



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en ciencia y tecnología de alimentos

**Diseño de un recubrimiento antimicrobiano con proteína de
chícharo-quitosano, transglutaminasa y nanopartículas con aceite
esencial de tomillo para su aplicación en pan**

TESIS

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

Presenta:

QA Karla Itzel De Jesús Fuentes

Dirigido por:

Dr. Carlos Regalado González

Co-dirigido por:

Dr. Prospero Di Pierro

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Noviembre 2019
México



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

**Diseño de un recubrimiento antimicrobiano con proteína de
chícharo-quitosano, transglutaminasa y nanopartículas con aceite
esencial de tomillo para su aplicación en pan**

Tesis

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

Presenta:

QA Karla Itzel De Jesús Fuentes

Dirigido por:

Dr. Carlos Regalado González

Co-dirigido por:

Dr. Prospero Di Pierro

Dr. Carlos Regalado González
Presidente

Dr. Prospero Di Pierro
Codirector

Dra. Blanca Estela García Almendárez
Vocal

Dr. Aldo Amaro Reyes
Suplente

Dra. Montserrat Escamilla García
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Noviembre 2019
México

RESUMEN

El interés en la protección del medio ambiente y la producción segura de alimentos ha promovido el desarrollo de recubrimientos comestibles (RC) con sustancias antimicrobianas como los aceites esenciales para prolongar la vida útil de los alimentos como el pan. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un RC antimicrobiano basado en proteína de chícharo (PP) reticulada con transglutaminasa (TG) en mezcla con quitosano (QT) y reforzada por la adición de nanopartículas de sílice mesoporosa (NSM) que contienen aceite esencial de tomillo (AET), y su aplicación como recubrimiento sobre pan. Se realizó un diseño factorial completo 2^3 con dos réplicas y las películas comestibles producidas (PC) se caracterizaron fisicoquímicamente. Las suspensiones filmogénicas (FS) se analizaron para determinar su potencial ζ , tamaño de partícula (TP) e índice de polidispersión. Los recubrimientos se evaluaron como películas en cuanto a espesor, propiedades mecánicas y de barrera. La concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de tomillo (TEO) se probó utilizando *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* y *Aspergillus niger*. Las FS que mostraron el mejor potencial ζ (28.5 mV) y el TP más bajo (470 nm) fueron PP:QT+AET y PP:QT+AET+TG. El grosor de las películas mostró un rango de 97-127 μm , aunque después de la reticulación con TG aumentó en 20 μm , pero la resistencia a la tracción y el porcentaje de elongación disminuyeron. Todos los tratamientos mostraron un rango más bajo de permeabilidad al vapor de H_2O [0.095 a 0.67 $\text{cm}^3 \text{mm}/(\text{m}^2 \text{s kPa})$] que LDPE [7 $\text{cm}^3 \text{mm}/(\text{m}^2 \text{s kPa})$]. La CMI del AET fue de 7.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ contra *A. niger* (el más resistente). Por otro lado, los recubrimientos con AET y NSM-AET mostraron tener actividad antifúngica y por lo tanto se seleccionó el recubrimiento de PP:QT+NSM-AET para su aplicación en pan. Este RC produjo una disminución de 8% en la pérdida de humedad y más de 8 días de retraso en el desarrollo de hongos y levaduras. Se sugiere aumentar la cantidad de recubrimiento o aplicarlo en pan rebanado para controlar de mejor manera el crecimiento de los microorganismos deterioradores tanto en el interior como exterior del pan.

Palabras clave: recubrimiento comestible, nanopartículas, aceite esencial de tomillo, pan.

ABSTRACT

The interest on environmental protection and production of safe foods has led to the development of edible coatings (RC), which added with antimicrobial substances such as essential oils may increase the shelf life of foods like bread. The objective of this work was to develop an antimicrobial RC based on pea protein (PP) cross-linked with transglutaminase (TG) in mixture with chitosan (QT) and reinforced by the addition of mesoporous silica nanoparticles (NSM) containing thyme essential oil (AET), and its application on bread coating. A complete factorial design 2^3 with two replicates was conducted, and the edible films produced (PC) were physicochemically characterized. Filmogenic suspensions (FS) were analyzed to determine their ζ potential, particle size (PZ), and poly-dispersion index (PDI). The coatings were evaluated as films for thickness, mechanical and barrier properties. Minimal inhibitory concentration (MIC) of TEO was tested using *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, and *Aspergillus niger*. The FS that showed the best ζ potential (28.5 mV) and lowest particle size (470 nm) were PP:CH:TEO, and PP:CH:TEO:TG. Films thickness ranged 97-127 μm , and after crosslinking with TG it increased by 20 μm , but tensile strength and elongation at break decreased. All treatments showed lower water vapor permeability [0.095 to 0.67 $\text{cm}^3 \text{mm}/(\text{m}^2 \text{s kPa})$] than LDPE [7 $\text{cm}^3 \text{mm}/(\text{m}^2 \text{s kPa})$]. The MIC of the AET was 7.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ against *A. niger* (the most resistant). On the other hand, the coating with AET and NSM-AET showed antifungal activity and therefore the PP:QT+NSM-AET coating was selected for application on bread. This coating produced reduction of 8% in moisture losses and delayed during more than 8 days the growth of molds and yeasts. Based on these results it is recommended to increase the amount of coating or to apply it on bread slices to achieve better growth control of spoilage microorganisms.

Key words: Edible coating, pea protein, nanoparticles, thyme essential oil, bread.

DEDICATORIA

A mi familia por siempre estar a mi lado

A CONACYT por otorgarme la beca para realizar mis estudios de Maestría

A AMEXCID que por medio del convenio México-Italia me becó para realizar una estancia en Italia.

Al Dr. Carlos Regalado, por aceptarme y darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, por su guía y consejos para culminar con éxito este proyecto.

Al Dr. Prospero Di Pierro, por su apoyo para realizar la estancia en la Universidad de Nápoles, por compartir sus conocimientos y entusiasmo por la ciencia, valiosas enseñanzas para elaborar este trabajo.

A la Dra. Blanca García, por su paciencia y valiosas enseñanzas que ayudaron a enriquecer este trabajo.

Y a la Dra. Monserrat Escamilla y el Dr Aldo Amaro por su ayuda, consejos y correcciones para fortalecer este trabajo.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, al Programa de Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química, a los doctores y personal administrativo, por el apoyo, asesoría y facilidades otorgadas.

A mis amigas y compañeros del laboratorio de Biotecnología de la UAQ, y al personal del Grupo de Biotecnología, Bioquímica y Enzimología de la Universidad de Nápoles, por compartir su experiencia, conocimientos y sobre todo por su amistad.

This work was supported by the Italian Ministry of Foreign Affairs and International Cooperation through the "Progetti Bilaterali di Grande Rilevanza, 2018-2019" related to the Scientific and Technological Cooperation between Italy and the U.S. of Mexico.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	Página
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE CUADROS	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Películas y recubrimientos alimenticios	3
2.1.1. Materiales para películas y recubrimientos	3
2.1.2. Empaques activos antimicrobianos	6
2.1.3. El pan	16
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. OBJETIVOS	19
4.1. Objetivo general	19
4.2. Objetivos específicos	19
5. METODOLOGÍA	20
5.1. Material químico y biológico	20
5.1.1. Reactivos	20
5.1.2. Microorganismos	20
5.1.3. Medios de cultivo	20
5.2. Métodos	20
5.2.1. Extracción del aceite esencial de tomillo (AET)	20

5.2.2. Análisis por CG/MS del aceite esencial de tomillo (AET)	21
5.2.3. Síntesis y caracterización de las nanopartículas de sílice mesoporosas (NSM)	22
5.2.3.1. Síntesis de las NSM	22
5.2.4. Nanopartículas de sílice mesoporosas con aceite esencial de tomillo (NSM-AET)	23
5.2.4.1. Adsorción del aceite esencial de tomillo (AET) en las NSM	23
5.2.5. Actividad antimicrobiana del AET y las NSM-AET	25
5.2.6. Caracterización de la solución filmogénica	26
5.2.6.1. Diseño experimental	26
5.2.6.2. Solución filmogénica	27
5.2.6.3. Determinación de la cantidad apropiada de NSM	27
5.2.6.4. Efecto de la TG en la solución filmogénica con NSM	27
5.2.7. Determinación de las propiedades del recubrimiento	28
5.2.7.1. Potencial ζ , tamaño de partícula e índice de polidispersión	28
5.2.7.2. Espesor	29
5.2.7.3. Propiedades mecánicas	29
5.2.7.4. Permeabilidad CO ₂ , O ₂ y vapor de agua	29
5.2.7.5. Actividad antimicrobiana de las películas con AET y NSM-AET	30
5.2.8. Aplicación del recubrimiento comestible en pan blanco	30
5.2.8.1. pH	31
5.2.8.2. Actividad de agua (a _w)	31
5.2.8.3. Humedad	31
5.2.8.4. Análisis microbiológicos	31

5.2.8.5. Análisis del perfil de textura (APT)	31
5.2.9. Análisis estadístico	32
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
6.1. Extracción del AET y su composición	33
6.2. Síntesis y caracterización de las NSM	35
6.3. Nanopartículas de sílice mesoporosas con AET (NSM-AET)	37
6.4. Actividad antimicrobiana del AET y las NSM-AET	43
6.5. Preparación de la solución filmogénica (SF)	45
6.5.1. Caracterización de la solución filmogénica (SF)	46
6.5.2. Determinación de las propiedades del recubrimiento	48
6.5.3. Actividad antimicrobiana de las películas comestibles	52
6.6. Aplicación del recubrimiento comestible en pan blanco	54
6.7. pH	54
6.8. Actividad de agua (a_w) y % de humedad	57
6.9. Análisis microbiológicos	59
6.10. Análisis del perfil de textura (APT)	63
7. CONCLUSIONES	66
8. REFERENCIAS	68
9. ANEXOS	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.		Página
1	Estructura química del quitosano	4
2	Reacciones catalizadas por la enzima transglutaminasa	11
3	Síntesis de nanopartículas de sílice mesoporosas y su estructura	13
4	Aplicación del recubrimiento comestible en pan blanco	30
5	Análisis del tamaño y morfología de las NSM-AET con TEM	36
6	Análisis del tamaño y morfología de las NSM-AET con TEM	38
7	Isoterma de adsorción de las NSM para el AET	39
8	Gráfica de forma lineal de Langmuir para las NSM para el AET	40
9	Cinética de liberación y estabilidad del AET en las NSM	43
10	Películas obtenidas del diseño experimental para las SF, según el Cuadro 4	48
11	Actividad antimicrobiana de las películas con 10 mg/mL de AET y NSM-AET contra <i>A. niger</i> . 1) Película Control (sin AET), 2) Película con AET libre 3) Película con NSM-AET	54
12	Evaluación de la aplicación del recubrimiento en pan blanco después de 16 días. A) Control, B) Recubierto	52
13	pH de los panes control y recubiertos durante 16 días	55
14	Aw de los panes control y recubiertos durante 16 días	56
15	% de humedad de los panes control y recubiertos durante 16 días	57
16	Cuenta total de A) mesófilos aerobios, B) levaduras y C) hongos	61
17	Análisis de perfil de textura del pan con el Instron universal	62
18	Análisis de perfil de textura A) elasticidad, B) gomosidad y C) masticabilidad	63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro No.		Página
1	Composición del aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)	9
2	Espectro antimicrobiano del aceite de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)	10
3	NMP de E 551 en alimentos de acuerdo con la regulación de la comisión europea y el Codex Alimentarius	15
4	Diseño factorial completo 2 ³	27
5	Composición del AET	34
6	Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) del AET y las NSM-AET	44
7	Potencial ζ , tamaño e índice de polidispersión de las SF a pH 8 con diferentes % de NSM	45
8	Potencial ζ , tamaño e índice de polidispersión de los tratamientos	47
9	Resistencia a la tensión, % de elongación, módulo de Young y espesor de las películas	49
10	Permeabilidad a CO ₂ , O ₂ y H ₂ O de los tratamientos	52
11	Diámetros de la zona de inhibición de las películas comestibles con AET y NSM-AET	53
12	Actividad antimicrobiana del recubrimiento en pan blanco (control y recubierto) durante 16 días	59

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, debido a la necesidad de incrementar la vida de anaquel de los alimentos, se han buscado alternativas que permitan evitar su deterioro químico y biológico. Lo que ha promovido el uso de empaques activos que permitan alargar la vida de anaquel de los productos por medio de antimicrobianos naturales (Chang *et al.*, 2015).

Un ejemplo de alimentos a los que puede alargarse su vida de anaquel, son los productos de panificación, estos productos pierden sus propiedades organolépticas lentamente después de la cocción, debido a una combinación de procesos químicos y físicos (envejecimiento) (Pasqualone, 2019). Además, son alimentos susceptibles al deterioro por hongos y bacterias debido a sus características fisicoquímicas y a que generalmente son empaquetados en bolsas de polietileno, manteniendo un espacio de cabeza húmedo y, en consecuencia, con alta actividad de agua (Salgado & Jimenez, 2012; Heras-Mozos *et al.*, 2019). Por ello, hoy en día se buscan alternativas de empaques para estos productos, que sean de fuentes renovables, comestibles y además permitan incorporar conservadores naturales, para mantener su inocuidad sin afectar sus propiedades (Jideani & Vogt, 2016). Por lo tanto, se ha buscado impulsar el uso de polímeros naturales que puedan emplearse en la elaboración de empaques comestibles (Di Pierro *et al.*, 2006).

Los materiales que pueden emplearse para su elaboración son variados, aunque los más utilizados son los carbohidratos tales como: el almidón, los alginatos, los carragenatos y el quitosano. Este último funciona bien como barrera al oxígeno y además tiene propiedades antimicrobianas, lo que lo hace útil al emplearse en combinación con otros materiales, como las proteínas, para la elaboración de recubrimientos y películas (Sánchez Aldana *et al.*, 2015).

No obstante, se considera que las propiedades de las películas y recubrimientos aún son deficientes, por lo que se ha tratado de incorporar nuevos

aditivos a la matriz con el objetivo de obtener materiales con características mejoradas.

Generalmente las películas y recubrimientos comestibles están formados por dos componentes principales: uno es una matriz basada en proteínas, lípidos o carbohidratos que permite formar una estructura cohesiva y un solvente, que suele ser agua. Además, pueden emplearse plastificantes y nanomateriales que ayudan a mejorar las propiedades físicas y también funcionan como sistemas de suministro de compuestos bioactivos (antimicrobianos) (Fernandez-Bats *et al.*, 2018).

Se ha buscado la incorporación de conservadores naturales (antimicrobianos) en los recubrimientos, ya que pueden ser de gran utilidad para retardar el crecimiento microbiano en los alimentos (Arredondo-Ochoa *et al.*, 2017). Los que han mostrado mayor potencial son: los ácidos orgánicos, el quitosano, los extractos de plantas y sus aceites esenciales.

Los aceites esenciales han provocado gran interés debido a que presentan amplio espectro antimicrobiano. Sin embargo, a pesar de su gran potencial, su uso en conservación de alimentos aún es limitado, porque generan cambios organolépticos no deseados. Por ello, para reducir las dosis requeridas, se han buscado opciones que creen vehículos para estos, como los nanocompuestos (Ruiz-Rico *et al.*, 2017).

En este proyecto se usará proteína de chícharo, quitosano, transglutaminasa, sorbitol, nanopartículas de sílice y aceite esencial de tomillo para el diseño de un recubrimiento comestible antimicrobiano que será aplicado en un producto de panificación.

2. ANTECEDENTES

2.1. Películas y recubrimientos alimenticios

Los términos recubrimiento y película son empleados de manera indistinta, sin embargo, un recubrimiento es una suspensión de grado alimenticio que se añade a un alimento por barnizado, sumergido o aspersión, que al secarse forma una capa delgada sobre el alimento (Peltzer *et al.*, 2017). Mientras que una película, se obtiene al verter una suspensión filmogénica sobre una superficie inerte y después de secarse se pone en contacto con la superficie del alimento (Quirós-Sauceda *et al.*, 2014).

Las películas y los recubrimientos comestibles son una buena alternativa para extender la vida de anaquel de los alimentos, ya que actúan como barreras al vapor de agua, oxígeno, dióxido de carbono, aromas, lípidos, y otros solutos. Además, pueden contener compuestos activos que inhiban microorganismos patógenos y deterioradores (Quirós-Sauceda *et al.*, 2014).

2.1.1. Materiales para películas y recubrimientos

Las películas y recubrimientos se pueden elaborar a partir de diferentes materias primas como proteínas y carbohidratos.

Los carbohidratos más utilizados son almidón, alginatos, carragenatos, pectinas, derivados de celulosa y quitosano. Este último funciona bien como barrera al oxígeno y tiene propiedades antimicrobianas, lo que lo hace viable para emplearse en combinación con otros materiales (Otoni *et al.*, 2017).

Las proteínas que se han empleado generalmente son derivadas de fuentes animales, como la proteína de suero de leche, colágeno, gelatina, caseína y albúmina de huevo. Sin embargo, son proteínas con alto costo de producción; por lo que en la actualidad se han buscado alternativas de menor costo y que sean viables para su uso en procesos tecnológicos, como las proteínas de soya, maíz, trigo, arroz, haba, chícharo y cacahuate que son de origen vegetal (Janjarasskul & Krochta, 2010; Sánchez-Ortega *et al.*, 2014).

2.1.1.1. Quitosano

El quitosano es un polisacárido natural derivado de la desacetilación de la quitina [poli- β -(1 \rightarrow 4)-N-acetil-D-glucosamina], un componente mayoritario del caparazón de crustáceos, como cangrejos, langostas y camarones (Cé *et al.*, 2012). Este tiene grandes ventajas ya que es excelente para formar películas, geles, fibras y partículas, que además son biodegradables, no tóxicas, biocompatibles y desde 1970 son reconocidas generalmente como seguras (GRAS) (Peltzer *et al.*, 2017).

Se han hecho investigaciones que demuestran que tiene actividad antimicrobiana contra hongos filamentosos, levaduras y bacterias (Kong *et al.*, 2010). El efecto antifúngico se debe tanto a la supresión de la esporulación, así como de la germinación de esporas (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2008). El efecto antimicrobiano se debe a un cambio en la integridad de la membrana de las bacterias, originado por interacciones del grupo amino libre (carga positiva) y la membrana celular (carga negativa) (Peltzer *et al.*, 2017).

El quitosano con alto grado de desacetilación ($\geq 75\%$) y peso molecular entre 28 kDa y 1671 kDa ha mostrado tener mayor efecto antibacterianos en soluciones acuosas sin importar el tipo de ácido usado para su solubilización (Figura 1) (Chung *et al.*, 2004).

Las películas a base de quitosano generalmente se preparan por reticulación química o interacciones físicas con otros compuestos, generalmente proteínas, debido a que son biodegradables y biocompatibles. Lo que además ayuda a obtener buenas propiedades mecánicas y permeabilidad selectiva a los gases (CO_2 , H_2O y O_2) (Jiang *et al.*, 2016).

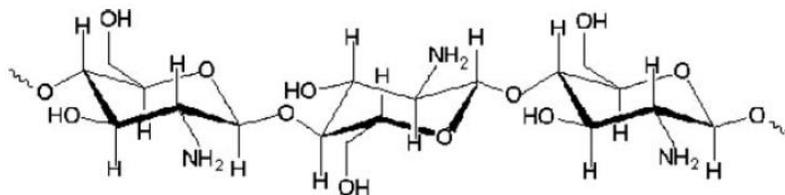


Figura 1. Estructura química del quitosano (Porta *et al.*, 2011).

2.1.1.2. Proteínas

Las películas y recubrimientos a base de proteínas presentan buenas propiedades mecánicas y de barrera contra gases (CO₂ y O₂), compuestos aromáticos y lípidos. Sin embargo, poseen alta permeabilidad al vapor de agua. Estas propiedades pueden mejorarse haciendo mezclas con materiales hidrófobos y algunos polímeros; o utilizando métodos químicos, enzimáticos y físicos (Bourtoom, 2009). Además, deben incorporar algún plastificante para que induzca flexibilidad y evite su ruptura durante el secado o manipulación para que la película o recubrimiento se vuelva suave y flexible (Osés *et al.*, 2009).

La capacidad que tienen diferentes proteínas para formar películas y recubrimientos es producto de sus características moleculares, como: peso molecular, composición, propiedades eléctricas (carga y pH), flexibilidad, y estabilidad térmica (Figueroa-Lopez *et al.*, 2018).

2.1.1.3. Proteína de chícharo

El chícharo (*Pisum sativum* L.) es una leguminosa que se cultiva generalmente en temporada de frío. En México se tiene registrada una producción anual de más de 66 mil toneladas, cuyos principales productores son los Estados de México, Puebla, Baja California, Hidalgo y Sinaloa. En el territorio mexicano se destinan más de 12 mil hectáreas para el cultivo de esta leguminosa (SAGARPA, 2017).

