



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

**FACULTAD DE QUÍMICA
POSGRADO DE ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA
REPÚBLICA**

**“Desarrollo y caracterización de nanofibras
electroestiradas con amplio espectro antimicrobiano como
alternativa de empaque activo”**

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Doctor en Ciencias de los Alimentos

PRESENTA

M. en C. KAREN MAGALY SOTO MARTÍNEZ

DIRIGIDA POR

Dra. Sandra O. Mendoza Díaz

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2018.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Doctorado en Ciencias de los Alimentos

“Desarrollo y caracterización de nanofibras electroestiradas con amplio espectro antimicrobiano como alternativa de empaque activo”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias de los Alimentos

Presenta:

M.en C. Karen Magaly Soto Martínez

Dirigido por:

Dra. Sandra O. Mendoza Díaz

Dra Sandra O. Mendoza Díaz

Presidente

Firma

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Secretario

Firma

Dr. Gabriel Luna Bárcenas

Vocal

Firma

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

Suplente

Firma

Dr. Rafael Vázquez Duhalt

Suplente

Firma

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Director de la Facultad

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

Resumen

El envasado activo de alimentos se define como aquel embalaje en el que los componentes adicionados, desempeñan otra función además de constituir una barrera física entre el alimento y su entorno, están diseñados para incorporar deliberadamente componentes que liberen o absorban sustancias hacia o desde los alimentos envasados al entorno que los rodea, evitando la adición directa del activo, una nueva tendencia en el área de envasado es el desarrollo de empaques activos antimicrobianos, que ayuden a evitar la contaminación o retardar el crecimiento de microorganismos en los alimentos, evitando de esta manera el desperdicio de alimentos. En el presente trabajo se desarrollaron estructuras nanométricas (nanofibras electroestiradas) capaces de encapsular y proteger antimicrobianos como la nisina y las nanopartículas de plata, activas contra bacterias Gram-positivas y negativas, con diferentes mecanismos de acción. Las fibras obtenidas a partir de nisina presentaron diámetros medios entre los 300-100 nm de longitud; se evaluaron sus perfiles de liberación a diferentes valores de pH, así como en diferentes matrices alimentarias, presentando actividad antimicrobiana contra bacterias como *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* y *Leuconostoc mesenteroides*. Se llevó a cabo la adición de AgNPs, sintetizadas por química verde a partir de residuos agroindustriales y plantas, en fibras electroestiradas para evaluar su actividad antimicrobiana.

Palabras clave: Empaque activo, nanofibras, bacteriocinas, nanopartículas de plata.

Abstract

The active food packaging is defined as packaging in which the components added, play another role besides being a physical barrier between food and the environment, they are designed to deliberately incorporate components that release or absorb substances into or from the packaged food to the surrounding environment, avoiding direct addition. In the present work, nanostructures (electrospun nanofibers) able to encapsulate and deliver antimicrobial actives with different antimicrobial spectrum and mechanism will be developed. Bacteriocins are effective against Gram-positive bacteria forming pores in the cell wall while silver nanoparticles produced by natural synthesis with oregano essential oil have antimicrobial activity against Gram-negative bacteria. A full characterization of the structures obtained including release profiles, morphology, gas barrier and antimicrobial activity will be performed. Thereafter a food matrix will be used to evaluate the functionality of the nanocarrier system.

Keywords: Active packaging, nanofibers, bacteriocin, silver nanoparticles.

*Nuestros sueños pueden convertirse en realidad, si los
deseamos tanto para ir tras ellos*

Walt Disney

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a Dios, por permitirme llegar hasta este momento, por ayudarme a sobrellevar todos los obstáculos que existieron en el camino y por poner en mi camino personas maravillosas a las cuales hoy puedo llamar familia y amigos.

En segundo lugar quiero agradecer a mis padres, quienes son mi mayor fortaleza y una de mis principales motivaciones para mejorar día a día, a ustedes les debo todo lo que soy y cada una de las cosas que hago en mi vida siempre es con el fin de que ustedes se sientan orgullosos de mi, de verdad muchas gracias por todo lo que me han dado, los amo infinitamente. Otras personitas muy importantes en mi vida son mis hermanos y sobrinos con los cuales siempre paso momentos increíbles y me hacen olvidar cualquier problema, gracias por siempre estar para mi y por que se que siempre puedo contar con ustedes. A los que se me adelantaron mi Patito hermosa y mi pequeñín B gracias por cuidarme desde el cielo y siempre darme su apoyo.

Gracias a Jairo mi ahora esposo, por siempre estar a mi lado y por compartir conmigo todas nuestras alegrías y también tristezas, gracias por brindarme siempre tu ayuda y amor infinito, eres una persona muy especial en mi vida, te amo, gracias también por darme la oportunidad de formar nuestra familia pequeña ahora solo con Lucky pero que pronto crecerá, los dos siempre están para mi me esperan, me abrazan y me alimentan ja ja.

Gracias a mis grandes amigos: a los de toda la vida (Diana, Adri, Sara, Kari, Angie, Bren) y a los que conocí durante el doctorado (Cyn, Memi, Eli, Cami, Luis, Nancy) que hoy por hoy los siento como parte de mi familia y se que siempre vamos a estar en contacto y pueden contar conmigo para lo que necesiten.

Gracias Dra. Sandra por permitirme formar parte de su grupo de trabajo por un largo tiempo, que la verdad gracias al apoyo de usted y al cariño que me brinda,

me parecieron muy cortos, es usted una excelente persona a la que admiro y quiero mucho, gracias por sus consejos y enseñanzas. Espero que esto no sea el fin, si no que sea el inicio de grandes colaboraciones y tenga por seguro que puede contar conmigo para lo que necesite.

De igual manera gracias a mis sinodales: Dra. Montse, Dra. Flavia, Dr. Luna, Dr. Rafael, por todo el apoyo que me brindaron y por dedicar su tiempo a revisar este trabajo

Por ultimo quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT, por la beca brindada para realizar mis estudios de doctorado.

Con mucho cariño para todos ustedes
Maguie

1. ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	10
2. MARCO TEÓRICO	12
2.1. ENVASADO ACTIVO DE ALIMENTOS	12
2.1. EMPAQUES ACTIVOS ANTIMICROBIANOS	14
2.2. NANOTECNOLOGÍA EN EMPAQUES ALIMENTARIOS	15
2.2.1. NANOENCAPSULACIÓN Y SISTEMAS DE ENCAPSULACIÓN	17
2.2.1.1. NANOFIBRAS ELECTROESTIRADAS	18
2.2.1.2. APLICACIONES	20
2.2.2. ELECTROESTIRADO	20
2.3. BACTERIOCINAS	22
2.3.1. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN	22
2.3.2. USO EN ALIMENTOS	22
2.3.3. NISINA	23
2.3.3.1. MECANISMO DE ACCIÓN	24
2.3.3.1. LIMITANTES DE USO	25
2.4. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	26
2.4.1. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS	26
2.4.2. SÍNTESIS VERDE	28
2.4.2.1. USO DE EXTRACTOS DE PLANTAS PARA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS	29
2.4.3. NANOPARTÍCULAS DE PLATA	32
2.4.4. MECANISMO DE ACCIÓN ANTIMICROBIANA Y ESPECTRO ANTIMICROBIANO	34
2.4.5. USO EN ALIMENTOS	35
2.5. ORÉGANO MEXICANO (<i>LIPPIA GRAVEOLENS</i>)	36
2.6. PERICÓN (<i>TARGETES LUCIDA</i>)	38
2.7. BAGAZO DE NARANJA	38
2.8. MOSTO DE UVA	39
2.9. NANOCOMPOSITOS	40
3. JUSTIFICACIÓN	42
4. HIPOTESIS	43
5. OBJETIVOS	44
5.1. OBJETIVO GENERAL	44
5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
6. METODOLOGÍA	45
6.1. MATERIALES	45

6.1.1. CEPAS	45
6.1.1.1. LAVADO DE CEPAS	45
6.2. DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE FIBRAS ELECTROESTIRADAS DE PROTEÍNA DE AMARANTO Y PULULANO	45
6.2.1. ELABORACIÓN DE SOLUCIONES POLIMÉRICAS Y PROCESO DE ELECTROESTIRADO	45
6.2.2. DETERMINACIÓN DE MORFOLOGÍA Y TAMAÑO DE PARTÍCULA	46
6.2.3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN MEDIO LÍQUIDO	46
6.2.4. PERFILES DE LIBERACIÓN A DIFERENTES VALORES DE PH	47
6.2.5. DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE LIBERACIÓN	47
6.2.6. PERFILES DE LIBERACIÓN EN DIFERENTES MATRICES ALIMENTARIAS	48
6.2.6.1. PERFIL DE LIBERACIÓN EN JUGO DE MANZANA	48
6.2.6.2. PERFIL DE LIBERACIÓN EN QUESO FRESCO	48
6.3. DESARROLLO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA MEDIANTE SÍNTESIS VERDE	49
6.3.1. ELABORACIÓN DE EXTRACTOS ACUOSOS DE ORÉGANO, PERICÓN, BAGAZO DE NARANJA Y MOSTO DE UVA	49
6.3.1.1. DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	50
6.3.1.1.1. ENSAYO DPPH	50
6.3.1.1.2. ENSAYO ABTS	50
6.3.1.1.3. CUPRAC ELECTROQUÍMICO	50
6.3.1.2. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES	51
6.3.1.3. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS MEDIANTE HPLC	51
6.3.2. SÍNTESIS VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y EFECTO DE TEMPERATURA Y TIEMPO DE REACCIÓN	52
6.3.2.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	53
6.3.2.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)	53
6.3.2.3. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON REFLECTANCIA DIFUSA	53
6.3.2.4. DIFRACCIÓN DE RAYOS X	54
6.3.3. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS RECIÉN SINTETIZADAS	54
6.3.3.1.1. DIFUSIÓN EN PLACA	54
6.3.3.1.2. DENSIDAD ÓPTICA (BIOSCREEN)	55
6.3.3.1.3. MODELAMIENTO MATEMÁTICO DEL CRECIMIENTO MICROBIANO	55
6.3.3.2. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS SECAS	56
6.3.4. SECADO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA	56
6.3.4.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	56
6.3.4.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE AGNs SECAS	56
6.3.5. DESARROLLO DE NANOCOMPOSITOS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y FIBRAS ELECTROESTIRADAS DE APA-PUL	57
6.3.5.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y PROCESO DE ELECTROESTIRADAS	57
6.3.5.2. CARACTERIZACIÓN DE NANOCOMPOSITOS DE AGNPs Y FIBRAS ELECTROESTIRADA DE APA-PUL	57
6.3.5.2.1. EVALUACIÓN DE MORFOLOGÍA (SEM)	57
6.3.5.2.2. MORFOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN LAS FIBRAS (TEM)	57
6.3.5.2.3. DISTRIBUCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO CON DETECTOR EDS	58

6.3.5.2.4. PERMEABILIDAD A VAPOR DE AGUA	58
6.3.5.2.5. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	59
6.3.6. DESARROLLO DE NANOCOMPOSITOS DE AgNPs, NANOFIBRAS ELECTROESTIRADAS DE APA-PUL Y NISINA	59
6.3.6.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	59
6.3.6.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	60
6.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	60

7. RESULTADOS 61

7.1. CARACTERIZACIÓN DE SOLUCIONES APA-PUL: NISINA	61
7.2. MORFOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE FIBRAS	62
7.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN MEDIO LÍQUIDO	64
7.4. EVALUACIÓN DE PERFILES DE LIBERACIÓN	66
7.4.1. PERFILES DE LIBERACIÓN A DIFERENTES VALORES DE PH	66
7.4.2. MODELOS DE LIBERACIÓN	69
7.4.3. PERFIL DE LIBERACIÓN EN JUGO DE MANZANA	70
7.4.4. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE LIBERACIÓN EN QUESO PANELA	74
7.5. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS	79
7.5.1. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	80
7.5.1. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES	83
7.5.2. CUANTIFICACIÓN DE FENOLES MEDIANTE HPLC/DAD	84
7.5.2.1. EXTRACTO ACUOSO DE MOSTO DE UVA	85
7.5.2.2. EXTRACTO DE CASCARA DE NARANJA	86
7.5.2.3. EXTRACTO ACUOSO DE ORÉGANO (<i>LIPPIA GRAVEOLENS</i>)	88
7.5.2.4. EXTRACTO DE PERICÓN TAGETES LUCIDA	90
7.6. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA	91
7.6.1. EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE REACCIÓN EN LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA.	91
7.6.2. MORFOLOGÍA DE AgNPs SINTETIZADAS	93
7.6.3. DIFRACCIÓN DE RAYOS X	97
7.6.4. FTIR	99
7.6.5. CURVAS DE CRECIMIENTO DE <i>E. COLI</i> Y <i>L. MONOCYTOGENES</i>	101
7.6.6. MODELAMIENTO MATEMÁTICO DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO	107
SE EVALUARON DIFERENTES PARÁMETROS CINÉTICOS (VELOCIDAD DE CRECIMIENTO, FASE LAG Y POBLACIÓN MÁXIMA ALCANZADA) DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS OBTENIDAS CON LAS AgNPs MEDIANTE EL SOFTWARE COMBASE, EN ESTE CASO SOLO SE EVALUARON LAS NANOPARTÍCULAS SINTETIZADAS CON LOS EXTRACTOS DE SUBPRODUCTOS DE FRUTAS, DEBIDO A QUE PRESENTARON MEJOR ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y A QUE EL USO DE LOS EXTRACTOS DE SUBPRODUCTOS DARÁN UN VALOR AGREGADO A ESTOS PRODUCTOS QUE SON SUBUTILIZADOS.	
7.6.7. SECADO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA	110
7.6.8. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE AgNPs SECAS	112
7.7. DESARROLLO DE NANOCOMPOSITOS DE NANOFIBRAS APA-PUL REFORZADOS CON DIVERSOS MATERIALES	116
7.7.1. DESARROLLO NANOCOMPOSITOS DE NANOFIBRAS APA-PUL REFORZADAS CON AgNPs	116

7.7.1.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS SOLUCIONES Y MORFOLOGÍA DE FIBRAS	116
7.7.1.2. DISTRIBUCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA	118
7.7.1.3. DISTRIBUCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA POR EDS	120
7.7.1.4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	122
7.7.2. DESARROLLO DE NANOCOMPOSITOS DE NANOFIBRAS DE APA-PUL REFORZADAS CON LA ADICIÓN DE NISINA Y AGNPs SINTETIZADAS CON MOSTO DE UVA	125
7.7.2.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS SOLUCIONES Y MORFOLOGÍA DE FIBRAS	125
7.7.2.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	127
7.7.3. PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA	128
8. CONCLUSIONES	131
9. BIBLIOGRAFÍA	132

1. INTRODUCCIÓN

Una de las principales funciones de las empresas de alimentos es ofrecer alimentos procesados bajo la primicia de brindar una mayor calidad a los consumidores. Para elaborar productos inocuos, se han desarrollado técnicas de conservación que eviten la propagación de los microorganismos patógenos relacionados con las enfermedades transmitidas por alimentos. La utilización de aditivos antagonistas como conservadores con propiedades antimicrobianas ha sido la manera más aceptada para prolongar la inocuidad y calidad de alimentos, bebidas y productos procesados. Existen diferentes conservadores comerciales que han sido aprobados para su uso en alimentos, entre ellos se encuentran las bacteriocinas: nisina y pediocina. Las bacteriocinas son polipéptidos capaces de inhibir el desarrollo de bacterias taxonómicamente similares a aquéllas que las producen. En particular, las bacteriocinas producidas por Bacterias Ácido Lácticas (BAL) son de mayor interés en la conservación de alimentos debido a que presentan propiedades antimicrobianas, tienen alta especificidad inhibitoria contra cepas de la misma especie y son rápidamente digeridas por las proteasas en el tracto digestivo humano, por lo que se inactivan sin llegar a formar compuestos secundarios (Chen & Hoover 2003)

Recientemente se ha propuesto el uso en alimentos de las nanopartículas de plata como agente antimicrobiano, éstas presentan una gran área superficial, tamaño muy pequeño (<20 nm) y alta dispersión. La plata es un metal con propiedades antimicrobianas, seguro y eficaz ya que no es tóxico para células animales. Las nanopartículas pueden elaborarse mediante síntesis verde con extractos de plantas que presenten una alta capacidad antioxidante.

Los compuestos activos difícilmente son incorporados en su forma pura, debido a que sufren diversas modificaciones que inducen la pérdida de la actividad biológica, sin embargo, pueden estar encapsulados en matrices que aseguren su estabilidad y permitan su liberación controlada. Se ha demostrado que las

nanofibras obtenidas por la técnica de electroestirado, son un buen sistema de liberación para péptidos y antioxidantes (Heunis *et al.*, 2011, Oliveira *et al.*, 2014).

El electroestirado es un proceso simple y directo, que implica la aplicación de un campo eléctrico, para expulsar continuamente la solución de un polímero de la aguja de una jeringa hacia un colector a tierra. Como resultado se forman fibras ultrafinas, en la escala de micrómetros o nanómetros, que se recogen como una malla no tejida o membrana en la placa del colector. La fibra obtenida presenta gran área superficial y alta porosidad, propiedades deseables para un sistema acarreador, para la entrega de fármacos u otros agentes terapéuticos (Neo *et al.*, 2013). Se han realizado diferentes estudios sobre la fabricación de fibras de diferentes polímeros, como el óxido de polietileno, celulosa, quitosano, etc. y recientemente se han obtenido fibras de polímeros de fuentes naturales, como la zeína y las proteínas de amaranto (Neo *et al.*, 2013; Homayoni *et al.*, 2009; Jia *et al.*, 2011; Aceituno *et al.*, 2013).

En este proyecto se desarrollaron nanofibras de proteína de amaranto cargadas con compuestos que presentan propiedades antimicrobianas complementarias, tal es el caso de la nisina, pediocina y nanopartículas de plata con el objetivo de ampliar el espectro antimicrobiano de las nanofibras. Las nanofibras obtenidas presentan potencial para el desarrollo de un empaque de alimentos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Envasado activo de alimentos

La función principal del envasado de alimentos es asegurar que la calidad del alimento permanezca intacta y sea seguro para el consumo, el empaque proporciona protección física para mantener los productos alimenticios a salvo de interferencias externas como la temperatura, luz, presencia o ausencia de humedad, oxígeno, presión, enzimas, olores y contaminación microbiana (Barbosa-Pereira, Angulo, Lagarón, Paseiro-Losada, & Cruz, 2014; Hamad, Han, Kim, & Rather, 2018; Restuccia et al., 2010). El área de envasado de alimentos se encuentra en constante desarrollo en respuesta de las demandas de los consumidores, al igual que las nuevas tendencias en la producción de alimentos mínimamente procesados, recientemente el rol pasivo del envasado de alimentos ha cambiado para incluir aspectos tales como inocuidad, conveniencia, marketing y reducción de materiales, este nuevo concepto de empaques se denomina como empaque activo o inteligente (I. Ahmed et al., 2017).

El envasado activo de alimentos se define como aquel embalaje en el que los componentes adicionados, desempeñan alguna otra función además de constituir una barrera física entre el alimento y su entorno, además interactúan positivamente con el fin de mejorarla inocuidad y mantener características sensoriales (Realini & Marcos 2014; Ahmed et al. 2017), están diseñados para incorporar deliberadamente componentes que liberen o absorban sustancias hacia o desde los alimentos envasados al entorno que los rodea (Restuccia et al., 2010), y es una de las tecnologías más dinámicas utilizadas para preservar la calidad, seguridad y propiedades sensoriales de los alimentos (Barbosa-Pereira et al., 2014; Jaiswal, Tatke, Gabhe, & Vaidya, 2013).

Algunos tipos de envases activos permiten la liberación controlada de sustancias activas (antimicrobianos y antioxidantes), evitando la adición directa en el producto (Figura 1). Por ejemplo, Ramos et al. (2014b) desarrollaron empaques de polipropileno adicionados con Carvacrol y Timol evaluando la liberación y la

capacidad antioxidante de los compuestos activos. Herna et al. (2013) elaboraron películas antimicrobianas de etileno y alcohol polivinílico (EVO) adicionadas con lauroil arginato, evaluando propiedades de barrera al oxígeno y vapor de agua, así como la liberación del activo en un sistema alimenticio de prueba.

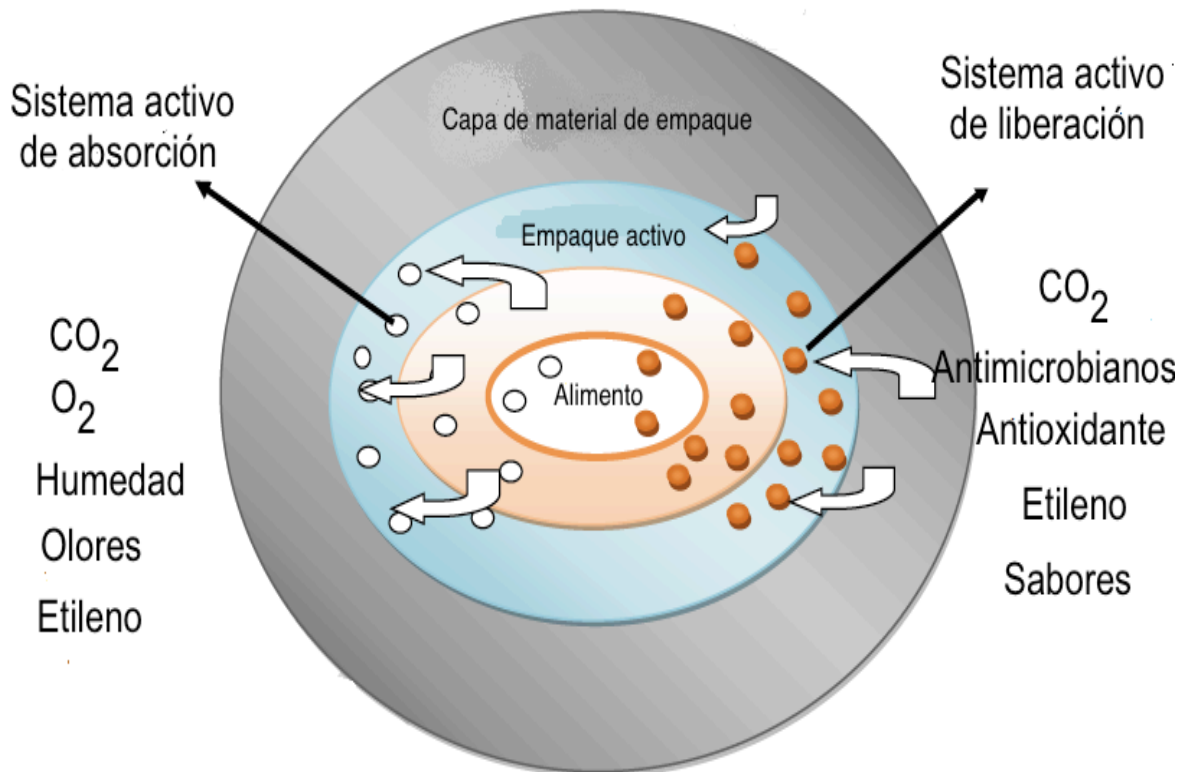


Figura 1. Esquema de liberación y absorción de compuestos en un empaque activo (Ahmed et al. 2017).

En la actualidad existe una gran demanda de uso de empaques que sean biodegradables, en este sentido el uso de polímeros derivados de recursos renovables atraen cada vez más atención como un método para la fabricación de empaques que sean amigables con el medio ambiente. Algunos polímeros utilizados en la fabricación de empaques se presentan en el Cuadro 1 (Fabra, López-Rubio, & Lagaron, 2014; Silvestre, Duraccio, & Cimmino, 2011).

Cuadro 1. Biopolímeros utilizados para la fabricación de empaques de alimentos.

Biopolímero	Origen	Ventajas	Fuente
Zeína	Proteína de maíz	Formación de películas Propiedades de barrera.	(Neo, Swift, et al., 2013; Yemenicio et al., 2006)
Proteína de soya	Soya	Propiedades barrera contra oxígeno y aromas Bajo costo Formación de películas	(González-Campos et al., 2013)
Quitosano	Derivado de quitina	Biodegradable Antimicrobiano Antifúngico No tóxico	(Arruda, Stefani, Aniceto, Jr, & Nat, 2014; Cruz-Romero, Murphy, Morris, Cummins, & Kerry, 2013)
Suero de leche	Desecho de industria láctea	Propiedades barrera de oxígeno y aromas	(J. Lee, Son, & Hong, 2008; Ramos, Beltrán, Peltzer, Valente, & Garrigós, 2014)
Celulosa	Producción bacteriana	No tóxico Biodegradable Bajo costo	(Lavoine et al., 2014; Moura, Mattoso, & Zucolotto, 2012)

2.1. Empaques activos antimicrobianos

Los empaques activos antimicrobianos son aquellos que reducen la fase de crecimiento exponencial y/o prolongan la fase de adaptación (Lag) de los microorganismos que puedan estar presentes en el alimento, esto con el propósito de mantener la inocuidad y calidad de los alimento y para alargar la vida de anaquel del producto (I. Ahmed et al., 2017). Los empaques activos antimicrobianos (EAA), se pueden clasifican en cuatro categorías de acuerdo a la

forma en que se incorporan los compuestos antimicrobianos: 1) incorporación en almohadillas o sacos, que no forman parte como tal del empaque, si no que se incorporan en el interior, este tipo de empaque se utiliza principalmente para carne; 2) consiste en la incorporación directa de los antimicrobianos en el material de empaque, los activos pueden incorporarse mediante técnicas de extrusión o electroestirado y son liberados de manera gradual al espacio de cabeza o a la superficie del alimento; 3) recubrimiento activo con una matriz que actúa como portador de antimicrobianos (encapsulación), los cuales se pueden liberar en la superficie de los alimentos a través de evaporación (sustancias volátiles) o difusión (sustancias no volátiles); 4) uso de polímeros con capacidad antimicrobiana como el quitosano y la poli-L-lisina (Fang, Zhao, Warner, & Johnson, 2017). Diferentes compuestos antimicrobianos han sido incorporados a empaques con el fin de aumentar la vida de anaquel de los productos alimenticios, entre los que podemos encontrar al dióxido de carbono, iones o nanopartículas de plata, antibióticos, bacteriocinas aceites esenciales y extractos de diferentes plantas (I. Ahmed et al., 2017; Fang et al., 2017).

Una de las categorías más utilizadas para la incorporación de compuestos antimicrobianos es la 3, en la cual es compuesto es encapsulado en un material de pared que permite una liberación controlada y además lo protege de factores ambientales que puedan dañar su integridad o disminuir su actividad antimicrobiana, en este sentido el uso de la nanotecnología ha sido de gran ayuda para el desarrollo sistemas de encapsulación capaces de incorporar antimicrobianos.

2.2. Nanotecnología en empaques alimentarios

La nanotecnología es una poderosa herramienta interdisciplinaria para el desarrollo de productos innovadores, se prevé que la nanotecnología tendrá un impacto de al menos 3 billones de dólares la economía mundial para el 2020, creando una demande de 6 millones de empleos en diversas industrias, esta tecnología se centra en la caracterización, fabricación y manipulación de

estructuras, dispositivos o materiales con una o dos dimensiones menores a 100 nm de longitud (Groves & Titoria 2009; Press 2010). En 2008, el desarrollo de empaques de alimentos basados en nanotecnología tuvo una producción anual de 4.13 mil millones de dólares y se espera un crecimiento anual del 12%, este desarrollo empleó más de 15 billones de fondos para investigación y 40000 investigadores (He & Hwang 2016). A pesar del gran potencial de la nanotecnología en la industria alimentaria y agrícola, su mercado no es muy grande, viéndose afectado por factores como la falta de información y la aceptación de los consumidores (Dudo, Choi, & Scheufele, 2011; Takeuchi, Kojima, & Luetzow, 2014).

En el área de empackado de alimentos la nanotecnología ha incursionado en ciertas áreas específicas (Figura 2), como en la producción de empaques que han reducido la contaminación ambiental a través del empleo de materiales biodegradables, en la producción de sensores adicionados a empaques activos, en el mejoramiento de materiales para producción de empaques basados en nanobiocompositos y en la incorporación de compuestos antimicrobianos mediante la encapsulación de compuestos activos (bacteriocinas, aceites esenciales) o la producción de nanocompuestos (nanopartículas de plata), los cuales pueden ser adicionados al empaque para su liberación o inmovilización (Hamad, 2018).

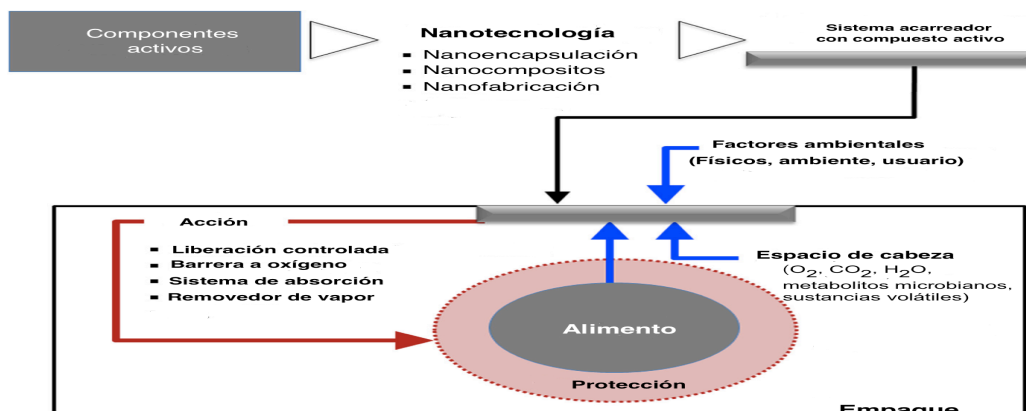


Figura 2. Representación del uso de nanotecnología en la producción de empaques activos, así como posibles aplicaciones (Mihindukulasuriya & Lim 2014)

2.2.1. Nanoencapsulación y sistemas de encapsulación

La nanoencapsulación se define como la tecnología para empaquetar compuestos en estructuras nanométricas elaboradas a partir de diferentes técnicas, tales como, electroestirado, coacervación, co-extrusión, etc. (Prakash et al., 2018). La nanoencapsulación fue desarrollada inicialmente para la administración de fármacos, sin embargo en los últimos años, esta tecnología ha ido innovando para introducirse en otras áreas como la alimenticia, esto con el desarrollo de sistemas de encapsulación basados en biopolímeros como la zeína, proteína de amaranto, proteína de soya, caseínas, entre otras (Xie & Hsieh 2003; Aceituno-Medina et al. 2013b; De Oliveira Mori et al. 2014). La nanoencapsulación ofrece diferentes ventajas en comparación con el uso de compuestos activos en su forma libre, algunas de ellas son: manejo de la sustancia con mayor facilidad, mejora la estabilidad, confiere protección contra la oxidación y degradación, mejora la solubilidad, provee una liberación controlada del activo, enmascara sabores y olores desagradables y mejora la biodisponibilidad de los compuestos (Prakash et al., 2018). En la actualidad diversos sistemas de encapsulación han sido desarrollados, todos con propósitos similares, sin embargo algunos presentan ventajas sobre otros como se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Ventajas y desventajas de sistemas de encapsulación (Blanco-Padilla, Soto, Hernández Iturriaga, & Mendoza, 2014)

Sistema de encapsulación	Morfología física	Ventajas	Desventajas
Nanoemulsión	Líquido	Sistemas translúcidos que permiten su uso en bebidas Acarreador de compuestos hidrofóbicos. Rápida absorción	Liberación rápida Baja estabilidad en condiciones ácidas
Nanoesferas	Sólido	Gran área superficial Liberación controlada de compuestos insolubles	Falta de estabilidad Métodos de producción costosos
Nanocápsulas	Sólido	El uso de polímeros naturales tales como	Es necesario un proceso de

		polisacáridos y proteínas aumentan la biodisponibilidad y la biodegradabilidad	purificación después de la síntesis.
Liposomas	Líquido	Capacidad para encapsular activos solubles en agua en su cavidad o solubilizar activos lipófilos en su bicapa Alta estabilidad Producción a gran escala	Liberación rápida Vida útil corta
Nanofibras	Sólido	Amplia área superficial y porosidad Alta permeabilidad a gases	Baja solubilidad de biopolímeros

2.2.1.1. Nanofibras electroestiradas

Las nanofibras son estructuras ultrafinas con diámetros por debajo de los 100 nm y una relación entre longitud y anchura generalmente mayores a 50 nm, poseen gran relación área superficial/ volumen, alta porosidad y tamaño de poro pequeño, uniformidad en tamaño, flexibilidad en la estructura ensamblada, facilidad de funcionalización con compuestos activos y capacidad de formar andamios enredados (S. Chen, Li, Li, & Xie, 2018). Existen diferentes métodos para la elaboración de fibras como el hilado en seco, hilado húmedo, hilado por fusión e hilado en gel, sin embargo las fibras obtenidas presentan diámetros en la escala submicrómica. En los últimos años se ha desarrollado una técnica denominada electroestirado que es capaz de producir fibras poliméricas con diámetros nanométricos (Agarwal, Greiner, & Wendorff, 2013).

El uso de este sistema de encapsulación se ha limitado a aplicaciones cosméticas, de filtración y biomédicas incluyendo ingeniería de tejidos, parches para heridas, biosensores y sistemas de liberación controlada (fármacos). Sin embargo en el área de alimentos, su uso se ha visto limitado por el empleo de polímeros sintéticos para su elaboración (Okutan, Terzi, & Altay, 2014; Wongsasulak, Patapeejumruswong, Weiss, Supaphol, & Yoovidhya, 2010; Zheng et al., 2013). Una de las principales desventajas que enfrenta este tipo de sistemas de encapsulación es que los polímeros utilizados no son grado alimentario, sin

embargo se han logrado elaborar nanofibras con diferentes polímeros naturales como los que se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Polímeros utilizados para la fabricación de nanofibras

Polímero	Co-polímero	Solvente	Diámetro	Ref.
Zeína	Ciclo dextrinas γ -CD 10	DMF	60 nm	(Kayaci & Uyar 2012)
Zeína	Polivinilpirrolidona PVP	Etanol-agua	730 nm	(Jiang, Mo, & Yu, 2012)
Proteína de suero	β -lactoglobulina PEO (75:25)	Agua desionizada	668nm	(Sullivan, Tang, Kennedy, Talwar, & Khan, 2014)
Ciclodextrina	Acetato de celulosa	Etanol		(Celebioglu & Uyar 2013)
Albumina Bovina	Mercaptoetanol	Trifluoroetanol/ agua		(Dror et al., 2008)
Caseína	PEO	Agua	100-500nm	(Xie & Hsieh 2003)
Gelatina	Quitosano	Ácido trifluoroacético diclorometano	250nm	(X. Wang, Yue, & Lee, 2015)
Nanofibras de fibra piña	PVA	Agua destilada		(L. M. M. Costa et al., 2013)
Aislado proteico de soya	PEO	Agua		(S. Wang, Marcone, Barbut, & Lim, 2013)
Proteína de soya	PEO PLA	Solución de hidróxido de sodio (1%)	200 nm	(Vega-Lugo & Lim 2009)
Colágeno	PLA Quitosano	Acido fórmico Cloroformo Acetona	500 nm	(Swarnalatha et al., 2013)
Albumina de huevo	Acetato de celulosa	Ácido fórmico y acético	410 nm	(Wongsasulak et al., 2010)

2.2.1.2. Aplicaciones

Debido a las diversas ventajas que las fibras producidas por el proceso de electroestirado presentan, sus aplicaciones son variadas, desde la industria textil, industria farmacéutica, industria biomédica e industria de alimentos (Zhong et al., 2018).

En el área médica se han realizado diversos estudios sobre la producción de nanofibras cargadas con diversos antibióticos. Por ejemplo las desarrolladas por Sohrabi et al. 2013, quienes evaluaron el mecanismo de liberación del antibiótico ampicilina cargado en fibras electroestiradas, elaboradas con poli-metil-metacrilato y nylon, observando que mantenía una liberación sostenida que mejoraba su efecto antimicrobiano, cuando se encontraban en contacto directo con la zona afectada, por otro lado en la industria de alimentos, se está incursionando en el desarrollo de fibras a partir de polímeros naturales como zeína, que se utilizó para la encapsulación de ácido gálico en nanofibras, con el fin de incorporarlo como ingrediente funcional en alimentos y así aumentar su valor comercial (Neo, Swift, et al., 2013). Otro uso de las nanofibras es la elaboración de películas para el recubrimiento de alimentos. Estas películas pueden proteger al alimento encapsulando sustancias bioactivas como antioxidantes o antimicrobianos, tal es el caso de las bacteriocinas que se están utilizando para dar un valor agregado a alimentos de la industria cárnica y láctea. Recientemente, el grupo de trabajo en colaboración con el grupo de investigación de nuevos materiales y nanotecnología del IATA-CSIC, España, desarrollaron nanofibras basadas en aislados de proteína de amaranto con la técnica de electroestirado (Patente P201131705; Aceituno *et al.*, 2013).

2.2.2. Electroestirado

El electroestirado es un método simple de producción continua de fibras ultrafinas con diámetros desde unos pocos micrómetros hasta unos pocos nanómetros con la ayuda de un campo eléctrico (Zhong et al., 2018). Esta técnica utiliza la acción de un campo eléctrico externo aplicado a la solución del polímero. La morfología y

el diámetro de las nanofibras, dependen de una serie de parámetros, entre los que se encuentran: las propiedades y composición de la solución, el tipo de polímero utilizado, la viscosidad, conductividad y polaridad de la solución, así como la tensión superficial del disolvente (Okutan et al., 2014).

El proceso de electroestirado consta de diferentes etapas, entre las que se puede mencionar el bombeo de la solución polimérica al electrodo (aguja), hasta la etapa final de recolección de fibras. El principio básico de electroestirado, consiste en aplicar una diferencia de potencial a una solución polimérica, para superar la tensión superficial del polímero y alcanzar un potencial crítico, capaz de perturbar el equilibrio de la gota en la punta del capilar y que ésta adquiera una forma cónica denominada cono de Taylor (Rogina, 2014; Subbiah, Bhat, Tock, Parameswaran, & Ramkumar, 2005).

Cuando el potencial aplicado alcanza el valor crítico, requerido para superar la tensión superficial del líquido, éste sufre un movimiento caótico o inestabilidad de flexión, un chorro de líquido es expulsado y el campo se dirige hacia el colector cargado de forma negativa, que recoge las fibras. Como el chorro viaja a través de la atmósfera, el solvente se evapora, dejando detrás una fibra seca en el dispositivo de recolección (Fig. 3). En las soluciones de baja viscosidad y poco entrelazamiento de las cadenas del polímero, el chorro se rompe en gotitas, mientras que para soluciones de alta viscosidad, se desplaza hacia el colector en forma de fibras con diámetros entre 50 nm y 10 μm (Subbiah et al. 2005; Electrospinning and Aplicaciones 2007; Kong & Ziegler 2013)

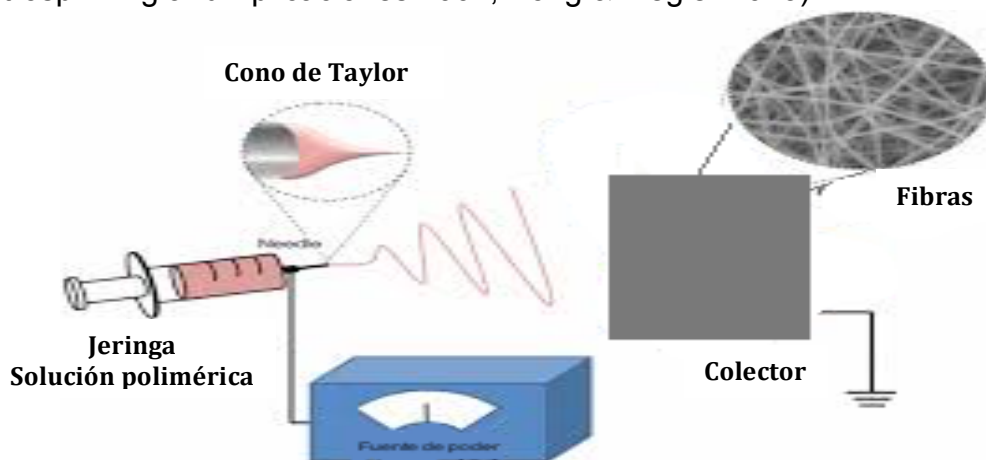


Figura 3. Esquema general de equipo de electroestirado

2.3. Bacteriocinas

2.3.1. Definición y clasificación

Las bacteriocinas son pequeños péptidos antimicrobianos que se sintetizan a nivel ribosomal, pueden sufrir modificaciones postraduccionales y son segregadas al exterior por una bacteria, principalmente ácido lácticas (Chikindas, Weeks, Drider, Chistyakov, & Dicks, 2018). La bacteria que la produce es inmune a la bacteriocina. En condiciones normales, las bacteriocinas son activas exclusivamente frente a bacterias Gram-positivas, sin embargo en presencia de otros factores de estrés pueden ser activas contra bacterias Gram-negativas. La amplitud en el número de especies y cepas inhibidas depende de cada bacteriocina, pues puede ser estrecho y confinado a la inhibición de especies que se encuentren relacionadas con su crecimiento, o puede ser relativamente amplio e incluir muchas especies bacterianas diferentes (Balciunas et al., 2013).

Muchas de las bacteriocinas de las BAL, son moléculas catiónicas, hidrofóbicas o anfifílicas, compuestas de 20 a 60 aminoácidos, generalmente tienen bajo peso molecular (raramente más de 10kDa), se someten a modificaciones postraduccionales y muestran sensibilidad a las enzimas proteolíticas, especialmente a las proteasas y son inofensivas para el consumo humano (Sidhu & Nehra 2017). Estas bacteriocinas son clasificadas comúnmente en 3 clases, siendo la clase I una de las más importantes debido a que en ella se encuentra a la nisina la clase I también denominada como Lantibióticos incluye a péptidos pequeños activos a nivel de membrana que contienen aminoácidos inusuales o poco comunes como lantionina (Lan), α -metil lantionina (MeLan), deshidroalanina y deshidrobutirina, formados en modificaciones post-traduccionales (Chen & Hoover 2003).

2.3.2. Uso en alimentos

En los últimos años, una gran cantidad de trabajos se han dirigido a la detección, purificación y caracterización de bacteriocinas. Se ha considerado su uso en las estrategias de conservación de alimentos, por ejemplo, la adición a los alimentos

de bacterias que produzcan bacteriocinas o la incorporación de las bacteriocinas en forma de concentrados, parcial o totalmente purificados. Sin embargo para su adición en alimentos se requiere una aprobación específica como conservantes de acuerdo a la legislación vigente. Hasta el momento, la nisina y la pediocina PA-1, son las únicas bacteriocinas con licencia para usarse como conservantes de alimentos (Balciunas et al., 2013). En el Cuadro 4 se muestran, algunas bacteriocinas con aplicación en alimentos.

Cuadro 4. Aplicación de bacteriocinas en alimentos, acoplado de (Balciunas et al., 2013)

Bacteriocina	Productor	Actividad	Alimento	Reducción (log UFC/g)
Nisina	<i>L. lactis</i>	<i>B. thermosphacta</i>	Carne	3.5
Nisina	<i>L. lactis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Leche	6
Pediocina	<i>L. plantarum</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Queso	1-2
Enterocina	<i>E. faecalis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Leche	2
Enterocina	<i>E. faecium</i>	<i>S. aureus</i>	Salchichas	5.3
Nisina Z	<i>L. lactis</i>	<i>S. aureus</i>	Queso	2

2.3.3. Nisina

Nisina es un péptido pequeño descubierto en 1920, consta de 34 residuos de aminoácidos (Figura 4) y tiene un peso molecular de 3.4 kD, es producido por la bacteria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Es un antibacteriano ampliamente utilizado como conservador de alimentos, debido a su potente actividad bactericida contra una gran variedad de bacterias que deterioran los alimentos, principalmente Gram-positivas como *L. monocytogenes*, *Clostridium botulinum* y *Bacillus cereus*. Se produce por algunas cepas de *Lactococcus lactis*. Se han estudiado dos grupos de nisina, A y Z, diferenciadas por el aminoácido del residuo 27, el grupo A contiene Histidina, mientras que el B tiene Asparagina, sin embargo no presentan

diferencias en su poder antimicrobiano (Gruskiene, Krivorotova, & Sereikaite, 2017).

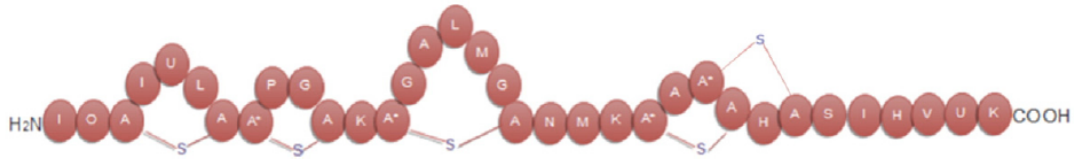


Figura 4. Estructura de la nisina que representa una cadena de 34 aminoácidos con 5 anillos cíclicos (Khan & Oh 2015).

La nisina tiene el reconocimiento de ser una sustancia GRAS (Generalmente reconocida como segura) por la FDA, pues se ha evaluado su toxicidad en modelos animales de ratas y cobayos encontrándose inofensiva o con una muy baja toxicidad, de acuerdo al comité FAO/WHO se permite una ingesta diaria de 33,000 unidades de nisina por 70kg de peso, sin embargo en cada país el máximo permisible difiere, siendo México unos de los países que presenta el más bajo con 500 UI/g de alimento procesado o queso, tomando en cuenta estas legislaciones, esta bacteriocina ha sido utilizada para la preservación de diversos alimentos, entre los que se incluyen queso, ensaladas, sopas instantáneas, reservorios para pescado, comida de bebe y malteadas (Khan & Deog-Hwan 2015).

2.3.3.1. Mecanismo de acción

Uno de los principales mecanismos de acción antimicrobiana de nisina es la formación de poros, principalmente en aquellas bacterias que tienen en su estructura celular la presencia del denominado lípido II, esto debido a que es capaz de formar un complejo estable nisina-lípido II, mediante la unión el extremo N-terminal, formando una jaula de pirofosfato alrededor del grupo de cabeza del Lípido II, posterior a esta unión la región C-terminal de la nisina se inserta en la membrana celular, llevando a la formación de poros como se muestra en la Figura 5, estos poros permiten la liberación de los componentes celulares (Sun et al. 2009; Magalhães & Nitschke 2013; Iburguren et al. 2014) y una rápida disipación

del potencial electrostático transmembrana que resulta en permeabilización de la membrana y por tanto una muerte celular acelerada (Khan & Oh 2015).

Además de la generación de poros, se sabe que la nisina es capaz de inhibir la biosíntesis de pared celular al interrumpir la producción de peptidoglicano y de igual manera inhibir el desarrollo de algunas esporas bacterianas (Khan & Deog-Hwan 2015; Prince et al. 2016).

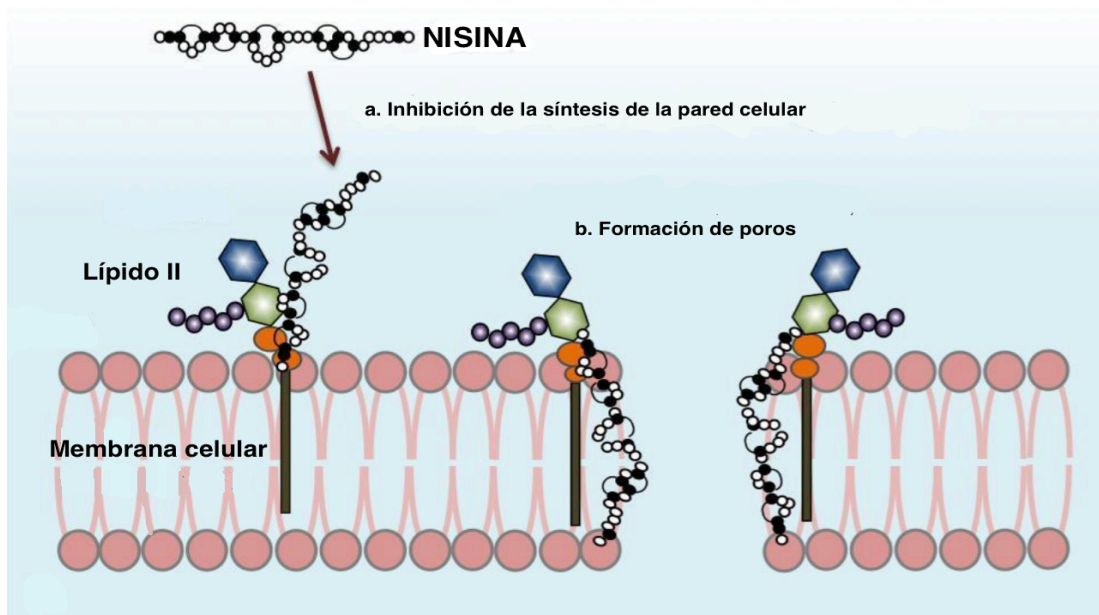


Figura 5. Principales mecanismos de acción de nisina en la célula bacteriana (Prince et al., 2016)

2.3.3.1. Limitantes de uso

El uso de las bacteriocinas en su estado libre es caro y se relaciona con pérdidas de la actividad antimicrobiana debido a la degradación, oxidación e interacciones con componentes del alimento (Hosseini et al., 2014; Laridi et al., 2003).

Los factores que pueden influir en la pérdida de la eficiencia antimicrobiana se relacionan con los componentes de los alimentos interaccionando con cationes divalentes, enzimas, grasa, proteínas, glutatión, proteasas, meta bisulfito de sodio y dióxido de titanio entre otros (Khan & Deog-Hwan 2015).

En diversos estudios se ha observado que las bacteriocinas interactúan con la grasa y proteínas del alimento, un ejemplo de ello es lo reportado por Aasen et al. (2003), quienes estudiaron las interacciones de Sakacina P con matrices alimentarias como un homogenizado de salmón ahumado, embutidos de pollo y pollo crudo, usando como comparación nisina. Se observó que más del 80% de las bacteriocinas se unió con las proteínas de los alimentos que no habían sido tratados térmicamente, la interacción con matrices de alto contenido de triglicéridos provocó la desactivación total de las bacteriocinas. En alimentos como el queso se ha estudiado la adición de nisina en su forma libre y de cultivos productores de nisina, observando en el primer caso que existe una disminución considerable de la actividad al interactuar con la caseína de la leche, por otro lado la adición de cultivos iniciadores no permite una elaboración eficaz del queso y cambia las propiedades sensoriales del producto (Imran et al., 2012).

2.4. Nanopartículas metálicas

Las nanopartículas metálicas (NPS) constituyen una nueva clase de estructuras químicas que se usan en diferentes campos científicos, como la plasmónica, óptica, catálisis, bioquímica y alimentos (Illas, 2014). Se han elaborado nanopartículas con diferentes metales como el oro, cobre, zinc y plata con diferentes aplicaciones y formas de síntesis (Geethalakshmi & Sarada 2013). Las nanopartículas metálicas presentan propiedades ópticas, térmicas, químicas y físicas inusuales que se deben a la combinación de una gran proporción de átomos de alta energía en la superficie en comparación con los metales sólidos y a la escala de nanómetros, siendo una principal característica el Plasmón formado en la superficie de las nanopartículas (Khan & Oh 2015).

