



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**DISEÑO DE UN RECUBRIMIENTO COMESTIBLE ACTIVO A BASE DE ALMIDÓN
OXIDADO-ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO MEXICANO (*Lippia graveolens* Kunth)
Y SU APLICACIÓN EN PIMIENTO MORRÓN (*Capsicum annuum* L.)**

TESIS

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

Presenta:

IBQ. Rebeca Guevara Valderrama

Dirigida por:

Dr. Carlos Regalado González

Co-dirigida por:

Dra. Olga Martín Belloso

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre 2018



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



DISEÑO DE UN RECUBRIMIENTO COMESTIBLE
ACTIVO A BASE DE ALMIDÓN OXIDADO-ACEITE
ESENCIAL DE ORÉGANO MEXICANO (*Lippia
graveolens* Kunth) Y SU APLICACIÓN EN PIMIENTO
MORRÓN (*Capsicum annuum* L.)

por

Rebeca Guevara Valderrama

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: FQMAC-264120



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

**DISEÑO DE UN RECUBRIMIENTO COMESTIBLE ACTIVO A BASE DE ALMIDÓN
OXIDADO-ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO MEXICANO (*Lippia graveolens* Kunth)
Y SU APLICACIÓN EN PIMIENTO MORRÓN (*Capsicum annuum* L.)**

TESIS

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

Presenta:

IBQ. Rebeca Guevara Valderrama

Dirigida por:

Dr. Carlos Regalado González

Co-dirigida por:

Dra. Olga Martín Beloso

Dr. Carlos Regalado González
Presidente

Dra. Olga Martín Beloso
Secretario

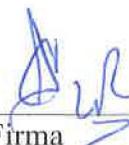
Dra. Blanca Estela García Almendárez
Vocal

Dra. Monserrat Escamilla García
Suplente

Dra. Teresita Arredondo Ochoa
Suplente



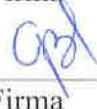
Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Directora de la Facultad



Firma

RÚBRICA

Firma



Firma



Firma



Firma



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

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre 2018

RESUMEN

Los frutos como el pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.) tienden a sufrir pérdida de humedad y deterioro fúngico durante su vida poscosecha. Una alternativa para su conservación es el uso de recubrimientos comestibles que contengan agentes hidrofóbicos y antimicrobianos como los aceites esenciales. El objetivo de este trabajo fue diseñar y caracterizar un recubrimiento comestible a base de una nanoemulsión (NE) de aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) (AEO) y almidón oxidado, y evaluar su aplicación en las características de calidad poscosecha del pimiento morrón. Se determinó la concentración mínima inhibitoria del AEO contra *Botrytis cinerea* (0.125% v/v) y *Colletotrichum gloeosporioides* (0.250 % v/v). Las NEs se caracterizaron utilizando un diseño factorial 3² con el factor concentración de AEO en tres niveles (0.25, 1.0 y 2.0% p/p) y el factor tiempo de sonicación (ts) tres niveles (0, 120 y 240 s). Las variables respuesta fueron tamaño de partícula y distribución de tamaño, índice de polidispersión (IP), potencial ζ , índice de blancura (IB), ángulo de contacto, coeficiente de mojabilidad y actividad antifúngica. Las NEs con 0.25% (p/p) de AEO con ts de 120 y 240 s mostraron el menor tamaño de partícula 64.69 ± 0.48 y 63.37 ± 1.57 nm, respectivamente. Sin embargo, los menores IP (0.14 ± 0.02 y 0.11 ± 0.01) se observaron en las NEs con 2.0% (p/p) de AEO sonicadas 120 y 240 s, respectivamente. El potencial ζ varió de -26.96 ± 2.11 a -20.73 ± 0.77 mV, sin diferencia significativa entre tratamientos. El menor IB (36.77 ± 0.06) se encontró en la NE con 0.25% (p/p) de AEO sonicada 120 s. Tanto la concentración de AEO como el ts tuvieron un efecto significativo sobre el ángulo de contacto y coeficiente de mojabilidad; encontrándose los menores ángulos de contacto (36.23 ± 0.25 y 33.60 ± 2.00 °) y los mejores coeficientes (-6.79 ± 0.09 y -5.91 ± 0.74 mN/m) en las NEs con 2.0% (p/p) de AEO con ts de 120 y 240 s, respectivamente. Sin embargo, únicamente las NEs con 2.0% (p/p) de AEO, independientemente del ts, lograron inhibir a *C. gloeosporioides*. La NE con 2.0% (p/p) de AEO con ts de 120 s se aplicó como recubrimiento comestible en pimiento morrón sin haber diferencia significativa entre el fruto recubierto y el control en cuanto a los parámetros físicos, bioquímicos y microbiológicos evaluados durante su almacenamiento por 20 días a 7 °C. La concentración de aceite esencial y el tiempo de sonicación mostraron ser factores clave para la obtención de NEs con características fisicoquímicas y microbiológicas adecuadas para su aplicación como recubrimientos comestibles. Sin embargo, es necesario evaluar concentraciones más altas de AEO ya que esto podría ayudar a disminuir la permeabilidad al vapor de agua y por tanto la pérdida de peso, así como el crecimiento de hongos en el fruto.

(Palabras clave: aceite esencial de orégano mexicano, almidón oxidado, nanoemulsión, recubrimientos comestibles, pimiento morrón)

SUMMARY

Fruits like bell pepper (*Capsicum annuum* L.) tend to suffer moisture loss and fungal deterioration during their post-harvest life. An alternative for its conservation is the use of edible coatings containing hydrophobic and antimicrobial agents such as essential oils. The aim of this work was to design and characterize an edible coating based on a Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth) essential oil (AEO) and oxidized starch nanoemulsion (NE), and evaluate its application on bell pepper's postharvest quality characteristics. Minimal inhibitory concentration of AEO against *Botrytis cinerea* (0.125% v/v) and *Colletotrichum gloeosporioides* (0.250% v/v) was determined. NEs were characterized using a 3² factorial design with the AEO concentration factor at three levels (0.25, 1.0 and 2.0% w/w) and the sonication time (ts) factor at three levels (0, 120 and 240 s). Response variables were particle size and distribution, polydispersity index (IP), ζ potential, whiteness index (IB), contact angle, wettability coefficient and antifungal activity. The NE with 0.25% (w/w) of AEO with ts of 120 and 240 s showed the smallest particle size 64.69 ± 0.48 and 63.37 ± 1.57 nm, respectively. However, the lowest IP (0.14 ± 0.02 and 0.11 ± 0.01) were observed in the 2.0% (w/w) AEO NEs sonicated 120 and 240 s, respectively. ζ potential varied from -26.96 ± 2.11 to -20.73 ± 0.77 mV, without significant difference between treatments. The lowest IB (36.77 ± 0.06) was found in the NE of 0.25% (w/w) AEO sonicated 120 s. Both the AEO concentration and the ts had a significant effect on the contact angle and wettability coefficient; finding the lowest contact angles (36.23 ± 0.25 and 33.60 ± 2.00 °) and the best coefficients (-6.79 ± 0.09 and -5.91 ± 0.74 mN/m) in the NEs of 2.0% (w/w) AEO sonicated 120 and 240 s, respectively. However, only the NEs with 2.0% (w/w) AEO, regardless of the ts, managed to inhibit *C. gloeosporioides*. NE with 2.0% (w/w) of AEO and ts of 120 s was applied as an edible coating on bell pepper with no significant difference between the coated fruit and the control in physical, biochemical and microbiological parameters evaluated during storage for 20 days at 7 °C. Essential oil concentration and sonication time were key factors in NEs production with adequate physicochemical and microbiological characteristics for their application as edible coatings. Nevertheless, it is necessary to evaluate higher AEO concentrations since it could help decrease water vapor permeability and therefore weight loss, and fungal growth on the fruit.

(Key words: Mexican oregano essential oil, oxidized starch, nanoemulsion, edible coatings, bell pepper)

DEDICATORIA

A mi familia y amigos por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada para la realización de este proyecto.

Al Dr. Carlos Regalado González, por dejarme ser parte de su equipo de trabajo y trabajar en su laboratorio. Ha establecido un ejemplo de excelencia como investigador, mentor y persona.

A la Dra. Olga Martín Beloso, por compartir su conocimiento y experiencia a pesar de la distancia, y ser un modelo a seguir como investigadora y mujer.

A la Dra. Blanca E. García Almendárez y a la Dra. Monserrat Escamilla García por su orientación, por sus ideas, aportaciones y comentarios, los cuales fueron invaluable para este proyecto.

A la Dra. Teresita Arredondo Ochoa por su disponibilidad, actitud, apoyo y guía, siempre con bondad y entusiasmo, que me ayudaron a completar esta tesis.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y al Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química, a los doctores y a su personal administrativo por su apoyo y facilidades otorgadas, especialmente a Carmelita y al Dr. Mercado y a su laboratorio.

A mis padres y a mi familia, por apoyarme incondicionalmente y ser la motivación para siempre seguir adelante.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Biotecnología de Alimentos, especialmente a Maaya, Teresita y Ángel por compartir sus conocimientos y experiencia y por su valiosa amistad.

A mis compañeros y amigos de generación, Dani, Itzel, Maaya, Isac, Beto, Raúl, Delia, Bety, Vane, Gloria, Ely, Illy, y Kari, por los recuerdos, amistad y gran apoyo durante esta etapa.

A Rodrigo por tu apoyo incondicional, tu cariño y por recordarme que siempre se puede dar más.

A Victor, Diana, Vicky, Mariana, Karen N., Karen A., Everardo y amigos de toda la vida, porque siempre me alentaron y creyeron en mí.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Resumen	i
Abstract	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Índice General	v
Índice de Figuras	viii
Índice de Cuadros	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Recubrimientos comestibles	3
2.1.1. Función y propiedades de los recubrimientos comestibles	3
2.1.2. Composición de los recubrimientos comestibles	4
2.1.2.1. Almidón	6
2.1.2.2. Almidones modificados	7
2.1.2.3. Almidón oxidado	7
2.1.3. Adición de agentes antimicrobianos en recubrimientos comestibles	8
2.1.3.1. Aceite esencial de orégano mexicano (<i>Lippia graveolens</i> Kunth)	9
2.1.4. Aplicación de recubrimientos comestibles	9
2.1.5. Aspectos regulatorios de los recubrimientos comestibles	9
2.2. Nanoemulsiones	10
2.3. Pimiento morrón (<i>Capsicum annuum</i> L.)	10
2.3.1. Cosecha	13
2.3.2. Manejo poscosecha y almacenamiento	14
2.3.3. Enfermedades poscosecha	15
2.3.4. Producción de chiles y pimiento morrón	15
2.4. Recubrimientos comestibles en pimiento morrón (<i>Capsicum annuum</i> L.)	16
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. OBJETIVOS	19

4.1.	Objetivo general	19
4.2.	Objetivos específicos	19
5.	METODOLOGÍA	20
5.1.	Materiales	20
5.1.1.	Reactivos	20
5.1.2.	Microorganismos	20
5.1.3.	Medios de cultivo	20
5.1.4.	Recolección de muestras de pimiento Morrón	20
5.2.	Métodos	20
5.2.1.	Extracción del aceite esencial de orégano mexicano (AEO)	20
5.2.2.	Actividad antifúngica del AEO	21
5.2.3.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria del AEO	21
5.2.4.	Elaboración de las nanoemulsiones AEO-almidón oxidado	22
5.2.5.	Diseño experimental para la caracterización de nanoemulsiones (NEs)	22
5.2.6.	Caracterización fisicoquímica de las NEs	23
5.2.6.1.	Medición del tamaño de partícula, índice de polidispersión, distribución de tamaño, índice de polidispersión y potencial ζ	23
5.2.6.2.	Medición de pH	23
5.2.6.3.	Determinación del índice de blancura	23
5.2.6.4.	Determinación de la tensión superficial líquido-vapor (γ_{LV})	23
5.2.6.5.	Determinación del ángulo de contacto sobre pimiento Morrón	24
5.2.6.6.	Determinación de la tensión superficial crítica del pimiento Morrón	24
5.2.6.7.	Determinación del coeficiente de mojabilidad	25
5.2.6.8.	Microscopía electrónica de transmisión de NEs	25
5.2.6.9.	Actividad antimicrobiana de las NEs	26
5.2.7.	Evaluación del efecto de la aplicación del recubrimiento comestible a base de la NE AEO-almidón oxidado en la calidad poscosecha de pimiento Morrón	26
5.2.7.1.	Diseño experimental	26
5.2.7.2.	Aplicación del recubrimiento comestible	26
5.2.7.3.	Evaluación de pérdida de peso	27
5.2.7.4.	Evaluación de color	28

5.2.7.5.	Determinación de parámetros bioquímicos	28
5.2.7.5.1.	Obtención del jugo del fruto	28
5.2.7.5.2.	Sólidos solubles totales (SST)	28
5.2.7.5.3.	pH y acidez titulable	28
5.2.7.5.4.	Vitamina C	29
5.2.7.6.	Cuenta total de hongos y levaduras	29
5.3.	Análisis estadístico	30
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
6.1.	Extracción del AEO	31
6.2.	Actividad antifúngica del AEO	32
6.3.	CMI del AEO contra hongos deterioradores	34
6.4.	Caracterización fisicoquímica de las NEs	38
6.4.1.	Tamaño de partícula, índice de polidispersión y distribución de tamaño	38
6.4.2.	Potencial ζ y pH	41
6.4.3.	Índice de blancura	43
6.4.4.	Tensión interfacial líquido-vapor (γ_{LV})	45
6.4.6.	Tensión superficial crítica del pimiento morrón	48
6.4.7.	Coefficiente de mojabilidad	49
6.5.	Microscopia electrónica de transmisión de nanoemulsiones	51
6.6.	Actividad antifúngica de NEs de AEO contra <i>C. gloeosporioides</i>	52
6.7.	Evaluación del efecto de la aplicación de la NE como recubrimiento comestible en la calidad poscosecha de pimiento morrón	53
6.7.1.	Pérdida de peso	53
6.7.2.	Evaluación de color	55
6.7.3.	Parámetros bioquímicos	56
6.7.3.1.	Sólidos solubles totales (SST)	56
6.7.3.2.	pH y acidez titulable	57
6.7.3.3.	Vitamina C	59
6.7.4.	Cuenta total de hongos y levaduras	60
7.	CONCLUSIONES	62
8.	REFERENCIAS	63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Taxonomía del género <i>Capsicum</i> .	11
2	Composición nutricional de <i>Capsicum annuum</i> L.	12
3	Tasa de respiración de chiles.	13
4	Diseño experimental para la caracterización de nanoemulsiones de aceite esencial de orégano mexicano.	22
5	Diseño experimental para la evaluación de recubrimiento comestible en pimiento morrón.	26
6	Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de orégano mexicano contra hongos deterioradores.	35
7	Tamaño promedio de partícula e índice de polidispersión de nanoemulsiones de aceite esencial de orégano mexicano.	38
8	Potencial ζ y pH de las nanoemulsiones de aceite esencial de orégano mexicano.	43
9	Tensión interfacial líquido-vapor de nanoemulsiones de aceite esencial de orégano mexicano.	46
10	Ángulo de contacto (θ) de nanoemulsiones de aceite esencial de orégano mexicano sobre superficie de pimiento morrón.	48
11	Ángulo de contacto de distintos líquidos de referencia en superficie de pimiento morrón.	49
12	Fuerzas adhesivas (W_a), fuerzas cohesivas (W_c) y coeficiente de mojabilidad (W_s) de nanoemulsiones de aceite esencial de orégano mexicano.	50
13	Diámetro de zona de inhibición de nanoemulsiones de aceite esencial de orégano mexicano contra <i>C. gloeosporioides</i> .	52
14	Sólidos solubles totales del jugo de pimiento morrón control y con recubrimiento durante 20 días de almacenamiento a 7 °C.	57
15	Cuenta total de hongos y levaduras en pimiento morrón control y con recubrimiento durante 20 días de almacenamiento a 7 °C.	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Formas de los frutos de algunos tipos de vainas de chiles.	11
2	Estados de madurez del pimiento morrón.	14
3	Producción mundial de chiles en el año 2016.	16
4	Medición de ángulo de contacto con el equipo DSA30.	24
5	Desinfección de pimiento morrón previa a la aplicación del recubrimiento comestible.	27
6	Frutos secándose después de la aplicación del recubrimiento comestible.	27
7	Apariencia de aceite esencial de orégano mexicano obtenido mediante hidrodestilación.	31
8	Actividad antifúngica del aceite esencial de orégano mexicano a distintas concentraciones contra <i>B. cinerea</i> .	32
9	Actividad antifúngica del aceite esencial de orégano mexicano a distintas concentraciones contra <i>C. gloeosporioides</i> .	33
10	Crecimiento de <i>B. cinerea</i> con distintas concentraciones de aceite esencial de orégano mexicano.	36
11	Crecimiento de <i>C. gloeosporioides</i> con distintas concentraciones de aceite esencial de orégano mexicano.	37
12	Distribución de tamaño de partícula de nanoemulsiones de aceite esencial de orégano mexicano con distintos tiempos de sonicación.	40
13	Índice de blancura de nanoemulsiones de aceite esencial de orégano mexicano con distintos tiempos de sonicación.	44
14	Apariencia de nanoemulsiones de aceite esencial de orégano mexicano obtenidas por sonicación durante 120 s.	45
15	Microscopia electrónica de transmisión de nanoemulsiones de 2.0% (p/p) de aceite esencial de orégano mexicano.	51
16	Actividad antimicrobiana de nanoemulsiones de aceite esencial de orégano mexicano contra <i>C. gloeosporioides</i> .	53
17	Porcentaje de pérdida de peso de pimiento morrón control y con recubrimiento durante 20 días de almacenamiento a 7 °C.	54
18	Parámetro de tono (hue) de pimiento morrón control y con recubrimiento durante 20 días de almacenamiento a 7 °C.	55
19	Parámetro L de pimiento morrón control y con recubrimiento durante 20 días de almacenamiento 7 °C.	56
20	pH y acidez titulable de pimiento morrón control y con recubrimiento durante 20 días de almacenamiento a 7 °C.	58
21	Contenido de vitamina C en pimiento morrón control y con recubrimiento durante 20 días de almacenamiento a 7 °C.	59

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la demanda de alimentos frescos con altos valores nutritivos y buenos atributos sensoriales como sabor, olor y textura ha incrementado, existiendo también un creciente interés por productos sin aditivos sintéticos (Bansal *et al.*, 2015). Por otro lado, las frutas y verduras son parte esencial de una dieta saludable, y un consumo diario suficiente puede contribuir a la prevención de enfermedades importantes, como las cardiovasculares y algunos cánceres (OMS, 2004). Sin embargo, estos productos son más susceptibles de ser atacados por microorganismos deterioradores y patógenos debido a su naturaleza y procesamiento (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2016). Una adecuada aplicación de los procesos de industrialización es esencial para obtener productos más seguros. Los nuevos productos alimenticios y su procesamiento imponen la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías de empaque que aseguren la protección de los alimentos mientras se abordan las cambiantes demandas de la industria y de los consumidores (Jagus *et al.*, 2016).

El pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.) es un fruto de gran importancia comercial en nuestro país. Este fruto es buena fuente de vitamina C y E, provitamina A, carotenoides y de compuestos fenólicos; siendo los últimos dos compuestos antioxidantes que pueden disminuir reacciones de oxidación perjudiciales en el cuerpo humano. Los pimientos verdes, amarillos, anaranjados y rojos están disponibles comúnmente en el mercado y dentro de éstos el verde es el más producido y consumido (Sun *et al.*, 2007). El problema crucial que se presenta para la comercialización de este cultivo es su relativamente corta vida útil, que se sitúa alrededor de dos semanas y limita las exportaciones a mercados lejanos. Las principales razones del deterioro del pimiento morrón son la pérdida de agua y la descomposición microbiana causada principalmente por hongos filamentosos (Poverenov *et al.*, 2014).

El uso de recubrimientos comestibles surge como una alternativa prometedora para mantener la calidad de los alimentos durante su procesamiento y comercialización. Estos se colocan en la superficie de los alimentos y están constituidos por finas capas de polímeros naturales (polisacáridos, proteínas animales y vegetales, lípidos) biodegradables, por lo que es una tecnología respetuosa con el medio ambiente que responde a la demanda creciente por parte de los consumidores de alimentos naturales, seguros y saludables (De Ancos *et al.*, 2015).

La mejora y el mantenimiento de la calidad de un producto están directamente relacionados con la extensión de su vida útil y el aseguramiento de su inocuidad, por lo que el uso de recubrimientos comestibles ha sido estudiado como una alternativa para la conservación de frutas y hortalizas ya que pueden crear barreras semipermeables a los gases y al vapor de agua, manteniendo la calidad del producto por más tiempo (Olivas y Barbosa-Cánovas, 2009). Asimismo, los recubrimientos comestibles pueden ser portadores de aditivos, como los agentes antimicrobianos, que ayuden a conservar el producto y reduzcan la contaminación microbiana (Han, 2014).

Las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales son bien reconocidas (Hammer *et al.*, 1999; Burt, 2014) y se ha reportado su incorporación como agentes antimicrobianos en alimentos de distintas maneras (Odriozola-Serrano *et al.*, 2014; Donsì y Ferrari, 2016; Ribeiro-Santos *et al.*, 2017), siendo en forma de nanoemulsión una de las maneras más efectivas debido a sus ventajas como la mejora en apariencia y estabilidad, entre otras (Salvia-Trujillo *et al.*, 2015; Artiga-Artigas *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2017). Sin embargo, existen distintos parámetros a considerar en la obtención de nanoemulsiones los cuales pueden afectar las características de éstas y, por lo tanto, su éxito como recubrimientos comestibles.

Se propuso para este proyecto diseñar un recubrimiento comestible activo a base de una nanoemulsión de aceite esencial de orégano mexicano y almidón oxidado, evaluar el efecto de su aplicación en pimiento morrón con el fin de reducir la pérdida de humedad y el ataque de microorganismos deterioradores en dicho fruto.

2. ANTECEDENTES

2.1. Recubrimientos comestibles

Se considera un recubrimiento o película comestible cualquier tipo de material usado para recubrir alimentos, prolongando la vida útil del producto, el cual se puede comer junto con el alimento o bien, ser eliminado antes de su consumo (Pavlath y Orts, 2009). Los recubrimientos comestibles se aplican en forma líquida sobre el alimento formando una capa delgada al secarse y se consideran parte del producto final. Mientras que las películas comestibles se obtienen como hojas sólidas al secar una suspensión filmogénica sobre una superficie inerte y pueden formar bolsas, cápsulas, envolturas, entre otros, mediante un proceso adicional. Una de las principales diferencias entre películas y recubrimientos es su grosor (Falguera *et al.*, 2011; Sánchez-Ortega *et al.*, 2014).

Los recubrimientos comestibles se han formulado y estudiado para evitar o disminuir el daño provocado en los alimentos durante su manipulación, almacenamiento y transporte, evitando que se deterioren y pierdan su calidad y valor nutricional. Los recubrimientos comestibles constituyen una tecnología respetuosa con el medio ambiente que puede mejorar la calidad de los alimentos, inocuidad, estabilidad y propiedades de manejo mecánico proporcionando una barrera semipermeable al vapor de agua, oxígeno, dióxido de carbono entre los alimentos y el medio ambiente (Pavlath y Orts, 2009; Valencia-Chamorro *et al.*, 2011)

El recubrimiento comestible activo es la idea innovadora más relevante que se ha aplicado a esta tecnología, el cual se ha definido como un sistema en el que el producto, el recubrimiento y el medio ambiente interactúan de una manera positiva prolongando la vida útil del producto o logrando algunas características deseables que no pueden obtenerse de otra manera (Jagus *et al.*, 2016). En este sentido, los recubrimientos comestibles activos actúan también como portadores no sólo de compuestos relacionados con la salud tales como vitaminas, minerales y compuestos bioactivos, sino también de agentes antimicrobianos y antioxidantes proporcionando un efecto antimicrobiano superficial y evitando la pérdida de otros componentes importantes (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2016).

2.1.1. Función y propiedades de los recubrimientos comestibles

La calidad de la mayoría de los productos alimenticios disminuye a través de fenómenos de transferencia de masa, incluyendo absorción y pérdida de humedad, absorción de aceite,

oxidación, pérdida de sabor, absorción de olores indeseables y migración de componentes del envase al alimento. Sin embargo, la pérdida de humedad es el factor de degradación de calidad más crítico en los productos frescos (Han, 2014). La mayoría de las frutas y hortalizas frescas contienen un porcentaje considerable de agua, cuya cantidad se mantiene en su entorno natural; La respiración se mantiene naturalmente por la piel del fruto en un equilibrio de oxígeno, dióxido de carbono y agua, y ésta controla la transmisión hacia y desde el ambiente circundante. Sin embargo, tan pronto como las frutas y verduras se separan de su ambiente de producción nativo (es decir, son cosechadas), el delicado equilibrio se altera (Pavlath y Orts, 2009).

El uso de recubrimientos comestibles en alimentos y especialmente en productos altamente perecederos, como los hortofrutícolas, se basa en algunas propiedades particulares tales como costo, disponibilidad, atributos funcionales, propiedades mecánicas (flexibilidad, tensión), propiedades ópticas (brillo y opacidad), efecto barrera al flujo de gases, resistencia al agua y a microorganismos y aceptabilidad sensorial (Falguera *et al.*, 2011). En los frutos y hortalizas los recubrimientos comestibles proporcionan un reemplazo y/o refuerzo de las capas naturales de éstos para evitar pérdidas de humedad, al mismo tiempo que permiten el intercambio selectivo y controlado de gases importantes, tales como oxígeno, dióxido de carbono y etileno, los cuales están implicados en procesos de respiración (Pavlath y Orts, 2009). Además del mantenimiento de la calidad física y química del fruto, los recubrimientos comestibles contribuyen a la calidad visual, la suavidad de la superficie y otros factores de calidad relacionados con su comercialización (Han, 2014).

2.1.2. Composición de los recubrimientos comestibles

Un recubrimiento comestible es esencialmente una red polimérica con muchas interacciones en una estructura de gel tridimensional (Sánchez-Ortega *et al.*, 2014). Los componentes principales de alimentos cotidianos (por ejemplo, proteínas, carbohidratos y lípidos) pueden cumplir los requisitos para la preparación de recubrimientos comestibles. Como regla general, los lípidos se utilizan para reducir la transmisión del vapor de agua, los polisacáridos se utilizan para controlar el oxígeno y la transmisión de otros gases, mientras que las proteínas proporcionan estabilidad mecánica. Los biopolímeros utilizados tienen múltiples mecanismos para la formación de recubrimientos, incluyendo fuerzas intermoleculares tales como enlaces covalentes (por ejemplo, enlaces disulfuro y entrecruzamiento) e interacciones electrostáticas, hidrófobas o iónicas (Han, 2014).

