



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

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

**“DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA NANOEMULSIÓN ANTIMICROBIANA A
BASE DE ALMIDÓN Y CERA DE ABEJA PARA SU USO COMO RECUBRIMIENTO
COMESTIBLE”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA:

M. en C. TERESITA ARREDONDO OCHOA

DIRIGIDA POR:

DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

CODIRIGIDA POR:

DRA. OLGA MARTÍN BELLOSO

Santiago de Querétaro, Qro

Enero de 2018



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

"DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA NANOEMULSIÓN ANTIMICROBIANA A BASE DE ALMIDÓN Y CERA DE ABEJA PARA SU USO COMO RECUBRIMIENTO COMESTIBLE"

PROTOCOLO DE TESIS:

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias de los Alimentos

Presenta:

M. en C. Teresita Arredondo Ochoa

Dirigido por:

Dr. Carlos Regalado González

Codirigido por:

Dra. Olga Martín Beloso

SINODALES

Dr. Carlos Regalado González
Director

Dra. Olga Martín Beloso
Codirector

Dra. Blanca E. García Almendárez
Asesor

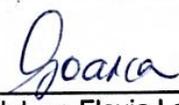
Dra. Dulce M. Rivera Pastrana
Asesor

Dr. Gustavo F. Gutiérrez López
Asesor


M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad







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

RESUMEN

Los hábitos de los consumidores han ido cambiando hacia un mayor deseo de adquirir productos frescos con excelentes atributos de calidad. En este sentido, el desarrollo y caracterización de recubrimientos comestibles constituye una estrategia potencial en el área de la conservación y protección de productos en fresco, debido a que ofrecen propiedades únicas de empaqueo por su selectiva funcionalidad, además de ser seguros para su consumo y ser elaborados a base de polímeros biodegradables. Los recubrimientos comestibles a base de almidón presentan una barrera selectiva al oxígeno, además de ser transparentes y flexibles. Sin embargo, la principal limitante es su deficiente barrera a la humedad debido a su naturaleza hidrofílica. En consecuencia, se ha propuesto la incorporación de agentes hidrofóbicos como son las ceras, mejorando las propiedades de barrera a la humedad una vez que sean aplicadas sobre la superficie de un producto en fresco. Por otro lado, la nueva generación de recubrimientos comestibles antimicrobianos está diseñada para permitir la incorporación y liberación de diversos compuestos de origen natural que fueron estudiados con el fin de controlar el crecimiento superficial de microorganismos en un alimento. El objetivo del presente trabajo fue diseñar y caracterizar una nanoemulsión antimicrobiana a base de almidón oxidado (OS) y cera de abeja (CA) y su posible aplicación como recubrimiento comestible. Se determinó el efecto aditivo de la combinación de dos antimicrobianos naturales, el arginato láurico (LAE) y la natamicina (NAT), en la inhibición de tres hongos deterioradores *Rhizopus stolonifer*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea* y la bacteria *Salmonella* Saintpaul, lográndose reducir hasta en un 50% la concentración encontrada para cada antimicrobiano de manera individual. Por otro lado, las nanoemulsiones a base de OS, CA y antimicrobianos empleando Tween 80 como emulsionante bajo un proceso de microfluidización, mostraron las mejores características fisicoquímicas, reológicas, y de mojabilidad, sin afectar el efecto antimicrobiano, mostrando una interacción significativa entre el tipo de emulsionante y el proceso de emulsificación y un uso potencial como recubrimiento comestible sobre productos frescos.

(Palabras clave: almidón oxidado, cera de abeja, antimicrobianos naturales, nanoemulsión).

SUMMARY

The consumer's habits have been changing to select natural fresh products with excellent quality attributes. In this sense, the development and characterization of edible coatings is a potential strategy in the area of preservation and safety of fresh products. They offer unique packaging properties due to their selective functionality, as well as being able to be ingested by the consumer and elaborated based on biodegradable polymers. The starch based edible coatings have a selective barrier to O₂, in addition to being transparent and flexible. However, the main limitation is its poor barrier to moisture due to its hydrophilic nature. Consequently, the incorporation of hydrophobic agents such as waxes has been proposed, improving the moisture barrier properties once they are applied on the surface of a fresh product. On the other hand, the new generation of antimicrobial edible coatings is designed to allow the incorporation and release of various compounds studied to control the surface growth of microorganisms in a food. The aim of this work was to design and characterize an antimicrobial nanoemulsion based on oxidized starch (OS) and beeswax (BW) and its possible application as an edible coating. The additive effect of the combination of two natural antimicrobials, lauric arginate (LAE) and natamycin (NAT), was determined in the inhibition of three deteriorating fungi *Rhizopus stolonifer*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea* and the bacterium *Salmonella* Saintpaul, reducing up to 50% the concentration found for each antimicrobial individually. From our results, nanoemulsions based on OS, BW and antimicrobials using Tween 80 as emulsifier under a microfluidization process, showed the best physicochemical, rheological and wettability characteristics, without affecting the antimicrobial effect, showing a significant interaction between the type of emulsifier and the emulsification process and a potential use as an edible coating on fresh products.

(Keywords: oxidized starch, beeswax, natural antimicrobials, nanoemulsions)

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca de doctorado con número de registro 247752, otorgada durante el periodo 2013-2017.

Al **Programa de Posgrados en Alimentos del Centro de la República (PROPAC)** por abrirme las puertas y darme la oportunidad de continuar con mi formación profesional.

Al **Dr. Carlos Regalado González** y a la **Dra. Blanca García**, por todos los conocimientos que nunca pararon de trasmitirme, por su apoyo incondicional, por su confianza, pero sobre todo por darme la oportunidad durante 8 años de formar parte de una gran familia llamada *Laboratorio de Biotecnología de Alimentos*.

Al la **Dra. Olga Martín Belloso**, por demostrarme que cuando se quiere se puede, que cuando quieres lograr algo es ahora o nunca, que la distancia no es un impedimento, que la perseverancia es mi mejor aliada, y que detrás de una honorable científica, existe una gran mujer y amiga.

A la **Dra. Dulce Rivera**, **Dr. Gustavo F. Gutiérrez**, al **Dr. Edmundo Mercado**, al **Dr. Juan de Dios Figueroa**, al **Dr. Luis Medina**, al **Dr. José de Jesús Pérez Bueno** y a la **M. en C. Luz María Avilés**, por la experiencia convertida en conocimientos que me brindaron para poder cumplir parte de los objetivos de mi proyecto.

A todas aquellas personas que por mi camino se cruzaron, que con o sin título alguno, me brindaron su apoyo desinteresadamente en el proceso de mi formación académica que hoy culmino con gran satisfacción.

DEDICATORIAS

- ❖ A **Rafita**, por darme la oportunidad de obtener el título de la mejor de las profesiones y enseñarme que el amor perfecto si existe.
- ❖ A mis **papás, Rafael y Tere**, porque nada es más contagioso que el ejemplo, el apoyo y el amor de una manera incondicional.
- ❖ A mi **hermana y mejor amiga Ale**, por comprobarme día con día que lo que nos une es más que una hermandad...es complicidad y por darme dos hermosos regalos, **Fer y Pau**, que me roban millones de sonrisas.
- ❖ A mi **familia Arredondo y Ochoa**, por ser ese el gran lazo de apoyo y cariño que siempre me ha sostenido.
- ❖ A mi **familia adoptiva Olivares-Moreno**, por dejarme formar parte de una gran familia...gracias por tanto cariño.
- ❖ A mi **mejor amigo Rodrigo**, mi mejor compañero de mi día con día durante 8 años, gracias por las risas, las tristezas, los logros, los fracasos, por tantas aventuras...gracias por tanto amigoooooooo.
- ❖ A cada uno los **amigos** que formaron parte de “**Biotec**”, por convertir mi lugar de trabajo en un segundo hogar y su compañía en mi segunda gran familia.
- ❖ A mis **amigos Linces**, por esa gran amistad que perdura a través de los años.
- ❖ A mis **amigas Salmantinas**, hermanas de vida.
- ❖ A cada uno de ustedes, **mis amigos de Lleida**, por hacerme sentir en casa cuando creía que la había deja a kilómetros y kilómetros de distancia...los llevo en el corazón esperando algún día la vida nos permita coincidir de nuevo...
- ❖ A **Gustavo**, mi mejor amigo mexicanito en Lleida...haberte conocido fue de las mejores coincidencias de mi vida...
- ❖ **A ti Rafa**, por ser ese gran compañero en este sueño de querer ser científicos, pero sobre todo por lograr junto conmigo el más hermoso y perfecto experimento de vida...

INDICE GENERAL

| | |
|--|------------|
| RESUMEN | i |
| SUMMARY | ii |
| AGRADECIMIENTOS | iii |
| DEDICATORIAS | iv |
| INDICE GENERAL | v |
| ÍNDICE DE CUADROS | ix |
| ÍNDICE DE FIGURAS | x |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1 Recubrimientos comestibles en productos frescos | 3 |
| 2.2 Propiedades funcionales de los recubrimientos comestibles | 5 |
| 2.3 Materiales utilizados en la formación de recubrimientos comestibles | 7 |
| 2.3.1 Proteínas | 8 |
| 2.3.2 Lípidos | 8 |
| 2.3.3 Polisacáridos | 9 |
| 2.3.3.1 Almidón | 10 |
| 2.3.4 Aditivos y otros componentes | 12 |
| 2.3.4.1 Plastificantes | 12 |
| 2.3.4.2 Antimicrobianos | 12 |
| 2.3.4.2.1 Arginato láurico (LAE) | 14 |
| 2.3.4.2.2 Natamicina (NAT) | 14 |
| 2.3.4.3 Agentes hidrofóbicos | 15 |
| 2.4 Uso de la nanotecnología en recubrimientos comestibles | 16 |
| 2.4.1 Nanoemulsiones | 16 |
| 2.4.2 Emulsionantes | 17 |
| 2.4.2.1 Emulsionantes aniónicos | 19 |
| 2.4.2.1 Emulsionantes catiónicos | 19 |
| 2.4.2.3 Emulsionantes anfotéricos | 20 |
| 2.4.2.4 Emulsionantes no iónicos | 20 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.4.3 | Métodos de emulsificación | 20 |
| 2.4.4 | Estabilidad de las nanoemulsiones | 22 |
| 2.4.5 | Tamaño de partícula e índice de polidispersión | 23 |
| 2.4.6 | Potencial zeta | 23 |
| 2.4.7 | Mojabilidad | 25 |
| 2.5 | Tomate Rojo | 26 |
| 3. | JUSTIFICACIÓN | 29 |
| 4. | HIPÓTESIS | 30 |
| 5. | OBJETIVOS | 31 |
| 5.1 | General | 31 |
| 5.2 | Específicos | 31 |
| 6. | MATERIALES Y MÉTODOS | 32 |
| 6.1 | Materiales | 32 |
| 6.1.1 | Material Biológico | 32 |
| 6.1.2 | Medios de Cultivo | 32 |
| 6.1.3 | Reactivos | 32 |
| 6.2 | Métodos | 32 |
| 6.2.1 | Determinación de la CML de los antimicrobianos naturales contra <i>R. stolonifer</i> , <i>C. gloeosporioides</i> y <i>B. cinerea</i> | 32 |
| 6.2.2 | Determinación de la CML del LAE contra <i>Salmonella</i> Saintpaul | 33 |
| 6.2.2.1 | Viabilidad celular | 33 |
| 6.2.3 | Determinación del efecto combinado de los antimicrobianos contra <i>R. stolonifer</i> , <i>C. gloesporioides</i> y <i>B. cinerea</i> | 34 |
| 6.2.4 | Evaluación del efecto de la combinación de antimicrobianos incorporados en una matriz formadora de recubrimientos comestibles | 35 |
| 6.2.5 | Análisis térmico de la cera de abeja | 36 |
| 6.2.6 | Formulación de la nanoemulsión a base de almidón, cera de abeja y antimicrobianos naturales | 36 |
| 6.2.7 | Caracterización fisicoquímica de las nanoemulsiones | 38 |
| 6.2.7.1 | Tamaño de partícula e índice de polidispersión (IPD) | 38 |
| 6.2.7.2 | Potencial zeta | 39 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 6.2.7.3 | pH | 39 |
| 6.2.7.4 | Color | 39 |
| 6.2.8 | Microscopía electrónica de transmisión (TEM) | 39 |
| 6.2.9 | Comportamiento reológico de las nanoemulsiones | 40 |
| 6.2.10 | Análisis de la mojabilidad de las nanoemulsiones | 40 |
| 6.2.10.1 | Determinación de la tensión superficial sólido-vapor (γ_{SV}) | 41 |
| 6.2.10.2 | Determinación de la tensión superficial líquido-vapor (γ_{LV}) | 42 |
| 6.2.10.3 | Determinación de la tensión superficial sólido-líquido (γ_{SL}) | 42 |
| 6.2.11 | Actividad antimicrobiana de las nanoemulsiones | 42 |
| 6.3 | Análisis estadístico | 43 |
| 7. | RESULTADOS | 44 |
| 7.1 | CML de los antimicrobianos naturales contra <i>R. stolonifer</i> , <i>C. gloesporioides</i> , y <i>B. cinerea</i> | 44 |
| 7.2 | CML del LAE contra <i>Salmonella</i> Saintpaul | 47 |
| 7.2.1 | Viabilidad celular | 49 |
| 7.3 | CML de la mezcla de antimicrobianos contra <i>R. stolonifer</i> , <i>C. gloesporioides</i> y <i>B. cinerea</i> | 51 |
| 7.4 | Evaluación del efecto antimicrobiano en una matriz filmogénica | 53 |
| 7.5 | Propiedades térmicas de la cera de abeja | 54 |
| 7.6 | Caracterización fisicoquímicas de las nanoemulsiones | 56 |
| 7.6.1 | Tamaño de partícula e IPD | 56 |
| 7.6.2 | Potencial zeta | 60 |
| 7.6.3 | pH | 62 |
| 7.6.4 | Color | 62 |
| 7.7 | TEM de las nanoemulsiones | 64 |
| 7.8 | Caracterización reológica de las nanoemulsiones | 64 |
| 7.8.1 | Propiedades viscoelásticas de las nanoemulsiones | 67 |
| 7.9 | Mojabilidad | 68 |
| 7.9.1 | Tensiones superficiales (γ_{SV} , γ_{LV} , γ_{SL}) | 68 |
| 7.9.2 | Coeficiente de mojabilidad | 70 |
| 7.10 | Efecto antimicrobiano | 71 |

| | | |
|-----------|---------------------|-----------|
| 8. | CONCLUSIONES | 73 |
| 9. | BIBLIOGRAFÍA | 75 |

ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro | | Página |
|---------------|--|---------------|
| 1. | Atributos de calidad de productos frescos | 4 |
| 2. | Propiedades funcionales de los recubrimientos comestibles | 6 |
| 3. | Materiales utilizados en la formación de recubrimientos comestibles | 7 |
| 4. | Clasificación de los emulsionantes de acuerdo a su HLB | 19 |
| 5. | Métodos para la formación de nanoemulsiones | 21 |
| 6. | Estabilidad de las nanoemulsiones dependiendo del potencial z | 25 |
| 7. | Combinación de antimicrobianos incorporados en la suspensión filmogénica. | 36 |
| 8. | Diseño 3 ² para la obtención de la nanoemulsión antimicrobiana a base de almidón y cera de abeja | 38 |
| 9. | Tamaño de partícula e índice de polidispersión (IPD) de las nanoemulsiones | 60 |
| 10. | Ángulo de contacto (θ) y tensiones superficiales de las nanoemulsiones | 70 |
| 11. | Fuerzas adhesivas (W_a), fuerzas cohesivas(W_c) y coeficiente de mojabilidad (W_s) de las nanoemulsiones | 71 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|---------------|--|---------------|
| 1. | Propiedades funcionales de un recubrimiento comestible aplicado en productos frescos | 6 |
| 2. | Representación esquemática de la estructura de una micela | 18 |
| 3. | Mecanismos fisicoquímicos que causan inestabilidad en una nanoemulsión | 22 |
| 4. | Representación de la doble capa eléctrica y el potencial zeta | 24 |
| 5. | Diagrama de la acción de las fuerzas superficiales sobre el ángulo de contacto | 26 |
| 6. | CMF del LAE contra <i>R. stolonifer</i> , <i>C. gloesporioides</i> y <i>B. cinerea</i> | 44 |
| 7. | Monitoreo del crecimiento al quinto día de incubación en presencia del LAE | 45 |
| 8. | CMF de NAT contra <i>R. stolonifer</i> , <i>C. gloesporioides</i> y <i>B. cinerea</i> | 46 |
| 9. | Monitoreo del crecimiento al quinto día de incubación en presencia de NAT | 46 |
| 10. | CMI del LAE contra <i>S. Saintpaul</i> | 47 |
| 11. | Efecto de la concentración del LAE sobre la turbidez en el medio de cultivo | 48 |
| 12. | CMB del LAE contra <i>S. Saintpaul</i> | 49 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 13. | Conteo celular de <i>S. Saintpaul</i> | 50 |
| 14. | Viabilidad celular de <i>S. Saintpaul</i> a) Células control; b) Células tratadas con LAE | 50 |
| 15. | Isoblograma de la mezcla de LAE y NAT | 52 |
| 16. | Efecto antimicrobiano de las películas comestibles a base de ACLS contra a) <i>R. stolonifer</i> ; b) <i>C. gloeosporioides</i> ; c) <i>B. cinerea</i> ; d) <i>S. Saintpaul</i> | 53 |
| 17. | Efecto antimicrobiano de las películas comestibles a base de OS contra a) <i>R. stolonifer</i> ; b) <i>C. gloeosporioides</i> ; c) <i>B. cinerea</i> ; d) <i>S. Saintpaul</i> | 54 |
| 18. | Termograma representativo de la CA: proceso de cristalización (línea continua) y proceso de fusión (línea punteada) | 56 |
| 19. | Efecto del tipo de emulsionante y del proceso de emulsificación en la distribución del tamaño de partícula de las nanoemulsiones | 58 |
| 20. | Efecto del tipo de emulsionante y del proceso de emulsificación sobre el potencial zeta de las nanoemulsiones. | 61 |
| 21. | Efecto del tipo del tipo de emulsionante y del proceso de emulsificación sobre el índice de blancura de las nanoemulsiones | 63 |
| 22. | Microscopía electrónica de transmisión de las nanoemulsiones con T80 y microfluidización | 64 |

- 23.** Efecto del tipo de emulsionante y del proceso de emulsificación sobre el comportamiento reológico de las nanoemulsiones **67**
- 24.** Curvas de flujo oscilatorio de las nanoemulsiones con comportamiento no-Newtoniano. **68**
- 25.** Efecto antimicrobiano de las nanoemulsiones con A. AE: ácido esteárico; B. T80: Tween 80; y C. T80/S60: Tween80 / Span60 a diferentes procesos de emulsificación (H=homogeneización; U=ultrasonido; M=microfluidización) contra a) *R. stolonifer*, b) *C. gloeosporioides*, c) *B. cinerea*, d) *S. Saintpaul*. **72**

1. INTRODUCCIÓN

Los productos frescos se deterioran con el paso del tiempo, bien por la acción de microorganismos, la acción fisicoquímica del entorno y la actividad biológica del propio alimento. Por esto, la industria de los alimentos busca proteger la integridad y calidad de sus productos desarrollando mejores tecnologías de empaqueo (Olivas y Barbosa-Cánovas, 2009).

Los empaques en la industria alimentaria están enfocados a la conservación y protección de todo tipo de alimentos, no obstante, el uso indiscriminado de empaques sintéticos ha generado serios problemas ecológicos contribuyendo a la contaminación ambiental provocada por desechos sólidos de baja degradabilidad (Siracusa *et al.*, 2009).

El uso de recubrimientos comestibles a base de polímeros biodegradables ha despertado un gran interés por su selectiva funcionalidad para regular la transferencia de humedad y la permeabilidad selectiva a los gases de productos frescos, lo que permite mejorar la calidad y extender la vida útil de estos productos. El enfoque actual de estas tecnologías de empaqueo consiste en caracterizar las propiedades funcionales del empaque y posteriormente orientar el estudio de su interacción como recubrimiento comestible sobre la superficie de un alimento (Vargas *et al.*, 2008).

Los recubrimientos comestibles a base de almidón, uno de los polisacáridos naturales más abundantes y el más comúnmente utilizado en la industria alimentaria debido a su amplia gama de funcionalidades y bajo costo, tienen la característica de ser barreras eficientes contra compuestos de baja polaridad, pero presentan pobres propiedades mecánicas y no ofrecen una buena barrera contra la humedad. En consecuencia, se ha propuesto el desarrollo de recubrimientos comestibles compuestos a partir de la combinación de más de un componente, como lo son los plastificantes y agentes hidrofóbicos, con la finalidad de conjuntar las propiedades

que brindan de manera individual, resultando en una tecnología de empaqueo con características funcionales superiores (Bourtoom, 2008).

Por otro lado, los productos frescos son susceptibles de ser contaminados por microorganismos que los deterioran y pueden provocar enfermedades a los consumidores. Es por ello que la nueva generación de recubrimientos comestibles está especialmente diseñada para permitir la incorporación de agentes antimicrobianos naturales con el objetivo de proporcionarle al producto en fresco un empaque con características inocuas (Falguera *et al.*, 2011).

El tomate rojo es una de las especies hortícolas de mayor cultivo a nivel mundial, por su alto rendimiento y consumo. México se coloca dentro de los principales países productores y ocupa el segundo lugar como país exportador. Es un fruto climatérico que, aunado a su composición química, lo convierte en un producto altamente perecedero por su alta tasa de respiración y pérdida de peso, aunado a las malas condiciones de humedad y temperatura durante su distribución y almacenamiento. Diversas tecnologías poscosecha han sido utilizadas para mantener la calidad del tomate rojo durante su almacenamiento como lo son, el uso de bajas temperaturas, tratamientos de calor y atmósferas modificadas, sin embargo, su carácter perecedero requiere el desarrollo de tecnologías emergentes que reduzcan su deterioro y con ello logren prolongar su vida útil de almacenamiento (SIAP-SAGARPA, 2016; Dávila-Aviña *et al.*, 2011).

2. ANTECEDENTES

2.1 Recubrimientos comestibles en productos frescos

Los hábitos de los consumidores han ido cambiando hacia un mayor deseo de adquirir productos frescos con excelentes atributos de calidad, precio accesible y conveniencia hasta sus hogares, por lo que los esfuerzos actuales están dirigidos a controlar aquellos precursores que puedan desencadenar características que vayan en detrimento de la calidad del producto final (Olivas y Barbosa-Cánovas, 2009).

Las frutas y hortalizas frescas se obtienen a través de diversas operaciones unitarias que van desde su transporte, almacenamiento y posterior llegada al consumidor, las cuales pueden influir en procesos de alteración responsables de cambios bioquímicos que conllevan a la degradación de la calidad del producto. Controlar todos los factores que pueden influir directa o indirectamente sobre la calidad de los productos frescos es de suma importancia para su aceptación, en este sentido, deben aplicarse técnicas de conservación, que combinadas o no, puedan mantener o mejorar los atributos de calidad de los productos frescos (Cuadro 1), además de alargar su vida útil de almacenamiento y asegurar su estabilidad microbiológica (Corbo *et al.*, 2010).

En las últimas décadas el empaçado ha adquirido un papel fundamental dentro de la industria de alimentos, el cual ha ido evolucionando a lo largo de los años como respuesta a los profundos cambios en el estilo de vida del consumidor, lo que supone una innovación continua al intentar satisfacer estas demandas. En la actualidad se dispone de una amplia gama de empaques de diversos materiales y características para satisfacer la demanda de la gran cantidad de productos alimenticios que existen. Debido a esta enorme variabilidad de productos, no es posible el uso de un empaque ideal que sea válido para todos ellos y por tanto, es necesario seleccionar para cada uso y tipo de alimento, el empaque y la tecnología de empaçado más adecuado en función de distintos parámetros como son las

características del producto, forma de transporte y distribución comercial, vida útil esperada, costos, posibilidad de reutilización o reciclado de los materiales y su compatibilidad con el medio ambiente (Williams y Wikström, 2011).

Cuadro 1. Atributos de calidad de productos frescos
(Lin y Zhao, 2007).

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

Hoy en día, el uso indiscriminado de empaques sintéticos ha provocado serios problemas ecológicos debido a la generación de desechos sólidos de baja degradabilidad, por lo que el desarrollo y caracterización de recubrimientos comestibles ha atraído la atención de muchos investigadores debido a la gran variedad de aplicaciones que ofrecen a la industria alimentaria, en particular a la conservación de frutas y hortalizas frescas por su selectiva funcionalidad, además

de poder ser ingeridos por el consumidor y elaborarse a base de polímeros biodegradables (Lin y Zhao, 2007; Janjarasskul y Krochta, 2010).

Un empaque o película comestible es definida como una capa delgada de material comestible formada por separado vaciando la suspensión filmogénica en un soporte sobre una superficie nivelada, la cual se deja secar y se aplica posteriormente a un alimento. Por otro lado, un recubrimiento comestible es definido como una capa delgada que se aplica en forma líquida como un revestimiento directamente sobre el alimento, generalmente por inmersión del producto en una solución o por aspersion sobre el mismo, formando parte integral del producto alimenticio sin afectar las características sensoriales del alimento. La diferencia entre las películas y los recubrimientos comestibles es el modo en que son formadas y su aplicación en los alimentos (Bourtoom, 2008).

2.2 Propiedades funcionales de los recubrimientos comestibles

Las propiedades funcionales (Cuadro 2) de los recubrimientos comestibles dependen en primera instancia del tipo de alimento al cual se le destinará su aplicación (características fisicoquímicas), sus condiciones de almacenamiento (humedad y temperatura) y sus principales vías de deterioro, los cuales estarán relacionados con el tipo de material a utilizar en su elaboración, su proceso de formación y su método de aplicación, además de que la tecnología y la materia prima involucrada en la producción de estas alternativas de conservación sean accesibles y viables económicamente (Vargas *et al.*, 2008; Janjarasskul y Krochta, 2010).