2.4.1. Síntesis de nanopartículas

Los métodos de síntesis de nanopartículas suelen agruparse en dos categorías los métodos de “arriba hacia abajo” y las de “abajo hacia arriba” (Rao & Paria, 2013; Thakkar, Mhatre, & Parikh, 2010). La primera consiste en la división de partículas de gran tamaño en porciones más pequeñas, involucrando procesos de molienda,

métodos químicos y volatilización de sólidos. Los segundos métodos consisten en la fabricación de nanopartículas a través de la condensación de átomos o entidades moleculares en una fase gaseosa o solución, es decir pasamos de algo pequeño a algo más grande, dentro de este enfoque se encuentra la reducción que es el método más popular para la síntesis, la cual inicia con la reducción de los iones metálicos, seguida por la agregación controlada de los átomos y finalmente una estabilización como se muestra en la Figura 6 (A. Kumar, Chisti, & Chand, 2013). Entre los métodos más representativos de esta aproximación encontramos el proceso de micelas reversibles, la reducción por calentamiento dieléctrico, irradiación con microondas, irradiación ultrasónica, radiólisis, síntesis electroquímica y reducción química de sales metálicas (Guzmán, Dille, & Godet, 2008; Nano, 2012).

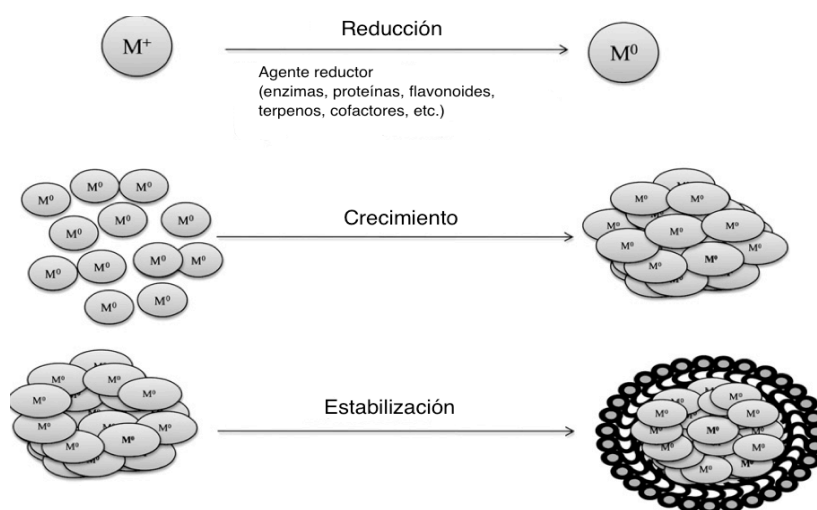


Figura 6. Proceso general de síntesis de nanopartículas del “abajo hacia arriba” (A. Kumar et al., 2013).

Una de las mejores técnicas para llevar a cabo la reducción de sales de metales de transición en presencia de agentes estabilizantes. El mecanismo de formación se basa en la reducción del metal con carga positiva a un átomo cero valente, que posteriormente actuará como centro de nucleación, dando lugar a la formación de aglomerados cuyo crecimiento continuará a medida que se sigan agregando más átomos, formándose así partículas de mayor tamaño y formas poliédricas más

compleja. Es necesario estabilizar las partículas mediante la envoltura de moléculas o "agentes" estabilizadores (polímeros generalmente) que se adsorben en su superficie, inhibiendo de esta manera el proceso de aglomeración (Patel, Kapoor, Dave, & Mukherjee, 2005).

La principal ventaja del método de reducción química es su reproducibilidad y la posibilidad de obtener coloides monodispersos con una distribución estrecha en el tamaño de las partícula, razón por la cual, son frecuentemente preparadas nanopartículas metálicas siguiendo esta metodología, empleando como agentes reductores especies químicas tales como: ácidos orgánicos, alcoholes, polioles, aldehídos y azúcares (Sifontes et al., 2010), sin embargo una de las principales desventajas de este método es el uso de agentes reductores tóxicos, que limitan su uso en áreas como la médica, farmacéutica y alimenticia, es por ello que se busca el uso de nuevos agentes reductores que sean compatibles con estas áreas (Muthuvel, Adavallan, Balamurugan, & Krishnakumar, 2014).

2.4.2. Síntesis verde

La síntesis de nanopartículas metálicas ha sido ampliamente estudiada empleando diversos métodos químicos y físicos, sin embargo se busca el desarrollo de tecnologías confiables, debido a que estos métodos presentan algunas desventajas ya que resultan costosos e implican el uso de algunos compuestos químicos tóxicos que repercuten en el ambiente y en la salud de los consumidores ya que las nanopartículas producidas pueden presentar residuos de los compuestos tóxicos, utilizados para su síntesis, adheridos a su superficie lo que resulta adverso para su aplicación en áreas como la biomédica de alimentos (Phongtongpasuk, Poadang, & Yongvanich, 2016). Por lo que en los últimos años han surgido nuevos métodos biológicos basados en el uso de microorganismos, enzimas y extractos de plantas y frutas, a los que se les denomina como síntesis verde. Estos procesos son amigables con el medio ambiente, en donde no se utilizan productos químicos tóxicos, son sencillos y sostenibles lo que los hace una alternativa segura para la síntesis de nanopartículas de plata (Rasheed, Bilal,

Iqbal, & Li, 2017). En este sentido el uso de extractos de plantas o frutas es uno de los más utilizados, ya que presentan algunas ventajas en comparación con el uso de microorganismos como se muestra en el Cuadro 5. Entre los métodos biológicos encontramos el uso de extractos de plantas que van desde moringa y manzanilla, extractos vegetales principalmente de cebolla y microorganismos como hongos, levaduras, bacterias y virus (A. Kumar et al., 2013; Thakkar et al., 2010). Además de esto existen métodos físicos como la molienda que han sido modificados para una producción a mayor escala (Malik, Shankar, Malik, Sharma, & Mukherjee, 2014).

Cuadro 5. Ventajas y desventajas de los métodos de síntesis verde de nanopartículas (Thakkar et al., 2010).

Técnica	Ventaja	Desventaja
Extractos de plantas y vegetales	Rápido	Variabilidad alta
	Barato	
	No tóxico	
Microorganismos	Barato	Complicado
	No tóxico	Consume mucho tiempo
	Específico	

2.4.2.1. Uso de extractos de plantas para síntesis de nanopartículas

Durante mucho tiempo se ha sabido que las plantas son capaces de reducir iones metálicos tanto en su superficie como en diversos órganos y tejidos, esta característica ha sido utilizada para la obtención de nanopartículas metálicas, sin embargo el tamaño de partícula y la falta de homogeneidad hacen poco posible el uso de este método de síntesis, por lo que se utiliza un enfoque encaminado al uso de extractos de plantas para la bioreducción de iones metálicos (Makarov et al., 2014). En la producción de nanopartículas utilizando extractos de plantas, el

extracto se mezcla con una solución de la sal del metal a temperatura ambiente y la reacción se completa en minutos. Algunos factores que afectan la síntesis de nanopartículas son las características de los componentes del extracto, su concentración, la concentración de la sal metálica, el pH, la temperatura y el tiempo de contacto (Gaur, Mishra, & Purohit, 2013). La síntesis de partículas metálicas con extractos de plantas y frutas involucra la reducción química de los iones a un estado cero valente, llevada a cabo por los metabolitos secundarios de los extractos, tal es el caso de terpenoides, flavonoides y ácidos fenólicos (Figura 7). Se pueden identificar tres fases en la síntesis de nanopartículas metálicas, la primera denominada “nucleación”, donde los átomos en estado cerovalente forman un núcleo pequeño; la siguiente fase denominada de “crecimiento” en donde los átomos comienzan a adherirse al núcleo y la última denominada como “capping” en donde los metabolitos en su forma oxidada se adhieren a la superficie de las nanopartículas para estabilizarla (S. Ahmed, Ahmad, Swami, & Ikram, 2016).

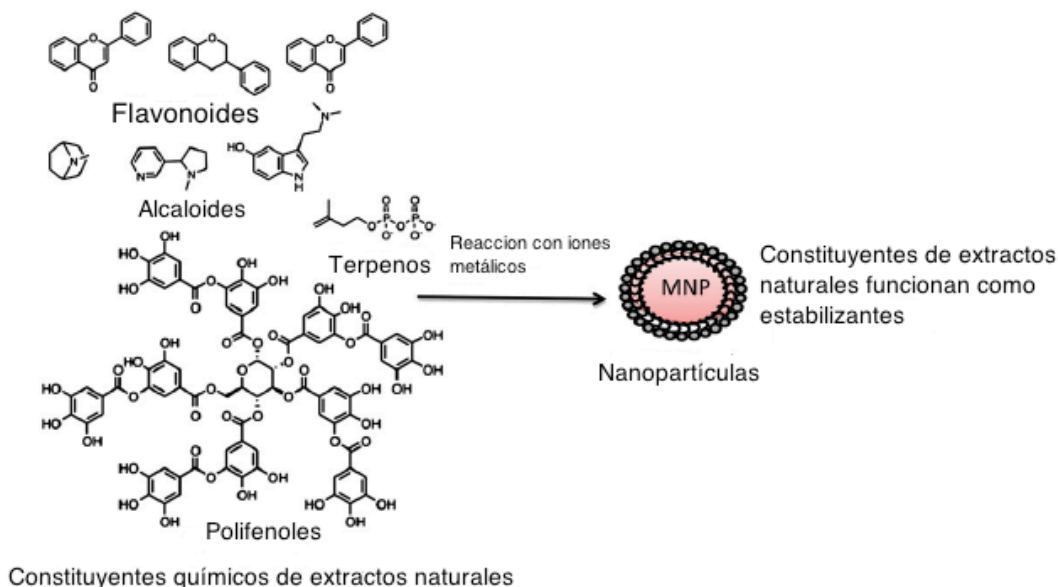


Figura 7. Componentes de plantas responsables de la reducción de sales metálicas (A. Kumar et al., 2013).

Existe una gran diversidad de extractos de plantas y frutas usados para la síntesis de nanopartículas metálicas (Cuadro 6) siendo los metales más utilizados oro, cobre, platino y plata (Muthuvel et al., 2014).

Cuadro 6. Ejemplos de nanopartículas elaboradas a partir de extractos de plantas

Planta	Metal	Tamaño (nm)	Referencia
<i>Trianthema decandra L</i>	Au	17.9- 56.7	(Geethalakshmi & Sarada 2013)
<i>Eucalyptus oleosa</i>	Au	21	(Pourmortazavi, Taghdiri, Makari, & Rahimi-Nasrabadi, 2015)
<i>Solanum nigrum</i>	Au	50	(Muthuvel et al., 2014)
<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>	Au	10-40	(Cai, Li, Sun, & Ji, 2011)
<i>Euphorbia hirta</i>	Au	6-71	(Annamalai, Christina, Sudha, Kalpana, & Lakshmi, 2013)
<i>Diopyros kaki</i>	Pt	15-19	(Song, Kwon, & Kim, 2010)
<i>Jatropha curcas L. latex</i>	Pb	10-12.5	(Joglekar, Kodam, Dhaygude, & Hudlikar, 2011)
<i>Hovenia dulcis</i>	Au	20	(Basavegowda, Idhayadhulla, & Lee, 2014)
<i>Chenopodium album</i>	Au	10-30	(Dwivedi & Gopal 2010)
<i>Terminalia arjuna</i>	Au	20-50	(Gopinath, et al., 2013)

2.4.3. Nanopartículas de plata

La plata es un agente antibacteriano seguro y no tóxico que es capaz de inhibir el crecimiento o matar alrededor de 650 tipos de microorganismos patógenos, se ha observado que en su estado nanométrico es decir en forma de nanopartículas exhiben un efecto antimicrobiano mejorado (Ibrahim, 2015). Las nanopartículas de plata (AgNPs) han sido ampliamente estudiadas debido a las excelentes propiedades fisicoquímicas y en consecuencia sus potenciales aplicaciones en los campos de física, química, ciencia de los materiales, opto eléctrica, energías renovables, remediación del medio ambiente y dispositivos biomédicos (Ruíz-baltazar, Reyes-lópez, Larrañaga, & Estévez, 2017). Las nanopartículas de plata tienen como propiedades gran área superficial, tamaño muy pequeño (<20 nm) y alta conductividad eléctrica y térmica, dispersión Raman mejorada en la superficie, estabilidad química, alta actividad catalítica y actividad antimicrobiana (Rasheed et al., 2017). Diferentes rutas de producción de nanopartículas de plata han sido investigadas, algunas están basadas en la reducción de nitrato de plata por borohidruro de sodio o citrato de sodio. Otros métodos incluyen el uso de microondas, electrolisis, co-condensación, microemulsión y fotoreducción de iones Ag y la síntesis verde mediante el uso de extractos de plantas o frutas (Sulaiman et al., 2013). Las nanopartículas de plata poseen muchas aplicaciones potenciales tales como agentes antimicrobianos, purificadores de aire y agua, ingredientes para tintas, industria textil, electrónica y medicina (Khalil et al. 2013; Rao & Paria 2013). Como se mencionó en el apartado anterior los compuestos fenólicos son los responsables de la reducción de los iones de Ag^+ a Ag^0 y posteriormente de funcionalizar la superficie (Figura 8).

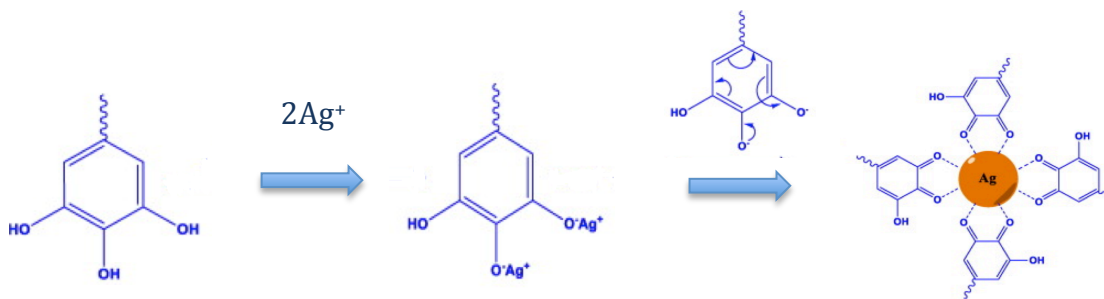


Figura 8. Mecanismo de síntesis de nanopartículas de plata mediante el uso de compuestos fenólicos (Park & Seonho 2016).

Algunos ejemplos del uso de extractos naturales de plantas y residuos de frutas usados para la síntesis de nanopartículas de plata se presentan en el Cuadro 7. La mayoría de estos estudios están enfocados en la investigación de su actividad antimicrobiana y catalítica.

Cuadro 7. Nanopartículas de plata elaboradas por reducción con extractos de plantas

Planta	Tamaño (nm)	Morfología	Referencia
<i>Olive</i>	20-25	Esféricas	(Khalil et al., 2013)
<i>Moringa oleifera</i>	57	Esféricas	(Prasad & Elumalai 2011)
<i>Chenopodium murale</i>	30-50	Esféricas	(Abdel-aziz, Shaheen, & El-nekeety, 2014)
<i>Piper longum</i>	15-200	Esféricas	(Reddy, Vali, Rani, & Rani, 2014)
<i>Boerhaavia diffusa</i>	25	Esféricas	(P. P. N. V. Kumar, et al, 2014)
<i>Ziziphora tenuior</i>	8-40	Esféricas	(Sadeghi & Gholamhoseinpoor 2015)
<i>Pistacia atlantica</i>	10-50	Esféricas	(Sadeghi & Gholamhoseinpoor 2015)
<i>Cocos nucifera</i>	22	Esféricas	(Mariselvam et al., 2014)
Arandanos	30-50	Esféricas	(Puišo et al., 2014)
Cascara de plátano	23.7	Esféricas	(Park & Seonho 2016)
Piel de papaya	16-29	Esféricas	(Park & Seonho 2016)
Residuos de Té	45	Esféricas	(Qing, Chen, Wang, Liu, & Lu, 2017)

2.4.4. Mecanismo de acción antimicrobiana y espectro antimicrobiano

Las nanopartículas de plata muestran mejores propiedades antimicrobianas en comparación con otras sales metálicas debido a su área de superficie extremadamente grande que proporciona un mejor contacto con los microorganismos. Las nanopartículas se unen a la membrana celular y tienen la capacidad de penetrar en el interior de las células bacterianas. La membrana bacteriana contiene proteínas que presenta azufre y las nanopartículas de plata interactúan con estas proteínas en la célula, así como con los compuestos que contienen fósforo como el ADN. Las nanopartículas de plata que ingresan en la célula bacteriana forman conglomerados de iones en el centro de las bacterias, los cuales interactúan con grupos tiol de enzimas vitales para el crecimiento microbiano. Las nanopartículas atacan preferentemente la cadena respiratoria, la división celular y finalmente conducen a la muerte celular. Las nanopartículas liberan iones de plata en las células bacterianas, que potencian su actividad bactericida mediante la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que generan un desequilibrio celular y finalmente la muerte (Figura 9) (Rai et al. 2009; Prabhu & Poulouse 2012).

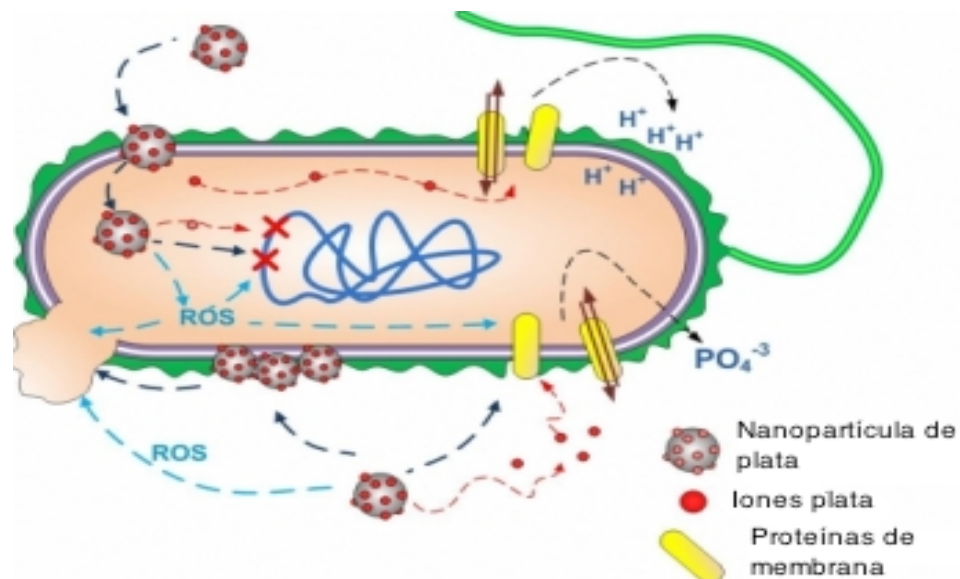


Figura 9. Diagrama que resume la interacción de nanopartículas de plata con células bacterianas. Nanopartículas pueden (1) liberar iones de plata y generar ROS; (2) interactuar con las proteínas de membrana que afecta a su correcto

funcionamiento; (3) acumularse en la membrana celular que afecta a la permeabilidad de membrana; (4) entrar en la célula en la que puede generar ROS, liberar iones de plata y afectar el ADN.

El espectro antimicrobiano de las nanopartículas de plata es muy amplio, se ha estudiado contra diversos microorganismos como *Escherchia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *S. aureus*, *B. cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Candida albicans*, incluso contra virus como el sida, obteniendo resultados similares a los de antibióticos comerciales como el cloranfenicol (Prasad & Elumalai 2011; Annamalai et al. 2013; Geethalakshmi & Sarada 2013; Mocanu et al. 2014).

2.4.5. Uso en alimentos

Las AgNPs (Nanopartículas de plata) tienen aplicación en el sector alimentario, concretamente en la agricultura y en el envasado de los alimentos. Dentro del campo de la agricultura, las AgNPs se emplean para prolongar la conservación de frutos, ya que además de su actividad antibacteriana presentan un efecto fungistático que retarda el crecimiento de hongos fitopatógenos. Estas NPs pueden aplicarse junto con un recubrimiento biodegradable en los frutos, mediante la inmersión de los mismos en la solución formadora de recubrimiento (Mendez, 2009). Además, las AgNPs también son empleadas en la fabricación de materiales en contacto con los alimentos, eliminando hasta en un 90% el crecimiento de microorganismos en los alimentos (Ávalos, Haza, & Morales, 2013), siendo una alternativa a otros métodos de conservación de alimentos que emplean la radiación o el tratamiento térmico. En el cuadro 8 se presentan ejemplos de películas poliméricas empleadas para empaques alimentarios adicionadas con nanopartículas metálicas, observado que el metal más utilizado es la plata. Ejemplos de empaques en la industria se encuentra el desarrollado por la empresa ucraniana Biomaster que produce aditivos a base de AgNPs con actividad antimicrobiana contra *Campylobacter* y la empresa española Nanobiomatters

donde se desarrollo un empaque a partir de la mezcla de AgNPS y nanoarcilla, denominado BactiBlock.

Cuadro 8. Nanopartículas metálicas incorporadas en materiales de empaque

Metal	Método de síntesis	Película utilizada	Propiedades antimicrobianas	Fuente
Plata	Reducción química con fructosa	Polietileno	<i>S. aureus</i> y <i>E.coli</i>	(Sadeghnejad, Aroujalian, Raisi, & Fazel, 2014)
Plata	Reducción química con citrato	Agar	Propiedades barrera contra vapor de agua <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Escherichia coli</i> O157:H7	(Rhim, Wang, Lee, & Hong, 2014)
Plata	Reducción con borohidruro de sodio	Celulosa	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	(Fortunati et al., 2014)
Zinc	Reducción química con hidróxido de sodio	Alginato de calcio	<i>S. Typhimurium</i> y <i>S. aureus</i>	(Akbar & Anal 2014)
Zinc	Proceso de malla	Gelatina bovina	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	(Nafchi, Nassiri, Sheibani, Ariffin, & Karim, 2013)
Cobre	Tratamiento térmico y UV	Celulosa	Hongos y levaduras	(Llorens, Lloret, Picouet, Trbojevich, & Fernandez, 2012)

2.5. Orégano mexicano (*Lippia graveolens*)

La planta de orégano (Figura 10) es un arbusto distribuido ampliamente en la República mexicana, en zonas tropicales, templadas, áridas y semiárida. Se tiene

identificadas alrededor de 40 especies de plantas a las cuales se les denomina como “orégano”, estas pertenecen a cuatro familias botánicas: Asterácea (Compositae), Laminaceae (Labiatae), Fabacee (Leguminoseae) y Verbenaceae, de esta última se desprende el género *Lippia*, del cual se desarrollan tres especies: *Lippia graveolens* HBK., *L. berlandieri* Schauer y *L. palmeri* (Fuentes & Mendoza 2011). En la medicina tradicional mexicana, las partes aéreas de la planta se usan como antiséptico, antipirético, analgésico, abortivo, antiespasmódico, agente antiinflamatorio y para el tratamiento de trastornos menstruales y diabetes. El orégano es una de las principales hierbas culinarias en el comercio mundial y su aceite esencial se utiliza para preparar bebidas alcohólicas, productos horneados, carnes, productos lácteos, vegetales procesados, bocadillos, grasas y aceites que involucran un mercado importante (Hernandez-Sandoval et al. 2008). Actualmente también se emplea como antimicrobiano para combatir algunas bacterias patógenas, tanto bacterias Gram-positivas como Gram-negativa, también contra levaduras y hongos filamentosos (Soto-Domínguez, García-Garza, Ramírez-Casas, Morán-Martínez, & Serrano-Gallardo, 2012); es por ellos que se utiliza como antimicrobiano con un amplio espectro. Sus propiedades antimicrobianas se relacionan con la presencia de monoterpenos como el timol, carvacrol p-cimeno y otros compuestos fenólicos presentes en los extractos o aceites esenciales (Salgueiro, Cavaleiro, Goncalves, & Proenca da Cunha, 2003).



Figura 10. Imagen de A) Pericón B) Orégano C) Bagazo de naranja y D) Mosto de uva secos, materiales utilizados para la síntesis de nanopartículas de plata.

2.6. Pericón (*Tagetes lucida*)

El género *Tagetes Lucida* Cav (Figura 10), corresponde a una planta Asterácea aromática nativa de México que fue y sigue siendo una de las plantas rituales más importantes, se puede encontrar en Aguascalientes, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán . Sus nombres comunes incluyen “Pericón”, “yauhtli” (nahualt), “hierba anís” ó “hierba de Santa María”. Las infusiones de esta planta son ampliamente utilizadas para el tratamiento de la ansiedad, espanto o susto, en algunas regiones de México es conocida por su actividad antidepresiva. Las partes aéreas de la planta son consumidas por vía oral en infusiones y extractos hidroalcohólicos, los cuales han mostrado propiedades antimicrobiana, insecticidas, antioxidantes y citotóxico que están relacionados con la presencia de compuestos como terpenos, flavonoides y algunas cumarinas (Abdala, 1999; Pérez-Ortega et al., 2016).

2.7. Bagazo de naranja

El naranjo es un árbol de la familia de las *Rutáceas*, subfamilia *arancioiea* del genero *Citrus*. Se requieren de tres a cinco años para que produzca frutos. Actualmente, se producen más de 120 millones de toneladas de cítricos en todo el mundo, de las cuales el 40% es utilizado por la agroindustria para extraer cerca de la mitad del peso del fruto como zumo. El resto, la piel, las semillas y la pulpa se convierten en residuos (Londoño-Londoño, Sierra, Álvarez, Restrepo, & Pássaro, 2012).

El cultivo es típico de las regiones tropicales y subtropicales. Su fruto es uno de los más populares en México, conocido como naranja, que es un cítrico rico en vitamina C y aceites esenciales; su pulpa está formada típicamente por once gajos llenos de jugo que van de sanos ácido a dulce (Sagarpa, 2016). En el año 2017 se produjeron 320,793.57 ha, siendo los principales productores Aguascalientes, Baja California, Baja California Sur y Campeche (SIAP, 2017). De esta producción más del 80% es utilizado para la producción de Jugo de Naranja, del cual se obtienen diferentes subproductos, siendo el principal el conocido como “bagazo” (Figura

10), este constituye aproximadamente el 50% de la fruta y está compuesto por la piel (albedo y flavedo), pulpa y semillas, se ha estimado que se producen aproximadamente 15 millones de toneladas en el mundo, después de la extracción del jugo. El bagazo, por su alto contenido de agua y su potencial contaminante del ambiente, genera un problema a nivel de las plantas industriales, sin embargo ha sido utilizado como una alternativa en alimentación suplementaria para rumiantes, especialmente los bovinos, por su alto contenido de fibra (Laufenberg, Kunz, y Nystroem, 2003, Navarro-cortez et al. 2018). Además es una fuente importante de compuestos bioactivos incluyendo antioxidantes como ácido ascórbico, flavonoides, compuestos fenólicos y pectinas, los cuales son de gran importancia para la nutrición humana (Kaderides & Goula 2017).

2.8. Mosto de uva

La uva (*Vitis* spp.) es una de las frutas mejor valuada en todo el mundo, esta puede consumirse en fresco o ser usada como base para la fabricación de diversos productos como el vino, mermelada, gelatina y aceite de la semilla, es uno de los cultivos más sembrados y se producen a nivel mundial aproximadamente 50 millones de toneladas cada año, de las cuales el 75% es utilizado para la producción de vino (Beres et al., 2017). La especie más utilizada para la producción de vino es *Vitis vinifera* que comprende una gran variedad de uvas que van desde coloraciones blancas (*Chardonnay*, *Pinot Blanc*, *Gewürztraminer*, *Comtessa*, *Noblessa*) y rojas (*Pinot noir*, *Cabernet Sauvignon*, *Cabernet franc*, *Merlot*, *Petit Verdot*), dependiendo del tipo de vino que se produzca será la uva utilizada. Durante la producción de vino, como resultado del prensado y la fermentación se producen toneladas de desechos conocidos como mosto de uva u orujo (Figura 10), el cual se compone en gran medida por las semillas, cáscara y tallos de la fruta (Peixoto et al., 2018). Generalmente se ha utilizado para la fertilización de los mismos viñedos, metanización o producción de energía y alimentación animal, sin embargo, la eliminación del mosto o su uso como compostaje es dañino para el medio ambiente, ya que demora un tiempo considerable en descomponerse (Oliveira et al., 2018). Por esta razón actualmente

se buscan nuevos usos para estos desechos, entre los que se encuentran su incorporación a productos cosméticos, farmacéuticos y alimenticios, principalmente por su alto contenido de compuestos fenólicos, que pueden clasificarse en tres tipos: ácidos fenólicos (ácidos hidrobenczoicos e hidroxixinámicos), flavonoides (catequina, flavonoles y antocianinas) y proantocianidinas, los cuales pueden ser utilizados para la producción de nanopartículas de plata (Peixoto et al., 2018).

2.9. Nanocompositos

La fabricación de empaques para alimentos a partir de biopolímeros presenta diversas desventajas, principalmente en propiedades mecánicas y de barrera, por lo que requiere la combinación de varios materiales e incluso, la creación y desarrollo de materiales denominados nanocompositos (Arora & Padua 2010). Los nanocompositos consisten típicamente de una matriz polimérica o fase continua y una fase discontinua o relleno. Las fibras, nanoarcillas y partículas, se han utilizado durante décadas para formar compuestos de polímero con una mejora de las propiedades mecánicas y térmicas. Se denomina biocomposito cuando el material de relleno que se emplea proviene de fuentes naturales, y en algunas ocasiones, también se incluyen aquellos materiales cuya matriz es biodegradable. Los nanocompositos poliméricos pueden ser usados como materiales para la fabricación de empaques activos y de acuerdo con Huang et al. 2015 se pueden clasificar en cuatro tipos dependiendo de su uso:

1. **Mejora de empaques:** polímeros con nanorellenos, es decir adición de nanocompuestos con el fin de mejorar las propiedades del empaque como de barrera a gases, estabilidad a temperatura y humedad e incluso mejorar sus propiedades de bloqueo ultravioleta, para incrementar la vida útil.
2. **Empaques activos:** incorporación de nanorellenos con actividad antimicrobiana o antioxidante, que resultan retienen el crecimiento microbiano o inhiben por completo su crecimiento.

- 3. Empaques inteligentes:** incorporación de nanosensores para la detección o monitoreo de las condiciones del alimentos durante el almacenamiento y el transporte del producto.
- 4. Uso de materiales biodegradables:** la unión de polímeros biodegradables para la mejora de propiedades de barrera.

Entre los sistemas nanométricos que pueden ser incorporados se encuentran las nanopartículas de metálicas (oro, cobre, plata) que presentan propiedades antimicrobianas, siendo las nanopartículas de plata las más utilizadas para funcionalizar materiales poliméricos, como el quitosano, almidones y otros carbohidratos, proporcionando acción antimicrobiana contra *E. coli* y *Salmonella* y mejorando las propiedades térmicas y de barrera de los empaques (Huang et al., 2015).

3. JUSTIFICACIÓN

Durante el proceso de fabricación de un alimento, este se encuentra expuesto a diversas fuentes de contaminación, como microorganismos deterioradores que disminuyen la calidad organoléptica de los productos y/o microorganismos patógenos que disminuyen la inocuidad de los mismos, los métodos convencionales de conservación no presentan un amplio espectro antimicrobiano y solo eliminan parcialmente la carga de microorganismos, mientras que la adición de diferentes compuestos antimicrobianos permite eliminar de manera más eficiente la contaminación en un alimento. Sin embargo, en los últimos años existe una demanda creciente en la incorporación de antimicrobianos naturales a los alimentos para disminuir el uso de compuestos químicos, pero presentan la desventaja de ser inestables a factores como el pH y temperatura, además de presentar interacciones con el alimento que disminuyen su actividad. La encapsulación de estos compuestos representa una alternativa viable para resolver los problemas de estabilidad y disminución de actividad biológica. Las nanofibras electroestiradas pueden fabricarse a partir de materiales biodegradables y encapsular compuestos con diferentes mecanismos antimicrobianos como la nisina y las nanopartículas de plata.

4. HIPOTESIS

La incorporación de diferentes compuestos antimicrobianos en nanofibras de proteína de amaranto y pululano modificará las características fisicoquímicas del sistema de encapsulación, así como sus propiedades antimicrobianas.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Desarrollar y caracterizar fisicoquímicamente fibras electroestiradas de aislado proteico de amaranto incorporando bacteriocinas y/o nanopartículas de plata sintetizadas con extractos naturales para la fabricación de empaques activos.

5.1. Objetivos específicos

1. Evaluar perfiles de liberación de nanofibras electroestiradas de proteína de amaranto cargadas con bacteriocinas.
2. Obtener y caracterizar extractos metanólicos y acuosos de uva, naranja, orégano y pericón.
3. Sintetizar y caracterizar nanopartículas de plata con extractos metanólicos y acuosos de diferentes materiales.
4. Evaluar el mecanismo de acción antimicrobiana de las nanopartículas de plata.
5. Desarrollar nanocompositos de AgNPs, nanofibras electroestiradas de APA-PUL y nisina.
6. Caracterizar física y microbiológicamente los nanocompositos de AgNPs nanofibras electroestiradas de APA-PUL y nisina.

6. METODOLOGÍA

6.1. Materiales

Concentrado proteico de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L. variedad Revancha) suministrado por Nutrisol, San Miguel de Proyectos Agropecuarios S.P.R. de R.S. (SMPA), orégano (*Lippia graveolens*) de la región de San Juan Raya, Puebla, bagazo de naranja (recolectado de juguerías del mercado de la Cruz, Querétaro), mosto de uva *Vitis vinifera* variedad “Cavernet Sauvignon” seco proporcionado por la Vinícola La Redonda ubicada en Ezequiel Montes, Querétaro (Producción 2015), pericón (*Tagetes lucida*). Ácido clorhídrico (HCl), hidróxido de sodio (NaOH), pululano, Tween 80, ácido fórmico, nisina, agar para métodos estándar (AME), medio MRS, solución amortiguadora de fosfatos y citratos, carbonato de sodio, cloruro de sodio, Nitrato de plata (AgNO₃), Limoneno, Kit BCA para cuantificación de proteína, Cloruro de amonio (NH₄Cl).

6.1.1. Cepas

Salmonella Typhimurium (ATCC 14028); *Leuconostoc mesenteroides* (ATCC 8923), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 89213).

6.1.1.1. Lavado de cepas

Cepas de los diferentes microorganismos se activan en caldo soya tripticaseína por 24 h a 35°C, pasado este tiempo las cepas se transfieren a tubos eppendorf para centrifugarse a 6000 rpm durante 5 min, el pellet obtenido se resuspendió en 1 mL de solución salina estéril al 10% y se centrifuga nuevamente en las mismas condiciones, este proceso se repite por lo menos 3 veces.

6.2. Desarrollo y caracterización de fibras electroestiradas de proteína de amaranto y pululano

6.2.1. Elaboración de soluciones poliméricas y proceso de electroestirado

Para la producción de fibras electroestiradas, se elaboraron soluciones poliméricas de aislado proteico de amaranto y pululano en una relación 50:50, adicionando

como tensoactivo Tween 80 al 29% (con respecto a la proteína) en ácido fórmico, tomando como consideración un 10% de sólidos totales en la solución. Para las fibras cargadas con bacteriocinas se adicionaron por separado dos concentraciones de nisina, 10 y 20 mg mg/mL, las soluciones se dejaron en agitación por 2 h, posteriormente se llevó a cabo una caracterización de las soluciones en cuanto a su viscosidad (Reómetro Brookfield DV3T con software Rheocalc T 1.2.19) y conductividad eléctrica (Conductímetro ORION Star A212 de Thermo Scientific). Una vez caracterizadas las soluciones se sometieron al proceso de electroestirado en un aparato equipado con una fuente de alto voltaje que proporciona un rango variable de 0-30 KV. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente y las condiciones de voltaje, distancia al colector y flujo de alimentación se fijaron a 22 kV, 10 cm y 0.4 mL/h, respectivamente (Aceituno, 2013).

6.2.2. Determinación de morfología y tamaño de partícula

La morfología de las fibras electroestiradas se examinó utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras se recubrieron con una capa de oro, al vacío. Todos los experimentos se llevaron a cabo a un voltaje de aceleración de 10 kV, para determinar los diámetros de las fibras obtenidas se midieron al menos 100 fibras de las micrografías obtenidas con ayuda del Software Image J.

6.2.3. Actividad antimicrobiana en medio líquido

La actividad antimicrobiana de las fibras cargadas con nisina se evaluó mediante la construcción de una curva de crecimiento microbiano de *Leuconostoc mesenteroides* y *L. monocytogenes*, para lo cual 25 mg de las fibras electroestiradas (cargadas con 10 y 20 mg de nisina) se colocaron en 15 mL de caldo MRS o CST previamente inoculado con una concentración aproximada de 10^2 UFC/mL y se incubaron a 30 y 35°C respectivamente durante 48 h. A diferentes tiempos (0, 2, 4, 6, 8, 24 hrs) se tomaron alícuotas de 1 mL y se realizó el recuento de microorganismos mediante la técnica de vertido en placa.

6.2.4. Perfiles de liberación a diferentes valores de pH

Para evaluar los perfiles de liberación de las fibras cargadas se suspendieron 10 mg de nanofibras cargadas con nisina (20 mg/mL) en 2 mL de solución amortiguadora de acetato 0.1 M pH 3.4 o en 2mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH6.1. La suspensión se agitó y luego se sometió a ultrasonidos durante 2 minutos y se mantuvo a temperatura ambiente con agitación suave. A diferente tiempos (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72 y 96 h) se reemplazó la solución tampón por una fresca y el líquido obtenido se centrifugo a 5000 rpm, la solución se filtró a través de una membrana de celulosa regenerada de la marca Agilent con tamaño de poro de 0.2 μm . La cantidad de nisina en cada tiempo se evaluó mediante HPLC/DAD (Agilent Technologies serie 2100), la separación se llevo a cabo a 35°C utilizando una columna Agilent de fase reversa Poroshell 120 (EC-C18, Agilent Technologies, 2.7 μm , 4.6 mm x 50 mm). Las fases móviles utilizadas fueron: A) ácido trifluoroacético al 0.05% y B) Acetonitrilo con un flujo de 0.9 mL/min. Las fases móviles se alimentaron con el siguiente gradiente de concentración: 0-5 min 20%B, 5-10 min 40%B, 10-15 min 60%B, 15-20 80%B. La concentración de nisina se calculó mediante la construcción de una curva de calibración de nisina en solución.

6.2.5. Determinación del mecanismo de liberación

A partir de las curvas de liberación a los diferentes pH se evaluó el mecanismo de transporte de masa de las nanofibras de APA y Pululano, para lo cual los datos se ajustaron a la ecuación de Ritger y Peppas:

$$Mt/M_{\infty} = kt^n \quad (1)$$

donde M_t es la cantidad de nisina liberada en cualquier momento (t); M_{∞} es la cantidad de nisina en el último tiempo de las mediciones, que en principio corresponde a la carga inicial; k es la constante de velocidad de liberación, y n indica el exponente de liberación. El exponente de liberación (n) se determinó minimizando la diferencia entre la ecuación (1) y un gráfico logarítmico de las curvas experimentales utilizando la herramienta Solver en Microsoft Excel.

Además, se utilizaron cuatro modelos de liberación cinética más para analizar el perfil de liberación ajustando los datos experimentales de la siguiente manera:

$$\text{Orden cero: } M_t / M_\infty = kt \quad (2)$$

$$\text{Primer Orden: } \ln (1 - M_t / M_\infty) = -kt \quad (3)$$

$$\text{Modelo de Higuchi : } M_t / M_\infty = kt^{1/2} \quad (4)$$

$$\text{Modelo de Hixson Crowell: } (1 - M_t / M_\infty)^{1/3} = -kt \quad (5)$$

6.2.6. Perfiles de liberación en diferentes matrices alimentarias

6.2.6.1. Perfil de liberación en jugo de manzana

Se utilizó jugo de manzana de la marca Gerber y se esterilizó mediante filtración con una membrana de celulosa regenerada de la marca Agilent con tamaño de poro de 0.2 μm , se verificó su esterilidad con recuentos microbianos de bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales y bacterias lácticas. 15 mL de jugo estéril se colocaron en tubos estériles de 50 mL y se inocularon con 10 μL (106 UFC/mL) de diferentes cepas (*L. monocytogenes*, *L. mesenteroides* y *S. Typhimurium*), se contó con cuatro tratamientos por microorganismo: C- (microorganismo sin tratamiento), T1 (adición de nisina en forma libre), T2 (adición de nanofibras cargadas con 10 mg de nisina) T3 (nanofibras sin cargar o control), los tubos se almacenaron a temperatura ambiente y se realizaron recuentos microbianos a diferentes tiempos 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 h. Para realizar el recuento se tomaron alícuotas de 1 mL de los tubos y se realizaron diluciones que se sembraron por extensión en placa en agar MRS para *L. mesenteroides* y AST para *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*. Las placas se incubaron a 35°C durante 24 horas y se procedió al conteo de UFC/mL.

6.2.6.2. Perfil de liberación en queso fresco

Se utilizó queso panela fresco de venta en el mercado y de manera aséptica se cortó en cubos de 1 cm^2 aproximadamente, posteriormente se inoculó con una

concentración de 10^5 UFC/mL de *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* por separado, el inóculo se dejó secar en una campana de flujo laminar y posteriormente se formaron cuatro tratamientos; C-) queso panela inoculado con el microorganismo (Control negativo), T1) queso panela adicionando nisina (20mg) en la superficie, T2) queso panela adicionado con la fibra cargada de nisina (20mg), T3) queso panela adicionado con fibras control. En los tratamientos en los que se adicionaron las fibras, estas se colocaron en forma de película sobre la superficie de los cubos de queso inoculado y posteriormente se almacenaron en bolsas herméticas (Ziploc) a temperatura de refrigeración (4°C). Se realizaron recuentos microbianos a diferentes tiempos 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 h. Para realizar el recuento se tomaron aleatoriamente los cubos de queso de cada tratamiento y se les adicionaron 9mL de diluyente de peptona, posteriormente se homogenizaron en un stomacher Bag Mixer de Interscience. Posteriormente se tomó una alícuota de 1mL y se realizaron diluciones que se sembraron mediante la técnica de vertido en placa en agar MRS para *L. mesenteroides* y AST para *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*, las placas se incubaron durante 24 h a 30 y 35 °C respectivamente. Posteriormente se realizó el conteo de UFC/mL y se calculó el contenido por cm^2 de queso panela.

6.3. Desarrollo de nanopartículas de plata mediante síntesis verde

6.3.1. Elaboración de extractos acuosos de orégano, pericón, bagazo de naranja y mosto de uva

La obtención de extractos acuosos se realizó mediante el método de decocción donde 10 g del material vegetal seco y molido (orégano, pericón, bagazo de naranja y mosto de uva) se adicionaron a 100 mL de agua y se llevaron a calentamiento por 10 min a 60°C, el extracto obtenido se dejó enfriar, se centrifugó por 5 min a 4000 rpm y el sobrenadante se filtró a vacío con papel Whatman No,1. El líquido restante se congeló a -70°C y se liofilizó hasta la obtención de polvos finos, los extractos se almacenaron en un desecador hasta su posterior uso.

6.3.1.1. Determinación de capacidad antioxidante

6.3.1.1.1. Ensayo DPPH

Para determinar la capacidad antioxidante de las muestras se determinó la concentración mínima inhibitoria 50 (IC₅₀) de las diferentes muestras mediante el software Prism GraphPad 6, para lo cual se probaron diferentes concentraciones de los extractos en ppm. Se preparó la solución de radical DPPH disolviendo 0.0015 g del radical en 20.5 ml de metanol y aforando con agua destilada a 25 mL. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro Spectra Max 190 (Molecular Devices, USA). La reacción se llevó a cabo en microplacas transparentes de 96 pozos para lo cual se adicionaron 20 µl de los extractos que se hacen reaccionar con 200 µl de solución de DPPH. Para la curva de calibración se prepararon diferentes concentraciones de Trolox en rangos de concentraciones de 50-800 µM. La disminución de la absorbancia durante 90 minutos a 520 nm.

6.3.1.1.2. Ensayo ABTS

El método del radical catión ABTS^{•+} (Re et al., 1999), se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS^{•+}, debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones. El radical catiónico ABTS^{•+} es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azino- bis- (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) con persulfato de potasio. Las mediciones se realizaron a una longitud de onda de 734 nm en una microplaca de 96 pozos (Nalge Nunc Intl., N.Y., U.S.A.). Se empleó una curva de Trolox en metanol como referencia, al igual que la técnica de DPPH los resultados se expresan como la concentración inhibitoria 50 en ppm, tomando en cuenta la respuesta de diferentes concentraciones de los extractos. La determinación del IC₅₀ se llevó a cabo en el software Prism GraphPad.

6.3.1.1.3. CUPRAC electroquímico

Para la técnica CUPRAC se preparó una solución amortiguadora de acetato de amonio 1.2 M a pH 7, una solución de CuCl₂ 1.2 x 10⁻²M en agua tridestilada y soluciones de Trolox y neocuproina a 1µM ambas en etanol. En un vaso con

fondo cónico se mezclaron 3mL del buffer con 1 mL de CuCl_2 y 1mL de neocuproina, se pasó un flujo de nitrógeno para eliminar el oxígeno. Posteriormente la solución se analizó utilizando voltamperometría cíclica con una velocidad de barrido de 100 mV/s, comenzando con el escaneo del potencial de circuito abierto (OCP) (determinado después de agitar la muestra) y cuando la variación de potencial fue menor a 1 mV/s, se usó la corriente en el pico de oxidación para cuantificar la concentración de $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+$. De la misma manera se llevó a cabo la determinación de la capacidad antioxidante realizando una curva con diferentes concentraciones de Trolox o añadiendo 20 μL del extracto. Los resultados se reportan como μg equivalentes de Trolox/g de muestra.

6.3.1.2. Determinación de fenoles totales

La determinación de fenoles totales se realizó de acuerdo al método descrito por Beta y colaboradores (2005), donde 200 μl de los diferentes extractos fueron mezclados con 1.5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu (diluido 10 veces en agua destilado). Se permitió que la mezcla alcanzara el equilibrio por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 1.5 mL de solución de carbonato de sodio (60 g/L). La reacción se incubó durante dos horas a temperatura ambiente y posteriormente se llevó a cabo la medición de la absorbancia de la solución a 725 nm contra un blanco del solvente utilizado para la extracción (agua). Se utilizó ácido gálico como estándar y los resultados se expresaron como μg de equivalentes de ácido ferúlico/g de muestra. Los análisis se condujeron por triplicado.

6.3.1.3. Determinación de compuestos fenólicos mediante HPLC

La determinación de compuestos fenólicos de los extractos metanólicos y acuosos se llevó a cabo mediante HPLC/DAD (Agilent serie 2100). La separación se realizó a 35 °C en una columna Agilent fase reversa Sorbax XDB-C18 de (4.6 x250 mm, 5 μm de tamaño de partícula). Las fases móviles utilizadas fueron A: ácido acético 1% y B: acetonitrilo con un flujo de 1 mL/min. Se utilizó el gradiente de concentraciones que se muestra en el cuadro 9, los estándares utilizados fueron ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido cafeíco, ácido cumárico, ácido ferúlico,

ácido cinámico, ácido clorogénico, ácido elágico, ácido rosmarínico, (+) catequina, apigenina, vainillina, kaempferol, rutina, resveratrol, quercetina, timol, carvacrol y naringenina.

Cuadro 9. Gradiente para la separación de compuestos fenólicos en extractos metanólicos.

Tiempo (min)	A%	B%
0	85	15
2.5	60	40
5	70	30
10	80	20
12	40	60
13	50	50
15	85	15

Para determinar la concentración de los diferentes estándares se construyeron curvas de calibración a diferentes concentraciones utilizando el área bajo la curva, para la concentración en la muestra se determinaron los picos presentes y se interpolaron a las curvas de calibración.

6.3.2. Síntesis verde de nanopartículas de plata y efecto de temperatura y tiempo de reacción

La elaboración de nanopartículas de plata se llevó a cabo mediante síntesis verde, a partir de una solución acuosa de AgNO_3 0.1M, a la cual se adicionó una concentración de 0.2% p/v de cada extracto liofilizado por separado, se mezcló mediante agitación en Vortex. Para determinar la temperatura más eficiente para la síntesis, diferentes mezclas se llevaron a calentamiento a 20, 40, 60, 80 y 100°C durante 10 minutos, por separado. La formación de las nanopartículas de plata se observó visualmente mediante un cambio de coloración de transparente a marrón y esta se confirmó mediante un análisis UV-Vis en donde se evaluó el espectro de absorción de las muestras en la región de exploración de 200-800 nm. Los espectros de absorción se registraron por espectrómetro UV-Vis Spectra Max

190 (Molecular Devices, USA). Para evaluar el tiempo de reacción se fijó la temperatura a 80 °C y se fue monitoreando la síntesis mediante un barrido en el espectro a diferentes tiempos, tomando una alícuota.

6.3.2.1. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

La morfología de las nanopartículas que presentaron los mejores espectros se examinó utilizando microscopia electrónica de barrido (SEM), para lo que en una oblea de silicio se colocaron gotas de la solución obtenida y se dejaron secar, posteriormente las obleas se observaron sin recubrimiento en un microscopio EPMA JXA-8230 de JEOL, los experimentos se llevaron a cabo con un voltaje de aceleración de 3,0 KV, se tomaron 5 imágenes de diferentes campos de la oblea para determinar la morfología.

6.3.2.2. Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

Para la determinación de la morfología y diámetro de las partículas se montaron en rejillas de cobre de 3.5mm de diámetro, las rejillas se sumergieron en la solución de nanopartículas y se dejaron secar por 20 min. Posteriormente las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL, modelo JEM-1010 acoplado a una cámara Gatan Bioscan de 1Kx1K que utiliza el programa Digital Micrograph 3.1 para adquisición de imágenes. Se tomaron 5 fotos a diferentes ampliaciones para observar la morfología de las partículas obtenidas, el diámetro medio se calculó con ayuda del software Image J mediante la medición de 100 partículas y posteriormente se construyeron los histogramas de distribución de frecuencia.

6.3.2.3. Espectroscopia de infrarrojo con Reflectancia difusa

Las muestras de nanopartículas de plata se centrifugaron a 20000 rpm por 15 min y el pellet se dejó secar a 60°C en cajas Petri, las muestras secas se analizaron por espectroscopia de reflectancia difusa realizando 16 barridos a 4 cm⁻¹ de resolución, para lo cual se pesaron 2mg y se formó una pastilla con bromuro de sodio, de igual manera se analizaron los extractos acuosos liofilizados.

6.3.2.4. Difracción de rayos X

Para obtener los difractogramas de Rayos X en un portaobjetos de vidrio se colocaron en el centro gotas de la suspensión de nanopartículas de plata sintetizadas con los diferentes extractos, los espectros se obtuvieron en un difractómetro de Rayos X (Dmax 2100 Rigaku Americas, Texas, USA). Con un generador de radiación de Cu Ka ($K=1.5428 \text{ \AA}$), el voltaje y la corriente se mantuvieron constantes a 30 y 40 mA respectivamente. El ángulo de incidencia se varió en un rango 2θ de $5-40^\circ$ en intervalos de 0.02. El diámetro de las partículas cristalinas se determinó mediante la ecuación de Debye-Scherrer:

(6)

$$\tau = \frac{K\lambda}{B\cos(\theta_B)}$$

Donde consideraremos un factor de forma = 0.9, $K = 1.5406$, B es el ancho medio del pico considerado para el cálculo y θ_B es el ángulo correspondiente con el máximo del pico (2θ).

