



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA EMULSIÓN  
CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA A BASE DE PROTEÍNA  
DE QUINUA-QUITOSANO Y ACEITES ESENCIALES”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**RAQUEL ADRIANA RÍOS ROMO**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. MONSERRAT ESCAMILLA GARCÍA**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2020**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA EMULSIÓN  
CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA A BASE DE PROTEÍNA  
DE QUINUA-QUITOSANO Y ACEITES ESENCIALES”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

RAQUEL ADRIANA RÍOS ROMO

DIRIGIDA POR

Dra. MONSERRAT ESCAMILLA GARCÍA

SINODALES

Dra. MONSERRAT ESCAMILLA GARCÍA

DIRECTOR

Dra. MAYRA DÍAZ RAMÍREZ

CODIRECTOR

Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

SINODAL

Dr. ALDO AMARO REYES

SINODAL

## Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Querétaro, mi casa de estudios, por el acceso a las condiciones e instalaciones necesarias, así como por el apoyo recibido durante mi estancia universitaria.

Al Laboratorio de Biotecnología de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro por brindarme los materiales, los equipos e instalaciones indispensables para el desarrollo de mi tesis y además por ser mi segunda casa durante un par de años.

A la Planta Piloto del parque biotecnológico por las facilidades otorgadas para el uso de equipos de laboratorio de sus instalaciones.

Al Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría número 00633 por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

Al Fondo para el Fortalecimiento de la Investigación UAQ del programa 20501419120502 por el financiamiento otorgado.

A la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, al Centro Nanociencias y Micro y Nanotecnologías, y al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV Querétaro) del Instituto Politécnico Nacional por el apoyo brindado para la realización de la experimentación requerida a lo largo del proyecto.

## Agradecimientos personales

Quiero agradecerle a mi directora de tesis, la Dra. Monserrat Escamilla García, por los conocimientos invaluable que me brindó para llevar a cabo este proyecto, por su orientación, paciencia y amistad, y sobretodo por su gran apoyo para la culminación de este trabajo. Gracias por la motivación, el ejemplo intelectual y la comprensión y guía en los momentos difíciles que con lleva la investigación.

Agradezco a los miembros del jurado, el Dr. Carlos Regalado González, el Dr. Aldo Amaro Reyes y a mi asesora, la Dra. Mayra Díaz Ramírez, por las valiosas contribuciones que hicieron a mi trabajo durante su desarrollo y por el tiempo dedicado.

Agradezco a mi familia que siempre me ha dado su apoyo incondicional y cariño, me ha guiado y cuidado con todo su amor. En especial a mi mamá que nunca ha escatimado esfuerzos para formarme y educarme, gracias por ser mi mejor ejemplo en la vida, por creer siempre en mí y en mis sueños, sobre todo gracias por nunca soltarme.

A mis amigas que siempre estuvieron a mi lado para ayudarme y escucharme. Gracias por todos los momentos compartidos, por las risas que siempre fueron muchas y los abrazos en momentos de estrés, hicieron de este proyecto una experiencia más divertida.

A Octavio, por siempre motivarme a alcanzar las metas que me propongo, por tu paciencia y cariño, y por acompañarme en los buenos y malos momentos.

## INDICE GENERAL

### ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
INDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	v
1. Antecedentes	1
1.1 Calidad en los alimentos	1
1.2 Embalaje de alimentos	1
1.3 Películas y recubrimientos comestibles	3
1.4 Emulsiones	3
1.5 Emulsiones como recubrimiento	4
1.5.1 Emulsiones a base de polisacáridos	4
1.5.1.1 Quitosano	5
1.5.2 Emulsiones a base de proteínas	6
1.5.2.1 Quinoa	6
1.6 Plastificantes	7
1.7 Antimicrobianos	8
1.7.1 Aceites esenciales	9
1.7.1.1 Tomillo	10
1.7.1.2 Romero	10
1.8 Agentes entrecruzantes	11
1.8.1 Transglutaminasa	12
1.9. Caracterización de emulsiones	13
1.10 Análisis de imagen	14

1.10.1 Matriz de co-ocurrencia de escala de grises	14
2. Hipótesis	15
3. Objetivos	16
3.1 General	16
3.2 Específicos	16
4. Metodología	17
4.1 Materiales	17
4.2 Métodos	17
4.2.1 Extracción de proteína de quinua	17
4.2.2 Elaboración de solución proteína de quinua-quitosano	18
4.2.3 Entrecruzamiento con transglutaminasa	18
4.2.4 Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales libres	18
4.2.4.1 Bacterias	18
4.2.4.2 Concentración mínima inhibitoria de los aceites	19
4.2.5 Elaboración de emulsión	19
4.2.6 Concentración mínima inhibitoria de los aceites en la emulsión	19
4.2.7 Caracterización de la emulsión	20
4.2.7.1 Tamaño de partícula	20
4.2.7.2 Potencial Z	20
4.2.7.3 Propiedades reológicas de emulsión	20
4.2.8 Efecto de la emulsión en estructura celular	20
4.2.8.1 Preparación de muestras	20
4.2.8.2 Topografía de las células	21
4.2.8.3 Análisis de imagen de textura	21
5. Resultados	24

5.1 Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales libres y adicionados a la emulsión	24
5.2 Estabilidad	30
5.3 Reología	32
5.4 Microscopía de fuerza atómica	33
5.5 Análisis de imagen	35
6. Discusión	38
6.1 Actividad antimicrobiana de soluciones filmogénicas	38
6.2 Actividad antimicrobiana de las emulsiones	38
6.3 Estabilidad	39
6.4 Reología de las emulsiones	41
6.5 Microscopía de fuerza atómica	42
6.6 Análisis de imagen	42
7. Conclusiones	44
8. Referencias	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Curva de crecimiento de <i>M. luteus</i> aceites esenciales libres.	24
2	Curva de crecimiento de <i>M. luteus</i> en presencia de las soluciones filmogénicas.	25
3	Efecto de los aceites esenciales incorporados a la solución filmogénica de PQ:Q en el tiempo de duplicación de <i>M. luteus</i> .	26
4	Efecto de los aceites esenciales en la velocidad específica de crecimiento de <i>M. luteus</i> .	27
5	Curva de crecimiento de <i>Salmonella</i> spp. ante aceites esenciales libres.	27
6	Curva de crecimiento de <i>Salmonella</i> spp. en la soluciones filmogénicas con y sin aceite esencial.	28
7	Tiempo de duplicación de <i>Salmonella</i> spp. en las soluciones filmogénicas con y sin aceite esencial.	29
8	Velocidad específica de crecimiento de <i>Salmonella</i> spp.	30
9	Reología de las soluciones filmogénicas.	33
10	Micrografía de fuerza atómica <i>Microoccus luteus</i> en emulsiones de proteína de quinua-quitosano.	34
11	Micrografía de fuerza atómica de <i>Salmonella</i> spp. en emulsión de proteína de quinua-quitosano.	35
12	Análisis de imagen de micrografías de fuerza atómica de <i>Salmonella</i> spp. y <i>M. luteus</i> en emulsión de proteína de quinua-quitosano con y sin aceite esencial.	36