El amplio uso que se le puede destinar a los recubrimientos comestibles dentro de la industria alimentaria abarca una categoría única de empackado, la cual debe satisfacer las necesidades de aquellos productos frescos mejorando sus propiedades funcionales (Figura 1). Todos estos atributos permitirán alargar la vida útil del producto, lo que a su vez repercutirá en el éxito de técnicas de almacenamiento y conservación, que determinarán en última instancia la preferencia del consumidor (Lin y Zhao, 2007; Janjarasskul y Krochta, 2010).

Cuadro 2. Propiedades funcionales de los recubrimientos comestibles
(Janjarasskul y Krochta, 2010)

- Sensorialmente aceptable (transparente, insípido y sin olor)
- Reducir la pérdida de humedad
- Reducir el transporte de gases (O_2 , CO_2 y C_2H_4)
- Reducir la migración de lípidos
- Retener componentes volátiles
- Mejorar las propiedades mecánicas
- Proveer integridad estructural
- Servir como vehículo de aditivos (sabores, colores, antioxidantes, antimicrobianos)
- Evitar o reducir el deterioro microbiano



Figura 1. Propiedades funcionales de un recubrimiento comestible aplicado en productos frescos (Lin y Zhao, 2007)

2.3 Materiales utilizados en la formación de recubrimientos comestibles

Diversos materiales son utilizados en la formulación de recubrimientos comestibles aplicados en productos frescos, dentro de los que se encuentran los polisacáridos, las proteínas y los lípidos (Cuadro 3), los cuales, de acuerdo con la “Agencia de Alimentos y Medicamentos” (FDA por sus siglas en inglés), deben de cumplir con el estatus de generalmente reconocidos como seguros (GRAS por sus siglas en inglés). Pueden utilizarse en forma única o combinada con otros componentes, y su selección dependerá específicamente del tipo de aplicación que se le destine al recubrimiento comestible (Vargas *et al.*, 2008; Olivas y Barbosa-Cánovas, 2009).

Cuadro 3. Materiales utilizados en la formación de recubrimientos comestibles

| Polímero | Ventajas | Desventajas | Aplicación | Referencia |
|---------------|---------------------------------|----------------------------------|------------|---|
| Proteínas | Transparentes | Deficiente barrera a la humedad. | Manzana | Pérez-Gago <i>et al.</i> , (2005). |
| | Eficiente barrera a los gases. | Alto costo de producción. | Tomate | Zapata <i>et al.</i> , (2008). |
| | Buenas propiedades mecánicas. | | Mora azul | Duan <i>et al.</i> , (2011). Pérez-Gago <i>et al.</i> , (2012). |
| Lípidos | | Opacas | Melón | Fallik <i>et al.</i> , (2005). Saucedo-Pompa <i>et al.</i> , (2009). |
| | Eficiente barrera a la humedad. | Inestabilidad sensorial. | Aguacate | Youssef <i>et al.</i> , (2012). |
| | | Pobres propiedades mecánicas. | Naranja | Debeaufort y Voilley, (2009) |
| Polisacáridos | Transparentes | | Fresa | Ribeiro <i>et al.</i> , (2007). |
| | Eficiente barrera a los gases. | Deficiente barrera a la humedad. | Manzana | Rojas-Graü <i>et al.</i> , (2008). |
| | Buenas propiedades mecánicas. | | Papaya | Tapia <i>et al.</i> , (2008). Oms-Oliu <i>et al.</i> , (2008). |
| | Bajo costo de producción. | | Melón | Pérez-Gallardo <i>et al.</i> , (2012). |
| | | | Frambuesa | Soliva-Fortuny <i>et al.</i> , (2012). |

2.3.1 Proteínas

Las proteínas, son polímeros formados por cadenas lineales de aminoácidos unidas mediante enlaces peptídicos que dependiendo de su estructura se clasifican en fibrosas y globulares. Presentan una amplia variedad de características en base a su origen biológico y su función, que involucran su peso molecular, conformación espacial, características eléctricas, hidrofobicidad y estabilidad térmica, las cuales determinarán en última instancia su capacidad para formar un recubrimiento comestible. Dentro de las proteínas utilizadas en la elaboración de recubrimientos comestibles se encuentran el aislado de proteína de suero de leche (WPI) y la caseína, ambas de origen animal, o las obtenidas a partir de fuentes vegetales como la zeína, el gluten de trigo, la proteína de soya e incluso la proteína de semilla de algodón. Entre los mecanismos más importantes involucrados en la formación de un recubrimiento comestible a base de proteínas, se encuentran la desnaturalización de la proteína mediante la aplicación de calor o la variación del pH, donde la matriz estructural se formará cuando las cadenas peptídicas se asocien a través de enlaces intermoleculares entrecruzados. Los recubrimientos comestibles a base de proteínas exhiben buenas propiedades de barrera al O₂, CO₂ y compuestos lipídicos, sobre todo en condiciones de baja humedad relativa, sin embargo, son pobres barreras contra el agua, además de ser frágiles y susceptibles a la rotura debido a la fuerte densidad de energía cohesiva de los polímeros (Lin y Zhao, 2007; Vargas *et al.*, 2008; Pérez-Gago, 2012).

2.3.2 Lípidos

A diferencia de otras macromoléculas, los lípidos no son considerados biopolímeros debido a que no poseen un gran número de unidades repetidas unidas por enlaces covalentes para formar una estructura molecular grande. Como consecuencia, son frágiles y no forman una estructura autosuficiente, por lo que su uso siempre está asociado como un agente de incorporación a un polímero que proporcione resistencia mecánica a un recubrimiento comestible. Los ácidos grasos, aceites, ceras (candelilla, carnauba y abeja) y resinas, son comúnmente utilizados

en la elaboración de recubrimientos comestibles y pueden ser adicionados como una capa lipídica dispersa en una red de hidrocoloide o como una capa secundaria, esto es, una capa lipídica sobre una capa de hidrocoloide. La función primaria de la incorporación de lípidos en la formulación de un recubrimiento comestible, además de conferirle brillo al alimento, es la barrera contra la humedad, ya que el agua posee poca movilidad dentro de una matriz lipídica debido a su poca afinidad y baja polaridad. Las propiedades finales de los recubrimientos comestibles adicionadas con lípidos dependerán de las características de estos componentes tales como su estado físico, grado de saturación y longitud de la cadena alifática (Vargas *et al.*, 2008; Debeaufort y Voilley, 2009).

2.3.3 Polisacáridos

Los polisacáridos, son polímeros de cadena larga formados a partir de unidades repetidas de monosacáridos o disacáridos unidos mediante enlaces glucosídicos, los cuales, han sido propuestos para su uso potencial en la elaboración de recubrimientos comestibles debido a su gran abundancia, bajo costo y fácil manejo, entre los que se encuentran el almidón y sus derivados, derivados de celulosa: metilcelulosa (MC), carboximetilcelulosa (CMC), hidroxipropilcelulosa (HPC) e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), alginatos, carragenina, quitosano, pectina y diversas gomas, que varían en función de su peso molecular, grado de ramificación, conformación espacial, carga eléctrica e hidrofobicidad, interviniendo de manera significativa en la capacidad para formar un recubrimiento comestible. Como resultado de la gran cantidad de grupos hidroxilo y otros restos hidrófilos presentes en la estructura de un polisacárido, los enlaces de hidrógeno juegan un papel significativo, formándose mediante interacciones interrumpidas entre los segmentos de cadena larga del polímero durante el proceso de coacervación y la formación de nuevos enlaces de hidrógeno intermoleculares a través de la evaporación del disolvente para crear la matriz estructural del recubrimiento comestible (Vargas *et al.*, 2008; Janjarasskul y Krochta, 2010).

2.3.3.1 Almidón

El almidón ha sido parte fundamental de la dieta del hombre desde tiempos prehistóricos además de su amplio uso a nivel industrial. Después de la celulosa, es probablemente el polisacárido más abundante e importante desde el punto de vista comercial. Se encuentra presente en los cereales, leguminosas, tubérculos y en algunos frutos como polisacárido de reserva, y aunque está ampliamente distribuido en la naturaleza, las fuentes más comunes del almidón son el maíz, la papa, el trigo, la tapioca y el arroz. Este polisacárido está organizando en partículas discretas conocidas como gránulos, cuya morfología, composición química y estructura son características de cada especie botánica. Químicamente, está conformado por dos macromoléculas, la amilosa formada exclusivamente por cadenas lineales de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos α -D-(1-4) y la amilopectina conformada por cadenas de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos α -D-(1,4) así como por ramificaciones que ocurren cuando el enlace es α -D-(1,6). La amilopectina es el componente mayoritario del almidón, el cual, normalmente se encuentra en una proporción del 70-80 %, aunque en ciertos casos alcanza niveles de hasta un 98-99 % los cuales son definidos como almidones cerosos (Pérez-Bertoft, 2010).

El almidón se ha convertido en un material prometedor para la formación de empaques por ser un polisacárido renovable, de gran disponibilidad, bajo costo y amplio uso. A nivel industrial, se ha incorporado como material biodegradable en sustitución de los empaques sintéticos. Dentro del mercado se han comercializado bolsas biodegradables a base de almidón por dos compañías, una denominada EverCorn™ producida por la empresa italiana Novamont, mientras que la bolsa Bio-PTM ha sido comercializada por la compañía japonesa Bioenvelope. Por otro lado, su aplicación en el desarrollo de recubrimientos comestibles aplicados en productos frescos ofrece buenas propiedades funcionales al ser transparentes, flexibles, presentar excelentes barreras al O_2 y CO_2 y servir como soporte de diferentes aditivos. Sin embargo, la principal limitante es su naturaleza hidrofílica que lo convierten en una pobre barrera a la humedad. Para que este material forme

la matriz del recubrimiento comestible se requiere un tratamiento térmico, donde mediante la aplicación de calor y en presencia de agua, los gránulos de almidón comienzan a captarla conforme aumenta la temperatura hasta hincharse completamente perdiendo el orden molecular, a este fenómeno se le conoce como gelatinización y para cada almidón el rango de temperaturas en el que se produce es diferente (García *et al.*, 2009; Soliva-Fortuny *et al.*, 2012).

Comúnmente, se usan almidones nativos en la formulación de un recubrimiento comestible, tanto por su disponibilidad y variedad, como por la cantidad de amilosa y amilopectina que pueden contener. Por otro lado, los procesos de modificación en los almidones van encaminados a cambiar las características del gránulo de almidón al producir una alteración en una o más de sus propiedades físicas, químicas o estructurales, debido a la incorporación de un componente ajeno a su estructura, para satisfacer la función deseada en la elaboración de recubrimientos comestibles. Los almidones pueden ser modificados por diferentes vías físicas y químicas, siendo ésta última la más comúnmente utilizada. La modificación química consiste en introducir a la molécula de almidón, grupos funcionales mediante reacciones de esterificación, eterificación o entrecruzamiento o someterlo a reacciones de descomposición ácida, hidrólisis enzimática u oxidación como es el caso almidón oxidado (OS) el cual se obtiene empleando hipoclorito de sodio bajo condiciones de pH y temperatura controladas, donde los grupos hidroxilo (OH^-) del almidón son oxidados primero a grupos carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) y luego a grupos carboxilo (COOH). Dentro de las principales características que poseen los almidones oxidados es su baja viscosidad, su alta resistencia a la degradación térmica y mecánica, además de ser menos propensos a retrogradar, lo que permite obtener recubrimientos comestibles transparentes y con mayor estabilidad (Singh *et al.*, 2007; Kramer, 2009).

Por otro lado, se ha demostrado que la combinación de dos modificaciones químicas, como el almidón acetilado-entrecruzado o doblemente modificado, le confieren características diferentes ya que proveen estabilidad en condiciones

ácidas, degradación térmica y mecánica, y retarda la retrodegradación durante un almacenamiento prolongado. La acetilación es una modificación química por esterificación, en el cual se sustituyen sus grupos hidroxilo (OH-), por grupos acetilos ($\text{CH}_3\text{-C=O}$). Por su parte, el tratamiento por entrecruzamiento es la introducción aleatoria de enlaces covalentes intra e inter-moleculares en el gránulo de almidón, los cuales refuerzan los enlaces de hidrógeno que actúan como puentes entre sus moléculas. Los recubrimientos comestibles a base de este tipo de almidón presentan mejores propiedades mecánicas (Kramer, 2009).

2.3.4 Aditivos y otros componentes

De la amplia variedad de funciones que se buscan cumplir en la elaboración de un recubrimiento comestible aplicado en productos frescos, la incorporación de aditivos como son los plastificantes, antimicrobianos y agentes hidrofóbicos, en conjunto con el compuesto de naturaleza polimérica, se proponen con la finalidad de aportar propiedades adicionales resultando en una tecnología de empaque superior (Lin y Zhao, 2007; Olivas y Barbosa-Cánovas, 2009).

2.3.4.1 Plastificantes

Los plastificantes son sustancias de bajo peso molecular, poco volátiles y con naturaleza química similar a la del biopolímero formador. Se usan para mejorar la flexibilidad y extensibilidad del recubrimiento comestible reduciendo los enlaces de hidrógeno internos entre las cadenas de polímeros y aumentando el espacio intermolecular. Dentro de los agentes plastificantes mayormente utilizados se encuentran los polioles tales como el glicerol, sorbitol y polietilenglicol (Janjarasskul y Krochta, 2010; Avena-Bustillos y McHugh, 2012).

2.3.4.2 Antimicrobianos

La principal causa de deterioro de la mayoría de los productos frescos es el crecimiento de la superficie microbiana. La reducción en los niveles de actividad de agua (a_w) y la protección con un empaque a prueba de humedad, son métodos

utilizados para evitar el deterioro del producto. Sin embargo, una reorganización del agua en el interior del empaque, debido a los cambios de temperatura, puede inducir a la condensación de humedad en la superficie de un producto en fresco, aumentando la posibilidad de un desarrollo microbiano, reduciendo drásticamente su calidad y comprometiendo su seguridad alimentaria (Quezada-Gallo, 2009; Campos *et al.*, 2011).

Una de las funciones importantes que surgen de la aplicación de los recubrimientos comestibles, es su uso como soporte de antimicrobianos con el fin de asegurar la estabilidad microbiológica y extender la vida útil de almacenamiento de productos frescos. Durante las dos últimas décadas, la popularidad de los empaques antimicrobianos en alimentos ha sido el mayor paradigma alcanzado, ya que se ha demostrado que algunos aditivos actúan más eficazmente cuando forman parte del recubrimiento comestible que cuando son aplicados a soluciones acuosas mediante aspersión o inmersión al mantenerse en la superficie del alimento durante más tiempo (Rojas-Graü *et al.*, 2009; Falguera *et al.*, 2011).

Hoy en día, se ha reconocido el rechazo del uso de antimicrobianos sintéticos en alimentos, por lo que las investigaciones se han centrado en la aplicación de agentes antimicrobianos naturales incorporados en recubrimientos comestibles con el objetivo de retardar el crecimiento microbiano en un alimento. Compuestos antimicrobianos de origen natural han sido aislados de fuentes vegetales, dentro de los que se incluyen, extractos de especias tales como canela, pimienta, tomillo, clavo, romero y orégano, los cuales han mostrado tener actividad antimicrobiana, sin embargo, poseen limitada aceptación debido a que proporcionan al alimento características sensoriales no deseadas. Por otro lado, existen aquellos que se producen a partir de la acción de bacterias, el más notable de los derivados es el polipéptido nisina y la natamicina (NAT), así como aquellos que se derivan de componentes naturales como el arginato láurico (LAE), los cuales han tenido una amplia aceptación en su aplicación en productos frescos debido a su rápido

metabolismo, baja o nula toxicidad y amplio espectro de inhibición (Valencia-Chamorro *et al.*, 2011; Avena-Bustillos y McHugh, 2012).

2.3.4.2.1 Arginato láurico (LAE)

Su nombre sistemático es: cloruro del éster etílico de N α - lauroil-L-arginina, en lo sucesivo, arginato láurico (LAE) etiquetado en virtud de la FDA. Es derivado del ácido láurico, L-arginina y etanol y su síntesis es llevada a cabo por el Laboratorio Miret, SA (Lamirsa), con el nombre comercial de Mirenat-D. El LAE se hidroliza en el cuerpo humano a través de reacciones químicas y metabólicas rompiendo la molécula en componentes comunes de la dieta humana; dicha función le adjudica un notable grado de seguridad obteniendo su estatus GRAS por la FDA en el 2005 para su uso como antimicrobiano en alimentos hasta 225 mg/L. Es un sólido blanco, soluble en agua y termorresistente. Muestra estabilidad química en un rango de pH entre 3-7 y mantiene su actividad antimicrobiana en este intervalo. Es un antimicrobiano de amplio espectro de inhibición contra todo tipo de bacterias gram positivas y negativas, mohos y levaduras. Es un tensoactivo catiónico cuya actividad antimicrobiana es una consecuencia directa de sus propiedades químicas, que incluyen la reducción de la tensión superficial y la formación de agregados iónicos, que pueden degradar o solubilizar las membranas celulares a concentraciones incluso por debajo de la concentración micelar crítica (CMC), que conducen a una pérdida del potencial de membrana, alterando la permeabilidad celular, la fuga de iones y componentes celulares, provocando la inhibición metabólica o la detención del crecimiento celular (Rodríguez *et al.*, 2004; VEDEQSA, 2009).

2.3.4.2.2 Natamicina (NAT)

La natamicina (NAT), es un antimicrobiano que se ha utilizado durante varios años para inhibir el crecimiento de mohos y levaduras en una gran variedad de alimentos, sin afectar el aspecto, color, sabor y aroma de los productos, ya que no penetra en el interior. Sin embargo, su espectro de inhibición es muy específico ya

que no presenta actividad contra bacterias. Es producido por la fermentación de una cepa no modificada genéticamente de *Streptomyces natalensis* aislada de una muestra del suelo. Comercialmente está disponible en un 50% de ingrediente activo generalmente combinado con un acarreador de NaCl o de lactosa. Como polvo es muy estable y puede ser almacenada por muchos años con una pérdida mínima de su actividad. Sin embargo, diferentes factores dentro de los que se encuentran valores de pH extremos, luz, oxidantes y metales pesados pueden comprometer su estabilidad. Como muchos macrólidos polienos, la NAT es anfotérica y tiene baja solubilidad en agua (40 µg/mL), lo cual representa una ventaja para el tratamiento sobre la superficie de los alimentos, debido a que asegura que el antimicrobiano permanezca sobre la superficie de los alimentos donde más se necesita, en lugar de migrar al interior de ellos. Su mecanismo de acción es sobre la membrana celular de los hongos, ya que se une al ergosterol, componente lipídico de la membrana celular, responsable del transporte intracelular de nutrientes, formando poros, aumentando la permeabilidad, permitiendo la pérdida de componentes y conduciendo a la muerte de la célula (Delves-Broughton, 2005).

2.3.4.3 Agentes hidrofóbicos

Actualmente las investigaciones se han orientado en el uso de polisacáridos y proteínas en combinación con agentes hidrofóbicos, tales como los aceites y ceras, los cuales le confieren al empaque comestible propiedades de barrera a la humedad, por lo que el uso de dicha combinación podría resultar de gran interés en el desarrollo de recubrimientos comestibles compuestos tipo monocapa, los cuales se forman a partir de una dispersión del material lipídico en la fase hidrofílica a base de polisacáridos o proteínas y es aplicado en una sola fase sobre el alimento, a diferencia de los recubrimientos comestibles bicapa formados en dos etapas, donde primero se aplica la capa a base de polisacáridos o proteínas la cual se deja secar, para posteriormente aplicar otra capa a base de lípidos, lo cual, al ser un proceso más largo y discontinuo, resulta inconveniente en su aplicación para productos frescos donde se busca el desarrollo de una tecnología de empaque eficiente (Bourtoom, 2008).

Aún existen muchas limitantes en cuanto a la formulación, caracterización y métodos de aplicación de los recubrimientos comestibles y más aún en productos frescos. Lograr una buena incorporación de cada uno de los componentes involucrados en la formulación de un recubrimiento comestible, controlar la transferencia de humedad de algunos polímeros formadores, la liberación controlada de antimicrobianos y la generación de efectos sensoriales no deseables, son algunas desventajas que aún se encuentran en fase de investigación (Dea *et al.*, 2012; Dhall, 2013).

2.4 Uso de la nanotecnología en recubrimientos comestibles

Hoy en día, la nanotecnología se ha convertido en uno de los campos de investigación tecnológica y científica más prometedora y atractiva para la industria alimentaria. Comprende el estudio, diseño, creación, manipulación y aplicación de diversos sistemas funcionales a través del control de la materia a nivel nanoescala, (Imran *et al.*, 2010).

El uso de la nanotecnología en un sistema alimentario cubre aspectos importantes durante su procesamiento, empaquetado, conservación y distribución. Dentro de las aplicaciones en alimentos se encuentran la formación de nanopartículas y nanoemulsiones que sirven como sistemas de protección e incorporación de aditivos, el desarrollo de nanocompuestos poliméricos caracterizados por la incorporación de partículas de relleno (silicato) en el interior de una matriz polimérica aplicados en el campo de los envases para alimentos, y el desarrollo de biosensores para la detección y cuantificación de patógenos, compuestos orgánicos y otros químicos implicados en la seguridad de un alimento (Durán y Marcato, 2013).

2.4.1 Nanoemulsiones

Una emulsión es una mezcla de dos líquidos inmiscibles entre sí, uno de los cuales está disperso en el otro, cuya estructura es estabilizada por un agente

surfactante llamado emulsionante y se caracteriza por ser un sistema meta estable, por lo que después de un cierto periodo estacionario se presenta una separación de fases. Existen emulsiones que se elaboran a partir de agua-en-aceite (W/O por sus siglas en inglés) y de aceite-en-agua (O/W por sus siglas en inglés), siendo ésta última la más utilizada. Por otro lado, una nanoemulsión es aquel sistema que se forma a partir la aplicación de diferentes métodos de emulsificación, los cuales, a partir de una emulsión o macroemulsión, tienen como objetivo reducir el tamaño de partícula hasta un rango de 10 a 100 nm, lo que los convierte en un sistema de alta estabilidad cinética y apariencia traslúcida y se propone como un buen método de incorporación de los componentes involucrados en la formación de un recubrimiento comestible con la finalidad de mejorar sus propiedades funcionales al permitir una mejor distribución y homogeneidad entre sus componentes, dando como resultado mejores propiedades de barrera a la humedad y al O₂ e incrementando la adhesión y durabilidad (McClements y Rao, 2011; Hélder *et al.*, 2012).

2.4.2 Emulsionantes

Los agentes tensoactivos, comúnmente denominados emulsionantes, juegan el papel más importante en la formación de una nanoemulsión al reducir la tensión interfacial en sistemas aceite-agua. Son moléculas anfipáticas que se componen por una cabeza polar (hidrofílica) que interactúa fuertemente con las moléculas de agua a través de interacciones dipolo o ión-dipolo, y una cola no polar (lipofílica) formada por una cadena de hidrocarburo lineal o ramificado que contiene de 8 a 18 átomos de carbono orientada hacia la parte oleosa, dando como resultado la formación de una micela (Figura 2) (McClements y Rao, 2011).

Dentro de la selección de los emulsionantes más apropiados en la formación de una nanoemulsión, además de tomar en cuenta la naturaleza de la fase oleosa utilizada (polaridad, solubilidad en agua, tensión interfacial y reología), existen dos factores importantes a considerar que caracterizan a los emulsionantes, la concentración micelar crítica (CMC) y el balance hidrofílico-lipofílico (HLB) (Jiménez- Islas *et al.*, 2010).

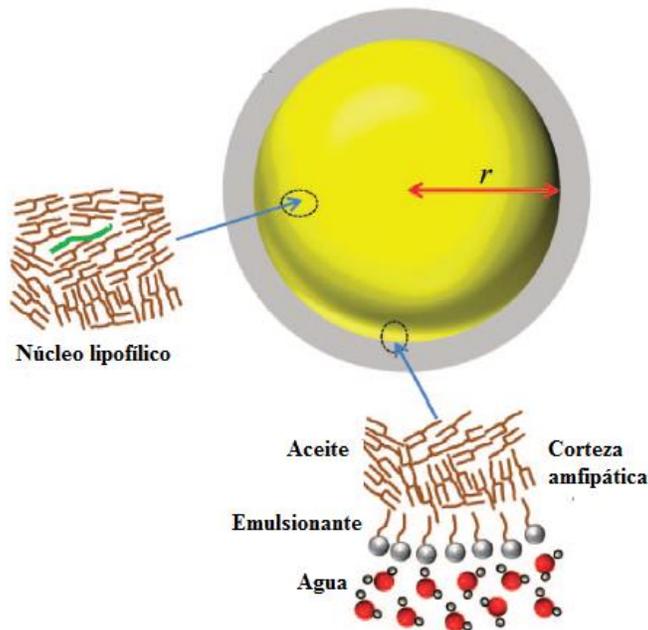


Figura 2. Representación esquemática de la estructura de una micela
(McClements y Rao, 2011)

La concentración de emulsionante en la que se alcanza la mínima tensión superficial es denominada concentración micelar crítica (CMC); es también la concentración de emulsionante por debajo de la cual las micelas se forman espontáneamente y es un parámetro característico para cada emulsionante. Para valores inferiores a esta concentración, todo el emulsionante presente en solución se encuentra en forma de monómeros, mientras que, a valores más altos, algunas moléculas de emulsionante se encuentran en forma micelar. Por otra parte, el balance hidrofílico-lipofílico (HLB) es un valor que representa la capacidad de un tensoactivo para formar emulsiones estables en sistemas agua-aceite o aceite-agua, al compararse con valores estándar establecidos de HLB para los emulsionantes ácido oleico (HLB=1) y oleato de sodio (HLB=20). De esta manera, valores de HLB cercanos a 1 indican que el tensoactivo forma emulsiones estables en sistemas agua-aceite, mientras que valores de HLB cercanos a 20 señalan su capacidad para formar emulsiones estables en sistemas aceite-agua. En el cuadro 4 se muestra una clasificación general en la aplicación de los emulsionantes de acuerdo a los intervalos del HLB.