6.3.3. Caracterización microbiológica de nanopartículas recién sintetizadas

6.3.3.1.1. Difusión en placa

Se utilizaron cepas previamente lavadas de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, para evaluar la actividad antimicrobiana de las diferentes nanopartículas obtenidas mediante la técnica de difusión en placa. Se colocó Agar Soya Trypticaseina (AST) fundido en tubos de 10mL y se inoculó con 5 μL de los diferentes cultivos de manera separada, los tubos se agitaron en Vortex e inmediatamente se vaciaron en cajas Petri estériles, una vez solidificadas se adicionaron 20 μL de la suspensión de nanopartículas sintetizadas con los diferentes extractos y se incubaron por 24h a 35°C , pasado el tiempo de incubación se midió con ayuda de un vernier automático los halos de inhibición formados, para poder comparar la actividad antimicrobiana con un control se

utilizó cloranfenicol y de igual manera se probaron los extractos utilizados para la síntesis de las AgNPs.

6.3.3.1.2. Densidad óptica (Bioscreen)

El bioscreen proporciona una medición de la densidad óptica a partir de la turbidez, la cual indica el desarrollo de microorganismos y es proporcional al crecimiento. Para llevar a cabo la medición de la actividad antimicrobiana mediante esta técnica, los extractos liofilizados se disolvieron en agua destilada a una concentración de 0.02% (Cantidad usada para la síntesis de nanopartículas) y se utilizó la suspensión formada después de la síntesis de AgNPs, se colocaron diferentes concentraciones de extracto y nanopartículas como se muestra a continuación 20, 40, 60, 80 y 100 μL en diferentes pozos de la microplaca, el mismo pozo se llenó con 100 μL de caldo ST y 20 μL de las cepa correspondiente. Posteriormente se incubó a 37°C durante 48 horas con un precalentamiento de 5 min, hasta llegar a la temperatura requerida, tomando lecturas de absorbancia en intervalos de 30 min. Dichas lecturas de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 600nm. Se utilizaron blancos el CST + Extracto y CST + Nanopartículas y como control (-) la mezcla de CST y la cepa de microorganismo. Con los datos obtenidos se construyeron graficas de crecimiento microbiano en el software Prism y se determinó el porcentaje de inhibición con respecto al control positivo.

6.3.3.1.3. Modelamiento matemático del crecimiento microbiano

A partir de las curvas de crecimiento obtenidas en el Bioscreen los datos se ajustaron al modelo matemático de Baranyi (Baranyi y Roberts 1995), utilizando el software DMFit v3.0 (ComBase; <http://www.combase.cc/tools/>) para estimar la fase de latencia (h), la densidad de población máxima (ODmax y la tasa de crecimiento ($\mu = \text{OD} / \text{h}$).

6.3.3.2. Caracterización microbiológica de nanopartículas secas

6.3.4. Secado de nanopartículas de plata

Para el proceso de electroestirado de las fibras de proteína de amaranto y pululano, se requirió de llevar a sequedad las AgNPs sintetizadas, para lo cual se probaron dos métodos, un proceso de liofilización por 2 días y un proceso de centrifugación a 20000 rpm por 15 min y se realizaron tres lavados, posteriormente se secaron a 60°C para su almacenamiento, una vez secas se pesaron y se calcularon los porcentajes de rendimiento.

6.3.4.1. Microscopia electrónica de transmisión

Para la obtención de micrografías de microscopia electrónica de transmisión se resuspendieron 100 mg de AgNPs en una solución acuosa adicionada con 10% Tween80, las muestras se montaron en rejillas de cobre sumergiéndolas en la suspensión, se dejaron secar y se observaron en un microscopio JEOL, modelo JEM-1010 acoplado a una cámara Gatan Bioscan de 1Kx1K que utiliza el programa Digital Micrograph 3.1 para adquisición de imágenes. Al igual que en las AgNPs se tomaron 5 fotos a diferentes ampliaciones para observar la morfología de las partículas obtenidas y el diámetro medio se determinó con ayuda del software Image J mediante la medición de 100 partículas y posteriormente se construyeron los histogramas de distribución de frecuencia en Prism.

6.3.4.2. Actividad antimicrobiana de AgNs secas

Para probar la actividad antimicrobiana se utilizó la técnica de difusión en agar en la cual se colocan 5 µL de la cepa de microorganismos (*E. coli*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*) en 10 mL de agar soya tripticaseina atemperados a 45°C, se mezclan e inmediatamente se transfirieron a una caja Petri estéril, cuando el agar solidificó se adicionaron 10 µL de cada tratamiento por separado y se incubaron a 35°C por 48 h, después de la incubación se midieron los halos de inhibición con ayuda de un vernier digital. Se usaron como controles los extractos (100 mg/mL) y el cloranfenicol (500 mg/mL), se probaron diferentes concentraciones de las nanopartículas (20, 40, 60, 70, 80, 90 y 100 mg/mL) resuspendidas en una solución acuosa con 10% de tween 80.

6.3.5. Desarrollo de nanocompositos de nanopartículas de plata y fibras electroestiradas de APA-PUL

6.3.5.1. Preparación de soluciones y proceso de electroestiradas

Se prepararon soluciones de aislado proteico de amaranto y pululano en una proporción 50:50 y se les adicionó una concentración de 100 mg/mL de AgNPs secas (se seleccionó únicamente las sintetizadas con los residuos de frutas), las soluciones obtenidas se caracterizaron midiendo su viscosidad en un Reómetro Brookfield DV3T con software Rheocalc T 1.2.19 y conductividad eléctrica en el Conductímetro ORION Star A212 de Thermo Scientific. Una vez caracterizadas las soluciones se sometieron al proceso de electroestirado un aparato equipado con una fuente de alto voltaje que proporciona un rango variable de 0-30 KV. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente y las condiciones de voltaje, distancia al colector y flujo de alimentación se fijaron a 22 kV, 10 cm y 0.4 mL/h, respectivamente (Aceituno, 2013).

6.3.5.2. Caracterización de nanocompositos de AgNPs y fibras electroestirada de APA-PUL

6.3.5.2.1. Evaluación de morfología (SEM)

La morfología de las nanofibras se examinó utilizando microscopia electrónica de barrido (SEM). Las muestras se recubrieron con una capa de oro, al vacío. Todos los experimentos se llevaron a cabo a un voltaje de aceleración de 15 kV. Los diámetros de las estructuras se obtuvieron por medio del software Image J, a partir de las micrográficas obtenidas. Tomando en cuenta la medición de 100 estructuras de cada muestra y posteriormente se construyó un histograma de distribución.

6.3.5.2.2. Morfología y distribución de nanopartículas de plata en las fibras (TEM)

Con el fin de determinar la distribución de las nanopartículas de plata dentro de las fibras de proteína de amaranto, se observaron en un microscopio electrónico de transmisión microscopio JEOL, modelo JEM-1010 acoplado a una cámara Gatan

Bioscan de 1Kx1K que utiliza el programa Digital Micrograph 3.1 para adquisición de imágenes. Las muestras se montaron en rejillas de cobre, electroestirado directamente sobre ellas durante 10 segundos.

6.3.5.2.3. Distribución de nanopartículas de plata por microscopía electrónica de barrido con detector EDS

Para determinar la distribución de la plata en las nanopartículas de plata se utilizó microscopía electrónica de barrido acoplada a un detector de Rayos X, para lo cual las muestras se observaron con la técnica de emisión de electrones retrodispersados que depende fuertemente del número atómico de la muestra. Esto implica que dos partes de la muestra que tengan distinta composición se revelan con distinta intensidad aunque no exista ninguna diferencia de topografía entre ellas y los rayos X que se generan en una muestra sometida en esta técnica permiten identificar los elementos presentes y establecer su concentración.

6.3.5.2.4. Permeabilidad a vapor de agua

Para determinar la permeabilidad de vapor de agua (PVA) se seleccionó el método desecante según la norma ASTM-96. En una cápsula de porcelana (peso constante), se agregó sílica gel (0% HR), se cubrió con los films, posteriormente esta cápsula fue ingresada en un desecador (50% HR) a una temperatura de 24°C. Las capsulas se pesaron en una balanza analítica Sartorius CP225D. Se registró el peso cada hora obteniendo una correlación mayor a 0.9, igualmente cada hora se determinó el porcentaje de humedad y la temperatura. A partir de la pendiente de la curva peso vs tiempo (J) se calculó la velocidad de transmisión de vapor de agua, VTVA, (Ec.7) y con las presiones parciales de vapor de agua de ambas caras de la película y el espesor de la película se calculó la PVA (Ec. 8):

(7)

$$VTVA = \frac{J}{T * A}$$

(8)

$$PVA = \frac{VTVA * L}{P_w(RH1 - RH2)}$$

Donde PVA es la permeabilidad al vapor de agua ($\text{g}/\text{Pa}\cdot\text{S}\cdot\text{m}$); L es el espesor promedio de la película [m]; A es el área de la película [m^2]; ($\text{RH}_1\text{-RH}_2$) es la diferencia de humedades relativas y P_w es la presión de vapor parcial de vapor de agua a la temperatura de ensayo [Pa].

6.3.5.2.5. Actividad antimicrobiana

Para esta etapa se seleccionó como una de las cepas más susceptibles *E. coli*. En tubos Falcón de 50 mL se adicionaron 15 mL de caldo soya tripticaseina y se inocularon 5 μL de la cepa previamente lavada, posteriormente se adicionaron las fibras electroestiradas (fibras con AgNPs y fibras sin activo), los tubos se incubaron a 35°C y a diferente tiempos de incubación se (0, 2, 4, 8 y 12 h) se tomó una alícuota de 1mL y se realizaron 6 diluciones que se sembraron por el método de vaciado en placa, las cajas se incubaron a 35°C por 24h y se realizó el conteo de colonias para construir la curva de crecimiento. Se utilizó como control el crecimiento del microorganismo sin ningún tipo de estrés.

6.3.6. Desarrollo de nanocompositos de AgNPs, nanofibras electroestiradas de APA-PUL y nisina

6.3.6.1. Preparación de soluciones

Se prepararon soluciones de aislado proteico de amaranto y pululano en una proporción 50:50 y se les adicionó una concentración de 100 mg/mL de AgNPs secas (sintetizadas con mosto de uva) y 20 mg de nisina, las soluciones obtenidas se caracterizaron midiendo su viscosidad en un Reómetro Brookfield DV3T con software Rheocalc T 1.2.19 y conductividad eléctrica en el Conductímetro ORION Star A212 de Thermo Scientific. Una vez caracterizadas las soluciones se sometieron al proceso de electroestirado un aparato equipado con una fuente de alto voltaje que proporciona un rango variable de 0-30 KV. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente y las condiciones de voltaje, distancia al colector y flujo de alimentación se fijaron a 20 kV, 10 cm y 0.4 mL/h, respectivamente.

6.3.6.2. Actividad antimicrobiana

En tubos Falcón de 50 mL se adicionaron 15 mL de caldo soya tripticaseina y se inocularon 5 µL de la cepa de *Listeria monocytogenes* previamente lavada, posteriormente se adicionaron las fibras electroestiradas (fibras con AgNPs y fibras sin activo), los tubos se incubaron a 35°C y a diferente tiempos de incubación se (0, 2, 4, 8 y 12 h) se tomó una alícuota de 1mL y se realizaron 6 diluciones que se sembraron por el método de vaciado en placa, las cajas se incubaron a 35°C por 24h y se realizó el conteo de colonias para construir la curva de crecimiento. Se utilizó como control el crecimiento del microorganismo sin ningún tipo de estrés.

6.4. Análisis estadístico

Los análisis se realizarán por triplicado y se calculara la media y error estándar. Para ello, se empleará el paquete estadístico JMP 8 y se realizará comparación de medias entre tratamiento.

7. RESULTADOS

7.1. Caracterización de soluciones APA-PUL: Nisina

En el proceso de electroestirado existen diversos factores que pueden cambiar la morfología y el diámetro de las fibras, entre los que se pueden encontrar características de la solución principalmente la viscosidad, conductividad eléctrica y tensión superficial (Bhardwaj & Kundu 2010), las cuales pueden variar con la adición del compuesto activo. En el cuadro 10 se presentan los valores de la viscosidad y conductividad eléctrica de las soluciones de APA-PUL en ácido fórmico con y sin nisina, antes del proceso de electroestirado. Las soluciones APA-PUL sin activo presentaron una viscosidad y conductividad de 67.30 mPa.s y 7.68 mS/cm respectivamente. La incorporación de nisina disminuyó significativamente ($P < 0.05$) ambos parámetros, la conductividad eléctrica de la solución se vio afectada cuando se adicionan compuestos activos que presentan funcionalidades iónicas, tal es el caso de la nisina la cual al pH de la solución (2.3) se encuentra cargada de manera positiva al encontrarse por debajo de su punto isoeléctrico, lo que podría saturar la solución impidiendo el movimiento libre de los iones y disminuyendo así la conductividad, de igual manera esta disminución fue dependiente de la concentración (Okutan et al., 2014). En el caso de la viscosidad únicamente la concentración más alta de nisina presentó diferencias significativas con respecto al control, observándose una disminución de hasta el 30%, estos resultados son similares a los reportados por Aceituno et al., 2012 y Wongsasulak et al., 2010, quienes observaron que al aumentar la concentración de sustancias proteicas en soluciones poliméricas la viscosidad tiende a disminuir.

Cuadro 10. Caracterización de las soluciones API-PUL y fibras electroestiradas

Concentración de nisina (mg/mL)	Conductividad (mS cm^{-1})	Viscosidad (mPa.s)	Diámetro (nm)	EE (%)
0	7.68 ± 0.125^a	67.30 ± 0.066^a	229.6 ± 8.4^a	---
10	4.42 ± 0.132^b	63.46 ± 0.203^a	173.2 ± 6.8^b	80.82 ± 0.06^a
20	3.41 ± 0.124^c	46.76 ± 2.74^b	124.1 ± 15.7^c	95.41 ± 0.10^b

Los resultados se presentan como la media \pm el error estándar de tres replicas, letras distintas en la misma columna representan diferencias significativas con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

7.2. Morfología y distribución de tamaño de fibras

La figura 11 muestra las imágenes de microscopia electrónica de barrido de las fibras electroestiradas de APA-PUL sin nisina (a) y para las fibras con 10 (b) y 20 (c) mg de nisina, en las que se puede observar la obtención de fibras lisas, continuas, sin ninguna clase de defectos. Esto está relacionado con una distribución uniforme de los componentes en las fibras formadas, resultados atribuidos a una alta miscibilidad entre los compuestos y que la adición de nisina no afectó la producción de fibras y no modificó su morfología (Aceituno-Medina, Mendoza, et al., 2013; Wongsasulak et al., 2010). La producción de fibras lisas con diámetros en escala nanométrica conlleva a áreas superficiales más grandes que superan la limitación de una liberación rápida, asociada generalmente con otros sistemas de encapsulación, además mejora la difusión del activo por su elevada área superficial y arquitectura interconectada porosa (Pillay et al., 2013), por lo que los sistemas obtenidos son prometedores para una liberación controlada de nisina.

En la figura 11 también se pueden observar los histogramas de distribución de tamaño de las fibra, en los tres casos se observa una distribución no homogénea del tamaño presentando las mayores frecuencias a 200, 160 y 100 nm para las fibras APA-PUL sin cargar y las fibras con nisina en 10 y 20 mg respectivamente. Se observó una disminución de aproximadamente el 46% con respecto a las fibras control y la concentración más alta de nisina. Existe una clara relación entre la adición de nisina y la disminución del diámetro, lo que se puede explicar con los cambios en cuanto a viscosidad y conductividad de las soluciones utilizadas para producirlas. La disminución de la viscosidad propició un mayor entrecruzamiento molecular de los componentes y mejoró las propiedades de estiramiento de la solución, lo que resultó en una disminución del diámetro de las fibras (Neo, Ray, et al., 2013). Para el caso de la conductividad eléctrica se ha reportado que disminuciones de esta se relacionan con aumento en el diámetro de la fibra, sin embargo en este trabajo se observó lo contrario, esto indica que tenemos el suficiente número de cargas para poder llevar a cabo el proceso de electroestirado tal como lo observó Neo et al. 2013. Es interesante resaltar que los diámetros

obtenidos son menores a los reportados para un sistema de PDLA y PEO adicionado con nisina, en donde los diámetros se encontraron entre los 400 y 450nm (Ahire & Dicks 2014).

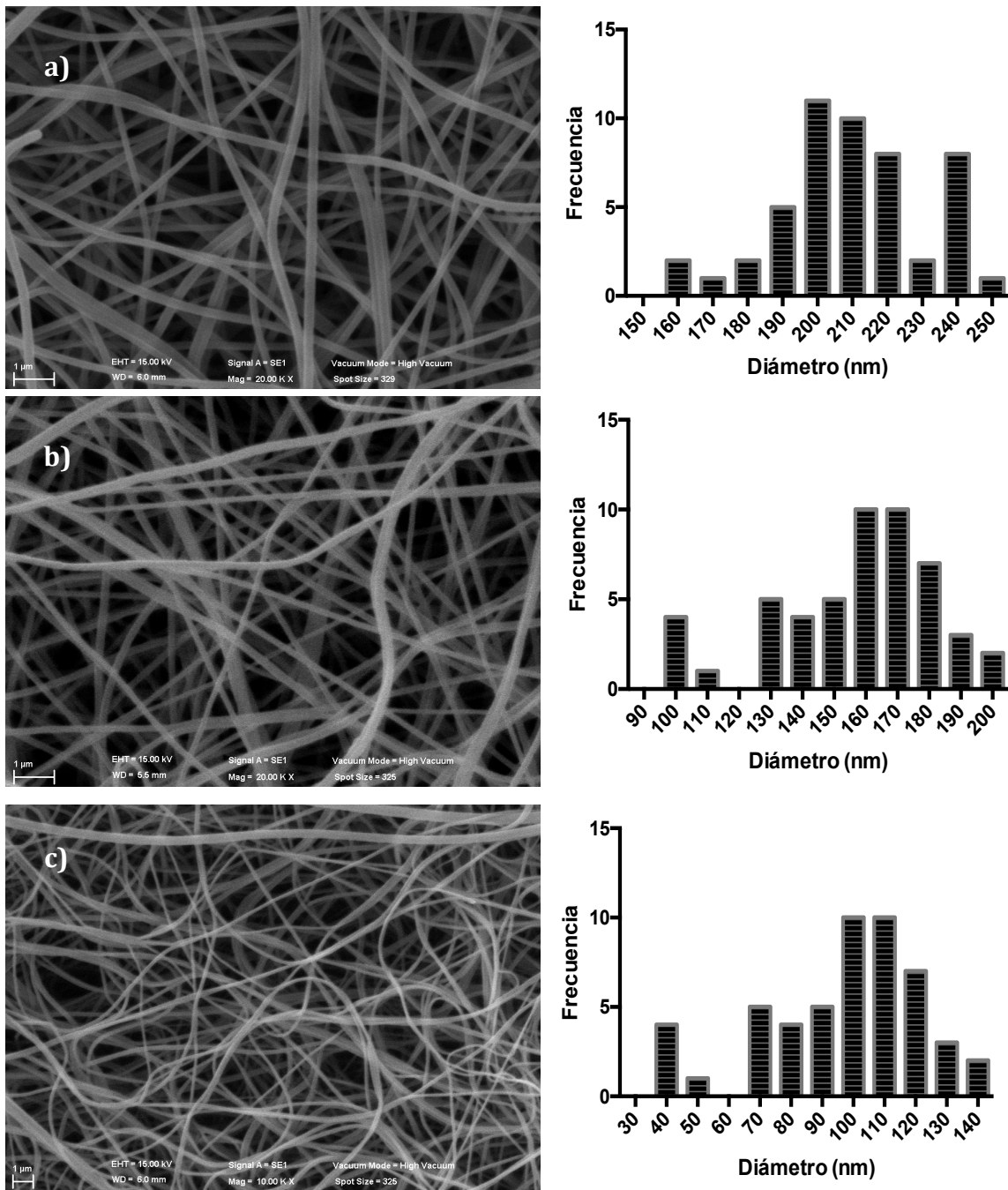


Figura 11. Microscopia electrónica e histograma de frecuencias de diámetro fibras electroestiradas de proteína de Amaranto-Pululano a) Mezcla (50:50), b) mezcla 50:50:10 mg Nisina, c) mezcla 50:50:20 mg Nisina.

7.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana en medio líquido

La evaluación de la actividad antimicrobiana de las fibras se midió en medio líquido contra un microorganismo deteriorador (*Leuconostoc mesenteroides*) y un microorganismo patógeno (*Listeria monocytogenes*). *Leuconostoc mesenteroides* se considera un microorganismo de descomposición, que ha sido aislado de productos lácteos y productos cárnicos, vinos, frutas y verduras, es causante de olores y sabores desagradables, moco y coloraciones verdosas en productos alimenticios (Basak, Ramaswamy, & Piette, 2002). *L. monocytogenes* es una bacteria patógena causante de la enfermedad conocida como Listeriosis cuyos síntomas más frecuentes son fiebre, dolor muscular, problemas gastrointestinales y recientemente se ha relacionado con problemas del sistema nervioso, listeria se puede encontrar en el tracto gastrointestinal de humanos, suelo, agua, vegetales frescos y productos lácteos (A. Costa, Lourenco, Civera, & Brito, 2018; Kljujev et al., 2018). Debido a los problemas relacionados con ambos microorganismos es importante el desarrollo de empaques que eviten la contaminación o inhiban el crecimiento, en este sentido las fibras electroestiradas cargadas con nisina representan una alternativa viable para la producción de empaques.

En la figura 12 se presentan las curvas de crecimiento de estos microorganismos usando como antagonistas las fibras control y las fibras cargadas con nisina. En el caso de *Leuconostoc* se puede observar una diferencia significativa en el crecimiento cuando se adicionan las fibras con nisina, ya que en ambas concentraciones se observa un efecto bacteriostático después de las 6 y 4 horas en las fibras con 10 y 20 mg, respectivamente. Por el contrario, el tratamiento con las fibras control presenta un crecimiento similar al crecimiento del microorganismo sin tratamiento, lo que nos indica que los componentes de las fibras no presentan actividad antimicrobiana por sí solos y que la actividad observada corresponde únicamente a la nisina encapsulada, al final del tratamiento existió una diferencia de 7 log de las fibras con nisina y el crecimiento normal del microorganismo, resultados satisfactorios para poder usar el sistema de encapsulación, contra microorganismos deterioradores como *Leuconostoc*.

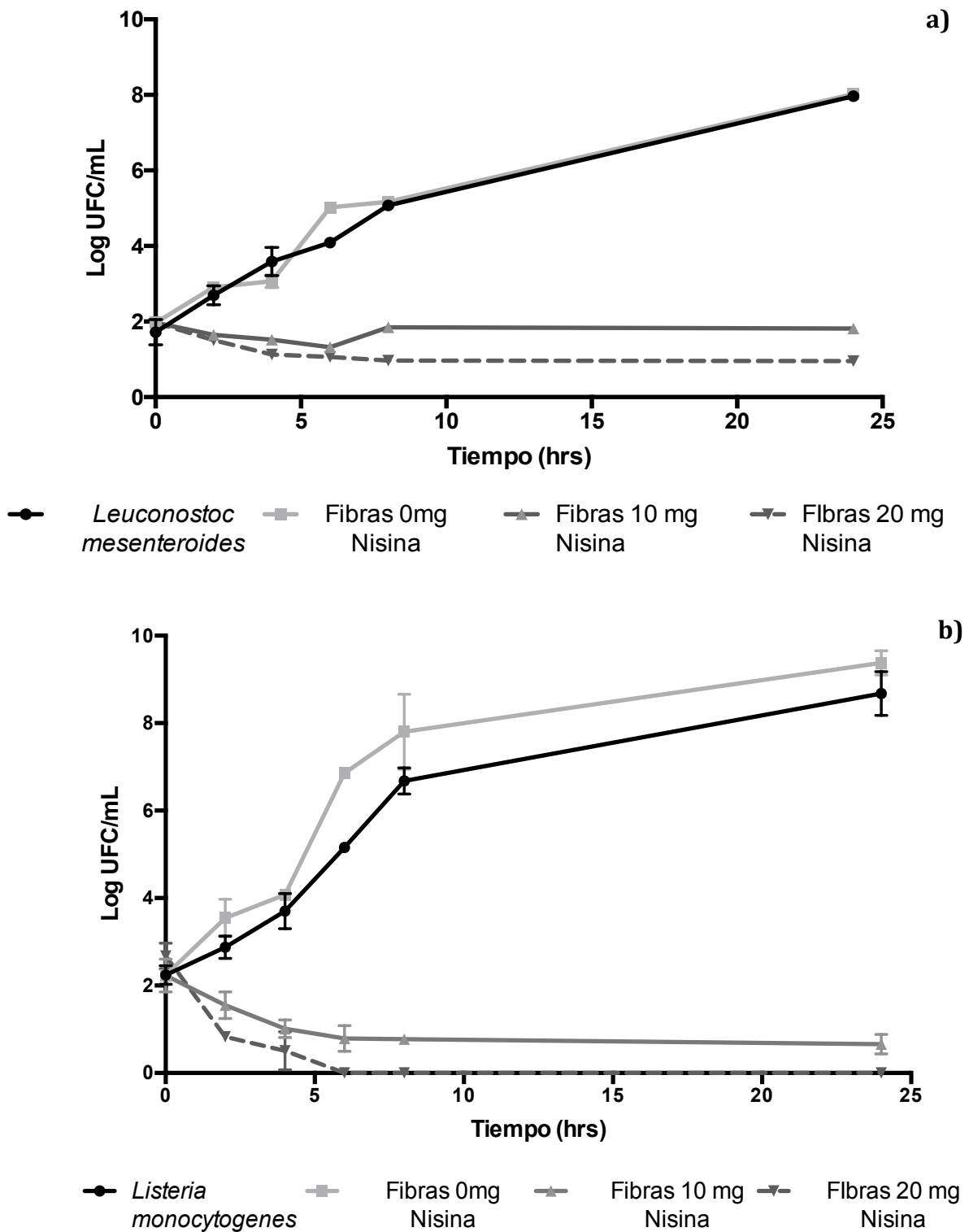


Figura 12. Curvas de crecimiento microbiano de a) *L. mesenteroides* y b) *L. monocytogenes* en caldo de cultivo MRS y ST respectivamente tratadas con las fibras control y fibras cargadas con nisina.

La curva de crecimiento de *L. monocytogenes* se muestra en la figura 12b, en donde se pueden observar resultados similares al experimento de *L. mesenteroides*. Las fibras control (sin nisina), presentan un crecimiento similar que el crecimiento normal del microorganismo, mientras que las fibras adicionadas con 10 mg de nisina presentaron una disminución de 1.22 log con respecto a la concentración inicial a las 6 horas de tratamiento y nuevamente un efecto bacteriostático y en las fibras con 20 mg de nisina se logró la inactivación total del microorganismo a las 6 horas de tratamiento, lo que nos indica un efecto dosis dependiente. Resultados similares fueron reportados por Imran et al. (2015) quienes elaboraron nanoliposomas de lecitina marina y lecitina de soya cargados con nisina, en donde observaron el mismo efecto bacteriostático contra *L. Monocytogenes*. Sin embargo no llegaron a la inactivación completa del microorganismo hasta que adicionaron nisina libre, estas diferencias con nuestro sistema pueden estar relacionadas con las eficiencias de encapsulación obtenidas ya que ellos presentan del 47% mientras que las fibras de APA-PUL tienen eficiencias del 80 al 95% (Cuadro 10), lo que representa una ventaja importante para poder ser usados como sistema de liberación de compuestos antimicrobianos como la nisina.

7.4. Evaluación de perfiles de liberación

7.4.1. Perfiles de liberación a diferentes valores de pH

El perfil de liberación de nisina de fibras electroestiradas de APA-PUL se midió a dos diferentes valores de pH en una solución amortiguadora de acetatos a 3.4 y una solución amortiguadora de fosfato a 6.1, valores de pH que normalmente presentan el jugo de manzana y el queso Panela fresco, utilizando las fibras con la mayor concentración de activo (20mg). El porcentaje de nisina liberado se calculó de acuerdo a la eficiencia de encapsulación del 95.4%. La figura 13 muestra la liberación de nisina con respecto al tiempo en los dos valores de pH, en ambos valores se observó una liberación rápida en las primeras 10 horas del experimento, seguido de una liberación gradual más lenta. Se puede observar que

en un medio ácido existe una mayor liberación alcanzando hasta un 92.77%, mientras que en un pH neutro se alcanzan valores más bajos de hasta el 65.12%, esta diferencia puede explicarse con el punto isoeléctrico de las proteínas utilizadas. El punto isoeléctrico del APA y nisina es 5.0 y 8.5 respectivamente (Shevkani, Singh, Rana, & Kaur, 2014; Stunkard, 2009), por tanto al ser colocadas en una solución con pH 3.4 ambas proteínas se encuentran cargadas positivamente, existiendo una repulsión electrónica entre la estructura de la fibra y el activo, lo que facilita la difusión de nisina desde las nanofibras al medio. Por el contrario, cuando el pH es de 6.1 la proteína de amaranto se encuentra cargada de manera negativa y la nisina permanece con cargas positivas, por lo que las interacciones electrostáticas entre el APA y la nisina se vuelven atractivas, estas interacciones junto con las interacciones hidrofóbicas pudieron haber causado una menor liberación de nisina en un pH cercano al neutro (D. Xiao, Davidson, & Zhong, 2011). Otro factor importante para la liberación de nisina es la solubilidad de los componentes de las fibras, el pululano es un polímero altamente soluble en agua lo, que explica la liberación rápida en las primeras horas, mientras que el APA cambia su solubilidad con respecto al pH, siendo más soluble en pH alcalinos y ácidos que a pH neutros (Aceituno-Medina, Lopez-Rubio, Mendoza, & Lagaron, 2013). La figura 13b muestra la morfología de las fibras después de 8 horas de ser colocadas en jugo de manzana (pH 3.4) y queso panela (pH 6.1), similar a lo que se observa en la curva de liberación en soluciones amortiguadoras, existe una mayor degradación de la morfología cuando se encuentra a un pH ácido comparado con el neutro, además el contenido de agua es diferente lo que conduce a una mayor hinchazón y pérdida de la morfología de las fibras electroestiradas. La liberación de nisina a partir de las fibras API-PUL es más lenta que la observada en nano cápsulas de zeína elaboradas por Xiao et al. 2011, quienes tuvieron una liberación del 100% en pH ácidos después de 30 minutos, estos resultados representan una ventaja, ya que la liberación rápida a las primeras horas puede ayudar a disminuir la carga inicial del microorganismo y posteriormente una liberación paulatina ayudaría a inhibir el crecimiento de los

microorganismos que hayan quedado remanentes ayudando a alargar la vida de anaquel del producto al que sean adicionadas.

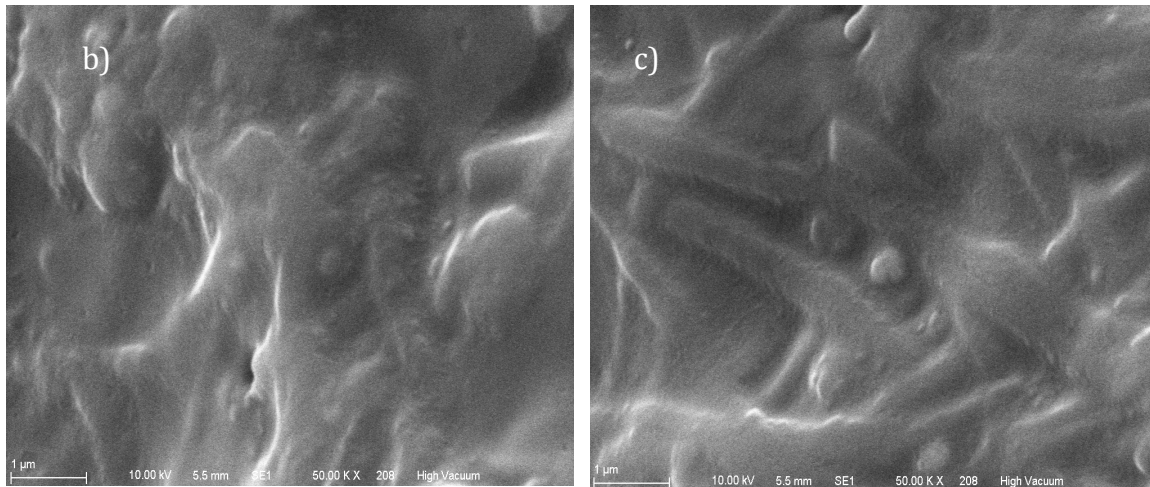
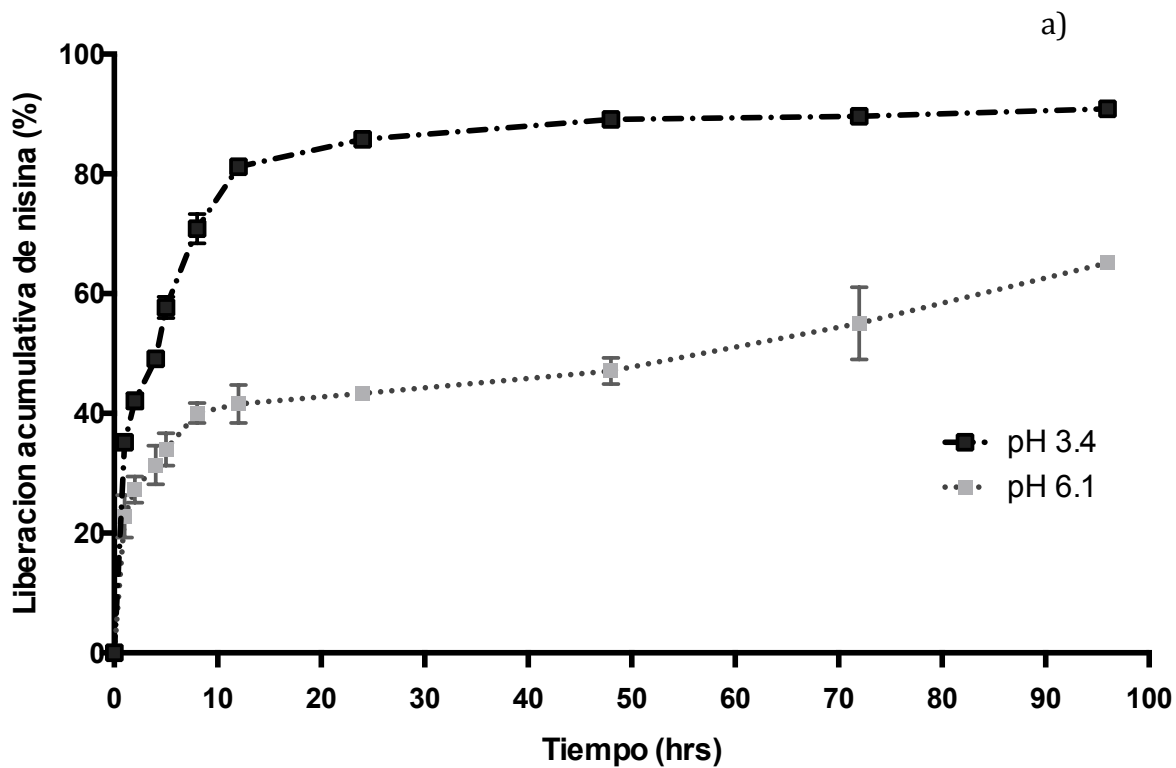


Figura 13. a) Perfil de liberación de nisina de las fibras APA-PUL a diferentes valores de pH, b) nanofibras APA-PUL 20 mg de nisina en jugo de manzana y c) nanofibras APA-PUL 20 mg de nisina en queso panela

7.4.2. Modelos de liberación

El estudio del mecanismo de liberación de nisina de las fibras electroestiradas es una característica importante para determinar sus posibles aplicaciones en la industria alimentaria, así como las posibles mejoras que el sistema de transporte pueda necesitar. Los modelos matemáticos brindan información sobre los fenómenos de transporte del compuesto activo desde las fibras electroestiradas hacia el medio, lo cual es fundamental para el desarrollo de sistemas de administración controlada (Neo et al., 2013). El proceso de liberación de un compuesto activo incluido en un sistema de encapsulación se puede llevar a cabo mediante diversos mecanismos tales como difusión, relajación o hinchamiento de las cadenas de polímero. La difusión ocurre cuando un activo atraviesa el material de pared, estimulado por el gradiente de concentración que existe entre el sistema de liberación del compuesto y el medio circundante. Mientras que en el proceso de hinchamiento de un polímero, la matriz polimérica que inicialmente se encuentra en estado cristalino sufre una transición vítrea y se forma un hidrogel. En ambos casos los perfiles de liberación de estos sistemas se caracterizan por presentar una disminución de la velocidad de liberación con el tiempo, que se relaciona con la mayor distancia que tiene que recorrer el compuesto activo desde dentro de la matriz hasta el medio (Heunis, Bshena, Klumperman, & Dicks, 2011).

Con el fin de estudiar el mecanismo de la liberación de nisina a partir de las fibras electrohiladas API-PUL, se utilizaron cinco diferentes modelos cinéticos que se ajustaron a los datos de liberación del 65% y del 80% (nisina liberada) para los modelos Kors-Peppas y los demás, respectivamente. El cuadro 11 muestra el coeficiente de correlación (r^2) de la relación lineal entre la liberación de nisina (%) y el tiempo en diferentes valores de pH. Se puede observar que el modelo de liberación de nisina a pH 3.4 presenta un valor "n" de 0.48 (obtenido de la ecuación de Ritger-Peppas), característica de una difusión de tipo Fickiano (Singhvi & Singh 2011). El mayor valor de r^2 (0,968) se obtuvo con el modelo de Higuchi, que describe una liberación controlada por difusión de matrices porosas, que sigue un mecanismo tipo Fickiano, este resultado se correlaciona con el valor de "n" obtenido (MacRi et al., 2012; Yao & Weiyuan 2010). Por otro lado, para la

liberación a pH 7,1, el modelo que mejor se ajustó a la mayoría de los datos fue el modelo Ritger-Peppas con un r^2 de 0,93 y un valor n de 0,385 que corresponde a un mecanismo de difusión anómalo o no fickiano, en el que se combinan los mecanismos de difusión parcial a través de una matriz hinchada y poros llenos de agua (MacRi, Sheihet, Singer, Kohn, & Clark, 2012). Debido a lo anterior se puede sugerir que la principal liberación de nisina está controlada por el mecanismo de difusión donde, la rápida liberación en las primeras 10 horas se debe a las moléculas de nisina que se encuentran en la superficie de las fibras APA-PUL, las cuales se liberan de manera más fácil al medio. Posteriormente la liberación de 10 a 12 horas puede explicarse como la consecuencia de la hinchazón y la erosión de las fibras, posteriormente la lenta liberación de nisina en las últimas horas se debe a que existe un aumento de la longitud de recorrido a través de la fibra. Un comportamiento similar a la liberación de nisina en las fibras de APA-PUL fue observado por Sun et al. (2013) en donde se estudió la liberación de curcumina de fibras electroestiradas elaboradas con alcohol poli vinílico (PVA).

Cuadro 11. Valores de r^2 del ajuste de las curvas de liberación a pH ácido y neutro con diferentes modelos matemáticos

Modelo	pH 3.4	pH 6.1
Ritger-Peppas $M_t/M_\infty = kt^n$	0.909	0.932
N	0.481	0.385
Orden-cero $M_t/M_\infty = kt$	0.805	0.661
First order $\ln(1 - M_t/M_\infty) = -kt$	0.962	0.802
Higuchi $M_t/M_\infty = kt^{1/2}$	0.968	0.824
Hixson-Crowell $(1 - M_t/M_\infty)^{1/3} = -kt$	0.929	0.761

Los valores de r^2 se obtuvieron en Excel y el valor n utilizando solver

7.4.3. Perfil de liberación en jugo de manzana

El jugo de frutas en una de las bebidas más consumidas en todo el mundo debido a que presenta un aporte importante de compuestos bioactivos como vitaminas, compuestos fenólicos, antocianinas, carotenoides, entre otros (Sung, Song, Kim, Ryu, & Kang, 2014). Entre los jugos más consumidos se encuentra el de manzana el cual tiene un rango de pH de 3.1 a 4.4 por lo que se considera como un

alimento con bajo riesgo de contener microorganismos patógenos, en este sentido se han reportado algunos brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) causados por esta bebida relacionados con microorganismos como *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* (M.-R. Choi et al., 2012). Lo que conlleva a la búsqueda de técnicas para la inactivación de estos microorganismos, una de las más utilizadas es la pasteurización que implica un calentamiento del jugo a temperaturas de hasta 100°C, afectando sus características sensoriales y por ende su venta (Gouma, Álvarez, Condón, & Gayán, 2015). Una alternativa a técnicas como la pasteurización es la adición de agentes antimicrobianos naturales como las bacteriocinas, sin embargo en diversos estudios se ha observado que la adición de estos compuestos a una matriz alimentaria disminuye su actividad antimicrobiana, pues interactúan con compuestos propios del alimentos como iones o incluso otras proteínas, motivo por el que se ha optado por proteger estos compuestos mediante encapsulación en materiales de pared como las nanofibras de amaranto (Blanco-Padilla et al., 2014). En la figura 14 se presenta la cinética de crecimiento de *L. mesenteroides* en jugo de manzana estéril, este es un microorganismo considerado como deteriorador de diversos alimentos entre los que se encuentran productos cárnicos y jugos de frutas (Alonso & Álvarez 2010). En el gráfica se puede observar que la población del microorganismo sufre una disminución de aproximadamente 1 log UFC/mL después de las 98 horas de estudio, siendo similar este comportamiento en los jugos donde se colocaron nanofibras sin activo, este comportamiento puede deberse a el pH ácido del jugo de manzana que se encontraba a 3.4 al inicio del experimento y disminuyó hasta 2.8 al final del mismo, debido al crecimiento de los microorganismos inoculados. En el caso del jugo adicionado con nisina libre no se observaron diferencias significativas con respecto al jugo sin tratamiento, en otros estudios se ha demostrado que la nisina es inestable en pH ácidos como el del jugo de manzana, llegando a la inactivación total de la actividad antimicrobiana, como se observa en los resultados obtenidos (Aasen et al., 2003). Por el contrario, los tratamientos de jugo de manzana adicionados con nisina en nanofibras lograron una reducción aproximadamente de cinco logaritmos de UFC/mL con

respecto a la concentración inicial, siendo una reducción mayor a otros tratamientos como las altas presiones en donde se observaron reducciones de hasta 2 logaritmos en jugos de frutas (Basak et al., 2002). Observar una mayor reducción con nisina en nanofibras no representa un aumento de la actividad antimicrobiana, si no que indica que existe una protección y una liberación controlada del activo al incorporarse en nanofibras de amaranto.

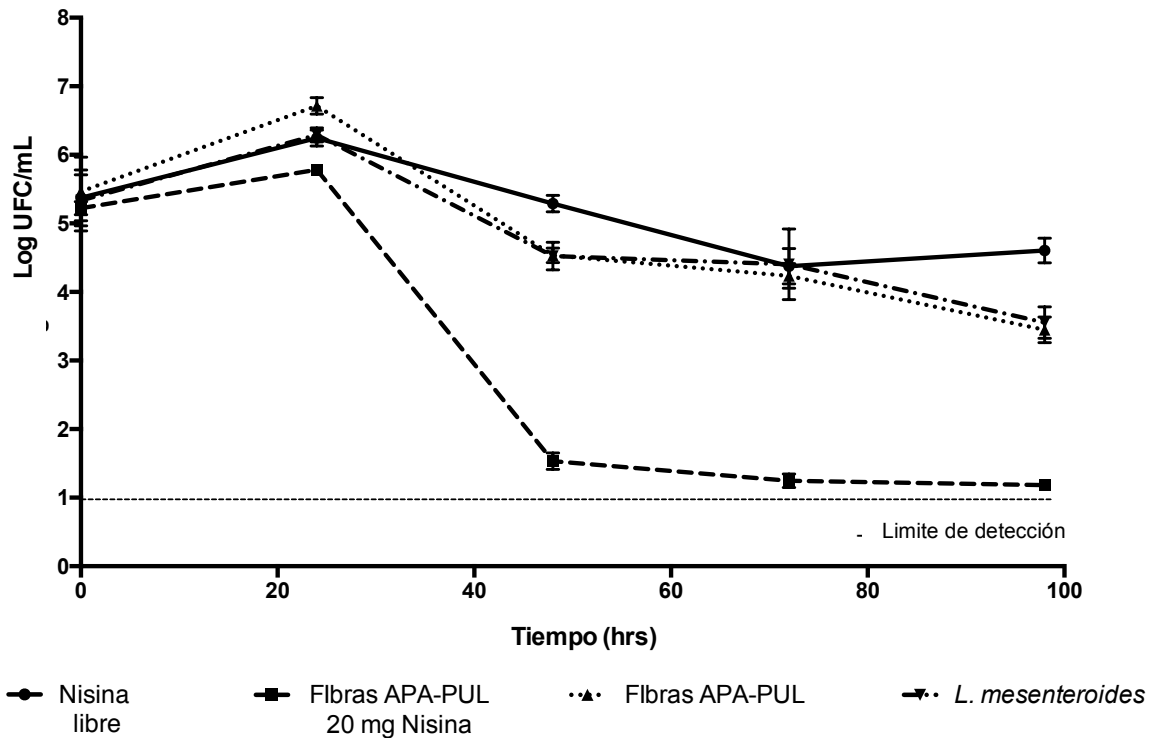


Figura 14. Cinética de crecimiento de *L. mesenteroides* en jugo de manzana estéril con diferentes tratamientos.

En la figura 15 se presenta la cinética de crecimiento de *Salmonella* Typhimurium donde se observa un comportamiento similar al de *Leuconostoc*, las nanofibras sin activo y el microorganismo como tal presentan una disminución significativa de la concentración inicial del microorganismo, pues es bien sabido que el pH es un factor de crecimiento intrínseco crítico para la inhibición de la proliferación microorganismos y uno de las principales factores conservadores de alimentos. Es ampliamente conocido que el bajo pH inhibe el crecimiento de microorganismos y

se ha estudiado el efecto sinérgico que presenta con otros tratamientos como el térmico (J.-Y. Lee, Kim, & Kang, 2015). Comparando las curvas de crecimiento de la nisina libre y encapsulada podemos observar que al adicionar nisina en el jugo de manzana, ésta pierde su actividad calentamiento óhmico y gas ozono, sin embargo estos tratamientos requieren de calentamiento para lograr la inactivación, lo que representa una desventaja del uso de estos, además que las reducciones en la población microbiana son menores a las observadas con los tratamientos evaluados en este estudio (Choi et al. 2009; Gabriel & Nakano 2009; Sung et al. 2014).

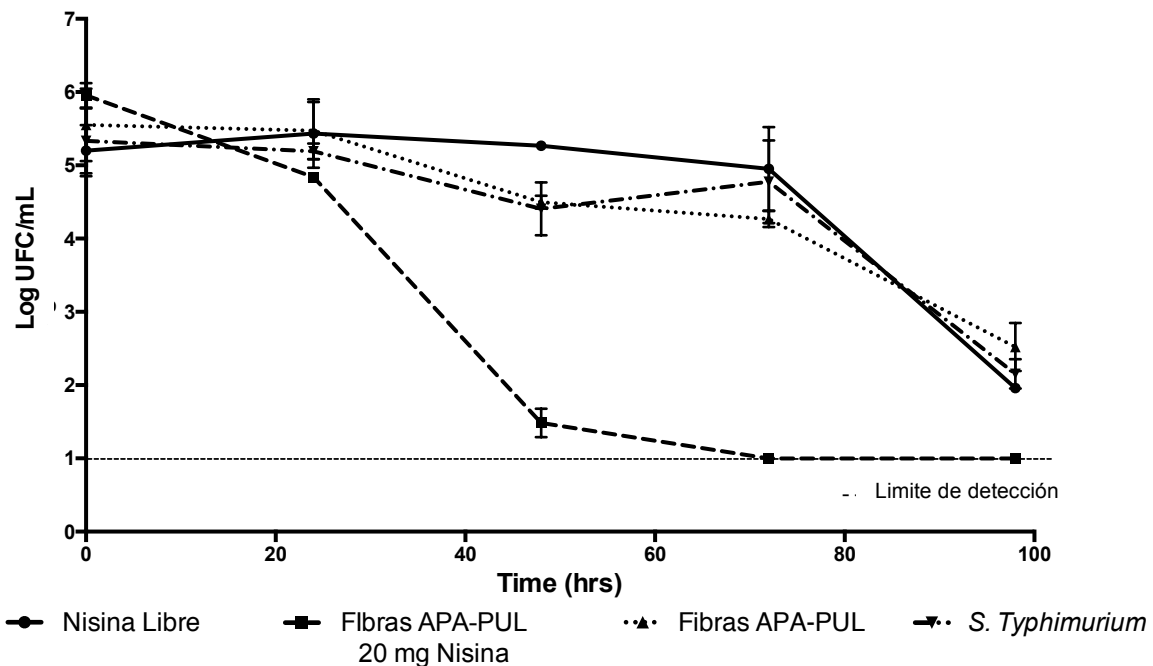


Figura 15. Cinética de crecimiento de *S. Typhimurium* en jugo de manzana estéril con diferentes tratamientos.

La cinética de crecimiento de *L. monocytogenes* se presenta en el gráfico de la figura 16, los resultados son similares a los microorganismos anteriores, donde se observó disminución de la carga inicial en las nanofibras sin activo y en nisina libre debido al efecto del pH como se observa en el jugo sin tratamientos. En el caso de la nisina encapsulada la disminución fue de 6 log UFC/mL después de las 24 horas de tratamiento, esto sugiere que el microorganismo presenta una menor

tolerancia a nisina que *Leuconostoc* y *Salmonella*, en comparación con el efecto del calentamiento óhmico se obtuvo una mayor reducción en jugo de manzana, pues solo se logró reducir 3 logaritmos (Gouma et al., 2015; J.-Y. Lee et al., 2015)

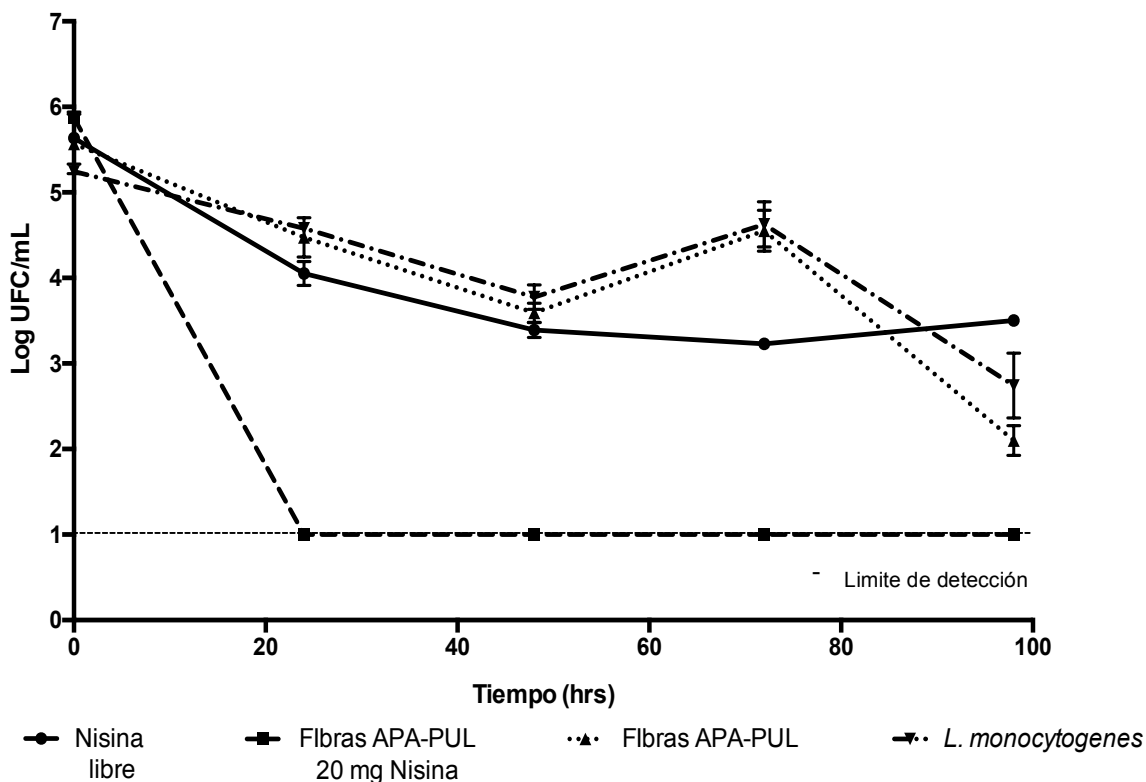


Figura 16. Cinética de crecimiento de *L. monocytogenes* en jugo de manzana estéril con diferentes tratamientos.