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Potencial Z de las emulsiones al día 0 y 10 de almacenamiento.	30
2	Tamaño de partícula e índice de polidispersión.	31
3	Propiedades reológicas.	32

## RESUMEN

Uno de los objetivos de la industria alimentaria es incrementar la vida de anaquel de sus productos y el empaquetado es uno de los métodos más ampliamente utilizado para lograrlo. A pesar de la efectividad de este método, actualmente hay controversia debido al impacto negativo de estos materiales sobre el ambiente, ya que actualmente se generan aproximadamente 299 millones de toneladas de residuos plásticos por año. Esto ha generado la búsqueda de alternativas para solucionar esa problemática. Una de las opciones de mayor interés es el desarrollo de recubrimientos comestibles, sin embargo, el reto sigue siendo obtener una funcionalidad similar a la de los empaques plásticos para la conservación de los alimentos. Aunado a esto y la tendencia del consumo de productos mínimamente procesados, los consumidores buscan recubrimientos libres de aditivos artificiales. En el presente trabajo, se elaboró un recubrimiento comestible a base de quitosano (Q) y proteína de quinua (PQ) entrecruzada con transglutaminasa mediante la formación de una emulsión, con la finalidad de obtener un recubrimiento con buenas propiedades mecánicas y antimicrobianas. Se propone además el uso de aceite esencial (EO) de tomillo (T) y romero (R) como agentes antimicrobianos. Se analizó la reología, tamaño de partícula y potencial Z de las emulsiones hechas previamente para la elaboración del recubrimiento comestible, así como la actividad antimicrobiana ante *Micrococcus luteus* y *Salmonella* spp., midiendo su crecimiento y daño en pared mediante microscopía de fuerza atómica. Los resultados indican que la adición de EO a la solución PQ:Q no afectó el potencial Z de las mismas, en un rango de  $-46.69 \pm 3.19$  mV a  $-46.21 \pm 3.83$  mV. El índice de polidispersión aumentó de  $0.51 \pm 0.07$  para la solución (PQ: Q) a  $0.80 \pm 0.04$  para las emulsiones. Las tres soluciones se ajustan al modelo reológico de Casson, con  $R^2$  entre 0.995 y 0.999. La concentración mínima inhibitoria de los EO en la emulsión fue de 0.5 % (v/v) para tomillo y 1 % (v/v) para romero. El mayor tiempo de duplicación fue de  $81.40 \pm 7.01$  h para *Salmonella* spp. en la emulsión PQ:Q-R. La dimensión fractal y la rugosidad de la pared celular de las bacterias disminuyó al adicionar los EO. Debido a las propiedades obtenidas estas emulsiones pueden utilizarse como un recubrimiento con actividad antimicrobiana para la conservación de alimentos.

## **1. Antecedentes**

### **1.1 Calidad en los alimentos**

La calidad de los alimentos es el conjunto de propiedades y características que hacen aceptables los alimentos a los consumidores, quienes demandan alimentos con una calidad mayor durante el periodo entre su adquisición y su consumo (Abasi y col., 2018). El interés sobre la conservación de los alimentos se remonta a épocas muy antiguas, donde se empleaban métodos como el secado al sol y aire, el escabeche, la salazón, entre otros.

Numerosos factores intervienen en la pérdida de la calidad original del producto o en su deterioro, tales como la exposición a la luz solar, el contacto con el oxígeno, la temperatura y el grado de humedad al que son expuestos, además de su contaminación. Los alimentos contaminados son aquellos que contienen agentes vivos (microorganismos, parásitos patógenos o deterioradores), químicos, minerales y orgánicos, extraños a su composición normal (Ancos y col., 2015).

Por lo anterior, los métodos de conservación se utilizan con el fin de alargar la vida útil de los alimentos, intentando preservar al máximo su calidad organoléptica y nutricional. Se han desarrollado diferentes estrategias como los métodos que involucran la variación de la temperatura (pasteurización, esterilización, refrigeración, congelación), la reducción de la humedad (desección, evaporación) o la adición de sustancias (ahumado) (Jiménez, 2013). El impacto ambiental que ocasionan dichos métodos ha obligado a la búsqueda de nuevas alternativas tales como, los recubrimientos y películas comestibles. Estos se caracterizan por ser seguros para la salud, utilizar tecnología simple para su elaboración y prolongar la vida útil de los alimentos (Fernández y col., 2015).

### **1.2 Embalaje de alimentos**

El embalaje de alimentos cumple cuatro funciones principales, la contención, protección, conveniencia y comunicación. La mayoría de los materiales utilizados para envasar alimentos pertenecen a las siguientes clases: metales, vidrio, papel y

polímeros, o la combinación de dos o más de éstos. La hojalata y el aluminio son los principales metales utilizados para el envasado, sin embargo, fenómenos como la corrosión de la hojalata son motivo de preocupación (Szczepańska y col., 2018). A su vez, el vidrio tiene las ventajas de transparencia, inercia, impermeabilidad, rigidez y es atractivo para el consumidor, pero presenta fragilidad y es pesado. Por otra parte, el papel es de bajo costo, disponibilidad, bajo peso, capacidad de impresión y resistencia mecánica. Su defecto más grave es la sensibilidad a la humedad (Berk, 2017).

La introducción de diversos materiales, tales como el poliéster, polipropileno y etileno, alcohol vinílicos y polímeros condujo a dejar de lado los envases antes mencionados para hacer uso de envases plásticos y flexibles. Debido a su versatilidad y bajo costo, los polímeros son los materiales de empaque más importantes para los alimentos. Sin embargo, éstos son poco amigables con el ambiente, al ser derivados del petróleo, ya que pueden presentar el fenómeno conocido como partición de compuestos químicos por difusión o absorción desde el empaque hacia el alimento. Lo anterior implica la contaminación de los alimentos provenientes del empaque plástico, lo cual puede causar efectos tóxicos en el consumidor y cambios organolépticos de los alimentos (Melina y col., 2018).

Las nuevas tendencias en las técnicas de envasado de alimentos son el resultado de las preferencias de los consumidores por productos alimenticios con mayor vida útil y comodidad. Aunado a los cambios en el estilo de vida de la población, dichas tendencias han evolucionado sin comprometer las características de seguridad y calidad de los alimentos. Los brotes microbianos transmitidos por los alimentos, es otro factor importante que exige la generación de empaques innovadores con efectos antimicrobianos (Majid y col., 2018). Un ejemplo de esto son los empaques o recubrimientos activos, los cuales son considerados como “activos” cuando proporcionan funciones más allá de la protección tradicional y la barrera inerte al ambiente exterior. El empaque libera o absorbe sustancias en el alimento o en el ambiente que lo rodea, además pueden contener componentes tales como

antimicrobianos, antioxidantes, eliminadores de O<sub>2</sub>, emisores/absorbentes de CO<sub>2</sub>, reguladores de humedad, liberadores de sabor, entre otros (Ahmed y col., 2017).