Esta leguminosa se usaba tradicionalmente para alimentación animal, debido a su alto valor nutritivo. Sin embargo, al paso del tiempo su precio fue en aumento, por lo que en la actualidad se emplea principalmente para consumo humano. El contenido de proteína en el chícharo es de 14-39 % en peso seco y está constituida principalmente por globulinas, que representan del 65-80 % de la proteína total. La fracción de globulina contiene: legumina con un peso molecular (Mw) de 360-400 kDa, vicilina (160-200 kDa) y pequeñas cantidades de convicilina (280 kDa). Igualmente, su perfil de aminoácidos está constituido por lisina (8 %), arginina (8

%), ácido aspártico (12 %) y ácido glutámico (19 %), y se caracteriza por un bajo contenido de metionina, cisteína y triptófano. Hoy en día, las proteínas de chícharo se usan para elaborar harinas, concentrados de proteína, y para enriquecer los alimentos en la industria; sin embargo, sus aplicaciones técnicas son muy limitadas, por ello se ha buscado su uso en la elaboración de empaques comestibles (Shi & Dumont, 2014).

2.1.2. Empaques activos antimicrobianos

Un empaque activo es un sistema en el que el producto, el empaque y el ambiente interactúan de manera positiva para extender su vida de anaquel. Este sistema cambia de forma constante las condiciones del empaque, lo que mejora la seguridad alimentaria y propiedades sensoriales manteniendo la calidad del alimento. A estos empaques se les añaden compuestos activos como agentes antimicrobianos, antioxidantes, enzimas, sabores, entre otros (Malhotra *et al.*, 2015; Lagarón *et al.*, 2016).

Actualmente, se ha buscado emplear agentes antimicrobianos de origen natural en la elaboración de empaques, debido a que los consumidores los prefieren. El uso de antimicrobianos permite retardar el crecimiento de microorganismos en el alimento. Sin embargo, si estos se aplican de forma directa se difunden rápidamente y sus sustancias activas pueden ser desnaturalizadas al interactuar con otros componentes del alimento, lo cual reduce su actividad antimicrobiana (Arredondo-Ochoa *et al.*, 2017). Por otro lado, los empaques antimicrobianos permiten una migración lenta y continua del agente antimicrobiano del empaque a la superficie del alimento, con lo que se mantiene por más tiempo una concentración constante (Sung *et al.*, 2013).

Los antimicrobianos que son comúnmente utilizados en películas y recubrimientos alimenticios son principalmente benzoatos, sorbatos, ácidos orgánicos, algunos polipéptidos, extractos de plantas y sus aceites esenciales, entre otros (Martínez-Tenorio & López-Malo, 2011).

Al momento de elegir un agente antimicrobiano es importante considerar su eficacia contra el microorganismo de interés y sus posibles interacciones con los componentes de la película e incluso con el alimento. Esto, debido a que las interacciones pueden influir en su efectividad y las características que se desean en la película.

Generalmente, los recubrimientos activos antimicrobianos requieren contacto constante del empaque y el producto para lograr mayor efectividad (Campos *et al.*, 2011).

2.1.2.1. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son líquidos aromáticos y volátiles que son extraídos de las plantas. Los compuestos químicos que los constituyen son metabolitos secundarios, que juegan un papel importante en la defensa de las plantas, ya que poseen propiedades antimicrobianas, además de efecto antioxidante (Hyldgaard *et al.*, 2012).

En la actualidad han sido muy estudiados debido a que presentan amplio espectro antimicrobiano. Sin embargo, a pesar de su gran potencial, su uso en la conservación de alimentos aún es limitado, debido a que generan cambios organolépticos no deseados. Por ello, se han buscado opciones que creen vehículos viables para estos compuestos y además puedan mejorar la calidad de los alimentos, como los recubrimientos comestibles (Ruiz-Rico *et al.*, 2017).

Los aceites esenciales contienen del 85-99 % de compuestos volátiles y de un 1-15 % de compuestos no volátiles. Los componentes volátiles son una mezcla de terpenos, terpenoides y otros constituyentes aromáticos y alifáticos, todos ellos caracterizados por su bajo peso molecular. Los terpenos están hechos de combinaciones de varias unidades de cinco carbonos llamados isoprenos; los monoterpenos formados por el acoplamiento de dos unidades de isopreno, son las moléculas más representativas de los aceites esenciales, representando el 90 % (Ruiz-Rico *et al.*, 2017).

Los compuestos aromáticos de los aceites esenciales se derivan principalmente del fenilpropano, ejemplo de ello son: aldehídos (cinamaldehído), alcoholes (alcohol cinámico), fenoles (eugenol), derivados metoxi (anetol, estragol) y compuestos derivados de dióxido de metileno (miristicina, apiol) (Ruiz-Rico *et al.*, 2017).

Se ha demostrado que los aceites esenciales y sus componentes, presentan propiedades antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes. Pese a que todos los componentes de los aceites esenciales pueden presentar actividad antimicrobiana, se han hecho investigaciones para identificar qué compuestos son los principales. Lo que se ha revelado en los aceites de albahaca y tomillo es que el carvacrol, timol, y eugenol son, los principales responsables de su actividad antioxidante y antimicrobiana (Sánchez-González *et al.*, 2011).

La razón principal de la actividad antimicrobiana en los aceites es debida a su hidrofobicidad, que les permite atravesar las membranas bacterianas y actuar directamente sobre ellas. Lo que provoca pérdida de iones, reducción del potencial de membrana y la disrupción de la fuerza protón motriz en la célula bacteriana ocasionando la muerte celular (Pesavento *et al.*, 2015).

2.1.2.1.1. Aceite esencial de tomillo

El tomillo es una planta aromática del género *Thymus* perteneciente a la familia Lamiaceae, que se caracteriza por su alto contenido en flavonoides como el timonino, cirsilineol, 8-metoxicirsilineol, ácido cafeico, diterpenoides, hidrocarburos saturados de cadena larga y aldehídos alifáticos a los que se les atribuyen sus propiedades antioxidantes (Varga *et al.*, 2015). Su actividad antimicrobiana se ha asociado al contenido de timol y carvacrol, que se encuentran en concentraciones de entre 10 % al 64 % y del 2 % al 11 % respectivamente, estos son monoterpenos con gran poder bactericida debido a su naturaleza fenólica (Pesavento *et al.*, 2015). Sin embargo, es importante considerar que el aceite esencial de tomillo varía en su composición según la temporada, la ubicación, el método de extracción y las partes de la planta de donde se extraiga (Cuadro 1) (Jang *et al.*, 2017).

Cuadro 1. Composición del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) (Burt, 2004; Khalili *et al.*, 2015).

Compuesto	Composición (% p/p)
R-pineno	0.4 - 1.0
R- terpineno	1.2 - 2.0
p- cimeno	7.0 - 56.0
Ç-terpineno	2.0 - 31.0
α -cariopileno	1.5 - 2.5
Borneol	1.7 - 4.0
Terpinen-4 ol	0.7 - 5.5
Carvacrol	2.0 - 11.0
Timol	10.0 - 64.0

El aceite esencial de tomillo ha mostrado excelentes propiedades antifúngicas, antivirales y antibacterianas. Su efecto se ha investigado previamente contra diversos agentes patógenos como: *Botrytis cinerea*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolítica*, *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella sonnei*, *Salmonella cholereasuis* y *Aspergillus niger* (Gonçalves *et al.*, 2017) mostrando concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) entre 15 a 60 µg/mL. Algunas de las MICs reportadas en la literatura se pueden observar en el Cuadro 2.

El uso de aceite esencial de tomillo como antimicrobiano en alimentos no es económico, ni prácticamente ideal. Su carácter hidrofóbico y baja estabilidad ante factores como luz, aire y altas temperaturas dificultan su incorporación a los alimentos. Por lo tanto, se ha hecho evidente la necesidad de implementar sistemas

que encapsulen, protejan y liberen este compuesto bioactivo y a su vez sean comestibles (Jemaa *et al.*, 2018).

Cuadro 2. Espectro antimicrobiano del aceite de tomillo (*Thymus vulgaris*) (Kalemba & Kunicka, 2003; Burt, 2004; Hyldgaard *et al.*, 2012).

Microorganismo	MIC (mg/mL)
<i>C. albicans</i>	1.0 - 5.0
<i>S. cerevisiae</i>	2.0 - 4.5
<i>B. subtilis</i>	2.0 - 5.0
<i>C. jejuni</i>	4.0 - 5.5
<i>Erwinia amylovora</i>	1.6 - 10.0
<i>Erwinia carotovora</i>	1.6 - 10.0
<i>E. coli</i> O157:H7	2.0 - 4.5
<i>L. innocua</i>	2.0 - 3.0
<i>L. monocytogenes</i>	2.0 - 4.5
<i>S. aureus</i>	2.0 - 5.0

MIC: concentración mínima inhibitoria

2.1.2.2. Transglutaminasa

El nombre sistemático de la transglutaminasa es R-glutaminil-péptido: amina (γ -glutamyltransferasa (E.C. 2.3.2.13)), que indica que su función es la transferencia de grupos acilo de residuos gamma glutaminil, presente en las proteínas o sustratos peptídicos (donador de acilo), a un sustrato aceptor de acilo, lo que resulta en una variedad de diferentes productos en función de las moléculas involucradas (Di Pierro *et al.*, 2013).

La formación de los enlaces isopeptídicos ϵ -(γ -glutaminil) lisina, entre los residuos de glutamina y lisina, son una de las reacciones que puede llevar a cabo

la transglutaminasa. Estas reacciones pueden ser intra o intermoleculares, lo que permite la formación de polímeros de alto peso molecular, que ayudan a mejorar las propiedades mecánicas y de barrera de las películas. A continuación en la Figura 2, se muestran las reacciones que lleva a cabo la enzima transglutaminasa (Porta *et al.*, 2015).

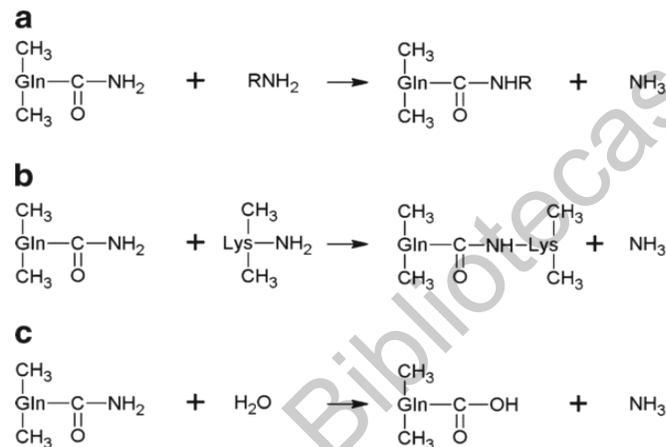


Figura 2. Reacciones catalizadas por la enzima transglutaminasa: **a.** reacción de transferencia de grupos acilo; **b.** reacción de entrecruzamiento entre residuos de glutamina y lisina de proteínas o péptidos; **c.** desaminación (Kieliszek & Misiewicz, 2014).

La transglutaminasa puede ser de origen animal o microbiano. La actividad enzimática de la transglutaminasa animal está influenciada por numerosos factores, entre ellos los iones Ca^{2+} , ya que se ha demostrado que su presencia induce cambios conformacionales en la molécula de la enzima, que promueven la actividad de su centro catalítico (Kieliszek & Misiewicz, 2014).

La transglutaminasa de origen microbiológico es de bajo peso molecular, a diferencia de la aislada de tejidos animales. Es un único polipéptido con un peso molecular de aproximadamente 38 kDa. Está compuesto por 331 aminoácidos, cuyo punto isoeléctrico es a pH 8.9. Es una proteína monomérica simple, que a 40 °C y a un pH 5.5 ve favorecida su actividad catalítica, sin embargo, esta enzima no es

estable al calor en presencia de etanol. La adición de carbohidratos, como maltodextrina, sacarosa, manosa, trehalosa y glutatión reducido, aumenta significativamente su estabilidad térmica (Kieliszek & Misiewicz, 2014).

Las enzimas biosintetizadas por *Streptoverticillium* sp son estables en un amplio rango de pH (4.5 a 8); además de no requerir ser activadas por iones Ca^{2+} , lo que es una ventaja con respecto a la transglutaminasa de origen animal. Su actividad aumenta en presencia de Co^{2+} , Ba^{2+} y K^+ y es inhibida por los iones Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} y Pb^{2+} que actúan uniéndose al grupo tiol de la cisteína en su centro activo (Kieliszek & Misiewicz, 2014).

2.1.2.3. Nanopartículas

Las nanopartículas se definen como partículas con tamaños entre aproximadamente 1 y 100 nm. Estas fueron sintetizadas por primera vez por Peter Paul Speiser en la década de 1950 con el objetivo de obtener fármacos y vacunas de liberación controlada (Kreuter, 2007).

Hoy en día las nanopartículas se usan en diversas áreas, incluida la industria alimentaria; ya que, por su tamaño se pueden emplear como portadores de compuestos activos que ayudan a combatir el deterioro microbiano de los alimentos, como nanosensores para empaques de alimentos y para mejorar las propiedades fisicoquímicas de los materiales de empaque.

Las nanopartículas más usadas en los empaques para alimentos son de origen orgánico debido a su biocompatibilidad, sin embargo, también se ha impulsado el uso de las nanopartículas inorgánicas ya que, se ha comprobado, que mejoran las propiedades mecánicas y de barrera de los materiales.

Las nanopartículas inorgánicas más usadas para mejorar las propiedades fisicoquímicas en los empaques para alimentos son las de MgO , Ag , TiO_2 , carburo de silicio y SiO_2 (Auffan *et al.*, 2018).

2.1.2.3.1. Nanopartículas de sílice mesoporosas

Las nanopartículas de sílice mesoporosas (MSN) son estructuras de dióxido de silicio (SiO_2), que están dispuestas de manera que crean poros de 2 a 50 nm. Son sintetizadas a partir de dos elementos principales: uno que funciona como plantilla, para dirigir la construcción de la red porosa de alta resolución (cristalina); y un precursor polimérico que se autoorganiza alrededor de la plantilla y, tras la polimerización, construye la estructura rígida final. Los poros se obtienen mediante la eliminación del tensioactivo y calcinación a alta temperatura entre 500 a 600 °C (Figura 3) (Hoffmann *et al.*, 2006).

La red mesoporosa en las nanopartículas, les proporciona grandes áreas de superficie (700 a 1000 m^2/g) y una gran capacidad de carga debido a los volúmenes de poro (0.6 a 1 cm^3/g). Por ello, el tamaño de poro, el volumen y la carga superficial son esenciales para encapsular la cantidad suficiente de un componente bioactivo y así retenerlo de manera eficiente durante el almacenamiento.

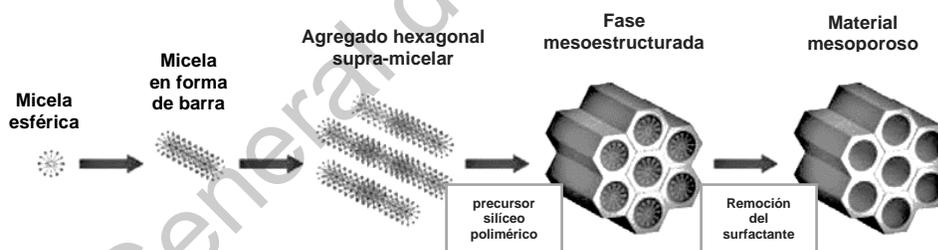


Figura 3. Síntesis de nanopartículas de sílice mesoporosas y su estructura (Pérez-Esteve *et al.*, 2015).

Además, el rango de tamaño de las MSN es importante, ya que se ha demostrado que juega un papel clave en la distribución y el comportamiento en los sistemas vivos (Pérez-Esteve *et al.*, 2015)

Para lograr la adsorción de moléculas bioactivas en las MSN, es importante considerar el tamaño y la selectividad de carga, debido a que solo las moléculas con tamaño menor que el poro del soporte pueden quedar atrapadas. Otros factores que considerar para la adsorción y la cinética de liberación del compuesto bioactivo

son: la longitud de poro, morfología de las partículas, área superficial, forma macroscópica y modificación o funcionalización de la superficie de las partículas (Pérez-Esteve *et al.*, 2015).

Dada su posible aplicación, para desarrollar sistemas de administración de compuestos activos de forma controlada, se ha realizado con éxito la síntesis de las MSN a partir de precursores similares a los alimentos. Se ha reportado el uso de las cenizas de la cáscara de arroz (fuente de sílice), los ésteres de poliglicerol de ácidos grasos, el éster de ácido mirístico de pentaglicerol y el ácido oleico como agentes generadores de MSN de calidad alimentaria (Tae *et al.*, 2009).

2.1.2.3.2. Uso en alimentos

El dióxido de silicio (E 551), se usa como aditivo alimentario en la Unión Europea (UE) de conformidad con el reglamento de aditivos alimentarios y pureza específica de la Comisión Europea, apartado No. 231/2012 (Younes *et al.*, 2018). Por lo que se ha evaluado su efecto toxicológico in vivo por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación / Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS) y se le asignó una ingesta diaria aceptable de "no especificado" (Liang *et al.*, 2018). Sin embargo, se han hecho diversos estudios que ayudaron a establecer un consenso entre la FDA, el Codex Alimentarius, el Reino Unido, Japón y la UE en el que se establece como la dosis letal del 50 % (DL₅₀, oral, rata) de 3160 mg/(kg día) (Ash & Ash, 2010).

En la actualidad, el aditivo E 551 está autorizado para su uso en una amplia gama de alimentos, el nivel máximo permitido (NMP) se establece en un rango de 2000 a 30000 mg/(kg día) y en algunos alimentos sólo se indica como buenas prácticas de fabricación (BPF) (Cuadro 3).

La función principal de E 551 en los alimentos es como agente de control de humedad, antiaglomerante para productos en polvo, adsorbente de aceites y grasas y clarificante en cervezas y vinos (Liang *et al.*, 2018).

Cuadro 3. NMP de E 551 en alimentos de acuerdo con la regulación de la comisión europea y el Codex Alimentarius (CXS 192-1995; Younes *et al.*, 2018).

Categoría del alimento	Restricciones/ excepciones	NMP (mg/L o mg/kg)
Queso madurado	Sólo en rodajas o rallado. Queso semiduro y duro	10000
Suplementos alimenticios		BPF
Productos de queso	Sólo queso semiduro y duro en rodajas o rallado	10000
Productos lácteos análogos, incluyendo bebidas blanqueadoras	Sólo quesos análogos en rodajas o rallados y queso fundido	10000
Productos extendidos, emulsiones, grasas y aceites	Sólo productos grasos enlatados	30000
Aceite vegetal en aerosol	Solo productos grasos enlatados	30000
Productos de confitería/ dulces para refrescar el aliento	Sólo la superficie	BPF
Goma de mascar	Sólo la superficie	BPF
Decoraciones, revestimientos y rellenos excepto de fruta	Sólo la superficie	BPF
Azúcares y jarabes	Sólo polvos secos para alimentos	10,000
Aderezos, condimentos y colorantes	Sólo aderezos	30000
Sal y sustitutos		10000

NMP: nivel máximo permitido; BPF: buenas prácticas de fabricación

2.1.3. El pan

Según el Codex Alimentarius, el pan es el producto resultante de la masa para hornear obtenida al mezclar harina y agua, con o sin adición de sal comestible, fermentada por la levadura de panadería *Saccharomyces cerevisiae*.

Este es uno de los productos alimenticios más importantes desde el punto de vista cultural, religioso y social; ya que ha sido un elemento esencial en la dieta tradicional en Europa, Medio Oriente, India, América y Oceanía (Heras-Mozos *et al.*, 2019). Sin embargo, debido a los cambios en la sociedad, también se ha modificado la forma en que se produce, compra y consume, por lo que se ha creado la necesidad de extender su vida útil (Pasqualone, 2019).

El pan se deteriora lentamente después de la cocción, debido a una combinación de procesos químicos y físicos llamados envejecimiento y también debido al deterioro microbiológico. El proceso de envejecimiento implica cambios estructurales, como aumento en la firmeza de la miga y la pérdida de humedad por la retrogradación del almidón, lo que a su vez favorece a las alteraciones por fenómenos oxidativos que perjudican el sabor y aroma, causando rechazo hacia el producto por parte de los consumidores (Barbarisi *et al.*, 2019). Además, es un alimento susceptible al deterioro por hongos y bacterias debido a sus características fisicoquímicas y a que generalmente es empaquetado en bolsas, manteniendo un espacio de cabeza húmedo y, en consecuencia, con alta actividad de agua ($0.94 < a_w < 0.97$) (Salgado & Jimenez, 2012; Heras-Mozos *et al.*, 2019).

Si bien, el horneado es una etapa en la que se logra eliminar tanto a mohos, levaduras y bacterias, una vez que el producto sale del horno, se debe manipular en condiciones estériles, para evitar el contacto con microorganismos que se encuentran en el ambiente, debido a que generalmente la contaminación es después del horneado. Los microorganismos que comúnmente son los causantes del deterioro del pan son hongos de los géneros: *Penicillium spp* y *Aspergillus spp* (Salgado & Jimenez, 2012).

Los efectos negativos de estos fenómenos tienen gran importancia para la industria, debido a que una mayor producción y venta requiere mayor vida de anaquel para el pan. Por ello, a nivel industrial, se permite incorporar agentes conservantes tales como: propionatos, sorbatos, enzimas (amilasas, lipasas o una combinación de las dos), emulsificantes, antimicrobianos y lípidos, que ayudan a disminuir la velocidad de retrogradación del almidón y conservan la inocuidad de los productos (Luna & Barcenas, 2011).

