.66	46.77 ± 1.65	0.587 ± 0.07
5 AFC-a	0.817 ± 0.07	56.71 ± 3.66	51.42 ± 3.53	0.505 ± 0.15
6 AFC-c	0.654 ± 0.09	44.64 ± 3.28	62.55 ± 8.92	0.158 ± 0.03
7 AFC-WPI-c	0.725 ± 0.11	49.53 ± 6.73	46.25 ± 7.94	0.225 ± 0.08
8 AFC-WPI-a	0.659 ± 0.09	64.74 ± 3.10	42.73 ± 6.84	0.926 ± 0.22
9 AFE-a	0.732 ± 0.04	85.37 ± 2.80	45.75 ± 4.22	0.466 ± 0.11
10 AFE-c	0.758 ± 0.08	58.92 ± 5.19	54.42 ± 5.52	0.115 ± 0.01
11 AFE-WPI-c	0.709 ± 0.06	86.74 ± 1.76	44.93 ± 5.10	0.205 ± 0.03
12 AFE-WPI-a	0.852 ± 0.13	80.81 ± 3.45	55.50 ± 10.49	0.450 ± 0.11

PVA= Permeabilidad al vapor de agua, %MS= Porcentaje de materia soluble total, DE= Desviación estándar; ADM=Almidón doblemente modificado; AFC= Almidón fosfatado convencionalmente; AFE= Almidón fosfatado por extrusión termoplástica; a= aceite; c= cera.

VI.4. Análisis estadístico y selección de mejor formulación.

Los resultados de cada variable respuesta de los doce experimentos junto con sus réplicas fueron analizados en el programa estadístico JMP versión 5.0.1. Los resultados del análisis se muestran en los anexos. Los factores analizados fueron el tipo de agente hidrófobo, la cantidad de almidón y el tipo de almidón y la diferencia estadística de cada nivel según la prueba de Tukey-Kramer ($p < 0.05$).

En cuanto a las variables respuesta PVA y espesor, los resultados obtenidos muestran una marcada falta de ajuste al modelo estadístico. Sin embargo, aún bajo estas condiciones una prueba de Tukey-Kramer ($p < 0.05$) mostró que sólo el tipo de almidón influye significativamente en los valores de PVA. El ADM fue el que presentó valores de PVA menores, pero en vista de la falta de ajuste se consideraron para la elección del tipo de almidón, el resto de las variables respuesta.

Respecto a espesor y opacidad, solo el tipo de agente hidrófobo mostró diferencia significativa ($p < 0.05$), los menores valores de espesor se obtuvieron cuando se utilizó aceite, sin embargo, no se escogió este agente hidrófobo en vista de su migración descrita en el apartado VI.2 y los menores valores de opacidad se obtuvieron cuando se usó cera.

El análisis a partir del porcentaje de materia soluble total (Cuadros 6 y 7) mostró que existe efecto en esta variable respuesta según el tipo y la cantidad de almidón y que existe diferencia significativa entre el AFE, que presentó mayor solubilidad, y el resto de los almidones y que cuando la composición es de un 50% almidón el porcentaje de materia soluble es mayor ($p < 0.05$). No se encontraron interacciones dobles entre los factores analizados.

Cuadro 6. Análisis de varianza para el porcentaje total de materia soluble.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F Ratio
Modelo	4	4658.13	1164.53	12.78
Error	19	1730.59	91.08	Prob > F
C. Total	23	6388.73		<.0001

Cuadro 7. Efecto de cada factor en el porcentaje total de materia soluble.

Fuente	Nparm	DF	Suma de cuadrados	F Ratio	Prob > F
Tipo de almidón	2	2	3824.39	20.99	<.0001
Tipo de agente hidrofóbico	1	1	158.65	1.74	0.2026
Cantidad de almidón	1	1	675.09	7.41	0.0135

En base a los valores de PVA, el ADM es una opción viable para uso como recubrimiento de alimentos, pero el AFE, de acuerdo a este análisis, con menores valores de opacidad y mayor porcentaje de materia soluble también representa una posibilidad con potencial de uso.

VI.5. Recubrimiento de alimento seleccionado y evaluación de pérdida de peso

En base a lo descrito anteriormente, se seleccionaron tres formulaciones que se probaron como recubrimiento para fresas por el método de inmersión en la solución filmogénica: ADM con cera y almidón AFE con cera (3-0.3%) y AFE con WPI y cera (1.5-1.5-0.3%) en todos los casos sorbitol al 3%, en peso.

Las fresas recubiertas con ADM, captaron mayor cantidad de recubrimiento, perceptible a primera vista (Figura 13c), el uso de las demás soluciones filmogénicas dieron una apariencia brillante al fruto (Figura 13a y b). A los 6 días de almacenamiento el lote de fresas correspondiente al control y al tratamiento con ADM, presentaron desarrollo fúngico y pudriciones, fenómeno que se observó a partir del día 4 y que en el día 6 apenas comenzaba en el resto de los tratamientos (Figura 13d y h).

La pérdida de peso de un fruto se debe principalmente a la pérdida de agua del mismo, que es una de las causas más importantes del deterioro durante el almacenamiento pues influye en la textura y calidad del producto lo que determinará el criterio de consumo, tal proceso se conoce como transpiración.

Además de controlar la temperatura y humedad relativa idóneas para el almacenamiento, una adecuada capa de recubrimiento en la superficie de un fruto puede proveer una barrera que permitiría alargar la vida útil y la utilidad de tal tecnología se verá reflejada en el efecto de la pérdida de peso de la fresa.

La tendencia del porcentaje de pérdida de peso de la fresa con cada formulación se muestra en la Figura 14. Se observa que entre el experimento 1 y 2 el tratamiento control existe mayor diferencia que en el resto de las formulaciones. La menor pérdida de peso en fresa se obtuvo cuando se utilizó AFE-WPI-cera y el resto de los tratamientos muestra una tendencia de pérdida de peso muy parecida al control.



Figura 13. Apariencia de fresas recubiertas con a) y e) almidón fosfatado por extrusión, aislado de proteína de suero lácteo, sorbitol y cera (1.5-1.5-3-0.3%); b) y f) almidón fosfatado por extrusión, sorbitol, cera (3-3-0.3%); c) y g) almidón doblemente modificado, sorbitol y cera (3-3-0.3%); d) y h) control. Incisos e, f, g y h a los 6 días de almacenamiento.

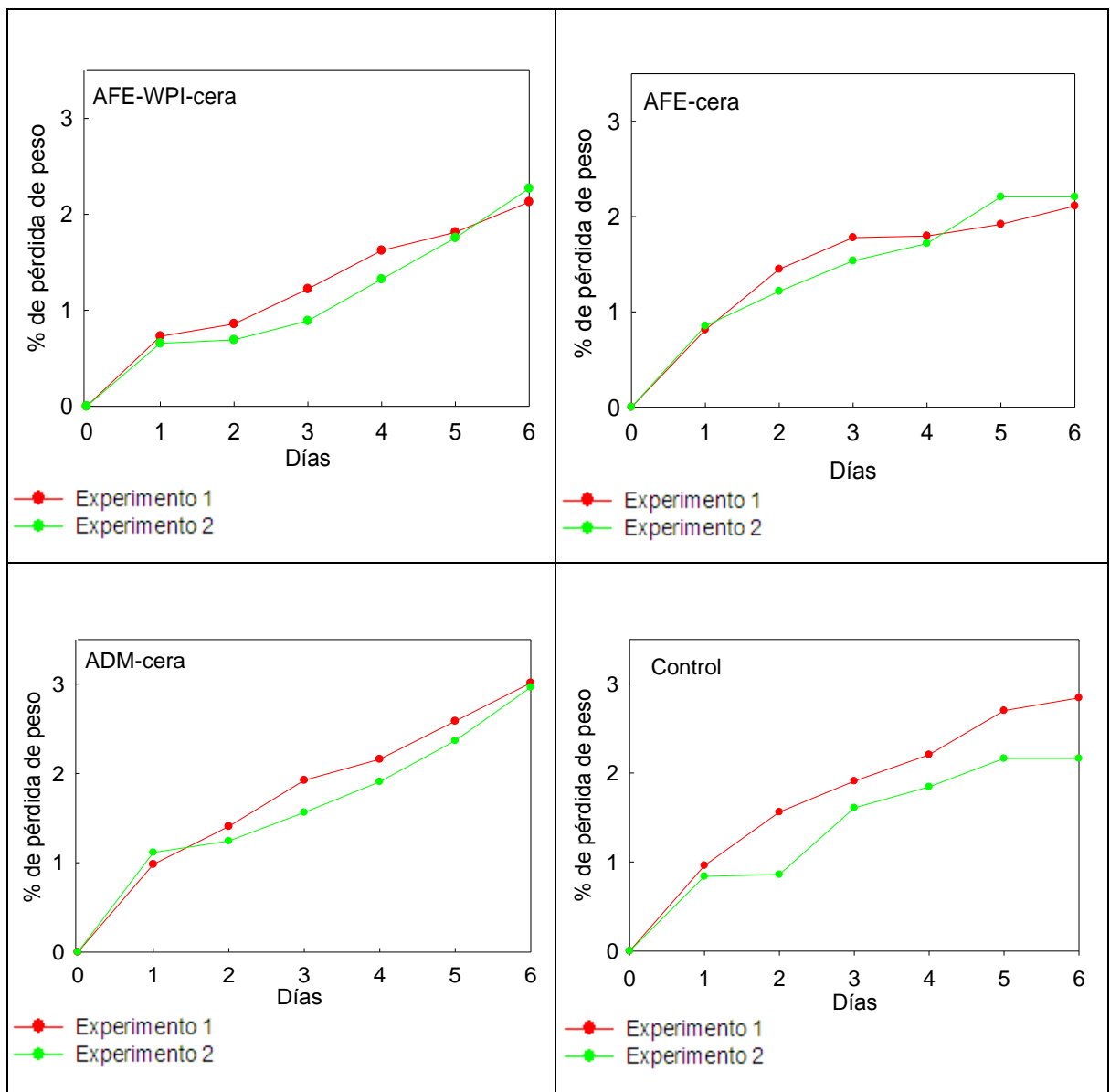


Figura 14. Porcentaje de pérdida de peso de cada formulación. AFE= Almidón fosfatado por extrusión. ADM= Almidón doblemente modificado, WPI= Aislado de proteína de suero de leche.

VI.6. Experimentos microbiológicos

VI.6.1. Concentración mínima inhibitoria de los antimicrobianos seleccionados contra *Botrytis cinerea* ATCC 12481

La concentración mínima inhibitoria (CMI) es definida como la concentración de antimicrobiano más baja a la que no hay crecimiento visible del microorganismo y la concentración mínima letal (CML) es definida como la concentración mínima de antimicrobiano a la que se produce el 99.9% de reducción de organismos (10^3) partiendo de un inóculo inicial de aproximadamente 10^5 (López-Malo y col., 2005).

La CMI contra *Botrytis cinerea* ATCC 12481 de ϵ -poli-lisina no pudo ser determinada utilizando este método de dilución en caldo puesto que a todas las concentraciones ensayadas se observó crecimiento micelial. La CMI de Mirenat-LA es de 500 ppm y de natamicina 25 ppm.