### 1.3 Películas y recubrimientos comestibles

Un recubrimiento comestible se puede definir como una matriz continua, delgada y de grado alimenticio, que se estructura alrededor de un alimento generalmente mediante la inmersión de este en una solución formadora del recubrimiento, barnizado o aspersion, con el fin de preservar su calidad y servir de empaque. Debido a que son aplicados directamente sobre la superficie del alimento, comúnmente son vistos como parte final del producto. Por otra parte, una película comestible es una matriz preformada, obtenida por moldeo, cuyo espesor es siempre mayor al de los recubrimientos (Fernández y col., 2015).

Dichas soluciones formadoras de la película o recubrimiento pueden estar conformadas por un polisacárido (almidón, quitosano, celulosa), un compuesto de naturaleza proteica (caseína, zeína, de quinua), lipídica (ceras, ácidos grasos) o por una mezcla de éstos (Anchundia y col., 2016). A pesar de sus diferencias, ambas proceden de igual manera frente a diversas sustancias que actúan sobre el alimento como barrera frente al transporte de gases y vapor de agua durante su conservación. Lo anterior se traduce en un aumento en la vida de anaquel de los productos, además ayudan a la conservación de sus propiedades organolépticas y los protegen de agentes contaminantes como los microorganismos (Escamilla y col., 2013).

### 1.4 Emulsiones

Una emulsión es una mezcla de dos o más líquidos que generalmente son inmiscibles, donde un líquido es dispersado en otro. Los ejemplos incluyen aceite crudo y agua que puede formar una emulsión de aceite en agua, en donde el aceite es la fase dispersa, y el agua es el medio de dispersión. La estabilidad de una emulsión se refiere a la capacidad de la emulsión para resistir cambios en sus propiedades a lo largo del tiempo. Hay tres tipos de inestabilidad en las emulsiones: (1) floculación, (2) cremación y (3) coalescencia. La floculación se produce cuando

hay una fuerza atractiva entre las gotas, por lo que forman flóculos. La coalescencia se produce cuando las gotitas chocan unas con otras y se combinan para formar una gota más grande, por lo que el tamaño promedio de las gotas aumenta con el tiempo. La cremación se produce cuando las gotitas suben a la parte superior de la emulsión bajo la influencia de la flotabilidad (Speight, 2017). El uso de un agente tensoactivo (surfactante) puede aumentar la estabilidad de una emulsión, de modo que el tamaño de las gotas no cambia significativamente con el tiempo y la emulsión se define como estable. La mayoría de las emulsiones contienen gotitas con un diámetro medio de más de alrededor de 1  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, se pueden formar nanoemulsiones con tamaños de gota entre 100–500 nm (de rango, y con una formulación adecuada, se puede preparar micro o nanoemulsiones altamente estables (Oyeneyin, 2015).

### 1.5 Emulsiones como recubrimiento

La incorporación de lípidos y ceras en recubrimientos o películas comestibles se realiza mediante la formación de emulsiones, donde la fase lipídica se mezcla con otro material. Posterior al mezclado, la emulsión se homogeneiza utilizando cizallamiento mecánico. La incorporación de una porción hidrófoba se realiza con la finalidad de mejorar las propiedades de barrera de los recubrimientos y así disminuir la pérdida de agua en los alimentos de interés como el queso (Costa y col., 2018).

#### 1.5.1 Emulsiones a base de polisacáridos

Los polisacáridos son polímeros naturales, ampliamente utilizados para la preparación de películas o recubrimientos comestibles, siendo los más empleados el almidón, la celulosa, la pectina y derivados de todos estos, como el pululano, alginatos y quitosano (Hassan y col., 2018). Los recubrimientos elaborados a partir de polisacáridos son principalmente diseñados para ser un bloqueador de oxígeno eficiente, debido a su forma de red con enlaces de hidrógeno bien ordenada. Sin embargo, éstos no se comportan bien como barreras de humedad debido a su naturaleza hidrofílica. Los recubrimientos de polisacáridos son incoloros, tienen un aspecto libre de grasa, un contenido calórico menor y se pueden aplicar para

prolongar la vida útil de frutas, verduras, mariscos o productos cárnicos al reducir significativamente la deshidratación, el oscurecimiento de la superficie y la rancidez oxidativa (Thakur y col., 2019).

#### 1.5.1.1 Quitosano

El quitosano (Q) es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa, es un polisacárido lineal compuesto por dos unidades de  $\beta$ - (1-4) -2-acetamido-D-glucosa y  $\beta$ - (1-4) -2-amino-D-glucosa (Dehghani y col., 2018). El Q se deriva de la desacetilación, en un medio alcalino, de la quitina presente en el exoesqueleto de crustáceos, células fúngicas y otros materiales biológicos. Es un compuesto no tóxico, biodegradable, biofuncional y biocompatible con propiedades antimicrobianas y antimicóticas (Li y col., 2013).

El quitosano se describe en términos de grado de desacetilación y peso molecular promedio, su importancia reside en sus propiedades antimicrobianas junto con su cationicidad y propiedades en la formación tanto de películas como recubrimientos comestibles (Elsabee y col., 2013).

Los recubrimientos a base de quitosano muestran valores de permeabilidad de oxígeno extremadamente bajos, humedad relativa baja, y permeabilidad al vapor de agua alta (Jost y col., 2014). Debido a que el quitosano presenta propiedades funcionales bacteriostáticas y fungistáticas, se pueden crear empaques antimicrobianos y ser considerados como una forma de empaque activo. Las películas a base de quitosano presentan buenas propiedades mecánicas y una permeabilidad alta al CO<sub>2</sub> y baja al O<sub>2</sub> (Ma y col., 2017). No obstante, el tener una alta permeabilidad al vapor de agua representa una limitante en su uso, ya que hay una mayor fuerza de enlace entre el agua y grupos hidroxilo del quitosano que con los grupos amino (Elsabee y col., 2013), siendo ésta una propiedad deseable a controlar en la mayoría de los alimentos. Una tendencia moderna de desarrollar recubrimientos comestibles activos es combinar diferentes materiales e incorporar

múltiples ingredientes funcionales como polímeros, polisacáridos y agentes entrecruzantes (Siang y col., 2015).

#### 1.5.2 Emulsiones a base de proteínas

Las proteínas formadoras de películas o recubrimientos comestibles se derivan de animales (por ejemplo, caseína, suero de leche, colágeno, gelatina y albúmina de huevo) o plantas (por ejemplo, maíz, soja, trigo, semilla de algodón, maní y arroz). El principal mecanismo de formación de películas de proteínas incluye la desnaturalización de la proteína iniciada por el calor, disolventes o un cambio en el pH, seguido de la asociación de cadenas peptídicas a través de nuevas interacciones intermoleculares, las cadenas de proteínas se unen a través de puentes de hidrógeno, enlaces iónicos y covalentes (Dehghani y col., 2018).

Las interacciones poliméricas que se presentan en las proteínas generan recubrimientos con una red proteica rígida, menos flexibles y permeables a los gases y vapores que otros. Por lo tanto, las películas o recubrimientos basados en proteínas se consideran bloqueadores de oxígeno altamente efectivos, incluso en humedad relativa (HR) (Enujiugha y Oyinloye, 2018). Se han elaborado diversas emulsiones a partir de proteínas, polisacáridos, ácidos grasos y la mezcla de estos. Hassan y col (2018), desarrollaron una emulsión de carboximetilcelulosa, ester de ácidos grasos y caseinato de sodio. Además, otros estudios se han enfocado en la elaboración de emulsiones a base de proteína de suero junto con aceite esencial de orégano y clavo (Fernández y col., 2014). Actualmente debido a la capacidad de mejorar y extender la vida de anaquel de los alimentos sean desarrollado nanoemulsiones a base de proteína de quinua y quitosano con aceite de timol como antimicrobiano (Robledo y col., 2018).