7.4.4. Determinación del perfil de liberación en queso panela

La mayoría de los quesos producidos en México son denominados quesos frescos, representando aproximadamente el 80% del queso total consumido. Este tipo de quesos se caracterizan por una vida útil corta, debido al alto nivel de humedad, baja concentración de sal y pH neutros. Debido a su alto contenido de agua tienen gran tendencia a la sinéresis. Uno de los representantes más importantes de este grupo es el queso Panela, que es un queso templado y húmedo, con un sabor dulce (Cruz-guerrero, Garci, & Jime, 2009; Guzman-hernandez, Contreras-rodriguez, Hernandez-velez, & Perez-martinez, 2016;

Stensberg, Wei, Mclamore, & Marshall, 2012). Este tipo de quesos generalmente se preparan con leche sin pasteurizar, lo que los hace propensos a la contaminación por diversos microorganismos, esta es la razón por la que se encuentran relacionados con brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, de acuerdo con el centro de control y prevención de enfermedades (por sus siglas en inglés CDC) el 29% de las ETAS está relacionado con el consumo de queso en Estados Unidos, lo que representa un problema de salud grave (Saxer, Schwenninger, & Lacroix, 2013). La contaminación microbiana puede ocurrir en cualquier etapa de la producción del queso, siendo los patógenos más frecuentes *E. coli*, *Campylobacter*, *Salmonella* y *Listeria* (Guzman-Hernandez et al. 2016). Para eliminar este tipo de contaminación es recomendable un tratamiento de pasteurización, sin embargo los productores observan que el sabor del queso cambia cuando se utiliza este proceso, por lo que el uso de antimicrobianos, como las bacteriocinas, es una alternativa. El uso de nisina encapsulada en nanofibras de proteína de amaranto y pululano fue evaluado para usarse como una película comestible para queso panela para inhibir el crecimiento de *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* y *L. mesenteroides*, la evaluación de la actividad antimicrobiana se llevó a cabo durante 7 días.

La figura 17 representa la curva de crecimiento de *Salmonella* en la que se puede observar que en ninguno de los tratamientos se observó crecimiento del microorganismo, lo que puede estar relacionado con las temperaturas de refrigeración en las que se almacenaron los trozos de queso, sin embargo es notoria una gran diferencia cuando se comparan los tratamientos de nisina libre y nisina encapsulada, ya que al adicionar la nisina en su forma libre esta perdió completamente su actividad antimicrobiana, ya que no logro una reducción significativa de la población del microorganismo. La disminución de su actividad puede deberse principalmente a que se une a componentes del queso como la proteínas y la grasa, por el contrario cuando la nisina se encuentra encapsulada existe una liberación controlada, que no permite la inactivación de la bacteriocina, se puede observar que desde las primeras horas del estudio existió una disminución de aproximadamente 2 logaritmos, logrando la inactivación completa,

después de 7 días de tratamiento. Existen diferentes estudios en los que se ha tratado de disminuir la contaminación de *Salmonella* en quesos frescos como el panela, entre ellos el uso de altas presiones hidrostáticas en las que se logró observar una disminución del contenido inicial del microorganismo, sin embargo se observó que las bacterias eran capaces de recuperarse, ya que no se llega a la inactivación completa del microorganismo (Lo & Herna 2007).

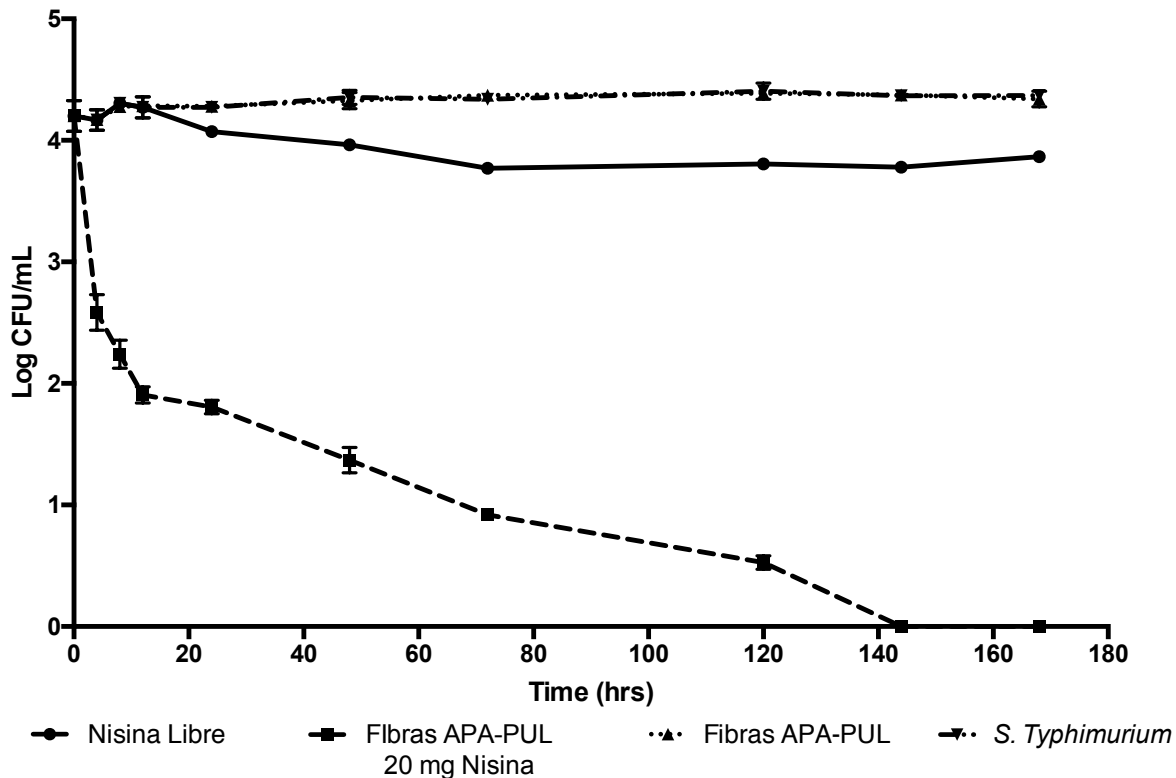


Figura 17. Cinética de crecimiento de *Salmonella Typhimurium* en queso panela comercial con diferentes tratamientos.

● Nisina Libre ■ Fibras APA-PUL 20 mg Nisina ▲ Fibras APA-PUL ◆ S. Typhimurium

En el caso de *Listeria monocytogenes* se presenta la curva de crecimiento en la figura 18, en donde se puede observar resultados similares a los encontrados para *Salmonella*, sin embargo este microorganismo requirió mayor tiempo de tratamiento para su inactivación completa, ya que fueron necesarios 9 días para no observar crecimiento del microorganismo, mientras que en el tratamiento en el que se adicionó nisina libre se observó una disminución a los dos días del

experimento de aproximadamente medio logaritmo y después de un día se observó nuevamente crecimiento de *Listeria* llegando a ser similar al control negativo, que no tenía ningún tipo de tratamiento. También se puede observar que las fibras de amaranto y pululano por si solas no presentaban actividad antibacteriana, pues no existió disminución de la concentración inicial del microorganismo

Por otra parte existen algunos estudios en donde se evalúa la disminución de *Listeria* con diversos tratamientos como las altas presiones y su combinación con extractos de timol, con este último tratamiento se observó una reducción de *Listeria* de 1.68 logaritmos de CFU/g, usando presiones de hasta 40 MPa , el inconveniente con este tratamiento es que el timol es un compuesto con olor y sabor característico que modifica las características sensoriales de los alimentos y no se alcanzó la inactivación completa de la carga inicial (Bleocanc et al., 2016).

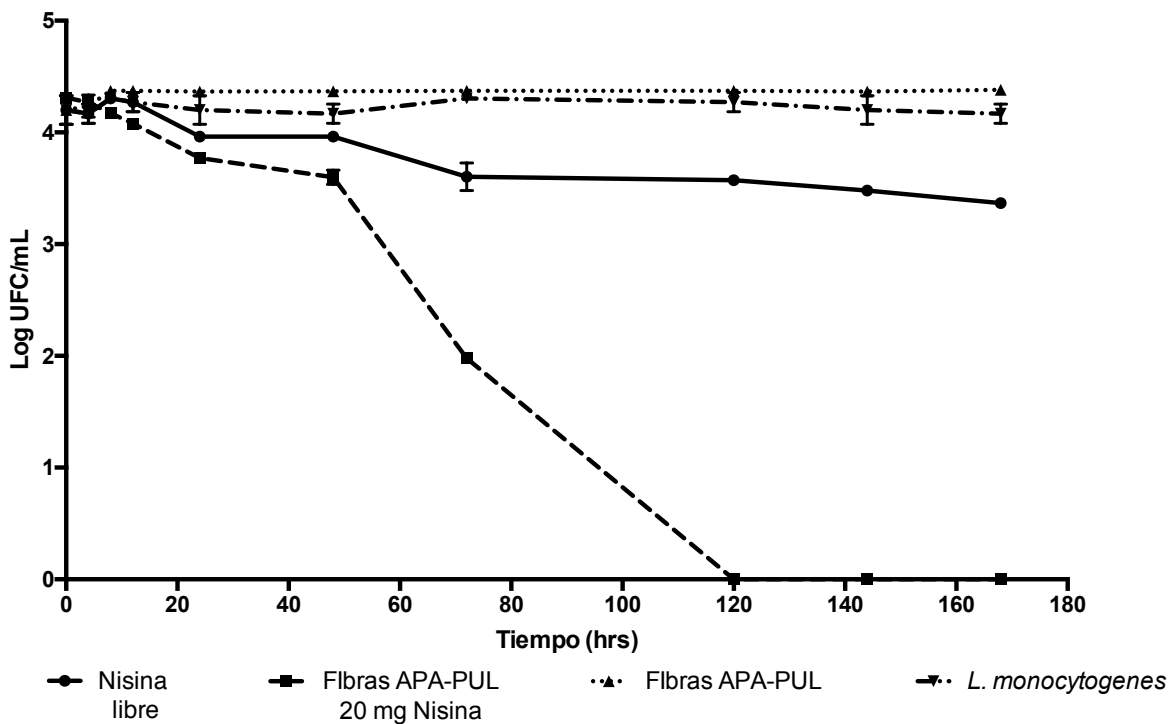


Figura 18. Cinética de crecimiento de *L. monocytogenes* en queso panela comercial con diferentes tratamientos.

En la figura 19 se presenta la curva de crecimiento de *Leuconostoc*, este fue el microorganismo que requirió más tiempo para lograr la inactivación completa, ya que esta se pudo observar hasta los siete días del tratamiento, la nisina adicionada en su forma libre logro una disminución de 0.6 unidades logarítmicas y manteniendo un efecto bacteriostático similar al control. Mientras que las fibras sin cargar que como ya se mencionó se puede relacionar a la temperaturas de refrigeración a la que se sometió el queso panela, durante el experimento, se observa el mismo efecto de pérdida de la actividad antimicrobiana de nisina al adicionarse en su forma libre, mientras que encapsulada se lleva a cabo una reducción de 4.5 Log de UFC/g.

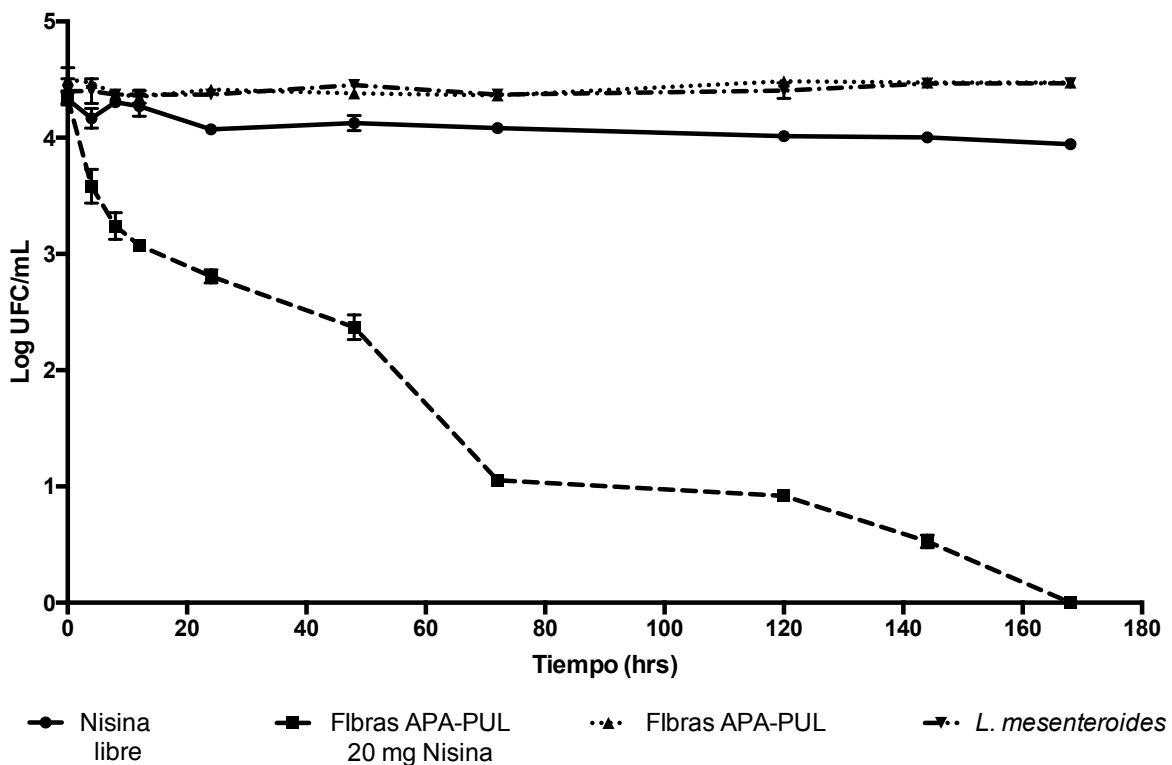


Figura 19. Cinética de crecimiento de *L. mesenteroides* en queso panela comercial con diferentes tratamientos.

Los resultados obtenidos permiten sugerir que el uso de las nanofibras de proteína de amaranto y pululano cargadas con nisina representa una alternativa viable para la eliminación de microorganismos patógenos en la superficie de queso panela, cuando se usan como una película comestible, ya que al utilizarse como una

película comestible en queso panela se observó una disminución del 100% de la población a las 172 horas del tratamiento.

7.5. Obtención y caracterización de extractos

Con el objetivo de aprovechar subproductos de la industria alimentaria, principalmente de la industria vinícola y de jugos de frutas, se obtuvieron extractos acuosos por el método de percolación de cuatro materiales secos: orégano, pericón, mosto de uva y bagazo de naranja, los cuales se liofilizaron para obtener un polvo seco, en el cuadro 12 se presentan los rendimientos obtenidos para cada extracto.

Cuadro 12. Porcentaje de rendimiento de los extractos acuosos de diferentes materiales

Muestra	Rendimiento (%)
Orégano	48.62 ± 2.9
Pericón	17.38 ± 0.7
Mosto de uva	53.6 ± 0.4
Bagazo de naranja	60.7 ± 1.4

Los resultados se presentan como la media ± el error estándar de tres replicas

El porcentaje de rendimiento es una relación entre la masa obtenida del extracto y la cantidad en gramos de la muestra seca utilizada, este factor se ve afectado por el método de extracción y el tipo de solvente, además se encuentra relacionado con los costos de extracción, por el uso de solventes y la energía necesaria para llevarla a cabo, por lo que encontrar un método de extracción eficiente es de suma importancia (Sharma & Cannoo 2017). En el cuadro 12 se puede observar que el mayor porcentaje de rendimiento se obtuvo con el bagazo de naranja, seguido del mosto de uva, orégano y pericón, presentando una tendencia a tener mayores rendimientos en los subproductos de frutas, comparado con los de las plantas, esto puede deberse a que los subproductos presentan una cantidad de azúcares que se solubilizan en agua en comparación con las plantas. Esta característica podría representar una desventaja, debido a que los hace más propensos a

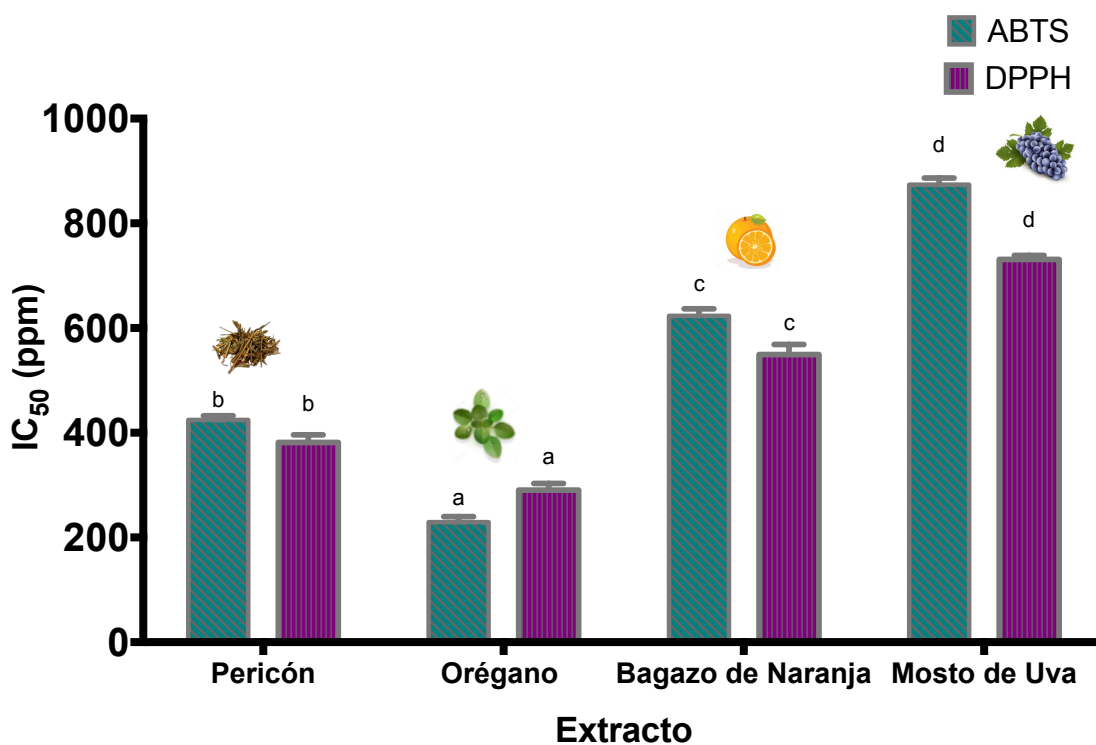
ataques microbianos y además después de un tiempo cuando se encontraban en estado líquido presentaron formación de geles, principalmente el extracto de naranja que puede contener una cantidad alta de pectinas (Navarro-cortez et al., 2018).

7.5.1. Evaluación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de los extractos utilizados para la producción de nanopartículas se determinó mediante dos métodos, ABTS y DPPH, los resultados se presentan como la Concentración Inhibitoria cincuenta (CI_{50}) que representa la cantidad de extracto necesaria para inhibir el 50% del radical. La figura 20 muestra los valores de CI_{50} en ppm obtenidos para cada extracto, en donde podemos observar que el extracto acuoso de orégano es el que presenta los valores de CI_{50} más bajos lo que indica una mayor capacidad antioxidante con respecto a los demás extractos, seguido de los extractos de pericón, bagazo de naranja y mosto de uva. En este caso la tendencia es diferente a la observada con los porcentajes de rendimiento, pues aquí las plantas son las que presentan una mayor capacidad antioxidante.

El extracto acuoso de orégano (*Lippia graveolens*) presentó una CI_{50} de 229.4 ± 10.5 y 290 ± 12.70 ppm, para ABTS y DPPH respectivamente, resultados que son más bajos que lo reportado para el aceite esencial de orégano griego, *Lippia turbinata*, con 357 y 400 ppm para el radical DPPH, las diferencias encontradas se deben a la cantidad de compuestos fenólicos extraídos, los cuales difieren de acuerdo a la especie, el método de extracción y los solventes utilizados (Quiroga et al., 2013). El extracto de pericón presentó una CI_{50} 424.50 ± 7.90 y 381.4 ± 14.5 ppm para ABTS y DPPH, los resultados concuerdan con lo reportado por Oliveiro-Verbel et al. 2010 quienes reportaron una CI_{50} de 397 ppm para un extracto hidroalcolico de la planta *Tagetes lucida*. En cuanto a los extractos de subproductos de frutas, estos presentaron valores de CI_{50} de 623.40 ± 13.65 , 549.30 ± 19.40 y 873.90 ± 12.56 , 731.20 ± 7.52 para el extracto de bagazo de naranja y mosto de uva respectivamente, los valores obtenidos para el desecho de

naranja son mejores a los obtenidos por Oliveiro-Verbel et al. (2010) para un extracto etanólico de piel naranja con un valor de 800 ppm. La obtención de una mayor capacidad antioxidante puede deberse a que en este trabajo se utilizó todo el bagazo de naranja que corresponde a la piel y a los arilos de la fruta, en donde también se encuentra gran cantidad de compuestos antioxidantes como la vitamina C. Para el mosto de uva de la especie *Cabernet Sauvignon*, se han reportado valores de CI_{50} de 342 ppm, lo cual resulta menor a lo encontrado en este estudio, es importante recalcar que la cantidad de compuestos fenólicos presentes en las uvas puede variar entre el año y el lugar de cosecha.

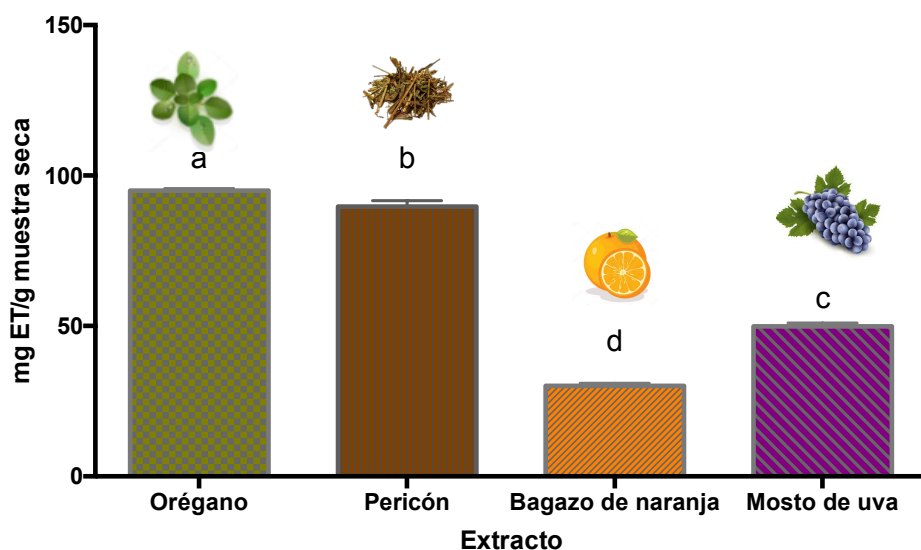


Los resultados se presentan como las media \pm el error estándar de tres replicas, letras diferentes en columnas del mismo color representan diferencias significativas identificadas mediante la prueba de Tukey $P < 0.05$

Figura 20. Porcentaje de inhibición del radical ABTS y DPPH en extractos acuosos y metanólicos de las plantas y frutas objeto de estudio.

Otra técnica utilizada para determinar la actividad antioxidante es el método CUPRAC, el cual consiste en la reducción de cobre, este puede llevarse a cabo por un método colorimétrico o siguiendo la transferencia de electrones mediante métodos electroquímicos (Cárdenas, Gómez, & Frontana, 2014). En la figura 21 se

presentan los resultados de la capacidad antioxidante de los extractos acuosos expresados como miligramos equivalentes de Trolox (mg ET) por gramo de muestra seca determinados por la técnica CUPRAC.



Los resultados se presentan como las media \pm el error estándar de tres replicas, letras diferentes representan diferencias significativas identificadas mediante la prueba de Tukey $P < 0.05$

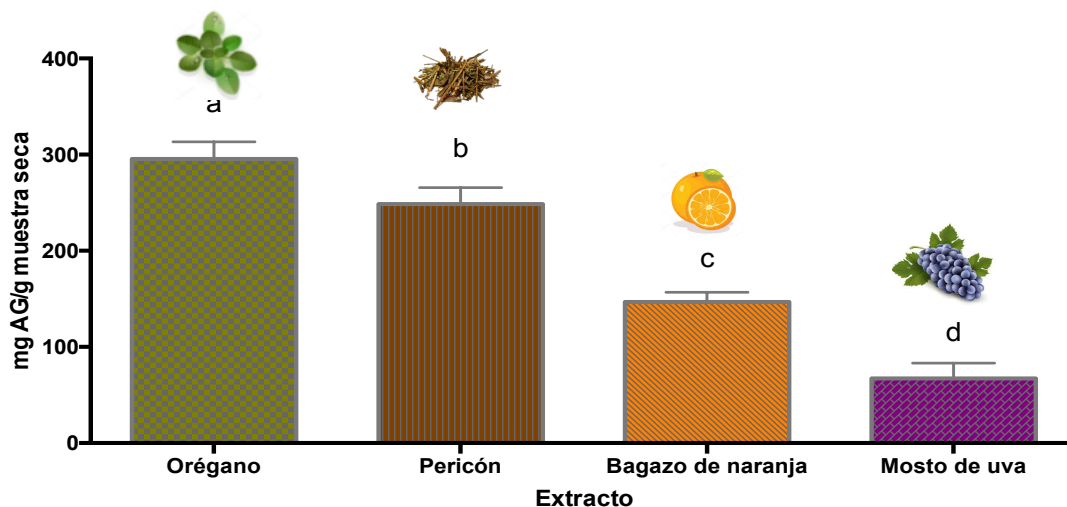
Figura 21. Capacidad antioxidante de extractos acuosos de diferentes materiales obtenida por la técnica CUPRAC electroquímico.

En la gráfica es fácil de observar que la capacidad antioxidante de los extractos de plantas es superior a la de los desechos de mosto de uva y bagazo de naranja llegando a ser hasta 3 veces mayor la del extracto orégano que la del extracto de naranja, estos resultados son acordes a los obtenidos en los métodos de ABTS y DPPH; sin embargo hasta el momento no se encontraron reportes de la capacidad antioxidante de extractos similares mediante esta técnica que nos permitan hacer una comparación.

La determinación de la capacidad antioxidante de los extractos es de suma importancia ya que podría relacionarse con la síntesis de nanopartículas de plata en donde se llevan a cabo reacciones de óxido reducción.

7.5.1. Determinación de fenoles totales

La figura 22 muestra los contenidos de fenoles totales de los extractos de las diferentes muestras en los que puede observar que se sigue la misma tendencia que en la capacidad antioxidante, ya que los extractos de plantas son los que presentan mayor contenido de compuestos fenólicos, nuevamente el extracto con un mayor contenido es el de orégano, seguido del pericón, bagazo de naranja y mosto de uva. Los fenoles de cáscara de uva han sido ampliamente estudiados reportándose intervalos que van desde 173-127 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra, los resultados obtenidos se encuentran dentro del rango reportado en la literatura (Tournour et al. 2015; Kuck & Noreña 2016). En el caso del orégano *Lippia graveolens* se obtuvo un contenido de 330.57 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto acuoso, resultados similares a los obtenidos por Zavala Nigoa, et al. (2004) quienes observaron un contenido fenólico de 231 mg EAG en extractos acuosos de orégano griego. Para el caso de los extractos de pericón y cáscara de naranja se han encontrado pocos estudios sobre el contenido de fenoles totales, pero se puede observar que el extracto de pericón es muy similar al de orégano, mientras que el de naranja es parecido al mosto de uva, siendo mayores a los reportados por Rincón et al., en 2005, sin embargo éstos no especifican la manera de obtención de los extractos. En general podemos concluir que la capacidad antioxidante es proporcional al contenido de fenoles totales, debido a las tendencias similares que se presentaron entre los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante determinada por diferentes técnicas.



Los resultados se presentan como la media \pm el error estándar de tres replicas, letras diferentes representan diferencias significativas identificadas mediante la prueba de Tukey $P < 0.05$

Figura 22. Fenoles totales obtenidos por el método de Folin-Ciocalteu de extractos acuosos, expresados como mg equivalentes de ácido gálico.

7.5.2. Cuantificación de fenoles mediante HPLC/DAD

Para la cuantificación de fenoles en los extractos acuosos liofilizados se utilizó cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC/DAD) y con la ayuda de 19 estándares se identificaron los picos obtenidos, de los cuales se realizaron curvas de calibración que se presentan en el apartado de anexos y en la figura 23 se presentan los estándares separados.

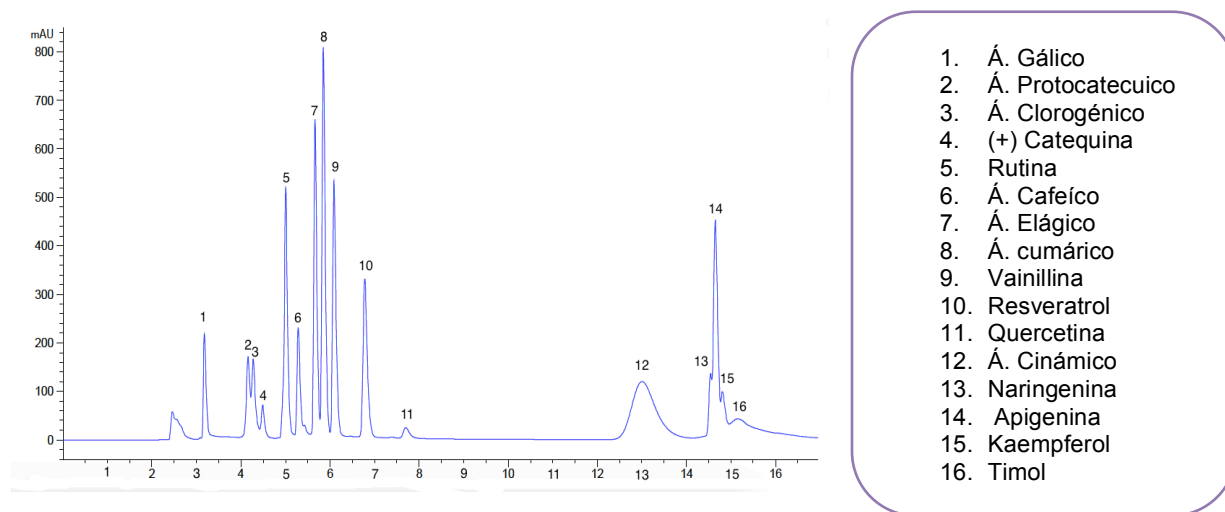


Figura 23. Cromatograma obtenido por HPLC/DAD de la mezcla de estándares.

7.5.2.1. Extracto acuoso de mosto de uva

En el cuadro 13 se muestran los compuestos fenólicos encontrados en extractos acuosos de mosto de uva (piel, tallos y semilla), en donde se presenta la concentración en mg del compuesto por gramo de muestra seca y el ajuste obtenido en la curva, se pudieron identificar cinco ácidos fenólicos, cuatro flavonoides y un estilbeno (Figura 24).

Cuadro 13. Contenido de compuestos fenólicos de extractos metanólicos de cascara de uva mediante HPLC/DAD.

Compuesto	Concentración (mg/g muestra seca)	% Ajuste
<i>Ácidos fenólicos</i>		
Ácido gálico	1.36 ± 0.39	93.9
Ácido cafeico	2.93 ± 0.12	98.7
Ácido cumárico	1.421 ± 0.22	96.5
Ácido clorogénico	0.18 ± 0.11	94.6
Ácido protocatecuico	0.20 ± 0.16	97.9
<i>Flavonoides</i>		
Rutina	0.34 ± 0.01	96.9
Kaempferol	2.48 ± 0.23	92.3
Apigenina	1.17 ± 0.10	98.7
<i>Estilbeno</i>		
Resveratrol	1.41 ± 0.22	94.4

Los resultados se presentan como la media ± el error estándar de tres replicas

El compuesto que se encontró en una mayor concentración fue el ácido cafeico, seguido del Kaempferol, resveratrol y apigenina, el perfil de compuestos fenólicos es similar al reportado por Peixoto et al. 2018 en un extracto hidroalcolico de

mosto de uva fermentado, sin embargo no se menciona la variedad de uva utilizada, en este estudio los compuestos mayoritarios del extracto son ácidos fenólicos como el cafeíco, gálico y cumárico y algunas antocianinas que no fueron identificadas en nuestro estudio.

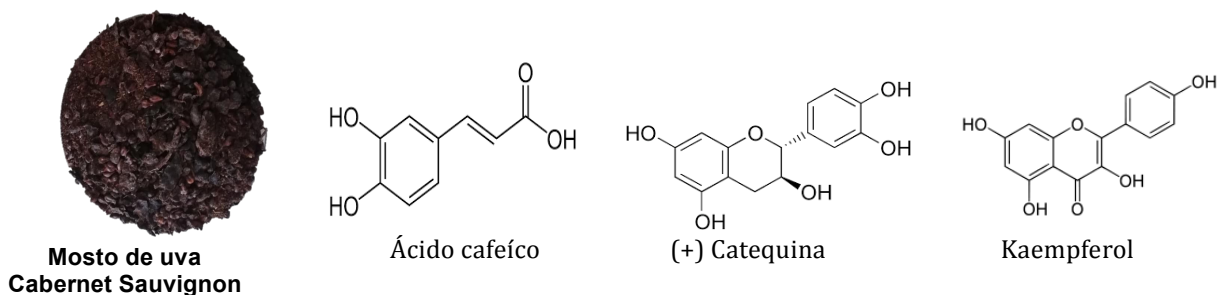


Figura 24. Estructura química de algunos de los compuestos encontrados en el extracto acuoso de mosto de uva.

7.5.2.2. Extracto de cascara de naranja

El contenido de diferentes compuestos fenólicos en extractos acuosos de cáscara de naranja se presentan en el cuadro 14 , expresado en mg/g de materia seca. En el caso de este extracto, además de los estándares se adiciono un estándar de Naringenina, compuesto encontrado en este material como lo reporta Escobar 2010, quien probó diferentes métodos de extracción de compuestos fenólicos en cáscara de naranja reutilizada encontrando concentraciones de 5.04 mg/g en base seca, resultado menor a lo obtenido en este estudio, aun no se han encontrado reportes de la cuantificación de compuestos fenólicos en extractos acuosos de desechos de naranja.

Cuadro 14. Contenido de compuestos fenólicos de extractos acuosos de bagazo de naranja mediante HPLC/DAD.

Compuesto	Concentración (mg/g muestra seca)	% Ajuste
<i>Ácidos fenólicos</i>		
Ácido gálico	8.29 ± 0.28	93.9
Ácido cafeíco	2.01 ± 0.18	98.7
Ácido cumárico	0.35 ± 0.16	96.5
Ácido clorogénico	2.79 ± 0.33	94.6
Ácido protocatecuico	0.62 ± 0.06	97.9
<i>Flavonoides</i>		
Rutina	0.52 ± 0.15	96.9
Kaempferol	1.17 ± 0.05	92.3
Naringenina	1.68 ± 0.53	98.7
<i>Aldehído</i>		
Vainillina	0.52 ± 0.15	97.6

Los resultados se presentan como la media ± el error estándar de tres replicas

Los compuestos mayoritarios del extracto acuoso de bagazo de naranja fueron el ácido gálico, clorogénico, cafeíco, naringenina y kaempferol (Figura 25), presentando un perfil de compuestos fenólicos similar al del mosto de uva caracterizados por la presencia mayoritaria de ácidos fenólicos y flavonoides. Un perfil de compuestos fenólicos similar fue reportado por Sanchez-Aldana et al. (2013), quienes elaboraron extractos acuosos ácidos de cáscara de naranja, en donde encontraron un perfil de compuestos rico en naringenina, esperidina y ácido cumárico en concentraciones menores a las reportadas en este trabajo, lo cual puede deberse a que se utilizó únicamente la piel de naranja y nosotros utilizamos

los gajos, semillas y piel que tiene una cantidad considerable de compuestos fenólicos y aceites esenciales.

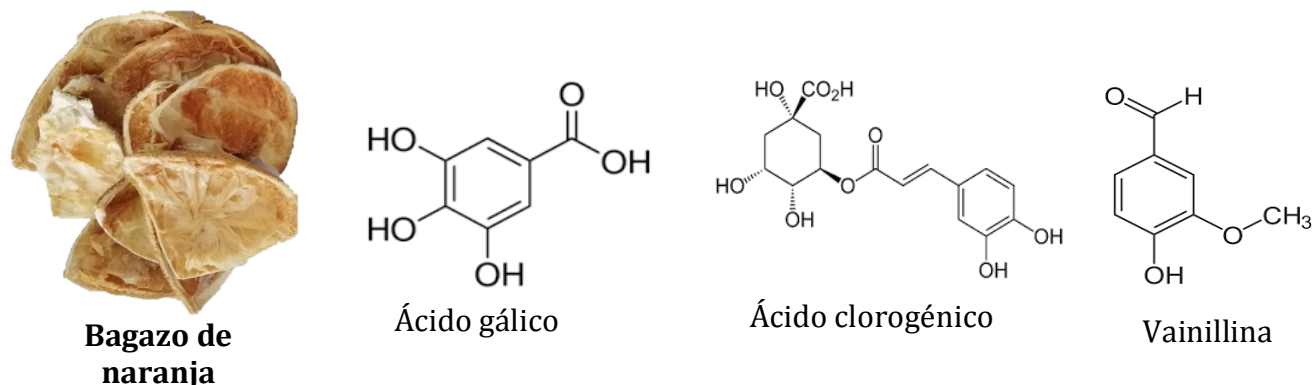


Figura 25. Estructura química de algunos de los compuestos encontrados en el extracto acuoso de bagazo de naranja.

7.5.2.3. Extracto acuoso de orégano (*Lippia graveolens*)

La especie *Lippia graveolens* es conocida como orégano mexicano y ha sido estudiado debido a que presenta compuestos terpénicos en su aceite esencial y por el contenido de compuestos con actividad antimicrobiana (Reyes, 2010), entre los que se encuentran el timol y carvacrol, compuestos que han sido identificados en otras especies de orégano como el *Origanum vulgare* (Martins et al., 2014).

En el cuadro 15 se presenta el perfil de compuestos fenólicos del extracto de orégano en el que se lograron identificar seis ácidos fenólicos, cuatro flavonoides, un aldehído y un monoterpeno. El ácido rosmarínico, gálico y elágico fueron los ácidos fenólicos mayoritarios del extracto, mientras que el kaempferol es el principal flavonoide, se pudieron identificar y cuantificar en el extracto timol (Figura 26) el cual es un monoterpeno característico de las plantas de orégano. A éste último se le atribuye principalmente su actividad antimicrobiana, y presentó una concentración de 3.12 ± 0.057 mg/g de muestra seca; valor más alto que lo reportado por Skendi et al., 2017, para un extracto similar de *Origanum vulgare*, y valor en concordancia a lo reportado por Fuentes (2009) en el aceite esencial de *Lippia graveolens*. Tienes oraciones muy largas parecen párrafos, traté de modificar y quede mejor

Cuadro 15. Contenido de compuestos fenólicos de extractos acuosos de orégano identificados mediante un análisis HPLC/DAD.

Compuesto	Concentración mg/g muestra seca	% Ajuste
Ácidos fenólicos		
Ácido gálico	1.31 ± 0.39	93.9
Ácido protocatecuico	0.26 ± 0.02	97.9
Ácido elágico	1.86 ± 0.05	94.6
Ácido cumárico	0.96 ± 0.07	96.5
Ácido rosmarínico	2.46 ± 0.19	99
Ácido ferúlico	0.62 ± 0.03	99.8
Aldehído		
Vainillina	0.87 ± 0.01	97.9
Flavonoides		
Quercetina	0.81 ± 0.09	99.7
Apigenina	0.63 ± 0.04	98.7
Kaempferol	5.76 ± 0.03	92.3
Naringenina	0.48 ± 0.05	98.3
Monoterpeno		
Timol	3.12 ± 0.06	93.7

Los resultados se presentan como la media ± el error estándar de tres replicas



Orégano

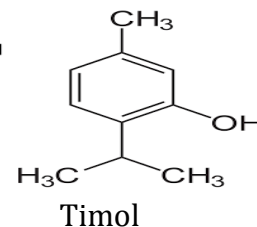
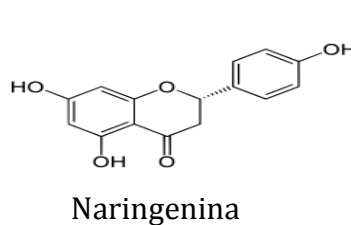
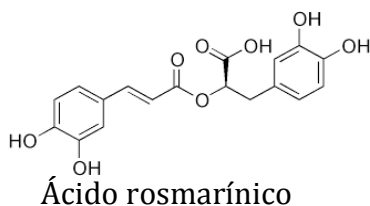


Figura 26. Estructura química de algunos de los compuestos encontrados en el extracto acuoso de orégano (*lippia graveolens*).

7.5.2.4. Extracto de pericón *Tagetes lucida*

Del genero *Tagetes* el más estudiado y conocido es el *erecta*, mejor conocido como flor de cempasúchil del que se han analizado los compuestos fenólicos presentes en extractos alcohólicos encontrándose como principales componentes los ácidos gálico, elágico y cumárico (Navarro-González, González-Barrio, García-Valverde, Bautista-Ortín, & Periago, 2014; Siriamornpun, Kaisoon, & Meeso, 2012).

Cuadro 16. Contenido de compuestos fenólicos de extractos acuosos de Pericón (*Tagetes Lucida*) identificados mediante un análisis HPLC/DAD.

Compuesto	Concentración mg/g muestra seca	% Ajuste
<i>Ácidos fenólicos</i>		
Ácido gálico	2.13 ± 0.26	93.9
Ácido protocatecuico	0.89 ± 0.069	97.9
Ácido elágico	1.41 ± 0.16	94.6
Ácido cumárico	2.25 ± 0.15	96.5
Ácido ferúlico	1.498 ± 0.18	99.8
<i>Aldehído</i>		
Vainillina	0.29 ± 0.033	97.9
<i>Flavonoides</i>		
Quercetina	0.27 ± 0.05	99.7
Apigenina	0.2181 ± 0.06	98.7
Kaempferol	5.87 ± 0.03	92.3
Naringenina	5.13 ± 0.49	98.3

Los resultados se presentan como la media ± el error estándar de tres replicas

En el cuadro 16 se presenta el perfil de compuestos fenólicos del extracto liofilizado de pericón, el cual se caracterizó por la presencia de cinco compuestos fenólicos, cuatro flavonoides y un aldehído aromático, siendo los mayoritarios para

los flavonoides naringenina y kaempferol, seguidos del ácido cumárico y gálico (Figura 27). En cuanto a comparación con la literatura no se logró encontrar un estudio donde se evaluara el perfil de compuestos fenólicos y cuantificación de la especie *Tagetes lucida*, sin embargo se menciona como componentes principales a la 5,7,4-trimetoxiflavona y patulina, que no fueron identificados en este estudio y se encuentran relacionados con la actividad antimicrobiana (Sanchez-Aldana et al., 2013).

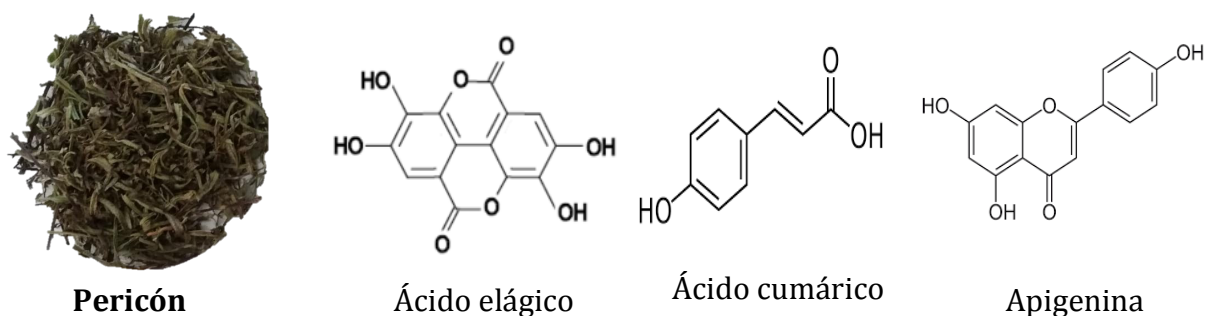


Figura 27. Estructura química de algunos de los compuestos encontrados en el extracto acuoso de Pericón (*Tagetes lucida*).

7.6. Síntesis de nanopartículas de plata

7.6.1. Evaluación del tiempo de reacción en la síntesis de nanopartículas de plata.

La síntesis de nanopartículas de plata usando extractos de plantas se basa en una reacción de óxido-reducción en la que participan diferentes componentes de las plantas como los compuestos fenólicos. La eficiencia de reducción es dependiente del estado de oxidación y conformación estructural de los compuestos, la cual puede verse afectada por diferentes factores dando como resultado diferentes tamaños y formas de las nanopartículas (Heydari & Rashidipour 2015). La formación de nanopartículas de plata se evaluó modificando el tiempo de reacción usando un espectrofotómetro Spectra Max con un barrido en el espectro de 300 a 800nm. Éste es un método indirecto para observar la reducción de los iones

plata mediante la presencia del plasmón de superficie, el cual aparece a longitudes de onda características para cada metal. De manera adicional, se corroboró la formación de nanopartículas con el cambio de color de las soluciones de nitrato de plata, este cambio de coloración se encuentra relacionado con la excitación del plasmón de superficie de las nanopartículas de plata. La figura 28 presenta los espectros de la formación de nanopartículas de plata a diferentes tiempos de reacción a una temperatura de 80°C con los extractos acuosos de los cuatro materiales anteriormente caracterizados.

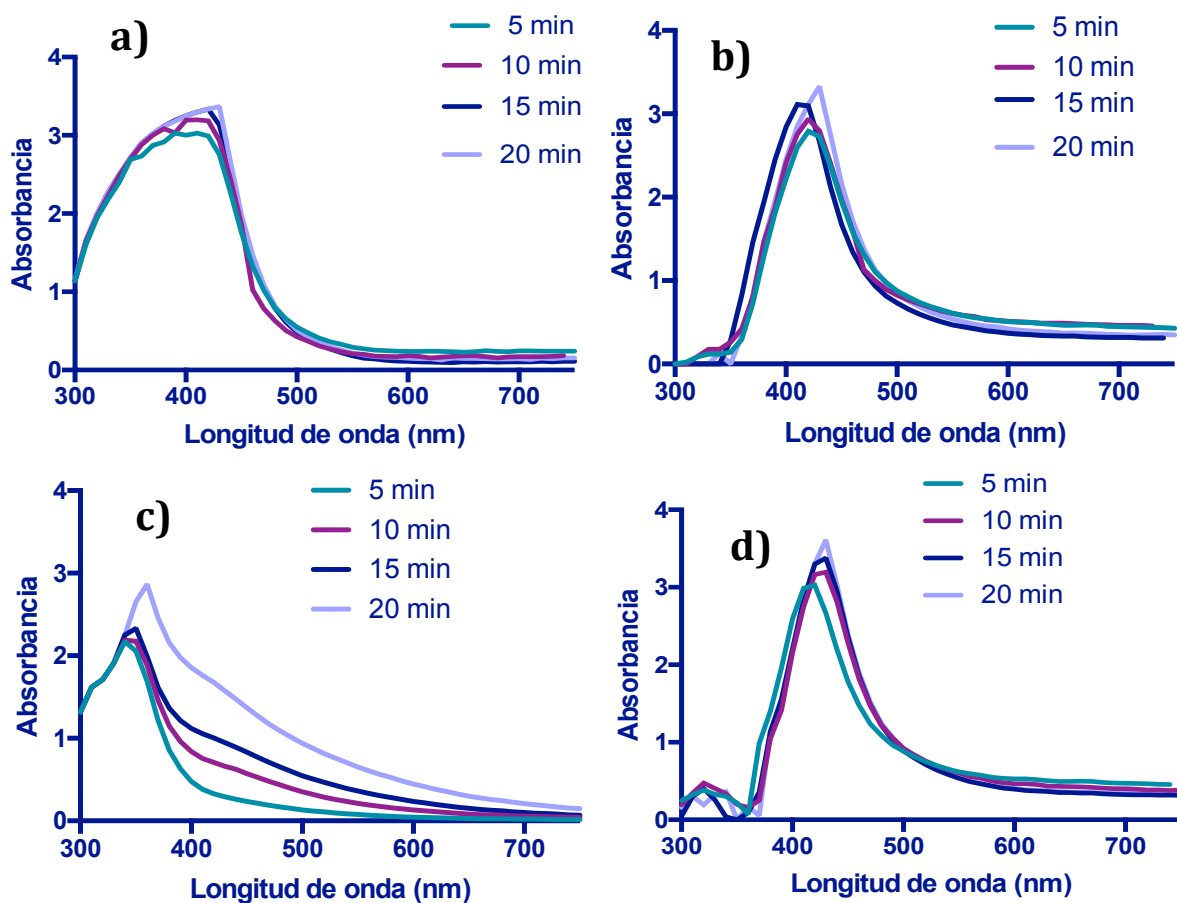


Figura 28. Espectros de UV-Vis de nanopartículas de plata a diferentes tiempos de reacción sintetizadas con extractos acuosos de a) uva b) orégano c) naranja y d) pericón.

Para la construcción de los espectros de la figura 27 se fijó una temperatura de 80°C y una concentración de 0.02% de los extractos, pues se observó que estas eran las mejores condiciones para la síntesis de nanopartículas. En todas las muestras se puede observar que existe formación de nanopartículas de plata desde los 5 minutos de reacción y conforme aumenta el tiempo de contacto, se observa un incremento de intensidad del pico de la RPS, lo que indica una reducción continua de los iones plata y un aumento en la concentración de AgNPs que se encuentran en solución (Mohan et al., 2016). Los resultados obtenidos son similares a los reportados con el uso de diferentes extractos de plantas y futas como el eucalipto (Shankar, Chorachoo, Jaiswal, & Piyawan, 2014) e incluso polisacáridos como el almidón.

Las nanopartículas de plata formadas con extractos de plantas presentan bandas mejor definidas y con un menor ensanchamiento, de acuerdo a lo reportado por Ashkarran & Bayat, 2013, la forma de la banda tiene relación con la morfología de las nanopartículas. De acuerdo Ashkarran & Bayat 2013, las características de las bandas se sugiere que las nanopartículas elaboradas con extractos de frutas presentan una forma octaédrica, mientras que las que se elaboraron con extractos de plantas presentan una forma esférica, sin embargo esto debe corroborarse con las micrografías de TEM.