Sin embargo, hoy en día los consumidores exigen productos más naturales e inocuos, por ello existe la necesidad de incorporar sustancias de origen natural, como los aceites esenciales (especias y plantas) y los metabolitos secundarios producidos por microorganismos (bacterias ácido lácticas), para conservar la calidad e inocuidad del pan (Salgado & Jimenez, 2012). Desafortunadamente, estos compuestos pierden parte de su efecto al estar en contacto directo con los alimentos y pueden producir cambios organolépticos no deseados. Por ello, hoy en día se buscan alternativas para empaques comestibles activos que permitan incorporar estos conservadores naturales, y así incrementar la vida de anaquel de los productos sin afectar sus propiedades (Jideani & Vogt, 2016).

3. JUSTIFICACIÓN

En la última década, se ha incrementado la búsqueda de materiales alternativos para la elaboración de empaques que sean biodegradables, comestibles y hechos a partir de fuentes renovables. Debido a que en la actualidad los empaques y embalajes son de materiales derivados del petróleo, que tardan años en degradarse y por lo tanto generan un grave problema de contaminación ambiental. Por ello, se ha implementado el desarrollo de materiales a base de proteínas y polisacáridos capaces de formar películas y recubrimientos que exhiban buenas propiedades de barrera al oxígeno y vapor de agua. Sin embargo, hasta el momento no se ha logrado, así que se ha tratado de incorporar nuevos ingredientes a la matriz para mejorar sus características. Actualmente se ha buscado el reforzamiento de las películas por medio de nanomateriales, que además puedan usarse como contenedores de compuestos activos para la elaboración de empaques antimicrobianos, activos e inteligentes.

Los empaques comestibles de esta investigación tuvieron como objetivo alargar la vida de anaquel de los alimentos, por medio de un agente antimicrobiano natural que retrase o impida el crecimiento de bacterias patógenas y deterioradoras. Esto debido a la fuerte tendencia entre los consumidores de preferir alimentos sin aditivos químicos añadidos. Por lo tanto, fue necesario buscar estrategias que satisfagan a los consumidores, creando empaques hechos de materiales de origen natural, que protejan al alimento sin contaminar el medio ambiente y mantengan su inocuidad.

De manera que, el objetivo principal del presente trabajo fue el diseño de un recubrimiento antimicrobiano comestible a base de proteína de chícharo entrecruzada con transglutaminasa en mezcla con quitosano y reforzado con nanopartículas de sílice con aceite esencial de tomillo y su aplicación en pan.

Todos estos componentes son de grado alimenticio y por lo tanto son considerados seguros para consumo humano.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Diseñar un recubrimiento antimicrobiano comestible a base de proteína de chícharo entrecruzada con transglutaminasa en mezcla con quitosano y reforzado con nanopartículas de sílice con aceite esencial de tomillo y su aplicación en pan.

4.2. Objetivos específicos

1. Sintetizar y caracterizar nanopartículas de sílice mesoporosas para la encapsulación de aceite esencial de tomillo.
2. Determinar el nivel de adsorción y liberación de aceite esencial de tomillo de las nanopartículas, así como su actividad antimicrobiana.
3. Incorporar las nanopartículas de sílice con aceite esencial de tomillo en una suspensión filmogénica de proteína de chícharo, quitosano y transglutaminasa para evaluar sus propiedades mecánicas, de barrera y antimicrobianas.
4. Aplicar el recubrimiento en pan para evaluar si existe un efecto en sus propiedades fisicoquímicas y microbiológicas.

5. METODOLOGÍA

5.1. Material químico y biológico

5.1.1 Materiales

Aislado de proteína de chícharo (Roquette Naturalys S85F, México), quitosano (mediano peso molecular 375 kDa, desacetilación ≥ 75 % y alto grado de pureza, Sigma-Aldrich), sorbitol (Sigma-Aldrich), enzima transglutaminasa microbiana derivada de cultivo de *Streptoverticillium* sp, con 92 UI/g (Activa WM, Ajinomoto), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), tetraetil ortosilicato (TeOS) y reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich), hidróxido de sodio (Mallincrodt). El tomillo (*Thymus vulgaris*) fue adquirido de la central de abastos de Querétaro y su aceite esencial fue extraído por hidrodestilación en un equipo diseñado y construido por el grupo de trabajo de Biotecnología.

5.1.2 Microorganismos

Se usó la cepa *Micrococcus luteus* NCBI 8166, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Aspergillus niger*.

5.1.3 Medios de cultivo

El medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) y agar soya tripticaseína fueron obtenidos de Bioxon (Cuatitlán Izcalli, México).

5.2 Métodos

5.2.1 Extracción del aceite esencial de tomillo (AET)

El material seco de la planta de tomillo se obtuvo de la central de abastos de Querétaro y se secó a temperatura ambiente durante 4 días a la sombra. El aceite esencial de tomillo (AET) fue extraído por hidrodestilación (equipo tipo Clevenger) de 500 g de hojas y tallos secos con 5 L de agua destilada, durante 3 h con un equipo de hidrodestilación tipo Clevenger (Cristalab, DF, México). Enseguida, se recuperó la capa oleosa del destilado y se secó con sulfato de sodio anhidro. El AET fue esterilizado por filtración usando un porta filtros Swinnex con membrana de 25

mm de diámetro (Millipore, Burlington, MA, EUA) de polifluoruro de vinilideno (PVDF) de tamaño de poro de 0.45 μm y fue almacenado en viales ámbar a 4 °C hasta su uso, (Hernández-Hernández *et al.*, 2014).

5.2.2 Análisis por CG/MS del aceite esencial de tomillo (AET)

El análisis se realizó con un cromatógrafo de gases (modelo 7890A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA.). La muestra de AET que se usó fue filtrada con una membrana de 0.22 μm (Millipore, MA, USA) y diluida (1:10 v/v) con metanol. Se colocaron 3 μL de la muestra en un inyector automático MPS2XL (Gerstel GmbH, Alemania), acoplado a un detector de espectrómetro de masas (modelo 5975C, Agilent Technologies) y se usó una columna capilar DB-WAX ETR de 30 m x 250 μm de diámetro y 0.25 μm de espesor de fase (Agilent). Se usó helio ultra puro (Infra, Querétaro, México) como gas portador a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min y una temperatura del inyector de 260 °C. El programa de temperatura del horno fue de 40 °C durante 10 min, aumentando a 3 °C/min a 140 °C, seguido de un aumento a 10 °C/min a 260 °C, y se mantuvo durante 5 min. El potencial de ionización para la espectrometría de masas se mantuvo a 70 eV, mientras que la fuente de ionización electrónica y las temperaturas de cuadrupolo fueron de 230 °C y 150 °C, respectivamente. La cuantificación se calculó como la relación entre la zona y la zona de cromatografía de cada compuesto. La identificación de los compuestos se realizó comparando los espectros de masas (MS) obtenidos con los de la biblioteca NIST/EPA/NIH (Mass Spectra Library). Sólo se muestran los componentes con al menos un 90 % de similitud con la biblioteca de espectros. La identificación confirmativa se llevó a cabo mediante la determinación de sus índices de retención de Kovats (KIs), lograda mediante la inyección de una solución que contenía una serie de n-alcanos (C5-C29) (Sigma-Aldrich) en las mismas condiciones cromatográficas que el AET. Los KI obtenidos se compararon con los reportados en la literatura.

5.2.3 Síntesis y caracterización de las nanopartículas de sílice mesoporosas (NSM)

5.2.3.1 Síntesis de las NSM

Para la síntesis de las NSM se usaron 0.5 g de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) que fue disuelto en 240 mL de agua destilada y 2 mL de NaOH 2 N, la solución se colocó en un baño ultrasónico durante 5 min. Esta se calentó a 80 °C y se le adicionaron 2.5 mL de TeOS gota a gota durante 5 min; después se mantuvo en agitación durante 2 h. El producto sólido que se formó se separó por medio de filtración y se lavó con etanol (EtOH) absoluto dos veces, después se secó a temperatura ambiente. El polvo resultante se calcinó en una mufla (Thermolyne, Thermo scientific, EUA) a 500 °C durante 5 h para eliminar los rastros del tensoactivo (Fernandez-Bats *et al*, 2018).

5.2.3.2 Tamaño, índice de polidispersión y potencial zeta (ζ) de las NSM

El potencial zeta (ζ), tamaño de partícula e índice de polidispersión se midieron con un equipo Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Se realizaron tres mediciones de potencial ζ en la muestra de nanopartículas (1 mg/mL). Se hizo a una temperatura de análisis de 25 °C y 200 mV. El potencial ζ se calculó por medio de la movilidad electroforética utilizando la ecuación de Henry y la aproximación de Smoluchowski. Se calculó el tamaño promedio de las partículas en la solución por medio de dispersión dinámica de luz incluyendo la doble capa de partículas (diámetro hidrodinámico). El índice de polidispersión fue representado por la varianza relativa en la distribución del tamaño de partícula (Porta *et al.*, 2016; Giosafatto *et al.*, 2019).

5.2.3.3 Microscopía electrónica de transmisión de las NSM

Para confirmar el tamaño y la forma de las nanopartículas de sílice se llevó a cabo una microscopía electrónica de transmisión, las nanopartículas se disolvieron en etanol (1 mg/mL) y se adsorbieron en rejillas de cobre/paladio recubiertas con

carbono durante 1 min. Las muestras se observaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión (JEM-1010 JEOL, Peabody, MA, EUA) con un voltaje de aceleración de 80 kV y las imágenes se obtuvieron utilizando el software de micrografía digital 3.1 (Gata, Pleasanton, CA, EUA) (Arredondo-Ochoa *et al.*, 2017).

5.2.4 Nanopartículas de sílice mesoporosas con aceite esencial de tomillo (NSM-AET)

5.2.4.1 Adsorción del aceite esencial de tomillo (AET) en las NSM

Se colocaron 0.1 g de NSM en un vial con 0.1 g de AET y 400 µL de EtOH absoluto; estos se mantuvieron en agitación a 2000 rpm durante 24 h en una campana de extracción para evaporar el exceso de disolvente.

5.2.4.2 Eficiencia de la adsorción NSM-AET

Para determinar la eficiencia en la encapsulación del AET en NSM (NSM-AET), se suspendieron 5 mg de las muestras en 10 mL de acetato de etilo y, después de la centrifugación (centrífuga IKA, Wilmington, NC, EUA) a 10,000 rpm durante 10 min, se midió la cantidad de aceite esencial liberado de las NSM en el sobrenadante transparente mediante espectrofotometría con un espectrofotómetro (UV-1800 Shimadzu, Kioto, Japón) a 270 nm. Se usó una curva de calibración lineal obtenida de diferentes concentraciones de aceite esencial en acetato de etilo para detectar la relación entre diferentes concentraciones de aceite esencial y su absorbancia (Yilmaz *et al.*, 2019). La eficiencia se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de la encapsulación} = \frac{\text{AET total} - \text{AET libre}}{\text{AET total}} \times 100$$

5.2.4.3 Liberación del AET de las NSM

Se determinó por el contenido de fenoles totales del aceite esencial con el método de Folin-Ciocalteu. Se usó ácido gálico (Sigma-Aldrich) como patrón primario para elaborar la curva de calibración en la que se usaron diferentes

cantidades (5 a 40 $\mu\text{g/mL}$), y se determinó su absorbancia siguiendo la misma metodología que se menciona a continuación.

Las muestras de aceite esencial se prepararon para su análisis de la siguiente manera: se usaron 100 μL de muestra, 900 μl de solución de metanol en agua (1:9), 250 μl de reactivo de Folin-Ciocalteu (1:2) y 750 μl de carbonato de sodio al 5 %. La muestra se centrifugó durante 5 min a 10 000 rpm (centrífuga IKA) y después de 2 h de reacción a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 765 nm con un espectrofotómetro (UV-1800, Shimadzu) (Volić *et al.*, 2018).

5.2.4.4 Isoterma de adsorción del NSM-AET

Se pesaron muestras de NSM (previamente secadas a 110 °C y enfriadas) de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, y 40 mg en tubos Eppendorf de 2 mL. Se pipetearon 4 μL de AET en cada tubo Eppendorf y se añadió agua pH 8 para obtener un volumen final de 2 mL. Las muestras se agitaron a 2,000 rpm durante 30 min y se equilibraron en un baño de agua donde se mantuvieron a 25 °C durante otros 30 min. Después de 1 h, se centrifugaron a 5,000 rpm durante 5 min y se separaron las NSM del sobrenadante (Bayrak, 2006). Las NSM se colocaron en tubos Falcon de 15 mL con 10 mL de acetato de etilo y, después se centrifugaron (centrífuga IKA) a 10,000 rpm durante 10 min, se midió la cantidad de aceite esencial liberado en el acetato de etilo mediante un espectrofotómetro (UV-1800 Shimadzu, Japón) a 270 nm (Yilmaz *et al.*, 2019).

También se determinó el contenido de fenoles totales en el sobrenadante por el método de Folin. Las muestras se prepararon de la siguiente manera: se usaron 5 μL de muestra, 995 μl de solución de metanol en agua (1:9), 250 μl de reactivo de Folin-Ciocalteu (1:2) y 750 μl de carbonato de sodio al 5 %. La muestra se centrifugó durante 5 min a 10,000 rpm (centrífuga IKA) y después de 2 h de reacción a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 765 nm con un espectrofotómetro (UV-1800, Shimadzu) (Volić *et al.*, 2018).

Se a partir de los resultados obtenidos se construyó una gráfica de Langmuir que nos permitió obtener a partir de la ecuación de la recta los parámetros de K_A (constante de equilibrio), ΔG^0_{ads} (energía libre de adsorción) y el factor R (idoneidad de la adsorción).

5.2.5 Actividad antimicrobiana del AET y las NSM-AET

Se usó caldo soya tripticaseína para *S. aureus* y caldo assay para *M. luteus* a ambos se les adicionó una mezcla de 1 % (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) y 0.1 % (v/v) de Tween (T) 80 (Sigma-Aldrich), esterilizados previamente con autoclave a 121 °C 15 minutos, para favorecer la solubilidad del AET o las nanopartículas con aceite esencial (Shin & Kang, 2003).

Se usaron tubos de caldo estéril con diferentes concentraciones de AET (2.5 mg/mL y 5 mg/mL) y NSM con AET (5 mg/mL y 10 mg/mL) así como tubos sin antimicrobiano como control. Los medios se inocularon con 10^6 CFU/mL e incubaron a 37 °C durante el análisis. Se tomaron muestras cada h durante 12 h continuas y se sembraron en cajas con agar soya tripticaseína para *S. aureus* y agar assay para *M. Luteus*, y se determinó la población en función del tiempo. Para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) se usó el método de la gota (Miles & Misra, 1938) y para obtener la concentración mínima bactericida (CMB) se tomaron muestras de los tubos después de 24 h y se sembraron para observar si existía crecimiento en las placas (Sánchez-Ortega *et al.*, 2014).

Para *A. niger* se preparó medio de cultivo PDA al que se añadieron 665 μ L de T80/100 mL de PDA, esto para favorecer la difusión de AET. El medio se vació en cajas petri estériles y enseguida, se inoculó cada caja con 100 μ L de suspensión de 1×10^5 esporas/mL que se sembró por extensión en superficie con ayuda de una varilla de vidrio. Se prepararon emulsiones con tres concentraciones (2.5, 5 y 7.5 mg/mL) de AET y NSM-AET (5, 10 y 15 mg/mL) con solución de T80 al 10 % (v/v) y 1 % DMSO estéril. Posteriormente, se colocaron en el centro de la superficie del agar, discos de membrana de PVDF (Millipore, Burlington, Massachusetts, EUA) de 25 mm de diámetro y tamaño de poro de 0.22 μ m estériles. Se colocaron 75 μ L de

cada emulsión de AET sobre las membranas y se dejó secar durante 20 minutos en campana de flujo laminar. Finalmente, se incubaron a 30 °C y se observó su crecimiento al quinto día. Como control negativo se colocaron 75 µL de solución estéril de T80 al 10 % (v/v) y 1 % DMSO (Hernández-Hernández *et al.*, 2014).

5.2.5.1 Determinación de la concentración mínima fungicida (CMF) del AET y las NSM-AET

La concentración mínima fungicida (CMF) del AET para *A. niger* se realizó por el método de dilución en agar. Se utilizaron distintas concentraciones de AET (2.5, 5 y 7.5 mg/mL) y NSM-AET (5, 10 y 15 mg/mL) fueron emulsificados usando T80 al 10 % (v/v) estéril. Después se incorporaron al medio PDA a 40 °C que se vació en cajas Petri estériles. Se sembraron 100 µL de inóculo con 10⁵ esporas/mL en la superficie. Las placas se incubaron a 30 ± 1 °C y se observó el crecimiento a los cinco días. Como control negativo se colocó PDA con solución de T80 al 10 % (v/v) (Prudent *et al.*, 1995; López-Malo *et al.*, 2005; Arredondo-Ochoa *et al.*, 2017). La concentración mínima inhibitoria se consideró como la concentración más baja de aceite esencial que inhibió el crecimiento visible del hongo (Wiegand *et al.*, 2008).

5.2.6 Caracterización de la solución filmogénica

5.2.6.1 Diseño experimental

Se realizó un diseño factorial completo 2³ con dos réplicas. Los factores fijos fueron la cantidad de proteína de chícharo, el sorbitol y quitosano. Los factores fueron la transglutaminasa (TG), las nanopartículas de sílice mesoporosas (NSM) y aceite esencial de tomillo (AET). Los niveles de cada factor fueron ausencia (-) o presencia (+) (Cuadro 4).

Las variables respuesta fueron: potencial ζ , tamaño de partícula, índice de polidispersión, espesor, fuerza de tensión, elongación y módulo de Young. A los mejores tratamientos se les determinó la permeabilidad a los gases y las propiedades antimicrobianas.

Cuadro 4. Diseño factorial completo 2³.

Tratamiento	TG	NSM	AET
T1	-	-	-
T2	-	-	+
T3	-	+	-
T4	-	+	+
T5	+	-	-
T6	+	-	+
T7	+	+	-
T8	+	+	+

TG: transglutaminasa; NSM: nanopartículas de sílice;

AET: aceite esencial de tomillo; -: ausencia; +: presencia.

Nota: todos los tratamientos contienen proteína de chícharo (PP), sorbitol y quitosano (QT)

5.2.6.2 Solución filmogénica

Se preparó una solución de quitosano (QT) (2 % p/v disuelto en HCl 0.1 M y proteína de chícharo (PP) (2 % p/v, pH=4 con HCl 1 M) en agua desionizada a la cual se le adicionó sorbitol (40 % p/p respecto a la proteína) y se ajustó a pH 8 con NaOH 1 M.

5.2.6.3 Determinación de la cantidad apropiada de NSM

Para evaluar la cantidad óptima de nanopartículas en la suspensión filmogénica a pH=8, se hicieron soluciones con diferentes cantidades de nanopartículas en un intervalo de 3 a 12 % (p/p), las nanopartículas fueron suspendidas en agua desionizada a una concentración de 10 mg/mL a pH 8 durante 5 min con la ayuda de un baño ultrasónico (Mod 8892, CIVEQ, EUA), y se añadieron a la SF antes de añadir el sorbitol (Fernandez-Bats *et al.*, 2018).

5.2.6.4 Efecto de la TG en la solución filmogénica con NSM

Para estudiar el efecto de la transglutaminasa, se tomó una muestra de solución filmogénica preparada a pH 8, se mantuvo durante 1 h a 25 °C con agitación en presencia de la enzima (2 UI/mg de proteína) y al final de la incubación se agregó el sorbitol y las NSM.

Una segunda muestra de solución filmogénica se preparó a pH 8, se mezcló con las NSM y luego se incubó con TG (2 UI/mg de proteína) durante 1 h a 25 °C. Al final de la incubación se agregó el sorbitol.

5.2.7 Determinación de las propiedades del recubrimiento

5.2.7.1 Potencial ζ , tamaño de partícula e índice de polidispersión

El potencial zeta (ζ), el tamaño de partícula y el índice de polidispersión se midieron con un equipo Zetasizer Nano-ZS (Malvern). Se realizaron tres mediciones de potencial ζ en cada muestra de solución filmogénica (1 mL). Se hicieron a una temperatura de análisis de 25 °C y 200 mV. El potencial ζ se calculó por medio de la movilidad electroforética utilizando la ecuación de Henry y la aproximación de Smoluchowski. Se calculó el tamaño promedio de las partículas en la solución por medio de dispersión dinámica de luz incluyendo la doble capa de partículas (diámetro hidrodinámico). El índice de polidispersión fue representado por la varianza relativa en la distribución del tamaño de partícula. El equipo usó un láser de helio-neón con potencia de operación de 4 mW y se fijó a $\lambda = 633$ nm de emisión roja (Porta *et al.*, 2016).

5.2.7.2 Espesor

Se elaboró una película con la solución filmogénica y se hizo una medición con un micrómetro con sensibilidad de 2 μm (HO62 Metrocontrol Srl, NA, Italia) se colocaron tiras de la película entre las mandíbulas del micrómetro y el espacio se redujo hasta que se midió la fricción mínima. Se hizo el cálculo de el grosor promedio a partir de cinco mediciones en posiciones aleatorias de la película (Giosafatto *et al.*, 2014).