##### 1.5.2.1 Quinua

La quinua (*Chenopodium quinua* Willd) es un pseudocereal que se cultivó en forma tradicional en el área andina desde la época incásica, siendo Perú y Bolivia los

principales productores y exportadores. Es un cultivo de alto valor nutritivo que contiene más proteína que la mayoría de los demás alimentos vegetales. Es el único alimento vegetal que posee todos los aminoácidos esenciales, oligoelementos y vitaminas y no contiene gluten (FAOSTAT, 2015). Los aminoácidos esenciales se encuentran en el núcleo del grano, a diferencia de otros cereales que los tienen en el exosperma o cáscara, como el arroz o trigo (Abugoch, 2014). Para algunas poblaciones del mundo incluir proteínas de alta calidad en sus dietas constituye un problema, especialmente en aquellas que escasamente consumen proteína de origen animal y deben obtener proteínas de cereales, leguminosas y otros granos. Las bondades peculiares del cultivo de la quinua están dadas por su alto valor nutricional. El contenido de proteína de la quinua varía entre 13.8 y 21.9 % (p/p) dependiendo de la variedad. Debido al elevado contenido de aminoácidos esenciales de su proteína, la quinua es considerada como el único alimento del reino vegetal que provee todos los aminoácidos esenciales. Lo que hace que se encuentre extremadamente cerca de los estándares de nutrición humana establecidos por la FAO. La quinua ha sido seleccionada por esta organización como uno de los cultivos destinados a ofrecer mayor seguridad alimentaria en el próximo siglo. Entre el 2005 y 2015 las exportaciones de quinua acumularon 946 millones de dólares en términos de valor, y 285 mil toneladas en volumen, registrándose el pico más alto en el 2014 (FAOSTAT, 2015).

Se ha demostrado que la proteína de quinua es un buen biopolímero para la formación de películas o recubrimientos comestibles en combinación con carbohidratos, que dan lugar a recubrimientos mecánicamente resistentes sin el uso de plastificantes. Se ha comprobado que la adición de pequeñas cantidades de un plastificante en películas de proteína-quitano mejora la permeabilidad al vapor de agua (Caro y col., 2016).

## 1.6 Plastificantes

Los plastificantes son compuestos de bajo peso molecular y han sido incorporados en la formulación de películas y recubrimientos comestibles para reducir las

interacciones entre las cadenas de los polisacáridos que generan una película rígida y quebradiza, para que de esta forma se obtenga una película flexible. La capacidad del plastificante para reducir las interacciones entre polímeros depende del número de grupos hidroxilo libres y la compatibilidad del plastificante con el polímero. Los plastificantes comunes para películas comestibles incluyen monosacáridos, oligosacáridos, polioles, lípidos y derivados (Anchundia y col., 2016), siendo los más utilizados el glicerol, polietilenglicol y sorbitol (Kavas y Kavas, 2014). El sorbitol es un tipo de polirol. Los grupos hidroxilo activos del sorbitol lo convierten en un plastificante efectivo para algunos polímeros ricos en -OH o -NH, como el quitosano (Liu y col., 2013). Además, el sorbitol no es tóxico y podría usarse en algunos materiales que entran en contacto con alimentos.

### 1.7 Antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos son diferentes clases de moléculas que suprimen la multiplicación y el crecimiento, o que provocan la muerte, de microorganismos como bacterias, hongos o virus. El mecanismo de acción preciso de algunos agentes antimicrobianos es desconocido, pero éstos deben interactuar o cruzar la membrana celular para tener un efecto. Sin embargo, la identificación del daño inducido por estos compuestos es difícil debido a la complejidad de las membranas celulares (Musumeci y Puglisi, 2013).

El deterioro de los alimentos y la contaminación por patógenos generalmente comienza en la superficie de los alimentos. Por lo tanto, los tratamientos de superficie de los alimentos y el empaque después de los tratamientos son críticos para proteger la calidad y seguridad de los mismos (Malhotra y col., 2015). Una forma de lograr este objetivo es la aplicación de recubrimientos o películas comestibles en las superficies de los alimentos los cuales actúan como portadores de agentes antimicrobianos (Guo y col., 2017). La mayoría de las veces se usan compuestos tanto biocompatibles como biodegradables tales como el quitosano y aceites esenciales de plantas (Yuan y col., 2016), dando lugar a un empaque bioactivo.

Lo anterior ha permitido dejar de lado recubrimientos antimicrobianos convencionales, que incluyen iones de metales pesados, aplicados en la mayoría de los procesos de conservación. Sin embargo, estos recubrimientos convencionales presentan inconvenientes como la liberación de iones metálicos y contaminantes en todo el alimento (Youssef y col., 2019).

#### 1.7.1 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son compuestos aromáticos de origen natural, con actividades biológicas de amplio espectro (Asbahani y col, 2015). Se han empleado como aditivos saborizantes, medicamentos o cosméticos, como agentes insecticidas, antioxidantes, antiinflamatorios, antialérgicos y anticancerígenos. Además, muchos de éstos ejercen fuertes actividades antibacterianas, antivirales y antifúngicas, estimulando su aplicación también como antimicrobianos naturales en productos de alimenticios y bebidas (Donsi y Ferrari, 2016).

Los aceites esenciales (EO) son mezclas complejas de compuestos no volátiles y volátiles, generalmente lipofílicos, poco solubles en agua, que pueden clasificarse ampliamente en alcaloides, flavonoides, isoflavonas, monoterpenos, fenoles, carotenoides y aldehídos. Los fenoles (por ejemplo, carvacrol, timol y eugenol), alcoholes (geraniol, linalool y mentol), aldehídos (neral, citral y cuminal), cetonas (por ejemplo, carvona, mentona, piperitona) y éteres (por ejemplo, estragol y anetol) se han descrito como las principales moléculas con actividad antimicrobiana (Vitanza y col., 2019). Una característica importante de los EO y sus componentes es la hidrofobicidad, que les permite acumularse en los lípidos de la membrana celular bacteriana, lo que interfiere con la permeabilidad celular (Xu y col., 2018).

Los EO son sintetizados por las plantas como metabolitos secundarios para brindar protección contra agentes externos, como la luz UV, herbívoros, insectos y patógenos (Sales de Almeida y col., 2018). El uso de estos aceites como técnica de conservación suave en la industrial de los alimentos ha ganado considerable atención

en los últimos años, principalmente por la percepción negativa de los consumidores hacia los conservadores químicos.

#### 1.7.1.1 Tomillo

El aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) se ha utilizado como ingrediente de sabor en una amplia variedad de alimentos, bebidas y confitería. Debido a sus propiedades antisépticas y antimicrobianas, este aceite también se ha utilizado con fines conservantes, tomando mayor interés industrial por ser generalmente reconocido como seguro (GRAS) por la Agencia Federal de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos de Norteamérica (Benjema y col., 2018).