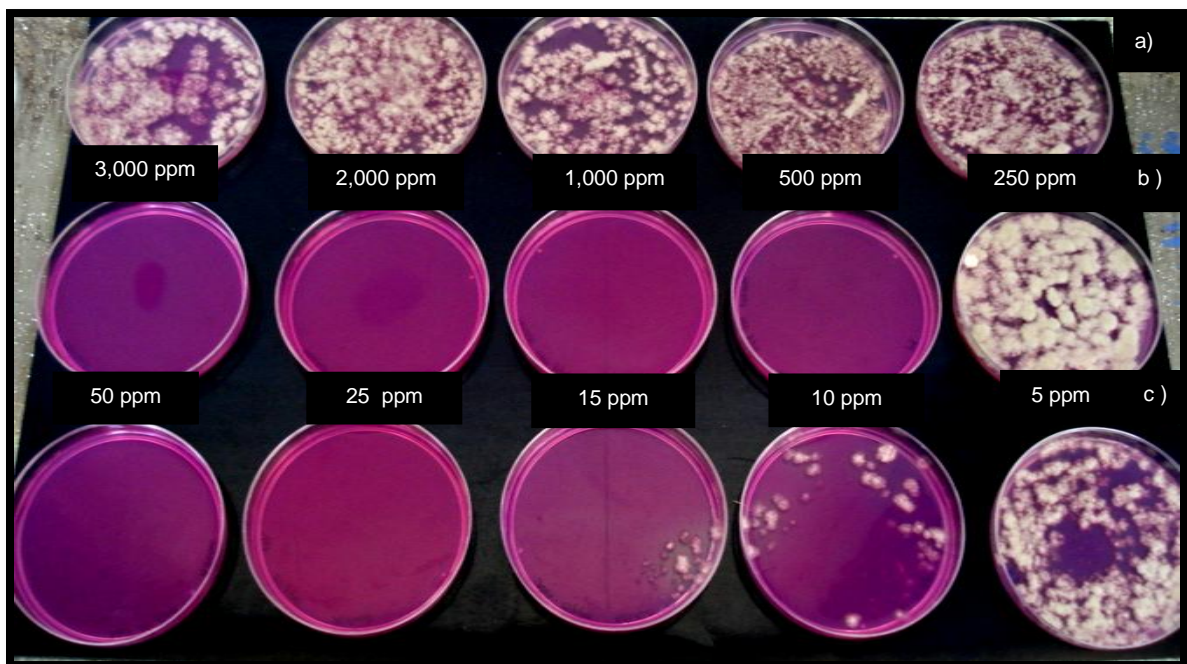


Figura 15. Concentración Mínima Inhibitoria contra *Botrytis cinerea* ATCC 12481 de a) ϵ -poli-lisina, b) Mirenat-LA y c) Natamicina.

En base a estos resultados, se escogió Mirenat-LA como el antimicrobiano de origen natural que debe ser adicionado a las formulaciones de películas comestibles para observar un efecto contra el crecimiento del hongo deteriorador *Botrytis cinerea* ATCC 12481.

VI.6.2. Ensayo *in vitro* de la efectividad de los recubrimientos contra la germinación de esporas y crecimiento de *Botrytis cinerea* ATCC 12481

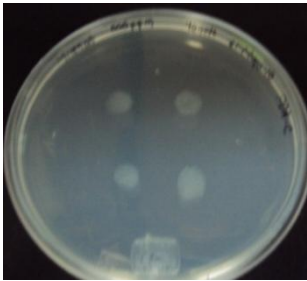
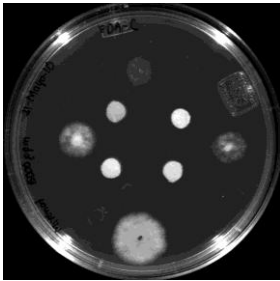
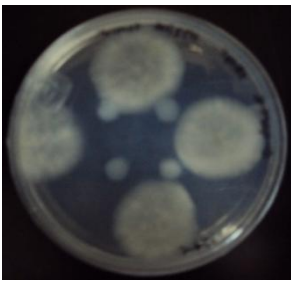

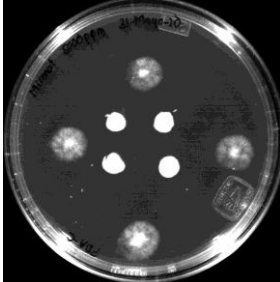


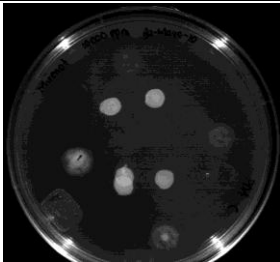
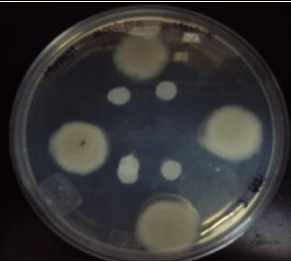
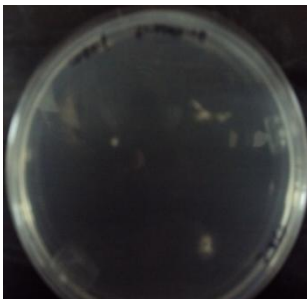
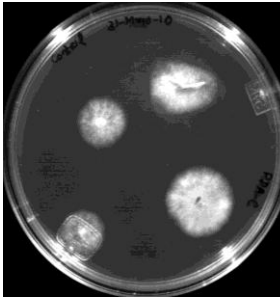

Se prepararon las soluciones filmogénicas de la formulación en la que se observó menor pérdida de peso es decir AFE-WPI-sorbitol-cera (1.5-1.5-3-0.3%) y con 500, 5,000 y 10,000 ppm de Mirenat-LA a la solución filmogénica, después se vaciaron 120 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ de cada solución en placas de acrílico de 10x10 cm. Las películas se secaron y despegaron con relativa facilidad. Considerando la cantidad de ingrediente activo del antimicrobiano utilizado (25%) y el volumen vaciado, las concentraciones reales en la película fueron 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 150 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y 300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ respectivamente. Si se considera además el área de cada círculo de película cortado (0.5027 cm^2) la concentración de antimicrobiano corresponde a 7.54 μg , 75.4 μg y 150.81 μg en cada círculo respectivamente. El Cuadro 8 muestra el crecimiento observado hasta los cinco días de incubación a 30°C. Al día 7 de incubación se observó un crecimiento desmedido del hongo, sin aparente diferencia entre el control y el resto de los tratamientos.

Botrytis cinerea es un hongo fitopatógeno mayoritariamente responsable de la podredumbre gris de la fresa (Reborbidos y col., 2000) por lo que proveer a este alimento de una capa que además de controlar los fenómenos propios de la senescencia sirva como un transporte activo de una sustancia antimicrobiana efectiva contra este hongo deteriorador es el fundamento que sostienen los experimentos que ya se han descrito, partiendo de ensayos *in vitro* que después servirán como base a posteriores investigaciones sobre el uso de antimicrobianos en recubrimientos.


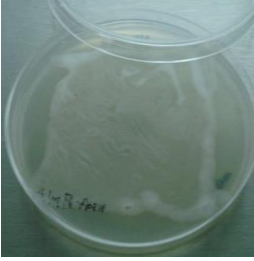

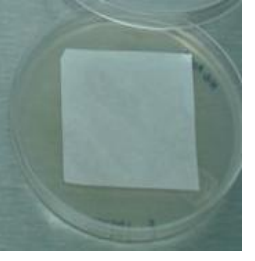
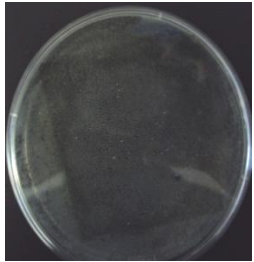
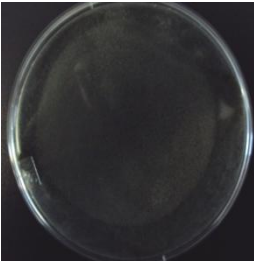
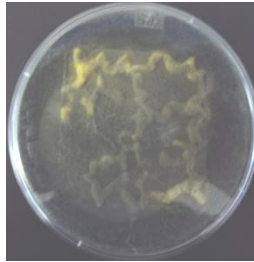
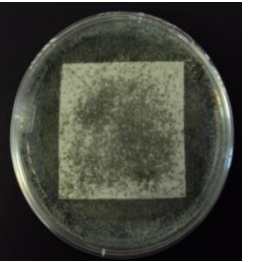
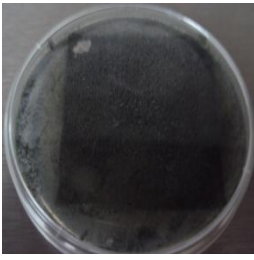
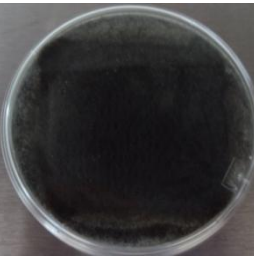


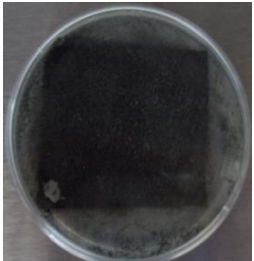
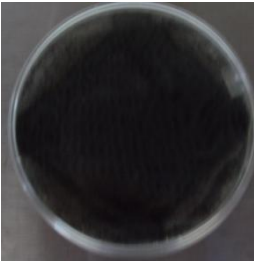

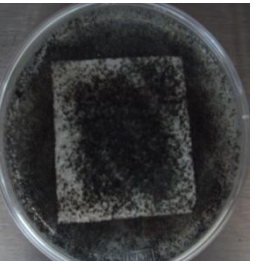
VI.6.3. Ensayo de biodegradabilidad

Se llevó a cabo, cualitativamente, con las tres formulaciones citadas en el apartado VI.5. Los resultados del monitoreo se muestran en los Cuadros 9 y 10.

Cuadro 8. Crecimiento de *Botrytis cinerea* ATCC 12481 sobre películas con distinta concentración de Mirenat-LA.

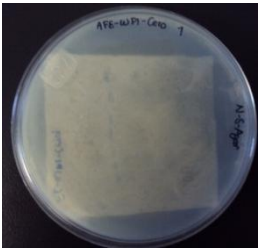
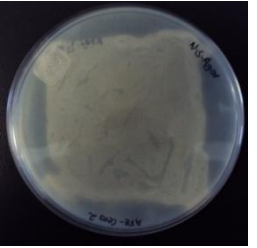
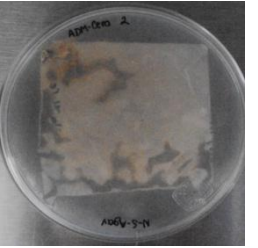
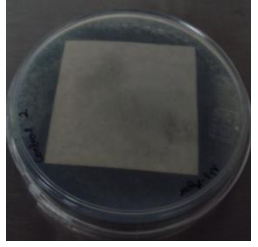
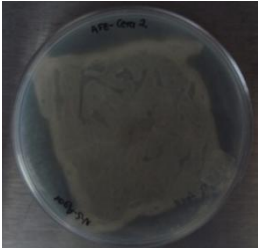
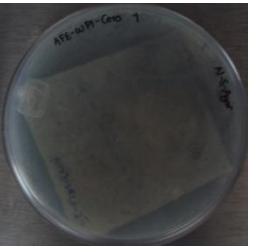
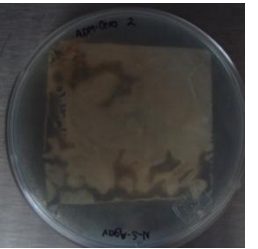
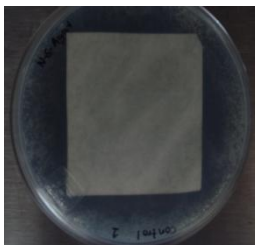
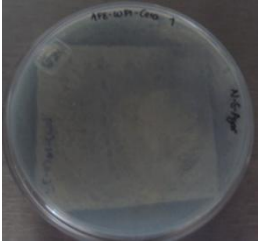
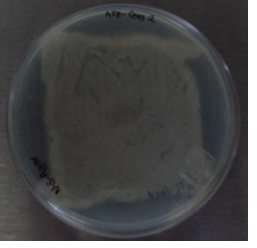
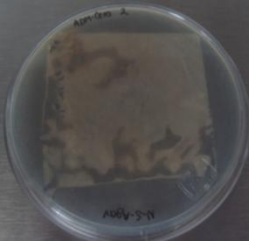
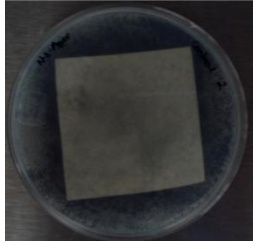
Concentración ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Día 1	Día 3	Día 5
15			
150			
300			
Control			

Cuadro 9. Resultados de ensayo de biodegradabilidad (aparición frontal del experimento).