En algunos estudios recientes se considera la producción de recubrimientos comestibles mediante la combinación de diversos polisacáridos, proteínas y lípidos con el fin de aprovechar las propiedades de cada compuesto y la sinergia que puede existir entre ellos (Falguera *et al.*, 2011). Las características físicas y químicas de los biopolímeros utilizados influyen en gran medida en las propiedades de los recubrimientos resultantes. Incluso la mayoría de los recubrimientos comestibles asocian una matriz estructural hidrófila y un compuesto lipídico hidrófobo, lo que da como resultado una mejor funcionalidad que los recubrimientos comestibles a base de hidrocoloides puros, especialmente con respecto a sus propiedades de barrera contra la humedad. Los recubrimientos comestibles compuestos se pueden obtener como bicapas o emulsiones; En un sistema bicapa, el lípido forma la segunda capa sobre la del polisacárido o proteína; mientras que en la estructura emulsificada, el lípido se dispersa en la matriz del biopolímero, sin embargo, se han encontrado mayores ventajas en los segundos. Las propiedades de los recubrimientos comestibles basados en emulsiones dependen de los compuestos utilizados en la matriz polimérica y de su compatibilidad con los compuestos lipídicos, así como de las técnicas de preparación. La compatibilidad entre los componentes, así como su miscibilidad, está directamente relacionada con la microestructura de los recubrimientos, lo que afecta sus propiedades finales (Galus y Kadzińska, 2015).

En la formulación del recubrimiento comestible la selección del disolvente es uno de los factores más importantes; dado que el recubrimiento debe ser comestible y biodegradable, sólo el agua, el etanol y sus mezclas son apropiados como disolventes (Han, 2014). Por otro lado, existe una serie de aditivos que se pueden incluir en la formulación de un recubrimiento, los cuales alterarán sus propiedades y mejorarán su función (Arredondo-Ochoa *et al.*, 2015). En la mayoría de los casos, se añade algún plastificante para mejorar las propiedades mecánicas. Los plastificantes son agentes de bajo peso molecular que se incorporan en los materiales poliméricos para aumentar la termoplasticidad de los polímeros, los cuales son capaces de posicionarse entre moléculas de polímero e interferir con las interacciones polímero-polímero para mejorar la flexibilidad y procesabilidad. Los alcoholes polihídricos son los tipos más comunes de plastificantes, incluyendo propilenglicol, glicerina, sorbitol y otros polioles (Kramer, 2009; Pavlath y Orts, 2009).

Aunque muchos biopolímeros poseen cierta capacidad emulsificante, es necesario también incorporar sustancias emulsificantes en la producción de recubrimientos a base de emulsiones.

Los emulsificantes son agentes tensoactivos de naturaleza anfifílica capaces de reducir la tensión superficial de la interfase agua-lípido o la superficie agua-aire, modifican también la energía superficial controlando la adherencia y la mojabilidad de la superficie del recubrimiento (Pavlath y Orts, 2009; Han, 2014). Se ha reportado que la naturaleza así como la cantidad del agente emulsificante tiene efecto sobre las propiedades finales de la emulsión (Arredondo-Ochoa *et al.*, 2017; Moghimi *et al.*, 2017).

2.1.2.1. Almidón

El almidón, la celulosa y sus derivados, la pectina, el quitosano, el alginato, la carragenina, el pululano y la goma gellan son los principales polisacáridos usados como matriz estructural de recubrimientos comestibles (Galus y Kadzińska, 2015). El almidón es el polisacárido natural más utilizado como materia prima debido a que es un recurso renovable, barato y ampliamente disponible (Jiménez *et al.*, 2012).

El almidón es una mezcla de dos polisacáridos, la amilosa y amilopectina; el primero es producto de la condensación de moléculas de glucosa por enlaces glucosídicos α -(1,4), que establece largas cadenas lineales con 200-2500 unidades. La amilopectina contiene ramificaciones por enlaces α -(1,6) localizadas cada 15-25 unidades lineales de glucosa (Badui, 2013). Las fuentes más significativas de almidón son los cereales, como el maíz, el trigo y el arroz, así como los tubérculos, como la papa y la yuca (Zhang *et al.*, 2014). De los dos polímeros de almidón, la amilosa está más estrechamente asociada con la capacidad de formar recubrimientos debido a su naturaleza lineal (Kramer, 2009).

Los recubrimientos a base de almidón tienen dos deficiencias significativas: alta sensibilidad al agua y baja resistencia mecánica. El almidón nativo no tiene propiedades termoplásticas; Sin embargo, con la adición de plastificantes, procesos térmicos y estrés, el almidón nativo gelatiniza y revela su carácter termoplástico (Zhang *et al.*, 2014). Cuando se aplica calor al almidón nativo en presencia de suficiente agua, los gránulos comienzan a abrirse, hincharse e hidratarse, lo que inicia el proceso de "gelatinización" o pérdida de ordenamiento granular y molecular. El tamaño físico del gránulo se hincha hasta varias veces su tamaño original, y se pierde la cristalinidad nativa. La gelatinización tiene lugar en un intervalo de temperaturas y depende del tipo de almidón y de su modificación. El cambio más evidente en la gelatinización del almidón es un gran aumento de la viscosidad (Kramer, 2009).

Sin embargo, el almidón nativo tiene ciertas limitaciones tales como baja resistencia al corte, descomposición térmica y alta tendencia a la retrogradación, lo que limita su uso en algunas aplicaciones de alimentos industriales (Singh *et al.*, 2007). Por otro lado, la sustitución química y la hidrólisis ácida de almidones que contienen amilosa mejoran la claridad y la flexibilidad de los recubrimientos fabricados a partir de ellos (Kramer, 2009).

2.1.2.2. Almidones modificados

Investigaciones recientes se han centrado en superar los problemas con el almidón nativo, por ejemplo, mezclando almidón con otros polímeros, añadiendo nanoarcilla en la matriz de almidón, escogiendo diferentes tipos de plastificantes o usando fuentes de almidón con alto contenido de amilosa (Zhang *et al.*, 2014). Una de las maneras más utilizadas para lograr que los almidones nativos tengan un mejor comportamiento es mediante la modificación química con la que se mejoran sus propiedades o se crean productos de almidón con propiedades únicas para diversas aplicaciones (Kramer, 2009).

Los almidones modificados son almidones cuya estructura química se ha modificado a fin de conferirles propiedades funcionales que de otra manera no tienen. La modificación química implica la introducción de grupos funcionales en la molécula de almidón, tal modificación de almidones granulares nativos altera profundamente su comportamiento de gelatinización, gelificación y retrogradación (Singh *et al.*, 2007). Se utilizan ampliamente en la industria dado que actúan como espesantes, estabilizadores, humectantes, aglomerantes, antihumectantes, acarreadores en el secado de pigmentos, etc. Y también se diseñan para que funcionen a distintas condiciones de pH, de sales y con distintos componentes de los alimentos (Badui, 2013).

2.1.2.3. Almidón oxidado

El almidón oxidado se obtiene mediante la adición de hipoclorito de sodio, el cual oxida algunos grupos hidroxilos, produce grupos carboxilos y provoca una ligera hidrólisis. Debido a lo voluminoso de los grupos formados, se inhibe por impedimento estérico la unión de cadenas lineales y, por consiguiente, la retrogradación. Estos almidones son de una temperatura de gelatinización y viscosidad menor, disminuyendo ésta última rápidamente con el calentamiento y la agitación, generando pastas fluidas y transparentes (Arredondo-Ochoa *et al.*, 2015).

2.1.3. Adición de agentes antimicrobianos en recubrimientos comestibles

Los recubrimientos comestibles activos pueden servir como portadores de compuestos antimicrobianos, constituyendo un factor adicional para la conservación de los alimentos contribuyendo a su inocuidad. Los recubrimientos comestibles con propiedades antimicrobianas se han estudiado por muchos años ya que se considera que la disminución del crecimiento microbiano en la superficie de los alimentos mejora la vida de anaquel y se ha reportado la alta capacidad de estos recubrimientos en retener dichos aditivos en la superficie del alimento (Kramer, 2009; Quezada-Gallo, 2009). Además, éstos pueden ser una buena barrera para evitar la contaminación durante el período de almacenamiento controlando el crecimiento de fitopatógenos en productos hortofrutícolas durante la vida útil poscosecha (Jagus *et al.*, 2016; Nguyen Van Long y Dantigny, 2016).

Los antimicrobianos generalmente tienen umbrales de concentración diferentes para la inhibición o inactivación de un microorganismo. Estos umbrales dependen de los objetivos específicos de la sustancia antimicrobiana, ya sea la pared celular, membrana celular, enzimas metabólicas, síntesis de proteínas y sistemas genéticos del microorganismo (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2016). Existen varias categorías de antimicrobianos que se pueden incorporar en recubrimientos comestibles, incluyendo ácidos orgánicos (acético, benzoico, láctico, propiónico, sórbico), ésteres de ácidos grasos (monolaurato de glicerilo), polipéptidos (lisozima, peroxidasa, lactoferrina, nisina), aceites esenciales de origen vegetal (canela, orégano, té de limón), nitritos y sulfitos, entre otros (Rojas-Graü *et al.*, 2009).

Los agentes antimicrobianos naturales provenientes de plantas, animales o microorganismos son preferidos por los consumidores debido a la creencia de que éstos no son dañinos y son más sanos que las sustancias químicas obtenidas mediante procesos sintéticos (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2016). Los metabolitos producidos por las plantas son una alternativa prometedora, destacando a los aceites esenciales ya que muestran propiedades antimicrobianas, baja toxicidad en mamíferos y una menor contaminación ambiental, por lo que podrían ser usados como alternativa a los fungicidas químicos. El uso de recubrimientos comestibles que incorporan aceites esenciales es una técnica prometedora para preservar la calidad de los alimentos y extender su vida útil (Nguyen Van Long y Dantigny, 2016). No obstante, su incorporación como

antimicrobianos es difícil debido a su baja solubilidad y aroma intenso (Artiga-Artigas *et al.*, 2017).

2.1.3.1. Aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth)

Los aceites esenciales son líquidos aromáticos aceitosos obtenidos de material vegetal (flores, capullos, semillas, hojas, ramas, corteza, hierbas, madera, frutos y raíces). Se pueden obtener por compresión, fermentación o extracción, pero el método de destilación con vapor es el más usado comúnmente para la producción comercial. El aceite esencial de orégano es uno de los agentes antimicrobianos más efectivos; el carvacrol y el timol son los principales compuestos responsables por su actividad antimicrobiana (Burt, 2014).

El efecto antimicrobiano de los componentes del aceite esencial de orégano se atribuye a la permeabilización de la membrana, lo que también afecta la fuerza protón-motriz y provoca la fuga de iones específicos. Sin embargo, aún queda por esclarecer el mecanismo de acción de cada uno de los componentes en contra de microorganismos específicos (Lambert *et al.*, 2001; Hernández-Hernández *et al.*, 2014).

2.1.4. Aplicación de recubrimientos comestibles

Los recubrimientos comestibles se pueden aplicar de diversas formas, por inmersión, barnizado o aspersión de la solución que contenga los ingredientes que formarán el recubrimiento sobre la superficie del alimento. Dependiendo de la concentración de la solución de recubrimiento, el producto absorberá una cantidad del material de recubrimiento necesario para formar la capa deseada, que cuando se seca, forma una capa protectora en la superficie del alimento (Pavlath y Orts, 2009). Para la aplicación de emulsiones como recubrimientos, el proceso de emulsificación de la fase lipídica en la fase acuosa debe de llevarse a cabo antes de la aplicación del recubrimiento (Galus y Kadzińska, 2015).

2.1.5. Aspectos regulatorios de los recubrimientos comestibles

Debido a que los recubrimientos comestibles se clasifican como productos alimenticios deben seguirse las regulaciones pertinentes a ingredientes alimenticios ya que son integrados a la parte comestible del alimento. En la reglamentación de la mayoría de los países, las sustancias químicas añadidas como agentes antimicrobianos se consideran aditivos alimentarios si el objetivo principal de las sustancias es la prolongación de la vida de almacén (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2016).

2.2. Nanoemulsiones

Las nanoemulsiones (NEs) son emulsiones con un tamaño de partícula en el orden de 100 nm. Una NE típica contiene aceite, agua y un agente emulsificante (Gupta *et al.*, 2016). El tamaño pequeño y el gran área de superficie de las NEs les dan una serie de propiedades fisicoquímicas y fisiológicas características que las hacen altamente adecuadas para ciertas aplicaciones (McClements y Jafari, 2018).

El uso de NEs de aceites esenciales, a través del aumento de su dispersabilidad en la fase acuosa y la menor resistencia a la transferencia de masa de estos compuestos hacia las membranas celulares, han demostrado no sólo mejorar la actividad antimicrobiana sino también mejorar su estabilidad fisicoquímica (Donsì, 2018). Los aceites esenciales incorporados en las NEs parecen penetrar más rápidamente en las membranas microbianas debido al área incrementada por unidad de peso lo que resulta en el uso de una menor cantidad de antimicrobiano que en emulsiones convencionales (Odriozola-Serrano *et al.*, 2014).

Para ofrecer un cierto grado de funcionalidad, las NEs deben formularse de acuerdo con los principios de diseño funcional, que relacionan su composición y tamaño con las funcionalidades deseadas en el producto (Donsì, 2018). Las propiedades fisicoquímicas y los atributos funcionales de una NE están determinados en gran medida por las propiedades de las partículas, tales como la composición, el tamaño, la carga eléctrica, el estado de agregación, el estado físico y la composición interfacial (McClements y Jafari, 2018). Dichas propiedades dependen de la selección de una tecnología de emulsificación adecuada para producir características de partícula bien definidas. Uno de los métodos más utilizados para la obtención de NEs es el ultrasonido, el cual se ha comparado con la microfluidización, donde se demostró que el primero es más rentable, fácil de implementar, más rápido y presenta un menor consumo de energía (Gharibzahedi y Jafari, 2018).

2.3. Pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.)

Las especies del género *Capsicum* son miembros de una gran familia denominada *Solanaceae*, la cual incluye a los chiles, al tomate, la papa, el tabaco, entre otros. La taxonomía del género *Capsicum* se presenta en el Cuadro 1. Existe un gran número de chiles de diversas formas y colores que crecen en todo el mundo y sus usos son muy diversos. Los chiles se consumen principalmente como vegetales frescos o deshidratados para su uso como especie, dichos productos

añaden sabor y color a los alimentos al mismo tiempo que proporcionan vitaminas y minerales esenciales (Bosland y Votava, 2012).

Cuadro 1. Taxonomía del género *Capsicum* (Adaptado de Bosland y Votava, 2012).

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Solanales
Familia:	Solanaceae
Subfamilia:	Solanoideae
Tribu:	Solaneae
Subtribu:	Capsicinae
Género:	<i>Capsicum</i>

El género *Capsicum* consiste en 20-27 especies, de las cuales cinco han sido domesticadas: *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* y *C. pubescens* (Heiser y Pickersgill, 1969). Y a su vez, *C. annuum* L. incluye una serie de variedades de chiles como el ancho, habanero (rojo, verde y naranja), jalapeño, poblano, pimiento morrón, serrano (verde y rojo), cubano, tabasco, etc. (González-Aguilar, 2016).

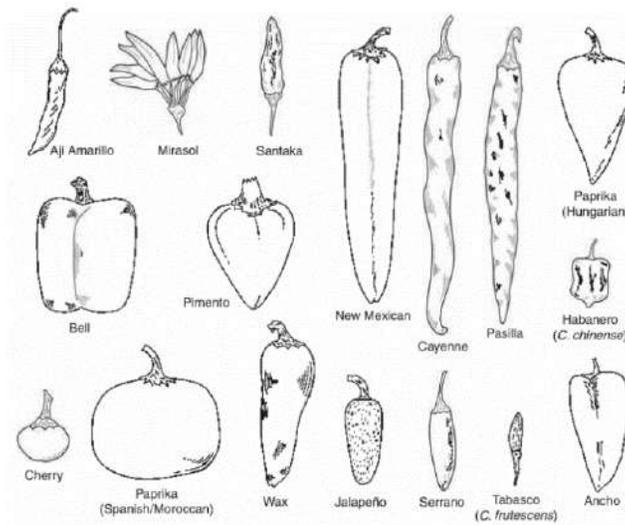


Figura 1. Formas de los frutos de algunos tipos de vainas de chiles (Bosland y Votava, 2012).

Desde un punto de vista taxonómico, las diferencias entre los cultivares de *C. annuum* L, no son suficientes para justificar la diferenciación de las especies, sin embargo, desde el punto de vista de un horticultor hay cualidades, como el sabor, que no se consideran caracteres taxonómicos, pero que tienen gran importancia para la industria alimentaria. Por lo que el sistema actual de

clasificación utiliza el género, la especie, la variedad, el tipo de vaina y el cultivar. Se conocen al menos 50 tipos distintos de vainas. Algunos de los tipos de vaina más reconocibles son campana (bell), jalapeño, cayena, Nuevo México, cera amarilla, ancho y mirasol (Figura 1). El grupo del pimiento morrón puede ser el tipo de vaina más importante desde el punto de vista económico; por otro lado, también tiene el mayor número de cultivares (Bosland y Votava, 2012).

Cuadro 2. Composición nutricional de *Capsicum annuum* L. (Adaptado de USDA, 2002).

Componente	Unidad	Valor por cada 100 g
Agua	g	93.89
Carbohidratos	g	4.64
Proteínas	g	0.86
Cenizas	g	0.43
Lípidos	g	0.17
Calcio	mg	10
Hierro	mg	0.34
Magnesio	mg	10
Fósforo	mg	20
Potasio	mg	175
Sodio	mg	3
Zinc	mg	0.16
Cobre	mg	0.066
Manganeso	mg	0.122
Vitamina C	mg	80.4
Tiamina (B1)	mg	0.057
Riboflavina (B2)	mg	0.028
Niacina (B3)	mg	0.480
Ácido pantoténico (B5)	mg	0.099
Piridoxina (B6)	mg	0.224
Beta caroteno	µg	208
Vitamina A	IU	370

El pimiento morrón verde es un fruto no completamente maduro, pero totalmente desarrollado en términos de tamaño y viabilidad de la semilla. Aunque todos los pimientos son verdes cuando están no maduros, diferentes variedades pueden desarrollar distintas coloraciones (amarillo, naranja, rojo, marrón, etc.) durante la maduración (Nunes, 2008; Bosland y Votava, 2012). La composición nutricional de *Capsicum annuum* L. se presenta en el Cuadro 2, siendo la vitamina C la de mayor relevancia debido a su contenido de 80.4 mg por 100 g, mientras que las necesidades diarias se encuentran entre 45 y 90 mg diarios (FAO, 2014). Dependiendo de la variedad y estado de madurez, el contenido nutritivo del pimiento morrón cambia, por ejemplo, el

pimiento morrón rojo es en general más nutritivo que el pimiento morrón verde ya que contiene hasta tres veces más vitamina C (Nunes, 2008). A pesar de que los pimientos no son picantes, todavía pertenecen a la especie *Capsicum annuum* L., debido a mutaciones no producen los capsaicinoides que causan la sensación picante en la mayoría de los otros cultivares (Bosland y Votava, 2012).

Cuadro 3. Tasa de respiración de chiles (Adaptado de González-Aguilar, 2016).

Temperatura (° C)	mg CO ₂ kg ⁻¹ h ⁻¹
5	7 a 8
10	10 a 15
15	24 a 30
20	32 a 36

Generalmente, los frutos que se cosechan inmaduros son no-climatéricos, mientras que los que se cosechan maduros pueden ser climatéricos o no-climatéricos (Bartz y Brecht, 2003). A diferencia de los frutos climatéricos que pasan por una fase de maduración la cual se caracteriza por un aumento de la respiración y producción de etileno, el pimiento morrón no lo hace, por lo que se considera un fruto no-climatérico. Los pimientos morrones producen niveles muy bajos de etileno: 0.1 y 0.2 $\mu\text{L kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ a 10 ° y 20 °C, respectivamente. Los frutos no-climatéricos también se distinguen por sus respuestas al etileno exógeno, en estos la magnitud de la respuesta respiratoria aumenta en función de la concentración de etileno, pero esto no se acompaña de un aumento en la producción de etileno o de otros cambios asociados a la maduración. El uso de etileno para inducir la maduración o el cambio de color no se recomienda en pimiento morrón porque estimula la respiración y el ablandamiento más que la coloración (González-Aguilar, 2016; Paredes-Lopez, 1999). La tasa de respiración de chiles se considera baja y se presenta en el Cuadro 3.

2.3.1. Cosecha

Los pimientos pueden ser cosechados en la etapa inmadura (verde), o después de que el color maduro (rojo, amarillo, etc., según la variedad) se desarrolle (Hartz et al., 2008). Los pimientos de buena calidad son de forma uniforme, con el tamaño y color típico de la variedad. La superficie (pericarpio) debe ser firme y relativamente gruesa con un color brillante y sabor dulce. Deben estar libres de defectos tales como grietas, decaimiento, arrugamiento y quemaduras solares. Los criterios para la cosecha de los pimientos incluyen el tamaño de la fruta, la firmeza y el color. Para los pimientos con coloración es importante también el criterio de tener un mínimo de 50% de color y se sabe que la forma más eficaz de inducir el color en los chiles es mantener los

frutos parcialmente coloreados a 20°-25° C con una humedad relativa (HR) > 95 % (González-Aguilar, 2016). Los estados de madurez se presentan en la Figura 2.



Figura 2. Estados de madurez del pimiento morrón (López Camelo, 2004).

2.3.2. Manejo poscosecha y almacenamiento

Los pimientos se envasan a menudo sin lavar y se pasan a cámaras de refrigeración. En diferentes regiones, el pre-enfriamiento se realiza comercialmente mediante enfriamiento por aire forzado, enfriamiento por vacío o hidro-enfriamiento. Sin embargo, el hidro-enfriamiento puede aumentar la incidencia de pudrición blanda, incluso cuando el agua está clorada. El hidro-enfriamiento puede ser seguro en climas más secos, aunque las condiciones de la temporada de lluvias también pueden favorecer el deterioro de los pimientos. Algunos pimientos se enceran antes del envío para reducir la pérdida de humedad y el desgaste y también se llegan a envolver en películas cuando se exponen a temperaturas de enfriamiento y llegan a tener una vida de almacenamiento de hasta una semana más que los pimientos no envueltos (Cantwell, 2008).

Los pimientos son sensibles al daño por frío a temperaturas inferiores a 7 °C; las condiciones típicas de almacenamiento y transporte son de 7 a 13 °C, con una HR de 90 a 95 % de lo contrario gradualmente se marchitarán o se volverán flácidos (Krishna, 2003; Nunes, 2008). Los pimientos de color o rojos son menos susceptibles a las lesiones por frío que los verdes; los pimientos maduros rojos se pueden mantener una semana a 4.4 °C sin lesiones. Si se mantienen en condiciones óptimas los pimientos morrones se pueden almacenar durante 2-3 semanas (Cantwell, 2008). La senescencia de los pimientos es acelerada con la exposición a etileno, por lo que no se recomienda el almacenamiento con frutos productores de etileno (Hartz et al., 2008). La

pérdida de agua, firmeza, cambios en color y en el aspecto debidos al desarrollo de enfermedades son algunos de los cambios físicos que ocurren en el pimiento durante el almacenamiento y que tienen un impacto directo en la pérdida de su calidad (Krishna, 2003).

2.3.3. Enfermedades poscosecha

Los principales hongos responsables por el deterioro del pimiento morrón durante el almacenamiento son *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides* spp (Ali *et al.*, 2016; Fallik *et al.*, 1999). El primero causa la pudrición gris, el segundo la pudrición negra y el tercero la enfermedad de antracnosis. *Botrytis cinerea* es un hongo que comúnmente se encuentra en los pimientos, el saneamiento en el campo y la prevención de heridas en el fruto reducen su incidencia. Este hongo crece bien a las temperaturas recomendadas de almacenamiento del pimiento; las inmersiones en agua caliente a 53-55 °C durante 4 min pueden controlar eficazmente el deterioro por pudrición gris sin causar lesiones en la fruta. La presencia de pudrición negra, especialmente en el extremo del tallo, es un síntoma de la lesión de refrigeración; el mejor control es almacenar los pimientos a 7 °C. Las pudriciones blandas pueden ocurrir en pimientos lavados o enfriados con agua cuando la sanitización del agua es inadecuada. La putrefacción bacteriana es causada por varias bacterias que atacan el tejido dañado; los pimientos también se ven afectados por muchas de las plagas de enfermedades, virus, insectos y nemátodos que afectan al tomate (González-Aguilar, 2016).

2.3.4. Producción de chiles y pimiento morrón

La producción mundial de chiles es liderada por China, sin embargo, México se encuentra en el segundo lugar (Figura 3). En México la mayor parte de la producción de pimiento morrón se destina a la exportación, tanto la que se genera a campo abierto como la de invernadero. La producción de pimiento morrón aumentó un 41% del año 2009 al 2014 (FAO, 2016). Los chiles y pimientos fueron de los principales productos agroalimentarios exportados en el 2015, siendo México el número tres en las exportaciones mundiales de dichos productos, con una participación en el mercado del 19.0%. Dentro de la producción de chile verde en el país, la de pimiento morrón representa el 16.8% de esta (SIAP, 2016).

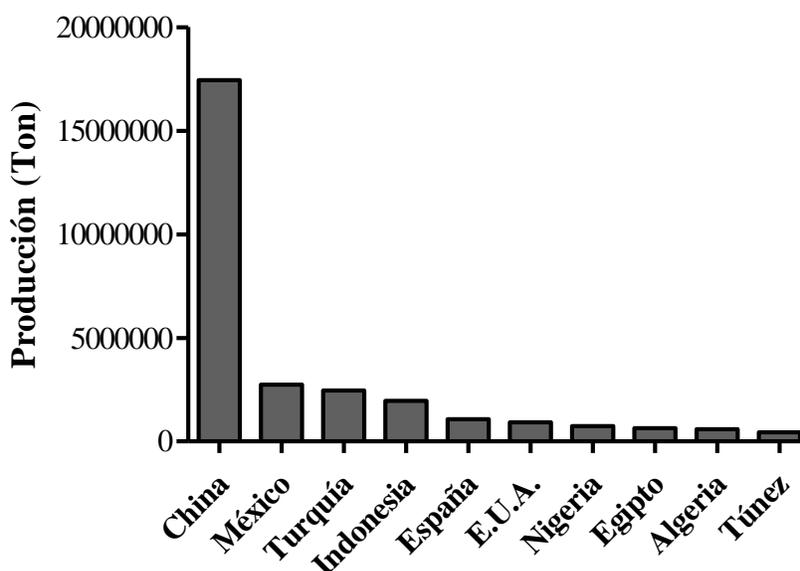


Figura 3. Producción mundial de chiles en el año 2016. Adaptado de FAO (2016).