Este aceite es rico en timol y carvacrol, compuestos fenólicos que son los principales componentes responsables de la acción antimicrobiana de este y otros aceites esenciales. Debido a sus propiedades antioxidantes se ha empleado para combatir las especies reactivas de oxígeno y evitar la oxidación de los alimentos (Dias y col., 2017). Estudios previos han demostrado el potencial de este aceite contra hongos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Ulocladium*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Chaetomium* y *Aspergillus niger*, comprobando su actividad antifúngica (Grande y col., 2018). De la misma forma, ha sido evaluado contra bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp. (Sadekuzzaman y col., 2018) contra los cuales presenta eficacia antibacteriana, principalmente contra las bacterias gramnegativas (Yuang y col., 2016).

#### 1.7.1.2 Romero

El romero (*Rosmarinus officinalis* L) es una hierba aromática perenne de larga duración. El uso del aceite obtenido de esta hierba se remonta al año 1500, antes de que se inventara la refrigeración, donde se utilizaba con fines de conservación de alimentos, así como con fines médicos antisépticos y astringentes (Turasan y col., 2015). A través de los años, el área de utilización del aceite de romero no ha cambiado mucho. Este aceite incluye constituyentes fenólicos en su composición, la cual involucra principalmente monoterpenos como el 1,8-cineol, el  $\alpha$ -pineno, el

alcanfor, el canfeno, los que le confieren efectos antioxidantes, antimicrobianos, pediculicidas, aroma-terapéuticos y anticancerígenos (Rizzo y col., 2018).

Junto con los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y tomillo (*Thymus vulgaris*), el aceite esencial de romero se encuentra entre los más activos en la prevención del deterioro de los alimentos y el crecimiento de patógenos (Mohsenabadi y col., 2018). Se ha analizado su efecto contra cepas de bacterias grampositivas (*S. aureus* y *Bacillus subtilis*) y gramnegativas (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Klebsiella pneumoniae*). Sin embargo, se demostró mayor actividad contra bacterias grampositivas que contra las gramnegativas (Okoh y col., 2010). Además, este aceite se ha estudiado como un agente activo incorporado en diferentes matrices biopoliméricas. Algunos ejemplos son su inclusión en una película de acetato de celulosa o en un recubrimiento de quitosano para conservar los alimentos (Lauriano y col., 2019).

### 1.8 Agentes entrecruzantes

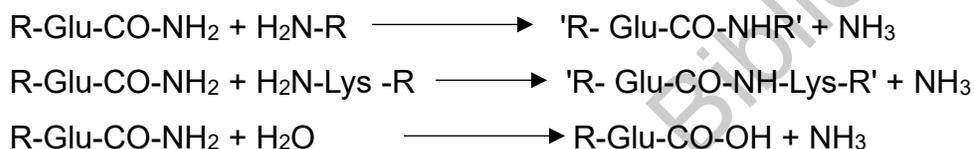
El método de entrecruzamiento implica la formación de enlaces químicos entre diferentes cadenas moleculares para generar una red tridimensional más fuerte. Los agentes entrecruzantes se pueden clasificar sobre la base del tipo de enlace producido, lo que conduce a una reticulación covalente bien estabilizada, formación de enlaces iónicos y reticulación física creada por enlaces de hidrógeno y van der Waals (Garavand y col., 2017).

El entrecruzamiento se utiliza en biopolímeros, tales como proteínas o polisacáridos, y su uso se ha recomendado en la elaboración de películas comestibles. El entrecruzamiento reduce la movilidad de la estructura de los polímeros, mejorando las propiedades mecánicas y de barrera, reduce su solubilidad en agua, crea estructuras más resistentes al calor y a la luz, mejora la estabilidad dimensional, así como la resistencia química y a los disolventes (Azeredo y Waldron, 2016).

### 1.8.1 Transglutaminasa

La enzima transglutaminasa (TG) se emplea como agente reticulante o de entrecruzamiento para mejorar la fuerza de red de proteínas en una película o recubrimiento comestible. El nombre sistemático de la TG es R-glutaminil-péptido: amina  $\gamma$ - glutamiltransferasa (E.C. 2.3.2.13). La catálisis consiste en la transferencia de acilo de residuos gamma glutaminil, presente en las proteínas o sustratos peptídicos (donador de acilo), a un sustrato aceptor de acilo. Lo anterior resulta en una variedad de diferentes productos en función de las moléculas involucradas (Amirdivani y col., 2018).

Las reacciones catalizadas por transglutaminasa se muestran a continuación:



La formación de los enlaces isopeptídicos  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutaminil) lisina, entre los residuos glutaminas y lisinas pueden ser intra-moleculares o inter-moleculares (Amirdivani y col., 2018). Debido a la formación de polímeros de alto peso molecular por acción de la TG en las películas comestibles, se pretende que las propiedades mecánicas y de barrera de las películas y recubrimientos mejoren.

Esta enzima se encuentra de forma natural en tejidos animales, en plantas y células microbianas, donde participa en distintos procesos como la coagulación, fotosíntesis y reacciones inmunológicas contra bacterias (Gurung y col., 2013). Como fuente microbiana se ha obtenido de microorganismos del género *Streptoverticillium*, del cual *Streptoverticillium ladakanum* es el mejor productor de la enzima. Además de que se ha descrito a esta enzima microbiana como la más efectiva para su uso en la preparación de recubrimientos comestibles a base de proteínas (Rodríguez y col., 2013). Por otra parte, cuenta con los beneficios de ser de bajo costo y un compuesto GRAS (generalmente reconocido como seguro), lo que permite su adición en alimentos (Amirdivani y col., 2018).

### 1.9. Caracterización de emulsiones

Debido a la amplia presencia de las emulsiones en los sistemas alimentarios, actualmente se han convertido en un vehículo de distribución popular para ingredientes funcionales (Drapala y col., 2018). Dependiendo del tipo de ingredientes utilizados y los requisitos para su aplicación, las emulsiones son diseñadas con diferentes tamaños, estructuras de superficie y propiedades electroquímicas (Wang y col., 2018). Las características como el tamaño, la morfología, la reología, la carga y la capacidad de encapsulación de las emulsiones se evalúan utilizando instrumentos analíticos y metodologías estandarizadas. Uno de los parámetros evaluados con mayor frecuencia es la estabilidad de la emulsión, la cual se refiere a la capacidad de la misma para resistir cambios en sus propiedades fisicoquímicas a lo largo del tiempo (Hu y col., 2017).

La carga eléctrica de la superficie de las gotas que forman la emulsión es un factor que afecta su estabilidad y comportamiento físicoquímico, y ésta es medida a través del potencial Z (Tavernier y col., 2016). De igual forma, la turbidez obtenida a través de un turbidímetro, nos indica la apariencia y estabilidad de la emulsión, donde la cantidad de luz que se dispersa determina principalmente la ligereza de la emulsión (Hu y col., 2017). Por otra parte, la microscopía óptica es el tipo de microscopía más utilizado para caracterizar las microestructuras de emulsión porque es relativamente económico y fácil de operar, dando información acerca de la microestructura tridimensional de la emulsión (Niu y col., 2018).