Cuadro 4. Clasificación de los emulsionantes de acuerdo a su HLB
(Jiménez- Islas *et al.*, 2010)

| HLB | Aplicación |
|------------|---|
| 4-6 | Emulsionantes para sistemas agua-aceite |
| 7-9 | Agentes humectantes |
| 8-18 | Emulsionantes para sistemas aceite-agua |
| 13-15 | Detergentes |
| 10-18 | Solubilizadores |

Finalmente, los emulsionantes se clasifican de acuerdo a su poder de disociación en presencia de un electrolito y de sus propiedades fisicoquímicas. Pueden ser iónicos o no-iónicos; y dentro de los iónicos, según la carga que posee la parte que presenta la actividad de superficie, se clasifican en aniónicos, catiónicos y anfóteros (Jimenez- Islas *et al.*, 2010).

2.4.2.1 Emulsionantes aniónicos

Son la clase de emulsionantes más utilizada a nivel industrial debido a su bajo costo de producción, donde la parte hidrofílica de la molécula posee una carga negativa derivada de un grupo carboxilato, sulfato, sulfonato o fosfato, y la cadena hidrofóbica que los forma es un grupo alquilo lineal con una longitud de cadena de 12-16 átomos de carbono (Jimenez- Islas *et al.*, 2010).

2.4.2.1 Emulsionantes catiónicos

Por definición, la parte hidrofílica de estos emulsionantes posee una carga positiva derivada de un grupo amonio cuaternario. Son solubles en agua cuando sólo hay un grupo alquilo largo, compatibles con la mayoría de los iones inorgánicos, y estables a los cambios del pH, ácidos y alcalinos. Estos emulsionantes suelen tener una alta adherencia en diferentes sustratos y una alta "persistencia" en esa adhesión que le permiten interactuar con las membranas celulares de los microorganismos actuando como antimicrobiano (McClements y Rao, 2011).

2.4.2.3 Emulsionantes anfotéricos

Son aquellos emulsionantes que poseen tanto un grupo catiónico como un grupo aniónico, donde la parte polar, por lo general, es un grupo carboxilato junto con un grupo amonio cuaternario. Su principal característica es su dependencia al pH en la solución en la cual se disuelven. En soluciones de pH ácido, la molécula adquiere una carga positiva y se comporta como un emulsionante catiónico, mientras que en soluciones de pH alcalino se convierte en carga negativa y se comporta como un emulsionante aniónico. Por otro lado, los emulsionantes anfotéricos muestran una excelente compatibilidad con otros tensoactivos, formando micelas mixtas (Hélder *et al.*, 2012).

2.4.2.4 Emulsionantes no iónicos

Son aquellos emulsionantes donde los grupos polares que forman la parte hidrofílica suelen ser un grupo alcohol o éter y en cuya parte hidrofóbica poseen principalmente una cadena alifática de entre 12 y 18 carbonos. Dentro de los emulsionantes no iónicos se distinguen los etoxilatos de alcoholes, alquilfenol, ácidos grasos, monoalcaolamidas, sorbitán, aminas grasas y copolímeros de óxido de etileno-óxido de propileno, a veces denominados tensoactivos poliméricos (McClements y Rao, 2011).

2.4.3 Métodos de emulsificación

Dentro de los métodos empleados en la formación de nanoemulsiones (Cuadro 5), se encuentran aquellos de baja energía o métodos fisicoquímicos, los cuales se basan en la formación de pequeñas gotas de aceite dentro de un sistema O/W cuando las variables como la temperatura y composición son alteradas. Por otro lado, los métodos de alta energía o métodos de dispersión, utilizan dispositivos mecánicos capaces de generar fuerzas disruptivas intensas que provoquen la ruptura de las fases de O/W y permitan la formación de pequeñas gotas de aceite. Su uso depende de la composición seleccionada de emulsionantes, así como de la cantidad de energía aplicada durante el proceso y del tiempo durante el cual se

aplica la energía. En la actualidad, los métodos de alta energía son los más utilizados dentro de la industria de alimentos en la producción de emulsiones convencionales (McClements y Rao, 2011; Hélder *et al.*, 2012).

Cuadro 5. Métodos para la formación de nanoemulsiones
(McClements y Rao, 2011; Hélder *et al.*, 2012)

| Método | Energía necesaria |
|---|--------------------------|
| Emulsificación espontánea | Baja |
| Desplazamiento del solvente | Baja |
| Punto de inversión | Baja |
| Fase invertida | Baja |
| Mezcladores de alta velocidad (Ultraturrax) | Alta |
| Ultrasonidos | Alta |
| Microfluidizadores | Alta |

Dentro de los métodos de alta energía utilizados en la formulación de nanoemulsiones se encuentra la homogeneización mediante el uso de mezcladores de alta velocidad (ultraturrax), que generan altas presiones donde una pre mezcla es forzada a atravesar micro canales los cuales están formados para crear un flujo extremadamente forzado. El tamaño de las micelas depende de la velocidad aplicada, del número de recirculaciones y de la viscosidad del fluido a tratar. Por otro lado, la aplicación de ultrasonidos con frecuencias de alrededor de ≥ 20 kHz y potencias que van de 200-600 W, son formadas a través de la aplicación de un campo acústico que produce ondas interfaciales y al volverse inestables provocan la erupción de la fase O/W en pequeñas gotas que posteriormente causan la cavitación (formación y subsecuente colapso de micro burbujas a causa de la presión) y fuerzas extremas de cizallamiento que rompen las micelas hasta formar nanopartículas. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que las generaciones de altas intensidades localizadas en el seno de una emulsión pueden provocar reacciones indeseables como la desnaturalización de proteínas, despolimerización de polisacáridos y la oxidación de lípidos. Por último, la microfluidización es un

método de alta energía que implica el uso de altas presiones donde una emulsión es dividida y forzada a fluir a través de un canal en dos corrientes, pasando cada corriente a través de un canal fino separado, para posteriormente juntarse en una cámara de interacción, generando fuerzas disruptivas que conllevan a la interrupción de gotas de alta eficiencia (McClements y Rao, 2011; Hélder *et al.*, 2012).

2.4.4 Estabilidad de las nanoemulsiones

Las nanoemulsiones son sistemas que tienden a romperse a través del tiempo por diferentes mecanismos fisicoquímicos como lo son el cremado, sedimentación, floculación y coalescencia (Figura 3), los cuales están relacionados con el tamaño de las partículas en suspensión y la carga electrostática, que sin duda alguna dependerán de la selección de los componentes y la metodología aplicada en su formación, por lo que el conocimiento de sus características interfaciales y de partícula es fundamental para poder controlar y predecir su estabilidad y posibles aplicaciones (McClements, 2016).

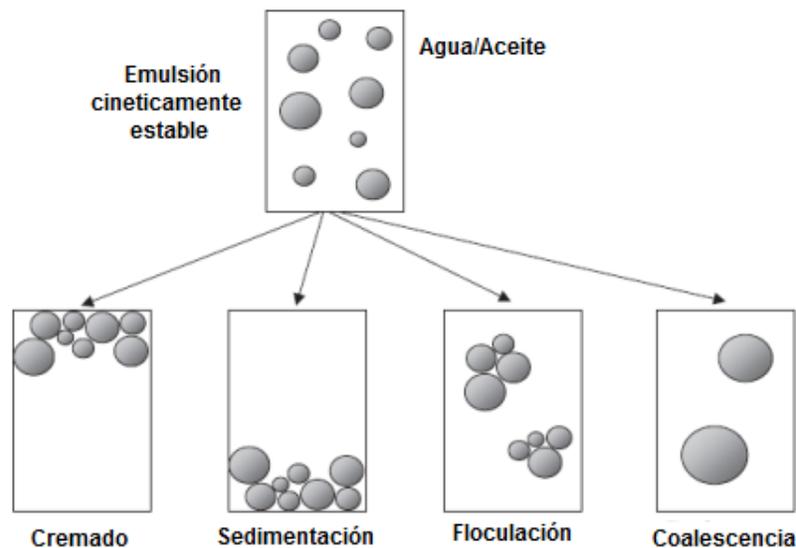


Figura 3. Mecanismos fisicoquímicos que causan inestabilidad en una nanoemulsión (McClements, 2016)

2.4.5 Tamaño de partícula e índice de polidispersión

La determinación del tamaño de partícula es uno de los parámetros más importantes a considerar, ya que influye en las propiedades ópticas, reológicas y de estabilidad de una dispersión coloidal. Las nanoemulsiones, por lo general, son sistemas polidispersos, lo que significa que las partículas en una muestra particular varían de tamaño, por tanto, es necesario determinar la distribución del tamaño de partícula que representa la fracción de partículas dentro de un rango de tamaños distribuidos en la muestra, que es una medida de la distribución del tamaño predominante (McClements, 2016).

Por su parte, el índice de polidispersión (IPD), es una medida de la heterogeneidad en la distribución del tamaño de partícula. Los valores de IPD cercanos a 0 indican distribuciones de tamaños homogéneos, mientras que los valores de IPD cercanos a 1 indican distribuciones de tamaños heterogéneos (Acevedo-Fani *et al.*, 2015).

2.4.6 Potencial zeta

Las partículas que forman parte de una nanoemulsión suelen estar cargadas electrostáticamente debido a su interacción con emulsionantes en su superficie, y son comúnmente caracterizadas en términos de su movilidad electroforética (velocidad de migración de un ión, cuando se aplica un campo eléctrico,) y esta su vez por el potencial zeta (McClements y Rao, 2011).

El potencial zeta es una magnitud de la repulsión o atracción entre dichas partículas y proporciona una idea de la estabilidad del sistema. Todas las partículas dispersas en una solución tienen una carga neta en su superficie, la cual va a estar rodeada fuertemente por iones de cargas contrarias en una capa fija o capa “Stern”, la que a su vez está rodeada por iones de carga similar que están unidos de una forma menos fuerte, a la cual se le conoce como “capa difusa”, por lo que se dice que las partículas cuentan con una doble capa eléctrica en la región de interfase

partícula- líquido (Figura 4). El potencial zeta es la diferencia de cargas que existe entre la doble capa y el seno del líquido que está en suspensión.

Si todas las partículas en suspensión tienen un gran potencial zeta negativo o positivo, entonces tenderán a repelerse entre sí y no hay tendencia a flocular. Por el contrario, si las partículas tienen valores de potencial zeta bajos, entonces no existen fuerzas para impedir que las partículas se unan y tiendan a flocular, por lo que entre mayor sea la magnitud del potencial zeta, mayor será la estabilidad de la nanoemulsión (Cuadro 6) (Kaszuba *et al.*, 2010; Jiménez- Islas *et al.*, 2010).

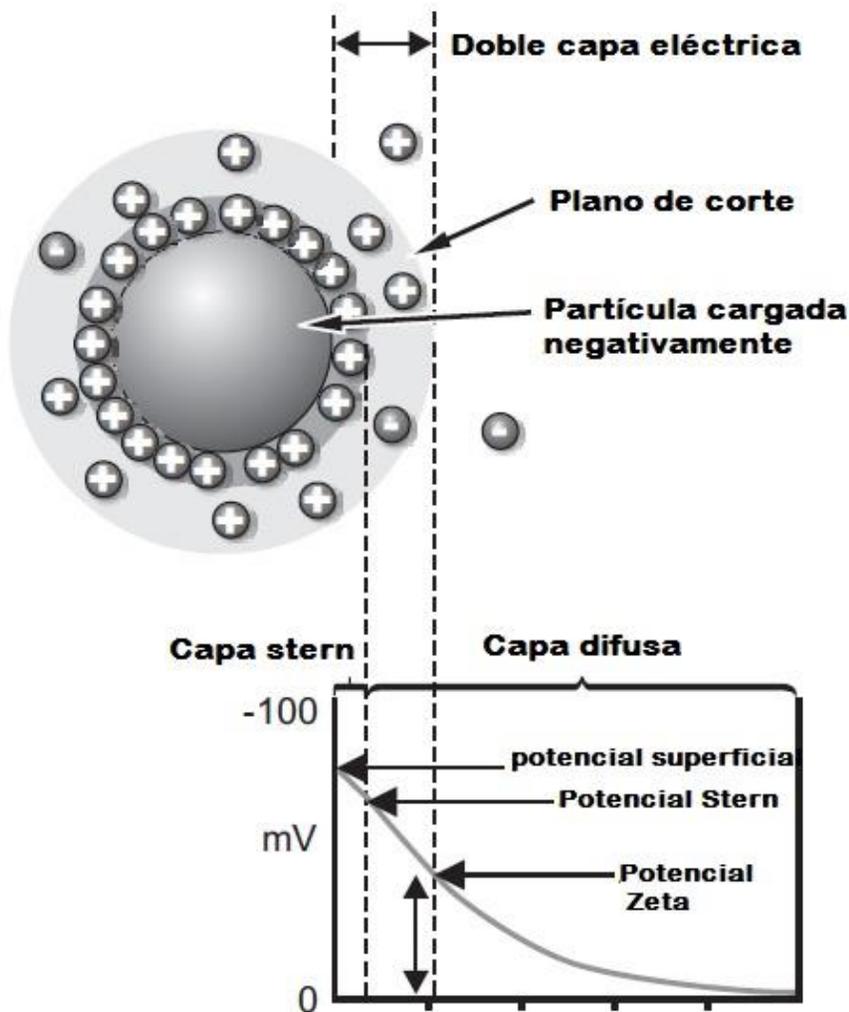


Figura 4. Representación de la doble capa eléctrica y el potencial zeta (Kaszuba *et al.*, 2010)

Cuadro 6. Estabilidad de las nanoemulsiones dependiendo del potencial zeta
(Kaszuba *et al.*, 2010).

| Estabilidad | Potencial Zeta (mV) |
|-----------------------|----------------------------|
| Máxima desestabilidad | 0 - ± 3 |
| Muy baja estabilidad | ± 5 - ± 15 |
| Baja estabilidad | ± 16 - ± 30 |
| Buena estabilidad | ± 31 - ± 60 |
| Muy buena estabilidad | ± 61 - ± 80 |
| Excelente estabilidad | ± 81 - ± 100 |

2.4.7 Mojabilidad

Cuando una nanoemulsión tiene como objetivo servir como recubrimiento comestible es necesario conocer la afinidad que tiene para adherirse a la superficie de un alimento. La capacidad de mojado de un sólido por un líquido está determinado por su coeficiente de mojabilidad (W_s), el cual estará influenciado por el balance de las fuerzas adhesivas (W_a) del líquido en el sólido sobre las fuerzas cohesivas (W_c) del propio líquido, que a su vez involucran la acción de tres fuerzas superficiales: solido-vapor (γ_{SV}), solido-líquido (γ_{SL}) y líquido-vapor (γ_{LV}) (Skurtys *et al.*, 2011).

Sin embargo, las características superficiales son un parámetro que intervienen de manera significativa en la capacidad de mojado de un sólido, las cuales estarán determinadas por el ángulo de contacto (θ) que forma el líquido en una superficie y representa el equilibrio mecánico entre las tres fuerzas superficiales (Figura 5) (Ramírez *et al.*, 2012).

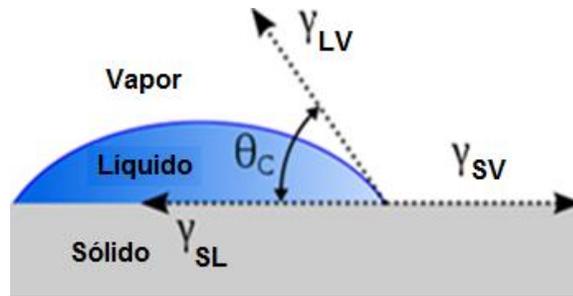


Figura 5. Diagrama de la acción de las fuerzas superficiales sobre el ángulo de contacto (Ramírez *et al.*, 2012)

2.5 Tomate Rojo

El tomate rojo (*Solanum lycopersicum*) es un producto fresco de gran importancia económica a nivel mundial. En la actualidad, se ha convertido en una de las especies hortícolas de mayor cultivo a nivel mundial, tanto en cielo abierto como en agricultura protegida por su alto rendimiento (25 Kg/m^2) y consumo (25 Kg). México se coloca dentro de los principales países productores a nivel mundial y ocupa el segundo lugar como país exportador, siendo nuestro principal mercado EUA con un 94%. La mayor parte del país es productor de este tipo de tomate, sin embargo, destacan los estados de Sinaloa, Baja California y Zacatecas, donde Sinaloa se sitúa con la mayor producción alrededor de 2 694, 385.19 ton para el 2014, ocupando más del 31% de la producción total nacional. Por otro lado, Querétaro, aunque no figura dentro de los principales estados productores, si ocupa el primer lugar en cuanto a rendimiento de producción de tomate rojo (204.46 ton/ha) sobre todo en agricultura protegida (SIAP-SAGARPA, 2016).

El tomate rojo es un fruto climatérico, perteneciente a la familia de las Solanáceas, donde su proceso de madurez se lleva a cabo de manera gradual y continua. Cambios en la textura, color, sabor, aroma y reducción de firmeza, son resultado del proceso de madurez en los frutos climatéricos, donde la velocidad de respiración y la producción de etileno se elevan llegando a un máximo y declinando hasta el comienzo de la senescencia del fruto. El tomate rojo se cosecha en un estado de madurez fisiológica donde todavía presente un color verde (etapa 2), de

esta manera, se permite que los exportadores, mayoristas y minoristas controlen mejor la comercialización de este fruto. Los requisitos mínimos de calidad que debe reunir el tomate rojo son estar entero, libre de daños físicos, mecánicos, fisiológicos o fitopatológicos, limpio (sin materiales extraños), con un color típico de la especie y variedad, de aspecto fresco, textura suave, exentos de olores y sabores extraños y no deben exceder los límites máximos de plaguicidas permitidos internacionalmente, sin embargo la estructura y composición química del tomate rojo lo convierten en un producto fresco delicado durante su manejo poscosecha, donde puede sufrir daño mecánico o por temperatura durante su distribución y almacenamiento, que lo hacen sumamente propenso al ataque por hongos y bacterias, con la posibilidad de llegar a su mercado de destino en una condición altamente deteriorada, con un porcentaje inaceptable del cargamento en condiciones que no permitirían su comercialización (Pérez *et al.*, 2001).

Dentro de las principales enfermedades causadas por hongos se encuentran la podredumbre blanda causada por *Rhizopus stolonifer*, la podredumbre por antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, y la podredumbre gris por *Botrytis cinerea*, los cuales se caracterizan por ser hongos deterioradores de frutos y vegetales frescos, que comúnmente se desarrollan en un amplio rango de temperaturas y humedades relativas y cuyo mecanismo de acción en el desarrollo de la enfermedad se produce debido a que las pectinas presentes en las hifas de cada hongo disuelven las células de los tejidos vegetales y terminan degradando la celulosa de la pared de la célula vegetal. Uno de los fungicidas ampliamente utilizado por ser altamente eficaz en el control de éstas enfermedades es el diclorán (DCNA); sin embargo el tiabendazol, benomilo, carbendazim, dithane y tiofanatos también son ampliamente utilizados, sin embargo, el impacto económico y ambiental es grande, ya que se ha demostrado que los fungicidas provocan el desarrollo de mecanismos de resistencia por parte del patógeno, a la vez que generan residuos tóxicos en alimentos y al medio ambiente, poniendo en riesgo la salud del hombre. Por otro lado, la presencia de patógenos como *Salmonella* spp. puede causar pérdidas totales, por lo que actualmente se buscan alternativas

naturales para el control del deterioro microbiano poscosecha de productos en fresco (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 2009).

3. JUSTIFICACIÓN

El interés en el uso de recubrimientos comestibles a base de biopolímeros naturales, incorporados de agentes hidrofóbicos y antimicrobianos naturales para prolongar la vida útil de almacenamiento y mejorar la calidad de un alimento, ha venido creciendo debido a la necesidad de reducir y sustituir el empleo de envases sintéticos de baja degradabilidad, por materiales menos agresivos con el medio ambiente, aunado a la demanda de alimentos frescos, seguros y con mayor vida de anaquel, por lo que la selección e incorporación de cada uno de sus componentes debe ser óptima con la finalidad de brindarle las características necesarias que lo hagan altamente eficaz.

Por lo anterior, el diseño y caracterización de nanoemulsiones aceite-en-agua (O/W), se proponen como un buen método de incorporación y distribución a escala nanométrica de cada uno de los componentes involucrados en su formación, con la finalidad de mejorar sus propiedades funcionales que potencialicen su uso como recubrimientos comestibles al ser aplicado sobre un producto en fresco.

4. HIPÓTESIS

La obtención de una nanoemulsión aceite-en-agua (O/W) a base de almidón, incorporando cera de abeja como agente hidrofóbico y antimicrobianos naturales, permitirá mejorar la distribución de cada uno de sus componentes, favoreciendo su selectiva funcionalidad y potencializando su posible aplicación como recubrimiento comestible.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Diseñar y caracterizar una nanoemulsión antimicrobiana a base de almidón, cera de abeja y su posible aplicación como recubrimiento comestible.

5.2 Específicos

1. Determinar la concentración mínima letal (CML) de los antimicrobianos arginato láurico (LAE) y natamicina (NAT) contra los hongos deterioradores *Rhizopus stolonifer*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea*, así como la bacteria *Salmonella Saintpaul*.
2. Determinar la actividad de los antimicrobianos incorporados en una matriz capaz formar recubrimientos comestibles.
3. Diseñar una nanoemulsión antimicrobiana aceite-en-agua (O/W) a base de almidón, incorporando cera de abeja como agente hidrofóbico.
4. Evaluar las propiedades fisicoquímicas, reológicas, de mojabilidad y antimicrobianas de la nanoemulsión.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

6.1.1 Material Biológico

- *Rhizopus stolonifer* CDBB-H-318
- *Colletotrichum gloeosporioides* ATCC 42374
- *Botrytis cinerea* CDBB-H-1556
- *Salmonella* Saintpaul S70 (aislada de tomate rojo)

6.1.2 Medios de Cultivo

Agar papa-dextrosa (APD), caldo papa-dextrosa (CPD), agar soya tripticaseína (AST) y caldo soya tripticaseína (CST) (Bioxon, CDMX, México). Agar rosa de bengala (RB) (BD-Difco, MD, EUA) suplementado con cloranfenicol (0.05% p/v) (Sigma, MO, USA).

6.1.3 Reactivos

Almidón oxidado [OS] y sorbitol no cristizable (Ingredion, Qro., México), cera de abeja (CA), ácido esteárico (AE), Tween 80 (T80), Span 60 (S60) y morfolina (Sigma, MO, USA), arginato láurico (LAE) (Vedeqsa, Barcelona, España), natamicina (NAT) (EcoBio, OH, USA).

6.2 Métodos

6.2.1 Determinación de la CML de los antimicrobianos naturales contra *R. stolonifer*, *C. gloeosporioides* y *B. cinerea*

Para establecer la concentración mínima fungicida (CMF) se eligieron dos antimicrobianos naturales: el LAE a concentraciones de 100 a 1600 mg/L y la NAT a concentraciones de 10 a 160 mg/L y se evaluó su efecto inhibitorio de manera individual contra los hongos deterioradores *R. stolonifer* CDBB-H-318, *C. gloeosporioides* ATCC 42374 y *B. cinerea* CDBB-H-1556. El reto antimicrobiano se llevó a cabo en tubos de ensaye con CPD junto con el antimicrobiano a la concentración deseada, además de un inóculo de 10^6 esporas/mL de cada

microorganismo, los cuales se incubaron a 28 ± 1 °C por 24 h. Posteriormente se sembró por extensión en superficie 100 μ L de cada tubo de ensaye en placas con agar RBC, se llevó a cabo el recuento de células viables y se monitoreó el crecimiento de cada hongo al quinto día de incubación (López-Malo *et al.*, 2005; Pitt y Hocking, 2009; Kowalczyk *et al.*, 2015).

6.2.2 Determinación de la CML del LAE contra *Salmonella* Saintpaul

La inhibición de la bacteria *S. Saintpaul* se determinó utilizando el LAE como antimicrobiano a concentraciones en un intervalo de 30 a 200 mg/L. El reto antimicrobiano se llevó a cabo en tubos de ensaye con CST junto con el antimicrobiano a la concentración deseada, además de un inóculo de 10^6 UFC/mL del microorganismo y se incubaron a 37 ± 1 °C por 24 h. Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) se midió la densidad óptica a 600 nm, y para la concentración mínima bactericida (CMB) se realizaron diluciones sucesivas para poder determinar el número de células viables usando el método de extensión por superficie en placas con AST de acuerdo con lo reportado por López-Malo *et al.*, (2005) y Becerril *et al.*, (2013).

6.2.2.1 Viabilidad celular

Con el objetivo de visualizar el efecto inhibitorio del LAE sobre las células de *S. Saintpaul*, se llevó a cabo un estudio de microscopía de fluorescencia utilizando el kit de viabilidad celular Live/Dead BacLight™ (Molecular Probes, Oregon, EUA) de acuerdo con lo reportado por Ercolini *et al.*, (2006). Se utilizó un cultivo de 10^6 UFC/mL de *S. Saintpaul* en su fase exponencial, el cual se expuso a la CMB del LAE establecida en el apartado 7.1.2, y un cultivo sin la adición del antimicrobiano como control; cada muestra se filtró a través de una membrana negra de policarbonato de 25 mm de diámetro y 0.4 μ m de tamaño de poro (Whatman, NJ, EUA). Una vez adheridas las células a la membrana, ésta se tiñó utilizando 100 μ L de una solución stock formada por dos fluorocromos, el SYTO-9 (20 mM) (fluorescencia verde), el cual tiene la capacidad de penetrar la membrana celular de

las bacterias y el yoduro de propidio (3.34 mM) (fluorescencia roja), el cual solo puede penetrar la membrana celular de aquellas bacterias cuya membrana se encuentra dañada, mezclados en una relación 0.003:1 en agua destilada y se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente por 15 min. Finalmente, las células se visualizaron en un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioskop 40, FICT Filter, Göttingen, Alemania), acoplado con una cámara AxioCam MRc, utilizando el software de imágenes ZEN pro 2012 versión 1.1.2.0. El conteo celular se llevó a cabo de forma aleatoria tomando en cuenta 10 campos de cada tratamiento con la ayuda del programa Image J version 1.49 m (Rasband, 2007) y los resultados se expresaron cómo % de células por campo.