En el 2015 se sembraron en invernadero aproximadamente 800 ha en el país, con rendimientos en campo que llegaron hasta 119.14 ton/ha con un valor de producción de \$1,370,726 millones (MXN), de los cuales \$179,538 millones fueron del Estado de Querétaro (SIAP, 2016).

2.4. Recubrimientos comestibles en pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.)

Se ha estudiado el efecto de diferentes recubrimientos comestibles en pimiento morrón en los últimos años. Lerdthanangkul y Krochta (1996) evaluaron la aplicación de distintos recubrimientos en pimiento morrón verde donde encontraron que debido a la naturaleza no climatérica de este fruto un recubrimiento comestible con propiedades de barrera a gases no beneficia su conservación. Sin embargo, es más importante que el recubrimiento tenga buenas propiedades de barrera al vapor de agua debido a la susceptibilidad que tiene el fruto a la pérdida de humedad.

La aplicación de un recubrimiento comestible a base de quitosano con aceite esencial de canela mejoró la aceptabilidad sensorial del pimiento morrón (*Capsicum annuum* L. cv. Vergasa) a los 35 días de almacenamiento en comparación con el control e incrementó la presencia de enzimas de defensa (superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa). De igual manera, el recubrimiento disminuyó la fuga de electrolitos y el contenido de malondialdehído, los cuales son indicadores de daño en la membrana celular (Xing *et al.*, 2011).

Ali *et al.* (2015) añadieron aceite esencial de hojas té de limón a un recubrimiento comestible a base de quitosano, y evaluaron su actividad antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* en pimiento morrón verde (*Capsicum annuum* L.). La presencia del aceite esencial en una concentración de 1% ayudó a disminuir el crecimiento micelial *in vitro*; mientras que *in vivo* el efecto fue similar, aunque se observó que el menor porcentaje de incidencia de antracnosis fue en los pimientos con el recubrimiento que contenía únicamente quitosano, lo que atribuyen a la capacidad del quitosano de estimular el sistema de defensa de la planta.

Por otro lado, Poverenov *et al.* (2014), evaluaron los efectos de un recubrimiento de quitosano con gelatina en pimiento morrón y encontraron que su aplicación retrasa la pérdida de firmeza del fruto, inhibe el decaimiento y mejora la capacidad de almacenamiento; lograron extender la vida de anaquel a tres semanas a 7 °C y a 14 días a 20 °C sin que existiera pérdida de calidad.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a las pérdidas generadas durante la distribución y almacenamiento de frutas y hortalizas frescas, es necesario el desarrollo de nuevas tecnologías de conservación que puedan mantener o mejorar los atributos de calidad de los productos frescos, además de alargar su vida útil y asegurar su inocuidad. En particular, el pimiento morrón tiende a sufrir pérdida de agua y deterioro fúngico, lo que afecta su vida de anaquel y su exportación.

El interés en el uso de recubrimientos comestibles a base de biopolímeros naturales, son una alternativa prometedora para extender la vida de anaquel de estos alimentos, ya que proporcionan una barrera selectiva entre éstos y el medio ambiente. Asimismo, la incorporación de compuestos lipofílicos mejora la funcionalidad del recubrimiento comestible, especialmente con respecto a la permeabilidad al vapor de agua.

Adicionalmente, hay una fuerte tendencia en el mercado por el uso de sustancias activas naturales que tengan las mismas propiedades funcionales que los aditivos sintéticos, en donde resaltan los aceites esenciales debido a su alto poder antimicrobiano. Sin embargo, su incorporación en alimentos es difícil debido a su naturaleza lipofílica y a su intenso aroma, por lo que la formación de nanoemulsiones, en las cuales se encuentra dispersa la sustancia lipofílica activa en una fase acuosa, se proponen como un buen método de incorporación y distribución de dichos compuestos.

Debido a lo anterior, resulta pertinente el diseño de un recubrimiento comestible activo, incorporando aceite esencial de orégano mexicano nanoemulsificado para su aplicación en pimiento morrón, en donde se espera mejorar y prolongar la vida de anaquel evitando la pérdida de agua e inhibiendo el crecimiento fúngico.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Diseñar y caracterizar fisicoquímicamente un recubrimiento comestible activo a base de una nanoemulsión de aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) y almidón oxidado; evaluar sus propiedades antimicrobianas y los efectos de su aplicación en pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.).

4.2. Objetivos específicos

1. Determinar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de orégano mexicano contra hongos deterioradores de pimiento morrón.
2. Diseñar y caracterizar fisicoquímicamente el recubrimiento comestible activo a base de una nanoemulsión de aceite esencial de orégano mexicano y almidón oxidado y evaluar sus propiedades antimicrobianas.
3. Evaluar el efecto de la aplicación del recubrimiento comestible diseñado en las características de calidad poscosecha del pimiento morrón.

5. METODOLOGÍA

5.1. Materiales

5.1.1. Reactivos

El almidón oxidado y el sorbitol no cristizable fueron obtenidos de Ingredion México (San Juan del Río, Qro., México). El Tween 80 (T80) fue suministrado de J.T. Baker (Center Valley, PA, EUA). El orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) fue adquirido de productores de Toluimán, Querétaro y su aceite esencial fue extraído de éste mediante hidrodestilación. El ácido metafosfórico, el ácido tartárico, la fenolftaleína y el 2,6-dicloroindofenol sal sódica y el fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

5.1.2. Microorganismos

La cepa de *Botrytis cinerea* (CDBB-H-1556) fue obtenida de la Colección Nacional de Cepas Microbianas Cultivos Celulares (CINVESTAV, IPN, México) y la cepa de *Colletotrichum gloesporioides* var. *minor* fue ATCC 42374.

5.1.3. Medios de cultivo

El medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) fue obtenido de Bioxon (Cuatitlán Izcalli, México).

5.1.4. Recolección de muestras de pimiento morrón

Se recolectaron 72 muestras de pimiento morrón rojo (*Capsicum annuum* L.) variedad SV9908PB provenientes de Rancho San Julián, Querétaro, Qro. Las muestras se seleccionaron con un tamaño, color y estado de madurez homogéneos.

5.2. Métodos

5.2.1. Extracción del aceite esencial de orégano mexicano (AEO)

El material seco de la planta de orégano mexicano se obtuvo de Toluimán, Querétaro y se almacenó en bolsas negras de polietileno a 25 °C. El aceite esencial de orégano mexicano (AEO) fue extraído por hidrodestilación de 450 g de hojas y tallos secos con 5 L de agua destilada, durante 3 h con el uso de un equipo de hidrodestilación. Enseguida, la capa oleosa del destilado obtenido fue removida y secada con sulfato de sodio anhídrido. El AEO fue esterilizado por filtración con uso de un portafiltros Swinnex con membrana (Millipore, Burlington, MA, EUA) de polifluoruro

de vinilideno (PVDF) de tamaño de poro de 0.45 μm y posteriormente almacenado en viales protegidos de la luz a 4 °C, siguiendo lo descrito por Hernández-Hernández *et al.* (2014).

5.2.2. Actividad antifúngica del AEO

Se preparó medio de cultivo PDA adicionado de solución de T80 al 50% (v/v), utilizando 665 μL de solución de T80 / 100 mL de PDA, esto para favorecer la difusión de AEO. El medio se vació en cajas Petri estériles de 8.5 cm de diámetro y se dejó solidificar y enfriar durante 20 min en campana de flujo laminar. Enseguida, se inoculó cada caja con 100 μL de suspensión de 1×10^5 esporas/mL y se sembró por extensión en superficie con ayuda de una varilla de vidrio.

Se prepararon emulsiones de tres concentraciones (15, 30 y 50%, p/v) de AEO con solución de T80 al 10% (v/v) esterilizada en autoclave. Posteriormente, se colocaron en el centro de la superficie del agar, discos de membrana de PVDF (Millipore, Burlington, Massachusetts, EUA) de 25 mm de diámetro y tamaño de poro de 0.22 μm previamente esterilizados en autoclave. Se colocaron 75 μL de cada emulsión de AEO sobre las membranas y se dejó secar durante 20 minutos en campana. Finalmente, se incubaron a 30 °C y se observó su crecimiento al sexto día. Como control negativo se colocaron 75 μL de solución estéril de T80 al 10 % (v/v) (Hernández-Hernández *et al.*, 2014).

5.2.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria del AEO

Para obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI) del AEO para los hongos *B. cinerea*, y *C. gloeosporioides* se utilizó el método de dilución en agar. Se utilizaron distintas concentraciones de AEO (0.0625, 0.125, 0.250, 0.500 y 1.000% v/v) y éste fue emulsificado usando T80 al 10% (v/v) estéril. Después se incorporó al medio PDA a 50 °C y se vació en cajas Petri estériles.

Se sembraron 100 μL de inóculo (10^5 esporas/mL) en la superficie. Las placas se incubaron a 30 ± 1 °C y se observó el crecimiento a los seis días. Como control negativo se colocó PDA adicionado únicamente de solución de T80 al 10% (v/v) (Prudent *et al.*, 1995; López-Malo Vigil *et al.*, 2005; Arredondo Ochoa *et al.*, 2016). La concentración mínima inhibitoria se consideró como la concentración más baja de aceite esencial que, bajo las condiciones definidas, inhibió el crecimiento visible de los microorganismos mencionados (Wiegand *et al.*, 2008).

5.2.4. Elaboración de las nanoemulsiones AEO-almidón oxidado

Se preparó una suspensión de almidón oxidado (3% p/p) con sorbitol no cristizable como plastificante (2.4% p/p) bajo agitación magnética y se calentó a 85° C por 20 min para llevar a cabo la gelatinización. Por otro lado, se mezcló el AEO (0.25, 1.0 y 2.0 % p/p) con T80 (2.0 g/g de AEO). Para formar la emulsión primaria se incorporó la mezcla de AEO y T80 a la dispersión de almidón y sorbitol mediante agitación magnética una vez que ésta llegó a una temperatura máxima de 55 °C. Enseguida, se homogeneizó la emulsión primaria empleando un mezclador de alta velocidad (IKA T25-Ultra-Turrax, Staufen, Alemania) a una velocidad de 13,500 rpm durante 3 minutos. Finalmente, se aplicó ultrasonido a las emulsiones por distintos tiempos (0, 120 y 240 s) a 20 kHz de frecuencia y 75% de amplitud (VCX 500 Vibra-Cell, Newtown, CT, EUA).

5.2.5. Diseño experimental para la caracterización de nanoemulsiones (NEs)

Para la caracterización de las nanoemulsiones (NEs) y la evaluación de su efecto antimicrobiano se llevó a cabo un diseño factorial 3² con el factor porcentaje de AEO en tres niveles (0.25, 1.0 y 2.0 % p/p) y tiempo de sonicación (ts) en tres niveles (0, 120 y 240 s), teniendo un total de 9 tratamientos. Se utilizaron tres réplicas para cada evaluación.

Cuadro 4. Diseño experimental para la caracterización de nanoemulsiones de aceite esencial de orégano mexicano.

Tratamiento	Concentración de AEO (% p/p)	Tiempo de sonicación (s)
1	0.25	0
2	0.25	120
3	0.25	240
4	1.0	0
5	1.0	120
6	1.0	240
7	2.0	0
8	2.0	120
9	2.0	240

5.2.6. Caracterización fisicoquímica de las NEs

5.2.6.1. Medición del tamaño de partícula, índice de polidispersión, distribución de tamaño, índice de polidispersión y potencial ζ

Se obtuvieron el tamaño promedio de partícula, el índice de polidispersión (IP), las curvas de distribución de tamaño en función de la intensidad (%) y el potencial zeta (ζ) para caracterizar las partículas dispersas en las NEs. En donde, un IP cercano a 1 indica una distribución de tamaño de partícula heterogénea. Dichos parámetros fueron determinados en las NEs 25 °C mediante dispersión dinámica de luz utilizando un difractómetro láser Zetasizer Nano ZS (ZEN 3600 Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, Reino Unido) con longitud de onda a 633 nm con detector de retrodispersión a 173°. El potencial ζ se obtuvo mediante dispersión de luz con análisis de fase utilizando el equipo antes mencionado calculando la movilidad electroforética de las partículas aplicando un voltaje de 200 mV. Se utilizó la ecuación de Henry y la aproximación de Huckel para obtener los valores de potencial ζ . Las muestras se diluyeron con agua destilada en una relación 1:10 para evitar el efecto de dispersión múltiple.

5.2.6.2. Medición de pH

El pH de cada una de las NEs fue determinado con el uso de un potenciómetro Hannah Instruments pH 209 a una temperatura de 25 °C. Se colocaron 50 mL de cada NE en agitación magnética y se prosiguió a medir el pH.

5.2.6.3. Determinación del índice de blancura

Se midieron las propiedades ópticas de las NEs a 25 °C con el uso de un colorímetro (CM-600d, Konica Minolta, Osaka, Japón). El equipo fue calibrado en cero en el ambiente y se utilizó un capuchón para calibración de blanco CM-A177. Se determinaron los valores CIE de L^* , a^* y b^* y se calculó el índice de blancura (IB) utilizando la siguiente ecuación (Artiga-Artigas *et al.*, 2017):

$$IB = 100 - ((100 - L)^2) + (a^2 + b^2))^{0.5}$$

5.2.6.4. Determinación de la tensión superficial líquido-vapor (γ_{LV})

La tensión superficial de las NEs se obtuvo utilizando un tensiómetro superficial con un anillo de platino-iridio de diámetro de 9.545 mm (K6 Krüss, Munich, Alemania). Se usaron 20 mL

de cada NE para cada medición y se realizó por triplicado. El equipo se calibró utilizando agua desionizada y etanol absoluto.

Se realizó la corrección del valor obtenido utilizando un factor de corrección donde se consideró el diámetro del anillo, el diámetro del alambre, la tensión superficial sin corrección, la densidad del líquido problema la cual se presenta en el apéndice 1, seguido lo descrito por Harkins y Jordan (1930).

5.2.6.5. Determinación del ángulo de contacto sobre pimiento morrón

Se midió el ángulo de contacto (θ) formado a los 30 s colocando una gota (30 μ l) de cada una de las NEs en la parte externa de la superficie de pimiento morrón rojo variedad SV9908PB en cualquier zona lisa mediante el uso de un equipo de ángulo de contacto DSA30 (Krüss, Hamburgo, Alemania) con el software DSA4 (Figura 4). El análisis se realizó por triplicado.

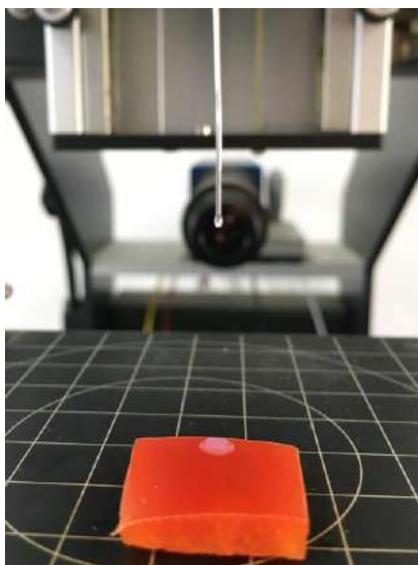


Figura 4. Medición de ángulo de contacto con el equipo DSA30.

5.2.6.6. Determinación de la tensión superficial crítica del pimiento morrón

Para la determinación de la tensión superficial crítica del pimiento morrón se siguió la metodología de Zisman (Zisman, 1964). Se midió el ángulo de contacto (Θ) formado a los 30 s colocando una gota (30 μ l) de cada líquido de referencia (agua desionizada, metanol, formamida, etilenglicol y propilenglicol) sobre la superficie del pimiento morrón rojo variedad SV9908PB mediante el uso de un equipo de ángulo de contacto DSA30 (Krüss, Hamburgo, Alemania) con el software DSA4. Posteriormente, se graficó la tensión superficial obtenida de tablas de constantes

físicas de cada uno de los líquidos contra el coseno del ángulo de contacto formado en la superficie del fruto. La línea obtenida se extrapoló hasta coseno igual a uno, y la tensión superficial obtenida se consideró la tensión superficial crítica del pimientó morrón.

5.2.6.7. Determinación del coeficiente de mojabilidad

Con los valores obtenidos anteriormente se obtuvo el coeficiente de mojabilidad con el uso de la siguiente ecuación:

$$W_s = W_a - W_c \quad (3)$$

Donde:

$$W_a = \gamma_{LV} (1 + \cos\theta) \quad (4)$$

$$W_c = 2\gamma_{LV} \quad (5)$$

En donde, la ecuación (4) es la de Young-Dupré (Young, 1805; Dupré y Dupré, 1869) como la propone Adam (1957) en donde W_a representa el trabajo de adhesión, el cual es una medida de la fuerza de atracción entre las partículas de la fase líquida y la fase sólida, y W_c es el trabajo de cohesión o de atracción entre las partículas de la fase líquida .

Por lo que:

$$W_s = \gamma_{LV}(\cos\theta - 1) \quad (6)$$

5.2.6.8. Microscopía electrónica de transmisión de NEs

Para confirmar el tamaño y distribución y observar la forma de las partículas de las NEs se llevó a cabo una microscopía electrónica de transmisión por tinción negativa seguido lo descrito por Arredondo-Ochoa *et al.* (2017) y Salvia-Trujillo *et al.* (2013b). Las muestras de las NEs con 2% (p/p) de AEO se adsorbieron en rejillas de cobre/paladio recubiertas con carbono durante 1 minuto, y después se colocaron flotando boca abajo sobre una gota de molibdato de amonio al 2% (p/v), pH 6.5, durante 1 minuto para realizar la tinción negativa; en donde se pretende generar un contraste de las micelas de la NE con el fondo teñido. Las muestras se observaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión (JEM-1010 JEOL, Peabody, MA, EUA) con un voltaje de aceleración de 80 kV y las imágenes se obtuvieron utilizando el software de micrografía digital 3.1 (Gata, Pleasanton, CA, EUA).

5.2.6.9. Actividad antimicrobiana de las NEs

La actividad antimicrobiana de las NEs se evaluó utilizando el método de difusión en agar. Se sembraron en cajas Petri con PDA 100 μ L de una suspensión de esporas 10^6 de *C. gloeosporioides* por extensión en superficie, debido a que este microorganismo fue el más resistente en experimentos previos. Posteriormente se colocó una gota de 20 μ L de cada tratamiento en el centro de la caja Petri y se incubaron a 30° C durante tres días. Los resultados se reportaron como el promedio de la zona de inhibición en mm (Arredondo-Ochoa *et al.*, 2017).

5.2.7. Evaluación del efecto de la aplicación del recubrimiento comestible a base de la NE AEO-almidón oxidado en la calidad poscosecha de pimiento morrón

5.2.7.1. Diseño experimental

Para evaluar el efecto del recubrimiento se llevó a cabo un diseño unifactorial con el factor recubrimiento en dos niveles: control o recubrimiento, tal como muestra el Cuadro 5. Se utilizó como recubrimiento la NE que presentó mejores características fisicoquímicas y antimicrobianas. La unidad experimental constó de dos frutos y se realizaron tres réplicas. Los tratamientos fueron aleatorizados. Se realizaron seis mediciones en el tiempo de cada parámetro evaluado a los 0, 4, 8, 12, 16 y 20 días de almacenamiento. Los parámetros evaluados fueron pérdida de peso, color, sólidos solubles totales, pH, acidez titulable, vitamina C y cuenta total de mohos y levaduras.

Cuadro 5. Diseño experimental para la evaluación de recubrimiento comestible en pimiento morrón.

Tratamiento	Tipo de recubrimiento
Control	Agua
Recubrimiento	Nanoemulsión 2% AEO sonicada 120 s

5.2.7.2. Aplicación del recubrimiento comestible

Los frutos fueron recolectados e inspeccionados para asegurar que estuviesen libres de daño y de alguna contaminación fúngica. Enseguida, fueron lavados y desinfectados con agua electrolizada neutra a 200 ppm por un tiempo de contacto de cinco minutos (Figura 5). Después de esto, fueron secados al aire libre seguido lo descrito por Arevalos-Sánchez *et al.* (2013). Posteriormente, los frutos fueron separados aleatoriamente en grupo control y grupo con

recubrimiento, para después ser recubiertos con agua o con la nanoemulsión elegida, respectivamente.



Figura 5. Desinfección de pimiento morrón previa a la aplicación del recubrimiento comestible.

La aplicación del recubrimiento fue mediante barnizado utilizando una esponja estéril. Enseguida, los frutos fueron colgados con una cuerda de algodón sujeta por el pedúnculo de cada uno para llevar a cabo el secado a temperatura ambiente con la ayuda de un ventilador suministrando una corriente de aire a baja velocidad para acelerar dicho proceso (Figura 6). Se colocaron dos pimientos en un contenedor plástico (*clamshell*) hecho de poliestireno y se almacenaron en refrigeración a 7 °C y 80 ± 5 % de HR.



Figura 6. Frutos secándose después de la aplicación del recubrimiento comestible.

5.2.7.3. Evaluación de pérdida de peso

Se tomó medida del peso de cada unidad experimental en cada tiempo de almacenamiento descrito en el punto 5.2.6.1 utilizando una balanza de precisión BJ 410C (Precisa, Livingston, Reino Unido). El resultado se reportó como porcentaje de pérdida de peso con respecto al peso inicial de cada muestra a través del tiempo (Lerdthanangkul y Krochta, 1996; Xing *et al.*, 2011).

5.2.7.4. Evaluación de color

El color de los pimientos fue evaluado utilizando un colorímetro (CM-600d, Konica Minolta, Osaka, Japón) en cada tiempo de almacenamiento descrito en el punto 5.2.6.1 obteniendo los valores CIE de L*, a* y b* a una temperatura de 25 °C. El equipo fue calibrado en cero en el ambiente y se utilizó un capuchón para calibración de blanco CM-A177. Se realizaron tres mediciones horizontalmente alrededor del centro del fruto para compensar variaciones de la pigmentación superficial. El ángulo de matiz (hue) fue calculado siguiendo las ecuaciones descritas por Lerdthanangkul y Krochta (1996) y Shewfelt *et al.* (1988) y fue reportado junto con el parámetro L.

5.2.7.5. Determinación de parámetros bioquímicos

5.2.7.5.1. Obtención del jugo del fruto

Para los parámetros bioquímicos se obtuvo jugo del fruto con el uso de un extractor de jugos eléctrico Frutelia (Moulinex, Alençon, Francia). Se mezclaron 10 g del jugo obtenido con 80 g de agua destilada y se filtraron con papel filtro para después ser utilizados en las pruebas posteriores.

5.2.7.5.2. Sólidos solubles totales (SST)

La determinación de sólidos solubles totales (SST) se realizó siguiendo lo descrito por el método AOAC-932.12 (AOAC, 2012) mediante el uso de un refractómetro HI 96813 (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, EUA), en el cual se colocaron 100 μ L de jugo del fruto a una temperatura de 25 °C. El refractómetro se calibró inicialmente usando agua destilada y el prisma se limpió con un pañuelo de papel y agua destilada después de cada medición.

5.2.7.5.3. pH y acidez titulable

El pH del jugo del fruto se determinó de acuerdo a la AOAC 981.12 (AOAC, 2012) mediante el uso de un potenciómetro Orion Star A211 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

La acidez titulable se determinó de acuerdo a la metodología descrita por la AOAC 942.15 (AOAC, 2012). Se tomaron 15 mL de jugo diluido y se le añadieron 3 gotas de fenolftaleína para titular con NaOH 0.1 N hasta alcanzar un pH final de 8.1 con el uso de un potenciómetro. Los resultados se reportan como g de ácido cítrico/100 g de fruto fresco (Castro *et al.*, 2008).

5.2.7.5.4. Vitamina C

Para la determinación de vitamina C se siguió la metodología descrita por la AOAC 967.21 (AOAC, 2012). Se mezclaron 2 mL de jugo diluido con 5 mL de solución extractora de ácido metafosfórico-ácido acético y se realizó la titulación con solución estándar de 2,6-diclorofenolindofenol sal sódica. Los resultados se reportan como mg de ácido ascórbico/100 g de fruto fresco.

5.2.7.6. Cuenta total de hongos y levaduras

Se tomaron 10 g de muestra de cada unidad experimental en cada tiempo de medición descrito en el punto 5.2.6.1. Las muestras se prepararon seguido lo descrito por la (NOM-110-SSA1-1994). La cuenta de hongos y levaduras se realizó seguido lo descrito por la (NOM-111-SSA1-1994). Se utilizaron 5 diluciones decimales y se prosiguió a colocar 1 mL de cada una de ellas en una caja Petri con 15-20 mL de PDA acidificado con ácido tartárico al 10% (p/v) con un pH final de 3.5. Se realizó duplicado de cada dilución. Se contaron las colonias de las cajas con 10-150 colonias a los 5 días de incubación a 30 °C.

5.3. Análisis estadístico

Todas las pruebas se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% seguido de una comparación de medias mediante la prueba de Tukey para la caracterización de nanoemulsiones y una prueba t de student comparar tratamiento contra un control en las pruebas de la aplicación del recubrimiento. Todos los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico JMP 8.0 (SAS Institute).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Extracción del AEO

El AEO obtenido mediante hidrodestilación presentó un color amarillento y olor característico (parámetros no determinados cuantitativamente) (Figura 7). El rendimiento obtenido fue de 2.33% (p/p base seca), el cual es menor al reportado por Hernández-Hernández *et al.* (2014) de 4.29% (p/p) para la misma variedad de orégano obtenido de la misma zona geográfica que en este estudio. Sin embargo, el rendimiento obtenido se encuentra dentro del rango reportado por Uribe-Hernández *et al.* (1992) de 0.67 a 2.54% (p/p) para la misma variedad de orégano proveniente de distintas zonas geográficas.