Día	AFE-WPI-cera	AFE-cera	ADM-cera	Control
1				
6				
12				
20				

AFE= Almidón fosfatado por extrusión. ADM= Almidón doblemente modificado, WPI= Aislado de proteína de suero de leche.

Cuadro 10. Resultados de ensayo de biodegradabilidad (apariciencia posterior del experimento).

Día	AFE-WPI-cera	AFE-cera	ADM-cera	Control
6				
12				
20				

AFE= Almidón fosfatado por extrusión. ADM= Almidón doblemente modificado, WPI= Aislado de proteína de suero de leche.

VII. DISCUSIÓN

Los materiales a evaluar en la formulación de recubrimientos comestibles fueron, por una parte, almidones de maíz céreos fosfatados. Se sabe que tanto las condiciones de pH así como los agentes fosfatantes utilizados juegan un papel importante en la modificación resultante del almidón, ya que valores de pH de 5-6.5 con mezclas de ortofosfatos producirán mayoritariamente monoésteres de fosfato que también se producirán en un rango de pH de 5-9 con tripolifosfato de sodio (STPP) (Kerr, 1947). A valores de pH de 10 con mezcla de STPP y trimetafosfato de sodio (STPM) se obtienen almidones con formación de diésteres de fosfato mayoritariamente (Lim y Seib, 2003). El grado de sustitución obtenido en los almidones fosfatados de esta investigación es mucho menor al reportado por algunos autores, por ejemplo, Landerito y Wang (2005), modificaron almidón de maíz céreo por dos diferentes métodos y reportan un contenido de fósforo de 0.570% (p/p) y 0.513% (p/p) con diferencia significativa entre ambos. Uno de los métodos utilizados por estos autores es muy parecido al método convencional de fosfatación utilizado en este trabajo, exceptuando dos condiciones que son trascendentes pues inciden en los resultados finales de grado de sustitución: el pH de la reacción, que ellos ajustaron a 9, y el tiempo de contacto que fue de 1 h a temperatura ambiente. Dichas condiciones son diferentes a las utilizadas en este trabajo (Sección V.2.1.1), además, ellos utilizaron una mezcla de STTP y STPM puesto que se basaron en las investigaciones reportadas en las que mejores condiciones de fosfatación las obtuvieron utilizando una mezcla de STPP al 5% (p/p) y 2% (p/p) de STMP en presencia de 5% (p/p) de sulfato de sodio (Lim y Seib, 2003). No obstante las diferencias, las conclusiones de los autores ya citados ayudaron a proponer razones por las cuales el grado de sustitución alcanzado en esta investigación no fue el esperado.

Se cree que el tiempo de reacción jugó un papel importante para el porcentaje de fósforo determinado en cada almidón modificado (aproximadamente diez veces menor que el valor arriba descrito) puesto que, aunque la dispersión preparada tenía

la suficiente cantidad de agua para que el agente fosfatante estuviera en contacto con los gránulos de almidón, probablemente el tiempo no fue el necesario para que pudiera dispersarse lo suficiente e incluso llegara a las zonas semicristalinas del gránulo. Quizás el reactivo permaneció en la superficie del gránulo sin penetrar a ninguna otra estructura, además, el pH del medio no se ajustó después de la preparación de la suspensión y tampoco fue monitoreado, de modo que no se conoce con exactitud el pH al que se llevó a cabo la reacción. El grado de sustitución fue bajo también para la fosfatación por extrusión, resultados que son inconsistentes con lo reportado en la bibliografía. Por ejemplo, Murúa-Pagola y col. (2009), utilizaron las mismas condiciones de extrusión que en este trabajo para almidón de maíz céreo y reportaron 0.75 % de fósforo en las muestras, la diferencia fue la hidrólisis primaria que ellos realizaron en el almidón con ácido clorhídrico por 9 h. La hidrólisis reduce el peso molecular del polímero de almidón empezando por las zonas amorfas donde se encuentran los enlaces α -1,6 de la amilopectina y dependiendo del tiempo de hidrólisis y otras variables como el tipo de ácido utilizado, la hidrólisis llega a las zonas semicristalinas del almidón. Este proceso se completa con la extrusión en el que se lleva a cabo la despolimerización de las moléculas, principalmente de amilopectina en el caso del almidón céreo (Manrique-Quevedo y col., 2007). Por lo tanto, puede concluirse que la hidrólisis inicial del almidón favorece el aumento del grado de sustitución.

Se sabe que los almidones fosfatados dan dispersiones acuosas más claras y estables con relación a los almidones no modificados (Murúa-Pagola, 2009). Cuando se usa almidón fosfatado por extrusión se obtienen dispersiones acuosas muy solubles debido a la gelatinización que sufre el almidón dentro del extrusor. Ambas características se observaron en las dispersiones acuosas preparadas a partir de las cuales se obtuvieron las películas para posterior caracterización, y en base a esas observaciones puede decirse que el almidón fue parcialmente sustituido con grupos fosfato.

El tipo de modificación química influye en las propiedades de barrera de las películas obtenidas. Sin embargo, en este trabajo, las interacciones de cada almidón con su correspondiente modificación química, el agente hidrófobo utilizado, el plastificante y en su caso, la interacción con las moléculas de proteína, influyeron en cierta medida para obtener los resultados finales. Se cree que una falta de asociación de las moléculas de amilopectina de los almidones céreos utilizados con el aceite provocó la migración del mismo hacia la superficie de las películas, esto probablemente debido a que son las moléculas de amilosa las que principalmente pueden formar complejos con lípidos, y en los almidones céreos la poca cantidad de esta molécula puede imposibilitar dichas interacciones (Espinosa, 2008). No obstante, considerando que el mismo fenómeno se observó en el almidón de papa acetilado-entrecruzado la migración pudiera deberse a la concentración de aceite utilizada, pero esto se contrapone con lo reportado por García y col. (2000), quienes mencionan que una concentración de aceite menor a 5 g/L (0.5%, p/v) no muestra una migración a la superficie en almidones de maíz nativo y altos en amilosa, aunque ellos utilizaron aceite de girasol en vez de aceite de cártamo. Además, las moléculas de amilosa disponibles en los almidones nativos no tienen la misma disposición en los almidones modificados como en el caso del almidón acetilado-entrecruzado utilizado en este estudio.

En cuanto a la propiedad de barrera medida, que fue la PVA, los valores obtenidos cuando se utiliza almidón con proteína, en todos los casos, son menores a los valores de películas hechas solo de WPI con distintos tratamientos que reportaron Pérez-Gago y Krochta (1999), con valores de PVA entre 4.75-5.06 g·mm/kPa·h·m². En dicho estudio se reportan valores de espesor de 115 a 139 μm y la concentración de WPI utilizada va del 5 al 10% en peso, temperatura de 25°C y humedad relativa del 77 %, mientras que en este estudio la concentración de WPI se fijó en 1.5% en peso. Shellhammer y Krochta (1997), reportaron un valor de PVA de películas de proteína de suero de leche con glicerol en relación 15:1 de 1.8918 g·mm/kPa·h·m² sin agente hidrófobo pero reportan también que el uso de cera de abeja en formulaciones de WPI al 10% disminuye la PVA con valores de 0.451±0.1292

$\text{g}\cdot\text{mm}/\text{kPa}\cdot\text{h}\cdot\text{m}^2$, valor que es menor a cualquiera de los valores de este trabajo de las formulaciones que incluyen la cera de abeja, pero la concentración de lípidos utilizada por ellos es del 40% con respecto al peso seco de la película, mientras que la concentración utilizada en este trabajo es del 0.3% en peso con respecto al volumen total de solución filmogénica lo que equivale a un 10% con respecto al peso de los biopolímeros filmogénicos (que fue siempre del 3%) adicionada a partir de una emulsión.

En cuanto a los valores de PVA de almidones modificados, López y col. (2008) probaron distintas concentraciones de diferentes almidones modificados a distintas concentraciones de plastificante (glicerol) y eligieron en base al valor de PVA de $0.4536 \text{ g}\cdot\text{mm}/\text{kPa}\cdot\text{h}\cdot\text{m}^2$ películas de almidón acetilado al 5% en peso, valor que es menor a cualquiera de los obtenidos en esta investigación. No obstante, Han y col. (2006), prepararon dispersiones acuosas de almidón de chícharo al 3% en peso probando distintas concentraciones de cera de abeja desde 0 hasta 40% en peso con respecto al peso de almidón, sus resultados indican que a mayor cantidad de cera de abeja menor PVA, valores que se encuentran entre 6.56 y 7.78 $\text{g}\cdot\text{mm}/\text{kPa}\cdot\text{h}\cdot\text{m}^2$, los espesores obtenidos por estos investigadores aumentan conforme aumenta la proporción de cera desde 84.46 hasta 117.53 μm , la PVA obtenida a partir de los almidones modificados utilizados sugiere que la modificación química y las interacciones con el resto de los componentes de la formulación así como la forma de incorporación de la cera a la solución filmogénica influyen en las propiedades de barrera de las películas.

En el caso de los almidones fosfatados, la esterificación de grupos fosfatos en las cadenas de amilopectina es una sustitución aniónica lo cual reduce interacciones intermoleculares por impedimento estérico y las suspensiones se vuelven pastas claras (Tharanathan, 2005), la naturaleza aniónica de los grupos sustituyentes también incrementa su afinidad por el agua, lo que explica porque los almidones fosfatados de este trabajo presentan una tendencia a valores mayores de PVA que el almidón acetilado-entrecruzado.

García y col. (2009), hicieron una revisión de los valores de PVA de películas con distintas formulaciones a base de almidón: el almidón de papa con glicerol con una PVA de 0.9252 g·mm/kPa·h·m² y de 0.63 g·mm/kPa·h·m² cuando se usa sorbitol como plastificante y de 0.4392 g·mm/kPa·h·m² cuando se utilizó sorbitol y aceite de girasol, todos los valores reportados en el Cuadro 5 son mayores a los revisados por estos autores, las condiciones experimentales no se especifican en la revisión, sin embargo, los valores de PVA del presente estudio están influenciados por las condiciones de temperatura, HR y espesor. Según Pavlath y Orts (2009) el espesor juega un papel importante en estas determinaciones.