6.2.3 Determinación del efecto combinado de los antimicrobianos contra *R. stolonifer*, *C. gloesporioides* y *B. cinerea*.

Una vez obtenida la CMF individual de los antimicrobianos LAE y NAT contra los hongos deterioradores *R. stolonifer*, *C. gloesporioides* y *B. cinerea*, se determinó su efecto combinado. El reto antimicrobiano se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.2.1, donde la CMF de cada antimicrobiano fueron los límites máximos de los cuales se partió. Posteriormente fracciones individuales fijas (desde 0.1, 0.2 hasta 0.9) de un antimicrobiano se probaron en mezcla con concentraciones variables del otro antimicrobiano, hasta obtener la concentración mínima que logró la inhibición completa de los tres hongos deterioradores. La combinación efectiva de cada antimicrobiano se obtuvo estimando la concentración fraccional inhibitoria (*FIC*, por sus siglas en inglés) (ecuación 1), definida como la suma del cociente de la concentración inhibitoria de cada antimicrobiano en la mezcla (CI_M), entre su concentración inhibitoria de manera individual (*CMF*) (ecuación 2) y mediante la construcción de un isobograma (López-Malo *et al.*, 2005; Brandt *et al.*, 2010).

$$FIC_{index} = FIC_A + FIC_B \quad [1]$$

Dónde:

$$FIC = \frac{CI_M}{CMF} \quad [2]$$

6.2.4 Evaluación del efecto de la combinación de antimicrobianos incorporados en una matriz formadora de recubrimientos comestibles.

La efectividad de los agentes antimicrobianos generalmente se ve reducida cuando se incorporan en matrices poliméricas complejas que formarán un recubrimiento comestible, debido a su interacción con los demás componentes que la forman (Dashipour *et al.*, 2015). Para evaluar el efecto inhibitorio de la combinación de antimicrobianos incorporados en una matriz formadora de recubrimientos comestibles contra el crecimiento de *R. stolonifer*, *C. gloeosporioides*, *B. cinerea* y *S. Saintpaul*, se partió de la formulación propuesta por Arredondo-Ochoa *et al.*, (2017) para la obtención de películas comestibles a base de ACLS u OS (3% p/p) y CA (1% p/p) que presentaron las mejores características fisicoquímicas, mecánicas y de barrera.

Por lo anterior, la combinación de antimicrobianos obtenida en el apartado 7.1.3, se incorporó en concentraciones 1x, 5x y 10x (Cuadro 7). La actividad antimicrobiana se evaluó en círculos de 10 mm de diámetro de la suspensión filmogénica que se pusieron en contacto con una concentración de 10^5 esporas/mL de cada hongo en cajas con APD, las cuales se incubaron a 28 ± 1 °C por 24 h, y en cajas con AST inoculadas con una concentración de 10^5 UFC/mL de la bacteria, las cuales se incubaron a 37 ± 1 °C durante 24 h. El efecto antimicrobiano se determinó mediante el diámetro del halo de inhibición (mm) para cada microorganismo.

Cuadro 7. Combinación de antimicrobianos incorporados en la suspensión filmogénica

| Nivel | LAE (mg/L) | NAT (mg/L) |
|--------------|-------------------|-------------------|
| 1x | 400 | 80 |
| 5x | 2000 | 400 |
| 10x | 4000 | 800 |

6.2.5 Análisis térmico de la cera de abeja

El comportamiento térmico de la CA se evaluó usando un calorímetro diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) (Q200 TA Instruments, DE, EUA), equipado con un sistema de refrigeración interna, utilizado indio de alta pureza como estándar y nitrógeno seco como gas de purga. El proceso se llevó a cabo pesando 10 mg de CA en una bandeja de aluminio herméticamente sellada. La muestra se equilibró a 90 °C antes de enfriarse a -40 °C, a una velocidad de 10 °C/min, manteniéndose isotérmicamente a dicha temperatura durante 10 min, para posteriormente recalentarse a 90 °C a 5 °C/min. Las mediciones se realizaron por triplicado y las curvas térmicas obtenidas para los procesos de cristalización y fusión, se expresaron como el flujo de calor (W/g) en función de la temperatura (°C). A partir de dichos termogramas se estimó la temperatura de inicio y el pico máximo (°C) de cristalización y fusión respectivamente, mientras que las entalpías para cada proceso (J/g) se determinaron integrando el área bajo la curva de cada termograma en el rango 10-80 °C, usando el software Universal 2000 V 4.5 (TA Instruments) (Buchwald *et al.*, 2008).

6.2.6 Formulación de la nanoemulsión a base de almidón, cera de abeja y antimicrobianos naturales.

Se formuló a partir de una dispersión acuosa del OS (3% p/p) y sorbitol no cristizable (2.4% p/p), la cual se calentó a 85 °C durante 20 min bajo agitación

magnética para completar la gelatinización del almidón. Posteriormente, se añadió la CA (1% p/p) fundida, junto con la morfolina (0.15% p/p) como co-disolvente y el emulsionante seleccionado en proporciones variables (p/p): CA:AE (5:1), CA:T80 (1:2.5) o CA:T80/S60 (1:2.5), de acuerdo con lo reportado por Hagenmaier y Baker (1997), Muscat *et al.*, (2013) y Santos *et al.*, (2014), respectivamente con modificaciones. Finalmente, se incorporó la mezcla de dos agentes antimicrobianos [LAE (0.2% p/p) y NAT (0.04% p/p)] según lo reportado por Arredondo-Ochoa *et al.*, (2017).

Para la obtención de las nanoemulsiones, las emulsiones primarias fueron sometidas a tres procesos diferentes de emulsificación: homogeneización utilizando un mezclador de alta velocidad (IKA T25-Ultra-Turrax, DE, EUA) a 21.500 rpm durante 3 min; ultrasonido durante 5 min continuos, a 20 kHz de frecuencia y 75% de amplitud usando un sonicador (VCX 500 Vibra-Cell, CT, EUA) o altas presiones utilizando un microfluidizador (M110P Nano DeBEE, Easton, MA, EE. UU.) a 150 MPa durante 3 ciclos (Salvia-Trujillo *et al.*, 2014; Sánchez-Ortega *et al.*, 2016).

Con el objetivo de establecer la mejor condición para obtener una nanoemulsión antimicrobiana estable, se partió de un diseño factorial 3^2 (Cuadro 8), donde los factores principales fueron el tipo de emulsionante y el proceso de emulsificación con tres niveles cada uno, mientras que las variables de respuesta fueron las propiedades fisicoquímicas, reológicas, de mojabilidad y antimicrobianas. Finalmente, las nanoemulsiones obtenidas se almacenaron a 4 ± 1 °C para su posterior caracterización.

Cuadro 8. Diseño 3² para la obtención de la nanoemulsión antimicrobiana a base de almidón y cera de abeja

| Tratamiento | Tipo de emulsionante | Tipo de emulsificación |
|--------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 1 | AE | Homogeneización |
| 2 | AE | Ultrasonido |
| 3 | AE | Microfluidización |
| 4 | T80 | Homogeneización |
| 5 | T80 | Ultrasonido |
| 6 | T80 | Microfluidización |
| 7 | T80/S60 | Homogeneización |
| 8 | T80/S60 | Ultrasonido |
| 9 | T80/S60 | Microfluidización |

*AE: Ácido esteárico; T80: Tween 80; S60: Span 60

6.2.7 Caracterización fisicoquímica de las nanoemulsiones

6.2.7.1 Tamaño de partícula e índice de polidispersión (IPD)

El tamaño de partícula de las nanoemulsiones se determinó utilizando un Zetasizer Nano ZS (ZEN 3600 Malvern, Worcestershire, RU), mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés), trabajando a 633 nm a 25 °C con un detector de retrodispersión a 173 °. Las muestras se diluyeron previamente con agua ultrapura (1:20) para evitar múltiples efectos de dispersión. Las curvas de distribución del tamaño de partícula en función de la intensidad (%), el tamaño de partícula (nm) y el IPD se utilizaron para caracterizar la dispersión de las partículas de CA en las emulsiones (Kaszuba *et al.*, 2008).

6.2.7.2 Potencial zeta

La carga superficial de las partículas de CA de las nanoemulsiones se evaluó midiendo su movilidad electroforética al aplicarse un campo eléctrico mediante la técnica del análisis de fase de la luz dispersada (PALS, por sus siglas en inglés), usando un Zetasizer Nano ZS (ZEN 3600 Malvern, Worcestershire, RU). Los valores de potencial zeta (mV), se obtuvieron aplicando el modelo de Smoluchowski utilizando el software del equipo (Kaszuba *et al.*, 2010).

6.2.7.3 pH

El pH se obtuvo directamente de las nanoemulsiones utilizando un potenciómetro (HI-2216 Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA).

6.2.7.4 Color

El color de las nanoemulsiones se determinó con un colorímetro (CR-400 Konica Minolta, Osaka, Japón), configurado para un iluminante D65 y un ángulo de observación de 10 °, calibrado previamente con una placa blanca. Se determinaron las coordenadas colorimétricas propuestas por la CIELAB usando los parámetros L^* , a^* y b^* , las cuales fueron utilizadas para calcular el índice de blancura (IB) de las nanoemulsiones mediante la ecuación (3) (Vargas *et al.*, 2008):

$$IB = 100 - [(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}]^{0.5} \quad [3]$$

6.2.8 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las nanoemulsiones se observaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión (JEM-1010 JEOL, Peabody, MA, EUA.) con la finalidad de obtener una medición directa del tamaño de partícula y la forma de la gota. Se realizó una tinción negativa, donde la muestra se absorbió sobre rejillas de cobre-paladio recubiertas

con carbono durante 1 min, y para posteriormente teñirse con una una gota de molibdato de amonio al 2% (p/v) a pH 6.5, durante 1 min. Las cuadrículas se observaron al microscopio con un voltaje de aceleración de 80 kV y las imágenes se obtuvieron utilizando un software de micrografía digital 3.1 (Salvia-Trujillo *et al.*, 2013).

6.2.9 Comportamiento reológico de las nanoemulsiones

El comportamiento reológico de las nanoemulsiones se determinó mediante pruebas de flujo de corte simple y oscilatorias, utilizando un reómetro de esfuerzo controlado (AR-G2, TA Instruments, New Castle, DE, EUA.), equipado con una geometría de doble cilindro concéntrico (21.96 mm de diámetro exterior, 20.38 mm de diámetro interior, 59.50 mm de altura y 500 m de separación desde la base), a 25.0 ± 0.1 ° C controlado por un baño recirculador (Cole Parmer Polystat y Peltier AR-G2). La estimación de la viscosidad (η) en función de la velocidad de cizallamiento o corte ($\dot{\gamma}$) se realizó en el rango de 1-300 1/s; mientras que el flujo de cizallamiento oscilatorio se usó para estimar las propiedades viscoelásticas (módulo elástico, G' y módulo viscoso, G''), en un rango de frecuencia de 0.1 - 100 rad/s en el régimen viscoelástico lineal. Las mediciones se llevaron a cabo por duplicado y los datos experimentales se analizaron directamente con el software TA Reology Advantage Data Analysis V.5.7.0 (TA Instruments, Crawley, Reino Unido) (Medina-Torres *et al.*, 2016).

6.2.10 Análisis de la mojabilidad de las nanoemulsiones

El coeficiente de mojabilidad (W_s) (ecuación 4) define la capacidad que tienen las nanoemulsiones para adherirse a la superficie de un alimento al ser aplicadas como un recubrimiento comestible. Está determinado por el equilibrio entre las fuerzas adhesivas (W_a) del líquido sobre el sólido (ecuación 5) y las fuerzas cohesivas (W_c) del propio líquido (ecuación 6) expresadas en mN/m, las cuales involucran la acción de tres fuerzas superficiales: la tensión líquido-vapor (γ_{LV}), la tensión sólido-vapor (γ_{SV}) y la tensión sólido-líquido (γ_{SL}) (ecuación 7). El

coeficiente de mojabilidad, el cual se expresó en unidades de mN/m, siempre tenderá ser ≤ 0 , en donde mientras más cercano al cero, mejor será el mojado de la superficie (Choi *et al.*, 2002).

$$W_s = W_a - W_c \quad [4]$$

Dónde:

$$W_a = \gamma_{LV} + \gamma_{SV} - \gamma_{SL} \quad [5]$$

$$W_c = 2\gamma_{LV} \quad [6]$$

Por lo que:

$$W_s = W_a - W_c = (\gamma_{LV} + \gamma_{SV} - \gamma_{SL}) - 2\gamma_{LV} = \gamma_{SV} + \gamma_{SL} - \gamma_{LV} \quad [7]$$

6.2.10.1 Determinación de la tensión superficial sólido-vapor (γ_{SV})

La γ_{SV} , también conocida como tensión superficial crítica, se calculó de acuerdo con el método propuesto por Zisman (1964), basado en el ángulo de contacto (θ) que forma el líquido sobre una superficie. La estimación del θ se determinó analizando la dispersión de una gota (9 μ L) de diferentes líquidos de referencia (etilenglicol, formamida, glicerol, metanol, propilenglicol y agua desionizada) con una tensión superficial conocida, sobre la superficie horizontal del tomate durante un tiempo de contacto de 60 s, utilizando un equipo de ángulo de contacto DSA30 (KRUS, Hamburgo, Alemania). Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el software DSA4 del mismo equipo. Finalmente, se llevó a cabo un gráfico Zisman de la tensión superficial de cada líquido frente a su correspondiente $\cos(\theta)$, y la extrapolación de la curva cuando $\cos(\theta)=1$ correspondió al valor de γ_{SV} (Skurtys *et al.*, 2011).

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

La γ_{LV} , la cual toma en cuenta las fuerzas implicadas en los límites del líquido con el aire que está en contacto, se midió utilizando un tensiómetro superficial (CSC Scientific, VA, EUA) equipado con un anillo de platino de 6 cm de diámetro, suspendido de una balanza de torsión que mide la fuerza de empuje necesaria para separar el anillo de la superficie del líquido, de acuerdo con el método del anillo de Du Nouy (Harkins y Jordan, 1930). Además, se introdujo un factor de corrección (F) (ecuación 8) propuesto por Zuidema & Waters (1941):

$$F = 0.7250 + \left(\frac{0.01452 P}{C^2 (D-d)} + 0.04534 - \frac{1.679 r}{R} \right)^{0.5} \quad [8]$$

donde C es la circunferencia media del anillo, D la densidad del líquido problema, d la densidad del aire saturado en la superficie del líquido medido a 25 ° C, r el diámetro del cable del anillo y R el diámetro del anillo.

6.2.10.3 Determinación de la tensión superficial sólido-líquido (γ_{SL})

La γ_{SL} considera las fuerzas implicadas en los límites del líquido y la superficie que se quiere recubrir. Se calculó a partir de la ecuación de Young (ecuación 9), considerando la γ_{SV} y la γ_{LV} , previamente estimadas. El θ formado por cada nanoemulsión en la superficie del tomate se midió de acuerdo con la metodología descrita en la sección (6.2.7.1) (Ramírez *et al.*, 2012).

$$\cos \theta = (\gamma_{SV} - \gamma_{SL}) / \gamma_{LV} \quad [9]$$

6.2.11 Actividad antimicrobiana de las nanoemulsiones

La actividad antimicrobiana de las nanoemulsiones se evaluó contra los tres hongos deterioradores (*R. stolonifer*, *C. gloeosporioides* y *B. cinerea*) y la bacteria

patógena (*S. Saintpaul S70*) evaluados anteriormente. El reto antimicrobiano se realizó poniendo en contacto 20 μL de cada nanoemulsión con 10^5 UFC/mL de cada microorganismo en placas con APD para los hongos deterioradores, las cuales se incubaron a 28 ± 1 ° C durante 24 h y en placas con AST para la bacteria patógena, a 37 ± 1 ° C durante 24 h. El efecto antimicrobiano se determinó mediante el diámetro del halo de inhibición (mm) para cada microorganismo (Zahid *et al.*, 2012).

6.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo para la caracterización fisicoquímica, reológica, de mojabilidad y antimicrobiana de las nanoemulsiones, de acuerdo con el diseño experimental propuesto en el apartado 6.2.3.2, donde cada variable respuesta se midió por triplicado y los resultados se expresaron como el promedio \pm desviación estándar, los cuales fueron analizados haciendo una comparación de medias mediante una prueba Tukey con un nivel de significancia de $p < 0.05$, utilizando el paquete estadístico JMP versión 5.0.1 (NC, EUA).

7. RESULTADOS

7.1 CML de los antimicrobianos naturales contra *R. stolonifer*, *C. gloesporioides*, y *B. cinerea*.

En la Figura 6 se muestran los resultados de la CMF del LAE para *R. stolonifer*, *C. gloesporioides* y *B. cinerea*, donde partiendo de un control de 5.3 ± 0.2 log, a una concentración de 800 mg/L se logró la completa inhibición de los tres hongos, sin presentar crecimiento durante su monitoreo hasta el quinto día de incubación (Figura 7). Hasta el momento no existen reportes acerca del uso del LAE en la inhibición de estos hongos deterioradores, sin embargo, Higuera *et al.*, (2013) reportó un efecto inhibitorio del LAE contra *Aspergillus niger* (320 mg/L), *Penicillium chrysogenum* (280 mg/L) y *Cladosporium cladosporioides* (80 mg/L), los cuales también son considerados deterioradores de frutos frescos.

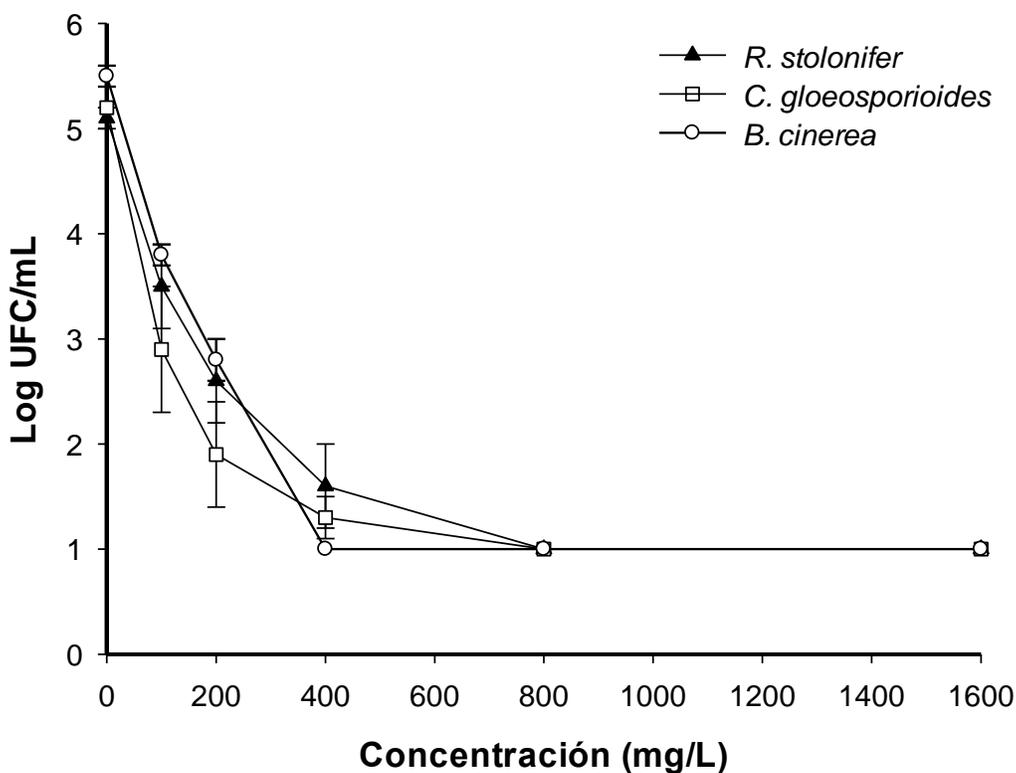


Figura 6. CMF del LAE contra *R. stolonifer*, *C. gloesporioides* y *B. cinerea*

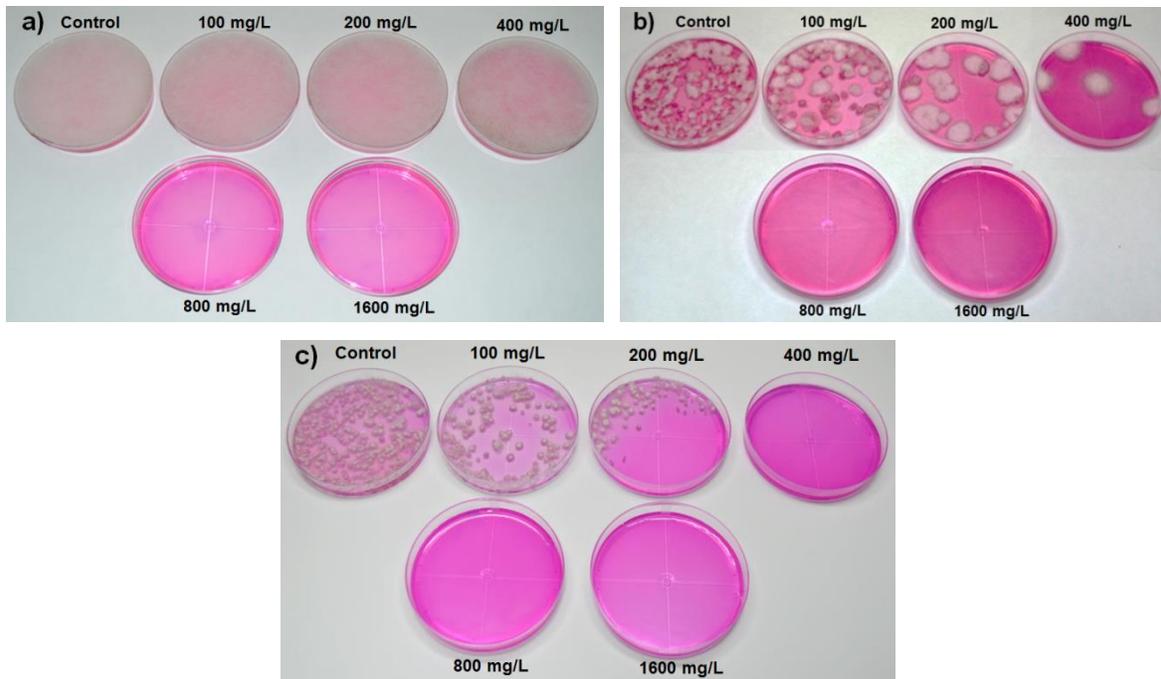


Figura 7. Monitoreo del crecimiento al quinto día de incubación en presencia del LAE. a) *R. stolonifer*; b) *C. gloeosporioides*; c) *B. cinerea*

Por su parte, la natamicina, cuyo espectro de inhibición es específico sobre mohos y levaduras, a una concentración de 160 mg/L se logró la completa inhibición de *R. stolonifer*, *C. gloeosporioides* y *B. cinerea* (Figura 8), obteniendo una reducción de hasta 4.3 log, sin presentar crecimiento durante su monitoreo hasta el quinto día de incubación (Figura 9). Por su parte, concentraciones menores del uso de la NAT fueron reportadas por Delves-Broughton *et al.*, (2005) contra *B. cinerea* (25 mg/L) y otros hongos deterioradores como *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. y *Penicillium expansum* (10 mg/L), partiendo de un control menor de tan solo 10^4 esporas/mL.