La composición y cantidad de aceite esencial extraído de plantas aromáticas depende de diversos factores tales como origen geográfico, variedad, parte de la planta utilizada, condiciones de crecimiento, método de secado, método y condiciones de extracción, entre otros (Calo *et al.*, 2015; Calvo-Irabién *et al.*, 2014). Es posible que a pesar de haber obtenido el orégano mexicano de la misma zona geográfica hayan existido condiciones ambientales distintas, incluso pudo haber una mayor proporción de hojas en los tallos o factores de extracción que hayan cambiado la cantidad de AEO extraído.



Figura 7. Apariencia de aceite esencial de orégano mexicano obtenido mediante hidrodestilación.

Los principales componentes del aceite esencial de orégano reportados son el timol y el carvacrol (Burt, 2014; Gómez-Sánchez *et al.*, 2011) a los cuales se les atribuye su alta actividad antimicrobiana. Sin embargo, Hernández-Hernández *et al.* (2014) reportaron la composición del AEO obtenido mediante el mismo método de extracción y proveniente de la misma zona geográfica (Tolimán, Querétaro) que en éste trabajo, en donde se obtuvieron distintos resultados

dependiendo del solvente que se utilizó en el método de cuantificación; Al utilizar metanol los componentes de dicho AEO mayoritarios fueron timol (66.3%), γ -terpineno (9.59%), α -pineno (4.85%) y al utilizar pentano se encontraron principalmente timol (49.9%), γ -terpineno (10.31%) y β -thujeno, α -terpineno y β -mirceno (2.32% cada uno); destacando la baja presencia de carvacrol (0.1%). Por lo anterior, se considera que el AEO utilizado en este trabajo tiene una composición alta en timol y en los componentes mencionados anteriormente.

6.2. Actividad antifúngica del AEO

Para confirmar la actividad antifúngica del AEO se utilizó el método de difusión con disco en agar y como microorganismos indicadores los hongos deterioradores de pimiento morrón *B. cinerea* y *C. gloeosporioides*. El AEO presentó efecto antifúngico contra los dos hongos mencionados (Figuras 8 y 9), presentando un mayor efecto contra *B. cinerea* ya que su desarrollo fue inhibido por completo con todas las concentraciones de AEO evaluadas (Figura 8). El efecto contra *C. gloeosporioides* fue menor, observándose crecimiento de colonias en la parte más alejada al disco y colonias más pequeñas conforme la distancia al disco disminuye. Hay que mencionar, además que el efecto inhibitorio aumenta conforme existe una mayor concentración de AEO en el disco (Figura 9).

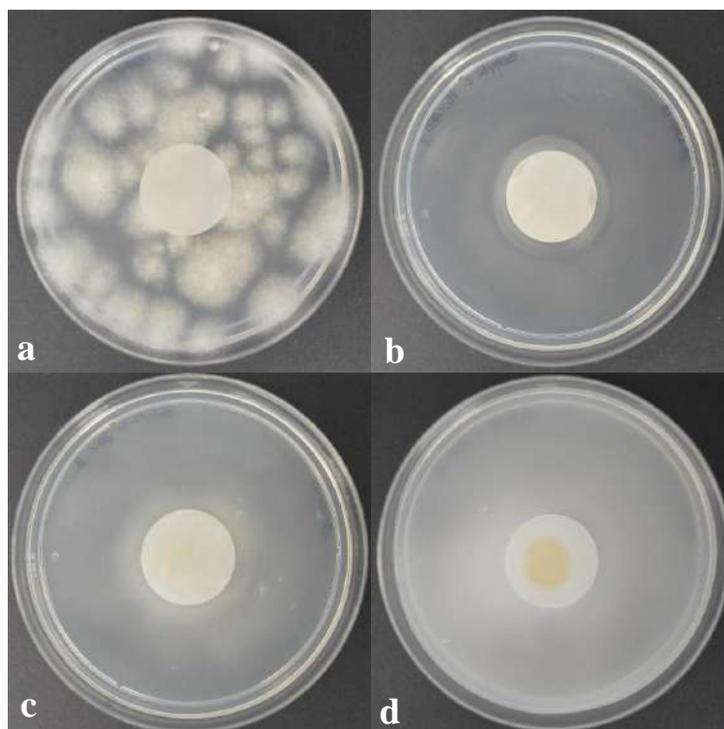


Figura 8. Actividad antifúngica del aceite esencial de orégano mexicano a distintas concentraciones contra *B. cinerea*. Control negativo con solución de T80 al 10% v/v (a), AEO al 15% (b), 30% (c) y 50% p/v de AEO (d).

El efecto antifúngico de AEO de *Lippia graveolens* ha sido evaluado anteriormente en hongos; Rodríguez-García *et al.* (2016) inhibieron el crecimiento *in vitro* de *Alternaria alternata* con películas de pectina adicionadas con AEO en una concentración de 15.7 g/L. Por otra parte, Nevárez-Moorillón *et al.* (2014) obtuvieron una concentración mínima inhibitoria de 0.50% v/v contra *C. gloeosporioides* en películas comestibles de almidón y quitosano adicionadas con AEO. Es importante resaltar que también se ha evaluado la inhibición de *B. cinerea* y *C. gloeosporioides* por otros aceites esenciales que contienen timol y carvacrol como componentes principales, así como por la presencia de los componentes de manera independiente (Daferera *et al.*, 2003; Martínez-Romero *et al.*, 2007; Combrinck *et al.*, 2011; Abbaszadeh *et al.*, 2014).

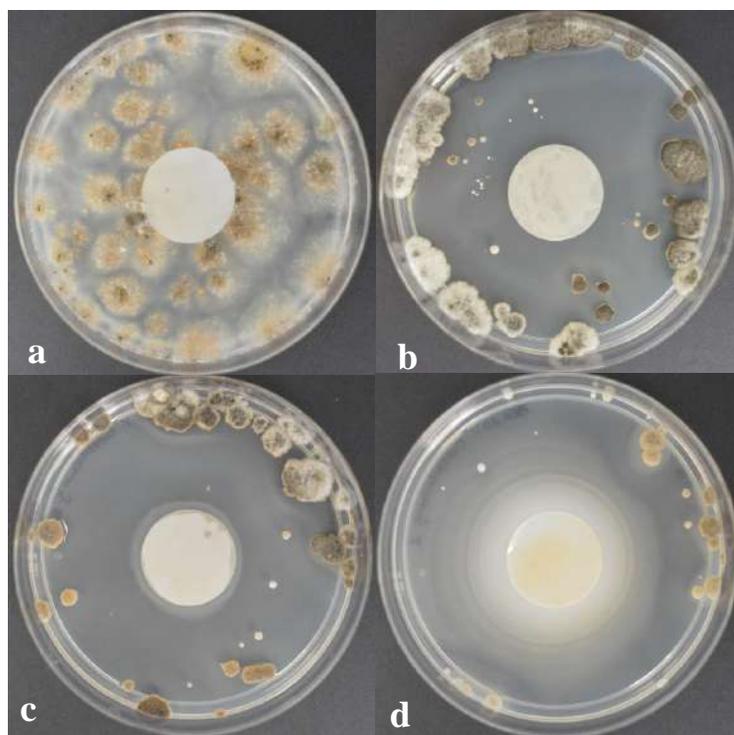


Figura 9. Actividad antifúngica del aceite esencial de orégano mexicano a distintas concentraciones contra *C. gloeosporioides*. Control negativo con solución de T80 al 10% v/v (a), AEO al 15% (b), 30% (c) y 50% p/v (d).

En el método de difusión en disco en agar el compuesto antimicrobiano colocado en el disco se difunde a través del agar resultando en un gradiente que es inversamente proporcional a la distancia hacia el disco situado en el centro de la caja (López-Malo Vigil *et al.*, 2005), esto explica la mayor inhibición en la parte más cercana al disco que se observa contra *C. gloeosporioides*. Si bien, se ha comprobado anteriormente la inhibición del crecimiento de hongos

por compuestos volátiles en la fase-vapor de aceites esenciales (López *et al.*, 2007). Por ejemplo, (Flores Meza *et al.*, 2016) comprobaron el efecto de la fase vapor del AEO por la técnica de volatilización en disco, en donde una concentración de 2000 ppm inhibió completamente a *B. cinerea* y *C. gloeosporioides*. De manera que, es posible que el efecto observado no sólo sea por el contacto directo del AEO con los hongos deterioradores sino también por el contacto con los compuestos volátiles en el espacio de cabeza.

Las colonias de *C. gloeosporioides* en contacto con el AEO presentan una morfología distinta al control (Figura 9), presentando tonalidades grises y una menor presencia de micelio. Soyly *et al.* (2007) reportaron que la exposición a los compuestos volátiles de aceites esenciales genera cambios degenerativos en la morfología de las hifas de *Sclerotinia sclerotiorum*, así como agregados de hifas encogidos, atribuyendo dicho efecto a la pérdida de integridad de la pared celular y membrana plasmática.

El mecanismo de acción de los aceites esenciales contra microorganismos es complejo y no ha sido explicado en su totalidad, siendo lo más probable que su actividad antimicrobiana no sea atribuible únicamente a un mecanismo en específico sino que existan distintos sitios afectados en la célula (Burt, 2014). Sin embargo, se reconoce que su acción se debe a su naturaleza lipofílica; debido a esto, son capaces de penetrar tanto la membrana plasmática como la membrana mitocondrial provocando la pérdida de su integridad e incrementando su permeabilidad (Kalemba y Kunicka, 2003; Swamy *et al.*, 2016). El daño generado en la célula puede causar una disminución de su potencial de membrana, afectando los canales de Ca^{2+} y otros iones, la bomba de protones y la fosa de ATP, llevando finalmente a la muerte celular por apoptosis y necrosis (Akhtar *et al.*, 2014; Burt, 2014).

6.3. CMI del AEO contra hongos deterioradores

En el Cuadro 6 se presenta la CMI del AEO obtenida contra los dos hongos mencionados anteriormente mediante el método de dilución en agar. Se observa que la concentración encontrada para *B. cinerea* fue menor (0.125% p/p) (Figura 10) que para *C. gloeosporioides* (0.250% p/p) (Figura 11), lo que corresponde con la mayor susceptibilidad observada en el primero anteriormente.

Vitoratos *et al.* (2013) encontraron una CMI de 0.02 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de aceite esencial de orégano europeo en la inhibición de *B. cinerea*, aunque es menor es posible que se deba a diferencias en la

composición del aceite esencial, a que el inóculo fue 2 log menor y a que el crecimiento se observó únicamente a las 24 horas. Por otro lado, Cid-Pérez *et al.* (2015) obtuvieron una CMI de aceite esencial de otra variedad de orégano mexicano (*Poliomintha longiflor*) con alto contenido de timol y carvacrol, para *B. cinerea* y *C. gloeosporioides* de 0.8 y 1.0 g/L, respectivamente. Estas concentraciones son similares a las obtenidas en este trabajo, resaltando la mayor susceptibilidad de *B. cinerea* a los componentes de dichos aceites esenciales.

Cuadro 6. Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de orégano mexicano contra hongos deterioradores.

Microorganismo	Concentración de AEO (% v/v)				
	0.0625	0.125	0.250	0.500	1.000
<i>Botrytis cinerea</i>	-	+	+	+	+
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	-	-	+	+	+

+ Inhibición

- No inhibición

Los factores inherentes al microorganismo de prueba, el agente antimicrobiano, el medio de prueba y/o el propio procedimiento de prueba pueden alterar los resultados (López-Malo Vigil *et al.*, 2005). Se debe mencionar también que la definición de CMI así como los métodos utilizados difieren entre publicaciones por lo que a veces es difícil hacer comparaciones entre estudios, sin embargo, la CMI de aceites esenciales determinada por el método de dilución en agar en general parece ser la más aproximada en el orden de magnitud de los resultados obtenidos (Burt, 2014).

Hay que considerar que la efectividad de un agente antimicrobiano se reduce cuando se incorpora en películas o recubrimientos comestibles debido a la presencia de distintos compuestos en comparación con los ensayos *in vitro*; Además, un compuesto podría ser eficaz bajo las condiciones de prueba utilizadas pero no proporcionar una actividad adecuada en el alimento en condiciones prácticas (Arredondo Ochoa *et al.*, 2016; López-Malo Vigil *et al.*, 2005). Debido a esto, es posible que la concentración efectiva en las NEs sea mayor a la encontrada como CMI por lo que para el diseño del recubrimiento también se tomaron en cuenta concentraciones mayores de AEO.

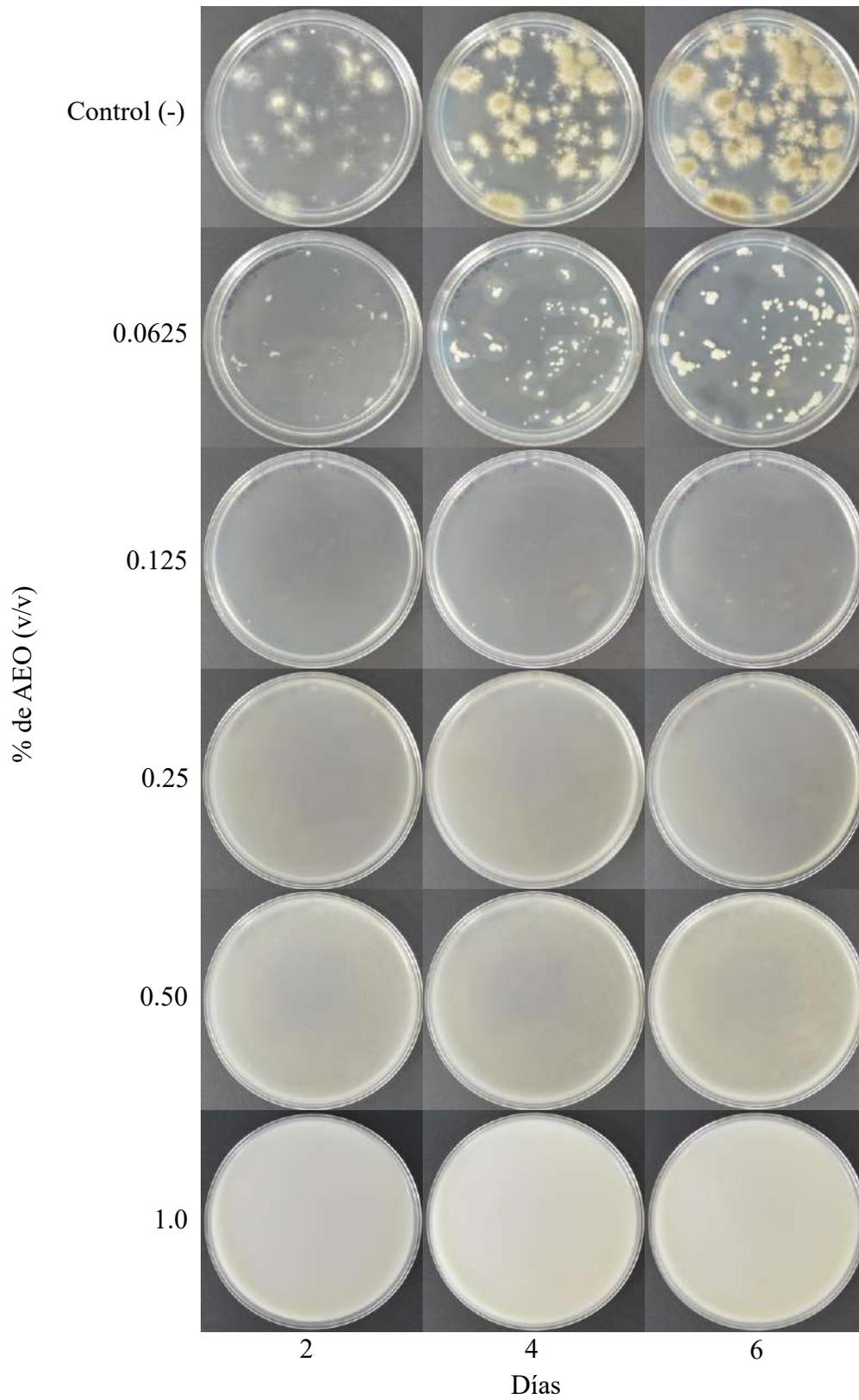


Figura 10. Crecimiento de *B. cinerea* con distintas concentraciones de aceite esencial de orégano mexicano a los 2, 4 y 6 días y control y concentración de manera ascendente.

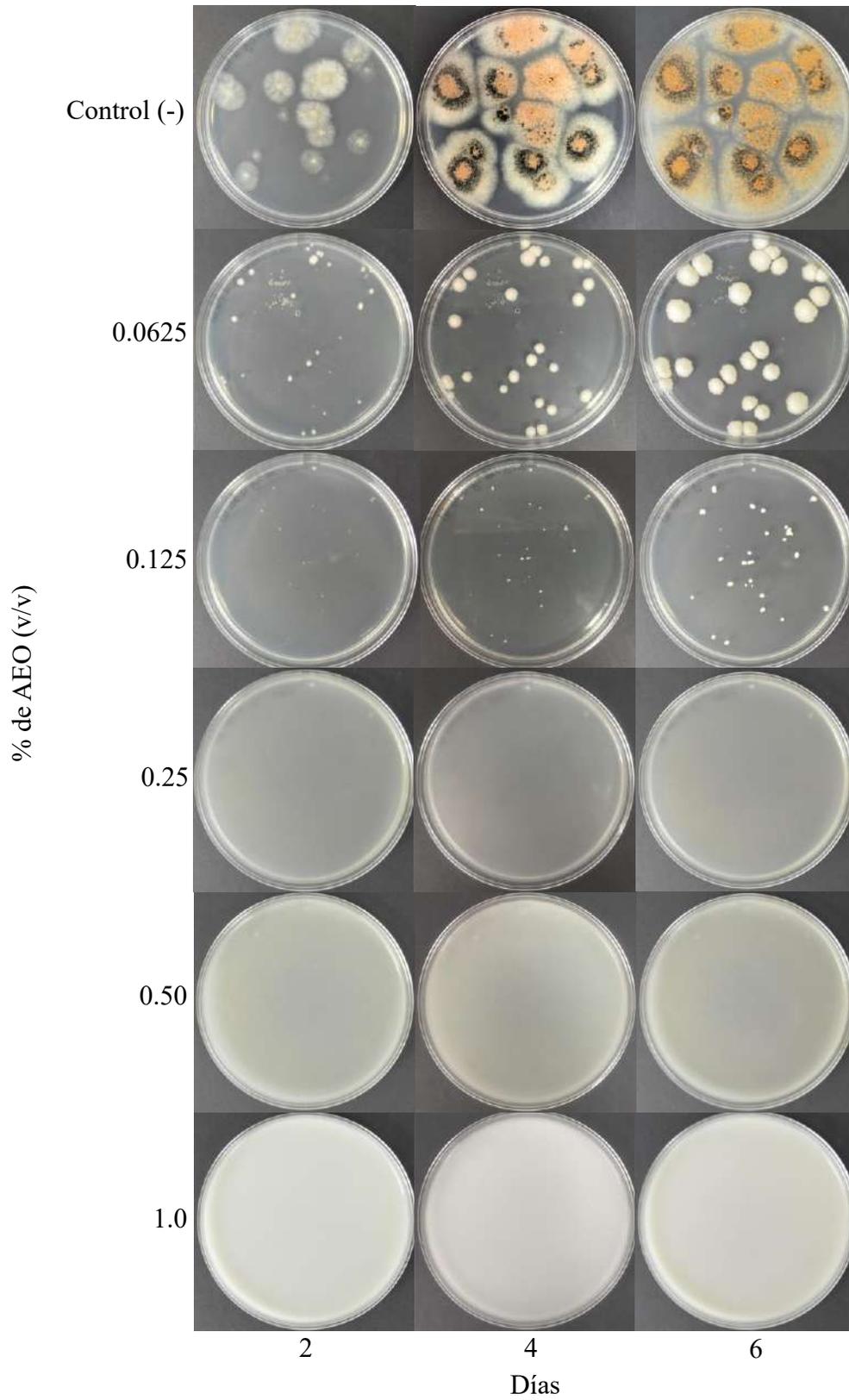


Figura 11. Crecimiento de *C. gloeosporioides* con distintas concentraciones de aceite esencial de orégano mexicano a los 2, 4 y 6 días y control y concentración de manera ascendente.

6.4. Caracterización fisicoquímica de las NEs

6.4.1. Tamaño de partícula, índice de polidispersión y distribución de tamaño

En el Cuadro 7 se presentan los valores de tamaño promedio de partícula e IP y en la Figura 12 la distribución de tamaño de las NEs de AEO obtenidas.

Cuadro 7. Tamaño promedio de partícula e índice de polidispersión de nanoemulsiones de aceite esencial de orégano mexicano.

Tratamiento	Concentración de AEO (% p/p)	Tiempo de sonicación (s)	Tamaño promedio de partícula (nm)	Índice de polidispersión
1	0.25	0	99.38 ± 1.18 ^a	0.44 ± 0.03 ^a
2	0.25	120	64.69 ± 0.48 ^d	0.45 ± 0.02 ^a
3	0.25	240	63.37 ± 1.57 ^d	0.47 ± 0.01 ^a
4	1.0	0	93.94 ± 3.84 ^{a,b}	0.41 ± 0.02 ^a
5	1.0	120	74.96 ± 0.94 ^c	0.20 ± 0.01 ^{b,c}
6	1.0	240	78.13 ± 1.49 ^c	0.20 ± 0.01 ^{b,c}
7	2.0	0	100.42 ± 2.91 ^a	0.27 ± 0.07 ^b
8	2.0	120	88.32 ± 4.93 ^b	0.14 ± 0.02 ^{c,d}
9	2.0	240	90.47 ± 1.15 ^b	0.11 ± 0.01 ^d

Los datos se presentan como la media (n=3) ± desviación estándar de tres experimentos independientes. Letras diferentes dentro de una columna representan diferencias significativas por la prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$).

Las características fisicoquímicas, así como los atributos funcionales de una NE dependen ampliamente de las propiedades de partícula tales como tamaño, composición, etc. (McClements y Jafari, 2018). Todas las emulsiones obtenidas con 0.25 y 1.0% (p/p) de AEO, así como las obtenidas con 2.0% (p/p) de AEO con sonicación tienen un tamaño promedio de partícula menor a 100 nm denominándose así nanoemulsiones ya que se encuentran dentro del rango reportado de 10-100 nm (McClements, 2011). Sin embargo, es importante resaltar que algunos autores consideran NEs sistemas con tamaños de partícula menores a 200 nm (Abbas *et al.*, 2014; Artiga-Artigas *et al.*, 2017), en este sentido todas las emulsiones obtenidas podrían ser consideradas NEs. La concentración de AEO y el ts, así como su interacción, fueron significativos ($\alpha < 0.05$) respecto al tamaño promedio de partícula y el IP (Apéndice 2). En este sentido, el efecto del ts sobre dichas variables respuesta depende de la concentración de AEO en la emulsión. Obtener tamaños de

partícula pequeños mejora la estabilidad de las NEs ya que las interacciones coloidales tanto atractivas como repulsivas tienden a aumentar cuando incrementa el tamaño de partícula, las cuales están directamente relacionadas con mecanismos de separación (Zhang y McClements, 2018).

Se ha reportado anteriormente la obtención de NEs de aceites esenciales utilizando únicamente homogeneización con un dispersor de alto cizallamiento; Salvia-Trujillo *et al.* (2014) reportaron tamaños promedio de partícula en el rango nano utilizando homogeneización (3400 rpm por 2 minutos), sin embargo, dicho resultado dependía del tipo de aceite esencial utilizado y en su mayoría presentaban distribuciones de tamaño multimodales, lo cual no se presentó en este caso. Dichos autores atribuyen principalmente las diferencias observadas en los tamaños de partícula a la estructura molecular, concentración de compuestos volátiles, viscosidad, tensión interfacial y afinidad del surfactante por cada uno de los aceites utilizados.

Las NEs obtenidas con 0.25% (p/p) de AEO presentan dos picos en su distribución de tamaño correspondientes a partículas de distinto tamaño (Figura 9a). A pesar de que se observa una disminución en el tamaño promedio de partícula al aplicar el tratamiento de sonicación por 120 o 240 s (de 99.38 ± 1.18 a 64.69 ± 0.48 y 63.37 ± 1.57 nm, respectivamente), el IP no disminuyó, lo cual es claro al observar el gráfico de distribución de tamaño en donde el valor promedio en la campana se desplaza a un valor menor pero el ancho de la curva sigue siendo el mismo, lo que nos indica un mismo grado de variabilidad entre los tamaños de las partículas en las NEs a pesar de haber reducido el tamaño promedio de estas. Es importante también notar que el tratamiento de sonicación en este nivel de AEO no eliminó el pico que se presenta cerca de 10,000 nm; dicho pico puede ser atribuido a estructuras de la suspensión coloidal del almidón oxidado o a partículas de AEO interaccionando con el almidón formando aglomerados que no pudieron ser disgregados.