5.2.7.3 Propiedades mecánicas

La fuerza de tensión, elongación, y módulo de Young, se midieron usando un equipo Instron Universal (Mod. 5543A, Norwood, MA, EUA). Se elaboró una película con la solución filmogénica y se cortaron tiras de película de 10 mm de ancho x 5 cm de largo, estas tiras se equilibraron colocándolas a 50 % de humedad relativa (HR) y 23 °C en una cámara ambiental.

Las propiedades de tensión se midieron de acuerdo con la norma ASTM D882-97 (1997). Cada tira de película se colocó entre las mordazas neumáticas del Instron, la separación inicial de agarre se programó a 90 mm y se estiraron las tiras a una velocidad de 30 mm/min hasta la ruptura de la muestra (Giosafatto *et al.*, 2014; Porta *et al.*, 2016).

5.2.7.4 Permeabilidad CO₂, O₂ y vapor de agua

La permeabilidad se midió usando la técnica ASTM D3985 (1981), con modificaciones usando un equipo Multiperm (Extrasolution s.r.l., Pisa, Italia). Se realizó una película que se acondicionó durante dos días a 50 % de HR antes de realizar la medición. Se usaron máscaras de aluminio para reducir el área de prueba de la película a 5 cm², la prueba se realizó a 25 °C y a 70 % de HR (Fernandez-Bats *et al.*, 2018).

5.2.7.5 Actividad antimicrobiana de las películas con AET y NSM-AET

Se cortaron círculos de 10 mm de diámetro de las películas con AET y NSM-AET, una vez cortados los círculos se dejaron bajo luz UV para esterilizar durante 30 min, por cada lado. Se usaron placas de agar soya tripticaseína para *S. aureus* y agar assay para *M. luteus* con 10⁵ UFC/mL, y se evaluó la actividad antimicrobiana colocando los trozos de las películas en la superficie del agar, seguido de incubación a 35 °C durante 24 h para *S. aureus* y 48 h para *M. luteus*. El efecto antimicrobiano se determinó midiendo el diámetro de la zona de inhibición (Arredondo-Ochoa *et al.*, 2017). Con *A. niger* se cortaron círculos de 25 mm de diámetro y se siguió el mismo

procedimiento antes descrito usando agar PDA, seguido de incubación a 25 °C durante 5 días.

5.2.8 Aplicación del recubrimiento comestible en pan blanco

Se realizó un diseño experimental unifactorial en dos niveles, panes recubiertos y panes sin recubrir. Las unidades experimentales se conformaron por 3 panes y cada tratamiento se realizó aleatoriamente y por triplicado. Las mediciones se realizaron a los 0, 4, 8, 12 y 16 días. Todos los panes fueron formulados de acuerdo con lo reportado por Quiroz (2018) y la NMX-F-159-S-1983 (Anexo 1). Los panes fueron recubiertos por aspersión al momento de salir del horno.

Se asperjó el recubrimiento dos veces en toda la superficie de los panes y se dejaron secar por 5 min en una campana de extracción, se almacenaron en bolsas de polietileno de alta densidad (12 cm x 25 cm) a 25 °C y 50 % HR. Para realizar las mediciones fisicoquímicas se molieron y homogenizaron las muestras.



Figura 4. Aplicación del recubrimiento comestible en pan blanco.

5.2.8.1 pH

El pH se determinó utilizando un potenciómetro Orion star 211 (Thermo Scientific, MA, EUA). Esta medición se realizó por triplicado, se molió por completo cada pieza de pan, se tomaron 10 g por pieza y se mezclaron con 20 mL de agua destilada (pH 7, ajustado previamente con NaOH 0.01 M) (NMX-F-159, 1983).

5.2.8.2 Actividad de agua (a_w)

Para la determinación de la actividad del agua (a_w), las mediciones se realizaron con un equipo AquaLab (Modelo CX-2, Decagon, Pullmann, WA, EUA).

Se tomaron 5 g de pan homogeneizado y todas las muestras se analizaron por triplicado (Leuschner *et al.*, 1999)

5.2.8.3 Humedad

La humedad se determinó usando 1 g del pan homogeneizado mediante Termobalanza (Ohaus MB-200, NJ, EUA) a 105 °C y las mediciones se realizaron por triplicado (Estrada-López *et al.*, 2018), expresándose la humedad como % en peso.

5.2.8.4 Análisis microbiológicos

Para evaluar la actividad antimicrobiana del recubrimiento se pesaron 10 g del pan recubierto y se mezclaron con 90 mL de agua peptonada estéril y se mezclaron. Posteriormente, se tomó una alícuota de esta mezcla y se inoculó en cajas Petri utilizando la técnica de cuenta estándar (NOM-092-SSA1-1994) y conteo de mohos y levaduras (NOM-111-SSA1-1994).

5.2.8.5 Análisis del perfil de textura (APT)

El análisis del perfil de textura de los panes recubiertos y control se realizó según lo descrito por Al-Asmar *et al.* (2019) con algunas modificaciones. Cada muestra de pan se analizó usando un equipo Instron Universal (Mod. 5543A, Norwood, MA, EUA) equipado con una celda de carga de 2 kN en modo compresión con una sonda cilíndrica (55 mm de diámetro). La prueba se configuró para determinar los tres parámetros del APT establecidos: elasticidad, masticabilidad y gomosidad (Bourne, 2002). Estos se calcularon en el momento de la prueba determinando la carga y el desplazamiento en puntos predeterminados en la curva de APT. Las velocidades previas y posteriores fueron de 2 mm/s, mientras que la velocidad de prueba fue de 1 mm/s. Las muestras usadas fueron preparadas como se describió anteriormente, sólo que esta vez se usaron panes de 50 g, se centraron y comprimieron hasta un 30 % de deformación. La elasticidad (mm) se derivó del pico positivo obtenido en la primera compresión del producto o una fuerza de compresión máxima exhibida. La masticabilidad (N*mm) fue el producto matemático

del software Bluehill (versión 2.21) a partir de la dureza, cohesión y elasticidad del pan. Y finalmente la gomosidad (N) fue calculada por el software Bluehill automáticamente, haciendo el producto de la dureza con la cohesión, que es una relación de las áreas de fuerza positiva bajo la primera y segunda compresiones. Todos los análisis de APT se llevaron a cabo por triplicado por tratamiento durante el almacenamiento (0, 4, 8, 12 y 16 días).

5.2.9 Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron por triplicado y se reportó el promedio \pm desviación estándar. Se utilizó el análisis de regresión lineal para determinar diferencias a lo largo de los días y el análisis de varianza para determinar diferencias entre los tratamientos. Para determinar diferencias entre las medias se efectuó la prueba de Tukey, con un nivel de significancia $\alpha < 0.05$, utilizando el software estadístico R (versión 3.4.1.).

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Extracción del AET y su composición

El rendimiento del AET por el método de hidrodestilación fue de 1.77 ± 0.16 % (p/p, base seca), el cual es muy cercano al reportado por Gedikoğlu *et al.* (2019) de 1.8 ± 0.14 % (p/p) para la misma variedad de tomillo y método de extracción, sin embargo, las plantas fueron provenientes de diferentes zonas geográficas.

El rendimiento y la calidad de los aceites esenciales y los extractos depende de las condiciones climáticas, el tipo de suelo y el genotipo de la planta. Este se encuentra influenciado de manera prominente por la etapa fenológica (etapa vegetativa, floración completa, maduración de la semilla), la edad de la planta, la edad de la hoja e incluso por el método de extracción del aceite esencial (Csilla *et al.*, 2018).

Se usó la misma técnica de extracción, la misma variedad de plantas de tomillo (*Thymus vulgaris*) y además las plantas usadas en ambos casos se encontraban en la etapa de floración lo que explica que se obtuvieran resultados similares.

La composición del aceite esencial se analizó mediante CG/MS y la identificación confirmativa se llevó a cabo mediante la determinación de sus índices de retención de Kovats (KIs). Los resultados se muestran en el Cuadro 5.

Se identificó que los compuestos principales del AET eran timol (23.37 %), seguido de su precursor biosintético γ -terpineno (18.72 %), *p*-cimeno (11.88 %), linalool (3.93 %) y cariofileno (3.91 %). Varga *et al.* (2015) y Csilla *et al.* (2018) usaron también el método de hidrodestilación para la extracción del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) y reportaron su composición mostrando resultados diferentes. Varga *et al.* (2015) reportaron una composición en la que el compuesto mayoritario fue timol (32.2 %), seguido por *p*-cimeno (21.7 %), γ -terpineno (13 %) y 1,8-cineol (4.4 %). Csilla *et al.* (2018) por su parte, reportaron como los

componentes principales al timol (46.3 %), *p*-cimeno (22.1 %), linalool (5.1 %) y 1,8 cineol (9.8 %).

Cuadro 5. Composición del AET.

Número	Compuesto	Composición % área del pico	KI ^b	KI ^c	Identificación
1	Timol	23.37	2183	2173	KI, MS
2	γ -Terpineno	18.72	1226	1238	KI, MS
3	<i>p</i> -Cimeno	11.88	1245	1245	KI, MS
4	Linalool	3.93	1500	1501	KI, MS
5	Cariofileno	3.91	1626	1617	KI, MS
6	β -Pino	2.64	1139	1140	KI, MS
7	1-Octen-3-ol	1.55	1444	1445	KI, MS
8	Terpinen-4-ol	0.59	1630	1635	KI, MS
9	2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimetil	0.46	1858	1851	KI, MS
10	2,6-Octadienal, 3,7-dimetil	0.39	1631	1689	KI, MS
11	Ciclohexano, 1-metil-4-(1-Metiletilidieno)	0.15	1250	1262	KI, MS
12	Bornil acetato	0.09	1595	1600	KI, MS
13	Eugenol	0.08	2132	2141	KI, MS
14	Bencen, 1-metil-4-(1-metiletenil)	0.04	1382	1394	KI, MS

^b Índices de retención de Kovats calculados

^c Índices de Kovats reportados en la literatura

Los componentes mayoritarios que generalmente están presentes en los aceites esenciales del género *Thymus* son el timol, *p*-cimeno, γ -terpineno, carvacrol y linalool, dependiendo del quimiotipo del aceite (Csilla *et al.*, 2018). Sin embargo, la composición química del AET puede verse afectada por las condiciones

ambientales (humedad, temperatura, radiación, características del suelo, entre otras) (Jouki *et al.*, 2014). Varios autores han comentado la importancia de estos factores, ya que pueden provocar cambios en las rutas bioquímicas de síntesis de los compuestos secundarios. Un ejemplo es el timol que se sintetiza a partir del *p*-cimeno, que a su vez deriva del γ -terpineno, estos precursores son de vital importancia para la actividad antimicrobiana del aceite esencial. El timol se considera el compuesto con mayor actividad antimicrobiana y se ha observado que su síntesis se ve favorecida si existe exceso de humedad en el ambiente o si la planta se encuentra en estado de floración, ya que la planta necesita mayor protección contra agentes externos (Csilla *et al.*, 2018).

Es posible que debido a todos los factores externos que pueden influenciar los cambios en la composición del AET, se hayan encontrado proporciones distintas de los componentes de los aceites esenciales antes mencionados, sin embargo, es importante mencionar que el componente mayoritario en todos los casos fue el timol, compuesto característico del género *Thymus*.

6.2 Síntesis y caracterización de las NSM

Las NSM también conocidas como MCM-41 (material cristalino móvil), poseen sistemas de poros ordenados y de forma hexagonal con un tamaño bien definido (2-50 nm). Este material es muy utilizado en alimentos, principalmente como anti aglomerante, debido a que posee características particulares que lo hacen útil y versátil, como gran área de superficie, gran capacidad de adsorción y absorción (debido a sus poros), baja toxicidad y alta estabilidad química y térmica. Además, de que se ha demostrado que las NSM son capaces de reforzar las propiedades mecánicas de distintos materiales (Hoffmann *et al.*, 2019).

La morfología porosa y esférica de las NSM sintetizadas se visualizó mediante análisis con TEM, se observó un tamaño promedio de 200 ± 32 nm y una estructura mesoporosa tipo canal MCM-41 (Figura 5)

Fernandez-Bats *et al.* (2018) y Jin *et al.* (2019) reportaron para el mismo tipo de NSM (MCM-41) un tamaño promedio de 143 ± 26 nm y 576 ± 10.75 nm respectivamente (determinado por TEM).

El tamaño y la forma de las NSM están muy influenciados por el estado de agregación de las micelas del tensoactivo, su estructura anfífila y su concentración. Por ello, el tensoactivo más usado es el CTAB, ya que tiene la capacidad de servir como plantilla para crear partículas de sílice de dimensiones entre 200 a 400 nm con mesoporos ordenados y paralelos, que pueden usarse en productos alimenticios.

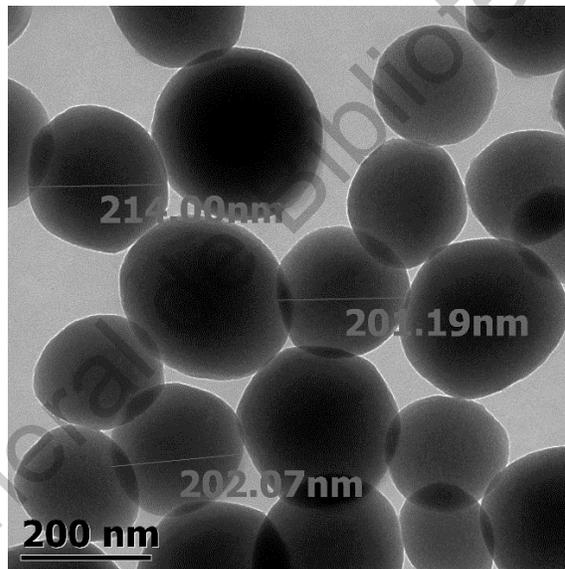


Figura 5. Análisis del tamaño y morfología de las NSM con TEM.

Sin embargo, existen otros factores que pueden ser determinantes en la morfología de las NSM durante su síntesis, como la velocidad de agitación y la velocidad de goteo del TEOS (Hoffmann *et al.*, 2019).

El tamaño de las nanopartículas sintetizadas en este trabajo son diferentes de las reportadas por Fernandez-Bats *et al.* (2018) y Jin *et al.* (2019), debido a que durante la síntesis existen diferentes factores que pueden modificar el tamaño de

las partículas, sin embargo, la morfología es igual así como la distribución de los poros, características fundamentales de las nanopartículas tipo MCM-41.

Con el objetivo de estudiar la estabilidad de las suspensiones de NSM en agua desionizada, se determinaron los valores de potencial ζ (1 mg de NP/mL de agua) e índice de polidispersión (IP) a un pH de 8.

El potencial ζ de las NSM fue de -43.83 ± 0.85 mV y el IP fue de 0.320 ± 0.02 , Fernandez-Bats *et al.* (2018), reportaron un potencial ζ para las NSM de -30 mV entre pH 8 y 12, mientras Jin *et al.* (2019) reportaron un valor de -47.13 ± 0.38 mV. Todos los valores se encuentran dentro del intervalo de potencial ζ considerado como estable.

Es bien sabido que las soluciones o suspensiones con valor absoluto del potencial zeta >30 mV, son más estables como consecuencia de la repulsión de partículas que dificulta su agregación (Croissant *et al.*, 2018).

El índice de polidispersión indica la distribución de tamaño de las partículas, lo que nos ayuda a conocer que tan homogéneas son las partículas de un material. Este es cero para una población monodispersa, un ejemplo de esto son los valores de aproximadamente 0.05 que se obtienen con partículas de látex, que se consideran como el estándar "monodisperso". Un índice de polidispersión > 0.5 ya nos indica una distribución muy amplia en el tamaño de las partículas de un material (Schwarz & Mehnert, 1999).

El índice de polidispersión determinado para las NSM sintetizadas fue de 0.320 ± 0.02 , valor que nos indica que existe baja polidispersión en el tamaño. También se obtuvo el intervalo de tamaño de las partículas, siendo de 174.4 a 234.2 nm, el cual se encuentra dentro de las especificaciones de la regulación de la comisión europea (2018) en el que se establece que para el uso de partículas de sílice en alimentos su tamaño debe ser ≥ 100 nm.

6.3 Nanopartículas de sílice mesoporosas con AET (NSM-AET)

Se determinó que las NSM son capaces de retener el AET con una eficiencia de 93.3 % \pm 0.73, mientras que Yilmaz *et al.* (2019) reportaron una eficiencia de 78.4 % \pm 2.36 usando nanopartículas de quitosano con aceite esencial de orégano.

La gran capacidad de encapsulación de las NSM las hace de gran utilidad para ser soporte de sustancias activas. Sin embargo, es importante considerar el tamaño y la selectividad de carga de las moléculas bioactivas, debido a que solo las moléculas con tamaño menor que el poro del soporte pueden quedar atrapadas y posteriormente ser liberadas (Pérez-Esteve *et al.*, 2015).

La diferencia en eficiencia de la encapsulación de los aceites esenciales en ambas nanopartículas puede explicarse debido a que poseen una estructura distinta. La presencia de los mesoporos en las NSM, le proporcionan una gran área superficial (700 a 1000 m²/g) y una gran capacidad de carga debido a los volúmenes de poro (0.6 a 1 cm³/g) (Hoffmann *et al.*, 2006). Lo que las hace más eficientes en el proceso de encapsulación del AET.

Se verificó la morfología y tamaño de las NSM-AET por medio de TEM, para determinar si al agregar el AET existían cambios. Se observó que las NSM-AET mantenían su morfología, pero incrementaron su tamaño, ya que sin AET su tamaño era de 200 \pm 32 nm y con AET fue de 482.60 \pm 200.47 nm (Figura 6).

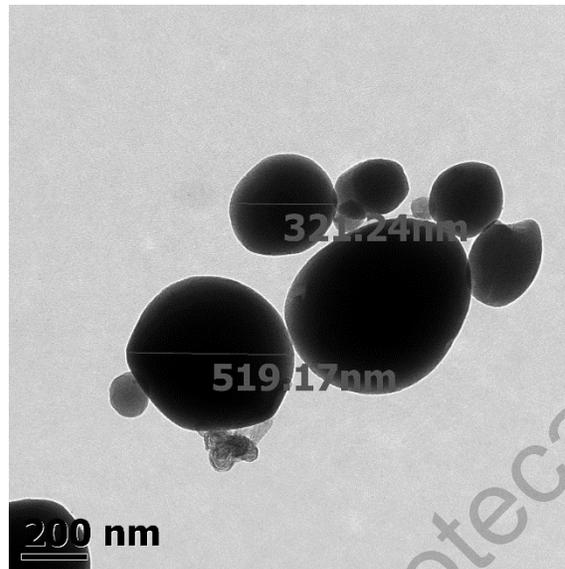


Figura 6 Análisis del tamaño y morfología de las NSM-AET, usando TEM.

Jin *et al.* (2019) también analizaron la morfología y tamaño de el mismo tipo de nanopartículas (MCM-41) y determinaron que el tamaño era de 576 ± 10.7 nm y al agregar aceite esencial de pimienta su tamaño incrementó, siendo de 717 ± 13.38 nm. En ambos casos hubo un incremento en el tamaño de partícula, sin embargo, en los resultados de esta investigación se observa una gran variación en el tamaño de las partículas esto puede deberse a la formación de aglomerados de nanopartículas que se forman al agregar el aceite, estos cambios parecen indicar que los aceites esenciales se insertaron de forma exitosa en la matriz mesoporosa de las nanopartículas.

Para estudiar la interacción del AET y las NSM, así como la estructura de la capa adsorbida, se llevó a cabo una isoterma de adsorción que se analizó con el modelo de Langmuir. Este es quizás el modelo más utilizado debido a su simplicidad y su fuerte razonamiento teórico, ya que la isoterma de Langmuir nos ayuda a establecer tres premisas esenciales que son la cobertura monocapa, la independencia del sitio de adsorción y la equivalencia (Bayrak, 2006).

La Figura 7 muestra la isoterma de adsorción del AET, donde se graficó a X_e (mg de adsorbato en solución) vs q (cantidad de adsorbato adsorbido por gramo de

adsorbente, al equilibrio). Como se puede observar, los datos convergen en una meseta horizontal. Esta meseta corresponde a la formación de una monocapa de adsorbente sobre las NSM.

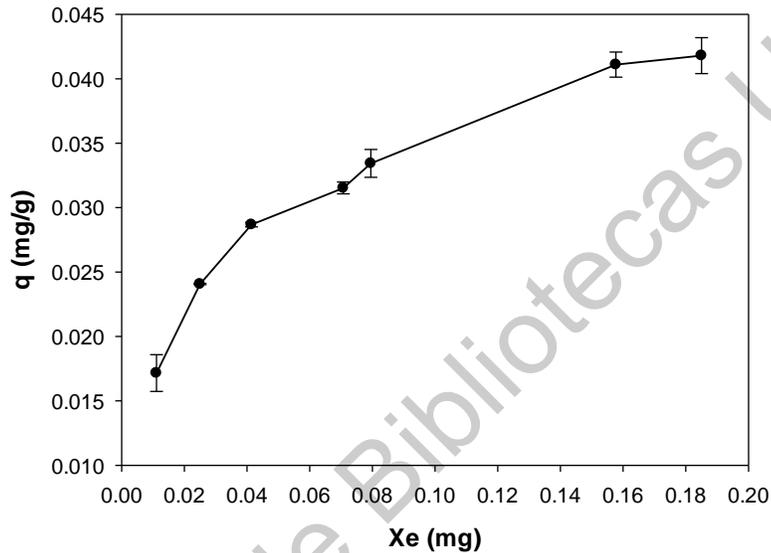


Figura 7. Isoterma de adsorción de las NSM para el AET.