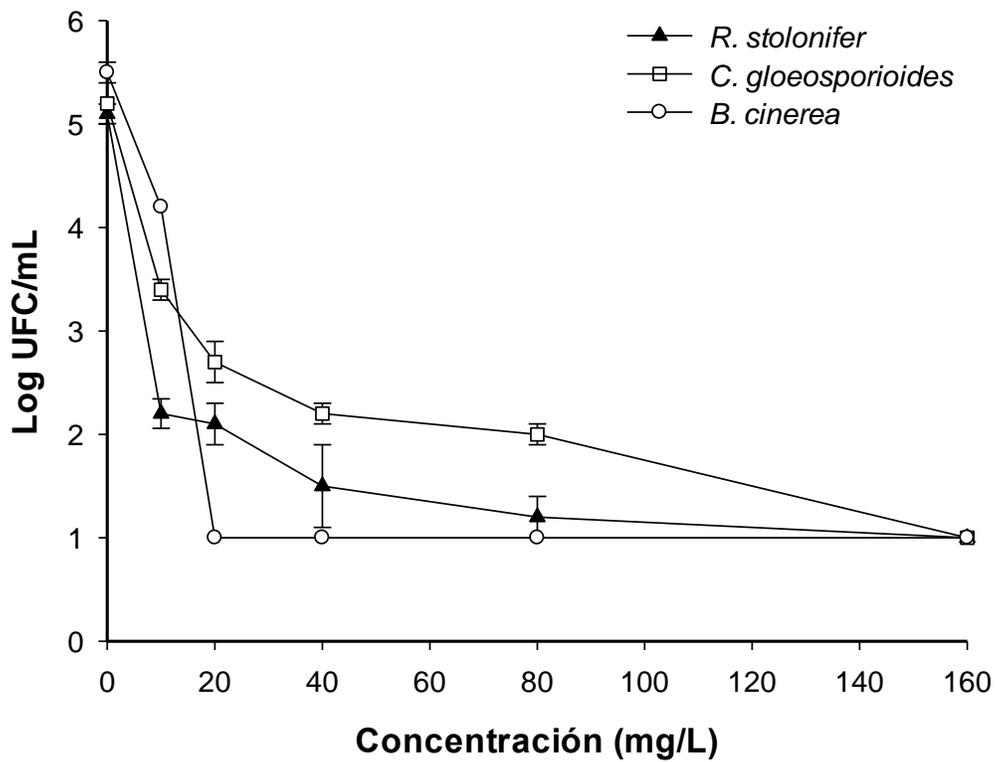


Figura 8. CMF de NAT contra *R. stolonifer*, *C. gloeosporioides* y *B. cinerea*

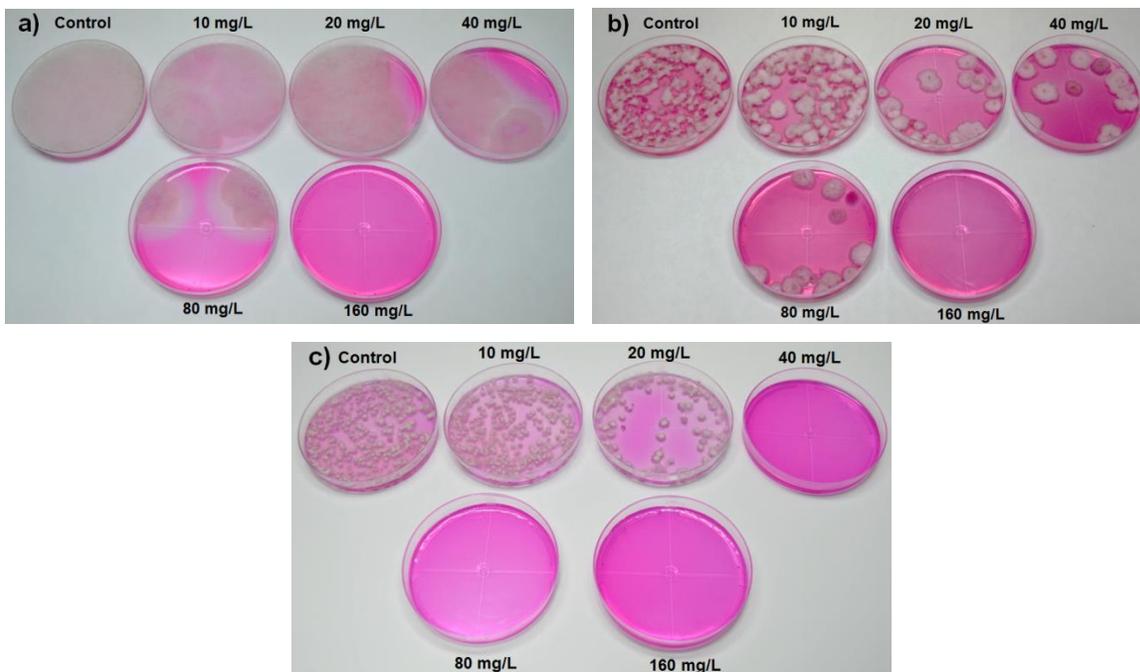


Figura 9. Monitoreo del crecimiento al quinto día de incubación en presencia de NAT. a) *R. stolonifer*; b) *C. gloeosporioides*; c) *B. cinerea*

7.2 CMI del LAE contra *Salmonella Saintpaul*.

Con respecto de la bacteria *S. Saintpaul*, en la Figura 10 se muestra la CMI del LAE, obteniendo una absorbancia de 0.278 ± 0.066 nm a 200 mg/L de LAE, presentando turbidez aquellos tratamientos en los que se utilizó las concentraciones más altas de LAE (Figura 11), sin embargo no podemos concluir que éste comportamiento se deba a un crecimiento por parte de la bacteria, sino a una posible interacción del antimicrobiano con el medio de cultivo en el que se llevó a cabo el reto antimicrobiano, por lo que se decidió llevar a cabo el conteo en placa.

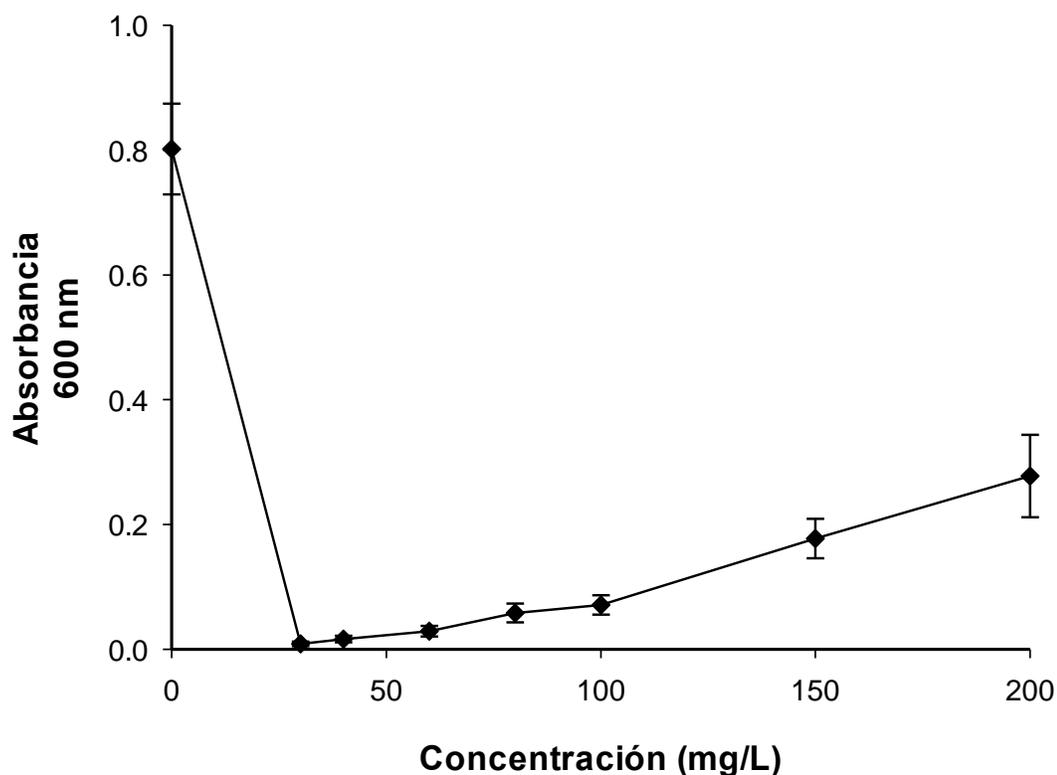


Figura 10. CMI del LAE contra *S. Saintpaul*

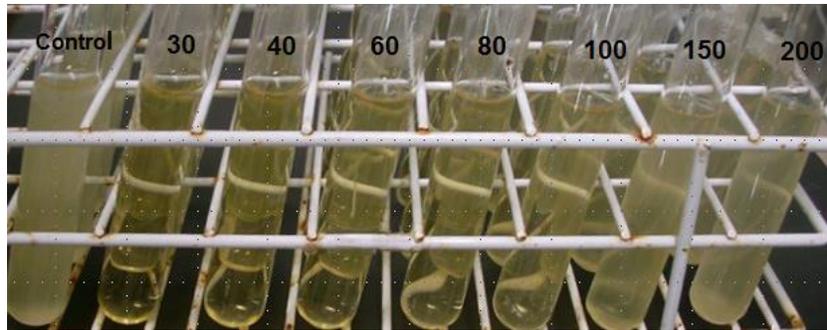


Figura 11. Efecto de la concentración del LAE sobre la turbidez en el medio de cultivo

Bonnaud *et al.*, (2010) reportan que el LAE, en soluciones ligeramente ácidas, se encuentra presente en forma de pequeñas micelas que no dispersan la luz y, por lo tanto, conducen a un sistema transparente, pero si existe una interacción con cualquiera de los grupos aniónicos en otras moléculas, puede formar complejos que pueden llegar a ser suficientemente grandes para dispersar la luz y tiendan a sedimentar, teniendo como consecuencia la presencia de turbidez en dicha solución.

En la Figura 12 se muestran los resultados obtenidos para la CMB del LAE contra la bacteria *S. Saintpaul*, donde partiendo de un control de 8.3 ± 0.2 log se encontró un efecto inhibitorio a una concentración de 100 mg/L de LAE, y se concluye que efectivamente la turbidez que se presentó en los tubos del reto antimicrobiano fue debido a una interacción del LAE con el medio de cultivo sin afectar con ello su poder antimicrobiano.

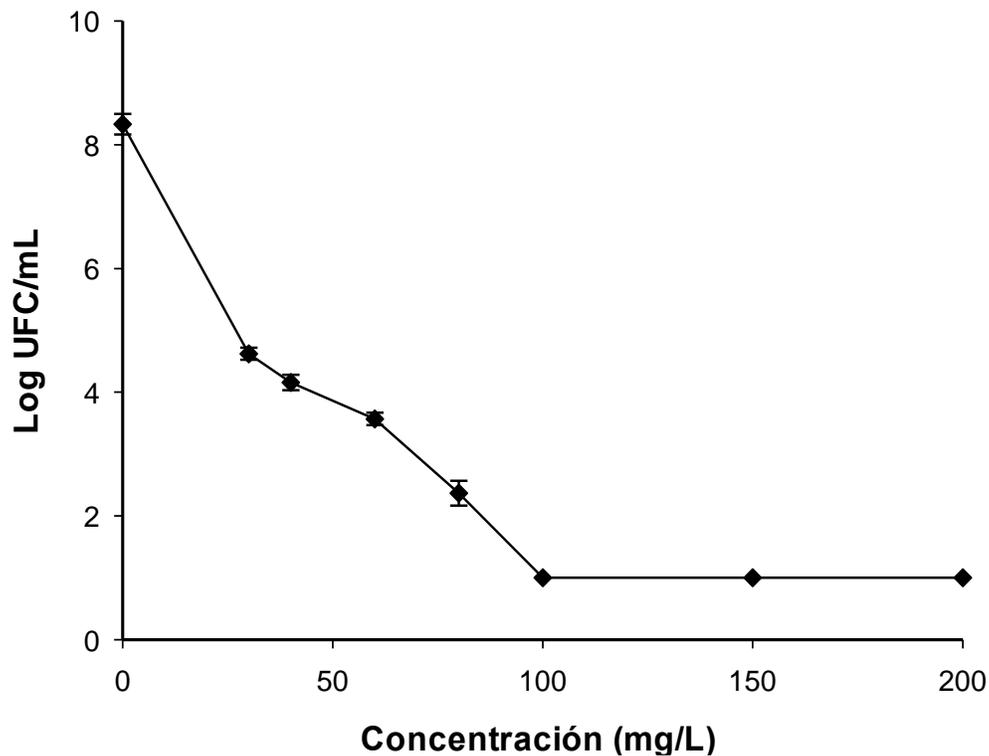


Figura 12. CMB del LAE contra *S. Saintpaul*

Becerril *et al.*, (2013) y Ma *et al.*, (2013) reportan el uso del LAE como antimicrobiano en la inhibición de *Salmonella enterica*, donde partiendo de un inóculo de 10^5 UFC/mL, a concentraciones de 23.5 mg/L y 25 mg/L respectivamente, logran la completa inhibición de dicha bacteria.

7.2.1 Viabilidad celular

Tomando en cuenta que la CMB del LAE encontrada en la inhibición de *S. Saintpaul* fue de 100 mg/L, el estudio de viabilidad celular se llevó a cabo utilizando dicha concentración. En la Figura 13 se muestran los resultados obtenidos del conteo celular, obteniendo para las muestras control un 96.4 % de células verdes (vivas), mientras que solo una pequeña porción (3.6 %) mostró una tinción roja (Figura 14a). Por el contrario, un 98.8 % de células tratadas con el LAE mostraron una coloración roja (muertas) con tan solo un tiempo de contacto de 15 min (Figura

14b). Resultados similares fueron reportados por Rodríguez *et al.*, (2004) para *Salmonella typhimurium* expuesta a 32 mg/L de LAE, obteniendo un 90.7 % células rojas, con un mayor tiempo de contacto (30 min).

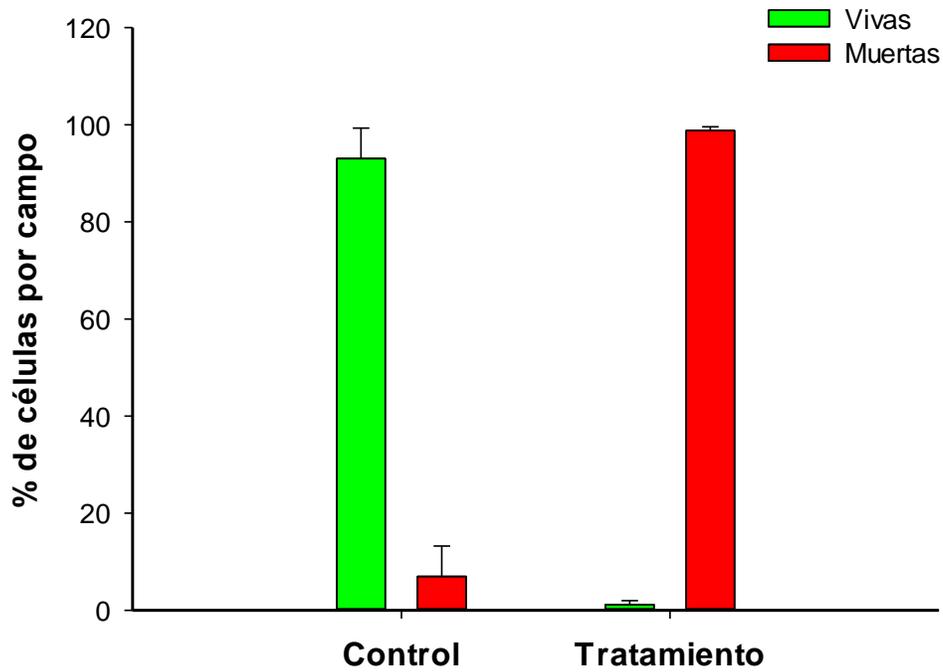


Figura13. Conteo celular de *S. Saintpaul*

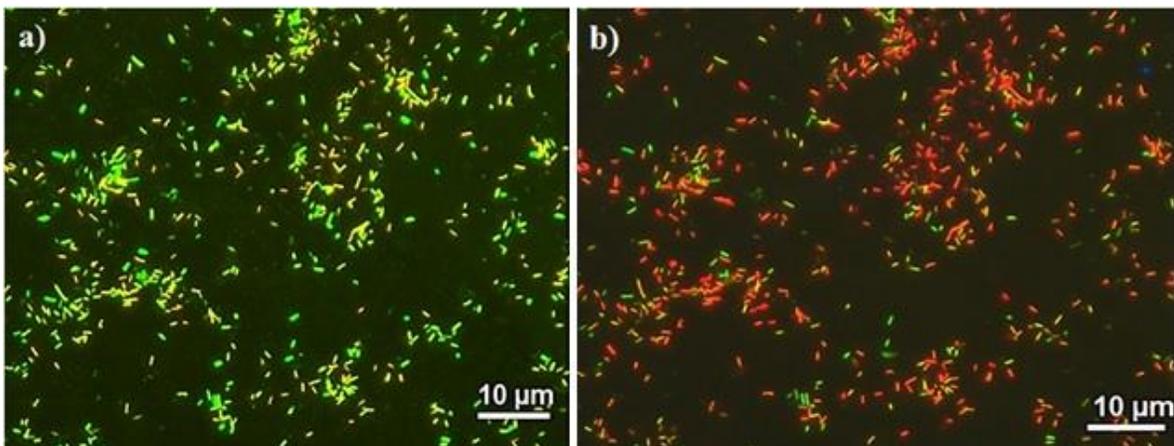


Figura 14. Viabilidad celular de *S. Saintpaul* a) Células control; b) Células tratadas con LAE (100 mg/L)

Ésta técnica de fluorescencia ha sido ampliamente utilizada y reportada por otros autores para visualizar el efecto de una amplia gama de antimicrobianos sobre diferentes microorganismos. Ercollini *et al.*, (2006) reportó el efecto de una película de polietileno incorporada de una bacteriocina (*Lactobacillus curvatus* 32Y) sobre la inhibición de *L. monocytogenes*, obteniendo un decremento en las células vivas con un tiempo de contacto de 2 h. Así mismo, Ghosh *et al.*, (2013) mostró el efecto antimicrobiano de una nanoemulsión de aceite de albahaca diluida 10 veces sobre *E. coli*, mostrando una destrucción total de las células, después de un tiempo de exposición de 30 min.

7.3 CML de la mezcla de antimicrobianos contra *R. stolonifer*, *C. gloesporioides* y *B. cinerea*.

A pesar de que se lograron encontrar las concentraciones individuales por parte de los antimicrobianos LAE (800 mg/L) y NAT (160 mg/L) en la inhibición de *R. stolonifer*, *C. gloesporioides* y *B. cinerea*, éstas fueron considerablemente altas. Teniendo como antecedente que el LAE es efectivo en la inhibición tanto de bacterias como de hongos, mientras que la NAT solamente controla el crecimiento de hongos, se propuso realizar la combinación de los agentes antimicrobianos con la finalidad de evaluar su efecto en la inhibición de los tres hongos y con ello disminuir la concentración de cada antimicrobiano.

Como resultado de las fracciones individuales probadas se lograron obtener diferentes combinaciones que mostraron un efecto inhibitorio para los tres hongos, sin embargo, la combinación que resultó efectiva utilizando la menor concentración de antimicrobianos fue de 400 mg/L LAE y 80 mg/L NAT, sin afectar la MCB encontrada para *S. Saintpaul*. El FIC_{index} fue calculado como: $FIC_{LAE} + FIC_{NAT} = 0.5 + 0.5 = 1$ indicando un efecto aditivo, que se produce cuando el efecto inhibitorio de la combinación del LAE y NAT es equivalente a la suma de los efectos de cada antimicrobiano de forma independiente. Por su parte, valores de $FIC_{index} < 1$

indican efecto sinérgico, mientras que $FIC_{index} > 1$ indica efecto antagonista (López-Malo *et al.*, 2005).

Así mismo, en la Figura 15 se muestra el isoblograma obtenido como resultado de las combinaciones de ambos antimicrobianos, donde en el eje de las abscisas se representan las concentraciones efectivas obtenidas para la NAT y en el eje de las ordenadas, las concentraciones efectivas obtenidas para el LAE. Al situar en los extremos las CMF de ambos antimicrobianos y unir los puntos de las combinaciones donde se obtuvo inhibición, nos da como resultado una línea recta la cual representa un efecto aditivo.

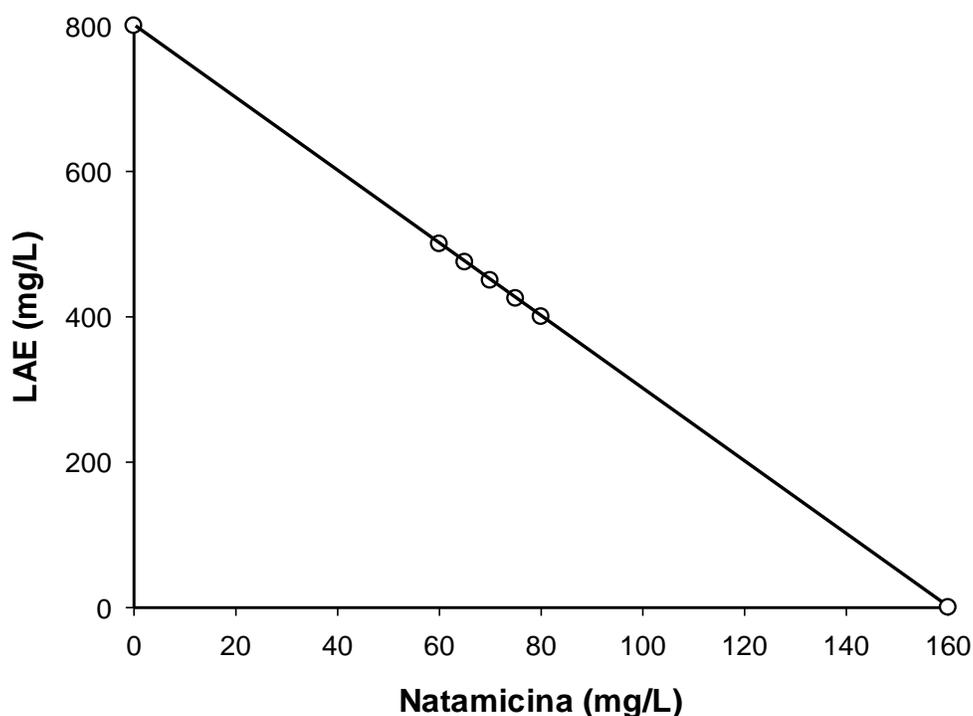


Figura 15. Isoblograma de la mezcla de LAE y NAT

Hasta el momento no existen reportes del uso combinado del LAE con la NAT, sin embargo, Ma *et al.*, (2016) reporta un efecto sinérgico del uso combinado del LAE con aceite esencial de canela contra *L. monocytogenes* y un efecto

antagonista contra *E. coli* y *S. entérica*, sin embargo, la incorporación de EDTA como antimicrobiano mejoró la actividad de LAE y superó el efecto antagónico de la combinación del LAE con el aceite esencial de canela. Por otro lado, Brandt *et al.*, (2010) reporta un efecto aditivo con la combinación del LAE y nisina, un efecto sinérgico de la nisina con sulfato de calcio ácido, y un efecto antagónico de la ϵ -polilisina con sulfato de calcio ácido en la inhibición de *L. monocytogenes*.

7.4 Evaluación del efecto antimicrobiano en una matriz filmogénica

En la Figura 16 se muestran los resultados obtenidos del efecto antimicrobiano de las películas comestibles a base de ACLS, donde las zonas inhibitorias se observan cuando la combinación de antimicrobianos es incorporada a partir de 5x y 10x, obteniendo un halo de inhibición de 20.0 ± 2.0 mm para *R. stolonifer*, de 29.7 ± 1.9 mm para *C. gloeosporioides*, de 22.7 ± 2.0 mm para *B. cinerea* y de 14.0 ± 1.5 mm para *S. Saintpaul*.

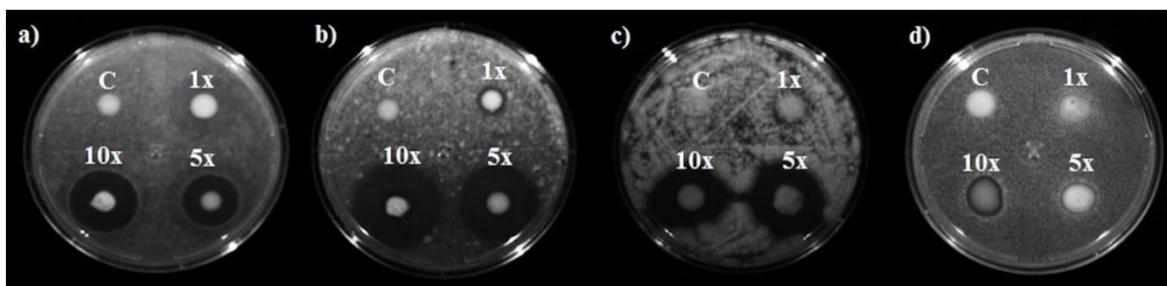


Figura 16. Efecto antimicrobiano de las películas comestibles a base de ACLS contra a) *R. stolonifer*; b) *C. gloeosporioides*; c) *B. cinerea*; d) *S. Saintpaul*

El mismo efecto se presentó para las películas comestibles a base de OS (Figura 17), obteniendo un halo de inhibición de 25.7 ± 1.0 mm para *R. stolonifer*, de 27.3 ± 2.4 mm para *C. gloeosporioides*, de 20.5 ± 1.2 mm para *B. cinerea*, y de 14.0 ± 1.5 mm para *S. Saintpaul*.

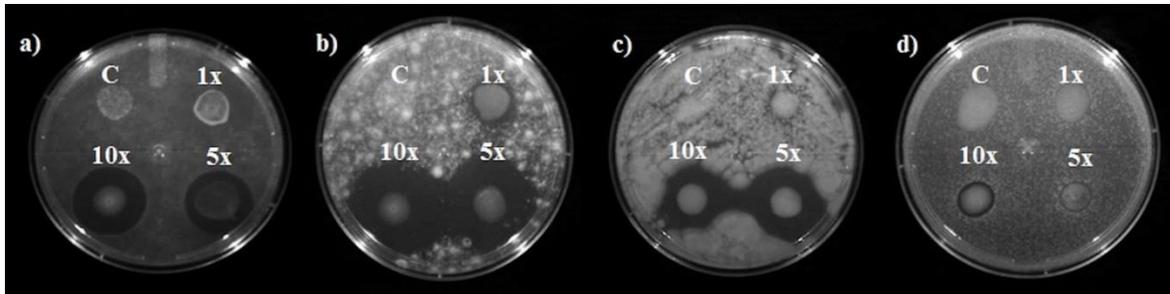


Figura 17. Efecto antimicrobiano de las películas comestibles a base de OS contra
a) *R. stolonifer*; b) *C. gloeosporioides*; c) *B. cinerea*; d) *S. Saintpaul*

El aumento en la concentración de antimicrobianos se hace necesaria cuando son incorporados dentro de una matriz compleja como lo son las películas comestibles debido a la interacción con los demás componentes que forman el empaque, además de que la superficie de la película se comporta como una barrera, disminuyendo el poder de difusividad del antimicrobiano a través de ésta.