Como se indicó con anterioridad, el diseño estadístico muestra faltas de ajuste muy remarcadas en la variable espesor y PVA, la causa de la variación en el espesor es debida al manejo de las películas durante el desmoldado, la elasticidad no es la misma en todas las formulaciones, a su vez, estas variaciones afectan la transferencia del vapor de agua y la variación en todo el sistema depende de este paso crucial.

Shih (1996), hizo una serie de experimentos en los que mezcló proteína de arroz con pululano y un agente entrecruzante en la solución filmogénica que fue alginato de propilén-glicol que, según argumenta, interactúa con las moléculas de proteína o polisacárido formando enlaces covalentes, especialmente bajo condiciones alcalinas. Cuando se usó agente entrecruzante en las formulaciones se obtuvieron menores valores de PVA, las interacciones tanto de los grupo aminos de la proteína como de los grupo hidroxilo del pululano con el agente entrecruzante permitieron también una disminución en la solubilidad de las películas cuando, por separado, las películas se desintegran fácilmente. En el presente estudio no se utilizó un agente entrecruzante, además algunos estudios complementarios, como la espectroscopia infrarroja, pudieran sugerirse para determinar si existe una interacción mayor entre las moléculas de almidón modificado y proteína.

Debido a la presencia de los grupos funcionales aniónicos en los almidones fosfatados, el porcentaje de materia soluble (%MS) es mayor especialmente cuando se usa AFE y también cuando se usa WPI en todas las formulaciones. Esto concuerda con los resultados de Pérez-Gago y Krochta (1999) quienes reportan un 100% de MS para películas a base de WPI, pero esto también podría sugerir que en las soluciones filmogénicas podría prevalecer el comportamiento de alguno de los biopolímeros en vez de la mezcla e interacciones moleculares esperadas entre ambos polisacáridos.

Los bajos valores de %MS cuando se usa aceite en las formulaciones, son atribuidos a que el aceite proporcionó a las películas una capa repelente que disminuyó su solubilidad y además, en el caso del ADM, por ser un almidón con modificación química dual, que se caracteriza por dar alta estabilidad y propiedades de protección mecánica a los productos que lo contienen se observó una relativa estabilidad de las películas ante el ambiente acuoso (Singh y col., 2007). Estos valores de %MS, sin embargo, son muy altos comparados con los que reportan López y col. (2008), la causa puede atribuirse a que ellos usaron almidón acetilado a distintas concentraciones de glicerol como plastificante.

La opacidad es también influenciada por el espesor y la composición de la película. Las películas de mayor opacidad fueron las que contenían aceite, pues la heterogeneidad de la película afecta la uniformidad de la absorción de luz. En todas las formulaciones que se usó cera la opacidad fue menor, pero estos valores son mayores a los reportados por Fernández y col. (2007) quienes usaron distintos ácidos grasos en películas de WPI. García y col. (2009) reportaron valores de opacidad bajos para las películas obtenidas a partir de la mezcla de almidón de maíz con glicerol y quitosán, no obstante, lo observado en este trabajo sugiere que conforme aumenta la cantidad de materiales en la formulación la opacidad también aumenta.

La diferencia entre los experimentos 1 y 2 de pérdida de peso mostrada en la Figura 14 del tratamiento control, sugiere que el recubrimiento en sí mismo, sin importar la formulación, controla la pérdida de agua, que es la principal causa de pérdida de peso de la fresa, en vista de los valores de PVA obtenidos en las formulaciones *in vitro* se esperaría que la formulación de ADM con cera proporcionara una capa con mayor protección a la pérdida de agua. Sin embargo, esta formulación junto con la de AFE y cera mostraron una pérdida de peso muy parecida a la del control mientras que en la formulación en la que se usa WPI la pérdida de peso es menor, esto puede explicarse por la observada característica de manejabilidad que da el WPI películas *in vitro* y que ya en el fruto recubierto el resultado es una compactación de los biopolímeros que disminuye la transferencia de vapor de agua.

Ribeiro y col. (2007), recubrieron fresa utilizando distintos biopolímeros: carragenina, quitosán y almidón adicionando cloruro de calcio a las soluciones filmogénicas como agente espesante que además contribuyó a la calidad microbiológica de los frutos; ellos hicieron primero un estudio en el que optimizan las características de sus recubrimientos en base a la superficie de contacto de las soluciones con el alimento en cuestión, también encontraron que utilizando carragenina y quitosán se obtiene menor pérdida de peso pero esta pérdida no la establecen como considerable con respecto a las fresas no recubiertas, sugieren el uso de lípidos para disminuir la pérdida de peso. Empero, en el presente estudio se observó que el uso de cera de abeja en la formulación no protege mayormente al alimento y que la viscosidad de la solución filmogénica puede afectar negativamente la apariencia de la fresa después del almacenamiento, puesto que, como se observó en el uso de la solución filmogénica de ADM, el recubrimiento no uniformemente distribuido en el fruto, debido a la alta viscosidad de la solución, puede provocar que las moléculas de vapor de agua se instalen en la capa espesa del recubrimiento, lo que según se cree, podría disminuir la tasa de intercambio de vapor. Posiblemente estos factores contribuyeron a la aparición de daños mecánicos por una mayor pérdida de firmeza, y pudriciones en los frutos.

García y col. (1998) monitorearon la pérdida de peso de fresa durante 30 días de almacenamiento usando almidones de maíz y papa nativos, también almidones altos en amilosa y cada uno con distintas concentraciones de glicerol o sorbitol correspondientes al 0, 10, 20 g/L de plastificante. Estos autores encontraron que tanto el plastificante como el tipo de almidón influye en la pérdida de peso de los frutos y que los almidones altos en amilosa con una concentración de 20 g/L de sorbitol o glicerol como plastificantes proveen de una capa protectora pues obtuvieron una pérdida de peso menor que con el resto de los almidones utilizados y lo atribuyen a que la amilosa es la responsable de la compactibilidad de los recubrimientos, esto pudiera explicar porque el uso de AFE, que es un almidón céreo, cuando se usó con cera no disminuyó la pérdida de peso de las fresas recubiertas.

Algunos factores deben tenerse en cuenta en los estudios anteriormente citados, por ejemplo, la madurez y calidad de las fresas cuando fueron adquiridas en el mercado local, por una parte Ribeiro y col. (2007) no mencionan parámetros de calidad de las fresas cuando se adquirieron del mercado local para ser recubiertas mientras que García y col. (1998) mencionan que las fresas utilizadas se encontraban en estado de madurez comercial (con 75% de color rojo) y que además fueron tratadas inmediatamente con los recubrimientos correspondientes. Las fresas en el presente trabajo provenían de un lote que ya estaba almacenado en el mercado local y 6 días antes de la fecha de caducidad marcada, el mismo lote se usó para el experimento 1 y 2, esto pudiera sesgar los resultados de pérdida de peso pues para la fecha en que se adquirieron las fresas, estas ya habían perdido un porcentaje de su peso, pérdida que aumenta conforme aumentan los días de almacenamiento. Otros parámetros deben evaluarse para determinar la efectividad del recubrimiento en la calidad de la fresa recubierta como la textura, color e incluso la aceptación del consumidor.

Los experimentos microbiológicos con Natamicina para la CMI por el método de dilución en caldo concuerdan con los resultados reportados en la bibliografía pues

se sabe que este antimicrobiano es activo contra algunos hongos a bajas concentraciones (Stark, 2003). Se han hecho numerosos estudios de la actividad de ϵ -poli-lisina contra distintas bacterias en diferentes medios de cultivo (Geornaras y col., 2007) pero no contra hongos, los resultados del método utilizado en esta formulación sugieren que hubo algún efecto de protección del caldo contra el antimicrobiano, razón por la cual no se observa el efecto real de este antimicrobiano contra las esporas de *B. cinerea*. Experimentos posteriores indicaron que al adicionar el antimicrobiano ϵ -poli-lisina en la placa de agar con posterior inoculación de esporas sobre ésta, se observa un efecto contra la germinación de esporas a 450 ppm del antimicrobiano. No se encontró información bibliográfica respecto al uso y efectividad de Mirenat-LA contra hongos, pero se sabe que es un conservante de amplio espectro con una amplia actividad antimicrobiana contra todo tipo de bacterias, hongos y levaduras (Alimentaria Exhibitions, 2008).

La adición de Mirenat-LA en las concentraciones propuestas a las películas, no causó ningún efecto en la germinación de esporas de *B. cinerea*, este efecto se relaciona más bien con la difusión del antimicrobiano en la película y la cantidad real presente en la misma, más no con la efectividad del mismo, la cual fue probada en experimentos previos. Deben hacerse más estudios que arrojen luz sobre la relación del antimicrobiano con el resto de la composición de la película tomando en cuenta la cantidad de ingrediente activo en los cálculos para las formulaciones, además, los experimentos realizados no simulan el tiempo ni la forma de invasión del microorganismo al alimento recubierto.

Los ensayos de biodegradabilidad mostraron que los materiales utilizados en la formulación de las películas comestibles son materiales que se descomponen por la acción de los microorganismos utilizados. Aunque la determinación fue meramente cualitativa, a partir de los seis días se observó que el material está completamente invadido por los microorganismos. Un monitoreo de peso de las películas puede proporcionar una información más específica sobre la biodegradabilidad de los materiales utilizados.

CONCLUSIONES

Se modificaron almidones de maíz altos en amilopectina para probar las propiedades de películas comestibles formadas a partir de ellos y la mezcla con proteína de suero de leche. El grado de fosfatación de los almidones modificados no fue eficiente por las condiciones de reacción utilizadas.

Cuando se usó almidón de papa con modificación dual (acetilado-entrecruzado) se obtuvieron menores valores de PVA y porcentaje de materia soluble total, no obstante, menores valores de opacidad se obtuvieron cuando se usó almidón fosfatado por extrusión.

El desmoldado de las películas después del secado es un paso crucial en su caracterización pues afecta el espesor, que a su vez afecta directamente algunas de las propiedades evaluadas como la opacidad y la permeabilidad al vapor de agua.

La permeabilidad al vapor de agua está influenciada por la temperatura y humedad relativa, ambas condiciones deben ser constantes en todas las formulaciones para obtener resultados reproducibles.

El aceite de cártamo adicionado a las soluciones filmogénicas al 0.3% no se incorporó a las películas por lo que no es un agente hidrófobo recomendado a esa concentración en las formulaciones.

La menor pérdida de peso de las fresas recubiertas se observó cuando se usó WPI con almidón fosfatado por extrusión y cera como agente hidrófobo, lo que sugiere que el uso de WPI en fresa puede ayudar a conservar sus características sensoriales por más tiempo.

El agente antimicrobiano Mirenat-LA no tuvo ningún efecto en el crecimiento de *B. cinerea* cuando se adicionó a la película a las concentraciones seleccionadas.

Mayores concentraciones adicionadas a las soluciones filmogénicas pueden probarse en experimentos que simulen la llegada real del microorganismo al alimento.

Los materiales utilizados en la formulación de las películas comestibles son completamente degradados por los microorganismos utilizados en un tiempo total de 20 días.

Estudios de caracterización de las soluciones filmogénicas y en las películas, como espectroscopia infrarroja, mediciones de viscosidad y de superficie de contacto, se sugieren para optimizar el recubrimiento de un fruto fresco.