Para obtener las constantes de Langmuir, se realizó una regresión lineal con los datos obtenidos de la isoterma (Figura 7), obteniendo la gráfica que se presenta en la Figura 8.

La aplicabilidad de la isoterma de Langmuir a los datos obtenidos de la adsorción de AET en las NSM se puede examinar a partir del gráfico de X_e/q (g) vs. X_e (Figura 8). Ya que se considera que la isoterma de Langmuir se aplica si la gráfica es lineal.

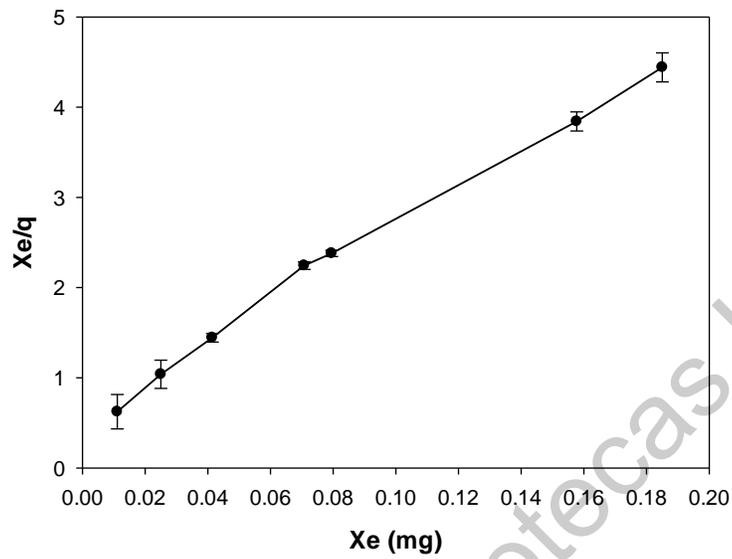


Figura 8. Gráfica de forma lineal de Langmuir para las NSM para el AET.

La energía libre de adsorción de Gibbs (ΔG^0_{ads}) obtenida mediante el gráfico de Langmuir fue de -9.573 kJ/mol a 25 °C, la cual indica que el proceso de adsorción es espontáneo y es de fisisorción a través de enlaces de hidrógeno de los componentes del aceite esencial sobre el grupo silanol (Si-O-H) en la interface de las NSM/H₂O (Parida *et al.*, 2006).

Bayrak (2006) reportó para la montmorillonita de sílice un ΔG^0_{ads} de -28.24 kJ/mol para cinco diferentes ácidos grasos, lo que indica que la adsorción de los ácidos grasos en la montmorillonita de sílice es más espontánea que la del AET en las NSM. Esta diferencia puede deberse a la complejidad de la composición del AET, ya que en su mayoría son compuestos aromáticos e hidrofóbicos, que pueden presentar dificultad para entrar en los poros de las NSM. Caso contrario con los ácidos grasos que son de forma lineal y pueden entrar fácilmente en los poros de la montmorillonita de sílice (Parida *et al.*, 2006).

La cobertura de la monocapa, que es la capacidad de adsorción de las NSM para el AET fue de 0.052 mg/g, mientras que Bayrak (2006) reportó para la montmorillonita de sílice un valor de la monocapa de 43 mg/g. Este valor es superior

al obtenido con las NSM, esto puede deberse a la composición del aceite esencial y la dificultad que tienen los compuestos aromáticos para entrar a los poros de las NSM.

Para comprobar los resultados anteriores se determinó el factor R (pendiente obtenida de la gráfica de Langmuir en la Figura 8, que nos indica el tipo de adsorción entre el AET y las NSM, que fue de 0.0061, que de acuerdo con lo reportado por Bayrak (2006) la adsorción es de tipo irreversible. El que sea una interacción irreversible explica los valores obtenidos en los otros parámetros; ya que los compuestos del AET que logran entrar a los poros de las NSM interactúan creando una fisisorción por puentes de hidrógeno de los enlaces silanol y los componentes del aceite esencial que hace muy lenta su liberación (Liew *et al.*, 1993).

Liew *et al.*, (1993) y Bayrak (2006) reportaron valores de R de 0.3 para partículas de sílice (provenientes de cascarilla de arroz y tratadas con H_2SO_4) con aceite de palma y de 0.403 para la montmorillonita de sílice con el ácido esteárico. Ambos valores son superiores a los encontrados en este trabajo, aclarando que las partículas usadas por Liew *et al.*, (1993) y Bayrak (2006) tienen características similares a las NSM usadas en este trabajo. Sin embargo, la composición de los adsorbatos que se usaron en los trabajos antes mencionados es diferente a la del AET y además en el caso particular de Liew *et al.*, (1993) se usó un tratamiento con ácido sulfúrico para incrementar la capacidad de adsorción de las partículas de sílice.

Finalmente se realizó un estudio de la liberación (en agua) del AET de las NSM, obteniendo los resultados que se muestran en la Figura 9.

En la gráfica se observa un comportamiento bifásico, ya que en las primeras 30 h la liberación fue muy rápida y disminuyó gradualmente alrededor de las 200 h.

La liberación bifásica sugiere que en la primera fase de liberación ocurre principalmente la difusión del AET que se encontraba en la superficie o cerca de la

superficie de las NSM. La segunda fase de liberación, que fue la más lenta, implica la difusión del AET atrapado dentro de los poros de las NSM.

Gaetano *et al.* (2005) y Chakraborty *et al.* (2012) reportaron para el mismo tipo de nanopartículas de sílice una cinética de liberación de tipo bifásica; el primer grupo realizó experimentos con ampicilina y el segundo con extractos de *Terminalia chebula* para los cuales reportaron un tiempo de liberación de hasta 160 h. La cinética de liberación del AET siguió el mismo comportamiento de los trabajos antes mencionados, sin embargo, el tiempo de liberación fue de hasta 360 h.

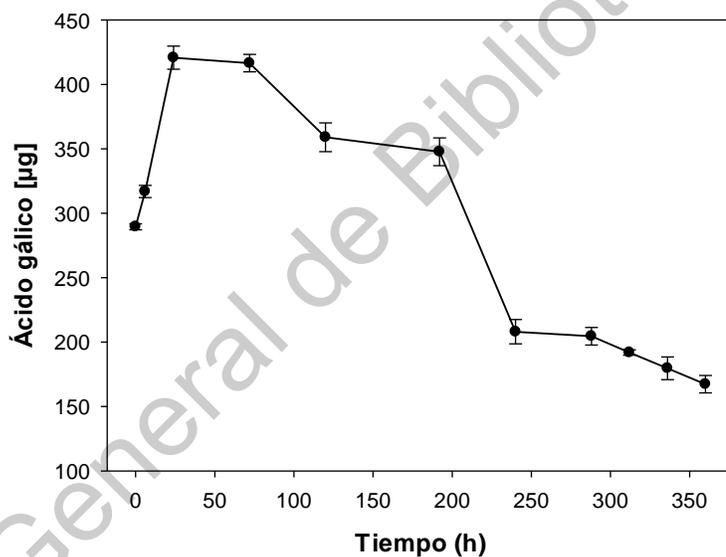


Figura 9. Liberación del AET en las NSM.

La interacción de los adsorbatos con las NSM es similar en todos los casos, ya que se formó una capa de adsorbato en la superficie que permitió una liberación rápida al inicio y después se hizo más lenta con el adsorbato atrapado dentro los poros de las NSM. En el caso del AET el tiempo de liberación observado fue mayor debido a la fuerte interacción que existe con las NSM, como se observó en la isoterma.

6.4 Actividad antimicrobiana del AET y las NSM-AET.

Cuadro 6. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) del AET y las NSM-AET

	<i>M. luteus</i>		<i>S. aureus</i>		<i>A. niger</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMF
AET (mg/mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	5	5
NSM-AET (mg/mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	7.5	7.5

Los resultados se reportan como la media \pm la desviación estándar (n=3).

Se evaluó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del AET y las NSM-AET, contra los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* y también la concentración mínima fungicida (CMF) para *Aspergillus niger*. Los resultados se muestran en el Cuadro 6.

El AET y las NSM-AET mostraron tener buena actividad antimicrobiana. El mayor efecto se observó contra *M. luteus*, ya que al usar 2.5 mg/mL del AET y las NSM-AET se inhibió a los 30 minutos, y con *S. aureus* el tiempo de inhibición fue de 2 h. El microorganismo estudiado con mayor resistencia fue *A. niger*, ya que para inhibir su crecimiento fue necesario incrementar la cantidad de AET y NSM-AET a 5 mg/mL y 7.5 mg/mL, respectivamente.

Csilla *et al.*, (2018) también usaron AET y reportaron una CMI de 1.6 mg/mL y CMB de 3.2 mg/mL para *S. aureus*, así como una CMF de 3.2 mg/mL para *A. niger*. Las CMI, CMB y CMF de este trabajo son mayores a las reportadas por Csilla *et al.* (2018), sin embargo, ambos aceites esenciales presentaron buena actividad antimicrobiana contra los mismos microorganismos de estudio.

La diferencia en la cantidad necesaria de los aceites esenciales para lograr actividad antimicrobiana puede deberse a los cambios en la composición, ya que esta se les atribuye a los compuestos aromáticos (fenólicos) presentes en los aceites, debido a que funcionan como permeabilizadores de membrana.

Los microorganismos Gram-positivos son generalmente más sensibles a los aceites esenciales que los Gram-negativos y los hongos (Varga *et al.*, 2015).

6.5 Preparación de la solución filmogénica (SF)

En pruebas preliminares se utilizaron diferentes porcentajes de sorbitol (40 y 50 %, en peso), respecto a la cantidad de proteína y se midieron las propiedades mecánicas para evaluar su efecto. Se observó que las películas con más sorbitol presentan menor fuerza de tensión y módulo de Young. Esto es debido a que cuando existe mayor proporción de plastificante, existe reducción en las interacciones proteína-proteína, por lo tanto la estructura es más débil (Porta *et al.*, 2011), por ello se decidió elaborar las películas con 40 % de sorbitol.

El pH para el recubrimiento se determinó en 8. A pesar de que la actividad antimicrobiana del AET es mayor a pH ácido, ya que no fue posible obtener películas con buenas propiedades mecánicas, resultaban quebradizas y frágiles, a pH < 7.

La cantidad de NSM necesaria para la elaboración de las SF se determinó usando diferentes porcentajes de NSM (3-12 % respecto a la proteína) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Potencial ζ , tamaño e índice de polidispersión de las SF a pH 8 con diferentes % de NSM.

%	Potencial ζ (mV)	Tamaño de partícula (nm)	Índice de polidispersión
3	-52 ± 0.95	330.07 ± 8.03	0.451
5	-43.83 ± 0.85	433.57 ± 12.25	0.458
7	-41.07 ± 1.10	565.23 ± 23.76	0.684
12	-14.97 ± 1.16	*DND	0.923

Los resultados se reportan como la media ± la desviación estándar (n=3).

Letras iguales indican que no existe diferencia significativa por la prueba Tukey ($\alpha < 0.05$).

*Datos no detectables

Los resultados obtenidos indican que los valores de potencial ζ para las SF tienden a acercarse más a cero al incrementar el porcentaje de NSM. También se

observó un ligero aumento en el tamaño promedio de partícula y el índice de polidispersión, esto puede explicarse debido a que al incrementar el % de NSM en las SF se favorece la agregación molecular.

Fernandez-Bats *et al.* (2018) reportaron para una SF a base de proteína de arveja amarga que la concentración de 3 % de NSM era la indicada para evitar la agregación molecular, y por lo tanto su desestabilización. Sin embargo, para este trabajo se eligió la SF con 7 % de NSM debido a que esta dentro del intervalo de estabilidad de potencial ζ ($> |30|$), y también cumple con la CMI de NSM necesaria para inhibir el crecimiento de los microorganismos estudiados.

6.5.1 Caracterización de la solución filmogénica (SF)

En el Cuadro 8 se listan las variables respuesta (potencial ζ , tamaño de partícula e índice de polidispersión) correspondientes a la caracterización de las SF.

Se realizó un análisis de varianza (Anexo 2), en el que se observó que las NSM y el AET tienen efecto significativo ($\alpha < 0.05$) en las variables, ya sea de forma individual o en interacción con otros factores.

En el Cuadro 8 todos los tratamientos se encuentran en un intervalo de potencial ζ de -17.8 a -28.5 mV. Sabbah *et al.*, (2016) reportaron que las suspensiones con potencial ζ en un rango de -16 a -30 mV, son de baja estabilidad. Esto puede deberse a que las nanopartículas en un porcentaje mayor al 3 % provocan un fenómeno de agregación molecular, por lo cual los valores de potencial ζ tienden a ser más cercanos a cero (Fernandez-Bats *et al.*, 2018). También podría deberse a que la proteína tiene carga positiva a pH 8 y tiende a crear repulsión con las NSM, lo que provoca que no exista una buena interacción, conduciendo a la agregación molecular.

Por otro lado, también se observó que en la mayoría de los tratamientos el AET y la TG ayudaron a incrementar el potencial ζ . Sin embargo, no fue un cambio significativo como el reportado por Porta *et al.*, (2016), quienes observaron un comportamiento similar en películas de *Vicia ervila* y pectina, ya que al agregar TG

a las soluciones filmogénicas el potencial incrementaba logrando mayor estabilidad para las SF.

El tamaño de partícula generalmente es reportado como el valor promedio del tamaño de todas las partículas presentes en una suspensión. Este valor es la representación hipotética del diámetro de una partícula que representa el número total de partículas de la muestra (Esposito *et al.*, 2016).

Se observó un aumento en el tamaño de partícula en las SF por la presencia de las NSM-AET y la TG, que puede deberse a que la TG forma redes poliméricas de mayor tamaño al entrecruzar los residuos de lisina y glutamina de la PP (Kowalczyk *et al.*, 2014).

Cuadro 8. Potencial ζ , tamaño e índice de polidispersión de los tratamientos.

Tratamiento	Potencial ζ (mV)	Tamaño de partícula (nm)	Índice de polidispersión
T1 (control)	-17.0 ± 0.56 ^a	500.7 ± 7.33 ^a	0.75 ± 0.03 ^a
T2	-28.5 ± 3.86 ^c	470.9 ± 6.56 ^b	0.64 ± 0.06 ^{ab}
T3	-21.1 ± 1.44 ^{ab}	575.6 ± 12.30 ^c	0.72 ± 0.03 ^{ab}
T4	-18.2 ± 0.56 ^a	466.6 ± 5.66 ^b	0.71 ± 0.01 ^{abc}
T5	-22.7 ± 4.67 ^{abc}	618.2 ± 18.28 ^b	0.72 ± 0.03 ^{bc}
T6	-28.2 ± 3.02 ^{bc}	472.2 ± 1.92 ^d	0.58 ± 0.01 ^{ab}
T7	-23.0 ± 1.10 ^{abc}	611.3 ± 6.96 ^d	0.67 ± 0.01 ^c
T8	-21.8 ± 0.97 ^{abc}	613.6 ± 11.72 ^d	0.64 ± 0.04 ^{bc}

*La descripción de los tratamientos se incluye en el Cuadro 2.

*Los resultados se reportan como la media ± la desviación estándar (n=3).

*Letras iguales indican que no existe diferencia significativa por la prueba Tukey ($\alpha < 0.05$).

Las SF evaluadas presentaron valores de IP en un intervalo de 0.58 a 0.75, lo que indica que todas las SF mostraron una distribución muy amplia en el tamaño de las

partículas de la suspensión. Esto puede deberse a que las SF están conformadas por una mezcla compleja de materiales (NSM, PP, AET, QT, TG), además de que el uso de la transglutaminasa crea una red polimérica que provoca el aumento en el tamaño de partícula.

Mediante el análisis estadístico, se observó (Anexo 2) que la interacción entre los tres factores fue significativa en cuanto a tamaño e índice de polidispersión, pero en el caso del potencial ζ solo las NSM-AET tuvieron efecto significativo (T4).

6.5.2 Determinación de las propiedades del recubrimiento

Se elaboraron películas con las SF caracterizadas para determinar sus propiedades mecánicas y grosor. Las películas obtenidas se muestran en la Figura 10.

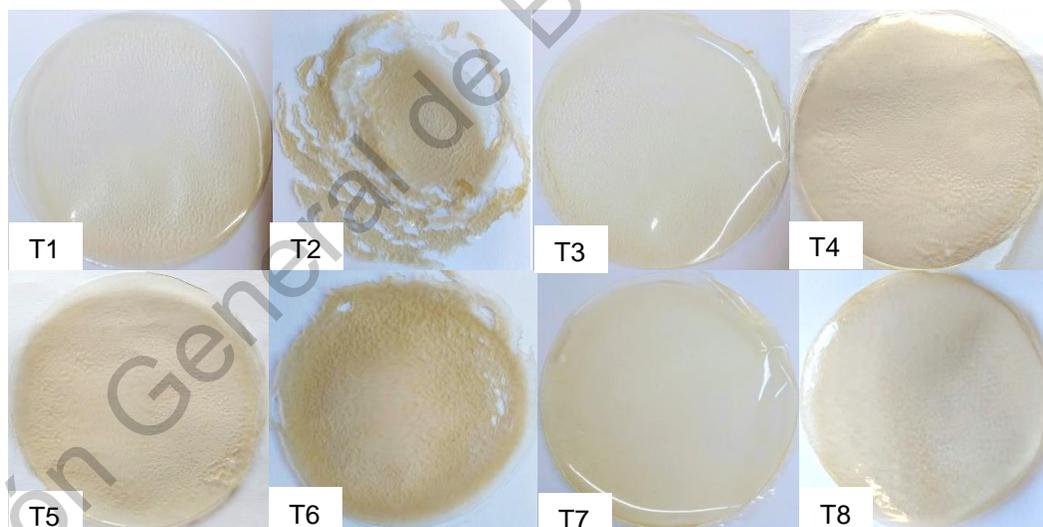


Figura 10. Películas obtenidas del diseño experimental para las SF, según el Cuadro 4.

No fue posible obtener películas completas y homogéneas en los tratamientos que contenían el AET libre (T2 y T6), por ello no fue posible evaluar sus propiedades mecánicas, ni su permeabilidad a gases.

En el Cuadro 9 se presentan las variables respuesta (resistencia a la tensión, % de elongación, módulo de Young y espesor) correspondientes a las propiedades mecánicas de las películas.

Se evaluó el espesor de las películas y se encontró que todas se encuentran en un rango de 97 a 128 μm . Kowalczyk *et al.* (2014) reportaron resultados similares para películas elaboradas con proteína de chícharo que se encontraban en un rango de 90 a 110 μm .

Sin embargo, se observó que la presencia de NSM y TG en conjunto, incrementaron el grosor de las películas, esto puede explicarse debido a que las NSM incrementan la cantidad de sólidos en la SF y a que la TG forma redes poliméricas de mayor tamaño al entrecruzar los residuos de lisina y glutamina de la proteína de chícharo, lo que hace una red más compacta y por lo tanto forman una película más gruesa (Kowalczyk *et al.*, 2014).

Cuadro 9. Resistencia a la tensión, % de elongación, módulo de Young y espesor de las películas.

Tratamiento	Espesor (μm)	Resistencia a la tensión (MPa)	Elongación (%)	Módulo de Young (MPa)
T1 (control)	99 \pm 0.02 ^a	3.51 \pm 0.73 ^a	24.97 \pm 1.51 ^a	94.81 \pm 0.44 ^a
T2	-	-	-	-
T3	97 \pm 0.00 ^a	3.36 \pm 0.94 ^a	28.4 \pm 1.56 ^a	89.60 \pm 9.31 ^a
T4	103 \pm 1.52 ^a	3.48 \pm 0.38 ^a	37.11 \pm 1.13 ^a	88.45 \pm 0.88 ^a
T5	128 \pm 0.01 ^b	5.93 \pm 0.41 ^b	4.33 \pm 1.49 ^b	124.71 \pm 3.00 ^b
T6	-	-	-	-
T7	117 \pm 1.04 ^b	5.96 \pm 0.93 ^b	5.81 \pm 1.32 ^b	114.67 \pm 2.01 ^b
T8	103 \pm 1.58 ^a	6.15 \pm 0.32 ^b	18.48 \pm 1.74 ^a	106.23 \pm 2.40 ^b

*Los resultados se reportan como la media \pm la desviación estándar (n=3).

*Letras iguales indican que no existe diferencia significativa por la prueba Tukey ($\alpha < 0.05$).

Los tratamientos con presencia de TG presentaron diferencias significativas ($\alpha > 0.05$) en cuanto a la fuerza de tensión (FT), el porcentaje de elongación (PE) y el módulo de Young (MY). Ya que se requirió mayor fuerza longitudinal para romper esas películas, disminuyó su capacidad de extenderse y eran significativamente más rígidas que las que no contenían TG.

Por lo tanto, estos resultados demuestran que la formación de reticulaciones de la proteína de chícharo catalizadas por la encima produjo un efecto de refuerzo en las películas, pero redujo su PE y las hizo más rígidas.