7.6.2. Morfología de AgNPs sintetizadas

La figura 29 presenta las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión y microscopía electrónica de barrido de las nanopartículas obtenidas con extractos acuosos de mosto de uva, bagazo de naranja, orégano y pericón, recién sintetizadas y montadas en preparación líquida, por lo que su observación mediante microscopía electrónica de barrido fue complicada para enfocar las muestras.

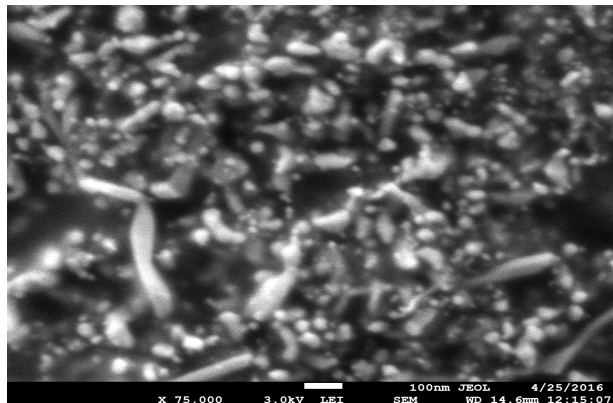
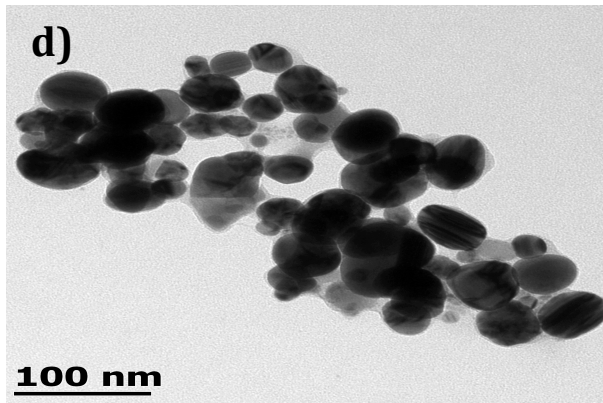
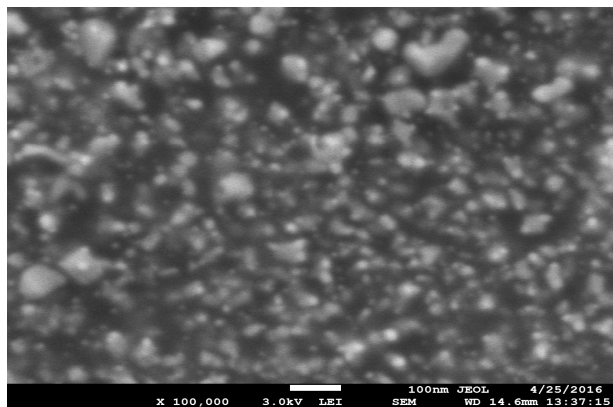
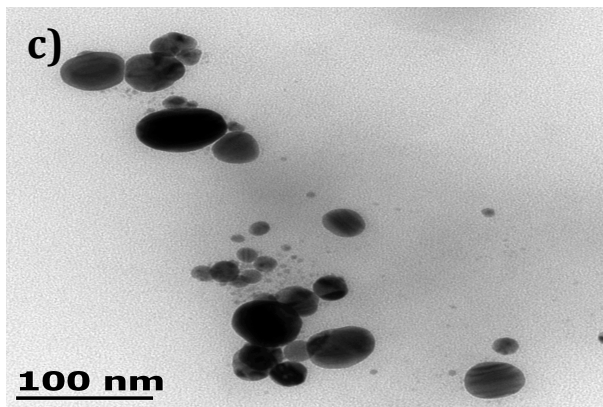
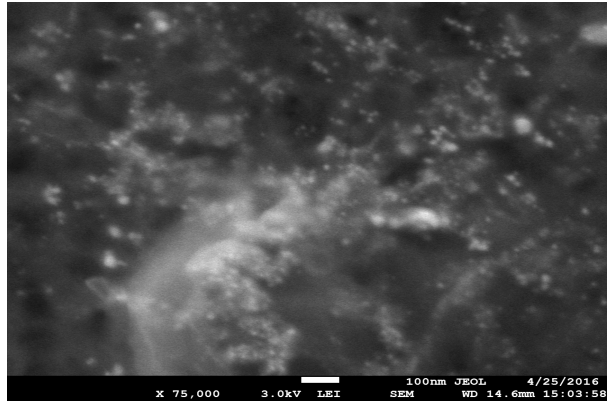
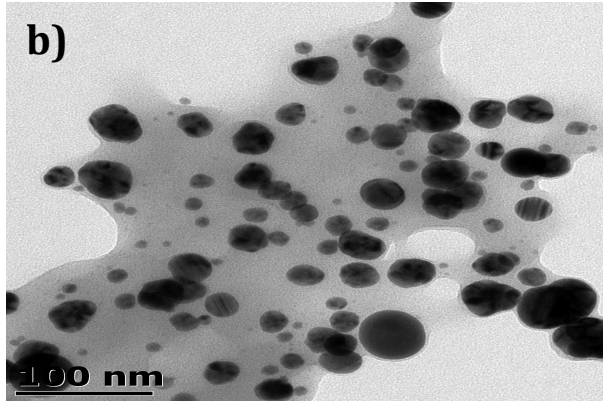
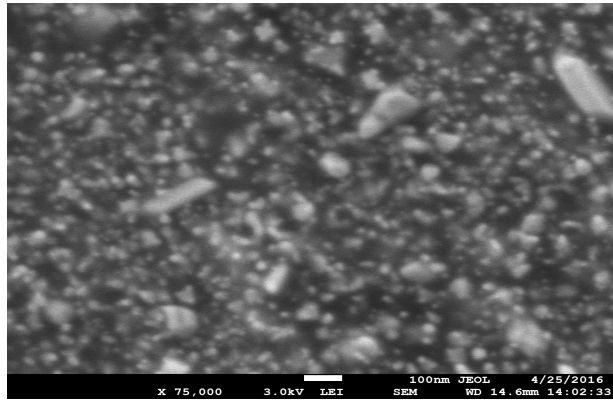
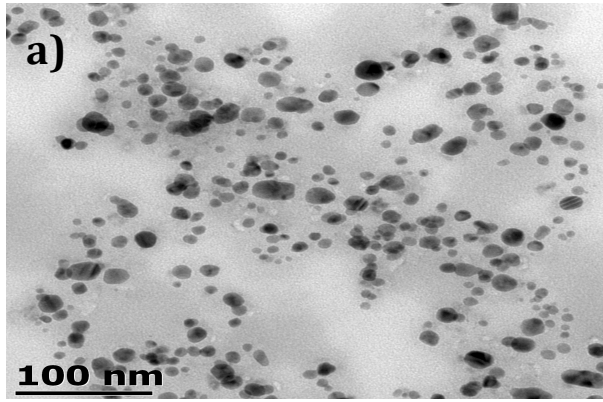


Figura 29. Imágenes TEM de AgNPs sintetizadas a partir de extractos acuosos de a) uva b) naranja c) orégano y d) pericón.

En las imágenes se puede observar que con todos los extractos acuosos utilizados se logró la producción de nanopartículas de plata como se confirmó con el plasmón de superficie en los espectros de absorción UV-Vis, las AgNPs formadas presentan una morfología esférica en su mayoría y ovalada con algunos extractos. Sin embargo es notorio en las imágenes que los tamaños de partícula y la concentración de nanopartículas formadas difiere dependiendo del extracto utilizado para su síntesis. Como se observa en la figura 30 en los histogramas de distribución de tamaño obtenidos a partir de la medición de 50 nanopartículas mediante el software Image J, las nanopartículas sintetizadas presentan diámetros entre los 3 y 80 nm, siendo nanopartículas poli dispersas.

Las nanopartículas con los menores diámetros fueron las elaboradas con el extracto acuoso de mosto de uva, que presentaron diámetros entre los 4-22 nm y una morfología esférica (Figura 29a), el mayor porcentaje de frecuencia en los 6 nm, los diámetros obtenidos son menores a los reportados por Roy et al., 2013, quienes elaboraron AgNPs a partir de extractos de piel de uva *Vitis vinífera*, obteniendo diámetros de aproximadamente 40 nm, la obtención de menores diámetros puede presentar una ventaja en las futuras aplicaciones de las nanopartículas ya que se ha demostrado que menores diámetros se relacionan con una mayor actividad antimicrobiana.

Para el caso de las nanopartículas de orégano, se obtuvieron nanopartículas esféricas con diámetros entre los 5-50 nm, con mayores porcentajes de frecuencia de 35 y 30 nm, estos diámetros son menores a los obtenidos con un extracto acuoso de orégano griego (*Origanum Vulgare*), con el que sintetizaron nanopartículas esféricas con diámetros de 63 y 85 nm (Sankar et al., 2013). La diferencia de resultados se puede relacionar con un el mayor contenido de compuestos fenólicos que presentó el extracto de orégano mexicano.

Las nanopartículas obtenidas con el extracto acuoso de bagazo de naranja presentan diámetros entre los 10 y 50 nm, mayoritariamente las nanopartículas presentaron diámetros de 25 nm. Estos resultados son similares a los obtenidos por Omran et al. 2017, quien utilizó un extracto acuoso de piel de naranja dulce, obteniendo partículas esféricas con un diámetro medio de 24 nm.

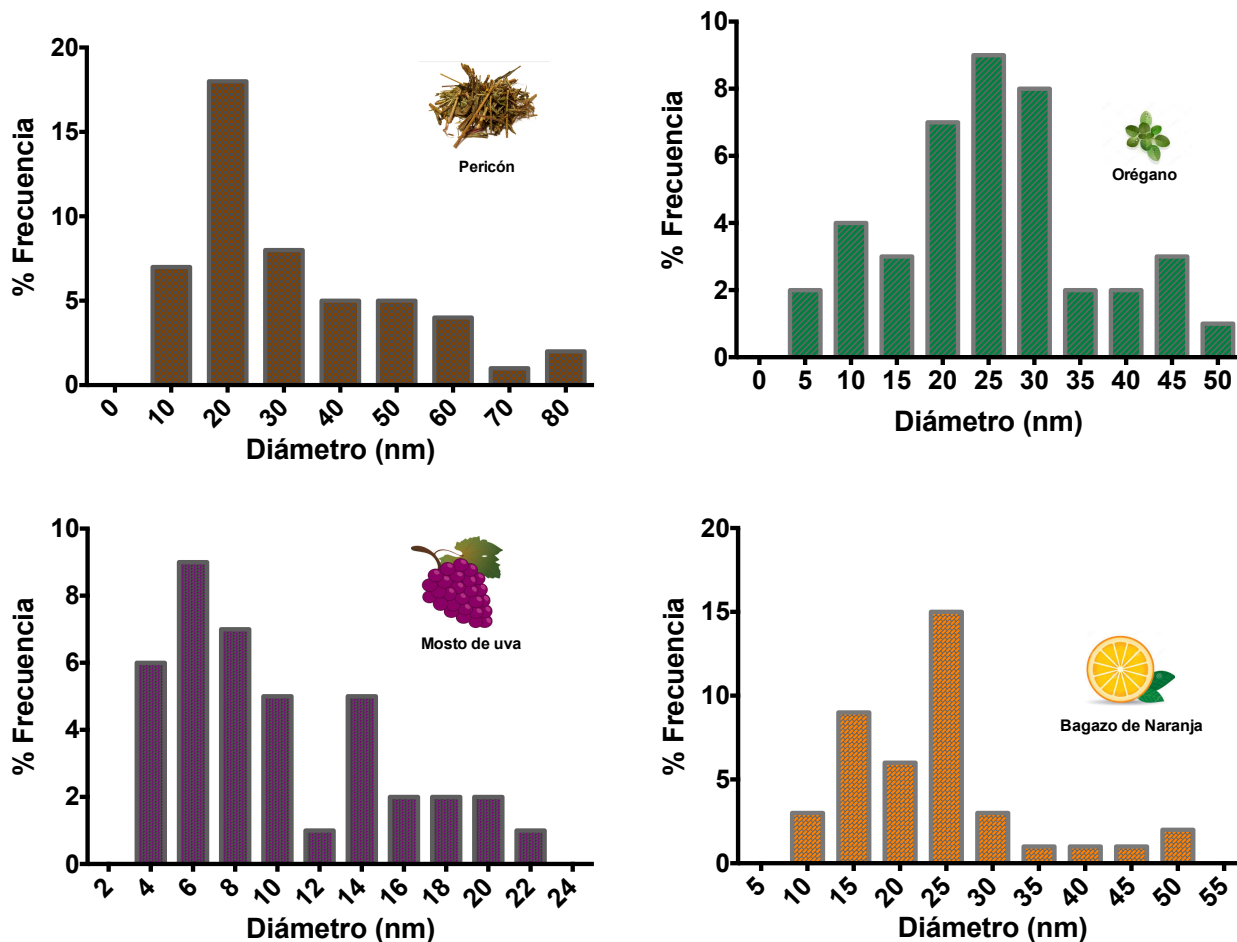


Figura 30. Histograma de distribución del tamaño de partícula de AgNPs sintetizadas a partir de extractos acuosos de pericón, orégano, uva y naranja.

En cuanto a la síntesis con el extracto acuoso de pericón se obtuvieron nanopartículas esféricas y ovaladas con diámetros desde los 10 hasta los 80 nm y se observa claramente en la imagen de TEM (Figura 29d) la aglomeración de partículas. La mayor frecuencia de los diámetros se obtuvo en 20 nm, es importante mencionar que hasta el momento no existen reportes sobre la síntesis de nanopartículas con este extracto.

Se pudo observar una relación inversa entre la capacidad antioxidante de los extractos y el diámetro de las AgNPs sintetizadas con los mismos, por lo que se puede concluir que el perfil de compuestos fenólicos que presentan

son los que determinan la morfología y el tamaño de las partículas al adherirse a la superficie y estabilizarlas, para evitar la aglomeración de las nanopartículas (Li et al. 2015; Park & Seonho 2016).

7.6.3. Difracción de Rayos X

La estructura cristalina de las nanopartículas de plata se determinó mediante difracción de rayos X. La difracción de las nanopartículas elaboradas con extracto de plantas (orégano y pericón) se presentan en la figura 31, estas nanopartículas presentaron 4 diferentes picos en las posiciones $2^\circ \theta$ de 38.28, 44.19, 64.43 y 77.56 que corresponden a los planos 111, 200, 220, 311 respectivamente característicos de la plata. Los patrones de difracción revelan que las nanopartículas sintetizadas son de naturaleza cristalina y son estructuras cúbicas centradas en las caras de acuerdo a los planos encontrados (Sankar et al., 2013). La presencia de otros picos de difracción en los patrones se encuentra relacionada con compuestos orgánicos presentes en los extractos acuosos, estos son mayores en las AgNPs sintetizadas con el extracto de pericón, lo que puede relacionarse con una mayor presencia de compuestos en la superficie de las nanopartículas (Moldovan, Achim, Clichici, & Filip, 2016).

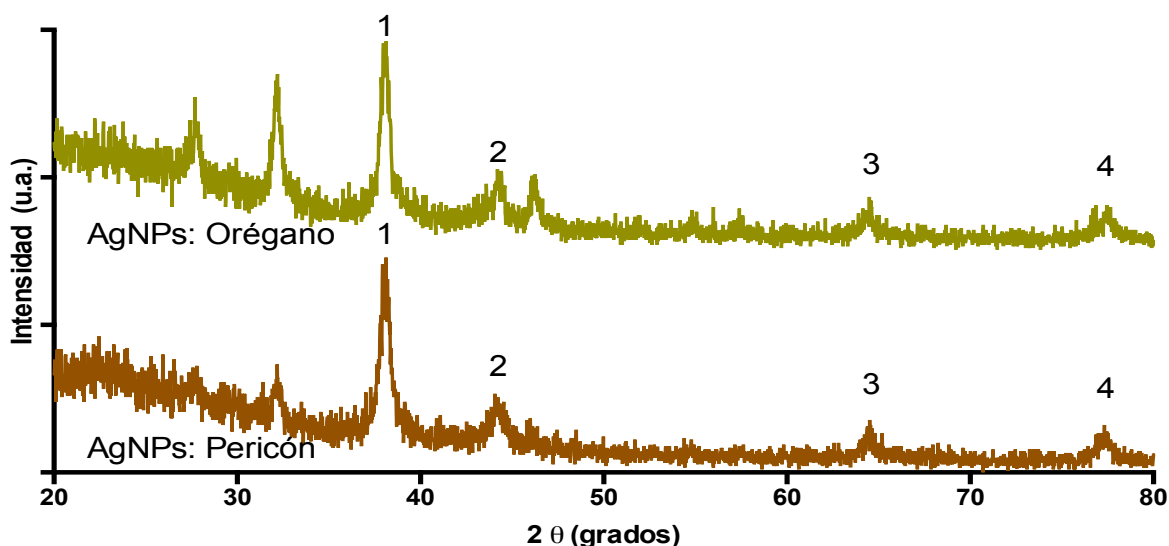


Figura 31. Difracción de rayos X de las nanopartículas de plata sintetizadas con extracto acuoso de a) orégano y b) pericón.

La figura 32 corresponde a los patrones de difracción de rayos X de las nanopartículas sintetizadas con subproductos de frutas, al igual que las AgNPs sintetizadas con plantas, las nanopartículas presentaron cuatro picos de difracción en las posiciones mencionados anteriormente que correspondían a estructuras cubicas centradas en las caras, sin embargo los picos no se encuentran del todo definidos lo que podría relacionarse con una gran cantidad de compuestos orgánicos presentes.

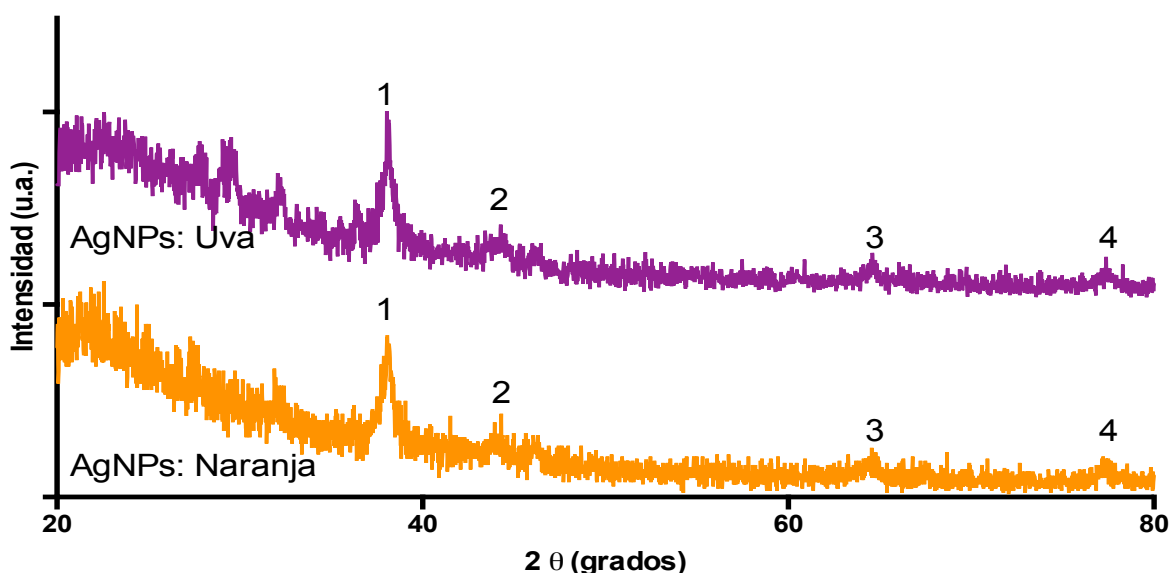


Figura 32. Difracción de rayos X de las nanopartículas de plata sintetizadas con extracto acuoso de a) mosto de uva y b) bagazo de naranja

De acuerdo a la ecuación de Scheler se calculó el diámetro de las nanopartículas de plata cristalinas obteniéndose los siguientes valores: 22.45, 26.79, 17.38 y 20.81 para los AgNPs sintetizadas con extractos acuosos de orégano, pericón, mosto de uva y bagazo de naranja respectivamente, al igual que en los diámetros obtenidos a partir de las imágenes de microscopia electrónica de transmisión se observó que las nanopartículas de mosto de uva son las que presentan menores diámetros, seguidas de las de naranja, orégano y pericón y los diámetros encontrados concuerdan con los obtenidos por TEM (Sadeghi & Gholamhoseinpoor 2015).

7.6.4. FTIR

Los estudios de espectroscopia infrarroja se llevaron a cabo con el fin de determinar los posibles grupos funcionales responsables de la reducción, la estabilización y adherencia en la superficie en las nanopartículas sintetizadas mediante síntesis verde. La figura 33 y 34 corresponden a los espectros de los extractos acuosos liofilizados de orégano y pericón y subproductos de frutas respectivamente, así como las AgNPs secas sintetizadas con estos extractos, como era de esperarse los espectros de los extractos son complejos y las principales bandas observadas están asociadas a los grupos funcionales presentes en los metabolitos secundarios.

Los espectros de los extractos mostraron bandas de absorción características de metabolitos secundarios de las plantas, entre las que se encuentra una banda de absorción entre los $3700-3400\text{cm}^{-1}$ correspondiente a las vibraciones de estiramiento de los grupo O-H de los grupos fenólicos. Las bandas en 2935 cm^{-1} se deben a las vibraciones de estiramiento del enlace C-H en compuestos aromáticos y una banda adicional aproximadamente en 1700 cm^{-1} que corresponde a las vibraciones del enlace C=O; además en la región de huellas dactilares, el pico presente entre $1400-1600\text{ cm}^{-1}$ correspondiente vibraciones de estiramiento del enlace C-C, aproximadamente entre $1070-1150\text{ cm}^{-1}$ se observan las vibraciones de estiramiento de C-O de polifenoles y bandas características de anillos aromáticos sustituidos $1200-900\text{ cm}^{-1}$. Las pequeñas bandas presentes entre $900\text{ y }600\text{ cm}^{-1}$ corresponden a compuestos aromáticos fuera del plano, debido a diferentes sustituciones en el anillo aromático, las cuales se pueden apreciar mejor en el espectro del extracto de uva; la obtención de estas bandas nos permite concluir que en los extractos tenemos la presencia de compuestos fenólicos que pueden estar relacionados con la síntesis de nanopartículas. Los espectros de las AgNPs secas mostraron la mayoría de las bandas presentes en los extractos liofilizados, lo que sugiere que los metabolitos secundarios son parte de la estructura de las nanopartículas y que se encuentran adheridos en la superficie ayudando a estabilizarlas. Los espectros de AgNPs solo presentan cambios menores en la posición de las bandas encontradas, comparándolas con

las del extracto. La banda de vibración del enlace OH cambia de 3034 a 3289 cm^{-1} para residuos de uva; de 3301 a 3224 para residuos de naranja; de 3264 a 3285 para orégano y de 3267 a 3297 en el pericón, lo cual puede relacionarse con la oxidación de estos grupos para la formación de las nanopartículas de plata y la formación de estructuras quinonas de los compuestos fenólicos y a las interacciones en el nuevo ambiente de la NP (Moldovan et al., 2016; Sankar et al., 2013).

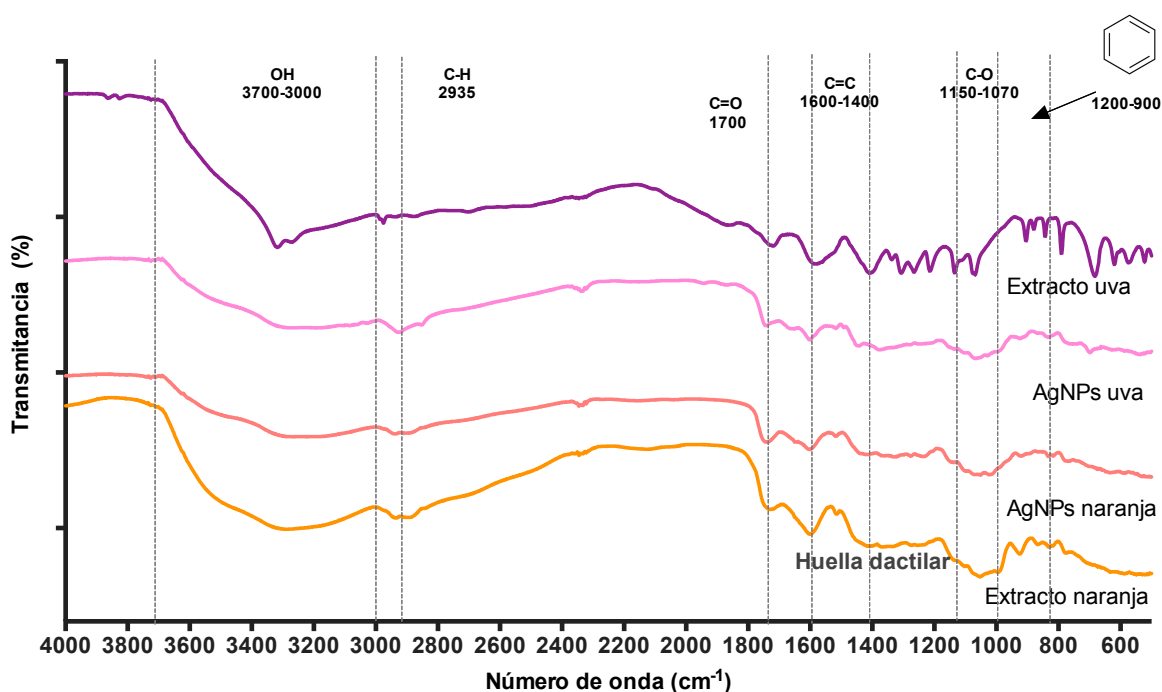


Figura 33. Espectros de DRIFT de los extractos liofilizados de orégano y pericón y de las AgNPs sintetizadas

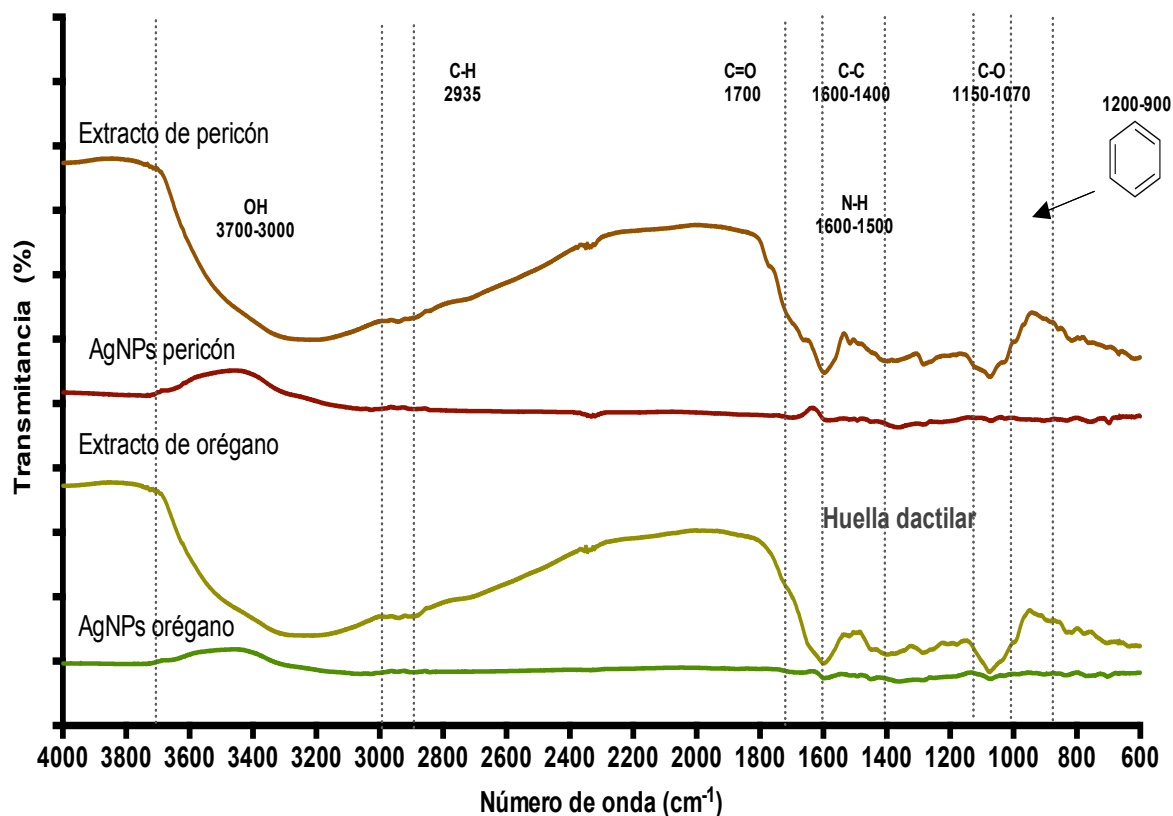


Figura 34. Espectros de DRIFT de los extractos liofilizados de mosto de uva y bagazo de naranja y de las AgNPs sintetizadas

7.6.5. Curvas de crecimiento de *E. coli* y *L. monocytogenes*

Se obtuvieron curvas de crecimiento microbiano midiendo la densidad óptica a 600nm, las lecturas se realizaron cada 30 min, para poder observar la actividad antimicrobiana de diferentes concentraciones de nanopartículas de plata recién sintetizadas contra una bacteria Gram negativa (*E. coli*) y una positiva (*L. monocytogenes*). La figura 35 muestra las curvas de crecimiento de *E. coli* O157:H7 tratadas con AgNPs y de los extractos liofilizados utilizados para su síntesis, en el caso de las nanopartículas sintetizadas con el extracto acuoso de pericón (Figura 35a), no se observa actividad antimicrobiana con las adición de 20, 40 y 60 μ L ya que alcanzan una densidad óptica final similar a la del control (crecimiento normal del microorganismo), incluso se puede observar que aumenta la velocidad de crecimiento del microorganismo en las primeras 5 horas. Mientras

con la adición de 80 y 100 μL permite el crecimiento del microorganismo al inicio y posteriormente tienen un efecto bacteriostático durante las 48 horas de crecimiento, el extracto liofilizado presentó un efecto bacteriostático similar a la concentración de 80 μL , el no observar actividad antimicrobiana al adicionar volúmenes menores, puede deberse a que los diámetros de las partículas obtenidas fueron mayores a los recomendados para observar actividad antimicrobiana, lo que hace más complicada su internalización a la célula.

Las AgNPs sintetizadas con el extracto de orégano (Figura 35b), no presentaron actividad antimicrobiana en las concentraciones de 20 y 40 μL , mientras que la concentración de 60 μL después de 15 horas presentó un efecto bacteriostático y una disminución del 13.7% de la concentración final del control. Las concentraciones de 80 y 100 μL presentaron el mismo efecto bacteriostático desde las 2 horas de tratamiento, en el caso del extracto acuoso liofilizado de orégano presentó un crecimiento similar al del control, hasta las 30 horas en donde se observó una disminución de la densidad óptica, esta disminución se relaciona con la desintegración de las células bacterianas que permite mejor el paso de la luz, disminuyendo la densidad óptica.

Las nanopartículas elaboradas con extracto de uva (Figura 35c) se puede observar que las AgNPs a concentraciones de 20, 40 y 60 μL permiten el crecimiento del microorganismo, sin embargo retrasan la fase de crecimiento exponencial hasta por 8, 10 y 20 h respectivamente, siendo la adición de 60 μL la que reduce hasta en un 50% el crecimiento de *E. coli* con respecto al control; por otra parte las concentraciones de 80 y 100 μL , no permitieron el crecimiento microbiano ya que la densidad óptica se mantuvo similar al inicio y al finalizar las 48 horas del experimento, de igual manera se realiza una comparación con el extracto liofilizado que se utilizó para la síntesis de nanopartículas de plata, observándose que presenta actividad antimicrobiana por sí mismo, esto se debe al perfil de compuestos fenólicos presentes en el extracto (Canadanovic-Brunet et al., 2011).

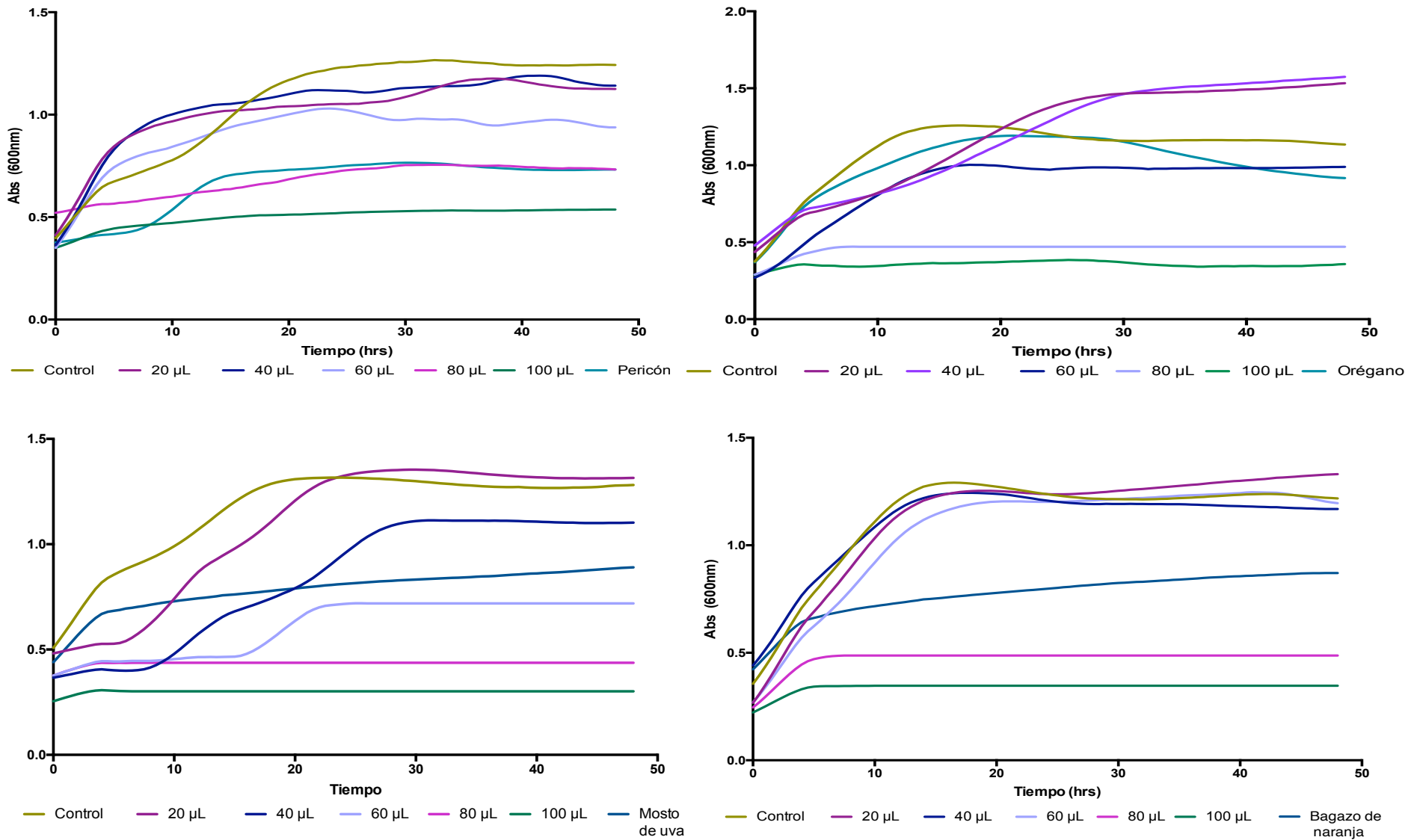


Figura 35. Curvas de crecimiento de *E. coli* O157:H7 tratada con diferentes concentraciones de AgNPs sintetizadas con: a) Pericón, b) Orégano, c) Mosto de uva y c) Bagazo de naranja.

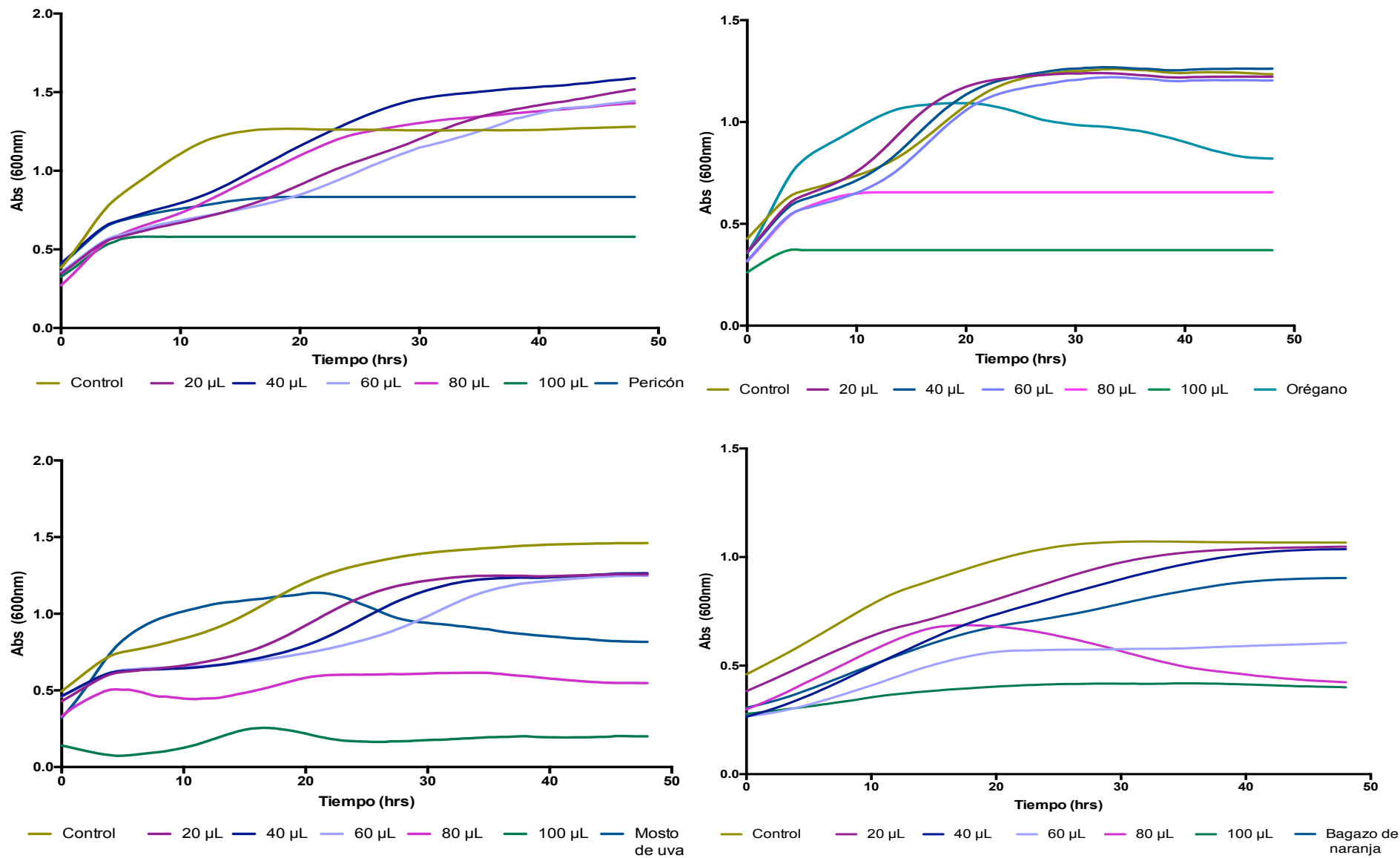


Figura 36. Curvas de crecimiento de *L. monocytogenes* O157:H7 tratada con diferentes concentraciones de AgNPs sintetizadas con: a) Pericón, b) Orégano, c) Mosto de uva y c) Bagazo de naranja.

En el caso de las nanopartículas de plata sintetizadas con bagazo de naranja adición de 20, 40 y 60 μL no presentan actividad antimicrobiana ya que permiten crecimiento normal de *E. coli* sin presentar diferencias con el control, mientras que los volúmenes de 80 y 100 μL tienen un efecto bacteriostático al no permitir crecimiento del microorganismo, el extracto acuoso de bagazo de naranja disminuye la velocidad de crecimiento del microorganismo y al final del experimento se disminuyó hasta un 43% la densidad óptica con respecto a la del control.

Las curvas de crecimiento para *Listeria monocytogenes* se presentan en la figura 36, para las AgNPs sintetizadas con el extracto acuoso de Pericón la adición de 20, 40, 60 y 80 μL no presentó actividad antimicrobiana e incluso obtuvieron densidades ópticas mayores a las del control al final del experimento. Mientras que la adición de 100 μL permitió el crecimiento del microorganismo y a las 12 horas tuvo un efecto bacteriostático, el extracto de pericón de igual manera presentó un efecto bacteriostático, después de las 12 horas de crecimiento y una disminución del 42% de la densidad óptica al final con respecto al control. En el caso de las nanopartículas sintetizadas con el extracto de orégano únicamente la adición de 80 y 100 μL presentaron actividad antimicrobiana inhibiendo el crecimiento, el extracto de orégano al igual que con *E. coli* permite el crecimiento pero después de las 15 horas se observa una disminución de la densidad óptica. Con el extracto de mosto de uva se observa que todas las concentraciones lograron una reducción del crecimiento microbiano con respecto al control siendo aproximadamente del 30% en los volúmenes de 20, 40 y 60 μL y una inhibición total en las concentraciones más altas, para el caso del extracto liofilizado se logra una reducción del 50% después de las 48 h del tratamiento. Sin embargo cabe destacar que al inicio de incubación permite un crecimiento acelerado del microorganismo llegando a ser incluso mayor al del control; este tipo de comportamiento ya ha sido reportado por Xu et al., 2016 quienes mencionan que para los compuestos del mosto de uva es difícil penetrar la membrana celular de las bacterias Gram-positivas lo que podría estar retardando el efecto antimicrobiano.

Las AgNPs elaboradas con extracto de bagazo de naranja al igual que con *E.coli* la adición de volúmenes menores (20, 40 y 60 μ L) no presentan actividad antimicrobiana, pues el crecimiento es similar al control, mientras que las adiciones más altas retardan el crecimiento e inhiben únicamente el 60% del crecimiento microbiano. El extracto liofilizado tiene una reducción del 10% al final del experimento se ha reportado que los compuestos presentes en los extractos de cascara de naranja no son muy eficaces contra bacterias Gram-positivas como es el caso de *L. monocytogenes* (S, Hegde, N S, & T R, 2014).

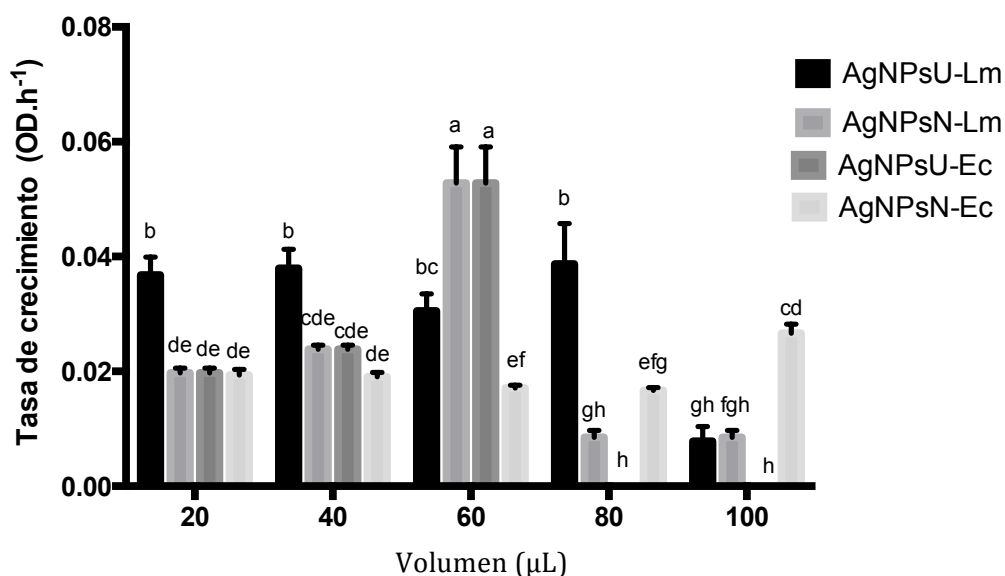
El volumen mínimo nanopartículas recién sintetizadas y sin secar para inhibir por el crecimiento microbiano de *E. coli* fue de 80, 60, 40 y 80 μ L para las sintetizadas con extracto de pericón, orégano, mosto de uva y bagazo de naranja respectivamente. Mientras que para *L. monocytogenes* fue de 100, 80, 20 y 80 μ L respectivamente. En general se puede observar que las AgNPs sintetizadas con el mosto de uva son las que presentan una mayor actividad antimicrobiana, esto puede atribuirse a que las NPs obtenidas con el mosto de uva presentan el menor tamaño (4-20 nm). Se ha demostrado que partículas con tamaños menores a 10 nm tienen un mayor efecto antimicrobiano al penetrar de manera más eficiente la membrana celular, causando daños en el ADN del microorganismo y evitando su replicación (Silhavy, Kahne, & Walker, 2010). De igual manera se puede observar que las nanopartículas elaboradas con síntesis verde presentan un mayor efecto contra *E. Coli*, un microorganismo Gram negativo. Existen diferencias importantes entre la membrana celular de bacterias Gram positivas y negativas, la pared celular de peptidoglicano de *E. coli* es aproximadamente 7.5 veces menor que la de *Listeria*, razón por la cual es más susceptible a la penetración de nanopartículas de plata (D. Lee, 2016). Si se compara la efectividad del extracto liofilizado contra las nanopartículas formadas podemos observar que este incrementa incluso cuando es probado contra *Listeria*, lo que representa una ventaja en su uso como antimicrobiana, ya que las nanopartículas pueden utilizarse para la fabricación de empaques o como desinfectantes de superficies.

7.6.6. Modelamiento matemático de las curvas de crecimiento

Se evaluaron diferentes parámetros cinéticos (velocidad de crecimiento, fase lag y población máxima alcanzada) de las curvas de crecimiento de los microorganismos obtenidas con las AgNPs mediante el software ComBase, en este caso solo se evaluaron las nanopartículas sintetizadas con los extractos de subproductos de frutas, debido a que presentaron mejor actividad antimicrobiana y a que el uso de los extractos de subproductos darán un valor agregado a estos productos que son subutilizados.

En la figura 37 se presenta un gráfico de barras, que corresponde a la tasa de crecimiento máximo, que se estima a partir de la pendiente de la fase exponencial graficada en función de la adición de diferentes volúmenes de AgNPs sintetizadas con diferentes extractos acuosos de mosto de uva y bagazo de naranja, se puede observar que este parámetro es dependiente de la concentración de AgNPs, del extracto utilizado para la síntesis y del microorganismo probado. Para *L. Monocytogenes*, la menor tasa de crecimiento se obtuvo cuando se utilizaron las AgNPs sintetizadas con el mosto de uva con el mayor volumen (100 µl), de igual manera estas nanopartículas son las que presentan las menores tasas de crecimiento en comparación con las nanopartículas sintetizadas con bagazo de naranja. Este resultado puede deberse a las diferencias en el tamaño que presentan las nanopartículas utilizadas como ya se mencionó en el apartado anterior. La tasa de crecimiento específico de *L. monocytogenes* sin tratamiento presentó un valor de $0.031 \pm 0.0006 \text{ DO}\cdot\text{h}^{-1}$, el cual se vio disminuido cuando se agregó un volumen de 100 µl de las nanopartículas sintetizadas con mosto de uva y bagazo de naranja, disminuyendo incluso hasta en un 75% la tasa de crecimiento para el caso de las AgNPs de mosto de uva. Las AgNPs de plata en general presentan diferentes mecanismo de acción antimicrobiana, entre los que destaca la unión a grupos tiol (-SH) formando complejos estables S-Ag, desactivando algunas enzimas en la membrana celular que están relacionadas con la energía transmembrana, el metabolismo y el transporte iónico (S. Ahmed et al., 2016).

En el caso de *E. coli* se obtuvieron resultados similares, los AgNPs sintetizados con extracto de uva presentan la mejor actividad antimicrobiana debido a que la tasa de crecimiento es cero, es decir que no se observó crecimiento bacteriano. Similar a los resultados obtenidos con *Listeria*, las AgNPs sintetizados con extracto de uva presentan una mejor actividad antimicrobiana en una mayor concentración contra *E. coli*, en comparación con el crecimiento normal del microorganismo que fue 0.028 ± 0.001 solo los AgNPs obtenidos con uva reducen significativamente la tasa de crecimiento. Las nanopartículas de naranja aumentaron la tasa de crecimiento específico, lo cual puede relacionarse con un mayor contenido de azúcares en el extracto que permite el crecimiento, sin embargo esto no quiere decir que no presenten actividad antimicrobiana, pues como se observó en las curvas de crecimiento anteriores algunas concentraciones permitían el crecimiento y posteriormente presentaban un efecto bacteriostático, presentando menor contenido de biomasa con respecto al control.

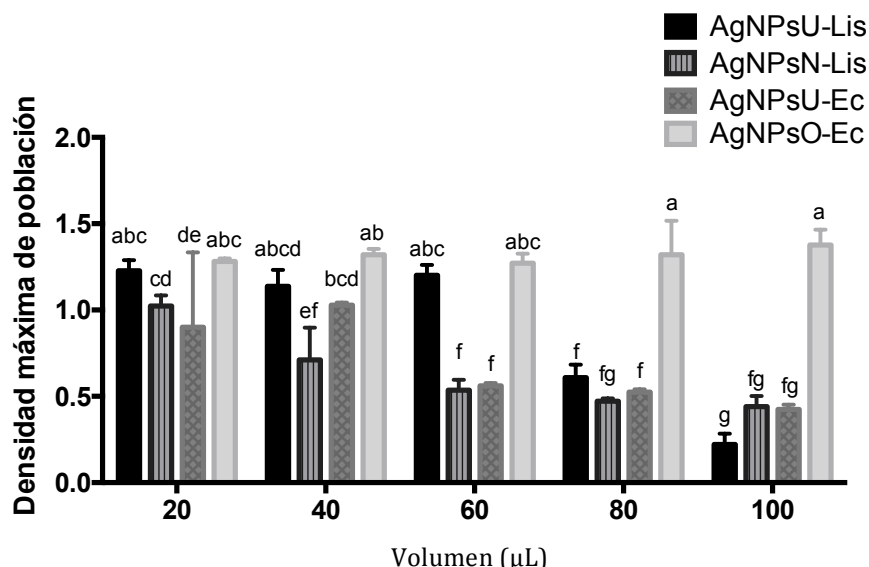


AgNPs: nanopartículas de plata U: uva N: naranja Ec: *E. coli* Lis: *L. monocytogenes*, los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de cinco experimentos. Barras con diferentes letras presentan diferencias significativas con la prueba de Tukey.

Figura 37. Velocidad de crecimiento de *E. coli* y *L. monocytogenes*, tratados con, AgNPs sintetizadas con extractos acuosos de mosto de uva y bagazo de naranja.

Otro parámetro importante obtenido mediante el ajuste matemático es la densidad de población máxima, que corresponde al nivel asintótico de DO en el final de la fase exponencial, la cual se presenta en la Figura 38. Se puede observar que la menor densidad de población se obtuvo con los AgNPs sintetizados con extracto de uva para los dos microorganismos. En la mayoría de los tratamientos, la densidad de población máxima disminuye conforme aumenta la concentración de AgNPs. Cabe destacar que solo con las nanopartículas sintetizadas con el extracto de bagazo de naranja contra *E. coli* se observó un aumento de la densidad de población con el aumento de la concentración, esto puede deberse a que el extracto de naranja presenta una alta concentración de azúcares como se mencionó antes permitiendo el crecimiento de *E. coli*, aunado a los mayores tamaños de partícula obtenidos con este extracto que no facilitan su internalización a la célula (M. Kumar et al., 2018).