En las NEs obtenidas con 1.0% y 2.0% (p/p) de AEO existe también una disminución del tamaño promedio de partícula al aplicar el tratamiento de sonicación; Reduciéndose de 93.94 ± 3.84 a 74.96 ± 0.94 y 78.13 ± 1.49 nm para las NEs de 1% de AEO sonicadas 120 y 240 s, respectivamente y de 100.42 ± 72 a 88.32 ± 4.93 y 90.47 ± 1.15 nm para las NEs de 2.0% (p/p) de AEO sonicadas 120 y 240 s, respectivamente. Se observa que la disminución del tamaño promedio de partícula es menor conforme está presente una mayor cantidad de AEO. Ahora bien, en estas

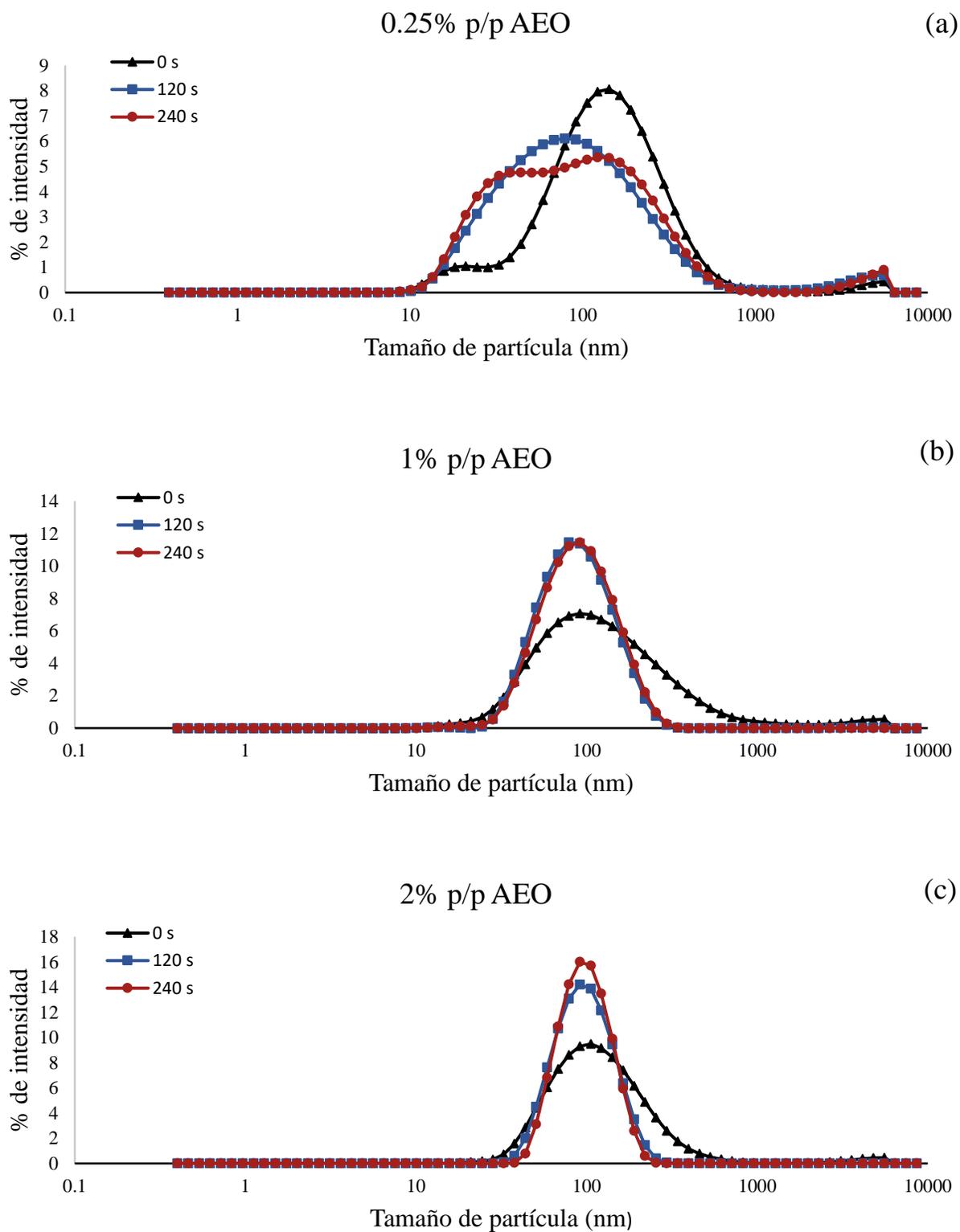


Figura 12. Distribución de tamaño de partícula de nanoemulsiones de aceite esencial de orégano mexicano con distintos tiempos de sonicación: 0.25% (a), 1.0% (b) y 2.0% p/p de AEO (c).

concentraciones de AEO se presenta una disminución del IP, lo cual es claro al observar el estrechamiento de la campana de distribución de tamaño en las NEs sonicadas, así como la desaparición del pico cercano a los 10,000 nm (Figura 9b y 9c). Lo anterior, se traduce en una mayor homogeneidad en los tamaños de partícula presentes en dichas NEs. Debe destacarse que no se observa diferencia en el IP o la distribución de tamaño de las NEs sonicadas por 120 s y las de 240 s, ya sea en 1.0% o 2.0% (p/p) de AEO.

El efecto de la concentración de la fase lipídica sobre el tamaño de partícula de NEs ha sido reportado anteriormente. Shahavi *et al.* (2015) encontraron que la disminución del tamaño promedio de partícula era mayor cuando se incrementaba la concentración de aceite en NEs de aceite de clavo e incluso mejoraba la estabilidad de éstas. Por otro lado, Jafari *et al.* (2006) reportaron que al tener una mayor concentración de la fase dispersa el tamaño promedio de partícula era mayor pero la distribución de tamaño se volvía más angosta en emulsiones de *d*-limoneno con concentrado de proteína de suero como emulsificante.

Se ha reportado la obtención de NEs por sonicación en donde amplitudes grandes y tiempos largos no generan una diferencia sobre el tamaño de partícula (Salvia-Trujillo *et al.*, 2013a; Shahavi *et al.*, 2015). Lo anterior se ha atribuido a un efecto de “sobre-procesamiento”, el cual se describe como un fenómeno en el cual los valores de tamaño promedio de partícula alcanzan un punto estable o incrementan; debido a un aumento en la coalescencia de las partículas, lo que produce finalmente un equilibrio entre la velocidad de colisión y la velocidad de rompimiento de las partículas en estas condiciones de procesamiento (Gul *et al.*, 2018). La sonicación se encuentra dentro de los métodos denominados de alta intensidad, en los cuales se utilizan dispositivos mecánicos para romper y mezclar las fases de aceite y agua (McClements y Jafari, 2018). En dicho proceso, la propagación de ondas ultrasónicas de alta intensidad a través del líquido conduce a la producción de microburbujas oscilantes que colapsan violentamente generando intensas fuerzas de cavitación que rompen las partículas más grandes (Gharibzahedi y Jafari, 2018). El efecto de “sobre-procesamiento” se ha atribuido a una mayor proximidad entre las partículas en los nodos y antinodos del campo acústico debido a las fuerzas de radiación ultrasónica (Kentish *et al.*, 2008).

6.4.2. Potencial ζ y pH

En el Cuadro 8 se presentan los valores de potencial ζ y pH de las NEs de AEO. En general, el potencial ζ de las NEs varió de -26.96 ± 2.11 a -20.73 ± 0.77 mV. Ambos factores evaluados

(concentración de AEO y ts) fueron estadísticamente significativos sobre dicho parámetro sin haber una interacción entre ellos (apéndice 3). Se observa primeramente que no existe diferencia significativa entre el potencial ζ de las NEs sin tratamiento de sonicación con distinta concentración de AEO (tratamiento 1, 4 y 7). Además, al aplicar el tratamiento de sonicación tampoco existe diferencia significativa sobre dicho parámetro en cada nivel de AEO. Con respecto al pH, se observa que existe un ligero decremento de éste parámetro cuando existe una mayor cantidad de AEO en la NE, lo que se atribuye principalmente al incremento de ácidos orgánicos presentes en el AEO (Hernández-Hernández *et al.*, 2014).

El potencial ζ es una medida indirecta de la estabilidad física de una emulsión, en donde se considera que cuando las partículas tienen un potencial ζ grande (>30 mV) ya sea negativo o positivo hace que éstas se repelen y como consecuencia la emulsión es estable. Lo anterior, se debe a que la agregación de las partículas es reducida porque se considera que la carga eléctrica de las éstas es lo suficientemente fuerte para asumir que las fuerzas repulsivas entre ellas son predominantes en el sistema (Sabbah *et al.*, 2016). Las características eléctricas de las partículas de la emulsión están determinadas en gran medida por la naturaleza de las sustancias tensoactivas adsorbidas a sus superficies y la composición iónica de la solución circundante (McClements, 2015). En este sentido, el valor negativo obtenido del potencial ζ se atribuye a la presencia de la carga negativa que contiene el almidón oxidado, el cual constituye la fase acuosa de la NE, y en menor medida al T80 ya que se ha reportado que éste es adsorbido en la superficie de la partícula de lipídica generando una carga neutra o ligeramente negativa en la interfase aceite-agua (Salvia-Trujillo *et al.*, 2014).

Como se mencionó anteriormente, el potencial ζ puede ayudar a predecir la estabilidad de las NEs, sin embargo, este parámetro no es relevante para tal finalidad cuando la diferencia entre potenciales es pequeña. Lu y Gao (2010) mencionan que para poder predecir diferencia entre la estabilidad de distintas emulsiones la diferencia entre sus potenciales debe ser de al menos 10 mV. En este caso, la diferencia entre los potenciales ζ obtenidos no es suficiente para diferenciar la estabilidad entre las NEs, pero cabe mencionar que las NEs sin tratamiento de sonicación presentaron una menor estabilidad visual en almacenamiento refrigerado, observándose una ligera presencia de cremado a los tres días de preparación.

Cuadro 8. Potencial ζ y pH de las nanoemulsiones de aceite esencial de orégano mexicano.

Tratamiento	Concentración de AEO (% p/p)	Tiempo de sonicación (s)	Potencial ζ (mV)	pH
1	0.25	0	-25.83 ± 2.14 ^{b c}	6.60 ± 0.05 ^a
2	0.25	120	-23.61 ± 2.60 ^{a b c}	6.59 ± 0.03 ^a
3	0.25	240	-24.64 ± 3.60 ^{a b c}	6.59 ± 0.03 ^a
4	1.0	0	-26.96 ± 2.11 ^c	6.49 ± 0.02 ^b
5	1.0	120	-25.22 ± 1.56 ^{a b c}	6.47 ± 0.01 ^b
6	1.0	240	-24.59 ± 1.41 ^{a b c}	6.39 ± 0.02 ^c
7	2.0	0	-23.94 ± 1.08 ^{a b c}	6.22 ± 0.02 ^d
8	2.0	120	-20.73 ± 0.77 ^a	6.19 ± 0.02 ^d
9	2.0	240	-21.12 ± 1.36 ^{a b}	6.21 ± 0.02 ^d

Los datos se presentan como la media (n=3) \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. Letras diferentes dentro de una columna representan diferencias significativas por la prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$).

6.4.3. Índice de blancura

La concentración de AEO y el ts tuvieron una interacción significativa ($\alpha < 0.05$) sobre el índice de blancura de las NEs (apéndice 4). El índice de blancura fue mayor conforme más AEO estaba presente en las NEs, obteniéndose valores de 41.66 ± 0.05 , 59.50 ± 0.06 y 74.17 ± 0.04 para las NEs sin tratamiento de sonicación con 0.25, 1.0 y 2.0% (p/p) de AEO, respectivamente. La aplicación del tratamiento de sonicación por 120 s en cada nivel de AEO disminuyó dicho parámetro entre 4 y 5 unidades y al extenderse a 240 s se observó un ligero incremento de 1 a 2 unidades (Figura 13). Este comportamiento de aumento en el índice de blancura se observa en todas las proporciones usadas de AEO al incrementar el ts, probablemente debido al “sobrepesamiento” mencionado anteriormente, en el tratamiento. En general, la apariencia percibida (homogeneidad, opacidad y color) de una NE es el resultado de sus interacciones con las ondas de luz (Chung y McClements, 2018) lo que a su vez depende de la concentración, tamaño, índice de refracción y distribución espacial de las gotas (McClements, 2002). En este sentido, al haber una mayor cantidad de AEO en las NEs existe una mayor cantidad de partículas que dispersan luz generando una mayor luminosidad afectando directamente el índice de blancura.

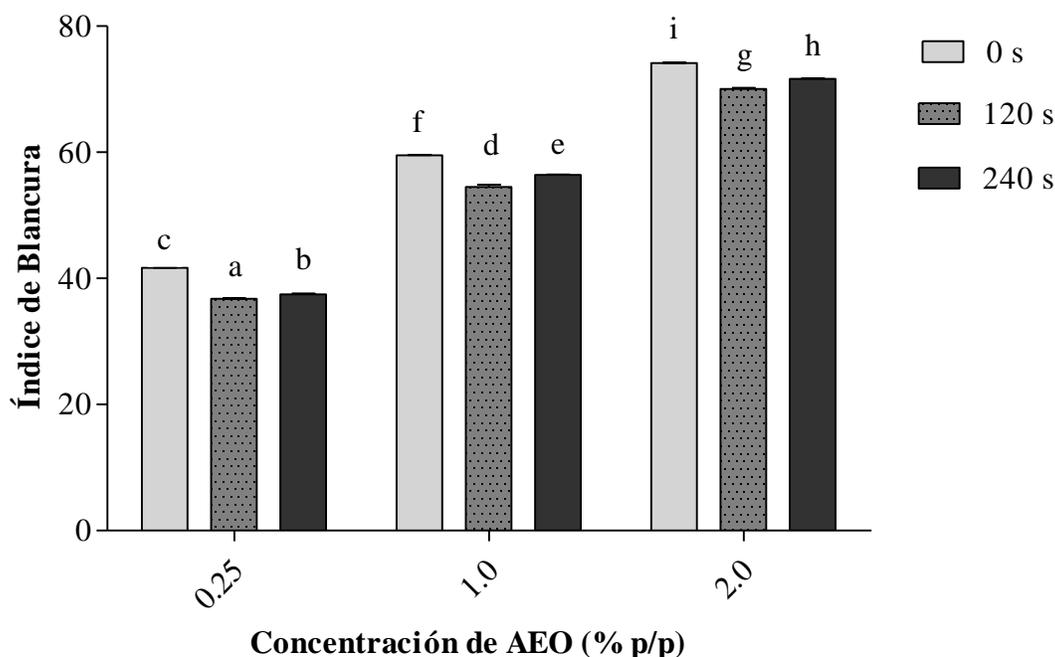


Figura 13. Índice de blancura de nanoemulsiones de aceite esencial de orégano mexicano con distintos tiempos de sonicación.

Los datos se presentan como la media ($n=3$) \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$).

Salvia-Trujillo *et al.* (2013a) reportaron valores de índice de blancura de 28-30 en una NE de aceite esencial de té de limón al 1% (v/v) en una matriz de alginato de sodio con un ts de 120 s a distintas amplitudes, sin embargo, la prolongación del tratamiento a 180 s no presentó diferencia significativa en este valor. Este menor resultado de índice de blancura puede explicarse por el tamaño promedio de partícula en donde dichos autores obtuvieron tamaños entre 5 y 10 nm, siendo estos menores a los obtenidos en este trabajo. Arredondo-Ochoa *et al.* (2017) reportan un índice de blancura de 39 para una NEs de cera de abeja (1% p/p), utilizando T80 como surfactante y 5 minutos de sonicación. Las diferencias pueden deberse al tipo de agente hidrofóbico presente en la fase dispersa, que como anteriormente se mencionó tiene un efecto directo sobre la reducción de tamaño de partícula y por ende, afecta el índice de blancura (Salvia-Trujillo *et al.*, 2014).

Por otro lado, la disminución del tamaño de partícula y obtención de distribuciones de tamaño unimodales en las NEs sonicadas (120 y 240 s) genera menor dispersión de luz provocando la disminución en el índice de blancura observada en cada porcentaje de AEO. McClements y Jafari, (2018) mencionan que la dispersión de luz por las gotas de la NE es débil cuando sus

dimensiones son mucho más pequeñas que la longitud de onda de la luz, lo que genera sistemas ópticamente transparentes. En la Figura 14 se presentan las NEs de cada concentración de AEO evaluada sonicadas 120 s ya que éste ts fue el que obtuvo el menor índice de blancura en cada una. Se observa que la NE de 0.25% (p/p) aún se percibe translúcida mientras que las de 1.0 y 2.0% (p/p) se ven mucho más opacas. El índice de blancura es de gran importancia ya que se pretende que el recubrimiento en el alimento sea imperceptible para el consumidor.



Figura 14. Apariencia de nanoemulsiones de aceite esencial de orégano mexicano obtenidas por sonicación durante 120 s. 0.25% (a), 1.0% (b) y 2.0% (p/p) de AEO (c).

6.4.4. Tensión interfacial líquido-vapor (γ_{LV})

En el Cuadro 9 se presentan los valores obtenidos y corregidos de la tensión superficial de las NEs a una temperatura de 25 °C. Para aplicar la corrección al valor obtenido se multiplicó éste por el factor de corrección correspondiente encontrado en el apéndice 1.

La tensión superficial de las NEs disminuyó conforme la concentración de AEO aumentó, sin embargo, no se observó diferencia estadísticamente significativa en la tensión superficial al aplicar el tratamiento de sonicación en cada concentración de AEO. El único factor significativo ($\alpha < 0.05$) sobre este parámetro fue la concentración de AEO en la NE. La menor tensión superficial obtenida fue en las NEs de 2.0% (p/p) de AEO, con valores de 35.09 ± 0.00 , 35.09 ± 0.00 y 35.27 ± 0.30 mN/m, para los ts de 0, 120 y 240 s, respectivamente.

La tensión interfacial líquido-vapor (γ_{LV}) considera las fuerzas de atracción entre las moléculas del líquido (fuerzas cohesivas) así como la atracción de las moléculas del líquido hacia las moléculas del aire (fuerzas dispersivas asociadas a la presión de vapor del líquido), en donde

se considera que si las primeras son más fuertes que las segundas, el cuerpo del líquido mantendrá su forma, pero si lo opuesto sucede el líquido se esparcirá, maximizando su área de superficie (Petrucci *et al.*, 2017). En este sentido, se considera que la reducción de la tensión superficial de las NEs es deseable ya que se traduce en un mayor esparcimiento y por lo tanto en una mayor capacidad de mojado.

Cuadro 9. Tensión interfacial líquido-vapor de nanoemulsiones de aceite esencial de orégano mexicano.

Tratamiento	Concentración de AEO (% p/p)	Tiempo de sonicación (s)	γ_{LV} sin corrección (mN/m)	γ_{LV} (mN/m)
1	0.25	0	38.67 ± 0.58^a	36.81 ± 0.58^a
2	0.25	120	38.67 ± 0.58^a	36.81 ± 0.58^a
3	0.25	240	38.67 ± 0.58^a	36.81 ± 0.58^a
4	1.0	0	37.67 ± 0.58^{ab}	35.79 ± 0.60^{ab}
5	1.0	120	37.67 ± 0.58^{ab}	35.79 ± 0.60^{ab}
6	1.0	240	37.83 ± 0.29^{ab}	35.96 ± 0.30^{ab}
7	2.0	0	37.00 ± 0.00^b	35.09 ± 0.00^b
8	2.0	120	37.00 ± 0.00^b	35.09 ± 0.00^b
9	2.0	240	37.00 ± 0.29^b	35.27 ± 0.30^b

Los datos se presentan como la media (n=3) \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. Letras diferentes dentro de una columna representan diferencias significativas por la prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$).

Al aumentar la cantidad de AEO en las NEs existe también una mayor cantidad de surfactante (T80), a lo cual se le atribuye el ligero decremento observado en la tensión superficial. Los surfactantes, como el polisorbato 80 (T80), cuando están presentes en bajas concentraciones, tienen la capacidad de adsorberse en las superficies o interfaces del sistema, reduciendo la tensión superficial significativamente (Rosen y Kunjappu, 2012). La estructura anfifílica de los surfactantes es la responsable de su tendencia a concentrarse en las interfaces; en particular, el T80 es un tensoactivo alifático no iónico derivado del sorbitán polietoxilado y ácido oleico, el cual tiene una región no polar formada por los residuos alifáticos de los hidrocarburos y regiones polares formadas por los grupos polioxietileno unidos al sorbitán (Möbius *et al.*, 2001; Krstonošić *et al.*, 2019). Kumar y Mandal (2018) demostraron la mayor capacidad del T80, en comparación con otros surfactantes (dodecilsulfato sódico y bromuro de hexadeciltrimetilamonio), para reducir

la tensión superficial en NEs de aceite en agua, lo cual es de gran importancia porque esto promueve el proceso de emulsificación.

Valores similares de tensión superficial de NEs han sido reportados en otros estudios; Arredondo-Ochoa *et al.* (2017) encontraron valores de 25.8 mN/m para una NE de cera de abeja 1% (p/p), con T80 como surfactante en una concentración de 2.5% (p/p) obtenida por sonicación. Por otra parte, Teixeira *et al.* (2017), en otro estudio sobre NEs de D- α -tocoferol y triglicéridos, con T80 como surfactante (1.5% p/v) y lecitina de soya hidrogenada como co-surfactante (0.5% p/v) obtuvieron valores entre 20.1 y 24.3 mN/m con distintas concentraciones de los componentes lipídicos. Es importante mencionar que todos los componentes dentro de la NE tienen un efecto sobre la tensión superficial.

6.4.5. Ángulo de contacto sobre pimiento morrón

Los ángulos de contacto (θ) formados al colocar cada una de las NEs sobre la superficie de pimiento morrón se presentan en el Cuadro 10, así como el coseno de dicho ángulo. El ángulo de contacto se define como el ángulo formado en la intersección de la interfase líquido-sólido y la interfase líquido-vapor (obtenido geoméricamente aplicando una línea tangente desde el punto de contacto a lo largo de la interfaz líquido-vapor en el perfil de la gota) (Yuan y Lee, 2013). En el apéndice 5 se presentan imágenes de gotas de nanoemulsión de AEO formando el ángulo de contacto sobre la superficie de pimiento morrón, demostrando el uso del software “Drop Shape Analysis”.

Todos los ángulos obtenidos son menores a 48.23°, y se observa una tendencia a disminuir conforme la cantidad de AEO aumenta en la NE. Los dos factores evaluados (concentración de AEO y t_s) fueron estadísticamente significativos (apéndice 6), sin haber una interacción entre estos. Todos los ángulos de contacto son agudos, menores a 90°, lo que indica una capacidad de mojado entre razonable y buena de estas NEs (Koopal, 2008), sin embargo, es importante resaltar que el menor ángulo de contacto se encontró en las NEs con 2.0% (p/p) de AEO, por lo que éstas serían más adecuadas para aplicar como recubrimiento en pimiento morrón.

El ángulo de contacto está determinado por una combinación de tensión superficial y fuerzas externas (usualmente gravedad), en donde se considera que el ángulo de contacto es característico de un sistema sólido-líquido en un ambiente en específico (Yuan y Lee, 2013). La disminución del ángulo de contacto conforme incrementa la cantidad de AEO en las NEs se

atribuye a la disminución de la tensión superficial de éstas y a una mayor afinidad entre éstas y la superficie hidrófoba del fruto debido a que contienen una mayor cantidad de componentes lipídicos. La superficie del pimiento morrón se considera hidrofóbica ya que como muchas plantas y frutos contiene una capa epicuticular de cera constituida por hidrocarburos de cadena larga, ácidos alcanoicos, amirina, lupeol, entre otros (Bauer *et al.*, 2005).

Cuadro 10. Ángulo de contacto (θ) de nanoemulsiones de aceite esencial de orégano mexicano sobre superficie de pimiento morrón.

Tratamiento	Concentración de AEO (% p/p)	Tiempo de sonicación (s)	θ (°)	Coseno de θ
1	0.25	0	48.23 ± 1.15 ^a	0.66
2	0.25	120	46.60 ± 1.84 ^{a b}	0.70
3	0.25	240	47.40 ± 2.23 ^{a b c}	0.70
4	1.0	0	43.77 ± 2.32 ^{a b c d}	0.71
5	1.0	120	42.29 ± 2.45 ^{b c d}	0.75
6	1.0	240	41.70 ± 1.21 ^{c d}	0.75
7	2.0	0	39.13 ± 2.07 ^{d e}	0.78
8	2.0	120	36.23 ± 0.25 ^{e f}	0.80
9	2.0	240	33.60 ± 2.00 ^f	0.82

Los datos se presentan como la media (n=3) ± desviación estándar de tres experimentos independientes. Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$).

6.4.6. Tensión superficial crítica del pimiento morrón

Los ángulos de contacto obtenidos al colocar distintos líquidos de referencia en la superficie del pimiento morrón se presentan en el Cuadro 11, así como la tensión superficial obtenida de tablas de constantes físicas de cada uno y la tensión superficial crítica del pimiento morrón. Ésta última se obtuvo mediante el método gráfico de Zisman (1964), extrapolando hasta coseno de θ igual a 1 (apéndice 7).

De acuerdo con el método de Zisman, la tensión superficial crítica es la tensión superficial que debe tener un líquido para humedecer completamente a determinado sólido. La tensión superficial crítica obtenida para la superficie de pimiento morrón fue de 13.78 mN/m, este valor es cercano al reportado por Arredondo-Ochoa *et al.* (2017) y Sánchez-Ortega *et al.*, (2016) de 15

mN/m para superficie de tomate, el cual es un fruto de la misma familia y tiene igualmente una superficie hidrofóbica formada por una capa cerosa.

Cuadro 11. Ángulo de contacto de distintos líquidos de referencia en superficie de pimiento morrón.

Líquido de referencia	Tensión superficial teórica (mN/m)	Ángulo de contacto (θ)	Coseno de θ	Tensión superficial crítica (mN/m)
Agua	72.35	81.95 \pm 1.64	0.14	
Formamida	57.70	66.33 \pm 5.12	0.40	
Etilenglicol	47.70	60.15 \pm 2.02	0.50	13.78
Propilenglicol	37.49	47.78 \pm 0.90	0.67	
Metanol	22.61	30.35 \pm 2.09	0.86	

Fernández y Khayet (2015) encontraron un ángulo de contacto con agua de 83.39° en superficie de pimiento morrón rojo (cv. Genil) lo que corresponde con el valor obtenido. El método de Zisman considera que los ángulos de contacto en una superficie de baja energía van disminuyendo conforme disminuye la tensión superficial de éstos (David y Neumann, 2014), comportamiento que se observa en los resultados obtenidos.

6.4.7. Coeficiente de mojabilidad

En el Cuadro 12 se presentan las fuerzas adhesivas, fuerzas cohesivas y coeficientes de mojabilidad de las NEs de AEO. El coeficiente de mojabilidad determina si el esparcimiento espontáneo del recubrimiento ocurrirá sobre la superficie del alimento; en donde se considera que si el trabajo de adhesión es mayor que el trabajo de cohesión entonces la asociación entre las moléculas del recubrimiento líquido y la superficie sólida será mayor que las fuerzas dentro del recubrimiento líquido permitiendo el esparcimiento espontáneo (Florio y Miller, 2004). En el caso contrario, si las fuerzas cohesivas son más fuertes que las fuerzas adhesivas ($W_s < 0$) el líquido tiende a formar gotas en la superficie lo que corresponde a un mojado parcial (Arredondo-Ochoa *et al.*, 2017; Skurtys *et al.*, 2011). Sin embargo, en este caso las fuerzas adhesivas van aumentando conforme existe más AEO en las NEs y las fuerzas cohesivas van disminuyendo lo que a su vez mejora el coeficiente de mojabilidad.