Este efecto ya ha sido reportado anteriormente por Higuera *et al.*, (2013) en películas comestibles a base de quitosano incorporando LAE como antimicrobiano en concentraciones que van desde 10 000 hasta 100 000 mg/L para la inhibición *S. entérica* obteniendo halos de inhibición de 11.9 ± 0.9 hasta 14.2 ± 0.4 mm. Por el contrario, dichas concentraciones de LAE no fueron suficientes para lograr un efecto inhibitorio contra los hongos deterioradores *A. niger*, *Cladosporium cladosporioides* y *Penicillium chrysogenum*. Así mismo, Da-Silva *et al.*, (2013) reportan la incorporación de la NAT en una concentración de 600 mg/L en películas comestibles a base de quitosano y alginato en la inhibición de tres hongos deterioradores de queso: *Debaromyces hansenii*, *P. commune* y *P. roqueforti*.

7.5 Propiedades térmicas de la cera de abeja

El comportamiento térmico de la CA se evaluó a través de un termograma (Figura 18), donde para el proceso exotérmico se estimó una temperatura de inicio de la cristalización (T_{oc}) de 61.47 ± 0.02 ° C. Esta curva exhibió dos picos, donde el

pico máximo de cristalización (T_c) fue a 57.15 ± 0.09 ° C, con una entalpía de cristalización (ΔH_c) de -186.15 ± 1.34 J/g. Para el proceso endotérmico, se observó una temperatura de inicio de fusión (T_{of}) de 50.64 ± 0.04 ° C, que muestra dos picos, donde el pico máximo de fusión (T_f) fue de $63.09 \pm 0,06$ ° C, con una entalpía de fusión (ΔH_f) de 188.85 ± 0.35 J/g. La presencia de diferentes picos en el comportamiento térmico de la CA, puede atribuirse a la composición heterogénea que la conforma (Attama *et al.*, 2006). Estos picos representan la cristalización o fusión de distintos componentes, tales como ácidos grasos (12-14%), monoésteres e hidroximonoésteres (35-45%), complejos de ésteres (15-27%), hidrocarburos de cadena lineal (principalmente C33) (12-16%) y otros componentes menores (Aichholz y Lorbeer, 1999; Buchwald *et al.*, 2008). Por otro lado, las propiedades térmicas de la CA obtenidos en el presente análisis concuerdan con los reportado por Yilmaz y Ogutou (2014) para una CA comercial (KahlWax, Kahl GmbH, Trittau, Alemania), excepto la ΔH_c (8% más pequeño) y ΔH_f (7.6% más pequeño), lo cual puede atribuirse a una variación en la composición de la CA. Finalmente, la estimación de los parámetros térmicos de la CA definió las condiciones mínimas de temperatura a partir de las cual se formaron las nanoemulsiones, evitando su solidificación durante el proceso.

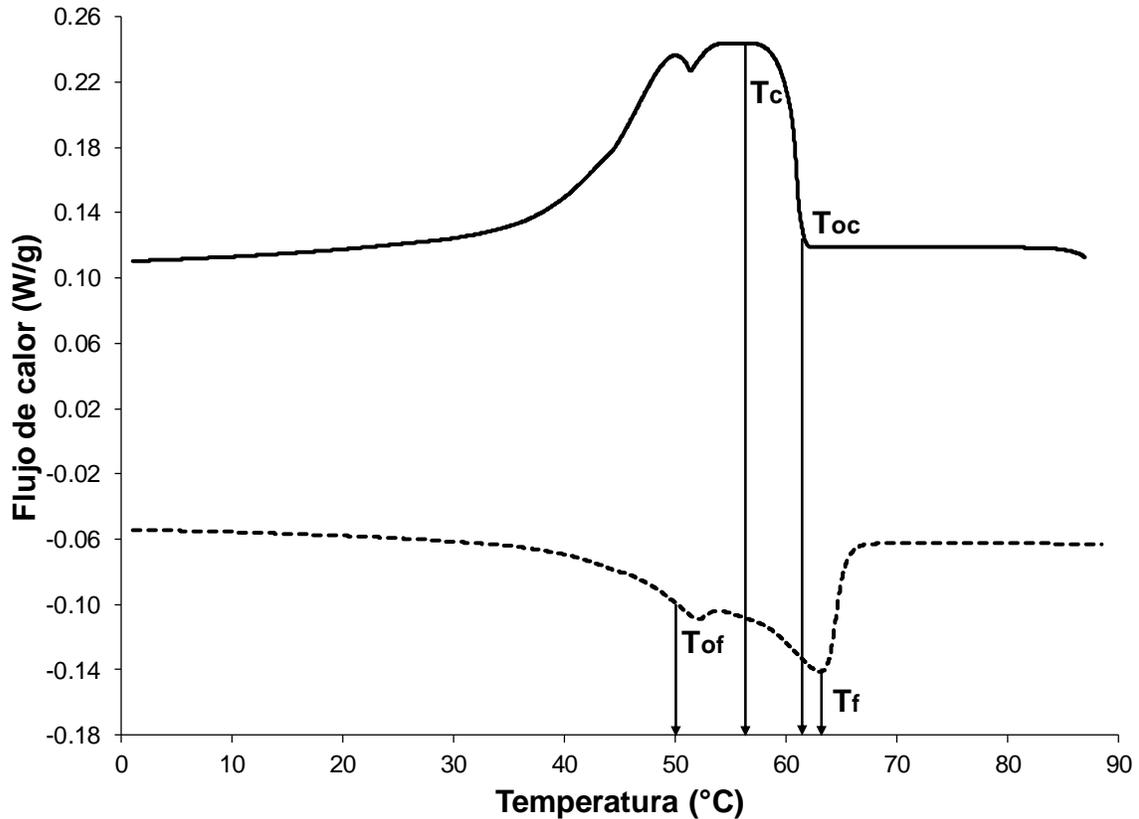


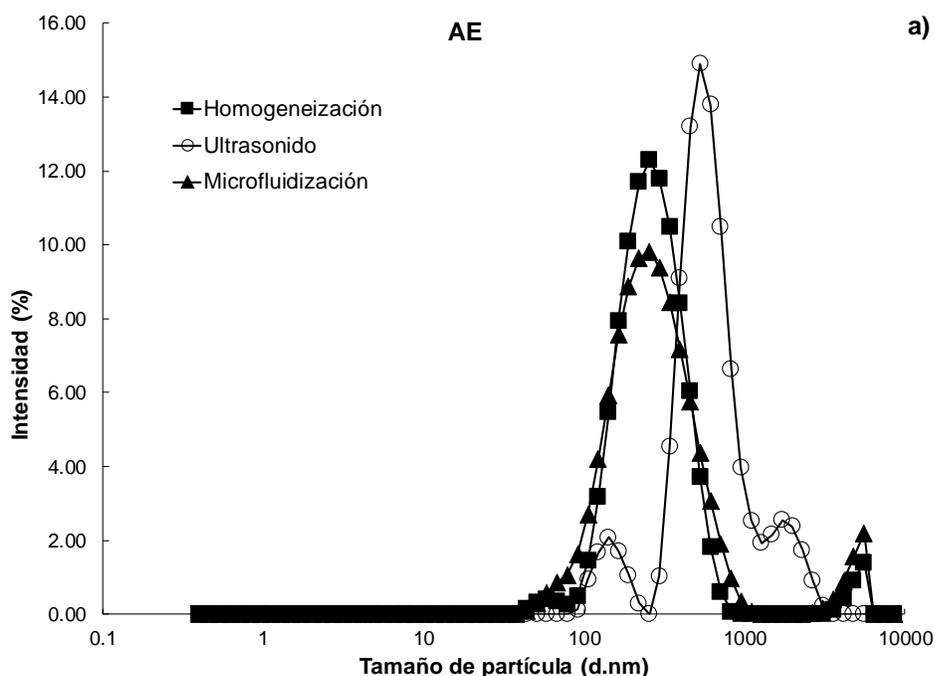
Figura 18. Termograma representativo de la CA: proceso de cristalización (línea continua) y proceso de fusión (línea punteada). (T_{oc} : temperatura de inicio de cristalización; T_c : pico máximo de cristalización; T_{of} : temperatura de inicio de fusión; T_f : pico máximo de fusión).

7.6 Caracterización fisicoquímicas de las nanoemulsiones

7.6.1 Tamaño de partícula e IPD

La técnica de DLS empleada para determinar el tamaño de partícula de las nanoemulsiones, considera que las partículas grandes tienen la capacidad de dispersar la luz con mayor intensidad que las partículas pequeñas (Brar y Verma, 2011). Por su parte, para la estimación del IPD, los valores límite pueden variar desde 0 hasta 1 para distribuciones de tamaños de partículas homogéneas y heterogéneas, respectivamente (Kaszuba *et al.*, 2008). Las distribuciones de tamaños de partícula de las diferentes nanoemulsiones (Figura 19) mostraron varios picos correspondientes a partículas de CA de diferente tamaño. Se pueden observar

picos de mayor intensidad, alrededor de los 1000 nm, en nanoemulsiones en las que se empleó la mezcla T80/S60 como emulsionantes, independientemente del proceso de emulsificación. Por otro lado, picos menores, en el rango nanométrico (100 nm), se observaron en nanoemulsiones empleando T80. De acuerdo con lo reportado por Rao y McClements (2012), los picos de alrededor de los 10 nm podrían asociarse a micelas de los emulsionantes que no fueron adsorbidos en la interfase aceite-agua de las nanoemulsiones, mientras que los picos con intensidad residual cercanos a los 5000 nm, sugirieron la presencia de partículas de CA más grandes que no fueron nanoemulsionadas.



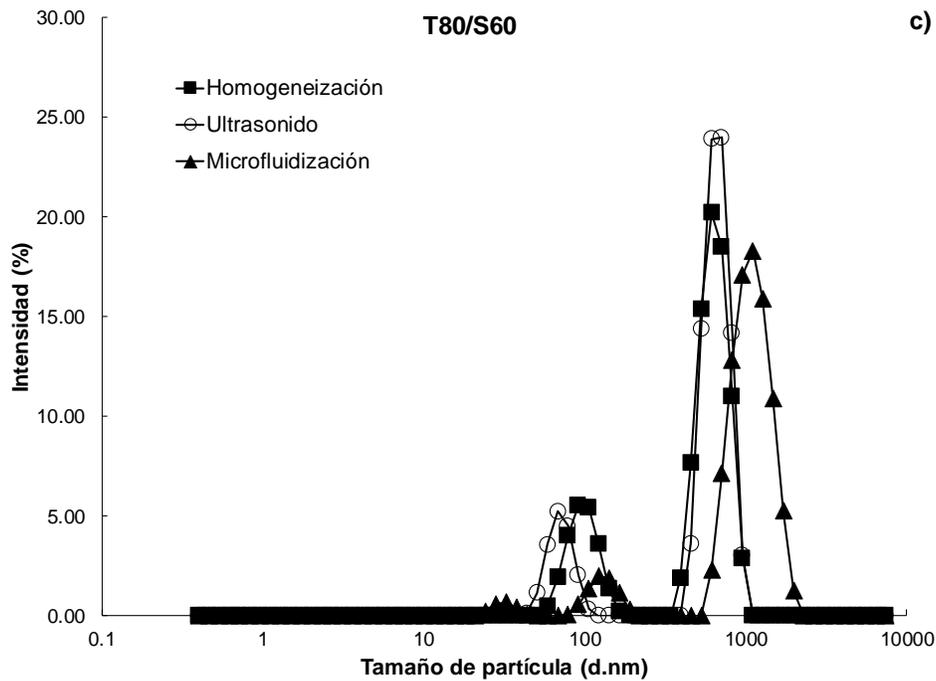
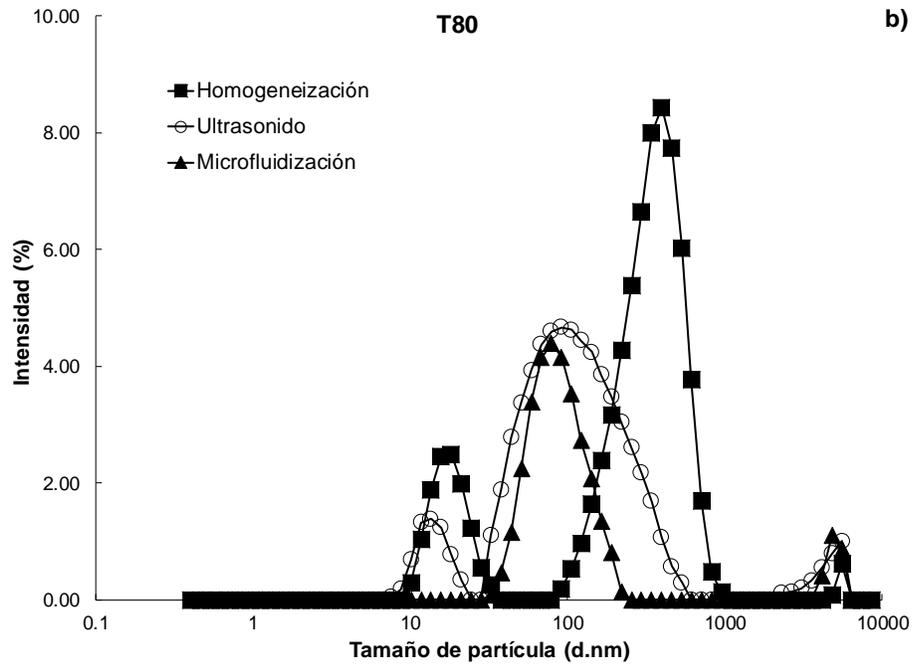


Figura 19. Efecto del tipo de emulsionante: a) AE: ácido esteárico; b) T80: Tween 80; c) T80/S60: Tween 80/Span 60, y del proceso de emulsificación: homogeneización, ultrasonido y microfluidización, en la distribución del tamaño de partícula de las nanoemulsiones.

Por otro lado, una interacción significativa ($p < 0.05$) entre el tipo de emulsionante y el proceso de emulsificación, afectó el tamaño de partícula e IPD de las nanoemulsiones (Cuadro 9). El uso del AE o la mezcla T80/S60 como emulsionantes, seguido de un proceso de ultrasonido, alcanzaron los mayores tamaños de partícula (515.1 nm o 1054.3 nm), con un IPD de 0.5 y 0.8, respectivamente. Por el contrario, las nanoemulsiones usando T80 y microfluidizadas, obtuvieron los menores tamaños de partícula de 77.7 ± 6.2 nm y un IPD de 0.3 ± 0.0 , los cuales se pudieron confirmar en el gráfico de distribución de tamaño de partícula (Figura 19). Ghosh *et al.*, (2013) reportaron que los emulsionantes no iónicos de bajo peso molecular tienen la capacidad de producir interacciones O/W favorables debido a su alto equilibrio hidrofílico-lipofílico (HLB=15), disminuyendo la tensión interfacial y requiriendo una menor energía libre para la formación de nanoemulsiones. Dichos autores reportaron un tamaño de partícula de 29.60 ± 0.20 nm con un IPD de 0.21 ± 0.002 para nanoemulsiones a base en aceite de albahaca (6% v/v) emulsionado con T80 en una relación 1:3 (v/v). Por su parte, Salvia-Trujillo *et al.*, (2013) lograron obtener una nanoemulsión homogénea a base de alginato de sodio y aceite de limón:T80 en una relación 1.1 (v/v), con tamaños de partícula de 7.35 ± 1.67 nm e IPD de 0.34 ± 0.10 , usando las mismas condiciones de microfluidización que las utilizadas en la presente investigación. Sin embargo, los tamaños de partícula ligeramente mayores obtenidas en el presente trabajo para las nanoemulsiones utilizando T80 y microfluidizadas, se atribuyeron a la baja temperatura de cristalización de las partículas de CA, que tienden a fusionarse debido a su composición heterogénea.

Cuadro 9. Tamaño de partícula e índice de polidispersión (IPD) de las nanoemulsiones

| Emulsionante | Proceso | Tamaño de partícula (nm) | IPD |
|--------------|-------------------|--------------------------|------------------------|
| AE | Homogeneización | 244.8±2.1 ^e | 0.7±0.2 ^{ab} |
| | Ultrasonido | 515.1±5.9 ^d | 0.5±0.2 ^{cd} |
| | Microfluidización | 256.8±3.9 ^e | 0.6±0.1 ^{cd} |
| T80 | Homogeneización | 185.5±8.5 ^f | 0.3±0.0 ^{bcd} |
| | Ultrasonido | 111.9±5.6 ^g | 0.4±0.0 ^{abc} |
| | Microfluidización | 77.7±6.2 ^h | 0.3±0.0 ^d |
| T80/S60 | Homogeneización | 913.8±10.6 ^b | 0.8±0.1 ^{ab} |
| | Ultrasonido | 1054.3±4.0 ^a | 0.7±0.0 ^{ab} |
| | Microfluidización | 891.9±8.9 ^c | 0.8±0.2 ^a |

AE: Ácido estéarico; T80: Tween 80; S60: Span 60.

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

7.6.2 Potencial zeta

El potencial zeta es la diferencia de la carga eléctrica entre la capa densa de los iones que rodean las partículas o micelas y la capa estacionaria del fluido que las rodea (Lu *et al.*, 2005). Las nanoemulsiones con valores absolutos de potencial zeta > 30 mV, generalmente se consideran estables, ya que la carga eléctrica de las partículas que la forman, es lo suficientemente fuerte para disminuir las fuerzas de repulsión predominantes en el sistema (Kaszuba *et al.*, 2010). Los valores de potencial zeta de las nanoemulsiones (Figura 20) fueron significativamente influenciados ($p < 0.05$) por el tipo de emulsionante y el proceso de emulsificación. Las nanoemulsiones que contienen AE como emulsionante sometidas a un proceso de ultrasonido y AE o T80/S60 tratadas mediante microfluidización, exhibieron la carga eléctrica más débil de -3.6 ± 0.4 mV, -5.0 ± 0.2 mV, y -7.0 ± 0.3 mV, respectivamente. Por el contrario, las nanoemulsiones en las que se utilizó T80 y microfluidización, mostraron la carga eléctrica más fuerte de -35.8 ± 3.8 mV. Este valor es más negativo que lo reportado por Guerra-Rosas *et al.*, (2016), quienes obtuvieron valores que van desde -6.53 mV a -15.20 mV, para nanoemulsiones a

base de pectina de alto metoxilo y una variedad de aceites esenciales, utilizando T80 como emulsionante en la misma proporción (aceite:emulsionante) que la empleada en este trabajo y sometidos a un proceso de microfluidización (150 MPa, 5 ciclos).

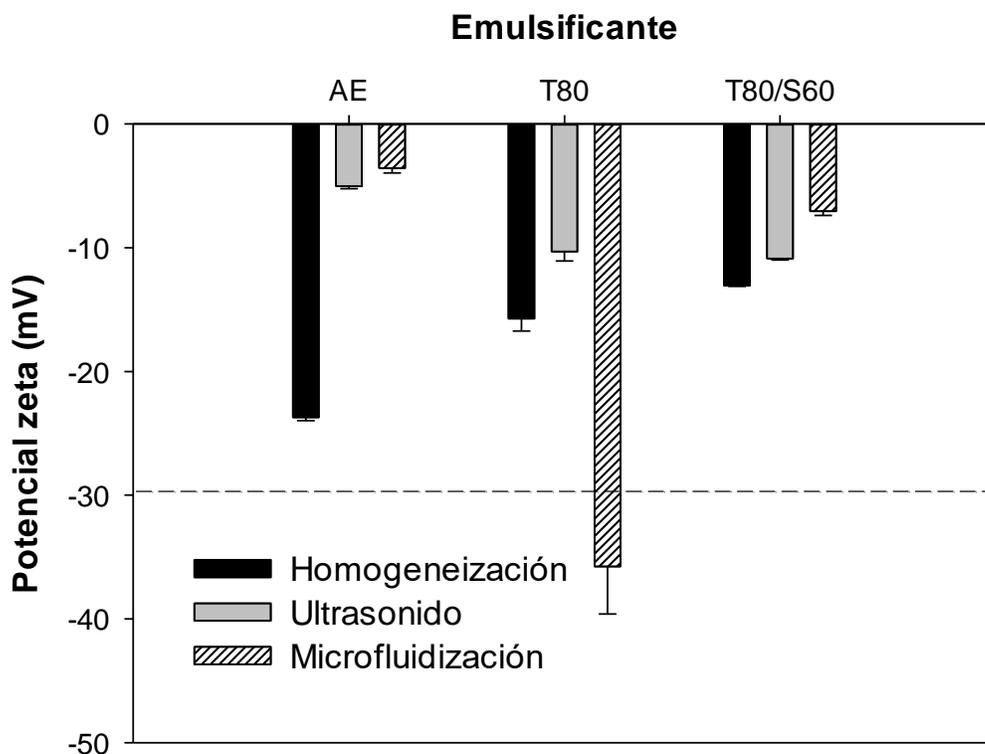


Figura 20. Efecto del tipo de emulsionante (AE: ácido esteárico; T80: Tween 80; T80/S60: Tween 80/Span 60) y del proceso de emulsificación (homogeneización, ultrasonido y microfluidización) sobre el potencial zeta de las nanoemulsiones.

La naturaleza de los emulsionantes controla la carga superficial de las nanoemulsiones; por lo tanto, las partículas de CA emulsionadas con AE (emulsionante aniónico) mostraron una carga negativa. Además, dicha carga puede atribuirse a la adsorción de moléculas de OS en la interfaz O/W, debido a la presencia de grupos carboxílicos aniónicos (Chanamai y McClements, 2001). Las impurezas aniónicas, como los ácidos grasos libres en los componentes lipídicos o

emulsionantes, también pueden contribuir a la carga negativa observada (McClements y Xiao, 2012). Finalmente, el uso de emulsionantes no iónicos como T80 mejora la estabilidad de las nanoemulsiones, debido a la presencia de grupos polioxietileno de naturaleza hidrofílica que pueden depositarse en la interfaz O/W y reducir la tensión interfacial, protegiendo las partículas de lípidos contra la agregación (Mayer *et al.*, 2013). Finalmente, el aumento en el potencial zeta para las nanoemulsiones en las que se empleó T80 y un proceso de microfluidización, podría deberse a su pequeño tamaño de partícula (77.7 ± 6.2 nm), lo que conlleva a tener más partículas con carga negativa.

7.6.3 pH

Uno de los factores más importantes que determinan la formación y las propiedades de las nanoemulsiones es el pH de la solución mediante la ionización de los grupos superficiales y, por lo tanto, influye en la densidad final de la carga superficial (Guzey y McClements, 2006). En este sentido, el pH de las nanoemulsiones no mostró diferencias significativas para cada emulsionante independientemente del proceso de emulsificación empleado, obteniendo un valor promedio de 8.4 ± 0.1 .

7.6.4 Color

En la Figura 21 se muestran los resultados de color de las nanoemulsiones, donde se observó una interacción significativa ($p < 0.05$) entre el tipo de emulsionante y el proceso de emulsificación expresado como IB. Las nanoemulsiones incorporadas con AE o T80/S60 usando ultrasonido, mostraron los valores más altos de IB de 64.2 ± 0.3 y 60.3 ± 1.7 , respectivamente. Por el contrario, el IB disminuyó significativamente ($p < 0.05$) hasta 31.7 ± 0.8 usando T80 bajo un proceso de microfluidización. Salvia-Trujillo *et al.*, (2014) reportaron una disminución en el IB utilizando microfluidización como proceso de emulsificación a diferentes presiones y ciclos, obteniendo valores de 35.71 ± 0.16 a 150 MPa y 3 ciclos, para

nanoemulsiones a base de alginato de sodio y aceite de limón emulsificadas con T80. Resultados similares fueron obtenidos por Guerra-Rosas *et al.*, (2016) obteniendo valores de IB de 32.94 ± 0.03 para nanoemulsiones a base de pectina de alto metoxilo y aceite esencial de tomillo emulsificados con T80 y microfluidización (150 Mpa, 5 ciclos).

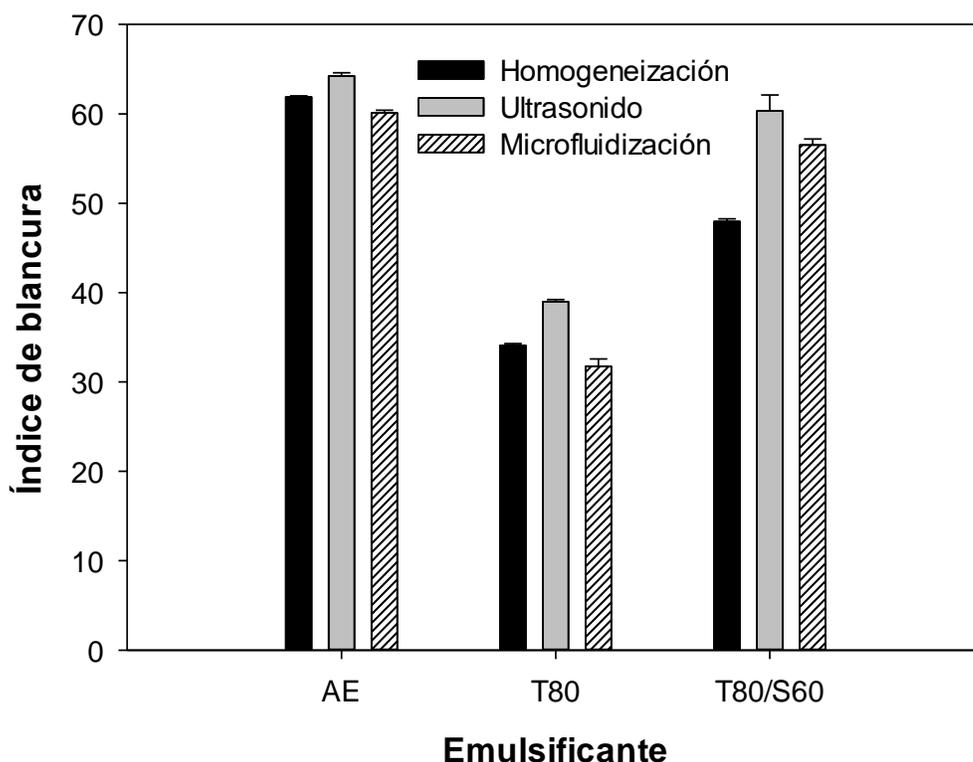


Figura 21. Efecto del tipo de emulsionante (AE: ácido esteárico; T80: Tween 80; T80/S60: Tween 80/Span 60) y del proceso de emulsificación (homogeneización, ultrasonido y microfluidización), sobre el índice de blancura de las nanoemulsiones.