Para obtener datos más reales respecto a la pérdida de peso en fresa recubierta, deben acercarse las condiciones a las reales de cosecha, por lo que se sugiere que posteriores experimentos se realicen con frutos recién cortados.

Formulaciones con antimicrobiano deben aplicarse al fruto fresco para observar el efecto real del antimicrobiano contra el hongo deteriorador *B. cinerea* utilizado en este estudio.

El uso de almidones modificados en la formulación de recubrimientos comestibles puede proveer nuevas perspectivas en esta área de investigación orientados a un producto en específico.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Alimentaria Exhibitions, 2008. www. bta-bcn.com.

Appendini, P., Hotchkiss, J.H. 2002. Review of antimicrobial food packaging. Innovative Food Science and Emerging Technologies. Vol. 3: 113-124.

ASTM Standar. 1990. Methods of conditioning plastics and electrical insulating materials for testing. Mayo 25 de 2010.

Badui, S., 2006. Química de los alimentos. 4ª edición. Pearson Educación, México D.F: 102-105.

Barbosa-Cánovas, G., Olivas, G.I. 2009. Edible Films and Coatings for Food Applications. Springer, New York: 211-238.

Bourtoom, T., 2008. Edible films and coatings: characteristics and properties. International Food Research Journal. Vol. 15: 237-248.

Cisneros-Zevallos, L., Krochta, J.M. 2003a. Viscosity of coating solution applied to fruits and vegetables by dipping method. Journal of Food Science. Vol. 68: 503-509.

Cisneros-Zevallos, L., Krochta, J.M. 2003b. Whey protein coatings for fresh fruits and relative humidity effects. Journal of Food Science. Vol. 68: 176-181.

Dangaran, K., Tomasula, P.M., Qi, P. 2009. Edible Films and Coatings for Food Applications. Springer, New York: 25, 31-32, 43.

Espinosa, S.V. 2008. Estudios estructurales de almidón de fuentes no convencionales: Mango (*Mangifera indica* L.) y plátano (*Musa paradisiaca* L.). Morelos. Instituto Politécnico Nacional. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos. 3-18.

Fernández, L., Días, E., Cebrian, M., Villarán, C., Maté, J.I. 2005. Effect of the unsaturation degree and concentration of fatty acids on the properties of WPI-based edible films. European Food Research and Technology. Vol. 224: 415-420.

García, M., Rojas, A.M., Laurindo, J.B., Romero-Bastida, C.A., Grossmann, M.V.E., Martino, M.N., Flores, S., Zamudio-Flores, P.B., Mali, S., Zaritzky, N.E., Sobral, P., Famá, L., Bello-Pérez, L.A., Yamashita, F., del Beleia, A.P. 2008. Food Engineering: Integrated Approaches. Springer, New York: 432.

- García, M.A., Martino, M.N., Zaritzky, N.E. 1998.** Plasticized starch-based coatings to improve strawberry (*Fragaria ananassa*) quality and estability. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 46: 3758-3764.
- García, M.A., Martino, M.N., Zaritzky, N.E. 2000.** Lipid addition to improve barrier properties of edible starch-based films and coatings. Journal of Food Science. Vol. 65: 941-947.
- García, M.A., Pinott, A., Martino, N.M., Zaritzky, N.E. 2009.** Edible Films and Coatings for Food Applications. Springer, New York: 169-203.
- García-Garibay, M., Revah, S., Gómez, R. L. 2004.** Biotecnología Alimentaria. Noriega Editores, México D.F: 196-197.
- Geornaras, I., Yoon, Y., Belk, K.E., Smith, G.C., Sofos, J.N. 2007.** Antimicrobial activity of ϵ -polilisina against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* in various food extracts. Journal of Food Science. Vol. 72: 330-334.
- Hagenmaier, R.D., Baker, R.A. 1994.** Wax microemulsions and emulsions as citrus coatings. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 42: 899-902.
- Han, J.H., Seo, G.H., Park, I.M., Kim, G.N., Lee, D.S. 2006.** Physical and mechanical properties of pea starch edible film containing beeswax emulsions. Journal of Food Science. Vol. 71: 290-296.
- Hu, G., Chen, J., Gao, J. 2009.** Preparation and characteristics of oxidized potato starch films. Carbohydrate polymers. Vol. 76: 291-298.
- Jagannath, J.H., Nanjappa, C., Das Gupta, D.K., Bawa, A.S. 2003.** Mechanical and barrier properties of edible starch-protein-based films. Journal of Applied Polymer Science. Vol. 88: 64-71.
- Kerr, R. W. 1947.** Orthophosphate ester of starch. U.S. patent 2.884,413.
- Kim, K.W., Ko, C.J., Park, H.J. 2002.** Mechanical properties, water vapor permeabilities and solubilities of highly carboxymethylated starch-based edible films. Journal of Food Science. Vol. 67: 218-222.
- Kirk, R.S., Sawyer, R., Egan, H. 1996.** Composición y análisis de alimentos de Pearson. 2ª edición. Cecsa, México D.F: 40-42.

- Kramer, M.E. 2009.** Edible Films and Coatings for Food Applications. Springer, New York: 113-201.
- Landeritol, A.N., Ya-Jane, W. 2005.** Preparation and propiedades of starch phosphates using waxy, common, and high-amylose corn starches. I. Oven-heating method. Cereal Chem. Vol 82: 264-270.
- Lim, S., Seib, P.A. 1993.** Preparation and pasting properties of wheat and corn starch phosphates. Cereal Chem. Vol. 70: 137-144.
- Lin, D., Zhao, Y. 2007.** Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. Vol. 6: 60-71.
- Liu, Z., Han, J.H. 2005.** Film-forming characteristics of starches. Journal of Food Science. Vol. 70: 31-34.
- López, O.V., García, M.A., Zaritzky, N.E. 2008.** Film forming capacity of chemically modified corn starches. Carbohydrate Polymers. Vol. 73: 573-581.
- López-Malo, A., Palou, E., Parish, M.E., Davidson, M.P. 2005.** Antimicrobials in Food. 3a edición. Taylor y Francis Group, Florida: 660-670.
- Magaña, F. 2007.** Diseño de un material de empaque biodegradable a base de aislado de proteína de suero adicionado con agentes antimicrobianos naturales. Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. 10-67.
- Manrique-Quevedo, N., González-Soto, R., Othman-Abu-Hardan, M., García-Suárez, F.J., Bello-Pérez, L.A. 2007.** Caracterización de mezclas de almidones de mango y plátano pregelatinizados mediante diferentes condiciones de extrusión. Agrociencia. Vol. 41: 637-645.
- May, M.E., 2009.** Desarrollo de un recubrimiento comestible a base de mucílago de nopal (*Opuntia spp.*). Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. 48-76.
- McHugh, T.H., Krochta, J.M. 1994.** Edible Coatings and Films to Improve Food Quality. CRC Press, Florida. 139-141.

- Mistry, Y., 2006.** Development of LDPE-based antimicrobial films for food packaging. Victoria. Victory University. A thesis for the award of masters degree. 2-46.
- Múrua-Pagola, B. 2009.** Preparación de derivados de almidón por extrusión y evaluación de almidones modificados como materiales de encapsulación de sustancias aromáticas mediante secado por aspersion. Querétaro. Instituto Politécnico Nacional. Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias de los Materiales. 6-126.
- Murúa-Pagola, B., Beristain-Guevara, C.I., Martínez-Bustos, F. 2009.** Preparation of starch derivates using reactive extrusión and evaluations of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. Journal of Food Engineering. Vol. 91: 380-386.
- National Starch and Chemical Company. 1994.** Tecnología de almidones para alimentos. Noviembre 6 de 2009.
- Pavlath, A.E., Orts, W. 2009.** Edible Films and Coatings for Food Applications. Springer, New York: 1-20.
- Pérez-Gago, M.B., Nadaud, P., Krochta, J.M. 1999.** Water vapor permeability, solubility, and tensile properties of heat-denatured versus native whey protein films. Journal of Food Science. Vol. 64: 1034-1037.
- Pérez-Gago, M.B., Serra, M., Alonso, M., Mateos, M., Del Río, M.A. 2003.** Effect of solid content and lipid content of whey protein isolate-beeswax edible coatings on color change of fresh-cut apples. Journal of Food Science. Vol. 68: 2186-2191.
- Rebordinos, L., Vallejo, I., Santos, M., Collado, I.G., Carbú, M., Cantoral, J.M. 2000.** Análisis genético y relación con patogenicidad en *Botrytis cinerea*. Revista americana de micología. Vol. 17: 37-42.
- Regalado, C., Pérez-Pérez, C., Lara-Cortés, E., García-Almendarez, B. 2006.** Advances in Agricultural and Food Biotechnology. Research Signpost, Kerala: 2-18.
- Ribeiro, C. Vicente, A.C., Teixeira, J.A., Cândida, M., 2007.** Optimization of edible coating composition to reatrd strawberry fruit senescence. Postharvest Biology and Technology. Vol 44: 63-70.

- Rojas-Graü**, M. A., Tapia, M.S., Martín, O. **2007**. Empleo de recubrimientos comestibles en frutas frescas cortadas: nuevo enfoque de conservación y desarrollo de productos. *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos*. Vol. 38: 105-118.
- Rojas-Graü**, M.A. **2006**. Recubrimientos comestibles y sustancias de origen natural en manzana fresca cortada: una nueva estrategia de conservación. Lleida. Universidad de Lleida. Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencia y Tecnología de alimentos. 42-65.
- Romero-Bastida**, C.A., Bello-Pérez, L.A., García, M.A., Martino, M.N., Solorza-Feria, J., Zaritzky, N.E. **2005**. Physicochemical and microstructural characterization of films prepared by thermal and cold gelatinization from non-conventional sources of starches. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 60: 235-244.
- Shellhammer**, T.H., Krochta, J.M. **1997**. Whey protein emulsion film performance as affected by lipid type and amount. *Journal of Food Science*. Vol. 62: 390-394.
- Shih**, F.F. **1996**. Edible films from rice protein concentrate and pullulan. *Cereal Chem*. Vol 73: 406-409.
- Singh**, J., Kaur, L., McCarthy, O.J. **2007**. Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications- a review. *Food Hydrocolloids*. Vol. 21: 1-22.
- Smith**, R.J., Caruso, J.L. **1964**. *Methods in carbohydrate chemistry*. Academic Press, New York: 311.
- Stark**, J., **2003**. *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods*. Woodhead Publishing Limited. Cambridge: 82-95.
- Tapia**, M.S., Rojas-Graü, M.A., Rodríguez, F.J., Ramírez, J., Carmona, A., Martín-Belloso, O. **2007**. Alginate and gellan-based edible films for probiotic coatings on fresh-cut fruits. *Journal of Food Science*. Vol. 72: 190-196.
- Tharanathan**, R.N. **2003**. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science and Technology*. Vol. 14: 71-78.
- Valencia-Chamorro**, S.A. **2009**. Desarrollo de recubrimientos comestibles con actividad antifúngica en frutos cítricos. Valencia. Universidad Politécnica de

Valencia. Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencia y Tecnología de Alimentos. 3-48.

Vargas, M., Pastor, C., Chiralt, A., McClements, J.D., González-Martínez, Ch. 2008. Recent advances in edible coating for fresh and minimally processed fruits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Vol. 48: 496-511.

Wang, L., Liu, L., Holmes, J., Kerry, J.F., Kerry, J. 2007. Assesment of film-forming potential and properties of protein and polysaccharide based biopolymer films. *International Journal of Food Science and Technology*. Vol. 42: 1128-1138.