La densidad de población máxima para *L. monocytogenes* y *E. coli* fue de 1.447 ± 0.007 y 1.052 ± 0.008 comparada mediante una prueba de Dunnett con los demás tratamientos, únicamente las nanopartículas de plata sintetizadas con el extracto de naranja no presentaron diferencias significativas cuando se prueban contra *E. coli*. En la literatura hay reportes de que el extracto de cáscara de naranja presenta una mejor actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y poco efecto contra Gram-negativas como *E. coli* (Geraci, Di Stefano, Di Martino, Schillaci, & Schicchi, 2017; Ramadan et al., 2015), es importante mencionar que debido a que se adicionaron las partículas recién sintetizadas aun contiene residuos del extracto con el que fueron sintetizadas, así como algunos componentes del mismo como azúcares, flavonoides, etc. La presencia de estos azúcares pueden traer efectos contraproducentes como un mayor crecimiento al proporcionar mayores nutrientes para el desarrollo de microorganismo o presentar mejor actividad antimicrobiana al presentar compuestos con este efecto, esto pudo observarse claramente con las nanopartículas sintetizadas con el extracto de naranja.



AgNPs: nanopartículas de plata U: uva N: naranja Ec: *E.coli O157:H7* Lis: *L. monocytogenes*, los resultados se reportan como la media \pm el error estándar de cinco réplicas. Barras con diferentes letras presentan diferencias significativas en la prueba de Tukey.

Figura 38. Densidad de población máxima para *E. coli* y *L. monocytogenes*, tratados con, AgNPs sintetizadas con extractos acuosos de mosto de uva y bagazo de naranja.

7.6.7. Secado de nanopartículas de plata

Debido a que las nanopartículas se iban a adicionar a nanofibras de proteína de amaranto y pululano, cuando se intentaron estos experimentos, resultó complicado incorporarlas en su forma líquida, por lo que se decidió llevar a cabo un tratamiento de secado de éstas para incorporarlas de esta manera en las nanofibras. Las imágenes de las nanopartículas después de centrifugarse se muestran en la figura 39, es notorio que después del proceso de centrifugación el tamaño de las nanopartículas se reduce con respecto a las partículas recién sintetizadas, esto puede deberse a las altas velocidades que se manejan en el proceso de centrifugación lo que puede fragmentar las partículas haciéndolas más pequeñas o hacer que compuestos adheridos a la superficie se despeguen y reduzca el tamaño de la misma, además de esto se debe tomar en cuenta que para poder re-suspender las partículas y observarlas por TEM se adicionó un tensoactivo (Tween 80), el cual puede servir también como un estabilizante. Al

igual que con el tamaño, también se puede observar que la cantidad de partículas se ve incrementada debido que se tienen partículas con menores tamaños, ambos cambios son más perceptibles en las nanopartículas elaboradas a partir de bagazo de naranja ya que estas presentaban antes del centrifugado diámetros de hasta 50 nm y después estas tuvieron una reducción de hasta 3 nm (Figura 38). En las nanopartículas de uva los cambios no son tan perceptibles pues ya contaban con diámetros más pequeños desde que se sintetizaron. Debido a que el diámetro de las nanopartículas representa un factor importante para la actividad antimicrobiana, se decidió evaluarla nuevamente para determinar la concentración de nanopartículas que se adicionarían a las fibras electroestiradas.

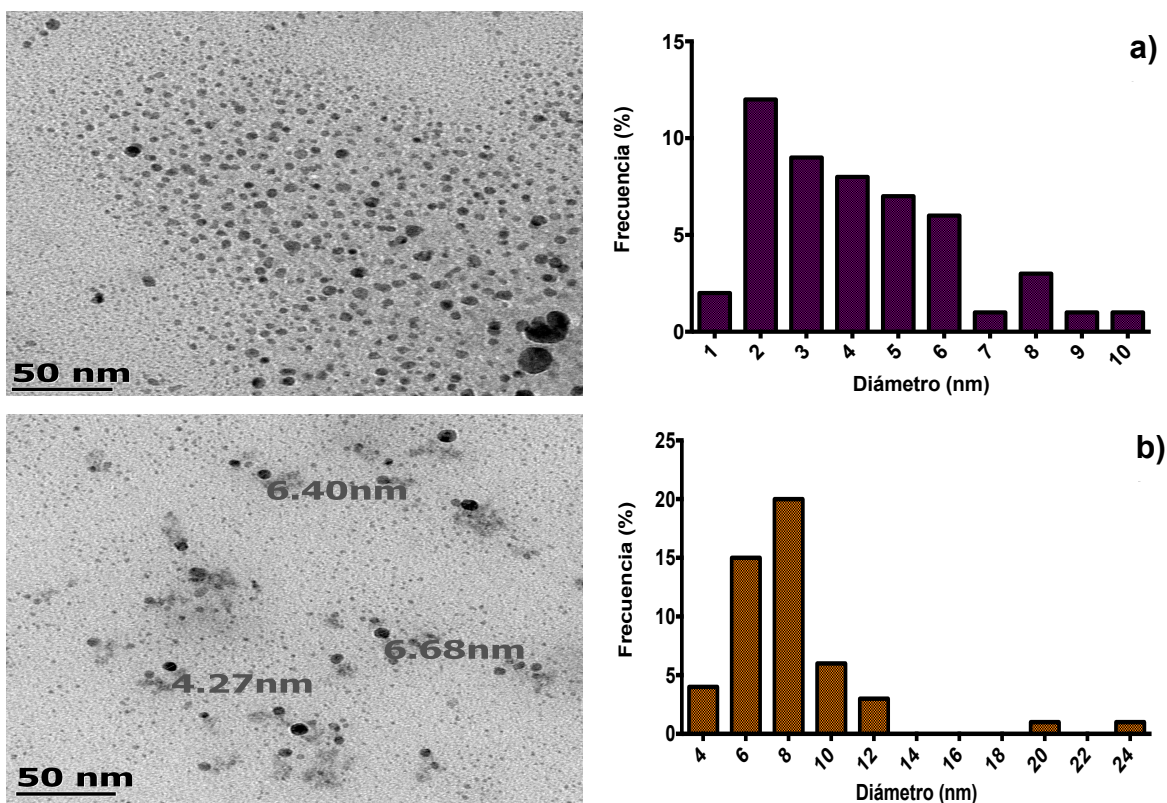
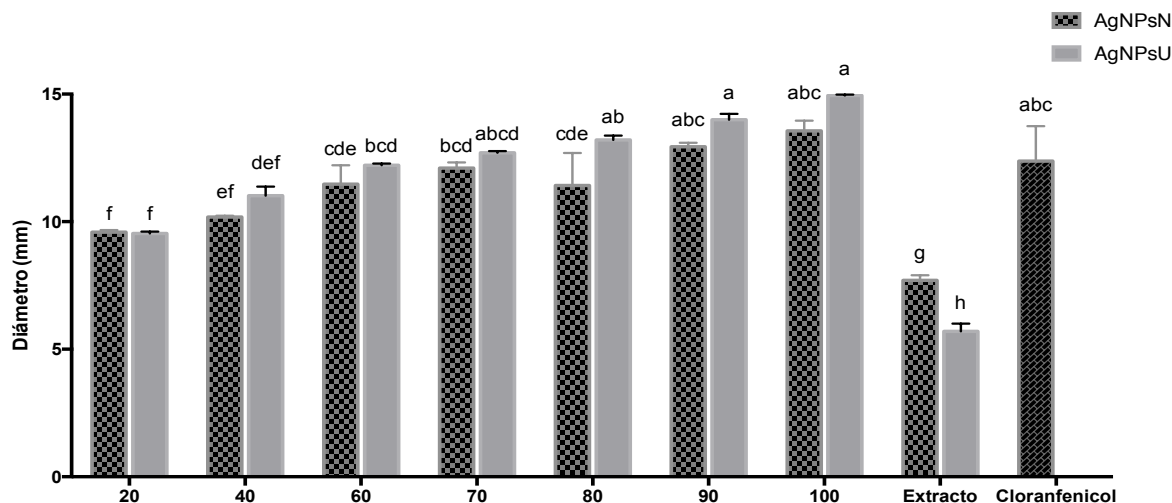


Figura 39. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de después del centrifugado resuspendidas en solución acuosa con tween80 al 10% y de distribución de diámetros, sintetizadas con a) mosto de uva y b) bagazo de naranja.

7.6.8. Actividad antimicrobiana de AgNPs secas

La actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata después de centrifugarse se midió mediante la técnica de difusión en agar, en donde la formación de un halo de inhibición se toma como la presencia de actividad antimicrobiana. En la figura 40 se presentan las zonas de inhibición de las nanopartículas de plata sintetizadas con extractos de bagazo de naranja y mosto de uva comparadas con dos controles: el extracto liofilizado (100 µg/mL) y un antibiótico de amplio espectro (cloranfenicol a 500 µg/mL) contra *E. coli* O157:H7, se puede observar que con las diferentes concentraciones de AgNPs se presenta efecto antimicrobiano, mostrando un efecto dosis dependiente, es decir que la actividad aumenta de manera lineal conforme aumenta la concentración de AgNPs. Sin embargo es a partir de la concentración de 40 µg/mL que se presentan diferencias estadísticamente significativas entre las nanopartículas sintetizadas con extracto de uva y naranja, presentando mayor actividad las AgNPs sintetizadas con mosto de uva, las mayores diferencias se presentaron en las concentraciones de 90 y 100 µg/mL. Para las nanopartículas sintetizadas con extracto de uva a partir de la concentración de 60 µg/mL el diámetro del halo de inhibición es similar al control de cloranfenicol, mientras que para las sintetizadas con bagazo de naranja los halos se asemejan en la concentración de 90 µg/mL, lo que coincide con los resultados obtenidos en las curvas de crecimiento por Bioscreen, en donde las nanopartículas sintetizadas con el extracto de uva presentan mayor actividad antimicrobiana. Aunque después del centrifugado el tamaño de las nanopartículas de naranja disminuyó, este sigue siendo mayor al de las sintetizadas con uva, lo que puede explicar que las NPs obtenidas con extracto de uva presenten mayor actividad antimicrobiana. La actividad antimicrobiana podría estar relacionada con los compuestos que se adhieren a la superficie de las nanopartículas y a la carga que estas presenten en la superficie que les permita interactuar mejor con la pared celular (D. Lee, 2016). La actividad antimicrobiana de los extractos usados para la síntesis muestra que el extracto de naranja presenta mejor actividad que el extracto de uva, esta actividad puede relacionarse con los compuestos presentes en el extracto y el pH ácido.

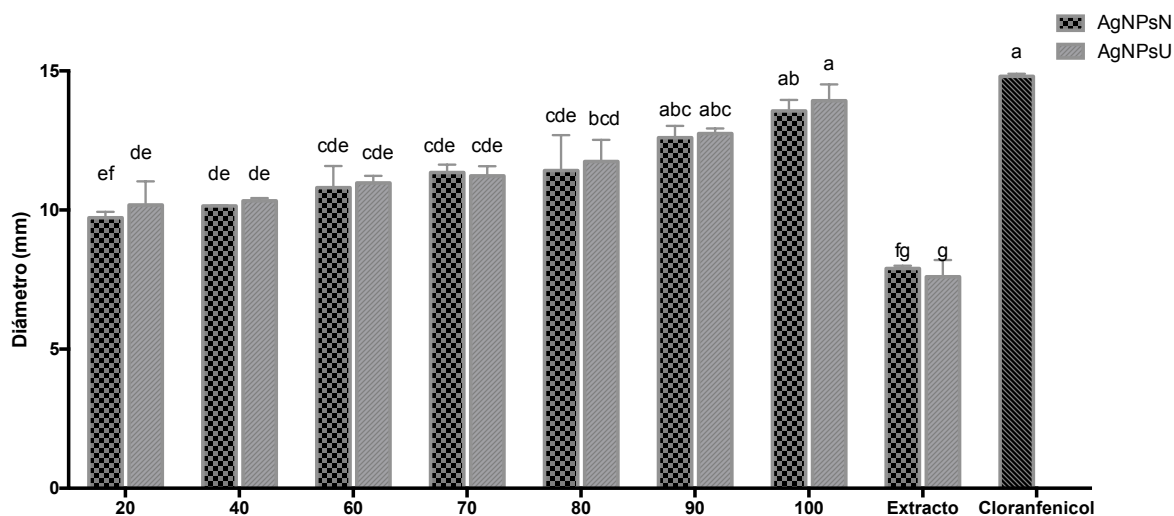


Diferentes letras presentan diferencias significativas ($P < 0.01$) de acuerdo a la prueba de Tukey ($n = 3$)

Figura 40. Zonas de inhibición de AgNPs a diferentes concentraciones contra *E. coli* O157:H7. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de Tukey $P < 0.01$. Resultados reportados como la media \pm DE.

La figura 41 muestra las zonas de inhibición para *L. monocytogenes* tratadas con diferentes concentraciones de AgNPs, al igual que con *E. coli* la actividad antimicrobiana presenta un efecto dosis dependiente, sin embargo la actividad antimicrobiana es menor (menores diámetros) y para ambas nanopartículas la concentración que tiene resultados similares al control es la de 90 y 100 $\mu\text{g/mL}$. Es importante hacer notar que el cloranfenicol se presenta en una concentración cinco veces mayor a la de la concentración más alta de las nanopartículas. El uso de los diferentes extractos para este microorganismo no representó diferencias significativas notorias como en el caso de *E. coli*, pues como se observa en el gráfico los diámetros son muy similares, estos resultados son acordes a lo obtenido en las curvas de crecimiento realizadas con las nanopartículas recién sintetizadas en donde las nanopartículas sintetizadas con bagazo de naranja presentaron mejor actividad antimicrobiana contra *Listeria*. Sin embargo aún se

puede distinguir una mayor actividad antimicrobiana en las nanopartículas sintetizadas con mosto de uva.

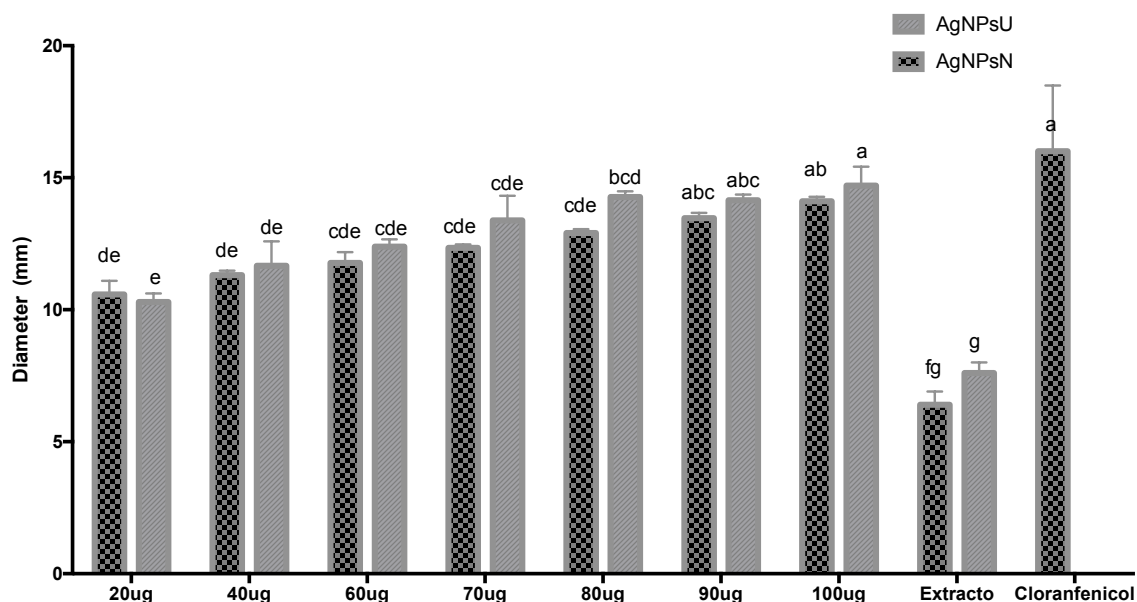


Diferentes letras presentan diferencias significativas ($P < 0.01$) de acuerdo a la prueba de Tukey ($n = 3$)

Figura 41. Zonas de inhibición de AgNPs a diferentes concentraciones contra *L. monocytogenes*. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de Tukey $P < 0.01$. Resultados reportados como la media \pm DE.

Los diámetros de la zona de inhibición de las AgNPs contra *S. aureus* se presentan en la figura 42. Se puede observar que nuevamente las concentraciones más altas de 90 y 100 $\mu\text{g/mL}$ son las que presentan inhibición del crecimiento similar al control de acuerdo con la comparación de medias de Tukey. Al igual que con los otros microorganismos se presenta mayor actividad con las nanopartículas sintetizadas con el mosto de uva y el efecto es dosis dependiente para ambas nanopartículas. Similar a lo observado con *Listeria* no se presentaron diferencias en la actividad antimicrobiana entre el uso de los diferentes extractos para la síntesis de nanopartículas. No así en la actividad de los extractos liofilizados si se observaron diferencias significativas presentado una mayor actividad el extracto acuoso de mosto de uva, aunque no llega a ser similar al control de cloranfenicol, ya que la actividad antimicrobiana que presentan estos extractos es debida a la presencia de diversos compuestos fenólicos como se

observó en su caracterización por HPLC, los cuales causan daños a la membrana citoplasmática, inhibición de la síntesis de peptidoglicano, inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y/o inhibición del transporte de energía, lo que puede ayudar a otros antimicrobianos a realizar su efecto (Sanhueza et al., 2017).



Diferentes letras presentan diferencias significativas ($P < 0.01$) de acuerdo a la prueba de Tukey ($n = 3$)

Figura 42. Zonas de inhibición de AgNPs a diferentes concentraciones contra *S. aureus*. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de Tukey $P < 0.01$. Resultados reportados como la media \pm DE.

Similar a lo obtenido con la actividad antimicrobiana de las nanopartículas recién sintetizadas, existió una mayor actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-negativas, las diferencias de la sensibilidad de las bacterias a AgNPs se atribuye al espesor de la capa de peptidoglicano en la membrana celular, 30 nm para bacterias Gram-positivo y 4 nm para bacterias Gram-negativas, lo que facilita la internalización de las nanopartículas dentro de la célula bacteriana y permite tener efectos en el ADN (Silhavy et al., 2010). La actividad antimicrobiana de las AgNPs sintetizadas con extractos de mosto de uva y bagazo de naranja contra *E. coli*, es mayor a lo reportado para AgNPs sintetizadas a partir de extractos de semilla de

uva reportadas por Xu et al. 2014 (zona de inhibición de 11 mm de diámetro) y Manal et al. 2014 (zona de inhibición de 6 mm de diámetro) quienes elaboraron nanopartículas con extracto de cáscara de naranja. Estas diferencias pueden explicarse por los menores tamaños de los AgNPs obtenidas en este trabajo en comparación con los reportados por esos autores.

7.7. Desarrollo de nanocompositos de nanofibras APA-PUL reforzados con diversos materiales

7.7.1. Desarrollo nanocompositos de nanofibras APA-PUL reforzadas con AgNPs

7.7.1.1. Caracterización de las soluciones y morfología de fibras

Como se mencionó anteriormente la formación de fibras electroestiradas puede verse afectada por diversos parámetros entre solución, estas últimas pueden verse afectadas por la adición de compuestos activos como las AgNPs. La viscosidad y la conductividad eléctrica de las soluciones se presenta en el Cuadro 17, la mezcla que no contiene activos, presenta una conductividad y viscosidad de 4.021 ± 0.002 y 67.30 ± 0.06 respectivamente. La incorporación de nanopartículas de plata (200 $\mu\text{g/mL}$) modificó significativamente ($P < 0.01$) ambos parámetros, la conductividad eléctrica es afectada por las cargas presentes en la solución, concentración de polímero y la temperatura. Al adicionar las nanopartículas de plata la conductividad eléctrica aumento, siendo más evidente cuando se adicionaron nanopartículas sintetizadas con el extracto de uva, esto nos podría indicar que estas presentan mayor número de iones que permiten el paso de la corriente eléctrica, en comparación con las nanopartículas sintetizadas con el bagazo de naranja. En el caso de la viscosidad la adición de nanopartículas disminuyó de manera significativa este parámetro con respecto al control (mezcla sin AgNPs), pero no presentaron diferencias entre los tipos de extractos utilizados para la síntesis de las nanopartículas. Las diferencias observadas en estos

parámetros se pueden ver reflejados en cambios en la morfología y el diámetro de las fibras obtenidas.

Cuadro 17. Caracterización de las soluciones de APA-PUL adicionadas con nanopartículas de plata y el diámetro obtenido de las fibras electroestiradas formadas a partir de cada solución

Solución	Viscosidad (Cp.)	Conductividad (ms/cm)	Diámetro (nm)
Sin AgNPs	67.30 ± 0.066 ^a	4.021 ± 0.002 ^a	299.6 ± 8.40 ^a
AgNPs naranja	50.136 ± 0.012 ^b	4.259 ± 0.001 ^b	104.8 ± 7.98 ^a
AgNPs uva	50.284 ± 0.004 ^b	11.200 ± 0.037 ^c	95.5 ± 5.67 ^a

Los resultados se presentan como la media ± el error estándar de tres replicas. Letras diferentes en una misma columna presentan diferencias significativas mediante la prueba de Tukey (P<0.01).

Se puede observar en la figura 43 que la adición de NPs a la solución de aislado proteico de amaranto y pululano no afectó la formación de nanofibras electroestiradas, pues se obtuvieron fibras lisas y continuas sin la aparición de defectos que son similares a las obtenidas en el control, teniendo como única diferencias los diámetros. Las fibras obtenidas de las mezclas adicionadas con AgNPs elaboradas por síntesis verde presentaron una disminución significativa del diámetro (P<0.05) con respecto a las fibras obtenidas con la solución control (sin AgNPs). La incorporación de Ag NPs obtenidas del mosto de uva provocó una disminución del diámetro de la fibra en 50 %. Se ha reportado que disminución de viscosidad y aumento de conductividad de la solución polimérica conlleva a una disminución en el diámetro de la fibra debido a un mayor transporte de cargas y menor interacción entre las cadenas poliméricas (Ping Neo et al., 2013, Cho et al. 2010, Aceituno-Medina et al. 2015).

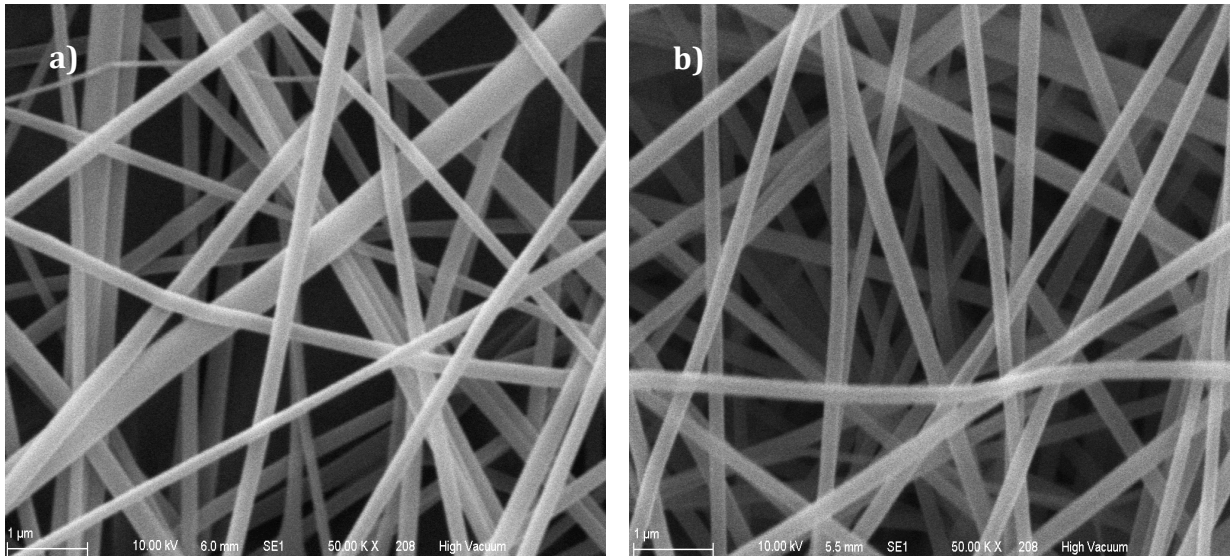


Figura 43. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las fibras cargadas con AgNPs sintetizadas con a) mosto de uva y b) bagazo de naranja

Los diámetros de las fibras obtenidas son menores a los reportados para otros nanocompositos adicionados con AgNPs, como es el caso de fibras de óxido de polietileno (PEO) en donde obtuvieron diámetros de 136 nm (Dubey et al., 2015) y fibras elaboradas con poliacrilonitrilo con diámetros de hasta 236 nm (Ren et al., 2017), en ambos casos se obtuvo una disminución del diámetro de las fibras en comparación con las fibras sin activos.

7.7.1.2. Distribución de nanopartículas de plata

En la figura 44 (a) se presentan las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión de las nanofibras cargadas con nanopartículas sintetizadas con extracto de bagazo de naranja en la que la fibra presenta un diámetro de 178.54 nm y las nanopartículas presentes diámetros entre los 4 y 8 nm. En la imagen 44 (b) se presentan las fibras cargadas con nanopartículas sintetizadas con mosto de uva, se puede observar que las nanopartículas se distribuyen a lo largo de las fibras que presentan diámetro promedio de 129.39 nm y las nanopartículas entre 4 y 5 nm. Estos resultados concuerdan con lo observado anteriormente en las imágenes de SEM y los diámetros obtenidos

mediante el software Image J, es importante mencionar que en las fibras adicionadas con nanopartículas de plata a partir de naranja (Figura 42c) se observaron aglomerados de nanopartículas que podrían estar distribuidas por fuera de las fibras, lo que podría resultar una desventaja para su posible aplicación ya que existiría una migración más rápida de las nanopartículas en el alimento, mientras que en las fibras con nanopartículas de uva no se observaron estos agregados (Figura 43d).

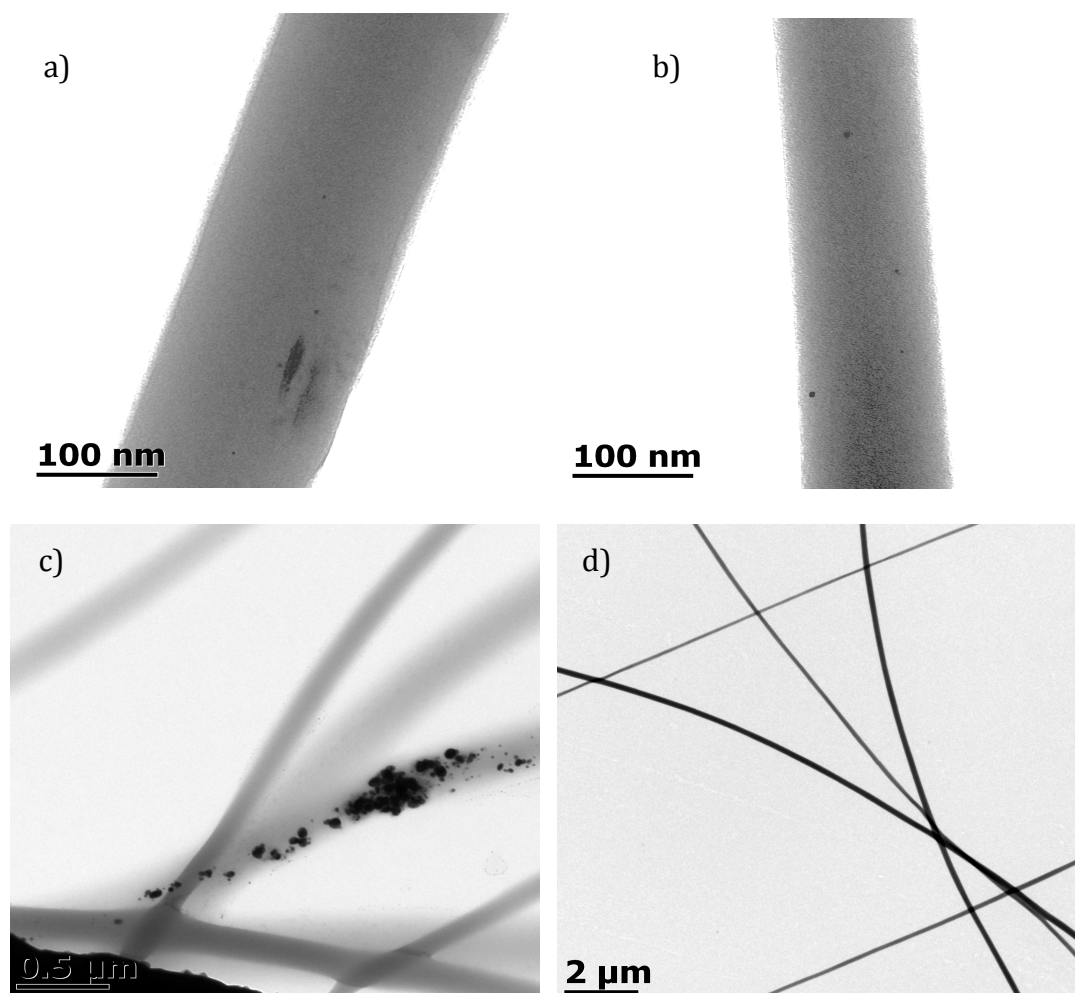


Figura 44. Micrografías electrónicas de transmisión de nanofibras electroestiradas con nanopartículas de plata sintetizadas con a y c) bagazo de naranja b y d) mosto de uva.

7.7.1.3. Distribución de nanopartículas de plata por EDS

El análisis elemental EDS de la superficie de las nanofibras cargadas con las nanopartículas de plata sintetizadas con mosto de uva se obtuvo de los espectros de rayos X producidos por el barrido de electrones en lugares puntuales de algunas micrografías, así como en toda la superficie SEM. En la figura 45 se observa el mapeo de la distribución de Ag en una muestra de nanofibras electroestiradas con una concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$ solución de AgNPs, así como la imagen de la cual se obtuvo el barrido (imagen obtenida a bajo vacío sin recubrimiento). Debido a que los materiales utilizados para la síntesis de las nanofibras no son materiales conductores en la imagen obtenida sin recubrimiento no se pueden apreciar de una manera clara las nanofibras formadas, sin embargo es posible observar algunos puntos más brillantes, que se pueden identificar como materiales conductores que en este caso son las AgNPs adicionadas a las fibras, las cuales se distribuyen a lo largo de la película analizada, esto pudo corroborarse con el mapeo del Elemento plata obtenido por EDS, pues se observa que al superponer las imágenes los puntos brillantes son reconocidos como plata por el detector.

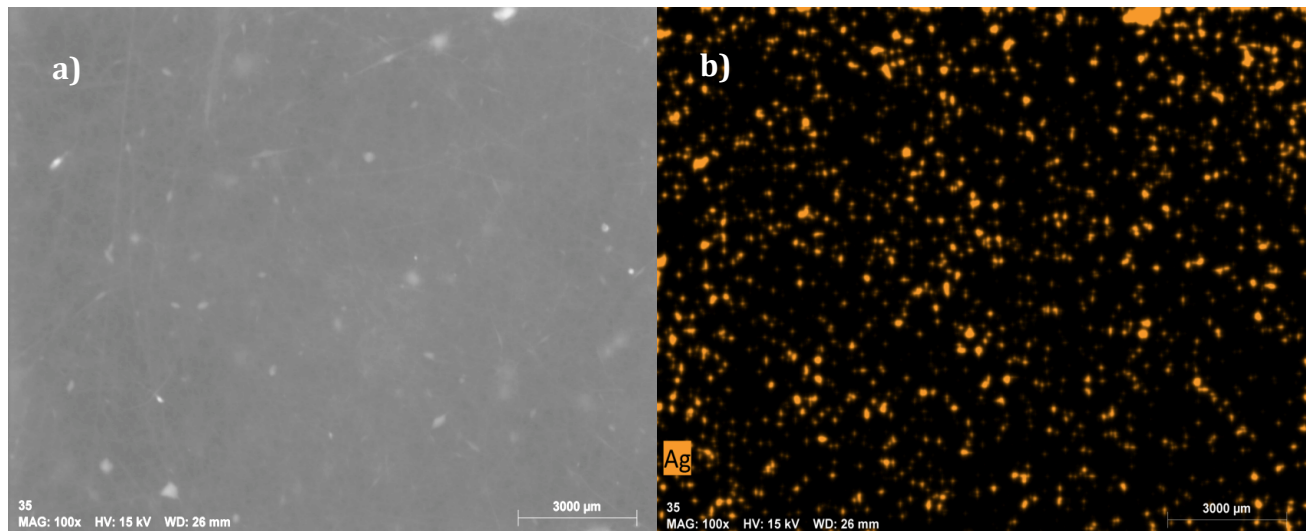


Figura 45. Micrografías electrónicas de barrido de nanofibras electroestiradas APA-PUL cargadas con AgNPs sintetizadas con mosto de uva a) imagen obtenida a vacío b) mapeo de la distribución de plata en la imagen.

La figura 46 representa los espectros de Rayos X de las nanopartículas de plata, en donde se grafica el número (conteo) de rayos X recibidos y procesados por el detector en función de la energía de los niveles atómicos de los elementos detectados. A partir de estos espectros de rayos X el software Genesis (EDAX) del equipo SEM integra los picos encontrados y normaliza respecto al elemento de mayor intensidad.

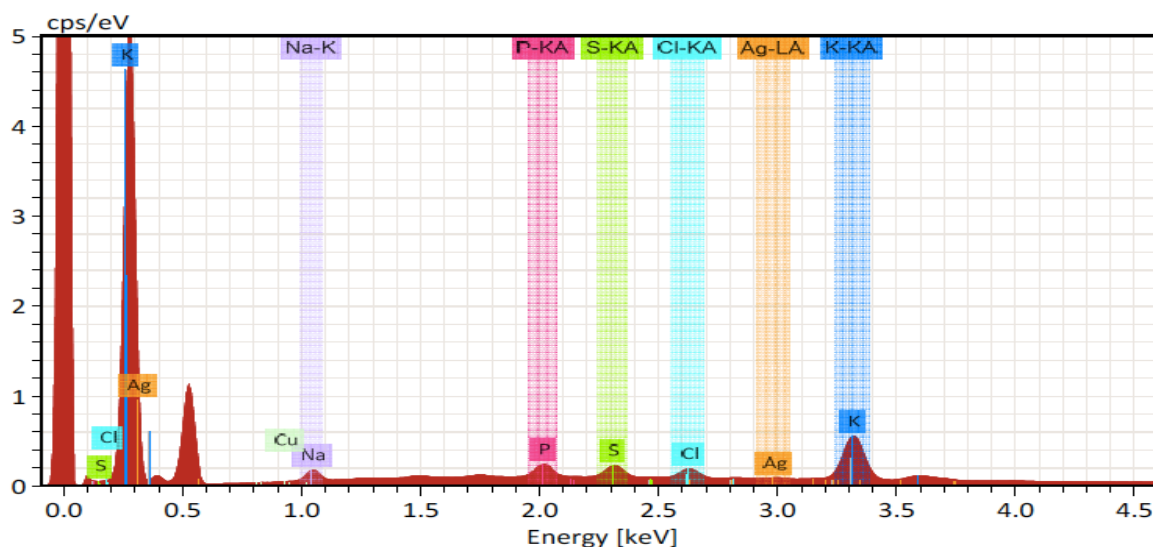


Figura 46. Espectros EDS de las fibras APA-Pul cargadas con AgNPs. Estos espectros provienen del barrido del haz de electrones en toda la superficie de las imágenes de micrografías.

Cuadro 18. Porcentaje en masa de diferentes elementos determinados por EDS

Elemento	No. Atómico	%Masa	%Masa normalizado	%Átomo
Carbono	6	30.20	60.91	71.32
Oxígeno	8	13.63	27.49	24.16
Sodio	11	0.73	1.47	0.90
Fósforo	15	0.62	1.25	0.57
Azufre	16	0.58	1.17	0.51
Cloro	17	0.51	1.03	0.41
Potasio	19	2.57	5.17	1.86
Cobre	29	0.39	0.78	0.17
Plata	47	0.39	0.73	0.09

En el cuadro 18 se presenta el análisis elemental de las muestras de nanofibras electroestiradas APA-PUL cargadas con AgNPs sintetizadas con el extracto

acuoso de mosto de uva, en el que podemos observar que los elementos mayoritarios corresponden a carbono y oxígeno, esto es de esperarse ya que estos elementos están presentes en toda la materia orgánica como los carbohidratos y proteínas con los que se elaboraron las nanofibras, cabe destacar que la plata es el elemento que se encontró en una menor cantidad con un porcentaje de masa 0.39%. Por lo que se puede sugerir que la concentración adicionada de nanopartículas de plata es muy baja con respecto a los demás ingredientes, ya que en total que se adiciona en peso es de 0.1 g de APA y PUL y los 200 µg corresponden al 0.2 % de los sólidos totales de la solución a electroestirar, el resultado obtenido con la técnica EDS es un poco alta, sin embargo es importante hacer énfasis en que este es un análisis semicuantitativo.

7.7.1.4. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los nanocompositos de fibras electroestiradas cargadas con nanopartículas de plata (sintetizadas con extractos de bagazo de naranja y mosto de uva), se determinó mediante la construcción de la curva de crecimiento de *E. coli* y *L. monocytogenes* (Figuras 47 y 48, respectivamente). Los tratamientos de nanofibras APA-PUL cargadas con AgNPs son comparados contra un control de fibras sin activo y el crecimiento normal de los microorganismos. Para *E. coli* se pueden observar diferencias significativas en el crecimiento bacteriano, ya que las fibras con AgNPs de naranja disminuyen en un 100% el crecimiento después de 8 horas de tratamiento. Mientras que las de uva llegan a este porcentaje después de las 12 horas, estas diferencias pueden estar relacionadas con la distribución de las nanopartículas en la película, pues como se observó en las imágenes de TEM las fibras con AgNPsN presentan agregados en la superficie que se difunden de manera más rápida al medio, sin embargo después de las 12 horas ambos logran la inactivación completa del microorganismo. Estos resultados son mejores a los reportadas por Dubey et al. 2015, quienes desarrollaron andamios de nanofibras elaboradas con óxido de polietileno (PEO) adicionadas de nanopartículas de plata sintetizadas en una solución de dimetilformamida, la completa inactivación de *E. Coli* se observó con

10 mg (cargadas con un 4% de AgNPs) de nanofibras, mientras que la cantidad de fibras de APA-PUL cargadas con AgNPs necesaria para inactivar el microorganismo fue de 0.5 mg (cargadas con un 0.2% de AgNPs), veinte veces menor a la reportada con las fibras de colágeno.

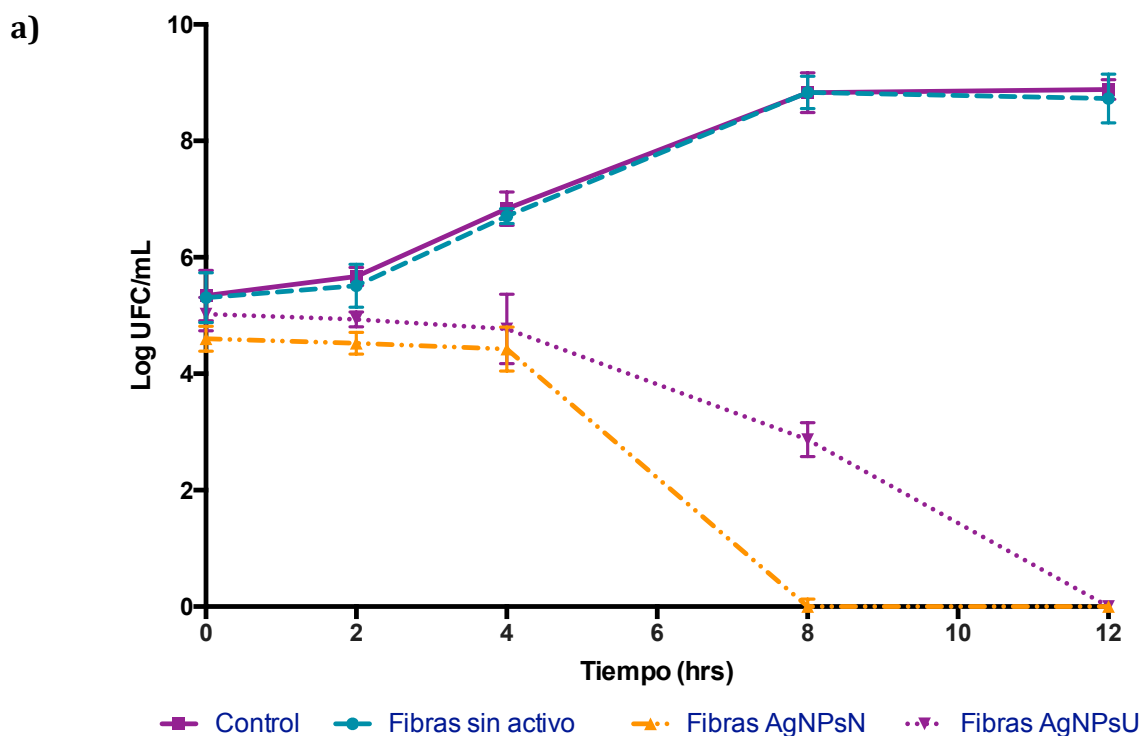


Figura 47. Curvas de crecimiento microbiano de *E. coli* tratadas con nanofibras APA-PUL cargadas con AgNPs

La figura 48 corresponde a las curvas de crecimiento de *L. monocytogenes*, en donde se puede observar que las fibras control sin activos no presentan actividad antimicrobiana como se mostró en los experimentos anteriores, pues su crecimiento es igual al del control alcanzando concentraciones muy cercanas a los 9 Log al final del experimento. Las fibras cargadas con AgNPs sintetizadas con bagazo de naranja lograron la disminución total del microorganismo a las 4 horas del experimento, por otro lado las sintetizadas con mosto de uva necesitaron 12 horas para inactivar totalmente al microorganismo, como se mencionó anteriormente esto puede deberse a la distribución de la plata dentro de las nanofibras. Este resultado da indicio de cómo se lleva a cabo la liberación de las

nanopartículas de plata de las nanofibras, pues ya se ha demostrado que este tipo de sistemas presentan una liberación rápida a las primeras horas que corresponde a la liberación de los activos que se encuentran en la superficie y una liberación paulatina correspondiente a los activos que forman parte del interior de la fibra y tienen mayor interacción con los componentes (Yao & Weiyuan 2010). Este perfil de liberación fue observado en fibras elaboradas con colágeno en donde en las primeras dos horas se liberó hasta un 50% del total de las AgNPs (Rath, Hussain, Chauhan, Garg, & Goyal, 2016). Debido a que la mayoría de las fibras cargadas con nanopartículas de plata elaboradas son diseñadas para su uso en la industria biomédica no se encontraron reportes de su uso contra *Listeria monocytogenes*.

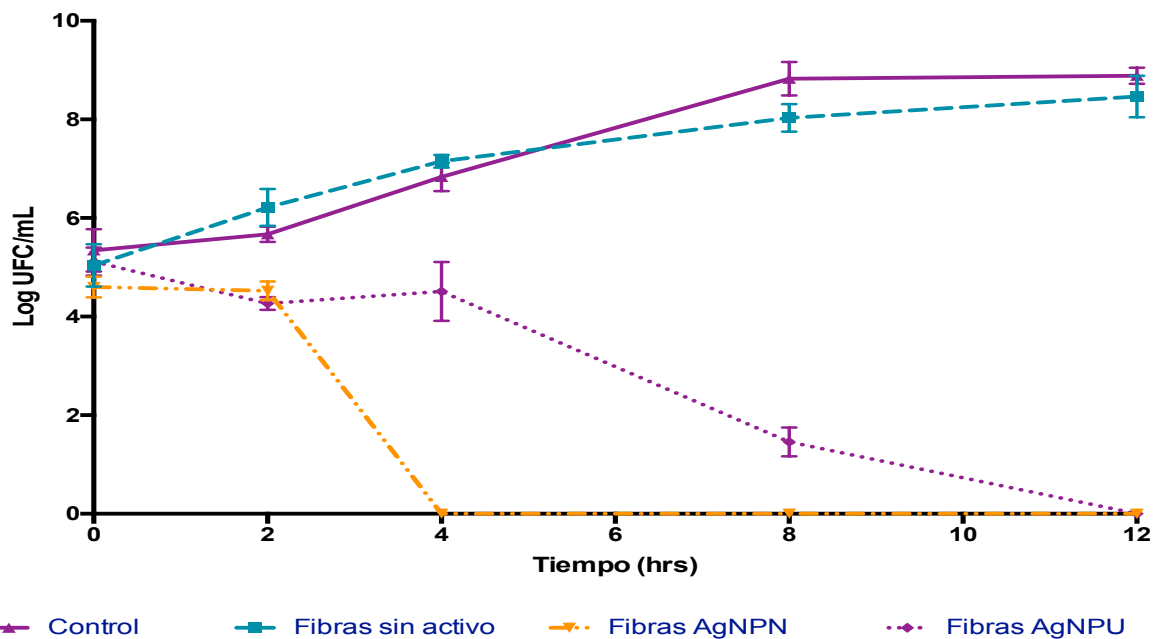


Figura 48. Curvas de crecimiento microbiano de *L. monocytogenes* tratadas con nanofibras APA-PUL cargadas con AgNPs.

En general las nanofibras con las nanopartículas sintetizadas con bagazo de naranja presentaron una inactivación más rápida de los microorganismo y presenta mejor actividad contra *Listeria* como se observó en las pruebas antimicrobianas de las nanopartículas solas, ambos tratamientos lograron disminuir aproximadamente 5 log la concentración inicial de ambos

microorganismos, por lo que pueden utilizarse como una alternativa para la fabricación de empaques antimicrobianos o para su uso en la industria biomédica.

7.7.2. Desarrollo de nanocompositos de nanofibras de APA-PUL reforzadas con la adición de nisina y AgNPs sintetizadas con mosto de uva

7.7.2.1. Caracterización de las soluciones y morfología de fibras

El cuadro 19 muestra la caracterización de la solución de APA-PUL adicionada con 200 µg/mL de AgNPs y 20 mg/mL de nisina, la elección de utilizar las nanopartículas sintetizadas con mosto de uva se tomó debido a que estas presentaron la mejor actividad antimicrobiana contra microorganismos tanto Gram-positivos como Gram-negativos y se considera que su liberación es más lenta con respecto a las sintetizadas con bagazo de naranja. Se puede observar que la adición de estos dos activos disminuyó significativamente la viscosidad de la solución y aumento la conductividad eléctrica con respecto a la solución control, parámetros que como se mencionó anteriormente repercuten en la morfología y el diámetro de las fibras obtenidas. Al adicionar ambos activos la viscosidad disminuyó 24.63 Cp., se ha demostrado que este parámetro es uno de los más influyentes en la formación de fibras electroestiradas, ya que a menores viscosidades es casi imposible lograr la formación de fibras continuas y lisas, aumentando la cantidad de defectos (perlas) (Li & Wang 2013; Nezarati et al. 2013). Sin embargo, aunque la viscosidad disminuyó no es apreciable la formación de defectos en las fibras obtenidas, pero si se puede observar que la morfología no es tan uniforme como cuando únicamente se adicionaban las AgNPs ó la nisina y el diámetro aumentó hasta casi un 100% (Cuadro 19). La conductividad eléctrica aumentó con respecto a la obtenida en el control, pero disminuyó en comparación con la obtenida en las fibras adicionadas con AgNPs, lo cual podría ser un indicativo de que la nisina (cargada positivamente) se encuentre interaccionando con la superficie de las nanopartículas, disminuyendo el número de cargas en la solución.

Cuadro 19. Caracterización de las soluciones de APA-PUL adicionadas con nanopartículas de plata y nisina, así como el diámetro obtenido de las fibras electroestiradas formadas a partir de cada solución.

Solución	Viscosidad (Cp.)	Conductividad (ms/cm)	Diámetro (nm)
Sin AgNPs	67.30 ± 0.066 ^a	4.021 ± 0.002 ^a	299.6 ± 8.40 ^a
AgNPs uva	50.284 ± 0.004 ^b	11.200 ± 0.037 ^c	95.5 ± 5.67 ^a
AgNPs + nisina	42.67 ± 0.184 ^b	10.34 ± 0.25 ^b	184.56 ± 10.73

Los resultados se presentan como la media ± el error estándar de tres replicas. Letras diferentes en una misma columna presentan diferencias significativas mediante la prueba de Tukey (P<0.01).

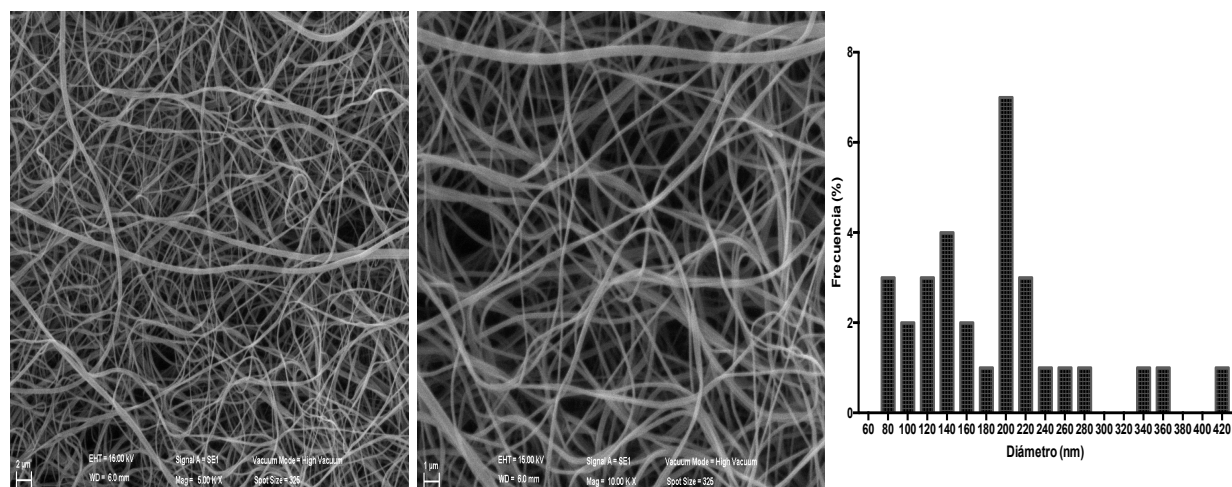


Figura 49. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las fibras APA-PUL cargadas con AgNPs y nisina, así como la distribución de tamaño de las fibras.

El diámetro obtenido para las fibras (Figura 49) adicionando los dos activos aumentó con respecto a la adición de cada activo por separado, lo cual es de esperarse ya que su adición modificaba los parámetros de la solución, hasta el momento no se han elaborado nanocompositos adicionando activos similares. Siendo posible comparar el diámetro con fibras de óxido de polietileno únicamente adicionadas con AgNPs, en las cuales se obtuvieron diámetros medios de 116.7 nm, resultados que resultan menores a los reportados en este estudio, lo que nos

puede dar un indicio de que la incorporación de nisina es la que tiene un mayor efecto en la morfología y diámetro (Dubey et al., 2015).