Los dos factores estudiados fueron significativos ($\alpha < 0.05$) sin haber una interacción entre éstos (apéndice 8). El valor más bajo obtenido de coeficiente de mojabilidad fue de -12.29 ± 0.39 mN/m para la NE sin sonicación con 0.25% (p/p) de AEO, y el valor más alto fue de -5.91 ± 0.74 mN/m para la NE sonicada 240 s con 2.0% (p/p) de AEO. Arredondo-Ochoa *et al.* (2017) obtuvieron un valor de -7.3 ± 0.6 mN/m para el coeficiente de mojabilidad de una NE sonicada de cera de abeja 1% (p/p) con almidón oxidado, el cual se encuentra cercano al valor obtenido.

Cuadro 12. Fuerzas adhesivas (Wa), fuerzas cohesivas (Wc) y coeficiente de mojabilidad (Ws) de nanoemulsiones de aceite esencial de orégano mexicano.

Tratamiento	Wa (mN/m)	Wc (mN/m)	Ws (mN/m)
1	61.33 ± 1.48^a	73.62 ± 1.17^a	-12.29 ± 0.39^a
2	62.10 ± 1.65^{ab}	73.62 ± 1.17^a	-11.52 ± 0.75^{abc}
3	61.71 ± 0.81^{ab}	73.62 ± 1.17^a	-11.91 ± 1.20^{ab}
4	61.61 ± 0.42^{ab}	71.58 ± 1.20^{ab}	-9.97 ± 1.15^{bcd}
5	62.25 ± 1.70^{ab}	71.58 ± 1.20^{ab}	-9.33 ± 0.98^{cd}
6	62.82 ± 1.03^{ab}	71.93 ± 0.60^{ab}	-9.11 ± 0.43^d
7	62.30 ± 0.80^{ab}	70.19 ± 0.00^b	-7.88 ± 0.80^{de}
8	63.40 ± 0.09^{ab}	70.19 ± 0.00^b	-6.79 ± 0.09^e
9	64.63 ± 0.22^b	70.54 ± 0.60^b	-5.91 ± 0.74^e

Los datos se presentan como la media (n=3) \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. Letras diferentes dentro de una columna representan diferencias significativas por la prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$).

Los tratamientos corresponden a los descritos en el Cuadro 4.

Se observa que el coeficiente de mojabilidad es más cercano a cero cuando incrementa la cantidad de AEO en la NE. Esto se explica por el incremento de las fuerzas adhesivas derivado de la disminución del ángulo de contacto a pesar de la disminución de la tensión superficial de las NEs. Aunado a esto, se observa la disminución de las fuerzas cohesivas por la disminución de la tensión superficial de las NEs cuando existe más AEO. Ya que el coeficiente de mojabilidad depende de estas dos fuerzas se observa la disminución en este parámetro. Se ha reportado que la adición de surfactante reduce las fuerzas de cohesión al reducir la tensión superficial y, por lo tanto, mejora la mojabilidad de recubrimientos comestibles (Carneiro-da-Cunha *et al.*, 2009). La afinidad entre el alimento y el recubrimiento es fundamental en el diseño de éste, en donde se tiene que tomar en cuenta la propagación efectiva de un recubrimiento sobre el alimento, la cual está

muy influida por la mojabilidad de la superficie por el recubrimiento (Osorio *et al.*, 2017). En este sentido, tener una concentración de 2.0% (p/p) de AEO en la NE proporciona una mejor afinidad con la superficie del pimiento morrón.

6.5. Microscopia electrónica de transmisión de nanoemulsiones

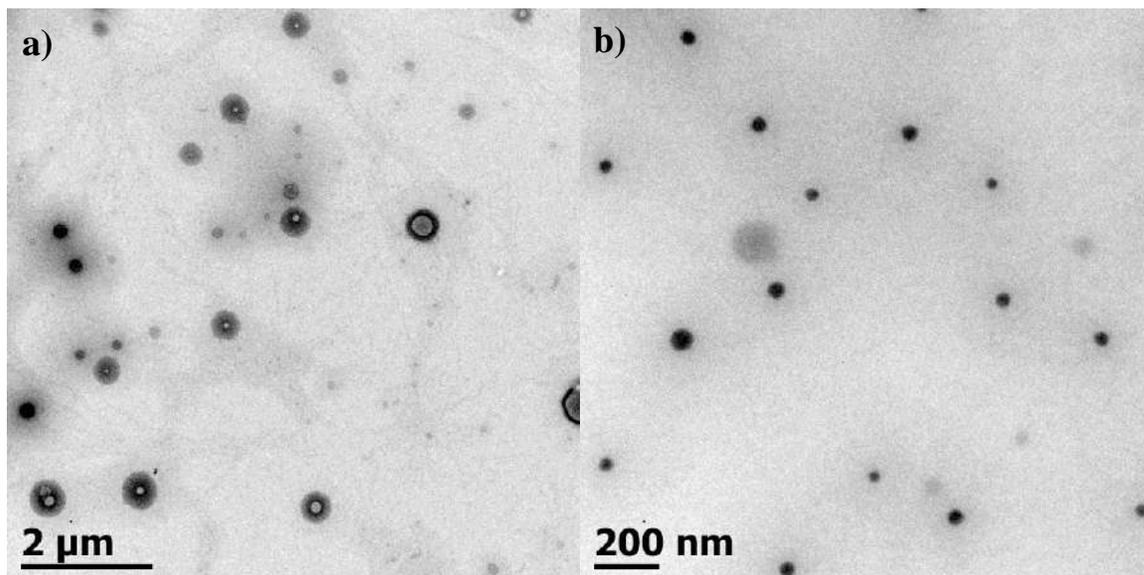


Figura 15. Microscopia electrónica de transmisión de nanoemulsiones de 2.0% (p/p) de aceite esencial de orégano mexicano. Sin tratamiento de sonicación (a) y sonicadas por 120 s (b).

Las observaciones por microscopia electrónica de transmisión (TEM) de las NEs se realizaron para confirmar los hallazgos encontrados anteriormente mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (6.4.1). En la micrografía de la NE de 2.0% (p/p) de AEO sin tratamiento de sonicación (figura 15a) se observan partículas con diámetro de 540 a 80 nm mientras que en la micrografía de la NE de 2.0% (p/p) sonicada 120 s (figura 15b) se observan diámetros de partícula de 75 a 35 nm, resaltando principalmente los menores tamaños y mayor homogeneidad de las partículas en la segunda.

Las imágenes aparecen como partículas negras en un fondo blanco lo que ha sido reportado anteriormente mediante ésta técnica de tinción en otras nanoemulsiones (Arredondo-Ochoa *et al.*, 2017; Salvia-Trujillo *et al.*, 2013b), en donde este efecto se atribuye a distinta afinidad de los agentes de tinción con los componentes interfaciales de las partículas en la NE.

6.6. Actividad antifúngica de NEs de AEO contra *C. gloeosporioides*

La actividad antimicrobiana de las NEs de AEO fue evaluada mediante la técnica de difusión en agar. El diámetro de la zona de inhibición obtenida contra *C. gloeosporioides* se presenta en el Cuadro 13. Se observa principalmente que únicamente con 2.0% (p/p) hubo inhibición de dicho microorganismo.

Cuadro 13. Diámetro de zona de inhibición de nanoemulsiones de aceite esencial de orégano mexicano contra *C. gloeosporioides*.

Tratamiento	Concentración de AEO (% p/p)	Tiempo de sonicación (s)	Zona de inhibición (mm)
1	0.25	0	0.00 ^b
2	0.25	120	0.00 ^b
3	0.25	240	0.00 ^b
4	1.0	0	0.00 ^b
5	1.0	120	0.00 ^b
6	1.0	240	0.00 ^b
7	2.0	0	12.38 ± 1.03 ^a
8	2.0	120	13.25 ± 0.87 ^a
9	2.0	240	13.50 ± 0.71 ^a

Los datos se presentan como la media (n=3) ± desviación estándar de tres experimentos independientes. Letras diferentes dentro de una columna representan diferencias significativas por la prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$).

Es importante mencionar que en las NEs con 1.0% (v/v) de AEO se observó un efecto fungistático ya que a los dos días de incubación se observó un halo de inhibición, pero hubo crecimiento dentro de éste a los tres días de incubación (Figura 13c), mientras que en 2.0% de AEO no se observó ninguna colonia dentro del halo (Figura 13d). La efectividad de los agentes antimicrobianos generalmente se reduce cuando se incorpora a recubrimientos comestibles debido a la presencia de otros compuestos diferentes en comparación con las pruebas *in vitro* (Arredondo Ochoa *et al.*, 2016).

A pesar de que se ha reportado un incremento en la actividad antimicrobiana de NEs atribuido a su pequeño tamaño de partícula (Salvia-Trujillo *et al.*, 2014; Donsì *et al.*, 2011), en este caso las NEs con 2.0% (p/p) de AEO sonicadas parecen presentar un mayor halo de inhibición

que las NEs sonicadas con esta concentración de AEO, sin embargo, la diferencia no fue significativa probablemente debido que las diferencias entre los tamaños promedio de partícula de tales nanoemulsiones son menores que las que se reportan en dichos trabajos.

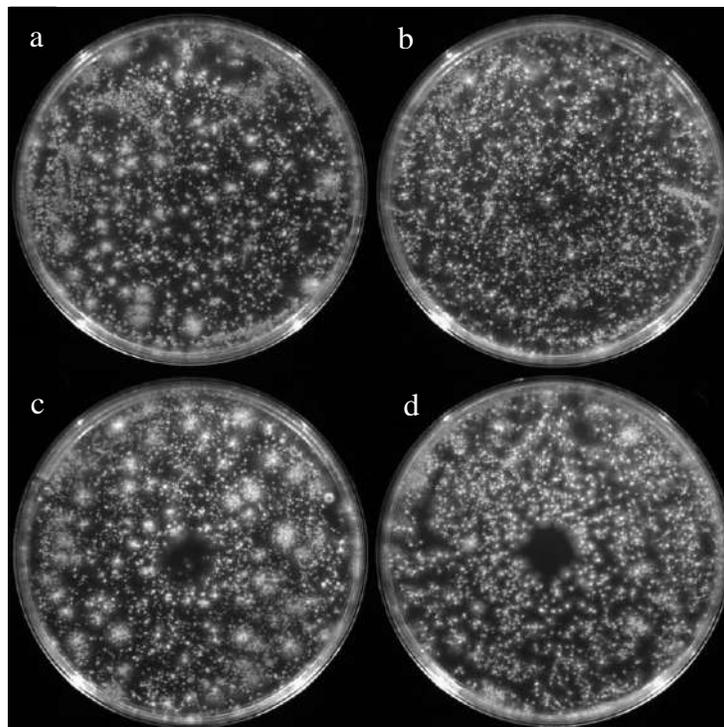


Figura 16. Actividad antimicrobiana de nanoemulsiones de aceite esencial de orégano mexicano contra *C. gloeosporioides*. Control negativo (a), 0.25% (b), 1.0% (c) y 2.0% (d) de AEO con un tiempo de sonicación de 120 s.

6.7. Evaluación del efecto de la aplicación de la NE como recubrimiento comestible en la calidad poscosecha de pimiento morrón

Se aplicó como recubrimiento comestible la NE de 2.0% (p/p) de AEO sonicada durante 120 s en pimiento morrón rojo siguiendo lo descrito en el punto 5.2.6.2. Se eligió esta NE debido a que dicha concentración de AEO presentó inhibición contra el microorganismo de interés, y dicho tiempo de sonicación disminuyó y homogenizó el tamaño de partícula, disminuyó el índice de blancura y mejoró el ángulo de contacto y coeficiente de mojabilidad.

6.7.1. Pérdida de peso

En la Figura 17 se presenta la pérdida de peso del fruto recubierto y control a través del tiempo de almacenamiento. Al final del tiempo de almacenamiento los frutos con recubrimiento presentaron un porcentaje de pérdida de peso de 3.33 ± 0.39 %, mientras que el control presentó

un porcentaje de pérdida de peso de 2.93 ± 0.11 % (Figura 17). Sin embargo, la pérdida de peso del fruto recubierto no fue significativamente diferente ($\alpha < 0.05$) a la pérdida del fruto control (apéndice 9). El porcentaje de pérdida de peso obtenido se encuentra dentro de lo reportado por Poverenov *et al.* (2014) para pimientos morrones mantenidos a 7 °C por 14 días y luego 5 días a 20 °C con distintos recubrimientos. Otros autores (Lerdthanangkul y Krochta, 1996; Ochoa-Reyes *et al.*, 2013) reportan mayores porcentajes de pérdida de peso para dicho fruto, sin embargo, se utilizaron mayores temperaturas de almacenamiento para esos estudios.

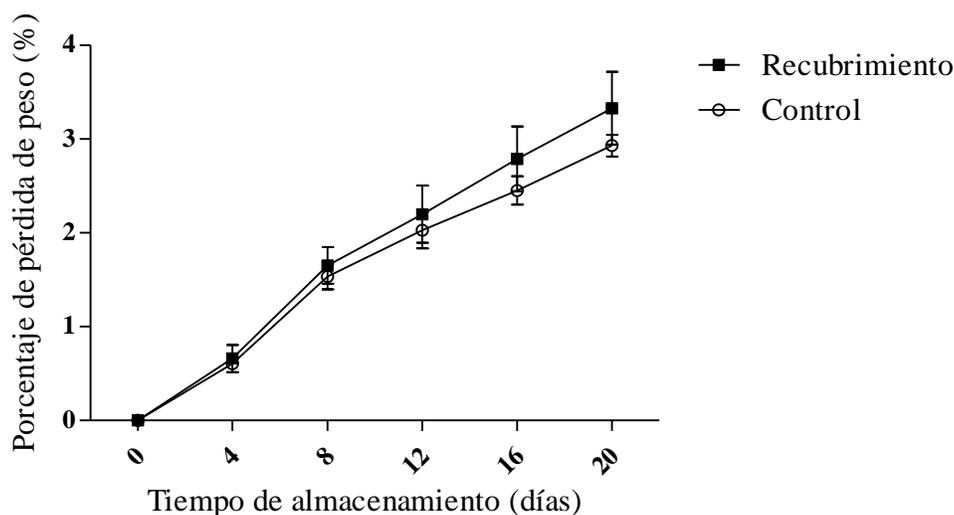


Figura 17. Porcentaje de pérdida de peso de pimiento morrón control y con recubrimiento durante 20 días de almacenamiento a 7 °C.

La migración de agua del fruto hacia el medio ambiente es la causa principal de la pérdida de peso durante el almacenamiento (Mohebbi *et al.*, 2014), por lo que es de gran importancia considerar las propiedades de barrera al vapor de agua del recubrimiento (Pavlath y Orts, 2009). Se ha reportado que la presencia de compuestos lipídicos como aceites esenciales en películas comestibles disminuye la permeabilidad al vapor de agua (PVA), el cual es un parámetro directamente relacionado con la pérdida de agua en el fruto (Galus y Kadzińska, 2015; Escamilla-García *et al.*, 2017). Sin embargo, Acevedo-Fani *et al.* (2015) reportaron que películas comestibles a base de quitosano incorporadas con aceites esenciales no presentaron diferencias significativas con el control (sin aceite esencial) con respecto a la PVA probablemente debido a la baja concentración de aceite utilizado (1.0% v/v). En este caso, es posible que la cantidad de AEO, que representa la fase hidrofóbica del recubrimiento comestible, no haya sido suficiente para presentar un efecto en el transporte de vapor de agua durante el almacenamiento del fruto. Se recomienda

realizar las mediciones de PVA de los recubrimientos utilizados para poder comparar dicho valor. Generalmente el ablandamiento, aumento de la flacidez pérdida de turgencia en el fruto son algunos de los síntomas asociados con la pérdida de humedad (Nunes, 2008) por lo que también es de gran importancia evaluar la textura de los pimientos durante el almacenamiento como se ha hecho en otros estudios (Lerdthanangkul y Krochta, 1996; Poverenov *et al.*, 2014).

6.7.2. Evaluación de color

En la Figura 18 se presenta el parámetro de tono (hue) del fruto control y con recubrimiento a través del tiempo de almacenamiento.

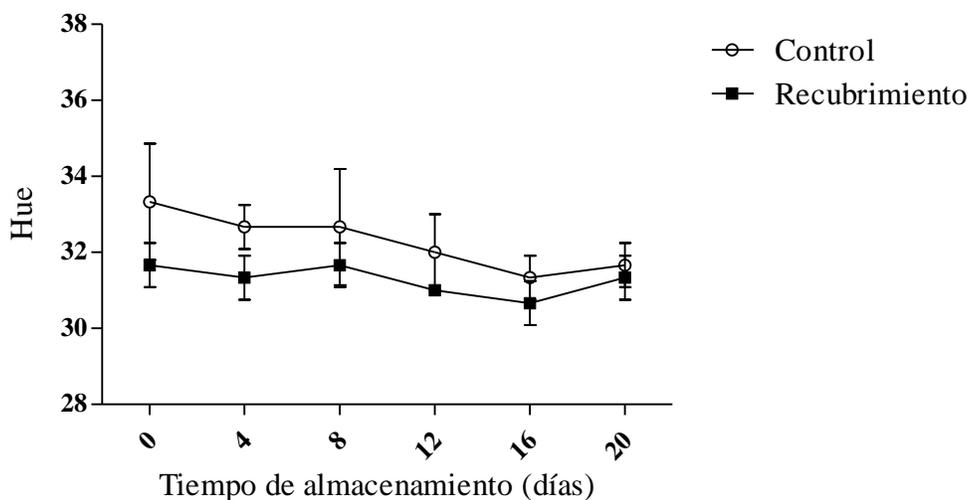


Figura 18. Parámetro de tono (hue) de pimiento morrón control y con recubrimiento durante 20 días de almacenamiento a 7 °C.

El ángulo hue de los pimientos control se mantuvo entre 31 y 33° durante el almacenamiento y el de los pimientos con recubrimiento entre 30 y 33°, por lo que la variación en dicho parámetro se consideró insignificante ya que los cambios de color reportados durante la maduración de pimiento morrón rojo son de mayor magnitud, sin embargo, se encuentran dentro de lo reportado para un tono totalmente rojo (Tadesse *et al.*, 2002).

Un ángulo hue de 0° representa un tono rojo puro mientras que uno de 180° representa un tono verde puro (Lerdthanangkul y Krochta, 1996); se ha reportado que dicho parámetro va disminuyendo durante la maduración del fruto lo que corresponde a una disminución de clorofila y un incremento en la síntesis de carotenoides (Pretel *et al.*, 1995). En este caso, los frutos evaluados no presentaron un cambio en el ángulo hue probablemente debido a que cuando se aplicó

el recubrimiento ya se presentaba un color rojo total en la superficie y los veinte días de evaluación no fueron suficientes para observar un cambio.

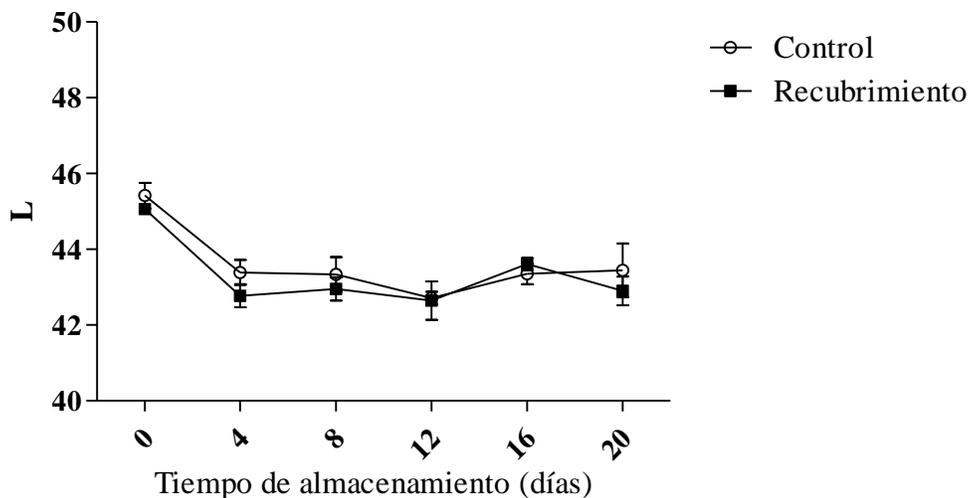


Figura 19. Parámetro L de pimiento morrón control y con recubrimiento durante 20 días de almacenamiento 7 °C.

El parámetro L de los pimientos control y recubiertos fue igual para ambos tratamientos a lo largo del tiempo de almacenamiento. Se observó una ligera disminución de (45.22 a 43.15) del día cero al día cuatro y se mantuvo constante a partir del cuarto día (Figura 19). El parámetro L está relacionado con la luminosidad del fruto, en donde colores pálidos tienen mayor luminosidad que colores oscuros (Lozano, 2006), la disminución observada en el cuarto día se atribuye a posibles cambios estructurales en el fruto durante la refrigeración sin embargo, es necesario realizar más experimentos para poder explicar dicho comportamiento.

6.7.3. Parámetros bioquímicos

6.7.3.1. Sólidos solubles totales (SST)

En el Cuadro 14 se presentan los sólidos solubles totales expresados como ° Brix del jugo de pimiento control y con recubrimiento a través del tiempo de almacenamiento. Los SST se mantuvieron en 7.36 ± 0.82 y 7.32 ± 0.79 ° Brix para el fruto control y el recubierto, respectivamente, sin haber diferencias significativas entre estos (apéndice 11), ni haber diferencias en dicho parámetro a través del tiempo Sin embargo, los resultados concuerdan con lo reportado por Poverenov *et al.* (2014) para pimientos morrones rojos con recubrimientos a base de quitosano-gelatina.

Se ha reportado que un incremento en sólidos solubles está relacionado con una acumulación de hexosas durante la maduración del fruto (Tadesse *et al.*, 2002). Es posible que los frutos utilizados para este experimento hayan tenido distinto grado de maduración al momento de aplicarles el recubrimiento debido a los valores obtenidos para SST en el día 0 y a la dispersión de los datos en cada medición. Es recomendable en este caso hacer una selección más homogénea del fruto en cuanto a su etapa de madurez o bien, considerar utilizar un grado de madurez menor al aplicar el recubrimiento e incrementar el tamaño de la unidad experimental, en donde se ha reportado por ejemplo para la variable respuesta *masa de fruto fresco* en pimiento morrón un tamaño óptimo de unidad experimental de 10 frutos (Lucio y Sari, 2017). Se tendría así una mayor precisión experimental al analizar los datos obtenidos y sería posible evidenciar diferencias entre el tratamiento y el control.

Cuadro 14. Sólidos solubles totales del jugo de pimiento morrón control y con recubrimiento durante 20 días de almacenamiento a 7 °C.

Tiempo de almacenamiento (días)	Sólidos solubles totales (° Brix)	
	Control	Recubrimiento
0	6.95 ± 1.02 ^{Aa}	7.87 ± 0.56 ^{Aa}
4	7.28 ± 0.62 ^{Aa}	7.22 ± 1.37 ^{Aa}
8	7.50 ± 0.61 ^{Aa}	7.25 ± 0.54 ^{Aa}
12	7.28 ± 1.40 ^{Aa}	7.62 ± 1.10 ^{Aa}
16	7.78 ± 1.14 ^{Aa}	6.85 ± 0.26 ^{Aa}
20	7.35 ± 0.31 ^{Aa}	7.13 ± 0.72 ^{Aa}

Los datos se presentan como la media (n=3) ± desviación estándar de tres experimentos independientes. Letras mayúsculas diferentes dentro de una columna representan diferencias significativas por la prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$) en cada tratamiento a través del tiempo.

Letras minúsculas diferentes dentro de una fila representan diferencias significativas por la prueba de t de student ($\alpha < 0.05$) entre tratamientos en cada tiempo.

6.7.3.2. pH y acidez titulable

En la Figura 20a se presenta el pH del pimiento morrón control y con recubrimiento a través del tiempo de almacenamiento evaluado. No se presentaron diferencias en dicho parámetro entre el fruto control y el recubierto (apéndice 12) ni diferencias a través del tiempo. El pH del fruto control fue de 5.29 ± 0.69 y el del fruto recubierto de 5.18 ± 0.12 . Se ha reportado que el pH de pimientos morrones no cambia entre los 14 y 28 días de almacenamiento a 8 °C (González-

Aguilar *et al.*, 1998) por lo que posiblemente es necesario incrementar el tiempo de evaluación del recubrimiento.

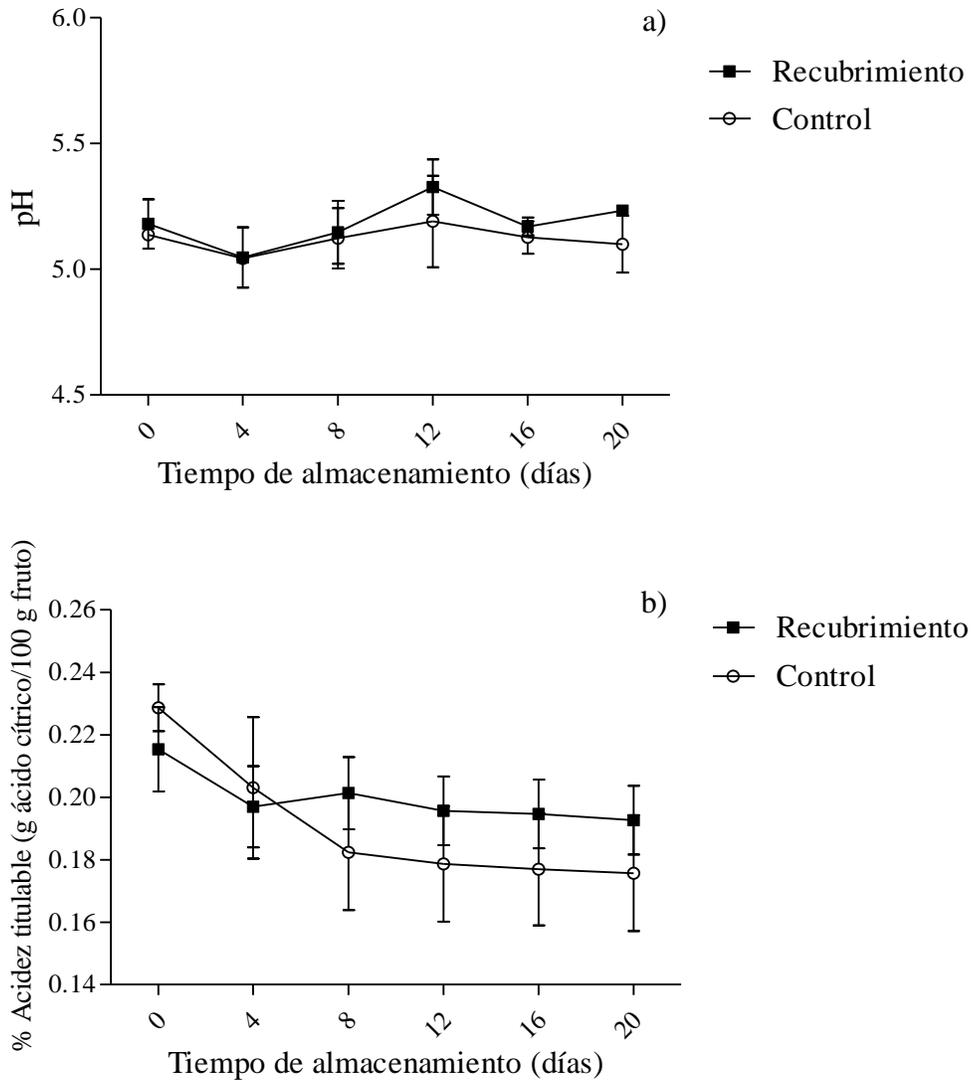


Figura 20. pH (a) y acidez titulable (b) de pimiento morrón control y con recubrimiento durante 20 días de almacenamiento a 7 °C.