Zobel, H.F. 1988. Molecules to granules: A comprehensive starch review. *Starch-Stärke*. Vol. 40: 44-50.

ANEXOS

A.1. Determinación de porcentaje de fósforo

La curva de calibración utilizada se muestra en la Figura 16 y los datos obtenidos en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Datos de la curva de calibración para la determinación de fósforo.

mg de fósforo/100mL	Absorbancia \pm DE
0.0	-0.004 \pm 0.006
0.5	0.051 \pm 0.018
1.0	0.083 \pm 0.009
2.0	0.156 \pm 0.011
4.0	0.306 \pm 0.019
6.0	0.435 \pm 0.025
8.0	0.545 \pm 0.025
10.0	0.654 \pm 0.039

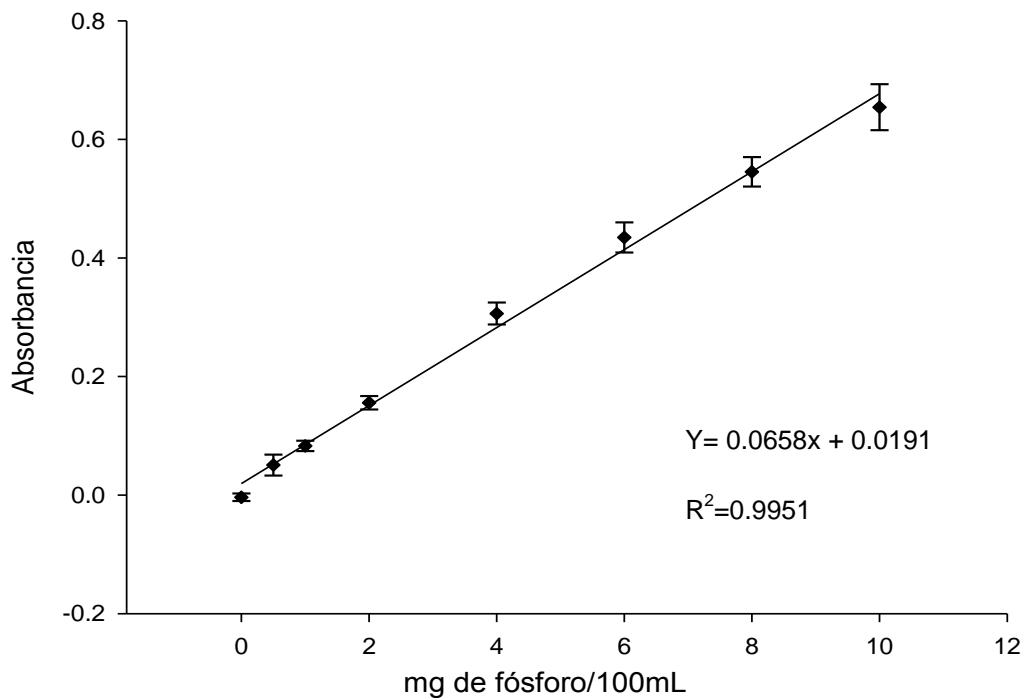


Figura 16. Curva de calibración para determinar porcentaje de fósforo.

A.2. Determinación de la permeabilidad al vapor de agua

Se escogió arbitrariamente una medición correspondiente a la formulación del diseño experimental con almidón fosfatado por extrusión termoplástica al 1.5%, con aislado de proteína de suero lácteo al 1.5%, con cera como agente hidrófobo al 0.3% y la concentración de sorbitol al 3% para mostrar cómo se obtuvo la permeabilidad al vapor de agua de todas las formulaciones del diseño experimental.

Los datos de pérdida de peso obtenidos durante el experimento se muestran en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Datos de pérdida de peso respecto al tiempo de una película formulada

Tiempo (h)	Peso (g)
0.0	124.90
0.5	124.89
1.0	124.88
1.5	124.87
2	124.86
3	124.84
4	124.82
5	124.80
6	124.78
7	124.76
8	124.74
24	124.42

La gráfica obtenida, así como la ecuación obtenida a partir de la regresión lineal de los datos mencionados se muestran en la Figura 17.

La humedad relativa promedio registrada en este experimento fue de 46.25% y la temperatura promedio de 24.3 °C, la presión de vapor del agua a esta temperatura de 3.0190 KPa, el área expuesta fue de $8.76 \times 10^{-4} \text{ m}^2$ y el espesor medio de la película fue de 51 μm (0.051mm).

Con la ecuación 2 y 3 descritas en el apartado V.2.3.1 se llevaron a cabo los cálculos como a continuación se muestra:

$$PVA = \frac{G/t \cdot x}{A \cdot \Delta P} \quad [2]$$

$$\Delta P = \frac{P^*}{100} (HR_2 - HR_1) \quad [3]$$

Cálculo de ΔP con la ecuación 3:

$$\Delta P = \frac{3.0190 \text{KPa}}{100} (100 - 46.25)$$

$$\Delta P = 1.623 \text{ KPa}$$

Cálculo de la PVA con la ecuación 2, de donde G/t, según la Figura 17, es de 0.02 g/h, así:

$$PVA = \frac{(0.02 \text{ g/h}) (0.051 \text{ mm})}{(0.000876 \text{ m}^2) (1.623 \text{ KPa})}$$

$$PVA = 0.782 \text{ g} \cdot \text{mm} / \text{m}^2 \cdot \text{h} \cdot \text{kPa}$$

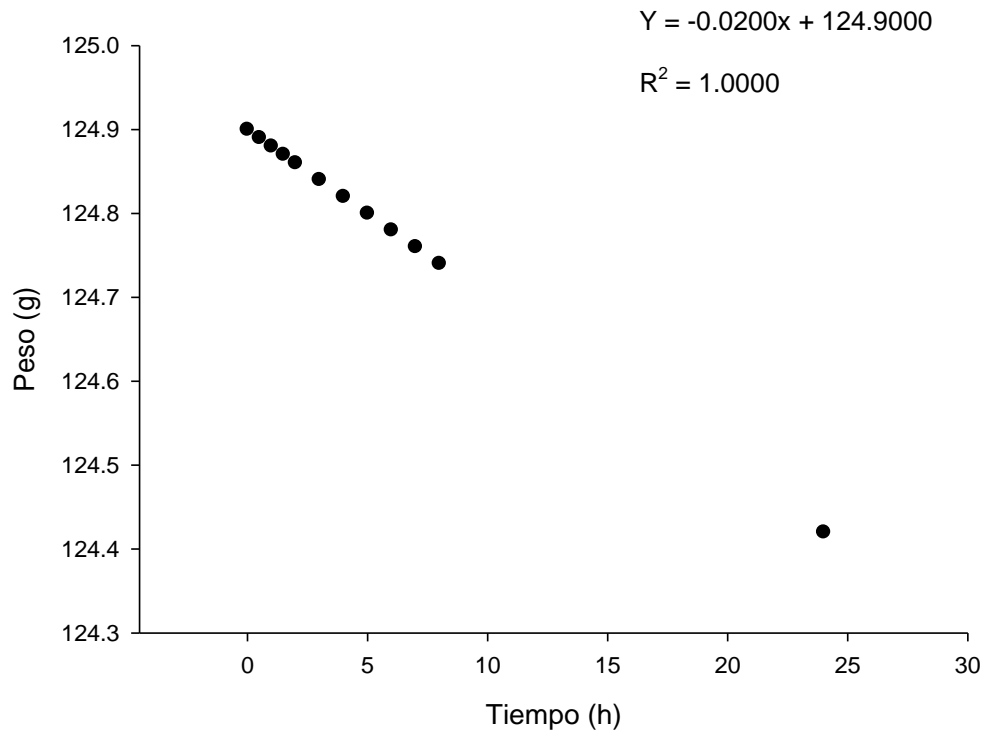


Figura 17. Gráfica de pérdida de peso con respecto al tiempo para cálculo de permeabilidad al vapor de agua

A.4. Análisis estadístico

A.4.1. Permeabilidad al vapor de agua

Summary of Fit

RSquare	0.330939
RSquare Adj	0.190084
Root Mean Square Error	0.08537
Mean of Response	0.707083
Observations (or Sum Wgts)	24

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	4	0.06849308	0.017123	2.3495
Error	19	0.13847275	0.007288	Prob > F
C. Total	23	0.20696583		0.0911

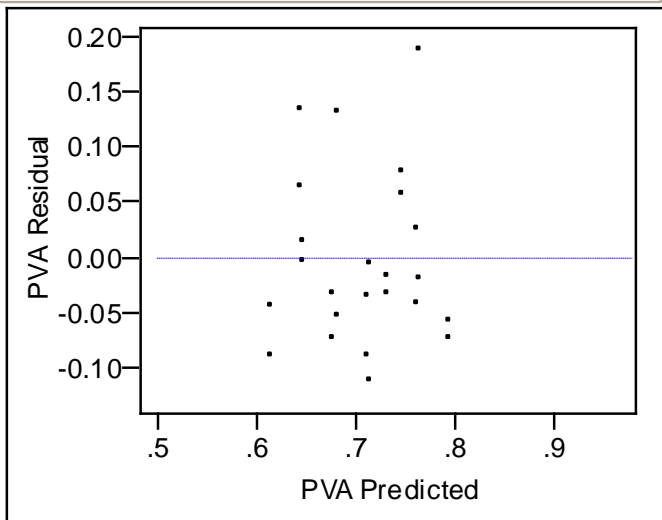
Lack Of Fit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	7	0.08558275	0.012226	2.7739
Pure Error	12	0.05289000	0.004408	Prob > F
Total Error	19	0.13847275		0.0580
				Max RSq
				0.7445

Effect Tests

Source	Nparm	DF	Sum of Squares	F Ratio	Prob > F
tipo de almidón	2	2	0.05599358	3.8415	0.0397
tipo de ag hidrofóbico	1	1	0.00673350	0.9239	0.3485
cantidad de almidón	1	1	0.00576600	0.7912	0.3849

Residual by Predicted Plot



A.4.2. Porcentaje de materia soluble total

Summary of Fit

RSquare	0.729117
RSquare Adj	0.672089
Root Mean Square Error	9.543801
Mean of Response	60.32983
Observations (or Sum Wgts)	24

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	4	4658.1351	1164.53	12.7853
Error	19	1730.5987	91.08	Prob > F
C. Total	23	6388.7339		<.0001

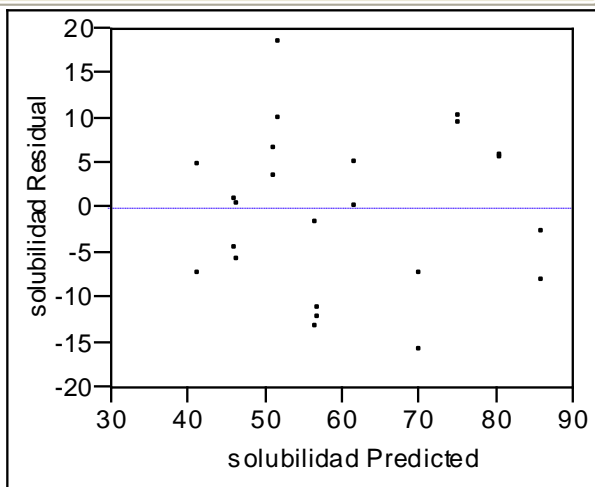
Lack Of Fit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	7	1455.2866	207.898	9.0616
Pure Error	12	275.3121	22.943	Prob > F
Total Error	19	1730.5987		0.0006
				Max RSq
				0.9569