7.7.2.2. Actividad antimicrobiana

La curva de crecimiento de *L. monocytogenes* tratada con el nanocomposito de fibras APA-PUL cargadas con AgNPs y nisina se presenta en la figura 50, se puede observar que desde las primeras horas del experimento existe una reducción significativa de las UFC/mL del microorganismo, alcanzado la inactivación completa a las 8 h del estudio, la cual se mantuvo durante las cuarenta horas posteriores. Tiempo al que se llega a una reducción de 5.38 Log de la concentración inicial y una diferencia de aproximadamente 7.8 Log con respecto al crecimiento normal de microorganismo y el crecimiento con la adición de la fibra sin activos. Estos resultados son mejores a los obtenidos por las fibras adicionadas con los activos de manera independiente, ya que las fibras cargadas con solo nisina presentaron una reducción de 2.8 Log a las 8 horas y las nanopartículas de plata una reducción de 1.8 Log, por lo que podríamos decir que existió un efecto sinérgico entre los dos compuestos activos, el cual podría explicarse de la siguiente manera: las nanopartículas de plata presentan una actividad menor contra bacterias Gram positivas, debido al grosor de su capa de peptidoglicano, lo que dificulta su internalización dentro de la célula bacteriana, mientras que la nisina tiene la capacidad de formar poros en la pared celular de las bacterias Gram-positivas. Estos poros ayudan a que las nanopartículas de plata comiencen a entrar a las células y se unan a enzimas importantes en el metabolismo y por consiguiente los microorganismos mueran en un menor tiempo (Silhavy et al., 2010; Soto et al., 2016). En otros estudios nisina ha presentado un efecto sinérgico y/o aditivo al combinarse con antibióticos como las tetraciclinas y ampicilinas al presentar algunas interacciones que mejoraban la actividad de estos antibióticos (Ren et al., 2017).

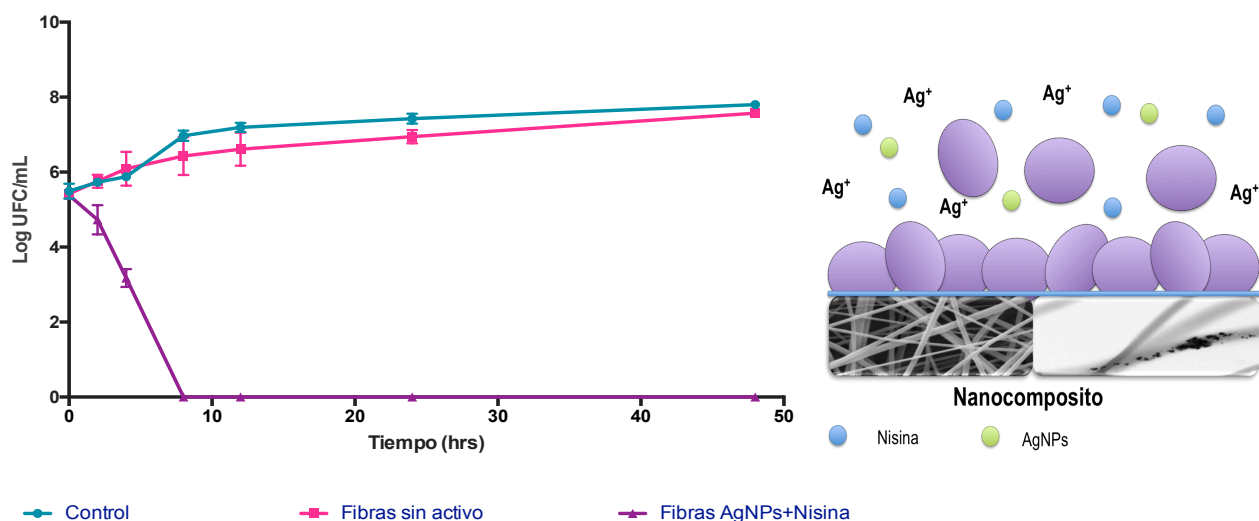


Figura 50. Curva de crecimiento microbiano de *L. monocytogenes* tratada con fibras APA-PUL cargadas con AgNPs y nisina

Si bien no se han probado nanocompositos similares para la inactivación de *Listeria*, si existe el desarrollo de empaques activos adicionados con AgNPs para la disminución de este microorganismo, un ejemplo es el empaque desarrollado para la protección de manzanas rebanadas, elaborado con polietileno, plata y óxido de titanio, en donde se inactivo por completo el microorganismo hasta los 10 días y aunque fue tardado mejoró la actividad antimicrobiana de las manzanas rebanadas (Ren et al., 2017). Los resultados obtenidos sugieren que los nanocompositos adicionados con los dos activos presentan una mejor actividad antimicrobiana que puede estar relacionada con un efecto sinérgico y que estos pueden usarse como recubrimientos para alimentos, alargando su vida de anaquel y disminuyendo la contaminación superficial de los mismos.

7.7.3. Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua es la cantidad de vapor (gramos) que pasa por unidad de superficie (m^2) de un material de espesor unidad (cm), por unidad de tiempo (días), cuando en sus paredes existe una diferencia de presión unitaria (Pa). Ésta es una propiedad importante para los materiales destinados al sector del empaque ya que puede estar directamente relacionada con la vida útil y estabilidad del producto envasado. En el cuadro 20 se presentan las

permeabilidades a vapor de agua obtenidas para casa película de fibras, podemos observar que con la adición de activos la PVA disminuye con respecto a las fibras control, en un 50.24% cuando se adicionan las AgNPs y en un 59.33% cuando se adicionan las AgNPs y nisina a las fibras. Es notorio que la adición de AgNPs es la que disminuye en mayor medida la permeabilidad al vapor de agua, esta disminución puede explicarse en primer lugar por la presencia de los AgNPs que como se observó en apartados anteriores son cristalinas, por lo que se consideran como una barrera al agua y un obstáculo para su difusión y finalmente, el cambio de difusión también podría explicarse por una fuerte interacción entre los AgNPs cristalinas y los polímeros con que se elaboran las fibras (APA-PUL) y a la hidrofobicidad de las AgNPs (Cheviron, Gouanvé, & Espuche, 2016). La adición de compuestos nanoestructurados como nanoarcillas y nanopartículas metálicas, se han utilizado para incrementar las propiedades mecánicas y de barrera de materiales elaborados con biopolímeros, en este sentido las nanopartículas de plata, son de las más utilizadas, ya que además proporcionan actividad antimicrobiana a los nanocompositos (Othman, 2014; Shankar, Rhim, & Won, 2018). La adición de nanopartículas de plata cristalinas como las que se obtuvieron por síntesis verde con el mosto de uva disminuyo la permeabilidad al vapor de agua de manera significativa.

Cuadro 20. Permeabilidad al vapor de agua de las fibras control y de las fibras cargadas con AgNPs y nisina

Muestra	PVA (g/Pa*s*m)
Control	7.056 x 10 ⁻⁹ a
AgNPs	3.545 x 10 ⁻⁹ b
AgNPs +Nisina	2.869 x 10 ⁻⁹ b

Los resultados se presentan como la media tres replicas. Letras diferentes en una misma columna presentan diferencias significativas mediante la prueba de Tukey (P<0.01).

Los valores de PVA son mayores a los reportados para un nanocomposito elaborado con ácido poliláctico y lignina, pero muy similares a los reportados para la incorporación de AgNPs a un nanocomposito elaborado con pectinas (Shankar

et al., 2018; Shankar, Tanomrod, Rawdkuen, & Rhim, 2016), estas diferencias se pueden relacionar principalmente con los polímeros utilizados para formar la base del nanocomposito, que en nuestro caso es un carbohidrato, pululano, el cual es muy soluble en agua con un valor de PVA de 5×10^{-6} g/Pa*s*m (Q. Xiao, Lu, Tong, & Liu, 2015) mientras que la proteína de amaranto presenta valores de $3.2 \cdot 10^{-9}$ g/Pa*s*m (Condés, Añón, & Mauri, 2015), es decir presenta una mayor hidrofobicidad, que al mezclarse con el pululano disminuye, pero al adicionarse las nanopartículas de plata se incrementa esta característica.

8. CONCLUSIONES

- Se logró la formación de fibras electroestiradas lisas y sin defectos con la incorporación de nisina en concentraciones de 10 y 20 mg/mL, esa encapsulación confiere estabilidad a la nisina a valores de pH de 3.4 y 6.1, en dos alimentos modelos (queso y jugo de manzana), manteniendo su actividad antimicrobiana contra microorganismos como *Salmonella*, *Listeria* y *Leuconostoc*, lo que sugiere su uso como producción de empaques activos antimicrobianos.
- Los extractos de pericón, orégano, mosto de uva y bagazo de naranja presentan excelentes propiedades de actividad antioxidante y perfiles de compuestos fenólicos que se utilizaron para la formación de nanopartículas de plata a través de la reducción de sales de plata.
- Mediante el análisis de FTIR se pudo observar que los compuestos fenólicos de los extractos están involucrados en la reducción y la estabilización de las nanopartículas de plata, al adherirse a su superficie y evitando su aglomeración, dependiendo del tipo de extracto utilizado se presentaron diferentes diámetros y mejores actividades antimicrobianas con efectos dosis dependiente.
- Los extractos que en su composición nutracéutica presentan compuestos fenólicos simples como el ácido gálico, formaron nanopartículas con mejores características morfológicas y mayor actividad antimicrobiana.
- Los nanocompositos formados con la adición de AgNPs y nisina, mejoró las características de permeabilidad al vapor de agua, propiedades mecánicas y actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos.
- Los nanocompositos elaborados pueden presentar diversas aplicaciones en diferentes áreas como la medicina y en la formación de empaques activos antimicrobianos, por su excelente actividad y baja PVA.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Aasen, I. M., Markussen, S., Møretrø, T., Katla, T., Axelsson, L., & Naterstad, K. (2003). Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *International Journal of Food Microbiology*, *87*, 35–43. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00047-3](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00047-3)
- Abdala, L. R. (1999). Flavonoids of the aerial parts from *Tagetes lucida* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, *27*(7), 753–754. [http://doi.org/10.1016/S0305-1978\(99\)00011-3](http://doi.org/10.1016/S0305-1978(99)00011-3)
- Abdel-aziz, M. S., Shaheen, M. S., & El-nekeety, A. A. (2014). Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles biosynthesized using *Chenopodium murale* leaf extract. *Journal of Saudi Chemical Society*, *18*(4), 356–363. <http://doi.org/10.1016/j.jscs.2013.09.011>
- Aceituno-Medina, M., Lopez-Rubio, A., Mendoza, S., & Lagaron, J. M. (2013). Development of novel ultrathin structures based in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolate through electrospinning. *Food Hydrocolloids*, *31*(2), 289–298. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.009>
- Aceituno-Medina, M., Mendoza, S., Lagaron, J. M., & López-Rubio, A. (2013). Development and characterization of food-grade electrospun fibers from amaranth protein and pullulan blends. *Food Research International*, *54*(1), 667–674. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.055>
- Aceituno-Medina, M., Mendoza, S., Rodríguez, B. A., Lagaron, J. M., & López-Rubio, A. (2015). Improved antioxidant capacity of quercetin and ferulic acid during in-vitro digestion through encapsulation within food-grade electrospun fibers. *Journal of Functional Foods*, *12*, 332–341. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2014.11.028>
- Agarwal, S., Greiner, A., & Wendorff, J. H. (2013). Functional materials by electrospinning of polymers. *Progress in Polymer Science*, *38*(6), 963–991. <http://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.02.001>

- Ahire, J. J., & Dicks, L. M. T. (2014). Nisin Incorporated With 2,3-Dihydroxybenzoic Acid in Nanofibers Inhibits Biofilm Formation by a Methicillin-Resistant Strain of *Staphylococcus aureus*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 7(1), 52–59. <http://doi.org/10.1007/s12602-014-9171-5>
- Ahmed, I., Lin, H., Zou, L., Brody, A. L., Li, Z., Qazi, I. M., ... Lv, L. (2017). A comprehensive review on the application of active packaging technologies to muscle foods. *Food Control*, 82, 163–178. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.06.009>
- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B. L., & Ikram, S. (2016). REVIEW A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications : A green expertise. *Journal of Advanced Research*, 7(1), 17–28. <http://doi.org/10.1016/j.jare.2015.02.007>
- Akbar, A., & Anal, A. K. (2014). Zinc oxide nanoparticles loaded active packaging, a challenge study against *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat poultry meat. *Food Control*, 38(1), 88–95. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.065>
- Alonso, C., & Álvarez, I. (2010). *Nuevas tecnologías en la conservación y transformación de los alimentos*.
- Annamalai, a., Christina, V. L. P., Sudha, D., Kalpana, M., & Lakshmi, P. T. V. (2013). Green synthesis, characterization and antimicrobial activity of Au NPs using *Euphorbia hirta* L. leaf extract. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 108, 60–65. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.02.012>
- Arora, A., & Padua, G. W. (2010). Review: Nanocomposites in food packaging. *Journal of Food Science*, 75(1), 43–49. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01456.x>
- Arruda, Q. De, Stefani, R., Aniceto, V., Jr, P., & Nat, I. (2014). Food Hydrocolloids Active chitosan / PVA fi lms with anthocyanins from *Brassica oleraceae* (Red Cabbage) as Time e Temperature Indicators for application in intelligent food packaging, 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.05.014>

- Ávalos, a., Haza, A., & Morales, P. (2013). Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 7(2), 1–23.
http://doi.org/10.5209/rev_RCCV.2013.v7.n2.43408
- Balciunas, E. M., Castillo Martinez, F. A., Todorov, S. D., Franco, B. D. G. D. M., Converti, A., & Oliveira, R. P. D. S. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 32(1), 134–142.
<http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.025>
- Barbosa-Pereira, L., Angulo, I., Lagarón, J. M., Paseiro-Losada, P., & Cruz, J. M. (2014). Development of new active packaging films containing bioactive nanocomposites. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 26, 310–318. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.06.002>
- Basak, S., Ramaswamy, H. S., & Piette, J. P. G. (2002). High pressure destruction kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae* in single strength and concentrated orange juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3(3), 223–231. [http://doi.org/10.1016/S1466-8564\(02\)00008-5](http://doi.org/10.1016/S1466-8564(02)00008-5)
- Basavegowda, N., Idhayadhulla, A., & Lee, Y. R. (2014). Phyto-synthesis of gold nanoparticles using fruit extract of *Hovenia dulcis* and their biological activities. *Industrial Crops and Products*, 52, 745–751.
<http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.006>
- Beres, C., Costa, G. N. S., Cabezudo, I., da Silva-James, N. K., Teles, A. S. C., Cruz, A. P. G., ... Freitas, S. P. (2017). Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Management*, 68, 581–594. <http://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.017>
- Bhardwaj, N., & Kundu, S. C. (2010). Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 28, 325–347.
<http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004>
- Blanco-Padilla, A., Soto, K. M., Hernández Iturriaga, M., & Mendoza, S. (2014).

- Food antimicrobials nanocarriers. *Scientific World Journal*, 2014.
<http://doi.org/10.1155/2014/837215>
- Bleoanc, I., Saje, K., Mihalcea, L., Oniciuc, E., Smole-mozina, S., Ioana, A., & Borda, D. (2016). Contribution of high pressure and thyme extract to control *Listeria monocytogenes* in fresh cheese - A hurdle approach, 38, 7–14.
<http://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.09.002>
- Cai, F., Li, J., Sun, J., & Ji, Y. (2011). Biosynthesis of gold nanoparticles by biosorption using *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1. *Chemical Engineering Journal*, 175, 70–75. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2011.09.041>
- Canadanovic-Brunet, J. M., Savatovic, S. S., Cetkovic, G. S., Vulic, J. J., Djilas, S. M., Markov, S. L., & Cvetkovic, D. D. (2011). Antioxidant and Antimicrobial Activities of Beet Root Pomace Extracts. *Czech Journal of Food Sciences*, 29(6), 575–585.
- Cárdenas, A., Gómez, M., & Frontana, C. (2014). Electrochimica Acta Development of an Electrochemical Cupric Reducing Antioxidant Capacity Method (CUPRAC) for Antioxidant Analysis. *Electrochimica Acta*, 128, 113–118. <http://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.10.191>
- Castro, G., Valbuena, E., Bríñez, W., Sánchez, E., & Vera, H. (2009). Comparación Del Empleo De Nisina Y Cultivos. *Revista Científica FCV-LUZ*, XIX, 201–209.
- Celebioglu, A., & Uyar, T. (2013). Electrospinning of nanofibers from non-polymeric systems: Electrospun nanofibers from native cyclodextrins. *Journal of Colloid and Interface Science*, 404, 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.04.034>
- Chen, H., & Hoover, D. G. (2003). Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 82–100.
<http://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00016.x>
- Chen, S., Li, R., Li, X., & Xie, J. (2018). Electrospinning: An enabling nanotechnology platform for drug delivery and regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2018.05.001>

- Cheviron, P., Gouanvé, F., & Espuche, E. (2016). Preparation, characterization and barrier properties of silver/montmorillonite/starch nanocomposite films. *Journal of Membrane Science*, 497, 162–171. <http://doi.org/10.1016/j.memsci.2015.09.039>
- Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A., & Dicks, L. M. (2018). Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 23–28. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.011>
- Cho, D., Nnadi, O., Netravali, A., & Joo, Y. L. (2010). Electrospun hybrid soy protein/PVA fibers. *Macromolecular Materials and Engineering*, 295(8), 763–773. <http://doi.org/10.1002/mame.201000161>
- Choi, M.-R., Liu, Q., Lee, S.-Y., Jin, J.-H., Ryu, S., & Kang, D.-H. (2012). Inactivation of Escherichia coli O157:H7, Salmonella typhimurium and Listeria monocytogenes in apple juice with gaseous ozone. *Food Microbiology*, 32(1), 191–195. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2012.03.002>
- Choi, S. J., Decker, E. A., Henson, L., Popplewell, L. M., & McClements, D. J. (2009). Stability of Citral in Oil-in-Water Emulsions Prepared with Medium-Chain Triacylglycerols and Triacetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(23), 11349–11353. <http://doi.org/10.1021/jf902761h>
- Condés, M. C., Añón, M. C., & Mauri, A. N. (2015). Amaranth protein films prepared with high-pressure treated proteins. *Journal of Food Engineering*, 166, 38–44. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.05.005>
- Costa, A., Lourenco, A., Civera, T., & Brito, L. (2018). Listeria innocua and Listeria monocytogenes strains from dairy plants behave similarly in biofilm sanitizer testing. *Lwt*, 92(March), 477–483. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.073>
- Costa, L. M. M., de Olyveira, G. M., Cherian, B. M., Leão, A. L., de Souza, S. F., & Ferreira, M. (2013). Bionanocomposites from electrospun PVA/pineapple nanofibers/Stryphnodendron adstringens bark extract for medical applications. *Industrial Crops and Products*, 41(1), 198–202. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.025>

- Cruz-guerrero, A. E., Garci, M., & Jime, J. (2009). LWT - Food Science and Technology Use of an exopolysaccharide-producing strain of *Streptococcus thermophilus* in the manufacture of Mexican Panela cheese, *42*, 1508–1512. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.04.009>
- Cruz-Romero, M. C., Murphy, T., Morris, M., Cummins, E., & Kerry, J. P. (2013). Antimicrobial activity of chitosan, organic acids and nano-sized solubilisates for potential use in smart antimicrobially-active packaging for potential food applications. *Food Control*, *34*(2), 393–397. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.04.042>
- De Oliveira Mori, C. L. S., Dos Passos, N. A., Oliveira, J. E., Mattoso, L. H. C., Mori, F. A., Carvalho, A. G., ... Tonoli, G. H. D. (2014). Electrospinning of zein/tannin bio-nanofibers. *Industrial Crops and Products*, *52*, 298–304. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.10.047>
- Dror, Y., Ziv, T., Makarov, V., Wolf, H., Admon, A., & Zussman, E. (2008). Nanofibers made of globular proteins. *Biomacromolecules*, *9*(10), 2749–2754. <http://doi.org/10.1021/bm8005243>
- Dubey, P., Bhushan, B., Sachdev, A., Matai, I., Uday Kumar, S., & Gopinath, P. (2015). Silver-nanoparticle-Incorporated composite nanofibers for potential wound-dressing applications. *Journal of Applied Polymer Science*, *132*(35), 1–12. <http://doi.org/10.1002/app.42473>
- Dudo, A., Choi, D. H., & Scheufele, D. a. (2011). Food nanotechnology in the news. Coverage patterns and thematic emphases during the last decade. *Appetite*, *56*(1), 78–89. <http://doi.org/10.1016/j.appet.2010.11.143>
- Dwivedi, A. D., & Gopal, K. (2010). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Chenopodium album* leaf extract. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *369*(1–3), 27–33. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.07.020>
- Electrospinning, T., & Aplicaciones, P. (2007). Producción De Micro Y Nano Fibras a Partir De La Farmacológicas. *VII Congreso de La Sociedad Cubana de*

- Escobar, M. (2010). Extracción de compuestos fenólicos de las cáscaras de cítricos producidos en México, 1–101.
- Fabra, M. J., López-Rubio, A., & Lagaron, J. M. (2014). On the use of different hydrocolloids as electrospun adhesive interlayers to enhance the barrier properties of polyhydroxyalkanoates of interest in fully renewable food packaging concepts. *Food Hydrocolloids*, 39, 77–84.
<http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.12.023>
- Fang, Z., Zhao, Y., Warner, R. D., & Johnson, S. K. (2017). Active and intelligent packaging in meat industry. *Trends in Food Science and Technology*, 61(2), 60–71. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.01.002>
- Fortunati, E., Rinaldi, S., Peltzer, M., Bloise, N., Visai, L., Armentano, I., ... Kenny, J. M. (2014). Nano-biocomposite films with modified cellulose nanocrystals and synthesized silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 101(1), 1122–1133. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.055>
- Fuentes, F. G., & Mendoza, S. (2011). Electrochemical Screening of Biomarkers in Chemotype Mexican Oregano Oils on Single-Walled Carbon Nanotubes Screen-Printed Electrodes, (9), 2212–2216.
<http://doi.org/10.1002/elan.201100245>
- Gabriel, A. a., & Nakano, H. (2009). Inactivation of Salmonella, E. coli and Listeria monocytogenes in phosphate-buffered saline and apple juice by ultraviolet and heat treatments. *Food Control*, 20(4), 443–446.
<http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.08.008>
- Gaur, P. K., Mishra, S., & Purohit, S. (2013). Solid Lipid Nanoparticles of Guggul Lipid as Drug Carrier for Transdermal Drug Delivery, 2013.
- Geethalakshmi, R., & Sarada, D. V. L. (2013). Characterization and antimicrobial activity of gold and silver nanoparticles synthesized using saponin isolated from *Trianthema decandra* L. *Industrial Crops and Products*, 51, 107–115.
<http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.055>

- Geraci, A., Di Stefano, V., Di Martino, E., Schillaci, D., & Schicchi, R. (2017). Essential oil components of orange peels and antimicrobial activity. *Natural Product Research*, 31(6), 653–659.
<http://doi.org/10.1080/14786419.2016.1219860>
- González-Campos, J. B., Mota-Morales, J. D., Kumar, S., Zárate-Triviño, D., Hernández-Iturriaga, M., Prokhorov, Y., ... Luna-Bárceñas, G. (2013). New insights into the bactericidal activity of chitosan-Ag bionanocomposite: The role of the electrical conductivity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111, 741–746. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.07.003>
- Gopinath, K., Venkatesh, K. S., Ilangovan, R., Sankaranarayanan, K., & Arumugam, a. (2013). Green synthesis of gold nanoparticles from leaf extract of Terminalia arjuna, for the enhanced mitotic cell division and pollen germination activity. *Industrial Crops and Products*, 50, 737–742.
<http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.060>
- Gouma, M., Álvarez, I., Condón, S., & Gayán, E. (2015). Modelling microbial inactivation kinetics of combined UV-H treatments in apple juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27, 111–120.
<http://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.11.004>
- Groves, K., & Titoria, P. (2009). Nanotechnology and the food industry. *Food Science & Technology*, 60(4), 44–51. <http://doi.org/10.4455/eu.2013.011>
- Gruskiene, R., Krivorotova, T., & Sereikaite, J. (2017). Nisin-loaded pectin and nisin-loaded pectin-inulin particles: Comparison of their proteolytic stability with free nisin. *LWT - Food Science and Technology*, 82, 283–286.
<http://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.061>
- Guzman-hernandez, R., Contreras-rodriiguez, A., Hernandez-velez, R., & Perez-martinez, I. (2016). International Journal of Food Microbiology Mexican unpasteurised fresh cheeses are contaminated with Salmonella spp ., non-O157 Shiga toxin producing Escherichia coli and potential uropathogenic E . coli strains : A public health risk. *International Journal of Food Microbiology*,

237, 10–16. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.018>

Guzmán, M. G., Dille, J., & Godet, S. (2008). Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity, 312–319.

Hamad, A. F., Han, J. H., Kim, B. C., & Rather, I. A. (2018). The intertwine of nanotechnology with the food industry. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(1), 27–30. <http://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.09.004>

He, X., & Hwang, H. M. (2016). Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(4), 671–681. <http://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.06.001>

Herna, P., Lo, G., & Gavara, R. (2013). ScienceDirect Characterization of ethylene-vinyl alcohol copolymer containing lauril arginate (LAE) as material for active antimicrobial food packaging, 1, 10–18. <http://doi.org/10.1016/j.fpsl.2013.09.002>

Hernandez-sandoval, L., Martínez-rocha, A., Puga, R., & Mendoza, S. (2008). Antioxidant and Antimutagenic Activities of Mexican Oregano (*Lippia graveolens* Kunth) Antioxidant and Antimutagenic Activities of Mexican Oregano (*Lippia graveolens* Kunth), (May 2015). <http://doi.org/10.1007/s11130-007-0061-9>

Heunis, T., Bshena, O., Klumperman, B., & Dicks, L. (2011). Release of bacteriocins from nanofibers prepared with combinations of poly(D,L-lactide) (PDLLA) and poly(ethylene oxide) (PEO). *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 2158–2173. <http://doi.org/10.3390/ijms12042158>

Heydari, R., & Rashidipour, M. (2015). Green synthesis of silver nanoparticles using extract of oak Fruit hull (Jaft): Synthesis and in vitro cytotoxic effect on MCF-7 cells. *International Journal of Breast Cancer*, 2015. <http://doi.org/10.1155/2015/846743>

Hosseini, S. M., Hosseini, H., Mohammadifar, M. A., German, J. B., Mortazavian, A. M., Mohammadi, A., ... Khaksar, R. (2014). Preparation and characterization of alginate and alginate-resistant starch microparticles

- containing nisin. *Carbohydrate Polymers*, 103, 573–580.
<http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.078>
- Huang, J. Y., Li, X., & Zhou, W. (2015). Safety assessment of nanocomposite for food packaging application. *Trends in Food Science and Technology*, 45(2), 187–199. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.002>
- Ibarguren, C., Naranjo, P. M., Stötzel, C., Audisio, M. C., Sham, E. L., Farfán Torres, E. M., & Müller, F. a. (2014). Adsorption of nisin on raw montmorillonite. *Applied Clay Science*, 90, 88–95.
<http://doi.org/10.1016/j.clay.2013.12.031>
- Ibrahim, H. M. M. (2015). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(3), 265–275. <http://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.01.007>
- Illas, F. (2014). *Chem Soc Rev*, 43(14). <http://doi.org/10.1039/c3cs60421g>
- Imran, M., Revol-Junelles, A. M., Paris, C., Guedon, E., Linder, M., & Desobry, S. (2015). Liposomal nanodelivery systems using soy and marine lecithin to encapsulate food biopreservative nisin. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 341–349. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.046>
- Imran, M., Revol-Junelles, A. M., René, N., Jamshidian, M., Akhtar, M. J., Arab-Tehrany, E., ... Desobry, S. (2012). Microstructure and physico-chemical evaluation of nano-emulsion-based antimicrobial peptides embedded in bioactive packaging films. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 407–419.
<http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.04.010>
- Jaiswal, Y., Tatke, P., Gabhe, S., & Vaidya, a. (2013). Rapid high performance thin layer chromatographic method for quantitation of catechin from extracts of cashew leaves-a short report. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 63(1), 49–54. <http://doi.org/10.2478/v10222>
- Jiang, Y. N., Mo, H. Y., & Yu, D. G. (2012). Electrospun drug-loaded core-sheath PVP/zein nanofibers for biphasic drug release. *International Journal of*

Pharmaceutics, 438(1–2), 232–239.

<http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.08.053>

Joglekar, S., Kodam, K., Dhaygude, M., & Hudlikar, M. (2011). Novel route for rapid biosynthesis of lead nanoparticles using aqueous extract of *Jatropha curcas* L. latex. *Materials Letters*, 65(19–20), 3170–3172.

<http://doi.org/10.1016/j.matlet.2011.06.075>

Kaderides, K., & Goula, A. M. (2017). Development and characterization of a new encapsulating agent from orange juice by-products. *Food Research International*, 100(June), 612–622.

<http://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.057>

Kayaci, F., & Uyar, T. (2012). Electrospun zein nanofibers incorporating cyclodextrins. *Carbohydrate Polymers*, 90(1), 558–568.

<http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.078>

Khalil, M. M. H., Ismail, E. H., El-Baghdady, K. Z., & Mohamed, D. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity. *Arabian Journal of Chemistry*, 7(6), 1131–1139.

<http://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.007>

Khan, I., & Deog-Hwan, O. (2015). Integration of nisin into nanoparticles for application in foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*.

<http://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.12.013>

Khan, I., & Oh, D.-H. (2015). Integration of nisin into nanoparticles for application in foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 34, 376–384.

<http://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.12.013>

Kljujev, I., Raicevic, V., Jovicic-Petrovic, J., Vujovic, B., Mirkovic, M., & Rothballer, M. (2018). *Listeria monocytogenes* – Danger for health safety vegetable production. *Microbial Pathogenesis*, 120(February), 23–31.

<http://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.04.034>

Kong, L., & Ziegler, G. R. (2013). Quantitative relationship between electrospinning parameters and starch fiber diameter. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1416–

1422. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.026>

Kuck, L. S., & Noreña, C. P. Z. (2016). Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. *Food Chemistry*, *194*, 569–576. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.066>

Kumar, A., Chisti, Y., & Chand, U. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances*, *31*(2), 346–356. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.003>

Kumar, M., Bansal, K., Gondil, V. S., Sharma, S., Jain, D. V. S., Chhibber, S., ... Wangoo, N. (2018). Synthesis, characterization, mechanistic studies and antimicrobial efficacy of biomolecule capped and pH modulated silver nanoparticles. *Journal of Molecular Liquids*, *249*, 1145–1150. <http://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.11.143>

Kumar, P. P. N. V., Pammi, S. V. N., Kollu, P., Satyanarayana, K. V. V., & Shameem, U. (2014). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Boerhaavia diffusa* plant extract and their anti bacterial activity. *Industrial Crops & Products*, *52*, 562–566. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.10.050>

Laridi, R., Kheadr, E. E., Benech, R. O., Vuillemand, J. C., Lacroix, C., & Fliss, I. (2003). Liposome encapsulated nisin Z: Optimization, stability and release during milk fermentation. *International Dairy Journal*, *13*(4), 325–336. [http://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00194-2](http://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00194-2)

Lavoine, N., Givord, C., Tabary, N., Desloges, I., Martel, B., & Bras, J. (2014). Elaboration of a new antibacterial bio-nano-material for food-packaging by synergistic action of cyclodextrin and micro fi brillated cellulose. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.06.006>

Lee, D. (2016). Antibacterial Activity of Silver-Nanoparticles Against *Staphylococcus Aureus* and *Escherichia Coli* Antibacterial Activity of Silver-

- nanoparticles Against Staphylococcus aureus and Escherichia coli, (October).
- Lee, J.-Y., Kim, S.-S., & Kang, D.-H. (2015). Effect of pH for inactivation of Escherichia coli O157:H7, Salmonella Typhimurium and Listeria monocytogenes in orange juice by ohmic heating. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 83–88. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.020>
- Lee, J., Son, S., & Hong, S. (2008). Characterization of protein-coated polypropylene films as a novel composite structure for active food packaging application, 86, 484–493. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.10.025>
- Li, D., Liu, Z., Yuan, Y., Liu, Y., & Niu, F. (2015). Green synthesis of gallic acid-coated silver nanoparticles with high antimicrobial activity and low cytotoxicity to normal cells, 50, 357–366.
- Li, Z., & Wang, C. (2013). One-Dimensional nanostructures, 15–29. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-36427-3>
- Llorens, A., Lloret, E., Picouet, P. a., Trbojevich, R., & Fernandez, A. (2012). Metallic-based micro and nanocomposites in food contact materials and active food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 24(1), 19–29. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.10.001>
- Lo, T., & Herna, M. M. (2007). Response of Two Salmonella enterica Strains Inoculated in Model Cheese Treated with High Hydrostatic Pressure, 99–109. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)72612-7](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)72612-7)
- Londoño-Londoño, J., Sierra, J., Álvarez, R., Restrepo, A. M., & Pássaro, C. P. (2012). Aprovechamiento de los subproductos cítricos. *Cítricos: Cultivo, Poscosecha e Industrialización*, (March 2015), 343–367.
- MacRi, L. K., Sheiher, L., Singer, A. J., Kohn, J., & Clark, R. A. F. (2012). Ultrafast and fast bioerodible electrospun fiber mats for topical delivery of a hydrophilic peptide. *Journal of Controlled Release*, 161(3), 813–820. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.035>
- Magalhães, L., & Nitschke, M. (2013). Antimicrobial activity of rhamnolipids against

- Listeria monocytogenes and their synergistic interaction with nisin. *Food Control*, 29(1), 138–142. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.009>
- Makarov, V. V., Love, a. J., Sinitsyna, O. V., Makarova, S. S., Yaminsky, I. V., Taliany, M. E., & Kalinina, N. O. (2014). “Green” nanotechnologies: Synthesis of metal nanoparticles using plants. *Acta Naturae*, 6(20), 35–44.
- Malik, P., Shankar, R., Malik, V., Sharma, N., & Mukherjee, T. K. (2014). Green Chemistry Based Benign Routes for Nanoparticle Synthesis Nanoparticles : A Glance. *Journal of Nanoparticles*, 2014, 14 pages. <http://doi.org/10.1155/2014/302429>
- Manal, A. A., Awatif, A. H., Khalid, M. O. O., Dalia, F. A. E., Nada, E. E., Lamia, A. A., ... Abdelelah, A. G. A. (2014). Silver nanoparticles biogenic synthesized using an orange peel extract and their use as an anti-bacterial agent. *International Journal of Physical Sciences*, 9(3), 34–40. <http://doi.org/10.5897/IJPS2013.4080>
- Mariselvam, R., Ranjitsingh, a J. a, Usha Raja Nanthini, a, Kalirajan, K., Padmalatha, C., & Mosae Selvakumar, P. (2014). Green synthesis of silver nanoparticles from the extract of the inflorescence of Cocos nucifera (Family: Arecaceae) for enhanced antibacterial activity. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 129, 537–41. <http://doi.org/10.1016/j.saa.2014.03.066>
- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: Different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. *Food Chemistry*, 158, 73–80. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.099>
- Mendez, M. A. A. (2009). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata: efecto sobre *Colletotrichum gloesporioides*.
- Mihindukulasuriya, S. D. F., & Lim, L. T. (2014). Nanotechnology development in food packaging: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 40(2),

149–167. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.09.009>

- Mocanu, A., Furtos, G., Rapuntean, S., Horovitz, O., Flore, C., Garbo, C., ... Tomoaia-cotisel, M. (2014). Applied Surface Science Synthesis ; characterization and antimicrobial effects of composites based on multi-substituted hydroxyapatite and silver nanoparticles. *Applied Surface Science*, 298, 225–235. <http://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.01.166>
- Mohan, S., Oluwafemi, O. S., Songca, S. P., Jayachandran, V. P., Rouxel, D., Joubert, O., ... Thomas, S. (2016). Synthesis , antibacterial , cytotoxicity and sensing properties of starch-capped silver nanoparticles. *Journal of Molecular Liquids*, 213, 75–81. <http://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.11.010>
- Moldovan, B., Achim, M., Clichici, S., & Filip, G. A. (2016). SC. <http://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.06.003>
- Moura, M. R. De, Mattoso, L. H. C., & Zucolotto, V. (2012). Development of cellulose-based bactericidal nanocomposites containing silver nanoparticles and their use as active food packaging, 109, 520–524. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.10.030>
- Muthuvel, A., Adavallan, K., Balamurugan, K., & Krishnakumar, N. (2014). Biosynthesis of gold nanoparticles using *Solanum nigrum* leaf extract and screening their free radical scavenging and antibacterial properties. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4(2), 325–332. <http://doi.org/10.1016/j.bionut.2014.03.004>
- Nafchi, A. M., Nassiri, R., Sheibani, S., Ariffin, F., & Karim, a. a. (2013). Preparation and characterization of bionanocomposite films filled with nanorod-rich zinc oxide. *Carbohydrate Polymers*, 96(1), 233–239. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.055>
- Nano, M. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas : controlando forma y tamaño, 5(1), 69–81.
- Navarro-cortez, R. O., Aguilar-palazuelos, E., Castro-rosas, J., Cortés, R. N. F., Ramírez, A. C., Delgado-licon, E., ... Gómez-aldapa, C. A. (2018).

Physicochemical and sensory characterization of an extruded product from blue maize meal and orange bagasse using the response surface methodology. *CyTA - Journal of Food*, 16(01), 498–505.
<http://doi.org/10.1080/19476337.2017.1416674>

Navarro-González, I., González-Barrio, R., García-Valverde, V., Bautista-Ortín, A., & Periago, M. (2014). Nutritional Composition and Antioxidant Capacity in Edible Flowers: Characterisation of Phenolic Compounds by HPLC-DAD-ESI/MSn. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 805–822.
<http://doi.org/10.3390/ijms16010805>

Neo, Y. P., Ray, S., Jin, J., Gizdavic-Nikolaidis, M., Nieuwoudt, M. K., Liu, D., & Quek, S. Y. (2013). Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique: A physicochemical study based on zein-gallic acid system. *Food Chemistry*, 136(2), 1013–1021.
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.010>

Neo, Y. P., Swift, S., Ray, S., Gizdavic-Nikolaidis, M., Jin, J., & Perera, C. O. (2013). Evaluation of gallic acid loaded zein sub-micron electrospun fibre mats as novel active packaging materials. *Food Chemistry*, 141(3), 3192–3200.
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.018>

Nezarati, R. M., Eifert, M. B., & Cosgriff-Hernandez, E. (2013). Effects of Humidity and Solution Viscosity on Electrospun Fiber Morphology. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 19(10), 810–819. <http://doi.org/10.1089/ten.tec.2012.0671>

Okutan, N., Terzi, P., & Altay, F. (2014). Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers. *Food Hydrocolloids*, 39, 19–26. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.12.022>

Oliveira, A. P. De, Módenes, A. N., Bragião, E., Hinterholz, C. L., Trigueros, D. E. G., & Bezerra, I. G. D. O. (2018). Academic Department of Chemical Engineering (DAENQ), Federal University of, (2017), #pagerange#. <http://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.05.001>

Oliveiro-Verbel, J., González-Cervera, T., Güette-Fernandez, J., Jaramillo-

- Colorado, B., & Stashenko, E. (2010). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(4), 568–574. <http://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000400016>
- Omran, B. A., Nassar, H. N., Fatthallah, N. A., Hamdy, A., El-Shatoury, E. H., & El-Gendy, N. S. (2017). Waste upcycling of *Citrus sinensis* peels as a green route for the synthesis of silver nanoparticles. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 00(00), 1–10. <http://doi.org/10.1080/15567036.2017.1410597>
- Othman, S. H. (2014). Bio-nanocomposite Materials for Food Packaging Applications: Types of Biopolymer and Nano-sized Filler. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 296–303. <http://doi.org/10.1016/j.aaspro.2014.11.042>
- Para, Q. U. E., & El, O. (2010). Instituto politécnico nacional.
- Park, J., & Seonho, S. C. (2016). Green synthesis of gold and silver nanoparticles using gallic acid : catalytic activity and conversion yield toward the 4-nitrophenol reduction reaction. <http://doi.org/10.1007/s11051-016-3466-2>
- Patel, K., Kapoor, S., Dave, D. P., & Mukherjee, T. (2005). Synthesis of nanosized silver colloids by microwave dielectric heating, 117(1), 53–60.
- Peixoto, C. M., Dias, M. I., Alves, M. J., Calhella, R. C., Barros, L., Pinho, S. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. *Food Chemistry*, 253(November 2017), 132–138. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.163>
- Pérez-Ortega, G., González-Trujano, M. E., Ángeles-López, G. E., Brindis, F., Vibrans, H., & Reyes-Chilpa, R. (2016). *Tagetes lucida* Cav.: Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of its tranquilizing properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 181, 221–228. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2016.01.040>
- Phongtongpasuk, S., Poadang, S., & Yongvanich, N. (2016). Environmental-friendly method for synthesis of silver nanoparticles from dragon fruit peel

- extract and their antibacterial activities. *Energy Procedia*, 89, 239–247.
<http://doi.org/10.1016/j.egypro.2016.05.031>
- Pillay, V., Dott, C., Choonara, Y. E., Tyagi, C., Tomar, L., Kumar, P., ... Ndesendo, V. M. K. (2013). A Review of the Effect of Processing Variables on the Fabrication of Electrospun Nanofibers for Drug Delivery Applications, 2013.
- Pourmortazavi, S. M., Taghdiri, M., Makari, V., & Rahimi-Nasrabadi, M. (2015). Procedure optimization for green synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of *Eucalyptus oleosa*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136, 1249–1254.
<http://doi.org/10.1016/j.saa.2014.10.010>
- Prabhu, S., & Poulouse, E. K. (2012). Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*, 2(1), 32. <http://doi.org/10.1186/2228-5326-2-32>
- Prakash, B., Kujur, A., Yadav, A., Kumar, A., Singh, P. P., & Dubey, N. K. (2018). Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. *Food Control*, 89, 1–11.
<http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.01.018>
- Prasad, T. N. V. K. V., & Elumalai, E. K. (2011). Biofabrication of Ag nanoparticles using *Moringa oleifera* leaf extract and their antimicrobial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(6), 439–442. [http://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60096-8](http://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60096-8)
- Press, D. (2010). NSA_8677_food-nanotechnology--an-overview.
- Prince, A., Sandhu, P., Kumar, P., Dash, E., Sharma, S., Arakha, M., ... Saleem, M. (2016). Lipid-II Independent Antimicrobial Mechanism of Nisin Depends on Its Crowding and Degree of Oligomerization. *Scientific Reports*, 6(August), 1–14. <http://doi.org/10.1038/srep37908>
- Puišo, J., Jonkuvienė, D., Mačionienė, I., Šalomskienė, J., Jasutienė, I., & Kondrotas, R. (2014). Biosynthesis of silver nanoparticles using lingonberry and cranberry juices and their antimicrobial activity. *Colloids and Surfaces B*:

- Biointerfaces*, 121, 214–221. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.05.001>
- Qing, W., Chen, K., Wang, Y., Liu, X., & Lu, M. (2017). Green synthesis of silver nanoparticles by waste tea extract and degradation of organic dye in the absence and presence of H₂O₂. *Applied Surface Science*, 423, 1019–1024. <http://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.07.007>
- Quiroga, P. R., Grosso, N. R., Lante, A., Lomolino, G., Zygadlo, J. A., & Nepote, V. (2013). Chemical composition, antioxidant activity and anti-lipase activity of *Origanum vulgare* and *Lippia turbinata* essential oils. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(3), 642–649. <http://doi.org/10.1111/ijfs.12011>
- Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27(1), 76–83. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.002>
- Ramadan, H., Min, B., Tiwari, A. K., Reddy, G., Adesiyun, A., Hinton, A., & Abdela, W. (2015). Antibacterial activity of Pomegranate, Orange and Lemon peel extracts against food-borne pathogens and spoilage bacteria In vitro and on poultry skin. *International Journal of Poultry Science*, 14(4), 229–239. <http://doi.org/10.3923/ijps.2015.229.239>
- Ramos, M., Beltrán, A., Peltzer, M., Valente, A. J. M., & Garrigós, C. (2014). LWT - Food Science and Technology Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films. *LWT - Food Science and Technology*, 58(2), 470–477. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.019>
- Ramos, M., Jiménez, A., Peltzer, M., & Garrigós, M. C. (2014). Development of novel nano-biocomposite antioxidant films based on poly (lactic acid) and thymol for active packaging. *Food Chemistry*, 162, 149–155. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.026>
- Rao, K. J., & Paria, S. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles from aqueous *Aegle marmelos* leaf extract. *Materials Research Bulletin*, 48(2), 628–634. <http://doi.org/10.1016/j.materresbull.2012.11.035>

- Rasheed, T., Bilal, M., Iqbal, H. M. N., & Li, C. (2017). Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Green biosynthesis of silver nanoparticles using leaves extract of *Artemisia vulgaris* and their potential biomedical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *158*, 408–415.
<http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.07.020>
- Rath, G., Hussain, T., Chauhan, G., Garg, T., & Goyal, A. K. (2016). Collagen nanofiber containing silver nanoparticles for improved wound-healing applications. *Journal of Drug Targeting*, *24*(6), 520–529.
<http://doi.org/10.3109/1061186X.2015.1095922>
- Re P O Rte E Sp E C I a L. (n.d.), 1–12.
- Realini, C. E., & Marcos, B. (2014). Active and intelligent packaging systems for a modern society. *MESC*, *98*(3), 404–419.
<http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.06.031>
- Reddy, N. J., Vali, D. N., Rani, M., & Rani, S. S. (2014). Evaluation of antioxidant , antibacterial and cytotoxic effects of green synthesized silver nanoparticles by *Piper longum* fruit. *Materials Science & Engineering C*, *34*, 115–122.
<http://doi.org/10.1016/j.msec.2013.08.039>
- Ren, S., Dong, L., Zhang, X., Lei, T., Ehrenhauser, F., Song, K., ... Wu, Q. (2017). Electrospun nanofibers made of silver nanoparticles, cellulose nanocrystals, and polyacrylonitrile as substrates for surface-enhanced raman scattering. *Materials*, *10*(1). <http://doi.org/10.3390/ma10010068>
- Restuccia, D., Spizzirri, U. G., Parisi, O. I., Cirillo, G., Curcio, M., Iemma, F., ... Picci, N. (2010). New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. *Food Control*, *21*(11), 1425–1435. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.04.028>
- Rhim, J. W., Wang, L. F., Lee, Y., & Hong, S. I. (2014). Preparation and characterization of bio-nanocomposite films of agar and silver nanoparticles: Laser ablation method. *Carbohydrate Polymers*, *103*(1), 456–465.
<http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.075>

- Rogina, A. (2014). Electrospinning process: Versatile preparation method for biodegradable and natural polymers and biocomposite systems applied in tissue engineering and drug delivery. *Applied Surface Science*, 296, 221–230. <http://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.01.098>
- Ruíz-baltazar, Á. D. J., Reyes-lópez, S. Y., Larrañaga, D., & Estévez, M. (2017). Results in Physics Green synthesis of silver nanoparticles using a *Melissa officinalis* leaf extract with antibacterial properties, 7, 2639–2643. <http://doi.org/10.1016/j.rinp.2017.07.044>
- S, M., Hegde, A. U., N S, S., & T R, P. K. (2014). Antimicrobial Activity of Citrus Sinensis and Citrus Aurantium Peel Extracts. *Journal of Pharmaceutical & Scientific Innovation*, 3(4), 366–368. <http://doi.org/10.7897/2277-4572.034174>
- Sadeghi, B., & Gholamhoseinpoor, F. (2015). Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy A study on the stability and green synthesis of silver nanoparticles using *Ziziphora tenuior* (Zt) extract at room temperature. *SPECTROCHIMICA ACTA PART A: MOLECULAR AND BIOMOLECULAR SPECTROSCOPY*, 134, 310–315. <http://doi.org/10.1016/j.saa.2014.06.046>
- Sadeghnejad, A., Aroujalian, A., Raisi, A., & Fazel, S. (2014). Antibacterial nano silver coating on the surface of polyethylene films using corona discharge. *Surface and Coatings Technology*, 245, 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2014.02.023>
- Salgueiro, L. R., Cavaleiro, C., Goncalves, M. J., & Proenca da Cunha, A. (2003). Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. *Planta Medica*, 69, 80–83. <http://doi.org/10.1055/s-2003-37032>
- Sanchez-Aldana, D., Noe Aguilar, C., Nevarez-Moorillon, G. V., & Contreras Esquivel, J. C. (2013). Comparative extraction of pectic and polyphenols from Mexican lime pomace and bagasse. *American Journal of Agricultural and Biological Science*, 8(4), 309–322.