En la Figura 20b se presenta el porcentaje de acidez titulable expresada como g de ácido cítrico por 100 g de pimiento morrón control y con recubrimiento a través del tiempo de almacenamiento evaluado. No se presentaron diferencias en dicho parámetro entre el fruto control y el recubierto ni diferencias a través del tiempo. Los resultados similares a lo reportado por Castro *et al.* (2008) para pimientos morrones rojos, ya que el color del fruto afecta dicho parámetro. González-Aguilar *et al.* (1998) observó una disminución de 75% en el porcentaje de acidez

titulable entre el día 14 y 28 de almacenamiento por lo que de igual forma que con el pH es posible que haya sido necesario evaluar por más tiempo los frutos para notar una diferencia significativa en el tiempo. Se ha reportado que la aplicación de recubrimientos comestibles mantiene niveles más altos de porcentaje de acidez, lo cual es importante ya que la disminución de éste está relacionado con procesos de maduración ya que hace la fruta menos ácida y amarga (Ali *et al.*, 2015).

6.7.3.3. Vitamina C

En la Figura 21 se presenta el contenido de vitamina C en el fruto control y con recubrimiento a través del tiempo de almacenamiento evaluado. La vitamina C es uno de los principales componentes nutricionales del pimiento morrón y su contenido aumenta hasta tres veces durante la maduración del fruto verde al fruto rojo (Nunes, 2008) por lo que es de gran importancia en los frutos evaluados.

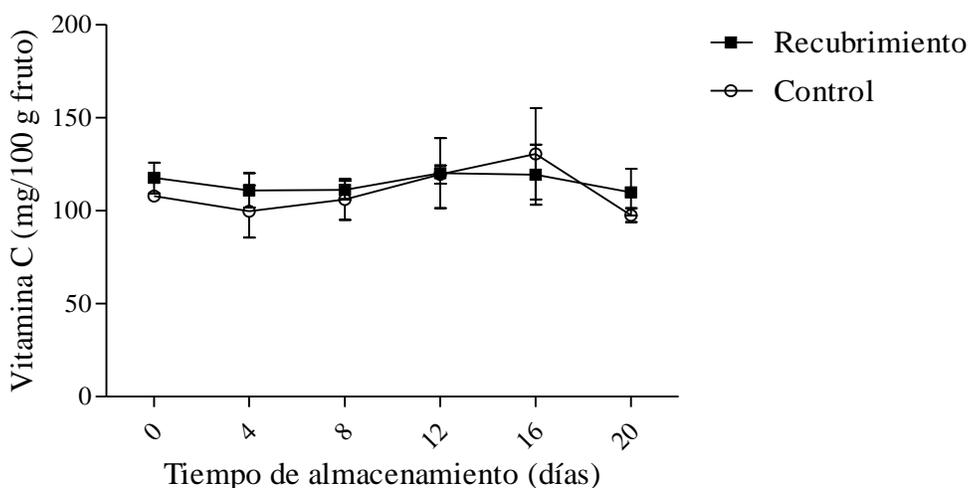


Figura 21. Contenido de vitamina C en pimiento morrón control y con recubrimiento durante 20 días de almacenamiento a 7 °C.

No hubo diferencias en el contenido de vitamina C entre el fruto control y el recubierto ni diferencias a través del tiempo, por lo que la aplicación del recubrimiento no afectó este parámetro. El contenido promedio de vitamina C obtenido para los pimientos (112.59 mg/100 g fruto fresco) se encuentra dentro de lo reportado en otros trabajos para el mismo fruto (Castro *et al.*, 2008). Se ha reportado que el contenido de ácido ascórbico en pimiento no muestra un cambio significativo durante 20 días a 7 °C pero disminuye después de 35 días (González *et al.*, 2005), por lo que

probablemente es necesario alargar el tiempo almacenamiento para poder observar un decremento en este nutrimento.

6.7.4. Cuenta total de hongos y levaduras

En el Cuadro 15 se presenta la cuenta de hongos y levaduras en el pimiento control y con recubrimiento a través del tiempo de almacenamiento. El deterioro microbiano reportado en pimiento morrón es causado principalmente por hongos filamentosos (Ali *et al.*, 2015; Poverenov *et al.*, 2014) debido a esto se realizó la cuenta total de la población de hongos y levaduras durante el almacenamiento del fruto. Se observa que la población fue incrementando a través del tiempo, sin embargo, este aumento no fue significativamente diferente entre tratamientos (apéndice 13).

Cuadro 15. Cuenta total de hongos y levaduras en pimiento morrón control y con recubrimiento durante 20 días de almacenamiento a 7 °C.

Tiempo de almacenamiento (días)	Hongos y levaduras (log UFC/g)	
	Control	Recubrimiento
0	1.59 ± 0.83 ^{A,a}	<1.0 ± 0.00 ^{A,a}
4	2.04 ± 0.42 ^{AB,a}	1.09 ± 0.55 ^{AB,a}
8	3.60 ± 0.13 ^{ABC,a}	1.70 ± 0.56 ^{AB,b}
12	3.80 ± 0.36 ^{B C,a}	2.95 ± 1.34 ^{AB,a}
16	4.24 ± 0.43 ^{C,a}	2.82 ± 1.10 ^{AB,a}
20	4.42 ± 0.63 ^{C,a}	3.91 ± 0.57 ^{B,a}

Los datos se presentan como la media (n=3) ± desviación estándar de tres experimentos independientes. Letras mayúsculas diferentes dentro de una columna representan diferencias significativas por la prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$) en cada tratamiento a través del tiempo.

Letras minúsculas diferentes dentro de una fila representan diferencias significativas por la prueba de t de student ($\alpha < 0.05$) entre tratamientos en cada tiempo.

Se observa una tendencia a haber una mayor cantidad de estos microorganismos en el fruto control, sin embargo, es posible que no se hayan observado diferencias estadísticas debido a la variación entre las réplicas de cada medición. Debido a lo anterior se recomienda ampliamente incrementar el tamaño de la unidad experimental como se menciona en el punto 6.7.3.1. ya que la cantidad de pimientos por unidad experimental reportada en la evaluación de recubrimientos comestibles varía entre 20 y 120 frutos (Poverenov *et al.*, 2014; Xing *et al.*, 2011).

Otra posible causa de la variación entre réplicas es la toma de muestra, en donde ésta se realizó tomando un corte del pedúnculo, cáliz y pericarpio, sin embargo, se ha encontrado que el pedúnculo y cáliz son particularmente susceptibles al ataque de hongos y frecuentemente el punto inicial de infección en pimiento morrón (Russo, 2012). Para homogeneizar la cuenta de estos microorganismos es recomendado recuperar las esporas de toda la superficie del fruto como lo reportaron Escamilla-García *et al.* (2018).

Por otro lado, generalmente se reporta el porcentaje de incidencia de decaimiento por hongos para evaluar la efectividad de recubrimientos comestibles o bien, tratamientos poscosecha en pimiento morrón (Poverenov *et al.*, 2014; Xing *et al.*, 2011; Fallik *et al.*, 1999; González-Aguilar *et al.*, 1998), lo cual es probablemente un parámetro más adecuado desde un punto de vista poscosecha ya que se considera el fruto no apto desde la aparición visual de la enfermedad. En este caso, se recomendaría evaluar si existe una correlación entre la cuenta de hongos y la incidencia de la enfermedad en el fruto.

7. CONCLUSIONES

Se evidenció la actividad antifúngica del aceite esencial de orégano mexicano contra hongos deterioradores de pimiento morrón, encontrándose una concentración mínima inhibitoria contra *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides* de 0.125 y 0.250% (v/v), respectivamente.

Fue posible la obtención de nanoemulsiones incorporando el AEO, extraído en el laboratorio, observándose que la concentración de aceite esencial y el tiempo de sonicación influyen significativamente en las propiedades fisicoquímicas y antimicrobianas de éstas; donde a una concentración de 2.0% (p/p) de AEO y 120 s de sonicación se obtuvo una distribución de tamaño de partícula más homogénea, bajo índice de polidispersión, menor ángulo de contacto y mejor coeficiente de mojado, lográndose mantener su efecto inhibitorio sin afectar su estabilidad, lo que hace que sea una buena alternativa para su aplicación como recubrimiento comestible.

De acuerdo con el valor de la tensión superficial crítica del pimiento morrón (13.78 mN/m), se considera una superficie de baja energía.

La aplicación del recubrimiento comestible diseñado sobre el pimiento morrón no afectó los parámetros de color, sólidos solubles totales, pH, acidez titulable y vitamina C. Sin embargo, no se logró disminuir la pérdida de peso y cuenta total de hongos y levaduras con respecto al fruto control en el tiempo y condiciones de almacenamiento evaluados.

Por lo anterior, es necesario evaluar concentraciones más altas de AEO en el recubrimiento comestible ya que esto podría ayudar tanto a disminuir la pérdida de agua como a la inhibición del crecimiento de hongos en el fruto. Asimismo, sería recomendable incrementar la cantidad de frutos por unidad experimental para disminuir la variación entre réplicas, extender el tiempo de almacenamiento evaluado y aplicar el recubrimiento en frutos con un grado de madurez menor.

El aceite esencial de orégano es considerado como un aditivo generalmente reconocido como seguro, estando presente en el fruto con el recubrimiento comestible en una concentración de 0.02% (p/p).

8. REFERENCIAS

- Abbas, S., Bashari, M., Akhtar, W., Li, W. W., y Zhang, X. (2014). Process optimization of ultrasound-assisted curcumin nanoemulsions stabilized by OSA-modified starch. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(4), 1265–1274. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2013.12.017
- Abbaszadeh, S., Sharifzadeh, A., Shokri, H., Khosravi, A. R., y Abbaszadeh, A. (2014). Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de Mycologie Medicale*, 24(2), e51–e56. DOI: 10.1016/j.mycmed.2014.01.063
- Acevedo-Fani, A., Salvia-Trujillo, L., y Rojas-Graü, M. A. (2015). Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: physicochemical characterization and antimicrobial properties. *Food Hydrocolloids*, 47, 168–177. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.01.032
- Adam, N. K. (1957). Use of the term ‘Young’s equation’ for contact angles. *Nature*, 180, 809–810. DOI: 10.1038/180809a0
- Akhtar, M. S., Degaga, B., y Azam, T. (2014). Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, 2(1), 1–7.
- Ali, A., Bordoh, P. K., Singh, A., Siddiqui, Y., y Droby, S. (2016). Post-harvest development of anthracnose in pepper (*Capsicum* spp): Etiology and management strategies. *Crop Protection*, 90, 132–141. DOI: 10.1016/j.cropro.2016.07.026
- Ali, A., Noh, N. M., y Mustafa, M. A. (2015). Antimicrobial activity of chitosan enriched with lemongrass oil against anthracnose of bell pepper. *Food Packaging and Shelf Life*, 3, 56–61. DOI: 10.1016/j.fpsl.2014.10.003
- Anónimo. (2002). Force Tensiometer – K6 User manual V3-02. Hamburgo, Alemania.
- AOAC. (2012). Official methods of analysis. (19a ed.). Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA, EUA.
- Arevalos-Sánchez, M., Regalado, C., Martín, S. E., Meas-Vong, Y., Cadena-Moreno, E., y García-Almendárez, B. E. (2013). Effect of neutral electrolyzed water on lux-tagged *Listeria*

- monocytogenes* EGDe biofilms adhered to stainless steel and visualization with destructive and non-destructive microscopy techniques. *Food Control*, 34(2), 472–477. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.05.021
- Arredondo-Ochoa, T., García-Almendárez, B. E., Escamilla-García, M., Martín-Belloso, O., Rossi-Márquez, G., Medina-Torres, L., y Regalado-González, C. (2017). Physicochemical and antimicrobial characterization of beeswax – starch food-grade nanoemulsions incorporating natural antimicrobials. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 2712. DOI: 10.3390/ijms18122712
- Arredondo-Ochoa, T., Márquez-Hernández, Y. M., García-Almendárez, B. E., y Regalado-González, C. (2015). Active edible films based on modified corn starch for food applications. En Gutiérrez-López G., Alamilla-Beltrán L., del Pilar Buera M., Welti-Chanes J., Parada-Arias E., y Barbosa-Cánovas G. (eds), *Water Stress in biological, chemical, pharmaceutical and food systems*, (pp. 451–460). Nueva York, NY, EUA: Springer. DOI: 10.1007/978-1-4939-2578-0_39
- Arredondo Ochoa, T., García Almendárez, B. E., Amaro Reyes, A., Rivera Pastrana, D. M., Gutiérrez López, G. F., Martín Belloso, O., y Regalado-González, C. (2016). Design and characterization of corn starch edible films including beeswax and natural antimicrobials. *Food and Bioprocess Technology*, 10, 103–114. DOI: 10.1007/s11947-016-1800-4
- Artiga-Artigas, M., Acevedo-Fani, A., y Martín-Belloso, O. (2017). Improving the shelf life of low-fat cut cheese using nanoemulsion-based edible coatings containing oregano essential oil and mandarin fiber. *Food Control*, 76, 1–12. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.01.001
- Badui Dergal, S. (2013). *Química de los alimentos* (5a ed.). México: Pearson Educación.
- Bansal, V., Siddiqui, M. W., y Rahman, M. S. (2015). Minimally processed foods: Overview. En M. W. Siddiqui y M. S. Rahman (Eds.), *Minimally processed foods: Technologies for safety, quality, and convenience* (pp. 1–15). Londres, Reino Unido: Springer. DOI: 10.1007/978-3-319-10677-9
- Bartz, J. A., y Brecht, J. K. (2003). *Postharvest physiology and pathology of vegetables* (2a ed.). Florida, EUA: Marcel Dekker Inc.

- Bauer, S., Schulte, E., y Thier, H. P. (2005). Composition of the surface waxes from bell pepper and eggplant. *European Food Research and Technology*, 220(1), 5–10. DOI: 10.1007/s00217-004-1046-7
- Bosland, P. W., y Votava, E. J. (2013). Peppers: Vegetable and spice capsicums (2a ed.). Wageningen, Países Bajos: CABI Publishing.
- Burt, S. (2014). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
- Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., y Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control*, 54, 111–119. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.12.040
- Calvo-Irabién, L. M., Parra-Tabla, V., Acosta-Arriola, V., Escalante-Erosa, F., Díaz-Vera, L., Dzib, G. R., y Peña-Rodríguez, L. M. (2014). Phytochemical diversity of the essential oils of Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth) populations along an edapho-climatic gradient. *Chemistry and Biodiversity*, 11(7), 1010–1021. DOI: 10.1002/cbdv.201300389
- Cantwell, M. (2008). Peppers Commodity Storage Manual. World Food Logistics Organization. Arlington, VA, EUA.
- Carneiro-da-Cunha, M. G., Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Souza, M. P., Teixeira, J. A., y Vicente, A. A. (2009). Physical properties of edible coatings and films made with a polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. *Journal of Food Engineering*, 95(3), 379–385. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2009.05.020
- Castro, S. M., Saraiva, J. A., Lopes-da-Silva, J. A., Delgadillo, I., Loey, A. V., Smout, C., y Hendrickx, M. (2008). Effect of thermal blanching and of high pressure treatments on sweet green and red bell pepper fruits (*Capsicum annuum* L.). *Food Chemistry*, 107(4), 1436–1449. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.09.074
- Chung, C., y McClements, D. J. (2018). Characterization of physicochemical properties of nanoemulsions: Appearance, stability, and rheology. En S. M. Jafari y D. J. McClements (Eds.), *Nanoemulsions* (pp. 547–576). Elsevier Ltd. DOI: 10.1016/B978-0-12-811838-

2.00017-5

- Cid-Pérez, T. S., Torres-Muñoz, J. V., Nevárez-Moorillón, G. V., Palou, E., y López-Malo, A. (2015). Chemical characterization and antifungal activity of *Poliomintha longiflora* Mexican oregano. *Journal of Essential Oil Research*, 28(2), 157–165. DOI: 10.1080/10412905.2015.1083490
- Combrinck, S., Regnier, T., y Kamatou, G. P. P. (2011). *In vitro* activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. *Industrial Crops and Products*, 33(2), 344–349. DOI: 10.1016/j.indcrop.2010.11.011
- Daferera, D. J., Ziogas, B. N., y Polissiou, M. G. (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*, 22(1), 39–44. DOI: 10.1016/S0261-2194(02)00095-9
- David, R., y Neumann, A. W. (2014). Contact angle patterns on low-energy surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 206, 46–56. DOI: 10.1016/j.cis.2013.03.005
- De Ancos, B., González-Peña, D., Colina-Coca, C., y Sánchez-Moreno, C. (2015). Uso de películas/recubrimientos comestibles en los productos de IV y V Gama. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 16(1), 8–17. Recuperado el 30 de Octubre del 2018 a partir de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802009000400011&lng=es&tlng=es.
- Donsì, F. (2018). Applications of nanoemulsions in foods. En S. M. Jafari y D. J. McClements (Eds.), *Nanoemulsions* (pp. 349–377). DOI: 10.1016/B978-0-12-811838-2.00011-4
- Donsì, F., Annunziata, M., Sessa, M., y Ferrari, G. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT - Food Science and Technology*, 44(9), 1908–1914. DOI: 10.1016/j.lwt.2011.03.003
- Donsì, F. y Ferrari, G. (2016). Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *Journal of Biotechnology*, 233, 106–120. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.07.005
- Dupré, A. M., y Dupré, P. (1869). *Théorie mécanique de la chaleur*. Paris, Francia: Gauthier-Villars.

- Escamilla-García, M., Calderón-Domínguez, G., Chanona-Pérez, J. J., Mendoza-Madrigal, A. G., Di Pierro, P., García-Almendárez, B. E., Amaro-Reyes, A., y Regalado-González, C. (2017). Physical, structural, barrier, and antifungal characterization of chitosan-zein edible films with added essential oils. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2370. DOI: 10.3390/ijms18112370
- Escamilla-García, M., Rodríguez-Hernández, M., Hernández-Hernández, H., Delgado-Sánchez, L., García-Almendárez, B., Amaro-Reyes, A. y Regalado-González, C. (2018). Effect of an edible coating based on chitosan and oxidized starch on shelf life of *Carica papaya* L., and its physicochemical and antimicrobial properties. *Coatings*, 8(9), 318. DOI: 10.3390/coatings8090318
- Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A., y Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science and Technology*, 22(6), 292–303. DOI: 10.1016/j.tifs.2011.02.004
- Fallik, E., Grinberg, S., Alkalai, S., Yekutieli, O., Wiseblum, A., Regev, R., Beres, H., y Bar-Lev, E. (1999). A unique rapid hot water treatment to improve storage quality of sweet pepper. *Postharvest Biology and Technology*, 15(1), 25–32. DOI: 10.1016/S0925-5214(98)00066-0
- FAO. (2014a). FAOSTAT. Recuperado el 30 de Octubre del 2018 a partir de <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
- FAO. (2014b). Necesidades Nutricionales. Recuperado el 30 de Octubre del 2018 a partir de <http://www.fao.org/docrep/014/am401s/am401s03.pdf>
- Fernández, V., y Khayet, M. (2015). Evaluation of the surface free energy of plant surfaces: Toward standardizing the procedure. *Frontiers in Plant Science*, 6(510), 1–11. DOI: 10.3389/fpls.2015.00510
- Flores Meza, A., Trejo Márquez, M. A., Lira Vargas, A. A., y Pascual Bustamante, S. (2016). Aplicación de extractos naturales de eucalipto y orégano como antifúngicos en el desarrollo de un envase activo para productos vegetales. *Investigación y desarrollo en ciencia y tecnología de alimentos*, 1(2), 242–248. Recuperado el 30 de Octubre del 2018 a partir de <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/2/2/43.pdf>

- Florio, J. J., y Miller, D. J. (2004). Handbook of coating additives (2a ed.). Boca Ratón, EUA: CRC Press.
- Galus, S., y Kadzińska, J. (2015). Food applications of emulsion-based edible films and coatings. *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 273–283. DOI: 10.1016/j.tifs.2015.07.011
- Gharibzahedi, S. M. T., y Jafari, S. M. (2018). Fabrication of nanoemulsions by ultrasonication. En S. M. Jafari y D. J. McClements (Eds.), *Nanoemulsions* (pp. 233–285). Elsevier Ltd. DOI: 10.1016/B978-0-12-811838-2.00009-6
- Gómez-Sánchez, A., Palou, E., y López-Malo Vigil, A. (2011). Antifungal activity evaluation of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) essential oil on the growth of *Aspergillus flavus* by gaseous contact. *Journal of Food Protection*, 74(12), 2192–2198. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-11-308
- González-Aguilar, G. A. (2016). Pepper. En K. Gross, C. Wang y M. Saltveit *The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks* (pp. 481-484. USDA.
- González-Aguilar, G. A., Cruz, R., y Baez, R. (1998). Storage quality of bell peppers pretreated with hot water and polyethylene packaging. *Journal of Food Quality*, 52(62), 287–299.
- González, M., Centurión, A., Sauri, E., y Latoumerie, L. (2005). Influence of refrigerated storage on the quality and shelf life of “Habanero” chili peppers (*Capsicum chinense* Jacq.). *Acta Horticulturae*, 682, 1297–1302. DOI: 10.17660/ActaHortic.2005.682.174
- Gul, O., Saricaoglu, F. T., Besir, A., Atalar, I., y Yazici, F. (2018). Effect of ultrasound treatment on the properties of nano-emulsion films obtained from hazelnut meal protein and clove essential oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, 41, 466–474. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2017.10.011
- Gupta, A., Eral, H. B., Hatton, T. A., y Doyle, P. S. (2016). Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter*, 12(11), 2826–2841. DOI: 10.1039/C5SM02958A
- Hammer, K. A., Carson, C. F., y Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 985–990.
- Han, J. H. (2014). Edible films and coatings. En J. H. Han (Ed.), *Innovations in Food Packaging* (pp. 213–255). Elsevier Ltd. DOI: 10.1016/B978-0-12-394601-0.00009-6

- Harkins, W., y Jordan, H. (1930). A method for the determination of surface and interfacial tension from the maximum pull on a ring. *Journal of the American Chemistry Society*, 52(1892), 1751–1772. DOI: 10.1021/ja01368a004
- Hartz, T., Cantwell, M., Lestrangle, M., Smith, R., Aguiar, J., y Daugovish, O. (2008). Bell pepper production in California. University of California Agriculture and Natural Resources. Recuperado el 15 de Septiembre del 2017 a partir de <https://escholarship.org/uc/item/43t2v37n>
- Heiser, C. B., y Pickersgill, B. (1969). Names for the cultivated *Capsicum* species (*Solanaceae*). *Taxon*, 18(3), 277–283.
- Hernández-Hernández, E., Regalado-González, C., Vázquez-Landaverde, P., Guerrero-Legarreta, I., y García-Almendárez, B. E. (2014). Microencapsulation, chemical characterization, and antimicrobial activity of Mexican (*Lippia graveolens* H. B. K.) and European (*Origanum vulgare* L.) oregano essential oils. *The Scientific World Journal*, 1–12. DOI: 10.1155/2014/641814
- Jafari, S. M., He, Y., y Bhandari, B. (2006). Nano-emulsion production by sonication and microfluidization - A comparison. *International Journal of Food Properties*, 9(3), 475–485. DOI: 10.1080/10942910600596464
- Jagus, R., Gerschensons, L., y Ollé Resa, C. (2016). Combinational approaches for antimicrobial packaging: natamycin and nisin. En J. Barros-Velazquez (Ed.), *Antimicrobial Food Packaging* (pp. 599–608). Elsevier Ltd. DOI: 10.1016/B978-0-12-800723-5.00049-8
- Jiménez, A., Fabra, M. J., Talens, P., y Chiralt, A. (2012). Edible and biodegradable starch films: A review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6), 2058–2076. DOI: 10.1007/s11947-012-0835-4
- Kalemba, D., y Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 813–829. DOI: 10.2174/0929867033457719
- Kentish, S., Wooster, T. J., Ashokkumar, M., Balachandran, S., Mawson, R., y Simons, L. (2008). The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, 170–175. DOI: 10.1016/j.ifset.2007.07.005

- Koopal, L. K. (2008). Wetting of solids: fundamentals and applications. En L. K., Koopal (ed) Interface Science (2a ed.). Wageningen, Netherlands: Wageningen University. DOI: 10.13140/RG.2.1.3988.8083
- Kramer, M. E. (2009). Structure and function of starch-based edible films and coatings. En M. E. Embuscado y K. C. Huber (Eds.), Edible films and coatings for food applications (pp. 113–134). Nueva York, EUA: Springer. DOI: 10.1007/978-0-387-92824-1
- Krishna, A. (2003). *Capsicum: The genus Capsicum*. Londres, Reino Unido: Taylor & Francis.
- Krstonošić, V., Milanović, M., y Dokić, L. (2019). Application of different techniques in the determination of xanthan gum-SDS and xanthan gum-Tween 80 interaction. *Food Hydrocolloids*, 87, 108–118. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2018.07.040
- Kumar, N., y Mandal, A. (2018). Surfactant stabilized oil-in-water nanoemulsion: Stability, interfacial tension, and rheology study for enhanced oil recovery application. *Energy and Fuels*, 32, 6452–6466. DOI: 10.1021/acs.energyfuels.8b00043
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., y Nychas, G. J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453–462. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x
- Lerdthanangkul, S., y Krochta, J. M. (1996). Edible coating effects on postharvest quality of green bell peppers. *Journal of Food Science*, 61(1), 176–179. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1996.tb14753.x
- López-Malo Vigil, A., Palou, E., Parish, M. E., y Davidson, P. M. (2005). Methods for activity assay and evaluation of results. En P. M. Davidson, J. N. Sofos, y A. L. Branen (Eds.), *Antimicrobials in food* (3a ed., pp. 659–680). Taylor & Francis.
- López Camelo, A. F. (2004). Manual for the preparation and sale of fruits and vegetables. FAO. Roma, Italia. Recuperado el 23 de Septiembre del 2017 a partir de <http://www.fao.org/docrep/008/y4893e/y4893e04.htm>
- López, P., Sánchez, C., Batlle, R., y Nerín, C. (2007). Vapor-phase activities of cinnamon, thyme,

- and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4348–4356. DOI: 10.1021/jf063295u
- Lozano, J. E. (2006). Food manufacturing: Scientific basis, engineering properties, and deteriorative reactions of technological importance. Nueva York, EUA: Springer US.
- Lu, G. W., y Gao, P. (2010). Emulsions and microemulsions for topical and transdermal drug delivery. En V. S. Kulkarni (Ed.), Handbook of non-invasive drug delivery systems. Elsevier Ltd. DOI: 10.1016/B978-0-8155-2025-2.10003-4
- Lu, W., Huang, D., Wang, C. C. R., Yeh, C., Tsai, J., Huang, Y., y Li, P. (2017). Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(1), 82–89. DOI: 10.1016/j.jfda.2016.12.018
- Lucio, A. D., y Sari, B. G. (2017). Planning and implementing experiments and analyzing experimental data in vegetable crops: problems and solutions. *Horticultura Brasileira*, 46(1), 316–327. DOI: 10.1111/vcp.12479
- Martínez-Romero, D., Guillén, F., Valverde, J. M., Bailén, G., Zapata, P., Serrano, M., Castillo, S., y Valero, D. (2007). Influence of carvacrol on survival of *Botrytis cinerea* inoculated in table grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 115(2), 144–148. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.015
- McClements, D. J. (2002). Colloidal basis of emulsion color. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 7(5–6), 451–455. DOI: 10.1016/S1359-0294(02)00075-4
- McClements, D. J. (2011). Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*, 7(6), 2297–2316. DOI: 10.1039/C0SM00549E
- McClements, D. J. (2015). Food emulsions: Principles, practices, and techniques (3a ed.). Washington, DC., EUA: CRC Press.
- McClements, D. J., y Jafari, S. M. (2018). General aspects of nanoemulsions and their formulation. En S. M. Jafari y D. J. McClements (Eds.), Nanoemulsions (pp. 3–20). Elsevier Ltd. DOI: 10.1016/B978-0-12-811838-2.00001-1
- Möbius, D., Miller, R., y Fainerman, V. B. (2001). Surfactants: Chemistry, interfacial properties,

applications. Amsterdam, Países Bajos: Elsevier Ltd.