Effect Tests

Source	Nparm	DF	Sum of Squares	F Ratio	Prob > F
tipo de almidón	2	2	3824.3907	20.9937	<.0001
tipo de ag hidrofóbico	1	1	158.6513	1.7418	0.2026
cantidad de almidón	1	1	675.0931	7.4118	0.0135

Residual by Predicted Plot



A.4.3. Opacidad

Summary of Fit

RSquare	0.608344
RSquare Adj	0.52589
Root Mean Square Error	0.153795
Mean of Response	0.405333
Observations (or Sum Wgts)	24

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	4	0.6980385	0.174510	7.3780
Error	19	0.4494028	0.023653	Prob > F
C. Total	23	1.1474413		0.0009

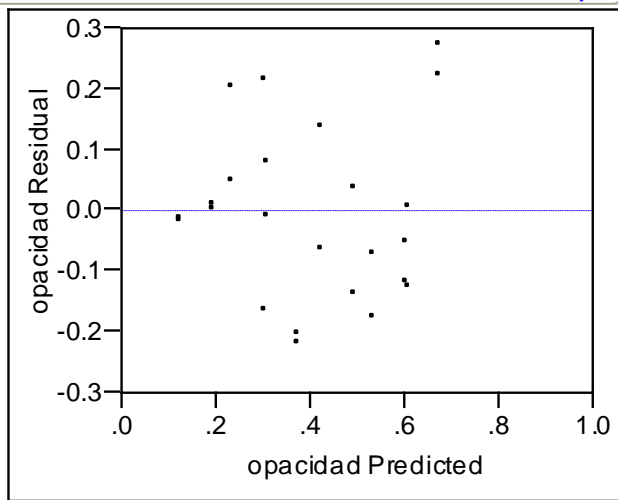
Lack Of Fit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	7	0.30808783	0.044013	3.7374
Pure Error	12	0.14131500	0.011776	Prob > F
Total Error	19	0.44940283		0.0221
				Max RSq
				0.8768

Effect Tests

Source	Npam	DF	Sum of Squares	F Ratio	Prob > F
tipo de almidón	2	2	0.12976233	2.7431	0.0898
tipo de ag hidrofóbico	1	1	0.53760267	22.7289	0.0001
cantidad de almidón	1	1	0.03067350	1.2968	0.2689

Residual by Predicted Plot



A.4.4. Espesor

Summary of Fit

R Square	0.254158
R Square Adj	0.097138
Root Mean Square Error	7.369773
Mean of Response	50.60408
Observations (or Sum Wgts)	24

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	4	351.6564	87.9141	1.6186
Error	19	1031.9576	54.3136	Prob > F
C. Total	23	1383.6140		0.2106

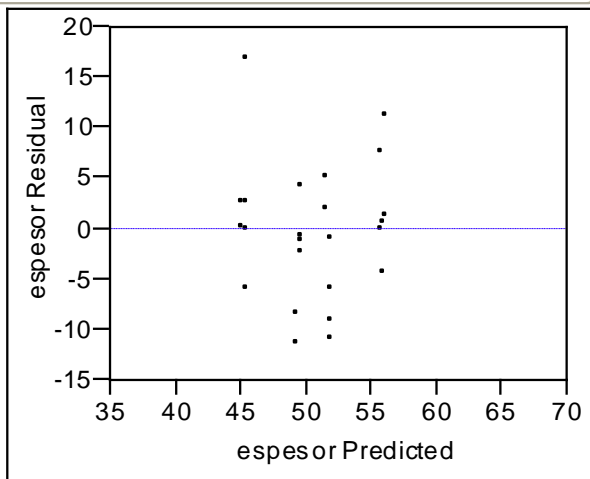
Lack Of Fit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	7	738.3845	105.483	4.3117
Pure Error	12	293.5731	24.464	Prob > F
Total Error	19	1031.9576		0.0132
				Max RSq
				0.7878

Effect Tests

Source	Npam	DF	Sum of Squares	F Ratio	Prob > F
tipo de almidón	2	2	0.63450	0.0058	0.9942
tipo de ag hidrofóbico	1	1	248.94465	4.5835	0.0455
cantidad de almidón	1	1	102.07725	1.8794	0.1864

Residual by Predicted Plot



A.5. Conteo de esporas

Se llevó a cabo en cámara Neu-bauer de 25 fosas (cada fosa con 16 cuadrados pequeños) con profundidad de 0.1 mm y área superficial individual de cada cuadro pequeño de $1/400 \text{ mm}^2$. Información en base a la cual se obtuvo el volumen total de la cámara utilizada como sigue:

$$V = (\text{Área}) \cdot (\text{Profundidad})$$

$$V = (0.0025\text{mm}^2) \cdot (16) \cdot (25) \cdot (0.1\text{mm})$$

$$V = 0.1\text{mm}^3$$

De modo que, 0.1 mm^3 es el volumen total de la cámara, y el número de esporas total que se cuente en toda la cámara corresponde al número de esporas que hay en 0.1 mm^3 , para conocer el número de esporas en 1 cm^3 o mL se llevó a cabo el siguiente cálculo:

$$N_{\text{esporas}} = \frac{(\text{Total de esporas en cámara})}{0.1\text{mm}^3} \cdot \left(\frac{1000\text{mm}^3}{1\text{cm}^3} \right)$$

$$\frac{\# \text{ de esporas}}{\text{mL}} = (\text{Esporas contadas}) \cdot (1 \times 10^4) \cdot (\text{dilución utilizada})$$

A continuación se muestra un ejemplo de los conteos realizados en la cámara:

3	4	2	3	4
6	2	0	5	10
5	4	5	3	9
5	4	1	2	4
7	5	7	1	3

Total=93

1	2	4	0	1
5	4	3	2	3
3	3	2	6	4
6	4	2	6	1
3	4	2	6	1

Total=90

7	4	2	5	7
7	4	2	7	6
3	4	2	0	10
3	6	4	4	0
6	3	8	0	5

Total=99

3	4	2	3	4
6	2	0	5	10
5	4	5	3	9
5	4	1	2	4
7	5	7	1	3

Total=84

El factor de dilución es 50 en este caso pues de la solución original se tomaron 50 μL y se llevaron a 500 μL como volumen total. Se obtuvo un promedio de los cuatro conteos realizados el cual fue de 91.5 esporas.

$$\frac{\# \text{ de esporas}}{\text{mL}} = (91.5) \cdot (1 \times 10^4) \cdot (50)$$

$$\frac{\# \text{ de esporas}}{\text{mL}} = 4.58 \times 10^7 \approx 5 \times 10^7$$

El número de esporas total de este conteo es **5×10^7 esporas/ mL**

A.6. Perspectivas de investigación

El uso de almidones modificados en la investigación sobre la formulación de recubrimientos comestibles es una perspectiva nueva, recién explorada en el Laboratorio de Biotecnología de Alimentos. El uso de estos biopolímeros tiene sus ventajas, sobre todo en cuanto a disponibilidad del material y reducción de costos.

Actualmente se están probando otro tipo de almidones modificados para obtener recubrimientos con una menor permeabilidad al vapor de agua, para lo cual se bajó la concentración de sorbitol y se caracterizaron las soluciones filmogénicas. Entre los almidones modificados probados se encuentran el almidón n-octenil-succinilado (OSA) y el oxidado que han provisto a las películas de menores valores de opacidad y permeabilidad al vapor de agua.

El primer paso antes de formular recubrimientos es estudiar teóricamente las propiedades que dará la modificación química a sus moléculas y como puede esto afectar positiva o negativamente a las propiedades de barrera.

También es importante contar con las condiciones ambientales necesarias para aumentar la confiabilidad de los resultados (la temperatura y humedad relativa de secado de las películas debe ser constante).

Los resultados de esta investigación mostraron que los almidones fosfatados no son opciones viables para reducir valores de permeabilidad al vapor de agua ni tampoco lo es la adición de agentes hidrófobos, la perspectiva es que se estudien las propiedades de almidones modificados sin la adición de agentes hidrófobos y especialmente se centre la aplicación y caracterización del recubrimiento sobre frutos frescos.

Standard Practice for Determining Resistance of Synthetic Polymeric Materials to Fungi¹

This standard is issued under the fixed designation G 21; the number immediately following the designation indicates the year of original adoption or, in the case of revision, the year of last revision. A number in parentheses indicates the year of last reapproval. A superscript epsilon (ϵ) indicates an editorial change since the last revision or reapproval.

This standard has been approved for use by agencies of the Department of Defense. Consult the DoD Index of Specifications and Standards for the specific year of issue which has been adopted by the Department of Defense.

1. Scope

1.1 This practice covers determination of the effect of fungi on the properties of synthetic polymeric materials in the form of molded and fabricated articles, tubes, rods, sheets, and film materials. Changes in optical, mechanical, and electrical properties may be determined by the applicable ASTM methods.

1.2 The values stated in SI units are to be regarded as the standard.

2. Referenced Document

- 2.1 *ASTM Standard:*
D 618 Methods of Conditioning Plastics and Electrical Insulating Materials for Testing²

3. Summary of Practice

3.1 The procedure described herein consists of (1) selection of suitable specimens for determination of pertinent properties, (2) inoculation of the specimens with suitable organisms, (3) exposure of inoculated specimens under conditions favorable to growth, (4) examination and rating for visual growth, and (5) removal of the specimens and observations or testing, either before cleaning or after cleaning and reconditioning.

NOTE 1—Since the procedure involves handling and working with fungi, it is recommended that personnel trained in microbiology perform the portion of the procedure involving handling of organisms and inoculated specimens.

4. Significance and Use

4.1 The resin portion of these materials is usually fungus-resistant in that it does not serve as a carbon source for the growth of fungi. It is generally the other components, such as plasticizers, cellulose, lubricants, stabilizers, and colorants, that are responsible for fungus attack on plastic materials. It is important to establish the resistance to microbial attack under conditions favorable for such attack, namely, a temperature of 2 to 38°C (35 to 100°F) and a relative humidity of 60 to 100 %.

4.2 The effects to be expected are as follows:

4.2.1 Surface attack, discoloration, loss of transmission (optical).

4.2.2 Removal of susceptible plasticizers, modifiers, and lubricants, resulting in increased modulus (stiffness), changes in weight, dimensions, and other physical properties, and deterioration of electrical properties such as insulation resistance, dielectric constant, power factor, and dielectric strength.

4.3 Often the changes in electrical properties are due principally to surface growth and its associated moisture and to pH changes caused by excreted metabolic products. Other effects include preferential growths caused by nonuniform dispersion of plasticizers, lubricants, and other processing additives. Attack on these materials often leaves ionized conducting paths. Pronounced physical changes are observed on products in film form or as coatings, where the ratio of surface to volume is high, and where nutrient materials such as plasticizers and lubricants continue to diffuse to the surface as they are utilized by the organisms.

4.4 Since attack by organisms involves a large element of chance due to local accelerations and inhibitions, the order of reproducibility may be rather low. To assure that estimates of behavior are not too optimistic, the greatest observed degree of deterioration should be reported.

4.5 Conditioning of the specimens, such as exposure to leaching, weathering, heat treatment, etc., may have significant effects on the resistance to fungi. Determination of these effects is not covered in this practice.