Lo anterior se explica debido a que la TG cataliza la formación de enlaces covalentes entre las proteínas por lo tanto, las películas son más resistentes y rígidas, por lo que se requiere aplicar más fuerza para romper esos enlaces (Di Pierro *et al.*, 2013).

Por su parte, las NSM ayudaron a incrementar el PE y disminuir el MY de las películas sin TG, aunque las NSM-AET mostraron mayor efecto en el PE, ya que lograron incrementarlo en un 13 % respecto al control (T1) y en al menos un 30 % respecto a las que contenían TG (T5, T7 y T8).

Este resultado puede explicarse teniendo en cuenta que las propiedades mecánicas de los biomateriales se asocian en gran medida con la distribución y la densidad de las interacciones intermoleculares e intramoleculares de los biopolímeros que determinan la red de las películas (Giosafatto *et al.*, 2019).

Fernandez-Bats *et al.* (2018) reportaron para películas a base de proteína de arveja amarga con NSM y TG, una FT de 0.63 ± 0.08 MPa, PE de 63.5 ± 7 y MY de 97 ± 5 MPa. Por su parte Giosafatto *et al.* (2019) reportaron para películas de pectina con NSM y TG, una FT de 33.4 ± 7.8 MPa, PE de 0.8 ± 0.2 y MY de 712.3 ± 52.3 MPa. Como se puede observar las propiedades mecánicas de un material se deben a las interacciones intra e inter moleculares de los biopolímeros, y estas dependen por completo de la naturaleza de los materiales. Ambos autores reportaron una mejora significativa en la FT y PE en los respectivos materiales al agregar las NSM,

y una disminución significativa del PE en presencia de TG; resultados similares a los obtenidos en esta investigación.

Además de poseer buenas propiedades mecánicas, los empaques de alimentos deben proveer una buena barrera contra los gases, sabores y aroma para mantener la calidad de los alimentos durante su vida anaquel. Aunque generalmente, existen algunas limitaciones en la aplicación de empaques a base de proteínas y polisacáridos, debido a su alta sensibilidad a la humedad (Giosafatto *et al.*, 2014).

En esta investigación se consideró evaluar el efecto de la TG, NSM y las NSM-AET en las propiedades de barrera de las películas de proteína de chícharo con quitosano. Los resultados se pueden observar en el Cuadro 10.

El tratamiento control (T1) mostró tener mayor permeabilidad al CO₂ que todos los demás tratamientos y al añadir TG (T5) se observó que su permeabilidad disminuyó, esto puede deberse a que a que la TG generalmente se asocia a una estructura más compacta debido al entrecruzamiento y por lo tanto la permeabilidad es menor.

Añadir la TG a las SF con NSM y NSM-AET no mostró tener un efecto significativo en la permeabilidad al CO₂, O₂ ni H₂O, por lo tanto, los enlaces creados por la TG en la proteína de chícharo resultaron ineficaces para mejorar las propiedades de barrera de las películas reforzadas con NSM (T7 y T8).

Las NSM tampoco mostraron mejorar las propiedades de barrera de las películas (T3 y T7), sin embargo, las películas con NSM-AET (T4 y T8) demostraron tener un efecto positivo en la permeabilidad a CO₂, O₂ y H₂O, lo anterior demuestra que las NSM-AET fueron las más eficientes para reforzar las películas y además disminuir su permeabilidad a gases, lo anterior puede deberse a que el AET presente en las películas crea un material de carácter hidrófobo que es menos sensible al vapor de agua y O₂.

Cuadro 10. Permeabilidad a CO₂, O₂ y H₂O de los tratamientos mostrados en el Cuadro 4.

Tratamiento	Permeabilidad (cm ³ mm m ⁻² d ⁻¹ kPa ⁻¹)		
	CO ₂	O ₂	H ₂ O
T1 (control)	2.024 ± 0.033 ^a	0.110 ± 0.017 ^a	0.429 ± 0.113 ^{abc}
T2	-	-	-
T3	1.751 ± 0.018 ^b	0.285 ± 0.026 ^{ab}	0.565 ± 0.109 ^a
T4	1.218 ± 0.027 ^c	0.139 ± 0.019 ^{de}	0.144 ± 0.022 ^{bc}
T5	1.831 ± 0.485 ^b	0.213 ± 0.021 ^{cd}	0.495 ± 0.064 ^{ab}
T6	-	-	-
T7	1.766 ± 0.097 ^b	0.332 ± 0.013 ^e	0.679 ± 0.145 ^a
T8	1.272 ± 0.062 ^c	0.211 ± 0.0002 ^{bc}	0.195 ± 0.018 ^c
Mater-BI ^{**}	22.69 ± 0.11	8.35 ± 0.23	15.68 ± 0.11
Polietileno de baja densidad ^{&}	7	1	0.2
Polietileno de alta densidad ^{&}	1	0.03	0.04

Los resultados se reportan como la media ± la desviación estándar (n=3).

Letras iguales indican que no existe diferencia significativa por la prueba Tukey($\alpha < 0.05$).

- Tratamientos en los que no fue posible medir la permeabilidad.

** Películas de almidón y poliésteres biodegradables. Comercializada por Novamont Spa. (Novara, Italia) (Di Pierro *et al.*, 2006).

& Polietileno de baja y alta densidad (Goodfellow, 2018).

Fernandez-Bats *et al.* (2018) reportaron el mismo comportamiento para la permeabilidad al O₂ y H₂O en películas elaboradas a base de proteína de arveja amarga con TG. También obtuvieron una reducción en la permeabilidad al O₂ y CO₂ al agregar NSM con APTES.

Es importante mencionar la baja permeabilidad al O₂ en las películas de PP:QT+NSM-AET (T4) (18 veces menor que Mater BI, película disponible comercialmente; 6 veces menor que el polietileno de baja densidad).

La permeabilidad al O₂, es de vital importancia, ya que su presencia en ciertos alimentos provoca desarrollo de microorganismos y reacciones de oxidación que afectan el sabor, calidad y aceptabilidad de los alimentos.

Al igual, la permeabilidad al vapor de H₂O es muy importante en los recubrimientos, ya que al ser aplicados sobre una matriz alimentaria pueden ayudar a disminuir la transferencia de agua entre el alimento y su ambiente, provocando menor deterioro de este y alargando su vida de almacenamiento.

6.5.3 Actividad antimicrobiana de las películas comestibles

Se determinó la actividad antimicrobiana de las películas que contenían AET y NSM-AET (Cuadro 11). Se eligió usar el tratamiento de NSM-AET, debido a sus excelentes propiedades mecánicas y de barrera, y se hizo una comparación con la película con TG+AET, debido a que es la única película con aceite esencial libre que fue posible obtenerse. Se probaron dos concentraciones diferentes del AET y NSM-AET partiendo de la CMI mencionada en el apartado (6.4).

Se observó que la concentración más alta ensayada mostró zonas de inhibición en todos los microorganismos, incluso en el más resistente (Figura 11), ya que presentó mayor difusión del aceite esencial de tomillo.

Cuadro 11. Diámetros de la zona de inhibición de las películas comestibles con AET y NSM-AET.

Microorganismo	Diámetro de la zona de inhibición (mm)			
	Película con TG+AET		Película con NSM-AET	
	7.5 mg/mL	10 mg/mL	7.5 mg/mL	10 mg/mL
<i>M. luteus</i>	6.25 ± 1.32 ^a	23.67 ± 1.21 ^a	4.33 ± 1.23 ^a	22.5 ± 0.50 ^a
<i>S. aureus</i>	0.17 ± 0.14 ^b	9.58 ± 0.84 ^b	1.50 ± 0.76 ^b	11.75 ± 0.87 ^b
<i>A. niger</i>	1.17 ± 0.52 ^b	7.08 ± 0.86 ^b	0.00 ^c	5.42 ± 0.76 ^c

Los resultados se reportan como la media ± la desviación estándar (n=3).

Letras iguales indican que no existe diferencia significativa por la prueba Tukey ($\alpha < 0.05$).



Figura 11. Actividad antimicrobiana de las películas con 10 mg/mL de AET y NSM-AET contra *A. niger*. 1) Película Control (sin AET), 2) Película con AET libre 3) Película con NSM-AET.

La razón de que se necesitara una concentración más alta para las películas que la CMI determinada para el AET y NSM-AET libres, es debido a que la actividad del agente antimicrobiano se ve reducida al incorporarse a un recubrimiento comestible, ya que la presencia de otros compuestos pueden disminuir la difusión del mismo (Arredondo-Ochoa *et al.*, 2017).

También se observó que no hubo diferencia significativa entre la actividad antimicrobiana de las películas con AET y NSM-AET, por lo que las NSM-AET dan ciertas ventajas al recubrimiento, porque permitieron obtener una película homogénea y con buenas propiedades mecánicas, de barrera y buena actividad antimicrobiana.

Se determinó que el microorganismo más sensible a la actividad antimicrobiana de las películas fue *M. luteus*, seguido de *S. aureus* y *A. niger*.

6.6 Aplicación del recubrimiento comestible en pan blanco

El pan es uno de los alimentos más importantes desde el punto de vista cultural, religioso y social. Es un producto que ha sido modificado de manera importante en la forma en que se produce, compra y consume (Pasqualone, 2019).

El pan fue hecho de forma tradicional en los hogares durante siglos, sin embargo, con la aparición de metodologías apropiadas la industrialización entró

profundamente en el sector de la panadería. Esto trajo consigo un problema muy importante durante el almacenamiento, ya que debido a la alta capacidad productiva y al aumento de sus ventas a lugares alejados de donde se fabrican, el producto debe cuidarse para evitar el crecimiento microbiano durante su vida de anaquel, ocasionado por la contaminación posterior al horneado (Balaguer *et al.*, 2013).

En este trabajo se realizó la evaluación del efecto antimicrobiano del recubrimiento con NSM-AET en pan blanco. Se eligió el recubrimiento con PP:QT con 10 mg/mL NSM-AET. Esta SF fue elegida debido a sus propiedades fisicoquímicas y antimicrobianas ya descritas. Los panes control y recubiertos fueron evaluados durante 16 días (Figura 12).

6.7pH

El pH de los panes control y recubiertos se muestra en la Figura 13. Aunque la figura muestra al pan control más afectado, no se detectó diferencia significativa ($\alpha > 0.05$) entre los panes control y los panes recubiertos (Anexo 3).



Figura 12. Evaluación de la aplicación del recubrimiento en pan blanco después de 16 días. A) Control, B) Recubierto.

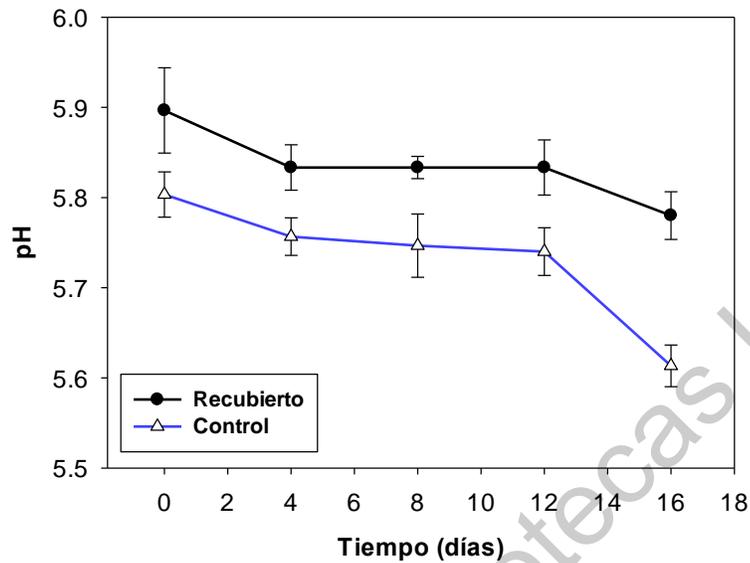


Figura 13. pH de los panes.

En general el pH de los panes se mantuvo a través de los días y comenzó a bajar a los 15 días de almacenamiento. Axel *et al.* (2017), reportaron para pan recubierto con una película de almidón y aceite esencial de mostaza a pH de 6, este valor sólo disminuyó una unidad después de 12 días de almacenamiento. Soukoulis *et al.* (2014), también reportaron para un pan recubierto con alginato y proteína de trigo que hubo una disminución de dos logaritmos en el pH después de 3 días de almacenamiento. Estos cambios en el pH pueden estar influenciados por el crecimiento de bacterias, ya que algunas tienen la capacidad de sobrevivir al horneado debido a que el centro de la miga no alcanza los 100 °C. Las bacterias pueden causar la disminución del pH debido a la degradación enzimática de la miga, además de provocar cambios de aroma y textura debido al fenómeno de hilado (Salgado & Jimenez, 2012).

Los resultados reportados por estos autores presentan semejanza con los obtenidos durante este trabajo, sin embargo, se observa que se usaron buenas prácticas de manufactura para la elaboración del pan, además de que el recubrimiento muestra que fue capaz de mantener la estabilidad del pH por más tiempo que el pan sin recubrimiento.

6.8 Actividad de agua (a_w) y % de humedad

Se determinó la actividad de agua y el porcentaje de humedad de los panes control y recubiertos, los resultados se muestran en las Figuras 14 y 15. Como puede observarse no existe diferencia significativa ($\alpha > 0.05$) entre los panes control y los panes recubiertos respecto a la actividad de agua (Anexo 4). Sin embargo, se observa que, sí existe diferencia en la a_w a través del tiempo de almacenamiento, ya que esta va incrementando.

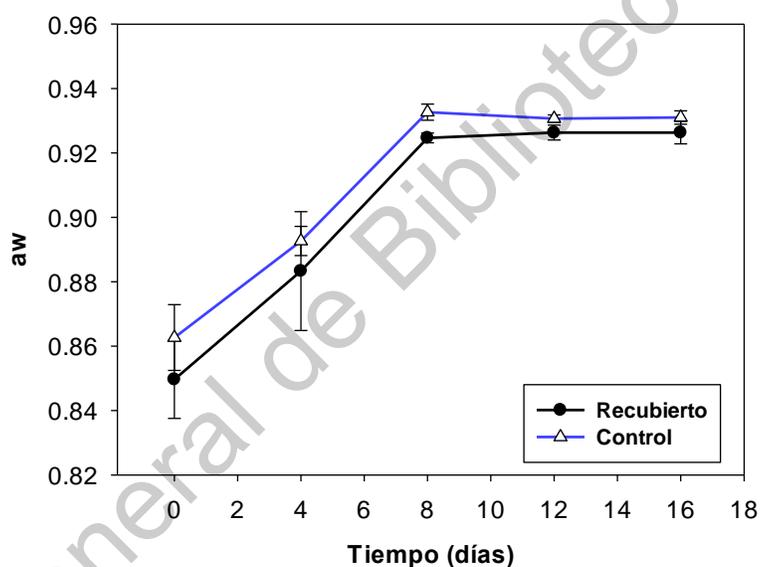


Figura 14. a_w de los panes control y recubiertos durante 16 días.

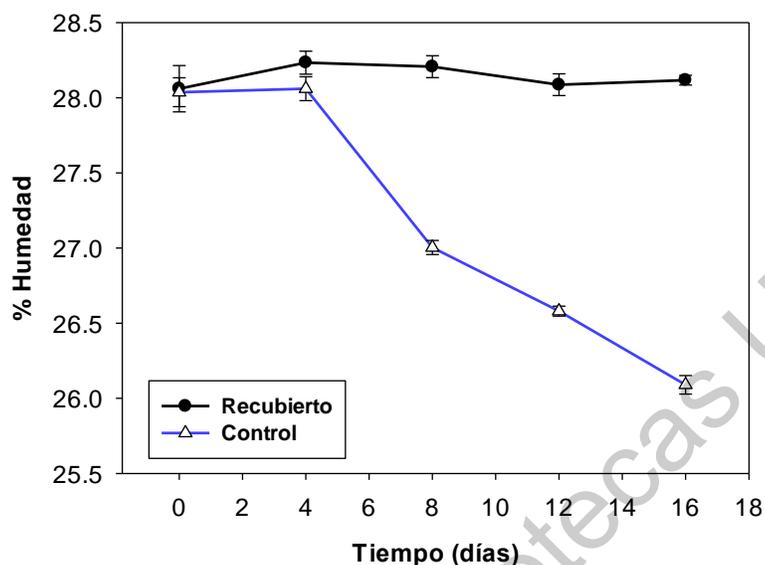


Figura 15. % de humedad de los panes control y recubiertos durante 16 días.

El porcentaje de humedad presentó diferencia significativa entre los tratamientos (Anexo 5), ya que los panes con recubrimiento mantienen el mismo contenido de humedad conforme pasa el tiempo, y los panes control comienzan a perder humedad después de 6 días de almacenamiento.

Los cambios en la a_w y el porcentaje de humedad son esperados, ya que la transferencia de masa del vapor de agua entre la corteza y la interface de la miga es la fuerza impulsora de la distribución de humedad desde el interior hacia el exterior en las hogazas de pan (Gray & Bemiller, 2003). Las migraciones de agua que ocurren en el pan dan lugar a cambios en sus características. Se ha confirmado que existe una relación inversa entre el contenido de humedad y el envejecimiento del pan (Luna & Barcenás, 2011).

Soukoulis *et al.* (2014), reportaron para un pan recubierto con alginato y proteína de trigo que la humedad y actividad de agua de sus muestras variaron de forma significativa respecto al tiempo, ya que la a_w aumentó de 0.85 a 0.95 durante 7 días de almacenamiento; comportamiento muy similar al que se observó con los panes de esta investigación, en los cuales se observó un incremento de a_w de 0.84 a 0.94.

Leuschner *et al.* (1999), reportaron para panes recubiertos con alginato y probióticos un contenido de humedad de 28 % que disminuyó a 20 % después de 7 días de almacenamiento a 25 °C. Estos resultados son similares a los que se encontraron en este trabajo, ya que al inicio ambos panes (control y recubiertos) presentaron un porcentaje de humedad del 28 % el día cero, valor que permaneció constante durante los 16 días de almacenamiento para los panes recubiertos, sin embargo, los panes control mostraron mayor pérdida de humedad, disminuyendo hasta 26 %, valor mayor al reportado anteriormente, que puede deberse a que para el empacado de los panes de este trabajo se usó polietileno de alta densidad.

Las diferencias que se observan entre el pan recubierto y el control sugieren que el recubrimiento ayuda a mantener la humedad del pan a través del tiempo, característica deseable ya que así puede retrasarse el proceso de envejecimiento.

6.9 Análisis microbiológicos

El uso de aceites esenciales en recubrimientos comestibles se ha convertido en una de las prácticas más importantes para la conservación de los alimentos. Se han realizado numerosas investigaciones en las que se ha probado el efecto antimicrobiano de estos recubrimientos adicionados de aceites esenciales y se ha confirmado su eficacia en diferentes matrices alimentarias (Sánchez-González *et al.*, 2011; Jin *et al.*, 2019).

En esta investigación se utilizó AET debido a que ya se ha reportado que tiene un excelente efecto contra una gran variedad de microorganismos deterioradores en los alimentos (Burt, 2004; Pesavento *et al.*, 2015; Csilla Gömöría *et al.*, 2018).

Se llevó a cabo un ensayo de cuenta estándar y de hongos y levaduras a lo largo de 16 días de almacenamiento (Cuadro 12). Se observa de forma general que tanto los mesófilos aerobios y las levaduras incrementaron (UFC/mL) a lo largo del tiempo. Esto puede relacionarse con la disminución de pH.

Se observa que al inicio del experimento (día 0) el recuento de bacterias mesófilas, hongos y levaduras fue menor al límite de detección estipulado en la norma (25 UFC/g) a partir del día 4 se observa un incremento en la población de mesófilos aerobios, sin embargo, hay menor crecimiento en los panes con recubrimiento.

Cuadro 12. Actividad antimicrobiana del recubrimiento en pan blanco (control y recubierto).

Días	Tratamiento	Mesófilos aerobios	Levaduras	Hongos
		log UFC/g		
0	Control	<1 ^a	<1 ^{abc}	<1 ^{abc}
	Recubierto	<1 ^a	<1 ^{abc}	<1 ^{abc}
4	Control	2.22 ± 0.07 ^d	1.36 ± 0.16 ^{ab}	1.30 ± 0.06 ^{abc*}
	Recubierto	2.12 ± 0.071 ^f	<1 ^{abc}	<1 ^{abc}
8	Control	2.79 ± 0.05 ^c	2.93 ± 0.40 ^c	1.77 ± 0.01 ^d
	Recubierto	2.44 ± 0.18 ^d	1.12 ± 0.26 ^{ab}	1.12 ± 0.15 ^{bc*}
12	Control	3.10 ± 0.06 ^b	4.33 ± 0.49 ^d	3.02 ± 0.17 ^{ab}
	Recubierto	2.79 ± 0.14 ^c	1.42 ± 0.36 ^{ab}	1.42 ± 0.06 ^a
16	Control	7.41 ± 0.49 ^h	6.54 ± 0.72 ^e	6.39 ± 0.39 ^d
	Recubierto	6.85 ± 0.61 ^h	4.04 ± 0.22 ^d	3.80 ± 0.18 ^{ab}

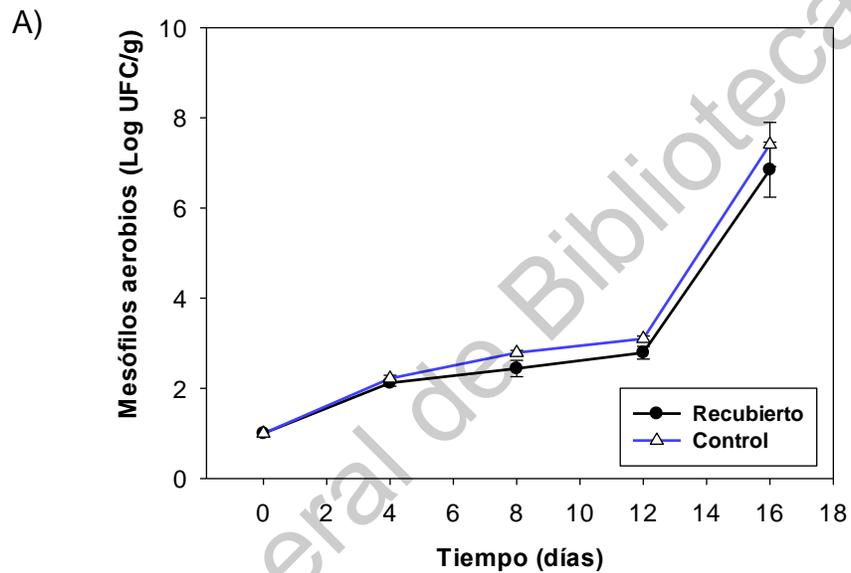
Los resultados se reportan como la media (n=3) ± la desviación estándar.

Letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre tratamientos por la prueba t de student ($\alpha < 0.05$).

Valor estimado en referencia a la NOM-092-SSA1-1994 y la NOM-111-SSA1-1994

En cuanto a los hongos y levaduras también existe un incremento en su población al pasó de 4 días, no obstante, el desarrollo de levaduras fue mayor que el de los hongos. También se puede observar que los panes control presentan mayor crecimiento de ambos microorganismos que los panes recubiertos (Figura 16).

Es notable que el recubrimiento tuvo mayor efecto antimicrobiano contra los hongos y levaduras, ya que después de 16 días de almacenamiento existió diferencia significativa entre las UFC/g de los panes control y los recubiertos, presentando los recubiertos una reducción de hasta el 50 % en la concentración del control. En el recuento de mesófilos aerobios no existió diferencia significativa entre el control y el recubierto a lo largo del tiempo.



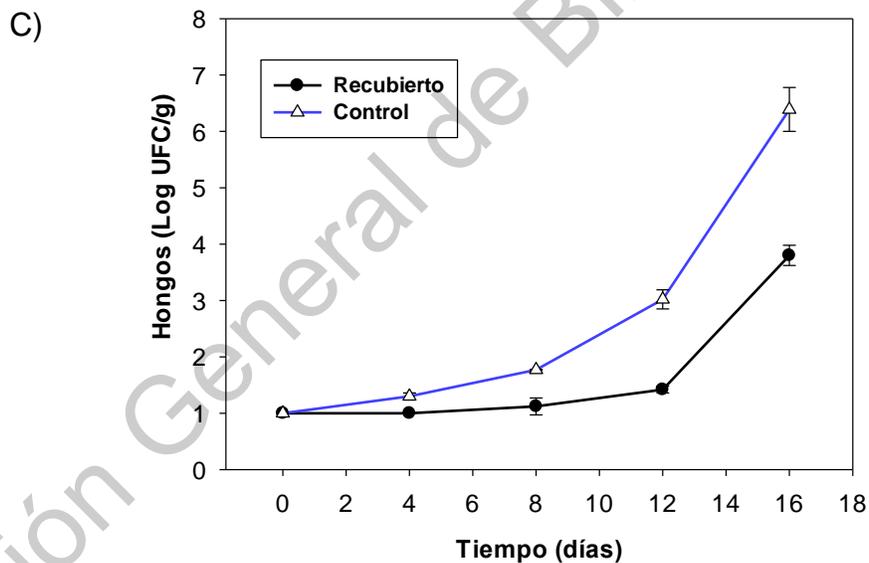
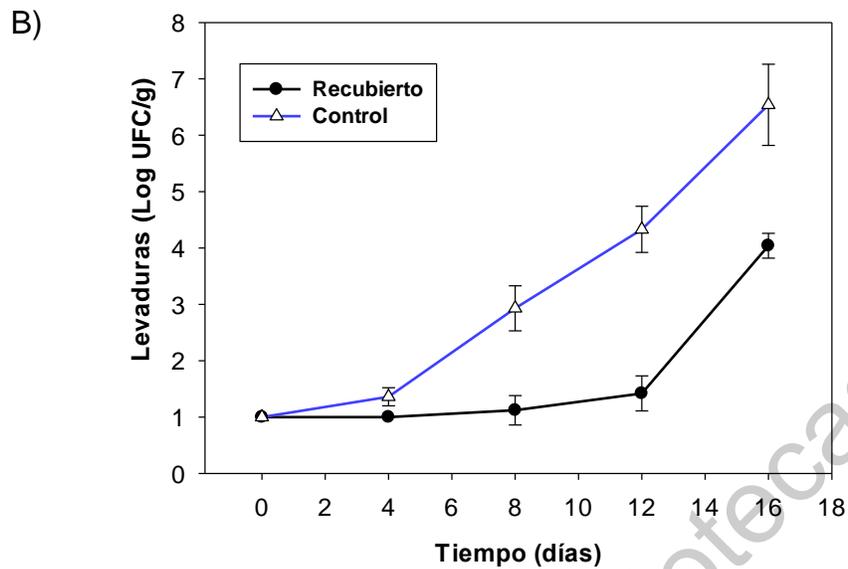


Figura 16. Cuenta total de A) mesófilos aerobios, B) levadura y C) hongos.

Esto puede explicarse ya que el recubrimiento se encuentra sólo en la superficie del pan y para disminuir el desarrollo de mesófilos aerobios, es necesario agregar el recubrimiento en otras áreas, ya que estas bacterias se desarrollan en el interior del pan y no sólo en la superficie. Un ejemplo de esto es lo reportado por (Pasqualone, 2019), que usó películas antimicrobianas de nitrocelulosa con 5 % de

aceite esencial de canela, colocó rebanadas de pan y las intercaló con una película al empacarse, este procedimiento protegió eficazmente el pan contra mesófilos aerobios, levaduras y hongos después de 7 días de almacenamiento.

6.10 Análisis del perfil de textura (APT)

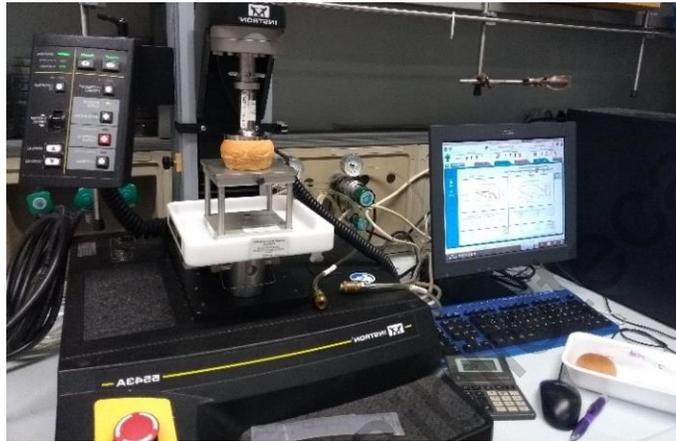
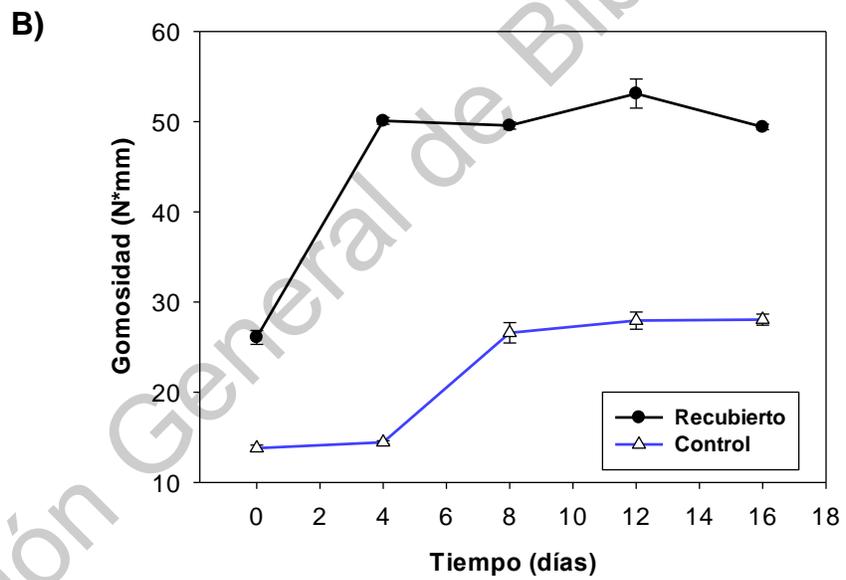
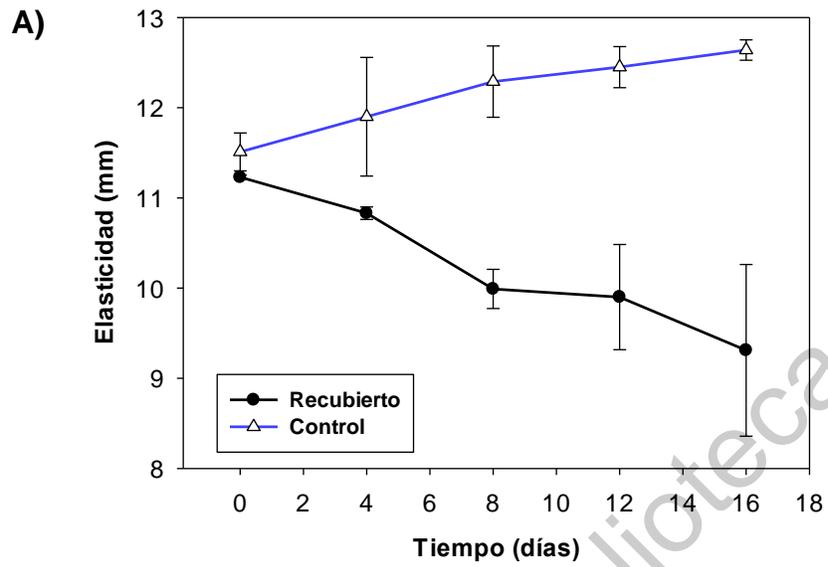


Figura 17. Análisis de perfil de textura del pan con el Instron universal.

Los parámetros de textura son una característica importante para la aceptación del pan ya que son fuertemente correlacionados con la decisión de compra del consumidor.

Para verificar si el recubrimiento pudiese influir en la calidad del pan, se realizó un análisis de textura (APT). Se evaluaron la elasticidad del pan (recuperación después de aplicar fuerza), la masticabilidad y la gomosidad, los resultados se observan a continuación (Figura 18).



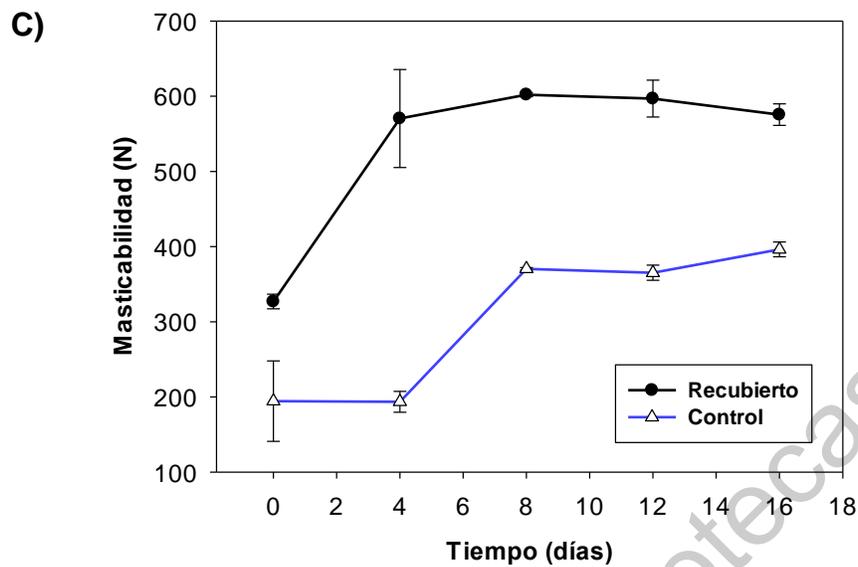


Figura 18. Análisis de perfil de textura A) elasticidad, B) gomosidad y C) masticabilidad.

Por medio de un ANOVA (Anexo 6) se determinó que la elasticidad de la corteza de los panes recubiertos y control tienen diferencia significativa, al igual que en la masticabilidad y gomosidad (Anexos 7 y 8), siendo mayor la elasticidad en el pan control y menor la gomosidad y masticabilidad.

Altamirano-Fortoul *et al.* (2012) reportaron para un pan con recubrimiento de almidón y probióticos (*Lactobacillus acidophilus*) que la elasticidad de la corteza de los panes recubiertos disminuyó de forma significativa con respecto al control, al igual que la gomosidad y la masticabilidad. Esto debido a que la presencia del recubrimiento en el pan que ayudó a disminuir su permeabilidad al agua y por lo tanto mantuvo por más tiempo el pan suave.

En este trabajo se encontraron resultados similares en cuanto a la disminución de la elasticidad, lo que puede estar asociado a que los panes con recubrimiento poseen una corteza más gruesa y por lo tanto más rígida, lo que se esperaría después de agregar una cubierta a la superficie de los panes (Altamirano-Fortoul & Rosell, 2011).

Sin embargo, la gomosidad y masticabilidad difieren en los resultados reportados de Altamirano-Fortoul *et al.* (2012); estas diferencias pueden deberse a que el pan recubierto usado en esta investigación creó una capa más rígida en la superficie, que la del recubrimiento reportado por ellos, esto puede estar asociado al grosor, ya que la gomosidad y masticabilidad del pan están asociadas con la energía requerida para desintegrar el pan antes de ser deglutido (Hernández & Franco, 2016).

La aplicación del recubrimiento en este trabajo se llevó a cabo post horneado, por la presencia de las NSM-AET, y por el método de aspersión, añadiendo dos capas, lo que pudo generar que se creara una capa gruesa de recubrimiento que pudo afectar de forma directa las propiedades de textura en el pan.

7 CONCLUSIONES

Las NSM mostraron buen potencial para encapsular y liberar el AET, evitando la evaporación de sus compuestos activos y ayudando a mantener su actividad antimicrobiana.

El uso de las NSM representa una buena estrategia para la incorporación de AET en la solución formadora de película, ya que se obtuvieron películas más homogéneas, con mayor resistencia a la tensión y porcentaje de elongación.

Las películas con NSM-AET presentaron valores bajos de permeabilidad al H₂O y O₂, en comparación con otros recubrimientos comerciales y polímeros, lo que las convierte en una buena alternativa para su uso como recubrimiento en productos de panificación.

El uso de la transglutaminasa para los recubrimientos con NSM y NSM-AET disminuyó su resistencia a la tensión y porcentaje de elongación, además de que no hubo diferencia significativa en la permeabilidad a gases, por ello el uso de transglutaminasa no fue benéfico para este recubrimiento.

Las películas con 10 mg/mL de AET y NSM-AET presentaron una buena actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos, mostrando incluso efecto para inhibir el crecimiento de 5 log de *A. niger* durante 5 días de cultivo en placa.

El recubrimiento aplicado en pan blanco fue capaz de disminuir la pérdida de humedad y retrasó el crecimiento de levaduras y hongos. Sin embargo, el análisis de textura mostró que al agregar el recubrimiento en los panes se afecta de forma negativa su textura, ya que incrementa su gomosidad y masticabilidad. Las APT son muy importantes para ofrecer un producto al consumidor, por ello es importante realizar en un futuro un análisis sensorial para saber si los consumidores detectan diferencia en la textura de los panes, ya que su evaluación fue solo instrumental.

Por lo tanto, el recubrimiento a base de proteína de chícharo con quitosano y nanopartículas de sílice con aceite esencial de tomillo tiene gran potencial para mantener la calidad del pan durante su almacenamiento.

8 REFERENCIAS

- Al-Asmar, A., Giosafatto, C., Panzella, L., & Mariniello, L. (2019). The Effect of Transglutaminase to Improve the Quality of Either Traditional or Pectin-Coated Falafel (Fried Middle Eastern Food). *Coatings*, 9(5), 331. <https://doi.org/10.3390/coatings9050331>
- Altamirano-Fortoul, R., & Rosell, C. M. (2011). Physico-chemical changes in breads from bake off technologies during storage. *LWT. Food Science and Technology*, 44(3), 631-636. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.04.018>
- Altamirano-Fortoul, R., Moreno-Terrazas, R., Quezada-Gallo, A., & Rosell, C. M. (2012). Viability of some probiotic coatings in bread and its effect on the crust mechanical properties. *Food Hydrocolloids*, 29(1), 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.02.015>
- Arredondo-Ochoa, T., García-Almendárez, B. E., Reyes, A. A., Pastrana, D. M. R., López, G. F. G., Belloso, O. M., & González, C. R. (2017). Design and characterization of corn starch edible films including beeswax and natural antimicrobials. *Food and Bioprocess Technology*, 10(1), 103–114. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1800-4>
- Ash, M., & Ash, I. (2010). Handbook of preservatives. In Endicott (Ed.), Handbook of preservatives (segunda, pp. 520–521). Nueva York: *Synapse Information Resources Incorporated*. Recuperado en septiembre 23, 2019 de https://books.google.com.mx/books?id=XZ2QB7bu5LwC&pg=PR4&lpg=PR4&dq=isbn+1-890595-66-7&source=bl&ots=6O7_ryCRn7&sig=ACfU3U36odqBAXDpQINly_RMHgH5-J1EVg&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjaqta81JfkAhUnjK0KHUPtBI0Q6AEwAnoECAkQAQ#v=onepage&q=isbn+1-890595-66-7&f=false
- ASTM D3985-81. (1981). Anual Book of ASTM standards. *In American Society for Testing and Materials* (p. 534). Philadelphia, PA.
- ASTM D882-97. (1997). Anual Book of ASTM Standards. In American Society for

Testing and Materials (p. 159). Philadelphia, PA.

- Auffaan, M., Rose, J., Bottero J. Y., Lowry, G. V., Jolivet, J. P., & Wiesner, M. R. (2009). Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature Nanotechnology*, 4(10), 634-641. <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.242>
- Axel, C., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2017). Mold spoilage of bread and its biopreservation: A review of current strategies for bread shelf life extension. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(16), 3528–3542. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1147417>
- Balaguer, M. P., Lopez-Carballo, G., Catala, R., Gavara, R., & Hernandez-Munoz, P. (2013). Antifungal properties of gliadin films incorporating cinnamaldehyde and application in active food packaging of bread and cheese spread foodstuffs. *International Journal of Food Microbiology*, 166(3), 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.012>
- Barbarisi, C., De Vito, V., Pellicano, M. P., Boscaino, F., Balsamo, S., Laurino, C., Volpe, M. G. (2019). Bread chemical and nutritional characteristics as influenced by food grade sea water. *International Journal of Food Properties*, 22(1), 280–289. <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1579837>
- Bayrak, Y. (2006). Application of Langmuir isotherm to saturated fatty acid adsorption. *Microporous and Mesoporous Materials*, 87(3), 203–206. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2005.08.009>
- Bourne, M.C. (2002). Texture profile analysis. *Food Technol.* 1978, 32, 62–66.
- Bourtoom, T. (2009). Edible protein films: Properties enhancement. *International Food Research Journal*, 16(1), 1–9.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253.
- Campos, C. A., Gerschenson, L. N., & Flores, S. K. (2011). Development of edible

- films and coatings with antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 849–875. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0434-1>
- Cé, N., Noreña, C. P. Z., & Brandelli, A. (2012). Antimicrobial activity of chitosan films containing nisin, peptide P34, and natamycin. *CYTA - Journal of Food*, 10(1), 21–26. <https://doi.org/10.1080/19476337.2010.537371>
- Chakraborty, S., Mitra, M. K., Chaudhuri, M. G., Sa, B., Das, S., & Dey, R. (2012). Study of the release mechanism of terminalia chebula extract from nanoporous silica gel. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168(7), 2043–2056. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9916-0>
- Chang, Y., McLandsborough, L., & McClements, D. J. (2015). Fabrication, stability and efficacy of dual-component antimicrobial nanoemulsions: Essential oil (thyme oil) and cationic surfactant (lauric arginate). *Food Chemistry*, 172, 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.081>
- Chung, Y., Su, Y., Chen, C., Jia, G., Wang, H., Wu, J. C. G., & Lin, J. (2004). Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25(7), 932–936.
- Croissant, J. G., Fatieiev, Y., Almalik, A., & Khashab, N. M. (2018). Mesoporous silica and organosilica nanoparticles: *Physical Chemistry, Biosafety, Delivery Strategies, and Biomedical Applications*, 1700831, 1–75. <https://doi.org/10.1002/adhm.201700831>
- Csilla Gömör, Anita Vidács, Erika Beáta Kerekes, Elvira Nacsá-Farkas, A. B., & Krisch, C. V. and J. (2018). Altered antimicrobial and anti-biofilm forming effect of thyme essential oil due to changes in composition. *Natural Products Communications*, 13(4), 483–487. <https://doi.org/10.1177/1934578X1801300426>
- Di Pierro, P., Chico, B., Villalonga, R., Mariniello, L., Damiao, A. E., Masi, P., Gussone, P. (2006). Chitosan - whey protein edible films produced in the absence or presence of transglutaminase: analysis of their mechanical and

barrier properties. *Biomacromolecules*, 7(00), 744–749.