- Moghimi, R., Aliahmadi, A., y Rafati, H. (2017). Ultrasonic nanoemulsification of food grade trans-cinnamaldehyde: 1,8-Cineol and investigation of the mechanism of antibacterial activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 35, 415–421. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2016.10.020
- Mohebbi, M., Hasanpour, N., Ansarifar, E., y Amiryousefi, M. R. (2014). Physicochemical properties of bell pepper and kinetics of its color change influenced by aloe vera and gum tragacanth coatings during storage at different temperatures. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(2), 684–693. DOI: 10.1111/jfpp.12018
- Nevárez-Moorillón, G. V., Ortiz-López, J. L., Dávila-Márquez, R. M., Meneses-Sánchez, M. C., Navarro-Cruz, A. R., y Ávila-Sosa, R. (2014). Anthracnose control by Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) essential oil added to edible films. *International Food Research Journal*, 21(5), 1863–1867. Recuperado el 2 de Junio del 2018 a partir del [http://www.ifrj.upm.edu.my/21%20\(05\)%202014/21%20IFRJ%2021%20\(05\)%202014%20Avila-Sosa%20131.pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/21%20(05)%202014/21%20IFRJ%2021%20(05)%202014%20Avila-Sosa%20131.pdf)
- Nguyen Van Long, N., y Dantigny, P. (2016). Fungal contamination in packaged foods. En J. Barros-Velazquez (Ed.), *Antimicrobial food Packaging* (pp. 45–63). DOI: 10.1016/B978-0-12-800723-5.00049-8
- NOM-110-SSA1-1994. (1994). Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Recuperado el 20 de Septiembre del 2018 a partir de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/110ssa14.html>
- NOM-111-SSA1-1994. (1994). Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Recuperado el 20 de Septiembre del 2018 a partir de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/111ssa14.html>
- Nunes, M. C. do N. (2008). *Color atlas of postharvest quality of fruits and vegetables*. Iowa, EUA: Blackwell Publishing.
- Ochoa-Reyes, E., Martínez-Vazquez, G., Saucedo-Pompa, S., Montañez, J., Rojas-Molina, R., de León-Zapata, M. A., Rodríguez-Herrera, R., y Aguilar, C. N. (2013). Improvement of shelf

life quality of green bell peppers using edible coating formulations. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2(6), 2448–2451.

Odriozola-Serrano, I., Oms-Oliu, G., y Martín-Belloso, O. (2014). Nanoemulsion-based delivery systems to improve functionality of lipophilic components. *Frontiers in Nutrition*, 1(24), 1–4. DOI: 10.3389/fnut.2014.00024

Olivas, G. I., y Barbosa-Cánovas, G. (2009). Edible films and coatings for fruits and vegetables. En M. E. Embuscado y K. C. Huber (Eds.), *Edible films and coatings for food applications* (pp. 211–244). Nueva York, EUA: Springer.

OMS. (2004). Estrategia mundial sobre régimen alimentario, actividad física y salud. Recuperado el 5 de Mayo del 2017 a partir de https://www.who.int/dietphysicalactivity/strategy/eb11344/strategy_spanish_web.pdf

Osorio, F., Valdés, G., Skurtys, O., Andrade, R., Villalobos-Carvajal, R., Silva-Weiss, A., Silva-Vera, W., Giménez, B., Zamorano, M., y Lopez, J. (2017). Surface free energy utilization to evaluate wettability of hydrocolloid suspension on different vegetable epicarps. *Coatings*, 8(1), 16. DOI: 10.3390/coatings8010016

Paredes-Lopez, O. (1999). *Molecular biotechnology for plant food production*. Pennsylvania, EUA.: CRC Press.

Pavlath, A. E., y Orts, W. (2009). Edible films and coatings: Why, what and how? En M. E. Embuscado y K. C. Huber (Eds.), *Edible films and coatings for food applications* (pp. 1–23). Nueva York, EUA: Springer.

Petrucci, R. H., Herring, J., Madura, J. D., y Bissonnette, C. (2017). *General chemistry: Principles and modern applications*. Toronto, Canadá: Pearson.

Poverenov, E., Zaitsev, Y., Arnon, H., Granit, R., Alkalai-Tuvia, S., Perzelan, Y., Weinberg, T., y Fallik, E. (2014). Effects of a composite chitosan-gelatin edible coating on postharvest quality and storability of red bell peppers. *Postharvest Biology and Technology*, 96, 106–109. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2014.05.015

Pretel, M. T., Serrano, M., Amoros, A., Riquelme, F., y Romojaro, F. (1995). Non-involvement of

- ACC and ACC oxidase activity in pepper fruit ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 5(4), 295–302. DOI: 10.1016/0925-5214(94)00025-N
- Prudent, D., Perineau, F., Bessiere, J. M., Michel, G. M., y Baccou, J. C. (1995). Analysis of the essential oil of wild oregano from Martinique (*Coleus aromaticus* Benth.)—Evaluation of its bacteriostatic and fungistatic properties. *Journal of Essential Oil Research*, 7(2), 165–173. DOI: 10.1080/10412905.1995.9698492
- Quezada-Gallo, L. A. (2009). Delivery of food additives and antimicrobials using edible films and coatings. En M. E. Embuscado y K. C. Huber (Eds.), *Edible films and coatings for food applications* (pp. 315–333). Nueva York, EUA: Springer.
- Raybaudi-Massilia, R., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R., y Martín-Belloso, O. (2016). Combinational edible antimicrobial films and coatings. En B. V. Jorge (Ed.), *Antimicrobial food packaging* (pp. 633–646). Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-12-800723-5.00052-8
- Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., y Sanches-Silva, A. (2017). Application of encapsulated essential oils as antimicrobial agents in food packaging. *Current Opinion in Food Science*, 14, 78–84. DOI: 10.1016/j.cofs.2017.01.012
- Rodriguez-Garcia, I., Cruz-Valenzuela, M. R., Silva-Espinoza, B. A., Gonzalez-Aguilar, G. A., Moctezuma, E., Gutierrez-Pacheco, M. M., Tapia-Rodriguez, M. R., Ortega-Ramirez, L. A., y Ayala-Zavala, J. F. (2016). Oregano (*Lippia graveolens*) essential oil added within pectin edible coatings prevents fungal decay and increases the antioxidant capacity of treated tomatoes. *Journal of the science of food and agriculture*, 96(11), 3772–3778. DOI: 10.1002/jsfa.7568
- Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., y Martín-Belloso, O. (2009). Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 20(10), 438–447. DOI: 10.1016/j.tifs.2009.05.002
- Rosen, M. J., y Kunjappu, J. T. (2012). *Surfactants and interfacial phenomena* (4a ed.). Hoboken, EUA: John Wiley & Sons. DOI: 10.1002/9781118228920
- Russo, V. M. (2012). *Peppers: Botany, production and uses*. Cambridge, EUA: CABI International.

- Sabbah, M., Esposito, M., Di Pierro, P., Giosafatto, C. V. L., Mariniello, L., y Porta, R. (2016). Insight into zeta potential measurements in biopolymer film preparation. *Journal of Biotechnology & Biomaterials*, 6(2), e126. DOI: 10.4172/2155-952X.1000e126
- Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, A., Soliva-Fortuny, R., y Martín-Belloso, O. (2013a). Physicochemical characterization of lemongrass essential oil – alginate nanoemulsions: Effect of ultrasound processing parameters. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 2439–2446. DOI: 10.1007/s11947-012-0881-y
- Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, A., Soliva-Fortuny, R., y Martín-Belloso, O. (2014). Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. *Food Hydrocolloids*, 43, 547–556. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2014.07.012
- Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., y Martín-Belloso, O. (2013b). Effect of processing parameters on physicochemical characteristics of microfluidized lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 401–407. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2012.07.004
- Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., y Martín-Belloso, O. (2015). Postharvest biology and technology use of antimicrobial nanoemulsions as edible coatings: Impact on safety and quality attributes of fresh-cut Fuji apples. *Postharvest Biology and Technology*, 105, 8–16. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2015.03.009
- Sánchez-Ortega, I., García-Almendárez, B. E., Santos-López, E. M., Amaro-Reyes, A., Barboza-Corona, J. E., y Regalado, C. (2014). Antimicrobial edible films and coatings for meat and meat products preservation. *The Scientific World Journal*, 1–18. DOI: 10.1155/2014/248935
- Sánchez-Ortega, I., García-Almendárez, B. E., Santos-López, E. M., Regalado, C., y Reyes-González, L. R. (2016). Characterization and antimicrobial effect of starch-based edible coating suspensions. *Food Hydrocolloids*, 52, 906–913. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.09.004
- Shahavi, M. H., Hosseini, M., Jahanshahi, M., Meyer, R. L., y Darzi, G. N. (2015). Evaluation of critical parameters for preparation of stable clove oil nanoemulsion. *Arabian Journal of*

Chemistry. DOI: 10.1016/j.arabjc.2015.08.024

- Shewfelt, R. L., Thai, C. N., y Davis, J. W. (1988). Prediction of changes in color of tomatoes during ripening at different constant temperatures. *Journal of Food Science*, 53(5), 1433–1437. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1988.tb09293.x
- SIAP. (2016). Atlas Agroalimentario 2016. Recuperado el 10 de Julio del 2017 a partir de https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2016/Atlas-Agroalimentario-2016
- Singh, J., Kaur, L., y 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*, 21(1), 1–22. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2006.02.006
- Skurtys, O., Velásquez, P., Henriquez, O., Matiacevich, S., Enrione, J., y Osorio, F. (2011). Wetting behavior of chitosan solutions on blueberry epicarp with or without epicuticular waxes. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 1449–1457. DOI: 10.1016/j.lwt.2011.02.007
- Soylu, S., Yigitbas, H., Soyly, E. M., y Kurt, Ş. (2007). Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Applied Microbiology*, 103(4), 1021–1030. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03310.x
- Sun, T., Xu, Z., Wu, C. T., Janes, M., Prinyawiwatkul, W., y No, H. K. (2007). Antioxidant activities of different colored sweet bell peppers (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Food Science*, 72(2), 98–102. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2006.00245.x
- Swamy, M. K., Akhtar, M. S., y Sinniah, U. R. (2016). Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1–21. DOI:10.1155/2016/3012462
- Tadesse, T., Hewett, E. W., Nichols, M. A., y Fisher, K. J. (2002). Changes in physicochemical attributes of sweet pepper cv. Domino during fruit growth and development. *Scientia Horticulturae*, 93(2), 91–103. DOI: 10.1016/S0304-4238(01)00317-X
- Teixeira, M. C., Severino, P., Andreani, T., Boonme, P., Santini, A., Silva, A. M., y Souto, E. B.

- (2017). D- α -tocopherol nanoemulsions: Size properties, rheological behavior, surface tension, osmolarity and cytotoxicity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(2), 231–235. DOI: 10.1016/j.jsps.2016.06.004
- USDA. (2002). National Nutrient Database for Standard Reference. Recuperado el 23 de Mayo del 2017 a partir de <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3069?fgcd=&manu=&lfacet=&format=Full&count=&max=50&offset=&sort=default&order=asc&qlookup=11333&ds=&qt=&qp=&qq=&qn=&q=&ing=>
- Valencia-Chamorro, S. A., Palou, L., Delfrio, M. A., y Pérez-Gago, M. B. (2011). Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(9), 872–900. DOI: 10.1080/10408398.2010.485705
- Vitoratos, A., Bilalis, D., Karkanis, A., y Efthimiadou, A. (2013). Antifungal activity of plant essential oils against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41(1), 86–92. DOI: 10.15835/nbha4118931
- Wiegand, I., Hilpert, K., y Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175. DOI: 10.1038/nprot.2007.521
- Xing, Y., Li, X., Xu, Q., Yun, J., Lu, Y., y Tang, Y. (2011). Effects of chitosan coating enriched with cinnamon oil on qualitative properties of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Food Chemistry*. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.07.105
- Young, T. (1805). An essay on the cohesion of fluids. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 95(0), 65–87. DOI: 10.1098/rstl.1805.0005
- Yuan, Y., & Lee, T. R. (2013). Contact angle and wetting properties. En G. Bracco y B. Holst, *Surface science techniques*. Heidelberg, Alemania: Springer. DOI: 10.1007/978-3-642-34243-1
- Zhang, Y., Rempel, C., y McLaren, D. (2014). Thermoplastic starch. En J. H. Han (Ed.),

Innovations in food packaging (2a ed., pp. 391–412). Elsevier Ltd. DOI: 10.1016/B978-0-12-394601-0.00016-3

Zhang, Z., y McClements, D. J. (2018). Overview of nanoemulsion properties: Stability, rheology, and appearance. En S. M. Jafari y D. J. McClements (Eds.), *Nanoemulsions* (pp. 21–49). Elsevier Ltd. DOI: 10.1016/B978-0-12-811838-2.00002-3

Zisman, W. A. (1964). Relation of the equilibrium contact angle to liquid and solid constitution. En *Advances in Chemistry* (pp. 1–51). DOI: 10.1021/ba-1964-0043.ch001

9. APÉNDICES

Apéndice 1. Factor de corrección para tensión superficial (Adaptado de Anónimo, 2002). El tensiómetro K6 está compensado linealmente de modo que el factor de corrección para una medición de agua pura a 20° C es 1; esto corresponde a un valor de la literatura para la tensión superficial del agua de 72.8 mN/m. En todas las demás condiciones, el valor de medición se debe multiplicar por un factor de corrección (Harkins y Jordan, 1930). Determinar la diferencia entre las densidades de las fases (para el límite de fase líquido/gas, solo tomar la densidad del líquido) y encontrar la columna correspondiente. Luego encontrar el valor medido en el equipo en la primera columna y el factor de corrección correspondiente.

Diferencia de densidad	0.65	0.8	1.0	1.2	1.4
σ (mN/m)	Factor	Factor	Factor	Factor	Factor
100	1.070	1.049	1.026	1.011	0.998
97	1.065	1.043	1.023	1.008	0.995
94	1.063	1.040	1.020	1.005	0.993
91	1.058	1.037	1.018	1.003	0.991
88	1.054	1.034	1.014	1.000	0.988
85	1.052	1.031	1.012	0.998	0.986
82	1.049	1.029	1.009	0.995	0.984
79	1.043	1.024	1.006	0.991	0.980
76	1.040	1.023	1.003	0.988	0.977
73	1.037	1.018	1.000	0.986	0.974
70	1.033	1.014	0.996	0.982	0.972
67	1.028	1.011	0.993	0.979	0.968
64	1.023	1.006	0.990	0.976	0.964
61	1.019	1.003	0.985	0.973	0.960
58	1.015	0.999	0.982	0.969	0.956
55	1.012	0.996	0.978	0.964	0.953
52	1.007	0.990	0.974	0.959	0.950
50	1.004	0.988	0.972	0.957	0.945

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

Apéndice 2. Análisis de varianza para tamaño promedio de partícula de NEs de AEO.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fc	Valor p
% de AEO	2	11899.791	5949.896	5074.217	<0.0001
Tiempo de sonicación	2	1860.660	930.33	793.4084	<0.0001
% de AEO*Tiempo de sonicación	4	1077.337	269.334	229.6949	<0.0001
Error	18	21.106	1.17		
total	26	14858.895			

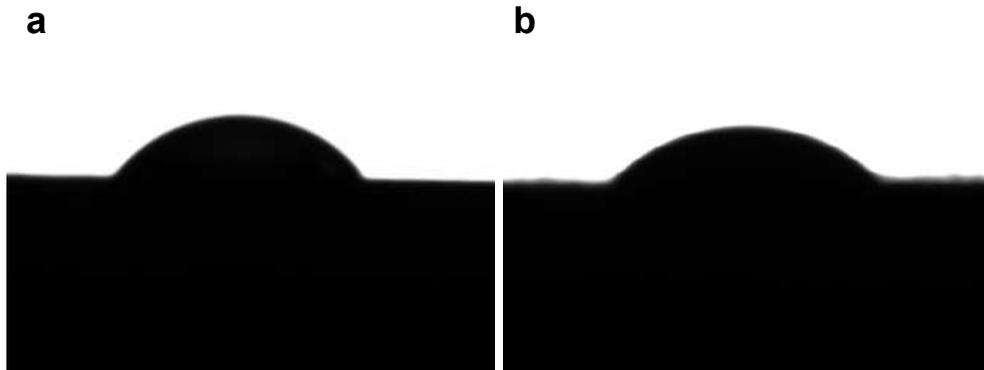
Apéndice 3. Análisis de varianza para potencial ζ de NEs de AEO.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fc	Valor p
% de AEO	2	87.491	43.746	10.682	<0.0004
Tiempo de sonicación	2	41.264	20.632	5.038	<0.0138
% de AEO*Tiempo de sonicación	4	5.258	1.315	0.321	0.8614
Error	18	110.574	4.095		
total	26	244.587			

Apéndice 4. Análisis de varianza para índice de blancura de NEs de AEO.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fc	Valor p
% de AEO	2	5013.984	2506.992	154258.9	<0.0001
Tiempo de sonicación	2	102.901	51.451	3165.810	<0.0001
% de AEO*Tiempo de sonicación	4	2.722	0.681	41.8646	<0.0001
Error	18	0.293	0.016		
total	26	5119.899			

Apéndice 5. Ejemplo del uso del software “Drop Shape Analysis” del equipo de ángulo de contacto

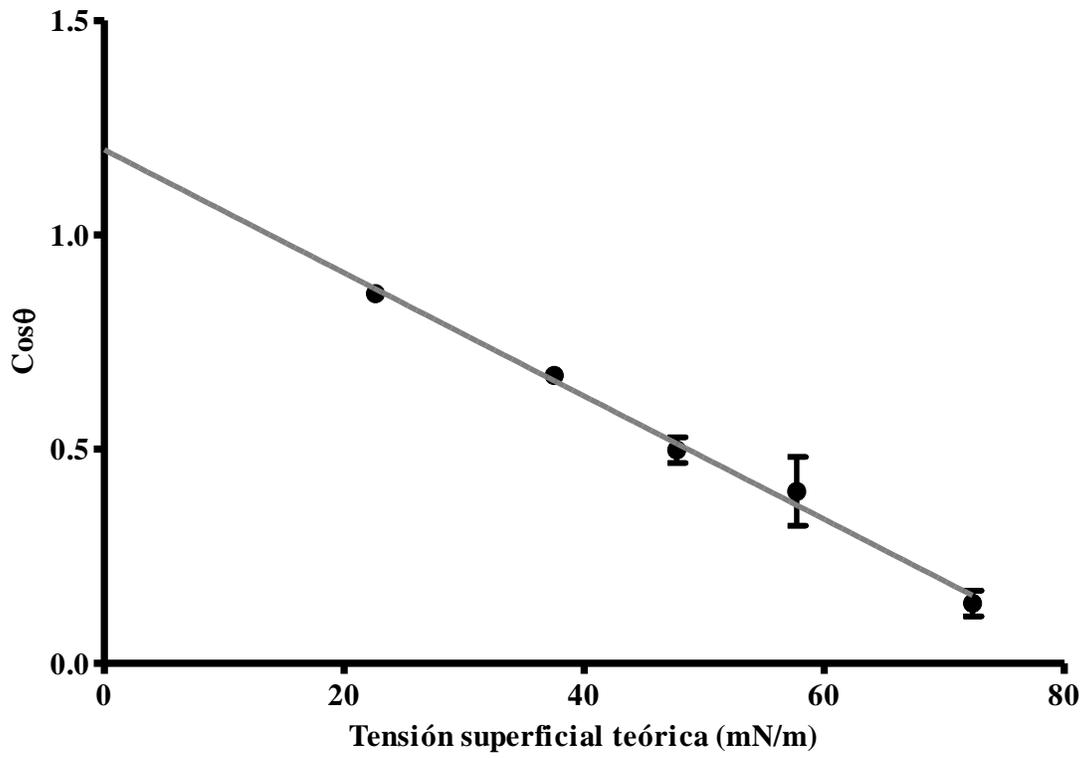


Ángulo de contacto formado en la superficie de pimienta morrón a los 30 s de contacto. Agua (a), metanol (b), NE de 0.25% de AEO (c), NE de 2.0% de AEO (d).

Apéndice 6. Análisis de varianza para ángulo de contacto de NEs de AEO sobre superficie de pimienta morrón.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fc	Valor p
% de AEO	2	556.183	278.092	81.735	<0.0001
Tiempo de sonicación	2	37.925	18.963	5.573	<0.0001
% de AEO*Tiempo de sonicación	4	19.015	4.754	1.3972	<0.0001
Error	18	61.242	3.402		
total	26	674.365			

Apéndice 7. Gráfica de Zisman obtenida para la obtención de tensión superficial crítica de pimienta morrón.



Apéndice 8. Análisis de varianza para coeficiente de mojabilidad de NEs de AEO sobre superficie de pimienta morrón.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fc	Valor p
% de AEO	2	114.754	57.377	88.731	<0.0001
Tiempo de sonicación	2	5.706	2.853	4.412	<0.0276
% de AEO*Tiempo de sonicación	4	2.253	0.563	0.871	<0.5002
Error	18	11.639	0.647		
total	26	134.353			

Apéndice 9. Análisis de varianza para pendientes estimadas de la pérdida de peso de pimiento morrón control y con recubrimiento durante 20 días de almacenamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fc	Valor p
Tipo de recubrimiento	1	0.0006	0.0006	2.9814	0.1593
Error	4	0.0009	0.0002		
total	5	0.0015			

Análisis de varianza para interceptos estimados de la pérdida de peso de pimiento morrón control y con recubrimiento durante 20 días de almacenamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fc	Valor p
Tipo de recubrimiento	1	0.0011	0.0011	0.6508	0.4651
Error	4	0.0068	0.0017		
total	5	0.0079			

Apéndice 10. Análisis de varianza para pendientes estimadas del parámetro de tono (Hue) de pimienta morrón control y con recubrimiento durante 20 días de almacenamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fc	Valor p
Tipo de recubrimiento	1	0.0057	0.0057	4.5352	0.1003
Error	4	0.0051	0.0013		
total	5	0.0108			

Análisis de varianza para interceptos estimadas del parámetro de tono (Hue) de pimienta morrón control y con recubrimiento durante 20 días de almacenamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fc	Valor p
Tipo de recubrimiento	1	3.9322	3.9322	4.8861	0.0916
Error	4	3.2191	0.8048		
total	5	7.1513			

Apéndice 11. Análisis de varianza para sólidos solubles totales (SST) de pimiento morrón control a través del tiempo.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fc	Valor p
Tipo de recubrimiento	1	0.0117	0.0117	0.0182	0.8935
Error	34	21.9524	0.6457		
total	35	21.9641			

Apéndice 12. Análisis de varianza para pH de pimienta morrón control y con recubrimiento durante 20 días de almacenamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fc	Valor p
Tratamiento	1	0.0306	0.0306	2.5606	0.1191
Error	33	0.3947	0.0120		
total	34	0.4253			

Apéndice 13. Análisis de varianza para pendientes estimadas de la cuenta de hongos en pimiento morrón control y con recubrimiento durante 20 días de almacenamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fc	Valor p
Tipo de recubrimiento	1	0.0000	0.0000	0.0048	0.9509
Error	2	0.0032	0.0016		
total	3	0.0032			

Análisis de varianza para interceptos estimados de la cuenta de hongos en pimiento morrón control y con recubrimiento durante 20 días de almacenamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fc	Valor p
Tipo de recubrimiento	1	0.9646	0.9646	11.9980	0.0742
Error	2	0.1607	0.0804		
total	3	1.1254			