Las propiedades de flujo de las emulsiones son evaluadas a través de un reómetro, el cual aplica fuerza de deformación por cizallamiento brindando información sobre la viscosidad, la tensión de fluencia, módulo de elasticidad y el comportamiento de fractura (Quinzio y col., 2018). Estudios más recientes, muestran la caracterización de las emulsiones utilizando calorimetría diferencial de barrido, esto con el fin de entender la estructura y las transiciones de fase que sufren las mismas al ser

sometidas a temperatura (Wang y col., 2018).

## 1.10 Análisis de imagen

### 1.10.1 Matriz de co-ocurrencia de escala de grises

La matriz de co-ocurrencia de escala de grises (GLCM, por sus siglas en inglés GrayLevel Co-Occurrence Matrix), es una técnica ampliamente utilizada para analizar las características de textura. Esta matriz especifica la cantidad de pares de píxeles que poseen ciertos valores de nivel de gris dentro de un área específica. Se calcula en función de una dirección y una distancia (Talavera-Martínez et al., 2019). A partir de una imagen en escala de grises, donde  $N$  es el número total de niveles de gris en la imagen. La matriz de co-ocurrencia de escala de grises definida por Haralick es una matriz cuadrada  $G$  de orden  $N$ , donde la entrada  $(i,j)$  de  $G$  representa el número de ocasiones en que un píxel con intensidad  $i$  es adyacente a un píxel con intensidad  $j$ . La matriz de co-ocurrencia normalizada se obtiene dividiendo cada elemento de  $G$  por el número total de pares de co-ocurrencia en  $G$  (Sebastian V et al., 2012). El contraste es una medida de las variaciones locales de los valores en escala de grises de los píxeles de una imagen. El contraste también es conocido como varianza o inercia. La entropía mide el desorden o aleatoriedad de las imágenes y puede ser usado para caracterizar la textura de la imagen y es un indicativo de la complejidad dentro de la imagen, por lo tanto, imágenes complejas tendrán altos valores de entropía (Mendoza y col., 2007; Arzate-Vázquez y col., 2011).

El análisis fractal es un método utilizado para medir la complejidad de un objeto. Es ampliamente utilizado en varias áreas diferentes de las ciencias biológicas y médicas (Zaletel et al., 2016). El concepto fractal, se basa en el fenómeno de la auto-similitud o, en otras palabras, la propiedad de una forma geométrica de ser similar cuando se divide en partes, o cuando se observa a diferentes escalas (Pantic y col., 2015).

## **2. Hipótesis**

La adición de los aceites esenciales de tomillo y romero en las emulsiones de quitosano-proteína de quinua entrecruzados con transglutaminasa brindarán actividad antimicrobiana y afectarán tanto su estructura como su reología.

### 3. Objetivos

#### 3.1 General

Desarrollar una emulsión con efecto antimicrobiano a base de quitosano y proteína de quinua entrecruzado con transglutaminasa y adicionada con aceites esenciales, así como evaluar el efecto en las propiedades reológicas y estructurales de la emulsión.

#### 3.2 Específicos

- \* Determinar las propiedades estructurales y reológicas de la emulsión hecha con proteína de quinua-quitosano entrecruzado con transglutaminasa en ausencia de aceite esencial.
- \* Determinar la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales de tomillo y romero libres ante *Micrococcus luteus* y *Salmonella* spp.
- \* Estudiar el efecto de los aceites esenciales en la pared celular de *Micrococcus luteus* y *Salmonella* mediante microscopia de fuerza atómica.
- \* Estimar la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales de tomillo y romero ante *Micrococcus luteus* y *Salmonella* spp. en las emulsiones.
- \* Evaluar el efecto de los aceites en las propiedades térmicas y reológicas de la emulsión a base de proteína de quinua-quitosano.

## 4. Metodología

### 4.1 Materiales

Quitosano (Cat. No. 417963, Sigma-Aldrich, EUA), quinua comercial peruana (Hanseatik), aceite esencial de romero "*Rosmarinus officinalis* L., Labiadas" (Drogueria Cosmopolita, CDMX, México), aceite esencial de tomillo (Drogueria Cosmopolita, CDMX, México), sorbitol (Cat. No. W302902, Sigma Aldrich), transglutaminasa microbiana derivada de *Streptoverticillium* sp, con 92 UI/ g (Activa WM, Ajinomoto, Francia).

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Extracción de proteína de quinua

A partir de semilla de quinua, se obtuvo harina mediante reducción de tamaño hasta un tamaño de 200  $\mu\text{m}$  utilizando un molino de café (Krups Modelo GX410011, Solingen, Alemania). La harina fue desgrasada mediante tres extracciones utilizando una solución de cloroformo: metanol (2:1 v/v) en proporción 1:10 p/v (harina: solvente) con agitación constante durante 2 h y 25 °C ( Elsohaimy, Refaay, & Zaytoun, 2015; Ruiz y col., 2016). La harina desgrasada se suspendió en agua destilada (10 % harina en agua, p/v) ajustando a pH 11 con una solución de NaOH 1 N y se mantuvo a pH y agitación constante durante 1 h a temperatura ambiente (25 °C), al finalizar este tiempo, las muestras se centrifugaron a 3200 x g, 10 °C durante 30 min. El sobrenadante se recuperó y se ajustó a pH 4.5 (punto isoeléctrico de la proteína de quinua), la solución se mantuvo a pH y agitación constante durante 30 min, posteriormente se centrifugó a 3200 x g, 10 °C durante 30 min. El precipitado se suspendió en agua destilada en relación 5:95 (precipitado:agua, p/v) y se neutralizó con NaOH 2 N; el extracto obtenido se secó a 50 °C en un horno (ED, Binder, Tuttlingen, Germany). Finalmente, se redujo el tamaño de partícula de los aislados proteicos utilizando un molino de café (Krups Modelo GX410011, Solingen, Alemania) durante 2 min y se pasó a través de un tamiz de apertura de poro de 200  $\mu\text{m}$  (malla No. 9, Tyler standard).

#### 4.2.2 Elaboración de solución proteína de quinua-quitosano

Se elaboró una solución de proteína de quinua (2 % p/v) en agua destilada ajustando a pH 11 con agitación constante durante 1 h. De manera simultánea se preparó una solución de quitosano 2 % (p/v) en ácido clorhídrico 0.5 M de acuerdo con lo propuesto por Escamilla y col. (2017). Una vez transcurrido el tiempo de agitación de ambas soluciones, se realizó una mezcla en una proporción 1:10 (quitosano: quinua), adicionó sorbitol como plastificante en una relación 1:1 quitosano: sorbitol y se ajustó a pH 11. Posteriormente se adicionó 0.5 % v/v Tween 80 y se homogeneizó utilizando un mezclador de alta velocidad (IKA T25-Ultra-Turrax, Wilmington, EUA) a 21.500 rpm durante 3 minutos y se sonicó 10 minutos usando un homogeneizador ultrasónico SONOPULS (HD3200, 150W, 20 KHz, Bandelin electronic GmbH & Co., Berlín, Alemania) (Hashemi-Gahruie y col., 2017).