- Di Pierro, P., Marquez, G. R., Mariniello, L., Sorrentino, A., & Villalonga, R. (2013). Effect of transglutaminase on the mechanical and barrier properties of whey protein/pectin films prepared at complexation pH. *J. Agric. Food Chem.* 61(19), 4593-4598. <https://doi.org/10.1021/jf400119q>
- Esposito, M., Di Pierro, P., Regalado-Gonzales, C., Mariniello, L., Giosafatto, C. V. L., & Porta, R. (2016). Polyamines as new cationic plasticizers for pectin-based edible films. *Carbohydrate Polymers*, 153, 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.087>
- Estrada-López, H. H., Restrepo-Flórez, C. E., & Iglesias-Navas, M. A. (2018). Aceptabilidad sensorial de productos de panadería y repostería con incorporación de frutas y hortalizas deshidratadas como ingredientes funcionales. *Información Tecnológica*, 29(4), 13–20. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642018000400013>
- Fernandez-Bats, I., Di Pierro, P., Villalonga-Santana, R., García-Almendarez, B., & Porta, R. (2018). Bioactive mesoporous silica nanocomposite films obtained from native and transglutaminase-crosslinked bitter vetch proteins. *Food Hydrocolloids*, 82, 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.041>
- Figuroa-López, K. J., Andrade-Mahecha, M. M., & Torres-Vargas, O. L. (2018). Development of antimicrobial biocomposite films to preserve the quality of bread. *Molecules*, 23(1), 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules23010212>
- Gaetano, F. D. E., Ambrosio, L., Raucci, M. G., Marotta, A., & Catauro, M. (2005). Sol-gel processing of drug delivery materials. *Biomedical Materials*, 6, 261–265.
- Giosafatto, C., Sabbah, M., Al-Asmar, A., Esposito, M., Sanchez, A., Villalonga Santana, R., Porta, R. (2019). Effect of mesoporous silica nanoparticles on glycerol-plasticized anionic and cationic polysaccharide edible films. *Coatings*, 9(3), 172. <https://doi.org/10.3390/coatings9030172>
- Giosafatto, C. V. L., Di Pierro, P., Gunning, P., Mackie, A., Porta, R., & Mariniello, L.

- (2014). Characterization of citrus pectin edible films containing transglutaminase-modified phaseolin. *Carbohydrate Polymers*, 106(1), 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.015>
- Gedikoğlu, A., Sökmen, M., & Çivit, A. (2019). Evaluation of *Thymus vulgaris* and *Thymbra spicata* essential oils and plant extracts for chemical composition, antioxidant, and antimicrobial properties. *Food Science and Nutrition*, 7(5), 1704–1714. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1007>
- Gonçalves, N. D., Pena, F. D. L., Sartoratto, A., Derlamelina, C., Duarte, M. C. T., Antunes, A. E. C., & Prata, A. S. (2017). Encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil used as a natural preservative in bakery product. *Food Research International*, 96, 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.006>
- Gray, J. A., & Bemiller, J. N. (2003). Bread staling: Molecular basis and control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1), 1–21. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00011.x>
- Heras-Mozos, R., Muriel-Galet, V., López-Carballo, G., Catalá, R., Hernández-Muñoz, P., & Gavara, R. (2019). Development and optimization of antifungal packaging for sliced pan loaf based on garlic as active agent and bread aroma as aroma corrector. *International Journal of Food Microbiology*, 290(March 2018), 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.024>
- Hernández-hernández, E., Regalado-gonzález, C., Vázquez-landaverde, P., Guerrero-legarreta, I., & García-almendárez, B. E. (2014). Antimicrobial activity of mexican (*Lippia graveolens*) and european (*Origanum vulgare* L) oregano essential oils. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2014/641814>
- Hernández, O., & Franco, I. (2016). Effect of transglutaminase on the reological and bakery properties of cassava (*Manihot esculenta*) dough. *Tecnología de la panificación*. Recuperado en octubre 7, 2019 de <http://revistas.utp.ac.pa/index.php/id-tecnologico/article/view/1236>

- Hoffmann, F., Cornelius, M., Morell, J., & Fröba, M. (2006). Silica-Based mesoporous organic – inorganic. *Hybrid Materials Angewandte*, 3216–3251. <https://doi.org/10.1002/anie.200503075>
- Hoffmann, F., Cornelius, M., Morell, J., Fröba, M., Tae, H., Park, Y., Porta, R. (2019). Bioactive mesoporous silica nanocomposite films obtained from native and transglutaminase-crosslinked bitter vetch proteins. *Food Hydrocolloids*, 82(2), 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.041>
- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3(JAN), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>
- Jang, S. H., Jang, S. R., Lee, G. M., Ryu, J. H., Park, S. II, & Park, N. H. (2017). Halloysite nanocapsules containing thyme essential oil: preparation, characterization, and application in packaging materials. *Journal of Food Science*, 82(9), 2113–2120. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13835>
- Janjarasskul, T., & Krochta, J. M. (2010). Edible packaging materials. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1(1), 415–448. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100836>
- Jemaa, M. Ben, Falleh, H., Serairi, R., Neves, M. A., Snoussi, M., Isoda, H., Ksouri, R. (2018). Nanoencapsulated *Thymus capitatus* essential oil as natural preservative. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 45, 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.08.017>
- Jiang, S. Juan, Zhang, X., Ma, Y., Tuo, Y., Qian, F., Fu, W., & Mu, G. (2016). Characterization of whey protein-carboxymethylated chitosan composite films with and without transglutaminase treatment. *Carbohydrate Polymers*, 153, 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.094>
- Jideani, V. A., & Vogt, K. (2016). Antimicrobial packaging for extending the shelf life of bread—A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(8),

1313–1324. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.768198>

- Jin, L., Teng, J., Hu, L., Lan, X., Xu, Y., Sheng, J., Wang, M. (2019). Pepper fragrant essential oil (PFEO) and functionalized MCM-41 nanoparticles: formation, characterization, and bactericidal activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (April). <https://doi.org/10.1002/jsfa.9776>
- Jouki, M., Mortazavi, S. A., Yazdi, F. T., & Koocheki, A. (2014). Characterization of antioxidant-antibacterial quince seed mucilage films containing thyme essential oil. *Carbohydrate Polymers*, 99, 537–546. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.077>
- Kalembe, D., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 813–829. <https://doi.org/10.2174/0929867033457719>
- Khalili, S. T., Mohsenifar, A., Beyki, M., Zhavah, S., Rahmani-Cherati, T., Abdollahi, A., Tabatabaei, M. (2015). Encapsulation of Thyme essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 502–508. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.054>
- Kieliszek, M., & Misiewicz, A. (2014). Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. *Folia Microbiologica*, 59(3), 241–250. <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0287-x>
- Kowalczyk, D., Gustaw, W., Świeca, M., & Baraniak, B. (2014). A study on the mechanical properties of pea protein isolate films. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(4), 1726–1736. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12135>
- Kreuter, J. (2007). Nanoparticles a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics*, 331(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.10.021>
- Lagarón, J. M., López-Rubio, A., & José Fabra, M. (2016). Bio-based packaging. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(2). <https://doi.org/10.1002/app.42971>

- Leuschner, R. G. K., O'Callaghan, M. J. A., & Arendt, E. K. (1999). Moisture distribution and microbial quality of part baked breads as related to storage and rebaking conditions. *Journal of Food Science*, 64(3), 543–546. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1999.tb15081.x>
- Liang, C. L., Xiang, Q., Cui, W. M., Fang, J., Sun, N. N., Zhan, X. P., Jia, X. D. (2018). Subchronic oral toxicity of silica nanoparticles and silica microparticles in rats. *Biomedical and Environmental Sciences*, 31(3), 197–207. <https://doi.org/10.3967/bes2018.025>
- Liew, K. Y., Yee, A. H., & Nordin, M. R. (1993). Adsorption of carotene from palm oil by acid-treated rice hull ash. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70(5), 539–541. <https://doi.org/10.1007/BF02542590>
- Luna, M., & Barcenas, M. (2011). Envejecimiento de panes: causas y soluciones. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 5(2), 40-53.
- Malhotra, B., Keshwani, A., & Kharkwal, H. (2015). Antimicrobial food packaging: Potential and pitfalls. *Frontiers in Microbiology*, 6(JUN), 234-237 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00611>
- Martinez-Tenorio, Y., & López-Malo-Vigil, A. (2011). Envases activos con agentes antimicrobianos y su aplicación en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. Recuperado en septiembre 21, 2019 de [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No5-Vol-2/TSIA-5\(2\)-Martinez-Tenorio-et-al-2011.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No5-Vol-2/TSIA-5(2)-Martinez-Tenorio-et-al-2011.pdf)
- Miles, A. A., & Misra, S. S. (1931). The Estimation of the bactericidal power of the blood. *The Journal of Hygiene*, 38(6), 732–749. <https://doi.org/10.1017/S002217240001158X>
- NMX-F-159. (1983). "Alimentos. Pan Blanco De Caja." Dirección General De Normas Mexicanas. Recuperado en septiembre 12, 2019 de <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-FF-038-2002.PDF>
- NOM-092-SSA1 (1994), "Procedimiento para la toma, manejo y transporte de

muestras de alimentos para su análisis microbiológico" *Dirección General De Normas Mexicanas*. Recuperado en Septiembre 13, 2019 de <http://www.salud.gob.mx › unidades › cdi › nom › 092ssa14>

NOM-111-SSA1 (1994). "Método para cuenta de mohos y levaduras en alimentos". *Dirección General De Normas Mexicanas*. Recuperado en Septiembre 8, 2019 de <http://www.salud.gob.mx › unidades › cdi › nom › 111ssa14>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, & Organización Mundial de la Salud. (2018). Norma general para los aditivos alimentarios. *Codex Alimentarius*, 507.

Osés, J., Fernández-Pan, I., Mendoza, M., & Maté, J. I. (2009). Stability of the mechanical properties of edible films based on whey protein isolate during storage at different relative humidity. *Food Hydrocolloids*, 23(1), 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.12.003>

Otoni, C. G., Avena-Bustillos, R. J., Azeredo, H. M. C., Lorevice, M. V., Moura, M. R., Mattoso, L. H. C., & McHugh, T. H. (2017). Recent advances on edible films based on fruits and vegetables—A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 1151–1169. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12281>

Parida, S. K., Dash, S., Patel, S., & Mishra, B. K. (2006). Adsorption of organic molecules on silica surface. *Advances in Colloid and Interface Science*, 121(1–3), 77–110. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2006.05.028>

Pasqualone, A. (2019). Bread packaging: features and functions. *Flour and Breads and Their Fortification in Health and Disease Prevention*, 211–222. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814639-2.00017-4>

Peltzer, M., Salvay, A., Delgado, J. F., & Wagner, J. R. (2017). Use of edible films and coatings for functional foods developments: A review. *Functional Foods: Sources, Health Effects and Future Perspectives*, (December), 316. Recuperado en septiembre 17, 2019 de

https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=60272

- Pérez-Esteve, É., Ruiz-Rico, M., Martínez-Máñez, R., & Barat, J. M. (2015). Mesoporous silica-based supports for the controlled and targeted release of bioactive molecules in the gastrointestinal tract. *Journal of Food Science*, 80(11), E2504–E2516. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13095>
- Pesavento, G., Calonico, C., Bilia, A. R., Barnabei, M., Calesini, F., Addona, R., Lo Nostro, A. (2015). Antibacterial activity of oregano, rosmarinus and thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. *Food Control*, 54, 188–199. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.045>
- Pesavento, G., Calonico, C., Bilia, A. R., Barnabei, M., Calesini, F., Addona, R., McClements, D. J. (2015). Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Food Control*, 21(1), 36–42. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02032.x>
- Porta, R., Di Pierro, P., Rossi-Marquez, G., Mariniello, L., Kadivar, M., & Arabestani, A. (2015). Microstructure and properties of bitter vetch (*Vicia ervilia*) protein films reinforced by microbial transglutaminase. *Food Hydrocolloids*, 50, 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.008>
- Porta, R., Di Pierro, P., Sabbah, M., Regalado-Gonzales, C., Mariniello, L., Kadivar, M., & Arabestani, A. (2016). Blend films of pectin and bitter vetch (*Vicia ervilia*) proteins: Properties and effect of transglutaminase. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 36, 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.07.001>
- Porta, R., Mariniello, L., Di Pierro, P., Sorrentino, A., & Giosafatto, C. V. L. (2011). Transglutaminase crosslinked pectin and chitosan-based edible films: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(3), 223–238. <https://doi.org/10.1080/10408390903548891>
- Quirós-Sauceda, A. E., Ayala-Zavala, J. F., Olivas, G. I., & González-Aguilar, G. A.

- (2014). Edible coatings as encapsulating matrices for bioactive compounds: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 51(9), 1674–1685. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1246-x>
- Quiroz, I. (2018). Pan artesanal en casa. In T. García Cerezo (Ed.), *Pan artesanal en casa* (Primera Ed, pp. 129–132). Ciudad de México: *Ediciones Larousse S.A. de C.V.*
- Ruiz-Rico, M., Pérez-Esteve, É., Bernardos, A., Sancenón, F., Martínez-Mañez, R., Marcos, M. D., & Barat, J. M. (2017). Enhanced antimicrobial activity of essential oil components immobilized on silica particles. *Food Chemistry*, 233, 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.118>
- Sabbah, M., & Esposito, M. (2016). Insight into zeta potential measurements in biopolymer film preparation. *Journal of Biotechnology & Biomaterials*, 6(2), 2–4. <https://doi.org/10.4172/2155-952X.1000e126>
- Salgado, A., & Jimenez, M. (2012). Métodos de control de crecimiento microbiano en el pan. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6(2), 160–172. Retrieved from <http://web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/TSIA-62Salgado-Nava-et-al-2012.pdf>
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., & Cháfer, M. (2011). Use of essential oils in bioactive edible coatings: A review. *Food Engineering Reviews*, 3(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s12393-010-9031-3>
- Sánchez-Ortega, I., García-Almendárez, B. E., Santos-López, E. M., Amaro-Reyes, A., Barboza-Corona, J. E., & Regalado, C. (2014). Antimicrobial edible films and coatings for meat and meat products preservation. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2014/248935>
- Sánchez Aldana, D., Contreras-Esquivel, J. C., Nevárez-Moorillón, G. V., & Aguilar, C. N. (2015). Caracterización de películas comestibles a base de extractos pécticos y aceite esencial de limón mexicano. *CYTA - Journal of Food*, 13(1), 17–25. <https://doi.org/10.1080/19476337.2014.904929>

- Schwarz, C., & Mehnert, W. (1999). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. II. Drug incorporation and physicochemical characterization. *Journal of Microencapsulation*, 16(2), 205–213. <https://doi.org/10.1080/026520499289185>
- Shi, W., & Dumont, M. J. (2014). Review: Bio-based films from zein, keratin, pea, and rapeseed protein feedstocks. *Journal of Materials Science*, 49(5), 1915–1930. <https://doi.org/10.1007/s10853-013-7933-1>
- Shin, S., & Kang, C. A. (2003). Antifungal activity of the essential oil of *Agastache rugosa* Kuntze and its synergism with ketoconazole. *Letters in Applied Microbiology*, 36(2), 111–115. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01271.x>
- Soukoulis, C., Yonekura, L., Gan, H. H., Behboudi-Jobbehdar, S., Parmenter, C., & Fisk, I. (2014). Probiotic edible films as a new strategy for developing functional bakery products: The case of pan bread. *Food Hydrocolloids*, 39, 231–242. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.023>
- Sung, S., Sin, L. T., Tee, T., Bee, S., Rahmat, A. R., Rahman, W. A. W. A., Vikhraman, M. (2013). Antimicrobial agents for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, 33(2), 110–123. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.08.001>
- Tae, H., Park, Y., Sig, Y., Yun, J., & Margandan, B. (2009). Highly siliceous MCM-48 from rice husk ash for CO₂ adsorption, *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 3, 545–549. <https://doi.org/10.1016/j.ijggc.2009.02.008>
- Varga, E., Bardocz, A., Belák, Á., Maráz, A., Boros, B., Felinger, A., Horváth, G. (2015). Antimicrobial activity and chemical composition of thyme essential oils and the polyphenolic content of different *Thymus* extracts. *Farmacia*, 6(3), 357–361.
- Volić, M., Pajić-Lijaković, I., Djordjević, V., Knežević-Jugović, Z., Pećinar, I., Stevanović-Dajić, Z., Bugarski, B. (2018). Alginate/soy protein system for

essential oil encapsulation with intestinal delivery. *Carbohydrate Polymers*, 200(January), 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.033>

Wiegand, I., Hilpert, K. & Hancock, R. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* **3**, 163–175 (2008) doi:10.1038/nprot.2007.521

Yilmaz, M. T., Yilmaz, A., Akman, P. K., Bozkurt, F., Dertli, E., Basahel, A., Sagdic, O. (2019). Electrospraying method for fabrication of essential oil loaded-chitosan nanoparticle delivery systems characterized by molecular, thermal, morphological and antifungal properties. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 52(September 2018), 166–178. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.12.005>

Younes, M., Aggett, P., Aguilar, F., Crebelli, R., Dusemund, B., Frutos, M. J., Lambr, C. (2018). Re-evaluation of silicon dioxide (E 551) as a food additive, 16(November 2017), 1–70. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5088>

9 ANEXOS

Anexo 1. Receta para la elaboración de pan blanco según lo reportado por Quiroz (2018).

Ingredientes

2000 g de harina de trigo
40 g de sal
20 g de levadura en polvo
520 mL de agua
400 mL de leche
160 g de azúcar
120 g de leche en polvo
200 g de mantequilla

Procedimiento

Se mezcla en un recipiente la levadura en polvo con la leche en polvo y la leche líquida. Se coloca en el bowl de la mezcladora la harina de trigo, sal y azúcar, y se mezclan con la levadura y leche previamente preparada. Se añaden 100 mL de agua y se comienza el mezclado con la batidora, se añade más agua (420 mL) hasta observar una mezcla homogénea y suave, al llegar a la consistencia deseada añadir la mantequilla y dejar mezclar hasta incorporarla totalmente durante 10 minutos.

La mezcla obtenida se amasa finalmente a mano para lograr la completa homogenización y se corta en porciones de 100 g que se colocan en moldes, se dejan fermentar durante 30 minutos y se precalienta el horno (200 °C), una vez pasados los 30 minutos se meten al horno y se dejan hornear a 170 °C durante 30 minutos.

Anexo 2. Factores significativos en la caracterización fisicoquímica de suspensiones filmogénicas.

Respuesta	Factor	N parámetros	Std Error	Razón F	Prob> F
Potencial ζ (mV)	NSM	2	61.12	9.65	0.006*
	AET	2	56.73	8.96	0.008*
	NSM:AET	2	151.50	23.92	0.000*
Tamaño de partícula (nm)	TG:NSM:AET	2	19437	193.42	2.43 e-10*
Índice de polidispersión	TG	2	0.030	27.15	8.57e-5*
	NSM	2	0.015	14.15	0.001*
	TG:AET	2	0.0003	15.94	0.001*

Anexo 3. Análisis de varianza del pH para las pendientes estimadas para el pan blanco control y con recubrimiento durante 16 días de almacenamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Columna 1	1	0.00060130	0.000601	0.1330	0.6173
Error	4	0.00593622	0.003985		
C. Total	5	0.00913822			

Anexo 4. Análisis de varianza de la aw para las pendientes estimadas para el pan blanco control y con recubrimiento durante 16 días de almacenamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Columna 1	1	0.0000	0.0001	0.0058	0.9690
Error	4	0.0032	0.0016		
C. Total	5	0.0035			

Anexo 5. Análisis de varianza del porcentaje de humedad para las pendientes estimadas para el pan blanco control y con recubrimiento durante 16 días de almacenamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Columna 1	1	0.0954817	0.08748	28.546	0.0055*
Error	4	0.0112236	0.002831		
C. Total	5	0.1012053			

Anexo 6. Análisis de varianza de la resiliencia para las pendientes estimadas para el pan blanco control con el recubrimiento durante 16 días de almacenamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Columna 1	1	0.00093822	0.000600	0.3023	0.011*
Error	4	0.00053822	0.001985		
C. Total	5	0.00060570			

Anexo 7. Análisis de varianza de la gomosidad para las pendientes estimadas para el pan blanco control con el recubrimiento durante 16 días de almacenamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Columna 1	1	0.08954817	0.089548	31.564	0.042*
Error	4	0.01172236	0.002931		
C. Total	5	0.10127053			

Anexo 8. Análisis de varianza de la masticabilidad para las pendientes estimadas para el pan blanco control con el recubrimiento durante 16 días de almacenamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Columna 1	1	0.0157646	0.015776	11.824	0.0231*
Error	4	0.0053038	0.001327		
C. Total	5	0.0108284			