Por todo lo anterior, las nanoemulsiones en las que se empleó T80 como emulsionante bajo un proceso de microfluidización, podrían ser adecuadas para el desarrollo de recubrimientos comestibles, debido a su apariencia ligeramente

translúcida, alta estabilidad y homogeneidad como resultado del tamaño nanométrico de las partículas de CA.

7.7 TEM de las nanoemulsiones

La TEM es una herramienta adecuada para la caracterización de nanoemulsiones, ya que es capaz de visualizar estructuras de tamaño nanométrico que no pueden detectarse mediante técnicas clásicas de microscopía (Klang *et al.*, 2011). El tamaño de partícula de las nanoemulsiones obtenido (Cuadro 9) se confirmó mediante dicha microscopía, donde las nanoemulsiones utilizando como emulsionante T80 y un proceso de microfluidización mostraron tamaños de partícula <100 nm de diámetro (Figura 22).

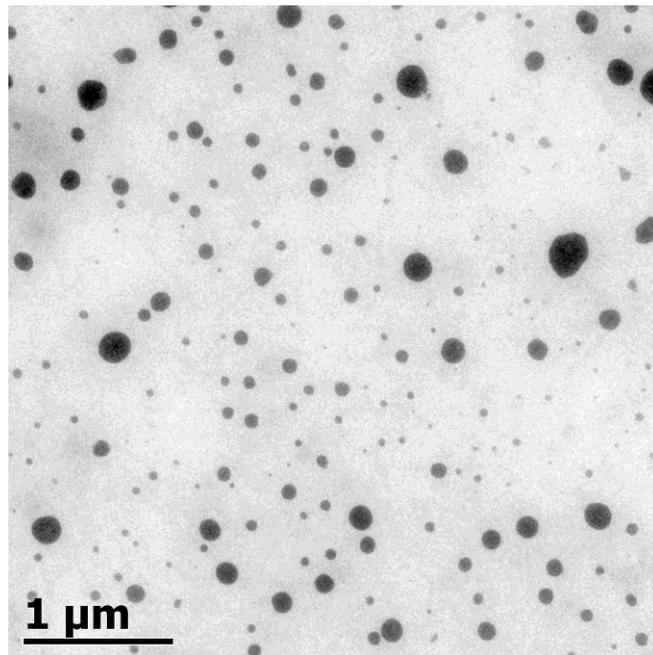
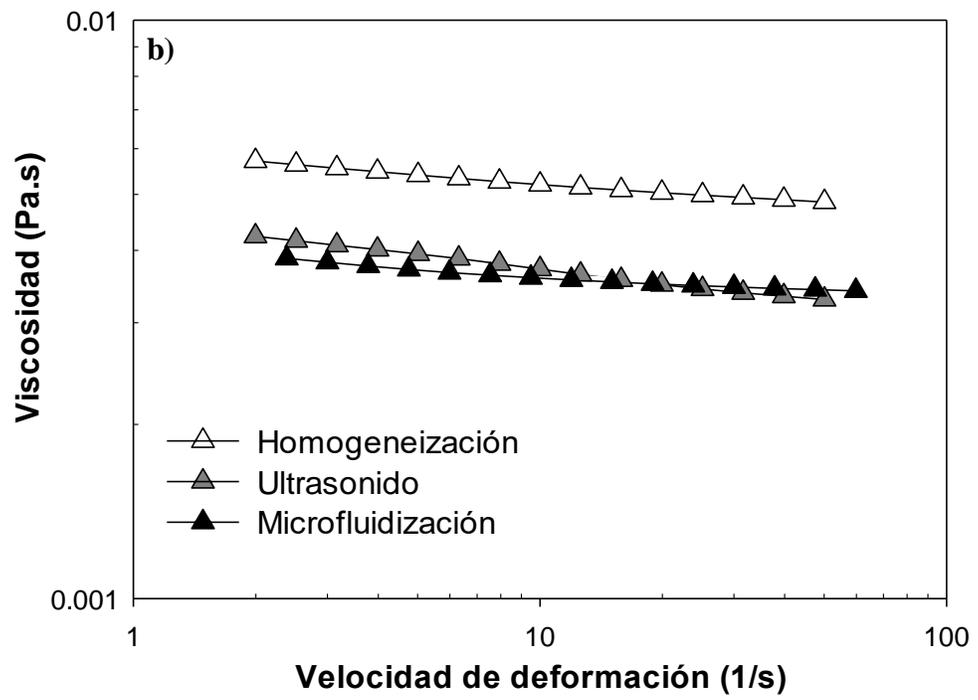
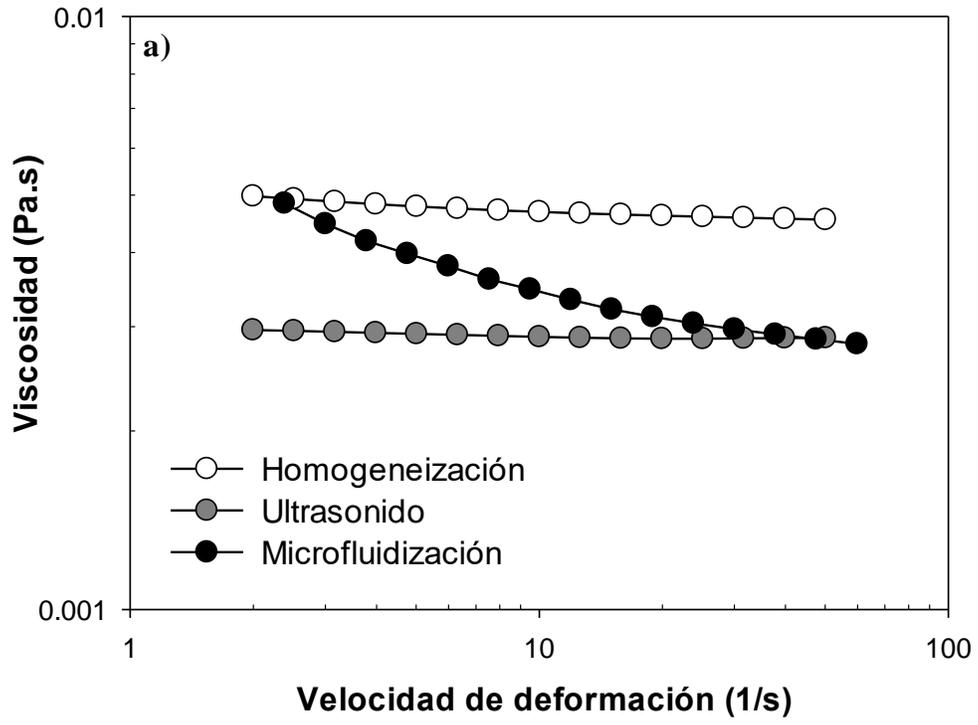


Figura 22. Microscopía electrónica de transmisión de las nanoemulsiones con T80 y microfluidización.

7.8 Caracterización reológica de las nanoemulsiones

Se observó un efecto significativo ($p < 0.05$) entre el tipo de emulsionante y el proceso de emulsificación (Figura 23), donde los fluidos no newtonianos dilatantes

presentan una $\eta > 1$, mientras que los fluidos pseudoplásticos presentan una $\eta < 1$ (Liang *et al.*, 2012). De acuerdo con lo anterior, se obtuvo un comportamiento no-Newtoniano de adelgazamiento al flujo ($\eta < 1$), para las nanoemulsiones con AE microfluidizadas (Figura 23a), T80 ultrasonicadas (Figura 23b) y T80/S60 homogeneizadas o microfluidizadas (Figura 23c), el cual puede atribuirse a la aglomeración entre las partículas de CA y de almidón. De acuerdo con lo reportado por Hopkins *et al.*, (2015), este comportamiento puede deberse a la interrupción de diversas interacciones (enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas) entre los componentes de la nanoemulsión (el almidón y la CA), cuando se somete a una prueba de cizallamiento, produciendo interacciones más débiles y una mayor alineación conforme la velocidad de deformación se incrementa. Estos autores reportaron un comportamiento similar de adelgazamiento al flujo con valores entre $0.81 \leq \eta \leq 0.95$, para nanoemulsiones a base de aislado de proteína de soya y aceite de linaza (3% o 10% p/p) usando T80 [relación aceite-emulsionante 1:0.5 (p/p)], después de un proceso de homogeneización. Por su parte, Rezvani *et al.*, (2013) reportaron un comportamiento de adelgazamiento al flujo para nanoemulsiones de caseinato de sodio y aceite de maíz (1.5% p/p) emulsionado con AE (1% y 2% p/p) utilizando dos ciclos de homogeneización, alcanzando valores de $\eta = 0.68-0.78$. Las nanoemulsiones restantes presentaron un comportamiento newtoniano ($\eta = 1$), el cual puede atribuirse a la gran cantidad de fase continua presente en las nanoemulsiones y al menor tamaño de partícula obtenido (Cuadro 9). En contraste con nuestros resultados, Fabra *et al.*, (2009) reportaron que el efecto de adelgazamiento al flujo por cizallamiento fue mucho más fuerte en nanoemulsiones con menores tamaños de partícula.



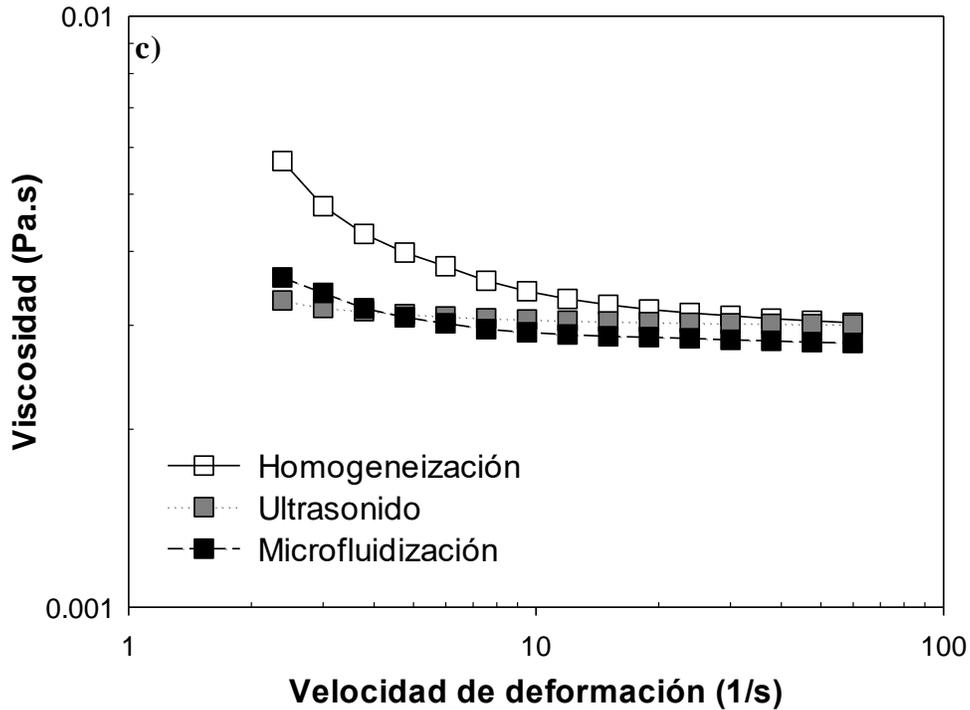


Figura 23. Efecto del tipo de emulsionante (AE: ácido esteárico; T80: Tween 80; T80/S60: Tween 80/Span 60) y del proceso de emulsificación (homogeneización, ultrasonido y microfluidización), sobre el comportamiento reológico de las nanoemulsiones.

7.8.1 Propiedades viscoelásticas de las nanoemulsiones

Las suspensiones a base de polisacáridos como el almidón tienden a ser materiales viscoelásticos que pueden exhibir características sólidas y líquidas simultáneamente (Medina-Torres *et al.*, 2016). Los módulos G' y G'' se refieren a respuestas elásticas y viscosas de un material dado, respectivamente (Bourbon *et al.*, 2010). Por lo tanto, es posible cuantificar el predominio del carácter sólido o líquido de una muestra a través de mediciones dinámicas (Campestrini *et al.*, 2013). Las nanoemulsiones que presentaron un comportamiento no newtoniano se expusieron a una prueba de oscilación de amplitud establecida y exhibieron un claro predominio del módulo viscoso ($G'' > G'$), para un rango de frecuencia de 1-100

rad/s (Figura 24). Este comportamiento podría ser el resultado de la configuración estructural de la CA y el almidón con el emulsionante, y del efecto potencial del proceso de emulsificación.

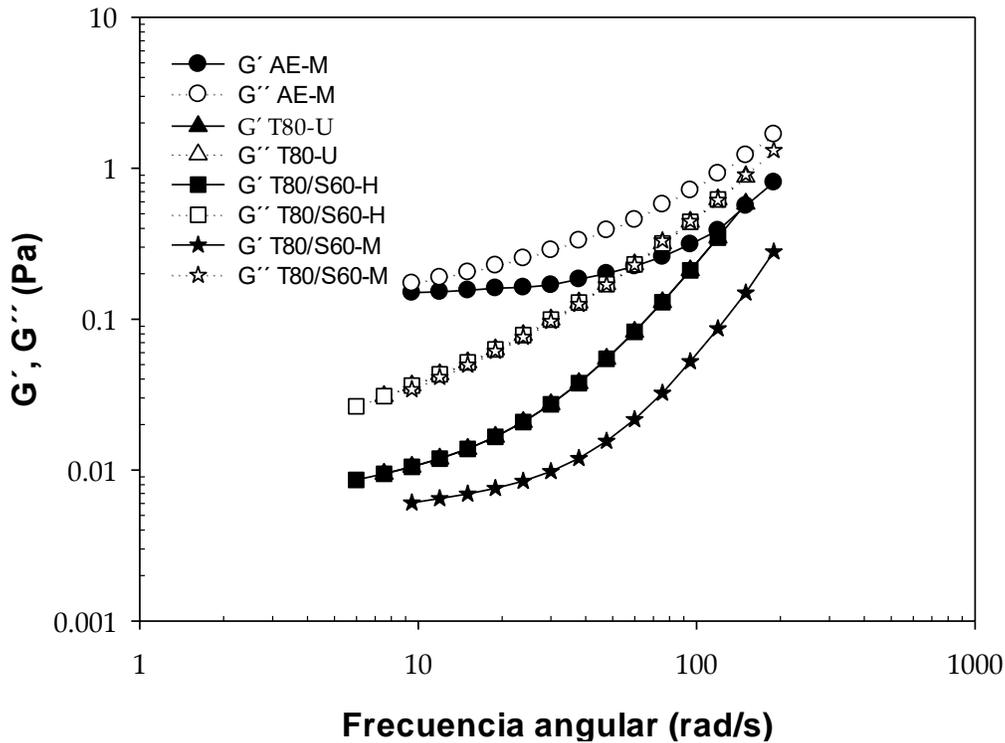


Figura 24. Curvas de flujo oscilatorio de las nanoemulsiones con comportamiento no-Newtoniano. G' (símbolos rellenos): módulo elástico y G'' (símbolos vacíos): módulo viscoso.

7.9 Mojabilidad

7.9.1 Tensiones superficiales (γ_{SV} , γ_{LV} , γ_{SL})

La principal función de un recubrimiento comestible formado a partir de una nanoemulsión, es la de mantener la calidad y la seguridad de un producto, siempre que haya una distribución efectiva de la nanoemulsión sobre la superficie del alimento, la cual está influenciada por su mojabilidad. Los ángulos de contacto (θ) de las nanoemulsiones se probaron sobre la superficie del tomate (Cuadro 10), obteniendo valores $<90^\circ$, los cuales variaron entre 38.5° y 48.6° , lo que implica que las nanoemulsiones son capaces de cubrir adecuadamente la superficie del

tomate pese a su naturaleza hidrofóbica, debido a que está cubierta por una capa de cera compuesta principalmente por naringenina-chalcona (52%), hidrocarburos de cadena larga (29%) y alcoholes de cadena larga y triterpenol (19%) (Bauer *et al.*, 2004). Por el contrario, Sánchez-Ortega *et al.*, (2016), reportaron mayores ángulos de contacto (61.5 °) para nanoemulsiones a base de almidón y ácido oleico empleando T80 como emulsionante sobre la misma superficie (tomate). Choi *et al.*, (2002) obtuvieron mayores valores de ángulo de contacto entre 87.5 ° y 90 ° para una emulsión de quitosano con T80 sobre tangerina, melón, manzana y tomate, lo que indica que esta emulsión apenas cubría la piel dichas frutas.

La γ_{SV} de la superficie del tomate (Cuadro 10) fue de 15.0 mN/m, mismo que lo reportado por Sánchez-Ortega *et al.*, (2016), y similar a los reportados por Casariego *et al.*, (2008) (17.4 mN/m). Las superficies de baja energía muestran valores de $\gamma_{SV} < 100$ mN/m, y su interacción se da principalmente a través de iones-dipolo, inducción o enlaces de hidrógeno (Zisman, 1964; Cerqueira *et al.*, 2009). Los valores promedio de la γ_{LV} de las nanoemulsiones (Cuadro 10) variaron desde 27.9 mN/m utilizando AE como emulsionante, hasta 30.9 mN/m usando T80, concordando con lo reportado por Sánchez-Ortega *et al.*, (2016) ($\gamma_{LV} = 30.86$ mN/m), así como con Ramírez *et al.*, (2012), ($\gamma_{LV} = 34.32$ mN/m) para nanomulsiones a base de carboximetilcelulosa, aceite de girasol y extracto de murta sobre la superficie de manzana.

Cuadro 10. Ángulo de contacto (θ) y tensiones superficiales de las nanoemulsiones

| Emulsionante | Proceso | θ | Cos θ | γ_{SV} (mN/m) | γ_{LV} (mN/m) | γ_{SL} (mN/m) |
|--------------|-------------------|----------|--------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| AE | Homogeneización | 45.8 | 0.7 | 15.0 | 26.0 | -3.1 |
| | Ultrasonido | 43.1 | 0.7 | 15.0 | 28.0 | -5.4 |
| | Microfluidización | 40.0 | 0.8 | 15.0 | 29.7 | -7.7 |
| T80 | Homogeneización | 42.2 | 0.7 | 15.0 | 26.6 | -4.6 |
| | Ultrasonido | 44.1 | 0.7 | 15.0 | 25.8 | -3.4 |
| | Microfluidización | 48.6 | 0.7 | 15.0 | 26.3 | -2.4 |
| T80/S60 | Homogeneización | 41.1 | 0.8 | 15.0 | 31.4 | -8.5 |
| | Ultrasonido | 38.5 | 0.8 | 15.0 | 30.0 | -8.4 |
| | Microfluidización | 40.2 | 0.7 | 15.0 | 31.4 | -8.9 |

AE: Ácido estearico; T80: Tween 80; S60: Span 60.

7.9.2 Coeficiente de mojabilidad

La mojabilidad de las nanoemulsiones está influenciada por las W_a , que hace que el líquido se extienda sobre la superficie plana sólida, y las W_c , que provocan la contracción entre las gotas del propio líquido (Casariego *et al.*, 2008). Cuando $W_s < 0$, la gota minimiza la energía libre de la superficie, lo que lleva a una mojabilidad parcial, y para $W_s = 0$, la superficie es totalmente mojable (Skurtys *et al.*, 2011). El tipo de emulsionante mostró una influencia significativa ($p < 0.05$) sobre el W_s de las nanoemulsiones (Cuadro 11), cuyos valores fueron -7.5 ± 0.5 mN/m utilizando AE, -7.7 ± 1.0 mN/m con T80, y -7.2 ± 0.7 mN/m con T80/S60. Estos resultados fueron inferiores a los reportados por Choi *et al.*, (2002), al aplicar una nanoemulsión a base de quitosano, emulsificada con T80 sobre tomate (-66.8 mN/m) y manzana (-56.44 mN/m) [39]. La superficie del tomate contiene ceras naturales compuestas principalmente por esteroides, triterpenoides, chalconas y alcanos, proporcionando una superficie hidrofóbica (Bauer *et al.*, 2004; Jetter *et al.*, 2006), por lo cual se obtienen valores bajos de W_s para todas las nanoemulsiones.

Cuadro 11. Fuerzas adhesivas (Wa), fuerzas cohesivas(Wc) y coeficiente de mojabilidad (Ws) de las nanoemulsiones

| Emulsionante | Proceso | Wa (mN/m) | Wc (mN/m) | Ws (mN/m) |
|--------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| AE | Homogeneización | 44.2±1.2 ^b | 52.1±1.7 ^b | -7.9±1.1 ^a |
| | Ultrasonido | 48.4±1.8 ^b | 56.0±1.9 ^b | -7.6±1.3 ^a |
| | Microfluidización | 52.4±1.7 ^b | 59.4±1.0 ^b | -7.0±1.6 ^a |
| T80 | Homogeneización | 46.2±2.1 ^c | 53.2±1.0 ^c | -7.0±2.0 ^a |
| | Ultrasonido | 44.2±2.0 ^c | 51.5±1.9 ^c | -7.3±0.6 ^a |
| | Microfluidización | 43.7±3.3 ^c | 52.6±1.9 ^c | -8.9±1.6 ^a |
| T80/S60 | Homogeneización | 54.9±0.3 ^a | 62.7±1.0 ^a | -7.8±1.2 ^a |
| | Ultrasonido | 53.4±1.1 ^a | 59.9±1.0 ^a | -6.5±0.5 ^a |
| | Microfluidización | 55.3±4.3 ^a | 62.7±2.6 ^a | -7.5±2.2 ^a |

AE: Ácido estéarico; T80: Tween 80; S60: Span 60.

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p<0.05).

7.10 Efecto antimicrobiano

Arredondo-Ochoa *et al.*, (2017) reportó el uso de agentes antimicrobianos naturales incorporados en una matriz nanoemulsificada, eficaz contra microorganismos que se encuentran comúnmente en productos frescos. En este estudio, la actividad antimicrobiana de las nanoemulsiones se vio significativamente influenciada (p<0.05) por el tipo de emulsionante y el proceso de emulsificación, de acuerdo con Liang *et al.*, (2012). Las zonas de inhibición de las nanoemulsiones usando AE (Figura 25A), fueron de 24.3 ± 2.4 mm para *R. stolonifer*, 28.7 ± 1.9 mm para *C. gloeosporioides*, 27.9 ± 8.0 mm para *B. cinerea* y 13.9 ± 0.7 mm para *S. Saintpaul*. Para las nanoemulsiones utilizando T80 (Figura 25B) las zonas de inhibición fueron de 28.9 ± 1.6 mm para *R. stolonifer*, 30.2 ± 1.3 mm para *C. gloeosporioides*, 34.7 ± 3.2 mm para *B. cinerea* y 14.5 ± 0.4 mm para *S. Saintpaul*. Las nanoemulsiones utilizando la mezcla T80/S60 (Figura 25C), ya sea homogeneizada o microfluidizada, exhibió un efecto inhibitorio contra *R. stolonifer* (28.0 ± 4.7 mm), *C. gloeosporioides* (27.5 ± 0.3 mm), *B. cinerea* (31.5 ± 1.7 mm) y

S. Saintpaul (14.4 ± 0.5 mm). Del mismo modo, Salvia-Trujillo et al., (2014) reportó la iinhibición de *Escherichia coli* para nanoemulsiones a base de alginato de sodio incorporadas con aceite de limón o de clavo y T80 como emulsionante bajo un proceso de microfluidización. Por otro lado, las nanoemulsiones obtenidas bajo un proceso de ultrasonido no mostró efecto inhibitorio contra ninguno de los microorganismos probados, lo que indica una interacción significativa ($p < 0,05$), entre el tipo emulsionante y el proceso de emulsificación. De acuerdo con Teixeira et al., (2007), y Lu et al., (2005), la actividad antimicrobiana de las nanoemulsiones se ve favorecida por el tamaño nanométrico loque permite una difusión más fácil a través de la membrana celular microbiana. En este sentido, el tamaño de partícula más alto (1054.33 ± 4.04 nm) se obtuvo para las nanoemulsiones usando T80/S60, y su interacción con el tipo de procesamiento (ultrasonido) puede explicar su inhibición de actividad antimicrobiana.

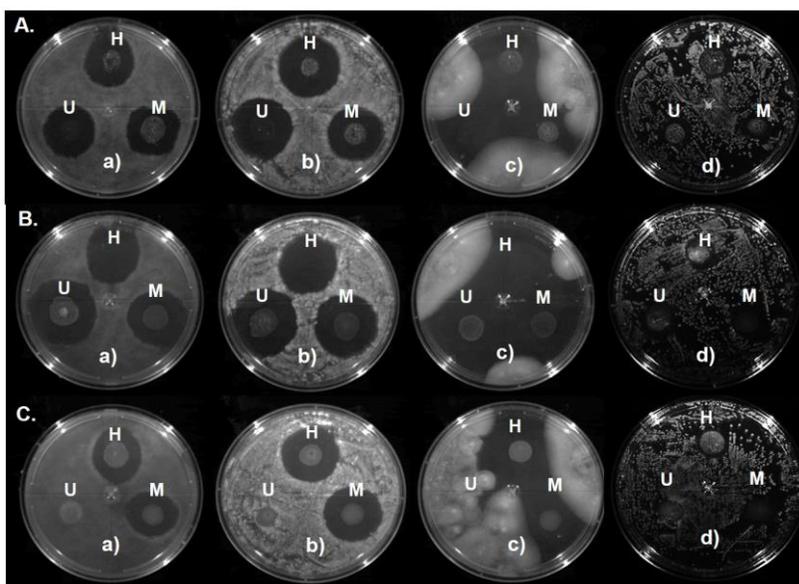


Figura 25. Efecto antimicrobiano de las nanoemulsiones con A. AE: ácido esteárico; B. T80: Tween 80; y C. T80/S60: Tween80 / Span60 a diferentes procesos de emulsificación (H=homogeneización, U=ultrasonido y M=microfluidización), contra a) *R. stolonifer*, b) *C. gloeosporioides*, c) *B. cinerea*, d) *S. Saintpaul*

8. CONCLUSIONES

De manera individual, el arginato láurico (LAE) a una concentración de 800 mg/L y la natamicina (NAT) a una concentración de 160 mg/L, logran la completa inhibición de los hongos deterioradores *Rhizopus stolonifer*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea*.