#### 4.2.3 Entrecruzamiento con transglutaminasa

La solución descrita en el punto 4.2.2, se ajustó a pH 9 (pH óptimo de acción de transglutaminasa) para la adición de 1.4 % de una solución de TG (10 % p/v), la cual se mantuvo en agitación constante durante 1 h. Finalmente el pH se ajustó a 11 y se le adicionó Tween 80 (0.5 % v/v), la solución se homogeneizó utilizando un mezclador de alta velocidad (IKA T25-Ultra-Turrax, Wilmington, DE, EUA) a 21.500 rpm durante 3 minutos y se sonicó 10 minutos usando un homogeneizador ultrasónico SONOPULS (HD3200, 150W, 20 KHz, Bandelin electronic GmbH & Co., Berlín, Alemania) (Hashemi-Gahruie, y col., 2017).

#### 4.2.4 Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales libres

##### 4.2.4.1 Bacterias

Las bacterias utilizadas fueron de la colección de cultivos del Laboratorio de Biotecnología de Alimentos de DIPA, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, México: *Salmonella* spp. y *Micrococcus luteus*. Todas las cepas se mantuvieron en leche descremada estéril y mezcla de glicerol a  $-70^{\circ}\text{C}$  y se activaron en caldo de nutrientes (Bioxon, Estado de México, México) a  $30^{\circ}\text{C}$  para *M. luteus* y a  $37^{\circ}\text{C}$  para *Salmonella* spp.

#### 4.2.4.2 Concentración mínima inhibitoria de los aceites

La eficacia antimicrobiana de los aceites se evaluó midiendo su concentración mínima inhibitoria (CMI) ante *Salmonella* spp. y *Micrococcus luteus* a partir de un crecimiento de 12 h de cada cultivo. Se prepararon medios de cultivo y se adicionaron soluciones de aceite esencial (0, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5 y 2.0 % v/v) en Tween 80 (0.5 % v/v) y se inocularon con medio cultivo ajustado a una densidad óptica de 0.08 ( $10^6$  UFC/mL), se evaluó la densidad óptica a 600 nm cada hora. La CMI se estableció como la concentración más baja probada que inhibió el crecimiento de *Salmonella* spp. y/o *Micrococcus luteus*.

#### 4.2.5 Elaboración de emulsión

Una vez establecida la CMI, se elaboraron las soluciones como se describen en los puntos 4.3.2 y 4.3.3, adicionando la CMI de aceite a las soluciones en el momento de la adición del sorbitol.

#### 4.2.6 Concentración mínima inhibitoria de los aceites en la emulsión

Se prepararon soluciones de quitosano-proteína de quinua entrecruzados con TG y se adicionaron soluciones de aceites esenciales con Tween 80 (0.5 % v/v) a la CMI obtenida en caldo, dichas soluciones fueron inoculadas con  $10^6$  UFC/mL y se registró el cambio de densidad óptica a 600 nm cada hora, como blanco se utilizó la solución sin inóculo. En caso de no presentar inhibición se aumentó la concentración de aceite, hasta encontrar la CMI en la emulsión. Apartir de los datos obtenidos se calcularon los parámetros cinéticos de los microorganismos evaluados contra la solución de proteína de quinua, la solución de quitosano y la solución filmogénica libre (PQ:Q) y adicionada con los aceites esenciales (PQ:Q-T y PQ:Q- R). Los parámetros determinados fueron tiempo de duplicación y velocidad de específica de crecimiento, siguiendo el modelo de Monod (Olivares-Marin y col., 2018), utilizando el software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, California, EUA).

#### 4.2.7 Caracterización de la emulsión

##### 4.2.7.1 Tamaño de partícula

El diámetro medio de partícula de las emulsiones se determinó con un difractómetro láser Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Reino Unido) a 633 nm y 25 °C, equipado con un detector de retrodispersión (Artiga-Artigas y col., 2017).

##### 4.2.7.2 Potencial Z

El potencial Z (mV) se determinó mediante dispersión de luz de análisis de fase (PALS) con un difractómetro láser Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Reino Unido), el cual determina la carga eléctrica en la interfaz de las gotitas dispersas en la fase acuosa (Artiga-Artigas, y col., 2017).

##### 4.2.7.3 Propiedades reológicas de emulsión

Las propiedades reológicas de la emulsión se determinaron utilizando un reómetro con una geometría de cilindros concéntricos (Discovery Hybrid Rheometer TA instruments, Delaware, EUA). Las mediciones se realizaron a 25 °C, depositando 23 mL de la emulsión en el cilindro del reómetro, dejándolas reposar durante 5 minutos después de la carga para permitir el equilibrio de la temperatura y el estrés inducido para relajarse. Las mediciones de flujo en estado estacionario se llevaron a cabo a 25 °C en el rango de velocidad de corte de 0 a 100 s<sup>-1</sup>. Los parámetros reológicos determinados fueron esfuerzo de corte, velocidad de corte y viscosidad aparente, utilizando el software TRIOS 4 (TA instruments, Delaware, EUA); las curvas de flujo experimentales se ajustaron al modelo de Casson (Ecuación 1):

$$\sigma^{1/2} = \sigma_o^{1/2} + \eta^{1/2} \gamma^{1/2} \quad (1)$$

donde  $\sigma$  es el esfuerzo cortante (Pa),  $\sigma_o$  es el límite elástico (Pa),  $\gamma$  es la velocidad de corte (s<sup>-1</sup>) y  $\eta$  es la viscosidad aparente del fluido (Zhao y col., 2015).

#### 4.2.8 Efecto de la emulsión en estructura celular

##### 4.2.8.1 Preparación de muestras

Las muestras se prepararon siguiendo la metodología propuesta por (Mathelié-

Guinlet y col., 2018) con algunas modificaciones. Las muestras se fijaron en portaobjetos de vidrio de 26 x 76 mm y  $1.1 \pm 0.1$  mm de espesor, el sustrato que se utilizó para fijar las muestras fue la emulsión descrita previamente en el punto 4.3.4, se formó una multicapa de la emulsión sobre el portaobjetos, para lo cual el portaobjetos se cubrió con 2 mL de emulsión y se dejó secar en horno (ED, Binder, Tuttlingen, Germany) a 40 °C durante 2 horas, este proceso se realizó hasta obtener un espesor aproximado de 4 nm. Una vez que se fijó el sustrato, se depositaron 5  $\mu$ l de la suspensión de bacterias incubadas en las soluciones filmogénicas a 37 °C, utilizando como control negativo a las bacterias incubadas en la solución libre de aceites durante 5 horas, tiempo en el que alcanzan su etapa de crecimiento logarítmica. Para las muestras, las bacterias se incubaron durante 5 horas en la solución filmogénica sin aceites y posteriormente, se les añadió el aceite esencial de tomillo o romero con Tween 80 (0.5 % v/v) a la CMI obtenida en caldo, y se incubaron durante 3 horas más.