5. Apparatus

5.1 *Glassware*—Glass vessels are suitable for holding specimens when laid flat. Depending on the size of the specimens, the following are suggested:

5.1.1 For specimens up to 75 mm (3 in.) in diameter, 150-mm (6-in.) covered Petri dishes.

5.1.2 For 75 mm (3 in.) and larger specimens, such as tensile and stiffness strips, large Petri dishes, trays of borosilicate glass, or baking dishes up to 400 by 500 mm (16 by 20 in.) in size, covered with squares of window glass.

5.2 *Incubator*—Incubating equipment for all test methods shall maintain a temperature of 28 to 30°C (82.4 to 86°C) and a relative humidity not less than 85 %. Automatic recording of wet- and dry-bulb temperature is recommended.

6. Reagents and Materials

6.1 *Purity of Reagents*—Reagent grade chemicals shall be used in all tests. Unless otherwise indicated, it is intended

¹ This practice is under the jurisdiction of ASTM Committee G-3 on Durability of Nonmetallic Materials and is the direct responsibility of Subcommittee G03.04 on Biological Deterioration.

Current edition approved Oct. 26, 1990. Published December 1990. Originally published as D 1924 - 61. Last previous edition D 1924 - 63. Redesignated G 21 in 1970 (Reapproved 1990).

² Annual Book of ASTM Standards, Vol 08.01.

that all reagents shall conform to the specifications of the Committee on Analytical Reagents of the American Chemical Society, where such specification are available.³ Other grades may be used, provided it is first ascertained that the reagent is of sufficiently high purity to permit its use without lessening the accuracy of the determination.

6.2 *Purity of Water*—Unless otherwise indicated, references to water shall be understood to mean distilled water or water of equal purity.

6.3 *Nutrient-Salts Agar*⁴—Prepare this medium by dissolving in 1 L of water the designated amounts of the following reagents:

Phosphorus dihydrogen orthophosphate (KH ₂ PO ₄)	0.7 g
Magnesium sulfate (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.7 g
Ammonium nitrate (NH ₄ NO ₃)	1.0 g
Sodium chloride (NaCl)	0.005 g
Ironous sulfate (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	0.002 g
Zinc sulfate (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	0.002 g
Manganous sulfate (MnSO ₄ ·H ₂ O)	0.001 g
Agar	15.0 g
Phosphorus monohydrogen orthophosphate (K ₂ HPO ₄)	0.7 g

Sterilize the test medium by autoclaving at 121°C (250°F) for 20 min. Adjust the pH of the medium by the addition of 0.01 N NaOH solution so that after sterilization the pH is between 6.0 and 6.5. Prepare sufficient medium for the required tests.

6.4 *Mixed Fungus Spore Suspension*:

NOTE 2—Since a number of other organisms may be of specific interest for certain final assemblies or components, such other pure cultures of organisms may be used if agreed upon by the purchaser and the manufacturer of the plastic. Reference (1) illustrates such a choice.

6.4.1 Use the following test fungi in preparing the cultures:

Fungi	ATCC No. ⁴	MYCO No. ⁵
— <i>Aspergillus niger</i>	9642 ^c	386
— <i>Penicillium pinophilum</i> ^c	11797	391
— <i>Chaetomium globosum</i> ✓	6205	459
— <i>Gliocladium virens</i> ✓	9645 ^c	365
— <i>Aureobasidium pullulans</i> ^a	15233 ^c	279c

^a American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20850.

^b Micrological Services, Box 1056, Crawfordsville, IN 47933.

^c Historically known as funiculosum.

Maintain cultures of these fungi separately on an appropriate medium such as potato dextrose agar. The stock cultures may be kept for not more than 4 months at approximately 3 to 10°C (37 to 50°F). Use subcultures incubated at 28 to 30°C (82 to 86°F) for 7 to 20 days in preparing the spore suspension.

6.4.2 Prepare a spore suspension of each of the five fungi by pouring into one subculture of each fungus a sterile 10-mL portion of water or of a sterile solution containing 0.05 g/L of a nontoxic wetting agent such as sodium dioctyl sulfosuccinate. Use a sterile platinum or nichrome inoculating wire to scrape gently the surface growth from the culture of the test organism.

³ "Reagent Chemicals, American Chemical Society Specifications," Am. Chem. Soc., Washington, DC. For suggestions on the testing of reagents not listed by the American Chemical Society, see "Reagent Chemicals and Standards," by Hugh Rossin, D. Van Nostrand Co., Inc., New York, NY, and the "United States Pharmacopoeia."

⁴ Agar and nutrient-salts agar are obtainable from biological laboratory supply houses.

6.4.3 Pour the spore charge into a sterile 125-mL glass-stoppered Erlenmeyer flask containing 45 mL of sterile water and 10 to 15 solid glass beads, 5 mm in diameter. Shake the flask vigorously to liberate the spores from the fruiting bodies and to break the spore clumps.

6.4.4 Filter the shaken suspension through a thin layer of sterile glass wool in a glass funnel into a sterile flask in order to remove mycelial fragments.

6.4.5 Centrifuge the filtered spore suspension aseptically, and discard the supernatant liquid. Resuspend the residue in 50 mL of sterile water and centrifuge.

6.4.6 Wash the spores obtained from each of the fungi in this manner three times. Dilute the final washed residue with sterile nutrient-salts solution (Note 3) in such a manner that the resultant spore suspension shall contain 1 000 000 ± 200 000 spores/mL as determined with a counting chamber.

6.4.7 Repeat this operation for each organism used in the test and blend equal volumes of the resultant spore suspension to obtain the final mixed spore suspension.

NOTE 3—Nutrient salts solution is identical with the composition for nutrient salts agar given in 6.3 except that the agar is omitted.

6.4.8 The spore suspension may be prepared fresh each day or may be held in the refrigerator at 3 to 10°C (37 to 50°F) for not more than 4 days.

7. Viability Control

7.1 With each daily group of tests place each of three pieces of sterilized filter paper, 25 mm (1 in.) square, on hardened nutrient-salts agar in separate Petri dishes. Inoculate these with the spore suspension by spraying the suspension from a sterilized atomizer⁵ so that the entire surface is moistened with the spore suspension. Incubate these at 28 to 30°C (82 to 86°F) at a relative humidity not less than 85 % and examine them after 14 days' incubation. There shall be copious growth on all three of the filter paper control specimens. Absence of such growth requires repetition of the test.

8. Test Specimens

8.1 The simplest specimen may be a 50 by 50-mm (2 by 2-in.) piece, a 50-mm (2-in.) diameter piece, or a piece (rod or tubing) at least 76 mm (3 in.) long cut from the material to be tested. Completely fabricated parts or sections cut from fabricated parts may be used as test specimens. On such specimens, observation of effect is limited to appearance, density of growth, optical reflection or transmission, or manual evaluation of change in physical properties such as stiffness.

8.2 Film-forming materials such as coatings may be tested in the form of films at least 50 by 25 mm (2 by 1 in.) in size. Such films may be prepared by casting on glass and stripping after cure, or by impregnating (completely covering) filter paper or ignited glass fabric.

8.3 For visual evaluation, three specimens shall be inoculated. If the specimen is different on two sides, three specimens of each, face up and face down, shall be tested.

⁵ DeVilbiss No. 163 atomizer or equivalent has been found satisfactory for this purpose.

NOTE 4—In devising a test program intended to reveal quantitative changes occurring during and after fungal attack, an adequate number of specimens should be evaluated to establish a valid value for the original property. If five replicate specimens are required to establish a tensile strength of a film material, the same number of specimens shall be removed and tested for each exposure period. It is to be expected that values of physical properties at various stages of fungal attack will be variable; the values indicating the greatest degradation are the most significant (see 4.4). The *ASTM Manual on Presentation of Data and Control Chart Analysis STP 15D*, may be used as a guide.

9. Procedure

9.1 *Inoculation*—Pour sufficient nutrient-salts agar into suitable sterile dishes (see 5.1) to provide a solidified agar layer from 3 to 6 mm (1/8 to 1/4 in.) in depth. After the agar is solidified, place the specimens on the surface of the agar. Inoculate the surface, including the surface of the test specimens, with the composite spore suspension by spraying the suspension from a sterilized atomizer⁵ with 110 kPa (16 psi) of air pressure so that the entire surface is moistened with the spore suspension.

9.2 *Incubation*—Cover the inoculated test specimens and incubate at 28 to 30°C (82 to 86°F) and not less than 85 % relative humidity for a minimum of 21 days, recording the growth each week.

NOTE 5—Covered dishes containing nutrient agar are considered to have the desired humidity. Covers on large dishes may be sealed with masking tape.

9.3 *Observation for Visible Effects*—If the test is for visible effects only, remove the three specimens from the incubator and judge them as follows:

Observed Growth on Specimens	Rating
None	0
Traces of growth (less than 10 %)	1
Light growth (10 to 30 %)	2

Observed Growth on Specimens	Rating
Medium growth (30 to 60 %)	3
Heavy growth (60 % to complete coverage)	4

NOTE 6—Traces of growth may be defined as scattered, sparse fungus growth such as might develop from (1) a mass of spores in the original inoculum, or (2) extraneous contamination such as fingermarks, insect feces, etc. Continuous cobwebby growth extending over the entire specimen, even though not obscuring the specimen, should be rated as 2.

NOTE 7—Considerable physical change in plastics may occur without much visual growth, hence some measure of change in physical property selected from those cited in the Appendix is recommended.

9.4 *Effect on Physical, Optical, or Electrical Properties*—Wash the specimens free of growth, immerse in an aqueous solution of mercuric chloride (1+1000) for 5 min, rinse in tap water, air dry overnight at room temperature, and recondition at the standard laboratory conditions defined in Methods D 618, 23 ± 1°C (73 ± 2°F) and 50 ± 2 % relative humidity, and test according to the respective methods used on control specimens (see the Appendix).

NOTE 8—For certain electrical tests, such as insulation resistance and arc resistance, specimens may be tested in the unwashed, humidified condition. Test values will be affected by surface growth and its associated moisture.

10. Report

10.1 The report shall include the following:

10.1.1 Organisms or organism used,

10.1.2 Time of incubation (if progressive).

10.1.3 Visual rating of fungus growth according to 9.3 and

10.1.4 Tabulation of progressive change in physical, optical, or electrical property against time of incubation. Give the number of observations, the mean, and the maximum observed change.

REFERENCES

- (1) Bagdon, V. J., Military Specification Mil-P-43018(CE). "Plastic Sheets: Polyethylene Terephthalate, Drafting, Coated," June 13, 1961.
- (2) Baskin, A. D., and Kaplan, A. M., "Mildew Resistance of Vinyl-Coated Fabrics," *Applied Microbiology*, APMB, Vol 4, No. 6, November 1956.
- (3) Berk, S., "Effect of Fungus Growth on Plasticized Polyvinyl Chloride Films," *ASTM Bulletin*, ASTBA, No. 168, September 1950, p. 53 (TP 181).
- (4) Berk, S., Ebert, H., and Teitell, L., "Utilization of Plasticizers and Related Organic Compounds by Fungi," *Industrial and Engineering Chemistry*, IECMA, Vol 49, No. 7, July 1957, pp. 1115-1124.
- (5) Brown, A. E., "Problem of Fungal Growth on Synthetic Resins, Plastics, and Plasticizers," *Modern Plastics*, MOPLA, Vol 23, 1946, p. 189.
- (6) Ross, S. H., "Biocides for a Strippable Vinyl Plastic Barrier Material," Report PB-151-119, U. S. Department of Commerce, Office of Technical Services