El LAE a una concentración de 100 mg/L inhibió el crecimiento de la bacteria patógena *Salmonella* Saintpaul.

Se comprobó el mecanismo antimicrobiano del LAE a través de la visualización con microscopía de fluorescencia de la bacteria patógena *Salmonella* Saintpaul.

La combinación del LAE a 400 mg/L con 80 mg/L de NAT mostró un efecto aditivo logrando la inhibición de los tres hongos deterioradores, sin afectar la CMB encontrada para *Salmonella* Saintpaul, reduciendo hasta en un 50% la concentración de cada antimicrobiano de manera individual.

La incorporación de la combinación de los antimicrobianos en una suspensión filmogénica a una concentración de 1.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para LAE y 0.20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para NAT logra, una vez formada la película comestible, logra la completa inhibición de los hongos deterioradores y de la bacteria patógena.

Existe una interacción significativa entre el tipo de emulsionante y el proceso de emulsificación empleado en la formación

El tipo de emulsionantes y el proceso de emulsificación fueron un factor crucial para la obtención de nanoemulsiones a base de almidón, cera de abeja y antimicrobianos naturales con propiedades fisicoquímicas, reológicas, de

mojabilidad y antimicrobianas adecuadas para la formación recubrimientos comestibles con potencial uso en productos frescos

Las nanoemulsiones empleando Tween 80 como emulsionante bajo un proceso de microfluidización, obtuvieron el menor tamaño de partícula, mostrando una distribución homogénea entre sus componentes que condujeron a una mayor estabilidad y transparencia; además presentaron buenas propiedades de mojado y lograron la completa inhibición de los hongos deterioradores *Rhizopus stolonifer*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea*, así como de la bacteria patógena *Salmonella* Saintpaul, comúnmente presentes en productos frescos.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo-Fani**, A., Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M.A. y Martín-Belloso, O. **2015**. Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. *Food Hydrocolloids*. 47:168-177.
- Aichholz**, R. y Lorbeer, E. **1999**. Investigation of combwax of honeybees with high-temperature gas chromatography and high-temperature gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. I. High-temperature gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 885(2), 601-615.
- Arredondo-Ochoa**, T., García-Almendárez, B.E., Amaro-Reyes, A., Rivera-Pastrana, D.M., Gutiérrez-López, G.F., Martín-Belloso, O. y Regalado-Gonzalez, C. **2017**. Design and characterization of corn starch edible films including beeswax and natural antimicrobials. *Food and Bioprocess Technology*, 10(1), 103-114.
- Attama**, A.A.; Shicke, B.C.; Müller-Goymann. **2006**. Further characterization of theobroma oil-beeswax admixtures as lipid matrices for improved drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 64(3), 294-306.
- Avena-Bustillos**, R.J. y McHugh, T.H. **2012**. Role of edible film and coating additives. En: E. A. Baldwin, R. Hagenmaier y J. Bai (Ed.). *Edible coatings and films to improve food quality*. CRC Press, New York.p. 157 -184.
- Bauer**, S., Schulte, E., & Thier, H. P. **2004**. Composition of the surface wax from tomatoes. *European Food Research and Technology*, 219, 223-228.
- Becerril**, R., Manso, S., Nerin, C. y Gómez-Lus, R. **2013**. Antimicrobial activity of lauroyl arginate ethyl (LAE), against selected food-borne bacteria. *Food Control*. 32(2): 404-408.
- Bonnaud**, M., Weiss, J. y McClements, D.J. **2010**. Interaction of a food-grade cationic surfactant (lauric arginate) with food-grade biopolymers (pectin, carrageenan, xanthan, alginate, dextran and chitosan). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 9770-9777.

- Bourbon**, A.I.; Pinheiro, A.C.; Ribeiro, C.; Miranda, C.; Maia, J.M.; Teixeira, J.A.; Vicente, A.A. **2010**. Characterization of galactomannans extracted from seeds of *Gleditsia triacanthos* and *Sophora japonica* through shear and extensional rheology: comparison with guar gum and locust bean gum. *Food Hydrocolloids*. 24(2-3), 184–192.
- Bourtoom**, T. **2008**. Edible films and coating: characteristics and properties. *International Food Research Journal*. 15(3): 237-248.
- Brandt**, A.L., Castillo, A., Harris, K.B., Keeton, J.T., Hardin, M.D. y Taylor, T.M. **2010**. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food antimicrobials applied singly and in combination. *Journal of Food Science* 75: M557-M563.
- Brar**, S.K. y Verma, M. **2011**. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. *Trends in Analytical Chemistry*, 30(1), 4-17.
- Buchwald**, R., Breed, M.D. y Greenberg, A.R. **2008**. The thermal properties of beeswaxes: unexpected findings. *The Journal of Experimental Biology*, 211(1), 121-127.
- Campestrini**, L.H.; Silveira, J.L.M.; Duarte, M.E.R.; Koop, H.S.; Nosedá, M.D. **2013**. NMR and rheological study of *Aloe barbadensis* partially acetylated glucomannan. *Carbohydrate Polymers*. 94(1), 511–519.
- Campos**, C.A., Gerschenson, L.N. y Flores, S.K. **2011**. Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology*. 4(6): 849–875.
- Casariego**, A., Souza, B.W.S., Vicente, A.A., Teixeira, J.A., Cruz, L., y Díaz, R. **2008**. Chitosan coating surface properties as affected by plasticizer, surfactant and polymer concentrations in relation to the surface properties of tomato and carrot. *Food Hydrocolloids*, 1452-1459.
- Cerqueira**, M.A., Lima, A.M., Teixeira, J.A., Moreira, R.A. y Vicente, A.A. **2009**. Suitability of novel galactomannans as edible coatings for tropical fruits. *Journal of Food Engineering*, 94(1), 372-378.
- Chanamai**, R. y McClements, D.J. **2001**. Depletion flocculation of beverage emulsions by gum arabic and modified starch. *Journal of Food Science*, 66(3), 457-463.

- Choi**, W.Y., Park, H.J., Ahn, D.J., Lee, J. y Lee, C.Y. **2002**. Wettability of chitosan coating solution on “fuji” apple skin. *Journal of Food Science*, 67(7), 2668-2672.
- Corbo**, M.R., Speranza, B., Campaniello, D., D’Amato, D. y Sinigaglia, M. **2010**. Fresh-cut fruits preservation: current status and emerging technologies. En A. Méndez-Vilas (Ed.). Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. Formatex Research Center, Spain. Vol.2. p. 1143–1154.
- Da-Silva**, M.A., Iamanaka, B.T., Taniwaki, M.H. y Kieckbush, T.G. **2013**. Evaluation of the antimicrobial potential of alginate and alginate/chitosan films containing potassium sorbate and natamycin. *Packaging Technology and Science* 26: 479-492.
- Dashipour**, A., Razavilar, V., Hosseini, H., Shojaei-Aliabadi, S., German, J.B., Ghanati, K., Khakpour, M., & Khaksar, R. **2015**. Antioxidant and antimicrobial carboxymethyl cellulose films containing Zataria multiflora essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 606-613.
- Dea**, S., Ghidelli, C., Pérez-Gago, M.B. y Plotto, A. **2012**. Coatings for minimally processed fruits and vegetables. En: E. A. Baldwin, R. Hagenmaier y J. Bai (Ed.). Edible coatings and films to improve food quality. CRC Press, New York. p. 243 -289.
- Debeaufort**, F. y Voilley, A. **2009**. Lipid-based edible films and coatings. En: M. E. Embuscado y K. C. Huber (Ed.). Edible films and coatings for food applications. Springer, New York. p. 135-168.
- Delves-Broughton**, J., Thomas, L.V., Doan, C.H. y Davidson, P.M. **2005**. Natamycin. En: M.P. Davidson, J.N Sofos y A.L. Branen (Ed.). Antimicrobials in food. 3rd Ed. CRC, Taylor & Francis. p. 275-303.
- Dhall**, R.K. **2013**. Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 53: 435-450.
- Donsì**, F., Annunziata, M., Sessa, M., & Ferrari, G. **2011**. Nanoencapsulation of essential oils enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT-Food Science and Technology*, 44(9), 1908-1914.

- Duan, J., Wu, R., Strik, B.C. y Zhao, Y. 2011.** Effect of edible coatings on the quality of fresh blueberries (Duke and Elliott) under commercial storage conditions. *Postharvest Biology and Technology*. 59(1): 71–79.
- Durán, N. y Marcato, P.D. 2013.** Nanobiotechnology perspectives. Role of nanotechnology in the food industry: a review. *International Journal of Food Science and Technology*. 48(6): 1127-1134.
- Ercolini, D., La Stora, A., Villani, F. y Maurello, G. 2006.** Effect of a bacteriocin-activated polythene film on *Listeria monocytogenes* as evaluated by viable staining and epifluorescence microscopy. *Journal of Applied Microbiology*. 100: 765-772.
- Fabra, M.J., Jiménez, A., Atarés, L., Talens, P. y Chiralt, A. 2009.** Effect of fatty acids and beeswax addition on properties of sodium caseinate dispersions and films. *Biomacromolecules*, 10(6), 1500-1507.
- Falguera, V., Quintero, J.P., Jiménez, A., Muñoz, J.A. y Ibarz, A. 2011.** Edible films and coating structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science and Technology*. 22(6): 292-303.
- Fallik, E., Shalom, Y., Alkalai-Tuvia, S., Larkov, O., Brandeis, E. y Ravid, U. 2005.** External, internal and sensory traits in Galia-type melon treated with different waxes. *Postharvest Biology and Technology* 36(1): 69–75.
- García, M.A., Pinotti, A., Martino, M.N. y Zaritzky, N.E. 2009.** Characterization of starch and composite edible films and coating. En: M. E. Embuscado y K. C. Huber (Ed.). *Edible films and coatings for food applications*. Springer, New York. p.169-210.
- Ghosh, V., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. 2013.** Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1): 338-344.
- Guerra-Rosas, M.I., Morales-Castro, J., Ochoa-Martínez, L.A., Salvia-Trujillo, L. y Martín-Belloso, O. 2016.** Lon-term stability of food-grade nanoemulsions from high methoxyl pectin containing essential oils. *Food Hydrocolloids*, 52, 438-446.

- Guzey, D.** y McClements D.J. **2006.** Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. *Advances in Colloid and Interface Science*, 128-130, 227-248.
- Hagenmaier, R.D.** y Baker, R.A. **1994.** Wax microemulsions and emulsions as citrus coatings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(4), 899-902.
- Harkins, W.D.** y Jordan, H.F. **1930.** A method for the determination of surface and interfacial tension from the maximum pull on a ring. *Journal of American Chemical Society*, 52(5), 1751-1772.
- Hélder, D.S.,** Cerqueira, M.A. y Vicente, A.A. **2012.** Nanoemulsion for food applications: Development and characterization. *Food and Bioprocess Technology*. 5(3):854-867.
- Hernández-Lauzardo, A.N.,** Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M.G. y Trejo-Espino, J.L. **2006.** Identification of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill., causal agent of *Rhizopus* rot disease of fruits and vegetables. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 24(1): 65-69.
- Higueras, L.,** López-Carballo, G., Hernández-Muñoz, P., Gavara, R. y Rollini, M. **2013.** Development of a novel antimicrobial film based on chitosan with LAE (ethyl-N α -dodecanoyl-L-arginate) and its application to fresh chicken. *International Journal of Food Microbiology*. 165 (3): 339-345.
- Hopkins, E.J.,** Chang, C., Lam, R.S.H. y Nickerson, M.T. **2015.** Effects of flaxseed oil concentration on the performance of soy protein isolate-based emulsion-type film. *Food Research International*. 67, 418-425.
- Imran, M.,** Revol-Junelles, A.M., Martyn, A., Tehrany, E.A., Jacquot, M., Linder, M. y Desorby, S. **2010.** Active food packaging evolution: transformation from micro to nanotechnology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 50(9):799-821.
- Janjarasskul, T.** y Krochta, M.J. **2010.** Edible packaging materials. *The Annual Review of Food Science and Technology*. 1: 415-448.
- Jetter, R.,** Kunst L. y Samuels, A.L. **2007.** Composition of plant cuticular waxes. In: M. Riederer and C. Müller (Eds.), *Biology of the plant cuticle* (pp. 145-175). Oxford: Blackwell Publishing Ltd.

- Jiménez-Islas, D., Medina-Moreno, S.A. y Gracida-Rodríguez. J.N. 2010.** Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 26(1): 65-84
- Kaszuba, M., McKnight, D., Connah, M.T., McNeil-Watson, F.K. y Nobbmann, U. 2008.** Measuring sub nanometer sizes using dynamic light scattering. *Journal of Nanoparticle Research*. 10(5), 823-829.
- Kaszuba, M., Corbett, J., Watson, F.M. y Jones, A. 2010.** High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*. 368(1927), 4439-4451.
- Klang, V.; Matsko, N.B.; Valenta, C.; Hofer, F. 2011.** Electron microscopy of nanoemulsions: an essential tool for characterisation and stability assessment. *Micron*, 43(2-3), 85-103.
- Kramer, M.E. 2009.** Structure and function of starch-based edible films and coatings. En: M. E. Embuscado y K. C. Huber (Ed.). *Edible films and coatings for food applications*. Springer, New York. p. 113-134.
- Liang, R., Xu, S., Shoemaker, C.F., Li, Y., Zhong, F. y Huang, Q. 2012.** Physical and antimicrobial properties of peppermint oil nanoemulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60(30), 7548-7555.
- Lin, D. y Zhao, Y. 2007.** Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 6(3): 60-71.
- López-Malo, A., Palou, E., Parish, M.E. y Davidson, M. 2005.** Methods for activity assay and evaluation of results. En: M.P. Davidson, J.N. Sofos y A.L. Branen (Ed.). *Antimicrobials in food*. 3rd Ed. CRC, Press, Florida. p. 659-680.
- Lu, W., Zhang, Y., Tan, Y.Z., Hu, K.L., Jiang, X.G. y Fu, S.K. 2005.** Cationic albumin-conjugated pegylated nanoparticles as novel drug carrier for brain delivery. *Journal of Controlled Release*. 107(3), 428-448.
- Ma, Q., Davidson, P.M. y Zhong, Q. 2013.** Antimicrobial properties of lauric arginate alone or in combination with essential oils in tryptic soy broth and 2% reduced fat milk. *International Journal of Food Microbiology*. 166: 77-84.

- Ma, Q., Zhang, Y. y Zhong, Q. 2016.** Physical and antimicrobial properties of chitosan films incorporated with lauric arginate, cinnamon oil, and ethylenediaminetetraacetate. *LWT-Food Science and Technology* 65(1): 173-179.
- Mayer, S., Weiss, J. y McClements, D. J. 2013.** Behavior of vitamin E acetate delivery systems under simulated gastrointestinal conditions: lipid digestion and bioaccessibility of low-energy nanoemulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 404, 215-222.
- McClements, D. J. y Rao, J. 2011.** Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 51(4), 285-330.
- McClements, D. J. y Xiao, H. 2012.** Potential biological fate of ingested nanoemulsions: influence of particle characteristics. *Food & Function*. 3, 202-220.
- McClements, D. J. 2016.** Context and Background. Food emulsions. Principles, practices, and techniques (3rd ed) (pp. 1-26). New York: CRC Press.
- Medina-Torres, L.; Santiago-Adame, R.; Calderas, F.; Gallegos-Infante, J.A.; González-Laredo, R.F.; Rocha-Guzmán, N.E.; Núñez-Ramírez, D.M.; Bernad-Bernad, M.J.; Manero, O. 2016.** Microencapsulation by spray drying of laurel infusions (*Litsea glaucescens*) with maltodextrin. *Industrial Crops and Products*. 90, 1-8,
- Muñoz, Z; Moret, A. y Garcés, S. 2009.** Assessment of chitosan for inhibition of *Colletotrichum* sp. on tomatoes and grapes. *Crop protection*. 28(1): 36-40.
- Muscat, D., Adhikari, R., McKnight, S., Guo, Q., & Adhikari, B. 2013.** The physicochemical characteristics and hydrophobicity of high amylose starch–glycerol films in the presence of three natural waxes. *Journal of Food Engineering*. 119(2), 205-219.
- Nanda, R. y Nayak, P.L. 2009.** Edible biodegradable films for packaging applications. *Popular Plastics and Packaging*. 54(8): 17-22.

- Olivas, G.I. y Barbosa-Cánovas, G. 2009.** Edible films and coatings for fruit and vegetables. En: M. E. Embuscado y K. C. Huber (Ed.). *Edible films and coatings for food applications*. Springer, New York. p. 211-244.
- Oms-Oliu, G., Soliva-Fortuny, R. y Martín-Belloso. 2008.** Using polysaccharide-based edible coatings to enhance quality and antioxidant properties of fresh-cut melon. *LWT-Food Science and Technology*. 41(10): 1862-1870.
- Pérez, J., Hurtado, G., Aparicio, V., Argueta, Q. y Larín, M.A. 2001.** Guía Técnica. Cultivo de Jitomate. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal. p. 7-47.
- Pérez, S. y Eric Bertoft, E. 2010.** The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. *Starch/Stärke*. 62(8): 389–420
- Pérez-Gago, M.B., Serra, M., Alonso, M., Mateos, M. y Del Río, M.A. 2005.** Effect of whey protein- and hydroxypropyl methylcellulose-based edible composite coatings on color change of fresh-cut apples. *Postharvest Biology and Technology*. 36(1): 77–85.
- Pérez-Gago. 2012.** Protein-based films and coatings. En: E. A. Baldwin., R. Hagenmaier y J. Bai (Ed.). *Edible coatings and films to improve food quality*. CRC, Washington. p. 13-77.
- Pérez-Gallardo, A., Mattinson, S.D., Lazcano-Peralta, A., Fellman, J.K. Barbosa-Cánovas, G., García Almendárez, B. y Regalado, C. 2012.** Effect of native and acetylated-crosslinked waxy corn starch-beeswax coatings on quality attributes of raspberries during storage. *Starch/Stärke*. 64(8): 665:673.
- Pitt, J.I. y Hocking, A.D. 2009.** Methods for isolation, enumeration and identification. En: *Fungi and food spoilage*. 3rd Ed. Springer, New York. p. 19-52.
- Quezada-Gallo, J.A. 2009.** Delivery of food additives and antimicrobials using edible films and coatings. En: M. E. Embuscado y K. C. Huber (Ed.). *Edible films and coatings for food applications*. Springer, New York. p. 315-334.
- Ramírez, C., Gallegos, I., Ihl, M. y Bifani, V. 2012.** Study of contact angle, wettability and water vapor permeability in carboxymethylcellulose (CMC) based film with

- murta leaves (*Ugni molinae Turcz*) extract. *Journal of Food Engineering*, 109(3), 424-429.
- Rao, J. y McClements, D. J. 2012.** Food-grade microemulsions and nanoemulsions: role of oil phase composition on formation and stability. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 326-334.
- Rasband, W.S. 2007.** Image J. U.S. National Institute of Health, Bethesda, MD, <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>. Accessed December 2017.
- Rezvani, E., Schleining, G., Sümen, G. y Taherian, A. R. 2013.** Assessment of physical and mechanical properties of sodium caseinate and stearic acid based film-forming emulsions and edible films. *Journal of Food Engineering*, 116(2), 598–605.
- Ribeiro, C., Vicente, A.A., Teixeira, J.A., y Miranda, C. 2007.** Optimization of edible coating composition to retard strawberry fruit senescence. *Postharvest Biology and Technology*. 44(1): 63–70.
- Rodríguez, E., Seguer, J., Rocabayera, X. y Manresa, A. 2004.** Cellular effects of monohydrochloride of L-arginine, N-alpha-lauroyl ethylester (LAE) on exposure to *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*. 96(5): 903–912.
- Rojas-Graü, M.A., Tapia, M.S. y Martín-Belloso, O. 2008.** Using polysaccharide-based edible coatings to maintain quality of fresh-cut Fuji apples. *LWT-Food Science and Technology*. 41(1): 139-147.
- Rojas-Graü, M.A., Soliva-Fortuny, R. y Martín-Belloso, O. 2009.** Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. *Trends in Food Science and Technology*. 20(10): 438-447.
- Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, A., Soliva-Fortuny, R. y Martín-Belloso, O. 2013.** Physicochemical characterization of lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions: effect of ultrasound processing parameters. *Food and Bioprocess Technology*, 6(9), 2439-2446.
- Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. 2014.** Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade

- emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. *Food Hydrocolloids*. 34, 1-10.
- Sánchez-Ortega**, I., García-Almendárez, B.E., Santos-López, E.M., Reyes-González, L.R., & Regalado, C. **2016**. Characterization and antimicrobial effect of starch-based edible coating suspensions. *Food Hydrocolloids*. 52, 906-913.
- Santos**, T.M., Pinto, A.M.B., De Oliveira, A.V., Ribeiro, H.L., Caceres, C.A., Ito, E.N., & Azeredo, H.M. **2014**. Physical properties of cassava-starch-carnauba wax emulsion films as affected by component proportions. *International Journal of Food Science & Technology*. 49(9), 2045-2051.
- Saucedo-Pompa**, S., Rojas-Molina, R., Aguilera-Carbó, A.F., Saenz-Galindo, A., de La Garza, H., Jasso-Cantú, D. y Aguilar, C.N. **2009**. Edible film based on candelilla wax to improve the shelf life and quality of avocado. *Food Research International* 42(4): 511–515.
- SIAP-SAGARPA**-Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. **2016**: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=258
- Singh**, J., Kaur, L. y McCarthy, O.J. **2007**. Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications: a review. *Food Hydrocolloids*. 21(1): 1-22.
- Siracusa**, V., Rocculi, P., Romani, S. y Dalla-Rosa, M. **2009**. Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 19:634-643.
- Skurtys**, O., Velásquez, P., Henriquez, O., Matiacevich, S., Enrione, J., & Osorio, E. F. **2011**. Wetting behavior of chitosan solutions on blueberry epicarp with or without epicuticular waxes. *LWT-Food Science and Technology*. 44(6), 1449-1457.
- Soliva-Fortuny**, R., Rojas-Graü, M.A. y Martín-Belloso, O. **2012**. Polysaccharide coatings. En: E. A. Baldwin, R. Hagenmaier y J. Bai (Ed.). Edible coatings and films to improve food quality. CRC Press, New York. p. 103 -136.
- Tapia**, M.S., Rojas-Graü, M.A., Carmona, S., Rodríguez, F.J., Soliva-Fortuny, R. y Martín-Belloso, O. **2008**. Use of alginate- and gellan-based coatings for

- improving barrier, texture and nutritional properties of fresh-cut papaya. *Food Hydrocolloids*. 22(8): 1493-1503.
- Teixeira, P.C., Leite, G.M., Domingues, R.J., Silva, J., Gibbs, P.A. y Ferreira, J.P. 2007.** Antimicrobial effects of a microemulsion and a nanoemulsion on enteric and other pathogens and biofilms. *International Journal of Food Microbiology*, 118(1), 15-19.
- Valencia-Chamorro, S.A., Palou, L.I., Del Río, M.A. y Pérez-Gago, M.B. 2011.** Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 51(9): 872-900.
- Vargas, M., Cháfer, M., Albors, A., Chiralt, A. y González-Martínez, C. 2008.** Physicochemical and sensory characteristics of yogurt produced from mixtures of cows' and goats' milk. *International Dairy Journal*. 18(12), 1146-1152.
- Vargas, M., Pastor, C., Chiralt, A., McClements, J.D. y González-Martínez, C. 2008.** Recent advances in edible coating for fresh and minimally processed fruits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 48(6): 496-511.
- VEDEQSA. 2009.** LAE New active preservative. Technical leaflet. Grupo LAMIRSA.
- Williams, H. y Wikström, F. 2011.** Environmental impact of packaging and food losses in a life cycle perspective: a comparative analysis of five food items. *Journal of Cleaner Production*. 19(1): 43-48.
- Youssef, K., Ligorio, A., Franco Nigro, F. e Ippolito, A. 2012.** Activity of salts incorporated in wax in controlling postharvest diseases of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 65: 39–43.
- Yilmaz, E. y Ögütçü, M. 2014.** Properties and stability of hazelnut oil organogels with beeswax and monoglyceride. *Journal the American Oil Chemists´ Society*, 91(6), 1007-1017.
- Zapata, P.J., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Valero, D. y Serrano, M. 2008.** Use of alginate or zein as edible coatings to delay postharvest ripening process and to maintain tomato (*Solanum lycopersicon* Mill) quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 88(7): 1287–1293.

- Zahid, N., Ali, A., Manickam, S., Siddiqui, Y. Maqbool, M. 2012.** Potential of chitosan-loaded nanoemulsions to control different *Colletotrichum* spp. and maintain quality of tropical fruits during cold storage. *Journal of Applied Microbiology*, 113(4), 925-939.
- Zisman, W. A. 1964.** Relation of the equilibrium contact angle to liquid and solid constitution. In F. M. Fowkes (Ed.), *Contact Angle, Wettability, and Adhesion* (pp. 1-51). Washington, DC: *Advances in Chemistry*; American Chemical Society.
- Zuidema, H. H., & Waters, G. W. 1941.** Ring method for the determination of interfacial tension. *Industrial and Engineering Chemistry*, 13(5), 312-313.