<http://doi.org/10.3844/ajabssp.2013.309.322>

- Sanhueza, L., Melo, R., Montero, R., Maisey, K., Mendoza, L., & Wilkens, M. (2017). Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, *12*(2), 1–15. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0172273>
- Sankar, R., Karthik, A., Prabu, A., Karthik, S., Subramanian, K., & Ravikumar, V. (2013). Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Origanum vulgare mediated biosynthesis of silver nanoparticles for its antibacterial and anticancer activity, *108*, 80–84.
- Saxer, S., Schwenninger, S. M., & Lacroix, C. (2013). LWT - Food Science and Technology Characterization of the micro flora of industrial Mexican cheeses produced without added chemical preservatives. *LWT - Food Science and Technology*, *53*(1), 314–320. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.01.016>
- Shankar, S., Chorachoo, J., Jaiswal, L., & Piyawan, S. (2014). Effect of reducing agent concentrations and temperature on characteristics and antimicrobial activity of silver nanoparticles. *Materials Letters*, 8–11. <http://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.08.100>
- Shankar, S., Rhim, J. W., & Won, K. (2018). Preparation of poly(lactide)/lignin/silver nanoparticles composite films with UV light barrier and antibacterial properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, *107*, 1724–1731. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.038>
- Shankar, S., Tanomrod, N., Rawdkuen, S., & Rhim, J. W. (2016). Preparation of pectin/silver nanoparticles composite films with UV-light barrier and properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, *92*, 842–849. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.107>
- Sharma, A., & Cannoo, D. S. (2017). A comparative study of effects of extraction solvents/techniques on percentage yield, polyphenolic composition, and

- antioxidant potential of various extracts obtained from stems of *Nepeta leucophylla*: RP-HPLC-DAD assessment of its polyphenolic constituents. *Journal of Food Biochemistry*, 41(2), 1–12. <http://doi.org/10.1111/jfbc.12337>
- Shevkani, K., Singh, N., Rana, J. C., & Kaur, A. (2014). Relationship between physicochemical and functional properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates. *International Journal of Food Science and Technology*, 49(2), 541–550. <http://doi.org/10.1111/ijfs.12335>
- Sidhu, P. K., & Nehra, K. (2017). Bacteriocin-nanoconjugates as emerging compounds for enhancing antimicrobial activity of bacteriocins. *Journal of King Saud University - Science*. <http://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.12.007>
- Sifontes, Á. B., Melo, L., Maza, C., Mendes, J. J., Química, C. De, Venezolano, I., ... Box, P. O. (2010). *Quim. Nova*, 33(6), 1266–1269.
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The Bacterial Cell Envelope, 1–16.
- Silvestre, C., Duraccio, D., & Cimmino, S. (2011). Progress in Polymer Science Food packaging based on polymer nanomaterials. *Progress in Polymer Science*, 36(12), 1766–1782. <http://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.003>
- Singhvi, G., & Singh, M. (2011). Review : in-Vitro Drug Release Characterization Models. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*, 11(1), 77–84.
- Siriamornpun, S., Kaisoon, O., & Meeso, N. (2012). Changes in colour, antioxidant activities and carotenoids (lycopene, β -carotene, lutein) of marigold flower (*Tagetes erecta* L.) resulting from different drying processes. *Journal of Functional Foods*, 4(4), 757–766. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2012.05.002>
- Sohrabi, a., Shaibani, P. M., Etayash, H., Kaur, K., & Thundat, T. (2013). Sustained drug release and antibacterial activity of ampicillin incorporated poly(methyl methacrylate)-nylon6 core/shell nanofibers. *Polymer (United Kingdom)*, 54, 2699–2705. <http://doi.org/10.1016/j.polymer.2013.03.046>

- Song, J. Y., Kwon, E. Y., & Kim, B. S. (2010). Biological synthesis of platinum nanoparticles using Diopyros kaki leaf extract. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33(1), 159–164. <http://doi.org/10.1007/s00449-009-0373-2>
- Soto-Domínguez, A., García-Garza, R., Ramírez-Casas, Y., Morán-Martínez, J., & Serrano-Gallardo, L. B. (2012). El Extracto Acuoso de Orégano (*Lippia graveolens* HBK) del Norte de México Tiene Actividad Antioxidante sin Mostrar un Efecto Tóxico in vitro e in vivo. *International Journal of Morphology*, 30(3), 937–944. <http://doi.org/10.4067/S0717-95022012000300029>
- Soto, K. M., Hernández-Iturriaga, M., Loarca-Piña, G., Luna-Bercenas, G., Gómez-Aldapa, C. A., & Mendoza, S. (2016). Stable nisin food-grade electrospun fibers. *Journal of Food Science and Technology*, 53(10), 3787–3794. <http://doi.org/10.1007/s13197-016-2365-y>
- Stensberg, M. C., Wei, Q., Mclamore, E. S., & Marshall, D. (2012). NIH Public Access, 6(5), 879–898. <http://doi.org/10.2217/nm.11.78>. Toxicological
- Stunkard, A. J. (2009). NIH Public Access. *Psychiatry: Interpersonal and Biological Processes*, 162(3), 214–220. <http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.02.012>. Investigations
- Subbiah, T., Bhat, G. S., Tock, R. W., Parameswaran, S., & Ramkumar, S. S. (2005). Electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 96(2), 557–569. <http://doi.org/10.1002/app.21481>
- Sulaiman, G. M., Mohammed, W. H., Marzoog, T. R., Al-, A. A. A., Kadhum, A. A. H., & Mohamad, A. B. (2013). Green synthesis , antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles using Eucalyptus chapmaniana leaves extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(1), 58–63. [http://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60024-6](http://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60024-6)
- Sullivan, S. T., Tang, C., Kennedy, A., Talwar, S., & Khan, S. a. (2014). Electrospinning and heat treatment of whey protein nanofibers. *Food Hydrocolloids*, 35, 36–50. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.023>
- Sun, Z., Zhong, J., Liang, X., Liu, J., Chen, X., & Huan, L. (2009). Novel

- mechanism for nisin resistance via proteolytic degradation of nisin by the nisin resistance protein NSR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(5), 1964–1973. <http://doi.org/10.1128/AAC.01382-08>
- Sung, H.-J., Song, W.-J., Kim, K.-P., Ryu, S., & Kang, D.-H. (2014). Combination effect of ozone and heat treatments for the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* in apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, 171, 147–53. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.001>
- Swarnalatha, B., Nair, S. L., Shalumon, K. T., Milbauer, L. C., Jayakumar, R., Paul-Prasanth, B., ... Nair, S. V. (2013). Poly (lactic acid)-chitosan-collagen composite nanofibers as substrates for blood outgrowth endothelial cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 58, 220–224. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.03.060>
- Takeuchi, M. T., Kojima, M., & Luetzow, M. (2014). State of the art on the initiatives and activities relevant to risk assessment and risk management of nanotechnologies in the food and agriculture sectors. *Food Research International*. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.022>
- Thakkar, K. N., Mhatre, S. S., & Parikh, R. Y. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(2), 257–262. <http://doi.org/10.1016/j.nano.2009.07.002>
- Tournour, H. H., Segundo, M. A., Magalhães, L. M., Barreiros, L., Queiroz, J., & Cunha, L. M. (2015). Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties. *Industrial Crops and Products*, 74, 397–406. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.055>
- Vega-Lugo, A. C., & Lim, L. T. (2009). Controlled release of allyl isothiocyanate using soy protein and poly(lactic acid) electrospun fibers. *Food Research International*, 42(8), 933–940. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.05.005>
- Wang, S., Marcone, M. F., Barbut, S., & Lim, L. T. (2013). Electrospun soy protein isolate-based fiber fortified with anthocyanin-rich red raspberry (*Rubus*

- strigosus) extracts. *Food Research International*, 52(2), 467–472.
<http://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.036>
- Wang, X., Yue, T., & Lee, T. (2015). *Development of Pleurocidin-poly(vinyl alcohol) electrospun antimicrobial nanofibers to retain antimicrobial activity in food system application*. *Food Control* (Vol. 54). Elsevier Ltd.
<http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.001>
- Wongsasulak, S., Patapeejumruswong, M., Weiss, J., Supaphol, P., & Yoovidhya, T. (2010). Electrospinning of food-grade nanofibers from cellulose acetate and egg albumen blends. *Journal of Food Engineering*, 98(3), 370–376.
<http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.014>
- Xiao, D., Davidson, P. M., & Zhong, Q. (2011). Release and antilisterial properties of nisin from zein capsules spray-dried at different temperatures. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 1977–1985.
<http://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.07.017>
- Xiao, Q., Lu, K., Tong, Q., & Liu, C. (2015). Barrier Properties and Microstructure of Pullulan-Alginate-Based Films. *Journal of Food Process Engineering*, 38(2), 155–161. <http://doi.org/10.1111/jfpe.12151>
- Xie, J., & Hsieh, Y. Lo. (2003). Ultra-high surface fibrous membranes from electrospinning of natural proteins: Casein and lipase enzyme. *Journal of Materials Science*, 38(Mdi), 2125–2133.
<http://doi.org/10.1023/A:1023763727747>
- Xu, H., Wang, L., Su, H., Gu, L., Han, T., Meng, F., & Liu, C. (2014). Making Good Use of Food Wastes: Green Synthesis of Highly Stabilized Silver Nanoparticles from Grape Seed Extract and Their Antimicrobial Activity. *Food Biophysics*, 10(1), 12–18. <http://doi.org/10.1007/s11483-014-9343-6>
- Xu, Y., Burton, S., Kim, C., & Sismour, E. (2016). Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial properties of pomace extracts from four Virginia-grown grape varieties. *Food Science & Nutrition*, 4(1), 125–133.
<http://doi.org/10.1002/fsn3.264>

- Yao, F., & Weiyuan, J. K. (2010). Drug Release Kinetics and Transport Mechanisms of Non-degradable and Degradable Polymeric Delivery Systems. *Expert Opinion Drug Delivery*, 7(4), 429–444.
<http://doi.org/10.1517/17425241003602259>.Drug
- Zavala-Nigoa, J., Loarca-Piña G., Garcia-Gasca T. (2006). Evaluación del contenido fenólico, capacidad antioxidante y actividad citotóxica sobre células CACO-2 del extracto acuoso de orégano (*Lippia graveolens* KUNTH). Memoria del 2do congreso nacional de Química Médica.
- Yemenicio, A., Arslano, A., Seda, Z., Elmac, Â., Korel, F., & Emrah, A. (2006). Incorporation of partially purified hen egg white lysozyme into zein films for antimicrobial food packaging, 39, 12–21.
<http://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.05.007>
- Zheng, F., Wang, S., Wen, S., Shen, M., Zhu, M., & Shi, X. (2013). Characterization and antibacterial activity of amoxicillin-loaded electrospun nano-hydroxyapatite/poly(lactic-co-glycolic acid) composite nanofibers. *Biomaterials*, 34(4), 1402–1412.
<http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.10.071>
- Zhong, J., Mohan, S. D., Bell, A., Terry, A., Mitchell, G. R., & Davis, F. J. (2018). Electrospinning of food-grade nanofibres from whey protein. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 764–773.
<http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.113>

- Aasen IM, Markussen S, Møretrø T, et al (2003) Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *Int J Food Microbiol* 87:35–43. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00047-3
- Abdala LR (1999) Flavonoids of the aerial parts from *Tagetes lucida* (Asteraceae). *Biochem Syst Ecol* 27:753–754. doi: 10.1016/S0305-1978(99)00011-3
- Abdel-aziz MS, Shaheen MS, El-nekeety AA (2014) Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles biosynthesized using *Chenopodium murale* leaf extract. *J Saudi Chem Soc* 18:356–363. doi: 10.1016/j.jscs.2013.09.011
- Aceituno-Medina M, Lopez-Rubio A, Mendoza S, Lagaron JM (2013a) Development of novel ultrathin structures based in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolate through electrospinning. *Food Hydrocoll* 31:289–298. doi: 10.1016/j.foodhyd.2012.11.009
- Aceituno-Medina M, Mendoza S, Lagaron JM, López-Rubio A (2013b) Development and characterization of food-grade electrospun fibers from amaranth protein and pullulan blends. *Food Res Int* 54:667–674. doi: 10.1016/j.foodres.2013.07.055
- Aceituno-Medina M, Mendoza S, Rodríguez BA, et al (2015) Improved antioxidant capacity of quercetin and ferulic acid during in-vitro digestion through encapsulation within food-grade electrospun fibers. *J Funct Foods* 12:332–341. doi: 10.1016/j.jff.2014.11.028
- Agarwal S, Greiner A, Wendorff JH (2013) Functional materials by electrospinning of polymers. *Prog Polym Sci* 38:963–991. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2013.02.001
- Ahire JJ, Dicks LMT (2014) Nisin Incorporated With 2,3-Dihydroxybenzoic Acid in Nanofibers Inhibits Biofilm Formation by a Methicillin-Resistant Strain of *Staphylococcus aureus*. *Probiotics Antimicrob Proteins* 7:52–59. doi: 10.1007/s12602-014-9171-5

- Ahmed I, Lin H, Zou L, et al (2017) A comprehensive review on the application of active packaging technologies to muscle foods. *Food Control* 82:163–178. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.06.009
- Ahmed S, Ahmad M, Swami BL, Ikram S (2016) REVIEW A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications : A green expertise. *J Adv Res* 7:17–28. doi: 10.1016/j.jare.2015.02.007
- Akbar A, Anal AK (2014) Zinc oxide nanoparticles loaded active packaging, a challenge study against *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat poultry meat. *Food Control* 38:88–95. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.09.065
- Alonso C, Álvares I (2010) Nuevas tecnologías en la conservación y transformación de los alimentos.
- Annamalai a., Christina VLP, Sudha D, et al (2013) Green synthesis, characterization and antimicrobial activity of Au NPs using *Euphorbia hirta* L. leaf extract. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 108:60–65. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.02.012
- Arora A, Padua GW (2010) Review: Nanocomposites in food packaging. *J Food Sci* 75:43–49. doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01456.x
- Arruda Q De, Stefani R, Aniceto V, et al (2014) Food Hydrocolloids Active chitosan / PVA films with anthocyanins from *Brassica oleraceae* (Red Cabbage) as Time e Temperature Indicators for application in intelligent food packaging. 1–9. doi: 10.1016/j.foodhyd.2014.05.014
- Ashkarran AA, Bayat A (2013) Surface plasmon resonance of metal nanostructures as a complementary technique for microscopic size measurement. 2:1.
- ASTM. "Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials" ASTM E 96-80, 1987, pp. 629-636.

- Ávalos a., Haza A, Morales P (2013) Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. *Rev Complut Ciencias Vet* 7:1–23. doi: 10.5209/rev_RCCV.2013.v7.n2.43408
- Balciunas EM, Castillo Martinez FA, Todorov SD, et al (2013) Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control* 32:134–142. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.11.025
- Barbosa-Pereira L, Angulo I, Lagarón JM, et al (2014) Development of new active packaging films containing bioactive nanocomposites. *Innov Food Sci Emerg Technol* 26:310–318. doi: 10.1016/j.ifset.2014.06.002
- Basak S, Ramaswamy HS, Piette JPG (2002) High pressure destruction kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae* in single strength and concentrated orange juice. *Innov Food Sci Emerg Technol* 3:223–231. doi: 10.1016/S1466-8564(02)00008-5
- Basavegowda N, Idhayadhulla A, Lee YR (2014) Phyto-synthesis of gold nanoparticles using fruit extract of *Hovenia dulcis* and their biological activities. *Ind Crops Prod* 52:745–751. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.12.006
- Beres C, Costa GNS, Cabezudo I, et al (2017) Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Manag* 68:581–594. doi: 10.1016/j.wasman.2017.07.017
- Bhardwaj N, Kundu SC (2010) Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol Adv* 28:325–347. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.01.004
- Blanco-Padilla A, Soto KM, Hernández Iturriaga M, Mendoza S (2014) Food antimicrobials nanocarriers. *Sci World J*. doi: 10.1155/2014/837215
- Bleoanc I, Saje K, Mihalcea L, et al (2016) Contribution of high pressure and thyme extract to control *Listeria monocytogenes* in fresh cheese - A hurdle approach. 38:7–14. doi: 10.1016/j.ifset.2016.09.002
- Cai F, Li J, Sun J, Ji Y (2011) Biosynthesis of gold nanoparticles by biosorption using *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1. *Chem Eng J* 175:70–75. doi:

10.1016/j.cej.2011.09.041

Canadanovic-Brunet JM, Savatovic SS, Cetkovic GS, et al (2011) Antioxidant and Antimicrobial Activities of Beet Root Pomace Extracts. *Czech J Food Sci* 29:575–585.

Cárdenas A, Gómez M, Frontana C (2014) *Electrochimica Acta* Development of an Electrochemical Cupric Reducing Antioxidant Capacity Method (CUPRAC) for Antioxidant Analysis. *Electrochim Acta* 128:113–118. doi: 10.1016/j.electacta.2013.10.191

Castro G, Valbuena E, Bríñez W, et al (2009) Comparación Del Empleo De Nisina Y Cultivos. *Rev Cient FCV-LUZ XIX*:201–209.

Celebioglu A, Uyar T (2013) Electrospinning of nanofibers from non-polymeric systems: Electrospun nanofibers from native cyclodextrins. *J Colloid Interface Sci* 404:1–7. doi: 10.1016/j.jcis.2013.04.034

Chen H, Hoover DG (2003) Bacteriocins and their Food Applications. *Compr Rev Food Sci food Saf* 2:82–100. doi: 10.1111/j.1541-4337.2003.tb00016.x

Chen S, Li R, Li X, Xie J (2018) Electrospinning: An enabling nanotechnology platform for drug delivery and regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev*. doi: 10.1016/j.addr.2018.05.001

Cheviron P, Gouanvé F, Espuche E (2016) Preparation, characterization and barrier properties of silver/montmorillonite/starch nanocomposite films. *J Memb Sci* 497:162–171. doi: 10.1016/j.memsci.2015.09.039

Chikindas ML, Weeks R, Drider D, et al (2018) Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr Opin Biotechnol* 49:23–28. doi: 10.1016/j.copbio.2017.07.011

Cho D, Nnadi O, Netravali A, Joo YL (2010) Electrospun hybrid soy protein/PVA fibers. *Macromol Mater Eng* 295:763–773. doi: 10.1002/mame.201000161

Choi M-R, Liu Q, Lee S-Y, et al (2012) Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in apple juice with

- gaseous ozone. *Food Microbiol* 32:191–195. doi: 10.1016/j.fm.2012.03.002
- Choi SJ, Decker EA, Henson L, et al (2009) Stability of Citral in Oil-in-Water Emulsions Prepared with Medium-Chain Triacylglycerols and Triacetin. *J Agric Food Chem* 57:11349–11353. doi: 10.1021/jf902761h
- Condés MC, Añón MC, Mauri AN (2015) Amaranth protein films prepared with high-pressure treated proteins. *J Food Eng* 166:38–44. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2015.05.005
- Costa A, Lourenco A, Civera T, Brito L (2018) *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* strains from dairy plants behave similarly in biofilm sanitizer testing. *Lwt* 92:477–483. doi: 10.1016/j.lwt.2018.02.073
- Costa LMM, de Olyveira GM, Cherian BM, et al (2013) Bionanocomposites from electrospun PVA/pineapple nanofibers/*Stryphnodendron adstringens* bark extract for medical applications. *Ind Crops Prod* 41:198–202. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.04.025
- Cruz-guerrero AE, Garcı M, Jime J (2009) *LWT - Food Science and Technology* Use of an exopolysaccharide-producing strain of *Streptococcus thermophilus* in the manufacture of Mexican Panela cheese. 42:1508–1512. doi: 10.1016/j.lwt.2009.04.009
- Cruz-Romero MC, Murphy T, Morris M, et al (2013) Antimicrobial activity of chitosan, organic acids and nano-sized solubilisates for potential use in smart antimicrobially-active packaging for potential food applications. *Food Control* 34:393–397. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.04.042
- De Oliveira Mori CLS, Dos Passos NA, Oliveira JE, et al (2014) Electrospinning of zein/tannin bio-nanofibers. *Ind Crops Prod* 52:298–304. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.10.047
- Del E, Fenólico C, Janet Z, et al CITOTÓXICA SOBRE CÉLULAS CACO-2 DEL (*Lippia graveolens* KUNTH).
- Dror Y, Ziv T, Makarov V, et al (2008) Nanofibers made of globular proteins.

- Biomacromolecules 9:2749–2754. doi: 10.1021/bm8005243
- Dubey P, Bhushan B, Sachdev A, et al (2015) Silver-nanoparticle-Incorporated composite nanofibers for potential wound-dressing applications. *J Appl Polym Sci* 132:1–12. doi: 10.1002/app.42473
- Dudo A, Choi DH, Scheufele D a. (2011) Food nanotechnology in the news. Coverage patterns and thematic emphases during the last decade. *Appetite* 56:78–89. doi: 10.1016/j.appet.2010.11.143
- Dwivedi AD, Gopal K (2010) Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Chenopodium album* leaf extract. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 369:27–33. doi: 10.1016/j.colsurfa.2010.07.020
- Electrospinning T, Aplicaciones P (2007) Producción De Micro Y Nano Fibras a Partir De La Farmacológicas.
- Escobar M (2010) Extracción de compuestos fenólicos de las cáscaras de cítricos producidos en México. 1–101.
- Fabra MJ, López-Rubio A, Lagaron JM (2014) On the use of different hydrocolloids as electrospun adhesive interlayers to enhance the barrier properties of polyhydroxyalkanoates of interest in fully renewable food packaging concepts. *Food Hydrocoll* 39:77–84. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.12.023
- Fang Z, Zhao Y, Warner RD, Johnson SK (2017) Active and intelligent packaging in meat industry. *Trends Food Sci Technol* 61:60–71. doi: 10.1016/j.tifs.2017.01.002
- Fortunati E, Rinaldi S, Peltzer M, et al (2014) Nano-biocomposite films with modified cellulose nanocrystals and synthesized silver nanoparticles. *Carbohydr Polym* 101:1122–1133. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.10.055
- Fuentes FG, Mendoza S (2011) Electrochemical Screening of Biomarkers in Chemotype Mexican Oregano Oils on Single-Walled Carbon Nanotubes Screen-Printed Electrodes. 2212–2216. doi: 10.1002/elan.201100245
- Gabriel A a., Nakano H (2009) Inactivation of *Salmonella*, *E. coli* and *Listeria*

monocytogenes in phosphate-buffered saline and apple juice by ultraviolet and heat treatments. *Food Control* 20:443–446. doi: 10.1016/j.foodcont.2008.08.008

Gaur PK, Mishra S, Purohit S (2013) Solid Lipid Nanoparticles of Guggul Lipid as Drug Carrier for Transdermal Drug Delivery.

Geethalakshmi R, Sarada DVL (2013) Characterization and antimicrobial activity of gold and silver nanoparticles synthesized using saponin isolated from *Trianthema decandra* L. *Ind Crops Prod* 51:107–115. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.08.055

Geraci A, Di Stefano V, Di Martino E, et al (2017) Essential oil components of orange peels and antimicrobial activity. *Nat Prod Res* 31:653–659. doi: 10.1080/14786419.2016.1219860

González-Campos JB, Mota-Morales JD, Kumar S, et al (2013) New insights into the bactericidal activity of chitosan-Ag bionanocomposite: The role of the electrical conductivity. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 111:741–746. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.07.003

Gopinath K, Venkatesh KS, Ilangovan R, et al (2013) Green synthesis of gold nanoparticles from leaf extract of *Terminalia arjuna*, for the enhanced mitotic cell division and pollen germination activity. *Ind Crops Prod* 50:737–742. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.08.060

Gouma M, Álvarez I, Condón S, Gayán E (2015) Modelling microbial inactivation kinetics of combined UV-H treatments in apple juice. *Innov Food Sci Emerg Technol* 27:111–120. doi: 10.1016/j.ifset.2014.11.004

Groves K, Titoria P (2009) Nanotechnology and the food industry. *Food Sci Technol* 60:44–51. doi: 10.4455/eu.2013.011

Gruskiene R, Krivorotova T, Sereikaite J (2017) Nisin-loaded pectin and nisin-loaded pectin-inulin particles: Comparison of their proteolytic stability with free nisin. *LWT - Food Sci Technol* 82:283–286. doi: 10.1016/j.lwt.2017.04.061

- Guzman-hernandez R, Contreras-rodriguez A, Hernandez-velez R, Perez-martinez I (2016) International Journal of Food Microbiology Mexican unpasteurised fresh cheeses are contaminated with Salmonella spp ., non-O157 Shiga toxin producing Escherichia coli and potential uropathogenic E . coli strains : A public health risk. *Int J Food Microbiol* 237:10–16. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.018
- Guzmán MG, Dille J, Godet S (2008) Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. 312–319.
- Hamad AF, Han JH, Kim BC, Rather IA (2018) The intertwine of nanotechnology with the food industry. *Saudi J Biol Sci* 25:27–30. doi: 10.1016/j.sjbs.2017.09.004
- He X, Hwang HM (2016) Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment. *J Food Drug Anal* 24:671–681. doi: 10.1016/j.jfda.2016.06.001
- Herna P, Lo G, Gavara R (2013) ScienceDirect Characterization of ethylene-vinyl alcohol copolymer containing lauril arginate (LAE) as material for active antimicrobial food packaging. 1:10–18. doi: 10.1016/j.fpsl.2013.09.002
- Hernandez-sandoval L, Martínez-rocha A, Puga R, Mendoza S (2008) Antioxidant and Antimutagenic Activities of Mexican Oregano (*Lippia graveolens* Kunth) Antioxidant and Antimutagenic Activities of Mexican Oregano (*Lippia graveolens* Kunth). doi: 10.1007/s11130-007-0061-9
- Heunis T, Bshena O, Klumperman B, Dicks L (2011) Release of bacteriocins from nanofibers prepared with combinations of poly(D,L-lactide) (PDLLA) and poly(ethylene oxide) (PEO). *Int J Mol Sci* 12:2158–2173. doi: 10.3390/ijms12042158
- Heydari R, Rashidipour M (2015) Green synthesis of silver nanoparticles using extract of oak Fruit hull (Jaft): Synthesis and in vitro cytotoxic effect on MCF-7 cells. *Int J Breast Cancer*. doi: 10.1155/2015/846743
- Hosseini SM, Hosseini H, Mohammadifar MA, et al (2014) Preparation and

- characterization of alginate and alginate-resistant starch microparticles containing nisin. *Carbohydr Polym* 103:573–580. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.12.078
- Huang JY, Li X, Zhou W (2015) Safety assessment of nanocomposite for food packaging application. *Trends Food Sci Technol* 45:187–199. doi: 10.1016/j.tifs.2015.07.002
- Ibarguren C, Naranjo PM, Stötzel C, et al (2014) Adsorption of nisin on raw montmorillonite. *Appl Clay Sci* 90:88–95. doi: 10.1016/j.clay.2013.12.031
- Ibrahim HMM (2015) Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. *J Radiat Res Appl Sci* 8:265–275. doi: 10.1016/j.jrras.2015.01.007
- Illas F (2014) *Chem Soc Rev*. doi: 10.1039/c3cs60421g
- Imran M, Revol-Junelles AM, Paris C, et al (2015) Liposomal nanodelivery systems using soy and marine lecithin to encapsulate food biopreservative nisin. *LWT - Food Sci Technol* 62:341–349. doi: 10.1016/j.lwt.2014.12.046
- Imran M, Revol-Junelles AM, René N, et al (2012) Microstructure and physico-chemical evaluation of nano-emulsion-based antimicrobial peptides embedded in bioactive packaging films. *Food Hydrocoll* 29:407–419. doi: 10.1016/j.foodhyd.2012.04.010
- Jaiswal Y, Tatke P, Gabhe S, Vaidya a (2013) Rapid high performance thin layer chromatographic method for quantitation of catechin from extracts of cashew leaves-a short report. *Polish J Food Nutr Sci* 63:49–54. doi: 10.2478/v10222
- Jiang YN, Mo HY, Yu DG (2012) Electrospun drug-loaded core-sheath PVP/zein nanofibers for biphasic drug release. *Int J Pharm* 438:232–239. doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.08.053
- Joglekar S, Kodam K, Dhaygude M, Hudlikar M (2011) Novel route for rapid biosynthesis of lead nanoparticles using aqueous extract of *Jatropha curcas* L.

- latex. *Mater Lett* 65:3170–3172. doi: 10.1016/j.matlet.2011.06.075
- Kaderides K, Goula AM (2017) Development and characterization of a new encapsulating agent from orange juice by-products. *Food Res Int* 100:612–622. doi: 10.1016/j.foodres.2017.07.057
- Kayaci F, Uyar T (2012) Electrospun zein nanofibers incorporating cyclodextrins. *Carbohydr Polym* 90:558–568. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.05.078
- Khalil MMH, Ismail EH, El-Baghdady KZ, Mohamed D (2013) Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity. *Arab J Chem* 7:1131–1139. doi: 10.1016/j.arabjc.2013.04.007
- Khan I, Deog-Hwan O (2015) Integration of nisin into nanoparticles for application in foods. *Innov Food Sci Emerg Technol*. doi: 10.1016/j.ifset.2015.12.013
- Khan I, Oh D-H (2015) Integration of nisin into nanoparticles for application in foods. *Innov Food Sci Emerg Technol* 34:376–384. doi: 10.1016/j.ifset.2015.12.013
- Kljujev I, Raicevic V, Jovicic-Petrovic J, et al (2018) *Listeria monocytogenes* – Danger for health safety vegetable production. *Microb Pathog* 120:23–31. doi: 10.1016/j.micpath.2018.04.034
- Kong L, Ziegler GR (2013) Quantitative relationship between electrospinning parameters and starch fiber diameter. *Carbohydr Polym* 92:1416–1422. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.09.026
- Kuck LS, Noreña CPZ (2016) Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. *Food Chem* 194:569–576. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.08.066
- Kumar A, Chisti Y, Chand U (2013) Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnol Adv* 31:346–356. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.01.003
- Kumar M, Bansal K, Gondil VS, et al (2018) Synthesis, characterization, mechanistic studies and antimicrobial efficacy of biomolecule capped and pH

- modulated silver nanoparticles. *J Mol Liq* 249:1145–1150. doi: 10.1016/j.molliq.2017.11.143
- Kumar PPNV, Pammi SVN, Kollu P, et al (2014) Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Boerhaavia diffusa* plant extract and their anti bacterial activity. *Ind Crop Prod* 52:562–566. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.10.050
- Laridi R, Kheadr EE, Benech RO, et al (2003) Liposome encapsulated nisin Z: Optimization, stability and release during milk fermentation. *Int Dairy J* 13:325–336. doi: 10.1016/S0958-6946(02)00194-2
- Lavoine N, Givord C, Tabary N, et al (2014) Elaboration of a new antibacterial bio-nano-material for food-packaging by synergistic action of cyclodextrin and micro fi brillated cellulose. *Innov Food Sci Emerg Technol*. doi: 10.1016/j.ifset.2014.06.006
- Lee D (2016) Antibacterial Activity of Silver-Nanoparticles Against *Staphylococcus Aureus* and *Escherichia Coli* Antibacterial Activity of Silver-nanoparticles Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.
- Lee J-Y, Kim S-S, Kang D-H (2015) Effect of pH for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in orange juice by ohmic heating. *LWT - Food Sci Technol* 62:83–88. doi: 10.1016/j.lwt.2015.01.020
- Lee J, Son S, Hong S (2008) Characterization of protein-coated polypropylene films as a novel composite structure for active food packaging application. 86:484–493. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2007.10.025
- Li D, Liu Z, Yuan Y, et al (2015) Green synthesis of gallic acid-coated silver nanoparticles with high antimicrobial activity and low cytotoxicity to normal cells. 50:357–366.
- Li Z, Wang C (2013) One-Dimensional nanostructures. 15–29. doi: 10.1007/978-3-642-36427-3

- Llorens A, Lloret E, Picouet P a., et al (2012) Metallic-based micro and nanocomposites in food contact materials and active food packaging. *Trends Food Sci Technol* 24:19–29. doi: 10.1016/j.tifs.2011.10.001
- Lo T, Herna MM (2007) Response of Two *Salmonella enterica* Strains Inoculated in Model Cheese Treated with High Hydrostatic Pressure. 99–109. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(07)72612-7
- Londoño-Londoño J, Sierra J, Álvarez R, et al (2012) Aprovechamiento de los subproductos cítricos. *Cítricos Cultiv Poscosecha e Ind* 343–367.
- MacRi LK, Sheihet L, Singer AJ, et al (2012) Ultrafast and fast bioerodible electrospun fiber mats for topical delivery of a hydrophilic peptide. *J Control Release* 161:813–820. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.04.035
- Magalhães L, Nitschke M (2013) Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. *Food Control* 29:138–142. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.06.009
- Makarov V V., Love a. J, Sinitsyna O V., et al (2014) “Green” nanotechnologies: Synthesis of metal nanoparticles using plants. *Acta Naturae* 6:35–44.
- Malik P, Shankar R, Malik V, et al (2014) Green Chemistry Based Benign Routes for Nanoparticle Synthesis Nanoparticles : A Glance. *J Nanoparticles* 2014:14 pages. doi: 10.1155/2014/302429
- Manal AA, Awatif AH, Khalid MOO, et al (2014) Silver nanoparticles biogenic synthesized using an orange peel extract and their use as an anti-bacterial agent. *Int J Phys Sci* 9:34–40. doi: 10.5897/IJPS2013.4080
- Mariselvam R, Ranjitsingh a J a, Usha Raja Nanthini a, et al (2014) Green synthesis of silver nanoparticles from the extract of the inflorescence of *Cocos nucifera* (Family: *Arecaceae*) for enhanced antibacterial activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 129:537–41. doi: 10.1016/j.saa.2014.03.066
- Martins N, Barros L, Santos-Buelga C, et al (2014) Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: Different performances

- regarding bioactivity and phenolic compounds. *Food Chem* 158:73–80. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.02.099
- Mendez MAA (2009) Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata: efecto sobre *Colletotrichum gloesporioides*.
- Mihindukulasuriya SDF, Lim LT (2014) Nanotechnology development in food packaging: A review. *Trends Food Sci Technol* 40:149–167. doi: 10.1016/j.tifs.2014.09.009
- Mocanu A, Furtos G, Rapuntean S, et al (2014) Applied Surface Science Synthesis ; characterization and antimicrobial effects of composites based on multi-substituted hydroxyapatite and silver nanoparticles. *Appl Surf Sci* 298:225–235. doi: 10.1016/j.apsusc.2014.01.166
- Mohan S, Oluwafemi OS, Songca SP, et al (2016) Synthesis , antibacterial , cytotoxicity and sensing properties of starch-capped silver nanoparticles. *J Mol Liq* 213:75–81. doi: 10.1016/j.molliq.2015.11.010
- Moldovan B, Achim M, Clichici S, Filip GA (2016) SC. doi: 10.1016/j.molliq.2016.06.003
- Moura MR De, Mattoso LHC, Zucolotto V (2012) Development of cellulose-based bactericidal nanocomposites containing silver nanoparticles and their use as active food packaging. *J Food Eng* 109:520–524. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2011.10.030
- Muthuvel A, Adavallan K, Balamurugan K, Krishnakumar N (2014) Biosynthesis of gold nanoparticles using *Solanum nigrum* leaf extract and screening their free radical scavenging and antibacterial properties. *Biomed Prev Nutr* 4:325–332. doi: 10.1016/j.bionut.2014.03.004
- Nafchi AM, Nassiri R, Sheibani S, et al (2013) Preparation and characterization of bionanocomposite films filled with nanorod-rich zinc oxide. *Carbohydr Polym* 96:233–239. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.03.055
- Nano M (2012) Metodologías para la síntesis de nanopartículas : controlando forma y tamaño. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* 50:69–81.

- Navarro-cortez RO, Aguilar-palazuelos E, Castro-rosas J, et al (2018) Physicochemical and sensory characterization of an extruded product from blue maize meal and orange bagasse using the response surface methodology. *CyTA - J Food* 16:498–505. doi: 10.1080/19476337.2017.1416674
- Navarro-González I, González-Barrio R, García-Valverde V, et al (2014) Nutritional Composition and Antioxidant Capacity in Edible Flowers: Characterisation of Phenolic Compounds by HPLC-DAD-ESI/MSn. *Int J Mol Sci* 16:805–822. doi: 10.3390/ijms16010805
- Neo YP, Ray S, Jin J, et al (2013a) Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique: A physicochemical study based on zein-gallic acid system. *Food Chem* 136:1013–1021. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.09.010
- Neo YP, Swift S, Ray S, et al (2013b) Evaluation of gallic acid loaded zein sub-micron electrospun fibre mats as novel active packaging materials. *Food Chem* 141:3192–3200. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.06.018
- Nezarati RM, Eifert MB, Cosgriff-Hernandez E (2013) Effects of Humidity and Solution Viscosity on Electrospun Fiber Morphology. *Tissue Eng Part C Methods* 19:810–819. doi: 10.1089/ten.tec.2012.0671
- Okutan N, Terzi P, Altay F (2014) Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers. *Food Hydrocoll* 39:19–26. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.12.022
- Oliveira AP De, Módenes AN, Bragião E, et al (2018) Academic Department of Chemical Engineering (DAENQ), Federal University of. #pagerange#. doi: 10.1016/j.biteb.2018.05.001
- Oliveiro-Verbel J, González-Cervera T, Güette-Fernandez J, et al (2010) Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. *Rev Bras Farmacogn* 20:568–574. doi: 10.1590/S0102-695X2010000400016

- Omran BA, Nassar HN, Fathallah NA, et al (2017) Waste upcycling of *Citrus sinensis* peels as a green route for the synthesis of silver nanoparticles. *Energy Sources, Part A Recover Util Environ Eff* 00:1–10. doi: 10.1080/15567036.2017.1410597
- Othman SH (2014) Bio-nanocomposite Materials for Food Packaging Applications: Types of Biopolymer and Nano-sized Filler. *Agric Agric Sci Procedia* 2:296–303. doi: 10.1016/j.aaspro.2014.11.042
- Para QUE, El O (2010) Instituto politécnico nacional.
- Park J, Seonho SC (2016) Green synthesis of gold and silver nanoparticles using gallic acid : catalytic activity and conversion yield toward the 4-nitrophenol reduction reaction. doi: 10.1007/s11051-016-3466-2
- Patel K, Kapoor S, Dave DP, Mukherjee T (2005) Synthesis of nanosized silver colloids by microwave dielectric heating. 117:53–60.
- Peixoto CM, Dias MI, Alves MJ, et al (2018) Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. *Food Chem* 253:132–138. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.01.163
- Pérez-Ortega G, González-Trujano ME, Ángeles-López GE, et al (2016) *Tagetes lucida* Cav.: Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of its tranquilizing properties. *J Ethnopharmacol* 181:221–228. doi: 10.1016/j.jep.2016.01.040
- Phongtongpasuk S, Poadang S, Yongvanich N (2016) Environmental-friendly method for synthesis of silver nanoparticles from dragon fruit peel extract and their antibacterial activities. *Energy Procedia* 89:239–247. doi: 10.1016/j.egypro.2016.05.031
- Pillay V, Dott C, Choonara YE, et al (2013) A Review of the Effect of Processing Variables on the Fabrication of Electrospun Nanofibers for Drug Delivery Applications.
- Pourmortazavi SM, Taghdiri M, Makari V, Rahimi-Nasrabadi M (2015) Procedure

- optimization for green synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of *Eucalyptus oleosa*. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* 136:1249–1254. doi: 10.1016/j.saa.2014.10.010
- Prabhu S, Poulouse EK (2012) Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *Int Nano Lett* 2:32. doi: 10.1186/2228-5326-2-32
- Prakash B, Kujur A, Yadav A, et al (2018) Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. *Food Control* 89:1–11. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.01.018
- Prasad TNVK V, Elumalai EK (2011) Biofabrication of Ag nanoparticles using *Moringa oleifera* leaf extract and their antimicrobial activity. *Asian Pac J Trop Biomed* 1:439–442. doi: 10.1016/S2221-1691(11)60096-8
- Press D (2010) NSA_8677_food-nanotechnology--an-overview.
- Prince A, Sandhu P, Kumar P, et al (2016) Lipid-II Independent Antimicrobial Mechanism of Nisin Depends on Its Crowding and Degree of Oligomerization. *Sci Rep* 6:1–14. doi: 10.1038/srep37908
- Puišo J, Jonkuvienė D, Mačionienė I, et al (2014) Biosynthesis of silver nanoparticles using lingonberry and cranberry juices and their antimicrobial activity. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 121:214–221. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.05.001
- Qing W, Chen K, Wang Y, et al (2017) Green synthesis of silver nanoparticles by waste tea extract and degradation of organic dye in the absence and presence of H₂O₂. *Appl Surf Sci* 423:1019–1024. doi: 10.1016/j.apsusc.2017.07.007
- Quiroga PR, Grosso NR, Lante A, et al (2013) Chemical composition, antioxidant activity and anti-lipase activity of *Origanum vulgare* and *Lippia turbinata* essential oils. *Int J Food Sci Technol* 48:642–649. doi: 10.1111/ijfs.12011
- Rai M, Yadav A, Gade A (2009) Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv* 27:76–83. doi:

10.1016/j.biotechadv.2008.09.002

Ramadan H, Min B, Tiwari AK, et al (2015) Antibacterial activity of Pomegranate, Orange and Lemon peel extracts against food-borne pathogens and spoilage bacteria In vitro and on poultry skin. *Int J Poult Sci* 14:229–239. doi: 10.3923/ijps.2015.229.239

Ramos M, Beltrán A, Peltzer M, et al (2014a) *LWT - Food Science and Technology* Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films. *LWT - Food Sci Technol* 58:470–477. doi: 10.1016/j.lwt.2014.04.019

Ramos M, Jiménez A, Peltzer M, Garrigós MC (2014b) Development of novel nano-biocomposite antioxidant films based on poly (lactic acid) and thymol for active packaging. *Food Chem* 162:149–155. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.04.026

Rao KJ, Paria S (2013) Green synthesis of silver nanoparticles from aqueous *Aegle marmelos* leaf extract. *Mater Res Bull* 48:628–634. doi: 10.1016/j.materresbull.2012.11.035

Rasheed T, Bilal M, Iqbal HMN, Li C (2017) *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* Green biosynthesis of silver nanoparticles using leaves extract of *Artemisia vulgaris* and their potential biomedical applications. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 158:408–415. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.07.020

Rath G, Hussain T, Chauhan G, et al (2016) Collagen nanofiber containing silver nanoparticles for improved wound-healing applications. *J Drug Target* 24:520–529. doi: 10.3109/1061186X.2015.1095922

Realini CE, Marcos B (2014) Active and intelligent packaging systems for a modern society. *MESC* 98:404–419. doi: 10.1016/j.meatsci.2014.06.031

Reddy NJ, Vali DN, Rani M, Rani SS (2014) Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of green synthesized silver nanoparticles by *Piper longum* fruit. *Mater Sci Eng C* 34:115–122. doi: 10.1016/j.msec.2013.08.039

- Ren S, Dong L, Zhang X, et al (2017) Electrospun nanofibers made of silver nanoparticles, cellulose nanocrystals, and polyacrylonitrile as substrates for surface-enhanced raman scattering. *Materials (Basel)*. doi: 10.3390/ma10010068
- Restuccia D, Spizzirri UG, Parisi OI, et al (2010) New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. *Food Control* 21:1425–1435. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.04.028
- Rhim JW, Wang LF, Lee Y, Hong SI (2014) Preparation and characterization of bio-nanocomposite films of agar and silver nanoparticles: Laser ablation method. *Carbohydr Polym* 103:456–465. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.12.075
- Rogina A (2014) Electrospinning process: Versatile preparation method for biodegradable and natural polymers and biocomposite systems applied in tissue engineering and drug delivery. *Appl Surf Sci* 296:221–230. doi: 10.1016/j.apsusc.2014.01.098
- Ruíz-baltazar ÁDJ, Reyes-lópez SY, Larrañaga D, Estévez M (2017) Results in Physics Green synthesis of silver nanoparticles using a *Melissa officinalis* leaf extract with antibacterial properties. 7:2639–2643. doi: 10.1016/j.rinp.2017.07.044
- S M, Hegde AU, N S S, T R PK (2014) Antimicrobial Activity of Citrus Sinensis and Citrus Aurantium Peel Extracts. *J Pharm Sci Innov* 3:366–368. doi: 10.7897/2277-4572.034174
- Sadeghi B, Gholamhoseinpoor F (2015) *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy* A study on the stability and green synthesis of silver nanoparticles using *Ziziphora tenuior* (Zt) extract at room temperature. *Spectrochim ACTA PART A Mol Biomol Spectrosc* 134:310–315. doi: 10.1016/j.saa.2014.06.046
- Sadeghnejad A, Aroujalian A, Raisi A, Fazel S (2014) Antibacterial nano silver coating on the surface of polyethylene films using corona discharge. *Surf Coatings Technol* 245:1–8. doi: 10.1016/j.surfcoat.2014.02.023

- Salgueiro LR, Cavaleiro C, Goncalves MJ, Proenca da Cunha A (2003) Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. *Planta Med* 69:80–83. doi: 10.1055/s-2003-37032
- Sanchez-Aldana D, Noe Aguilar C, Nevarez-Moorillon GV, Contreras Esquivel JC (2013) Comparative extraction of pectic and polyphenols from Mexican lime pomace and bagasse. *Am J Agric Biol Sci* 8:309–322. doi: 10.3844/ajabssp.2013.309.322
- Sanhueza L, Melo R, Montero R, et al (2017) Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *PLoS One* 12:1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0172273
- Sankar R, Karthik A, Prabu A, et al (2013) *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* *Origanum vulgare* mediated biosynthesis of silver nanoparticles for its antibacterial and anticancer activity. 108:80–84.
- Saxer S, Schwenninger SM, Lacroix C (2013) *LWT - Food Science and Technology* Characterization of the micro flora of industrial Mexican cheeses produced without added chemical preservatives. *LWT - Food Sci Technol* 53:314–320. doi: 10.1016/j.lwt.2013.01.016
- Shankar S, Chorachoo J, Jaiswal L, Piyawan S (2014) Effect of reducing agent concentrations and temperature on characteristics and antimicrobial activity of silver nanoparticles. *Mater Lett* 8–11. doi: 10.1016/j.matlet.2014.08.100
- Shankar S, Rhim JW, Won K (2018) Preparation of poly(lactide)/lignin/silver nanoparticles composite films with UV light barrier and antibacterial properties. *Int J Biol Macromol* 107:1724–1731. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.038
- Shankar S, Tanomrod N, Rawdkuen S, Rhim JW (2016) Preparation of pectin/silver nanoparticles composite films with UV-light barrier and properties. *Int J Biol Macromol* 92:842–849. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.07.107
- Sharma A, Cannoo DS (2017) A comparative study of effects of extraction

solvents/techniques on percentage yield, polyphenolic composition, and antioxidant potential of various extracts obtained from stems of *Nepeta leucophylla*: RP-HPLC-DAD assessment of its polyphenolic constituents. *J Food Biochem* 41:1–12. doi: 10.1111/jfbc.12337

Shevkani K, Singh N, Rana JC, Kaur A (2014) Relationship between physicochemical and functional properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates. *Int J Food Sci Technol* 49:541–550. doi: 10.1111/ijfs.12335

Sidhu PK, Nehra K (2017) Bacteriocin-nanoconjugates as emerging compounds for enhancing antimicrobial activity of bacteriocins. *J King Saud Univ - Sci*. doi: 10.1016/j.jksus.2017.12.007

Sifontes ÁB, Melo L, Maza C, et al (2010) *Quim. Nova.*, 33:1266–1269.

Silhavy TJ, Kahne D, Walker S (2010) *The Bacterial Cell Envelope*. 1–16.

Silvestre C, Duraccio D, Cimmino S (2011) Progress in Polymer Science Food packaging based on polymer nanomaterials. *Prog Polym Sci* 36:1766–1782. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2011.02.003

Singhvi G, Singh M (2011) Review : in-Vitro Drug Release Characterization Models. *Int J Pharm Stud Res* II:77–84.

Siriamornpun S, Kaisoon O, Meeso N (2012) Changes in colour, antioxidant activities and carotenoids (lycopene, β -carotene, lutein) of marigold flower (*Tagetes erecta* L.) resulting from different drying processes. *J Funct Foods* 4:757–766. doi: 10.1016/j.jff.2012.05.002

Sohrabi a., Shaibani PM, Etayash H, et al (2013) Sustained drug release and antibacterial activity of ampicillin incorporated poly(methyl methacrylate)-nylon6 core/shell nanofibers. *Polym (United Kingdom)* 54:2699–2705. doi: 10.1016/j.polymer.2013.03.046

Song JY, Kwon EY, Kim BS (2010) Biological synthesis of platinum nanoparticles using *Diopyros kaki* leaf extract. *Bioprocess Biosyst Eng* 33:159–164. doi:

10.1007/s00449-009-0373-2

Soto-Domínguez A, García-Garza R, Ramírez-Casas Y, et al (2012) El Extracto Acuoso de Orégano (*Lippia graveolens* HBK) del Norte de México Tiene Actividad Antioxidante sin Mostrar un Efecto Tóxico in vitro e in vivo. *Int J Morphol* 30:937–944. doi: 10.4067/S0717-95022012000300029

Soto KM, Hernández-Iturriaga M, Loarca-Piña G, et al (2016) Stable nisin food-grade electrospun fibers. *J Food Sci Technol* 53:3787–3794. doi: 10.1007/s13197-016-2365-y

Stensberg MC, Wei Q, Mclamore ES, Marshall D (2012) NIH Public Access. 6:879–898. doi: 10.2217/nnm.11.78.Toxicological

Stunkard AJ (2009) NIH Public Access. *Psychiatry Interpers Biol Process* 162:214–220. doi: 10.1016/j.pestbp.2011.02.012.Investigations

Subbiah T, Bhat GS, Tock RW, et al (2005) Electrospinning of nanofibers. *J Appl Polym Sci* 96:557–569. doi: 10.1002/app.21481

Sulaiman GM, Mohammed WH, Marzoog TR, et al (2013) Green synthesis , antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles using *Eucalyptus chapmaniana* leaves extract. *Asian Pac J Trop Biomed* 3:58–63. doi: 10.1016/S2221-1691(13)60024-6

Sullivan ST, Tang C, Kennedy A, et al (2014) Electrospinning and heat treatment of whey protein nanofibers. *Food Hydrocoll* 35:36–50. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.07.023

Sun Z, Zhong J, Liang X, et al (2009) Novel mechanism for nisin resistance via proteolytic degradation of nisin by the nisin resistance protein NSR. *Antimicrob Agents Chemother* 53:1964–1973. doi: 10.1128/AAC.01382-08

Sung H-J, Song W-J, Kim K-P, et al (2014) Combination effect of ozone and heat treatments for the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* in apple juice. *Int J Food Microbiol* 171:147–53. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.001

- Swarnalatha B, Nair SL, Shalumon KT, et al (2013) Poly (lactic acid)-chitosan-collagen composite nanofibers as substrates for blood outgrowth endothelial cells. *Int J Biol Macromol* 58:220–224. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.03.060
- Takeuchi MT, Kojima M, Luetzow M (2014) State of the art on the initiatives and activities relevant to risk assessment and risk management of nanotechnologies in the food and agriculture sectors. *Food Res Int*. doi: 10.1016/j.foodres.2014.03.022
- Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY (2010) Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* 6:257–262. doi: 10.1016/j.nano.2009.07.002
- Tournour HH, Segundo MA, Magalhães LM, et al (2015) Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties. *Ind Crops Prod* 74:397–406. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.05.055
- Vega-Lugo AC, Lim LT (2009) Controlled release of allyl isothiocyanate using soy protein and poly(lactic acid) electrospun fibers. *Food Res Int* 42:933–940. doi: 10.1016/j.foodres.2009.05.005
- Wang S, Marcone MF, Barbut S, Lim LT (2013) Electrospun soy protein isolate-based fiber fortified with anthocyanin-rich red raspberry (*Rubus strigosus*) extracts. *Food Res Int* 52:467–472. doi: 10.1016/j.foodres.2012.12.036
- Wang X, Yue T, Lee T (2015) Development of Pleurocidin-poly(vinyl alcohol) electrospun antimicrobial nanofibers to retain antimicrobial activity in food system application. Elsevier Ltd
- Wongsasulak S, Patapeejumruswong M, Weiss J, et al (2010) Electrospinning of food-grade nanofibers from cellulose acetate and egg albumen blends. *J Food Eng* 98:370–376. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2010.01.014
- Xiao D, Davidson PM, Zhong Q (2011) Release and antilisterial properties of nisin from zein capsules spray-dried at different temperatures. *LWT - Food Sci Technol* 44:1977–1985. doi: 10.1016/j.lwt.2011.07.017

- Xiao Q, Lu K, Tong Q, Liu C (2015) Barrier Properties and Microstructure of Pullulan-Alginate-Based Films. *J Food Process Eng* 38:155–161. doi: 10.1111/jfpe.12151
- Xie J, Hsieh Y Lo (2003) Ultra-high surface fibrous membranes from electrospinning of natural proteins: Casein and lipase enzyme. *J Mater Sci* 38:2125–2133. doi: 10.1023/A:1023763727747
- Xu H, Wang L, Su H, et al (2014) Making Good Use of Food Wastes: Green Synthesis of Highly Stabilized Silver Nanoparticles from Grape Seed Extract and Their Antimicrobial Activity. *Food Biophys* 10:12–18. doi: 10.1007/s11483-014-9343-6
- Xu Y, Burton S, Kim C, Sismour E (2016) Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial properties of pomace extracts from four Virginia-grown grape varieties. *Food Sci Nutr* 4:125–133. doi: 10.1002/fsn3.264
- Yao F, Weiyuan JK (2010) Drug Release Kinetics and Transport Mechanisms of Non- degradable and Degradable Polymeric Delivery Systems. *Expert Opin Drug Deliv* 7:429–444. doi: 10.1517/17425241003602259
- Yemenicio A, Arslano A, Seda Z, et al (2006) Incorporation of partially purified hen egg white lysozyme into zein films for antimicrobial food packaging. *J Food Res* 39:12–21. doi: 10.1016/j.foodres.2005.05.007
- Zheng F, Wang S, Wen S, et al (2013) Characterization and antibacterial activity of amoxicillin-loaded electrospun nano-hydroxyapatite/poly(lactic-co-glycolic acid) composite nanofibers. *Biomaterials* 34:1402–1412. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.071
- Zhong J, Mohan SD, Bell A, et al (2018) Electrospinning of food-grade nanofibres from whey protein. *Int J Biol Macromol* 113:764–773. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.02.113

Abreviaturas

APA: Aislado proteico de amaranto

PUL: Pululano

Cp: centipoises

nm: nanometros

PVA: permeabilidad al vapor de agua

cm: centimietros

kV: Kilo Volts

ms: mili siemens

DO: densidad óptica