#### 4.2.8.2 Topografía de las células

Esta determinación se llevó a cabo utilizando un microscopio de fuerza atómica (AFM: di Multimode V, Veeco, Plainview, NY, USA) en modo de contacto, para evitar cualquier daño a las muestras. Las imágenes se obtuvieron, a una velocidad de escaneo de 0.5 a 1.0 Hz, con una resolución de  $512 \times 512$  píxeles y a diferentes áreas (50  $\mu$ m x 50  $\mu$ m; 2.5  $\mu$ m x 2.5  $\mu$ m; 0.5  $\mu$ m x 0.5  $\mu$ m) (Mathelié-Guinlet y col., 2018).

#### 4.2.8.3 Análisis de imagen de textura

El análisis de imagen de textura se realizó siguiendo la metodología propuesta por (Arzate-Vazquez y col., 2012) y fue aplicado para caracterizar cuantitativamente la microestructura de la superficie de los microorganismos evaluados tratados con la solución filmogénica de proteína-quitosano con y sin aceites. Se seleccionaron tres características de textura como parámetros de estudio (entropía, dimensión fractal y rugosidad). Todas las imágenes obtenidas mediante microscopía de fuerza atómica

se convirtieron de color RGB a imágenes en escala de grises. Posteriormente, se aplicaron los algoritmos de Matriz de Co-ocurrencia de Nivel Gris (GLCM) y Conteo de Caja Diferencial Cambiante (SDBC) para obtener las características de textura a partir de imágenes en escala de grises, ambos incluidos en el software Image J 1.52a (Maryland, EUA). GLCM es un algoritmo estadístico de segundo orden que compara dos píxeles vecinos a la vez y compila la frecuencia con la que se pueden encontrar diferentes niveles de grises dentro de un área restringida. En este algoritmo se consideran tres variables: el número de niveles de gris (0–255), la distancia de los píxeles ( $d$ ) y el ángulo de desplazamiento ( $\theta$ ). La textura de la imagen (entropía) se analizó mediante el estudio de la dependencia espacial de los valores de píxeles representados por una matriz de co-ocurrencia  $G_{d,\theta}$ , con la entrada  $G_{d,\theta}(i,j)$ , que representa la frecuencia con que un píxel con intensidad  $i$  es adyacente a un píxel con intensidad  $j$ , separados en dirección  $\theta$ . Estos parámetros se midieron a una distancia  $d$  igual a 1 y un ángulo igual a  $0^\circ$ , utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Entropía} = - \sum_{ij} (G_{d,\theta}(i,j) \log (G_{d,\theta}(i,j))) \quad (2)$$

La textura fractal se evaluó mediante la escala de la ley de potencia para obtener su Dimensión Fractal (DF), utilizando el método de Conteo Diferencial de Cajas (SDBC). Este algoritmo, basado en el gráfico de intensidad de superficie, se genera a partir de imágenes en escala de grises 2D al trazar coordenadas de píxeles ( $x, y$ ) y su nivel de gris en el eje  $z$ . DF se estimó a partir de la pendiente en el gráfico de  $\log(\text{número de cajas})$  vs  $\log(\text{tamaño de caja})$ , usando la ecuación (3), donde "N" es el número de cajas y "r" es la longitud de la caja lateral o tamaño de caja.

$$DF = \frac{\log (N)}{\log (1/r)} \quad (3)$$

Este parámetro es una medida directamente relacionada con el grado de rugosidad de la superficie ( $R_q$ ), el cual se obtuvo siguiendo el protocolo de (Escamilla-García y col., 2019) y utilizando la Ecuación (4), donde  $R_q$  es la desviación estándar de los valores de  $Z_i$  indicando la rugosidad en nm,  $Z_i$  es la diferencia de altura de  $i$  en relación

con el promedio de las alturas, y N es el número de puntos en la imagen.

$$Rq = \sqrt{\frac{\sum Zi^2}{N}} \quad (4)$$

#### 4.2.9 Análisis estadístico

Todas las pruebas se realizaron por triplicado y los datos se evaluaron mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA) utilizando el software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, California, EUA). Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba de Dunnett, con un nivel de significancia  $p < 0.01$ . Los datos son presentados como la media  $\pm$  desviación estandar.

Dirección General de Bibliotecas UFRQ

## 5. Resultados

En el presente proyecto se evaluaron las propiedades estructurales, físicas, antimicrobiana y reológicas de una emulsión elaborada a partir de proteína de quinua-kitosano utilizando transglutaminasa como agente entrecruzante, como antimicrobiano se adicionó aceite esencial de tomillo y romero.

### 5.1 Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales libres y adicionados a la emulsión

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de romero y tomillo ante dos bacterias *M. luteus* (Gram positiva) y *Salmonella* spp. (Gram negativa). En la Figura 1, se muestran los resultados obtenidos en la determinación de la CMI de los aceites esenciales de tomillo y romero. La CMI del aceite esencial de tomillo ante *M. luteus* es de 0.5 % (v/v), mientras que la CMI del aceite esencial de romero fue de 1 % (v/v) (Figura 1).

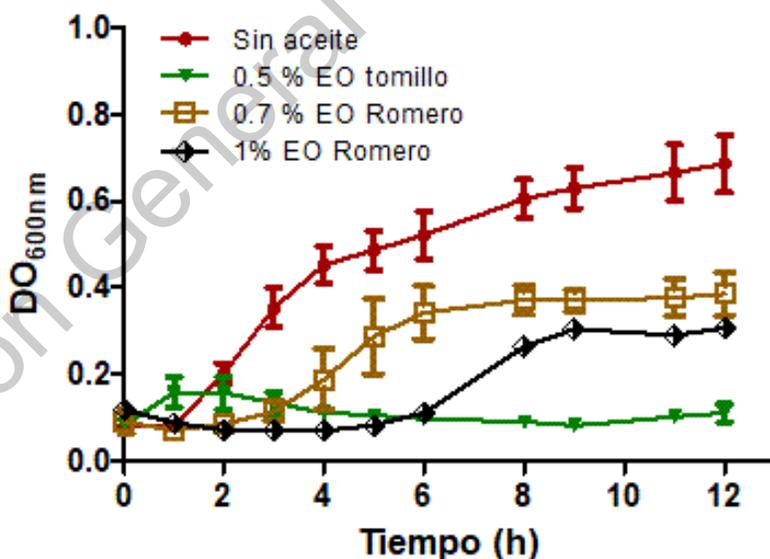


Figura 1. Curva de crecimiento de *M. luteus* aceites esenciales libres.  $DO_{600\text{ nm}}$ : Densidad óptica a 600 nm, EO: Aceite esencial.

Los aceites esenciales se incorporaron en las soluciones filmogénicas (con y sin TG) a la CMI obtenida para cada aceite esencial. En la Figura 2, se observa el efecto de

las soluciones filmogénicas y los aceites esenciales en *M. luteus*. La solución filmogénica de PQ:Q presentó el mayor crecimiento microbiano, mientras que las películas de Q, PQ:Q-R y PQ:Q-T no presentaron crecimiento microbiano desde el tiempo 0 hasta las 12 horas de monitoreo. A pesar de que se observó que la solución de quitosano inhibe el crecimiento de *M. luteus*, la combinación con PQ favoreció el crecimiento del microorganismo 4 veces por encima del valor de la densidad óptica obtenida con la solución filmogénica elaborada con PQ.

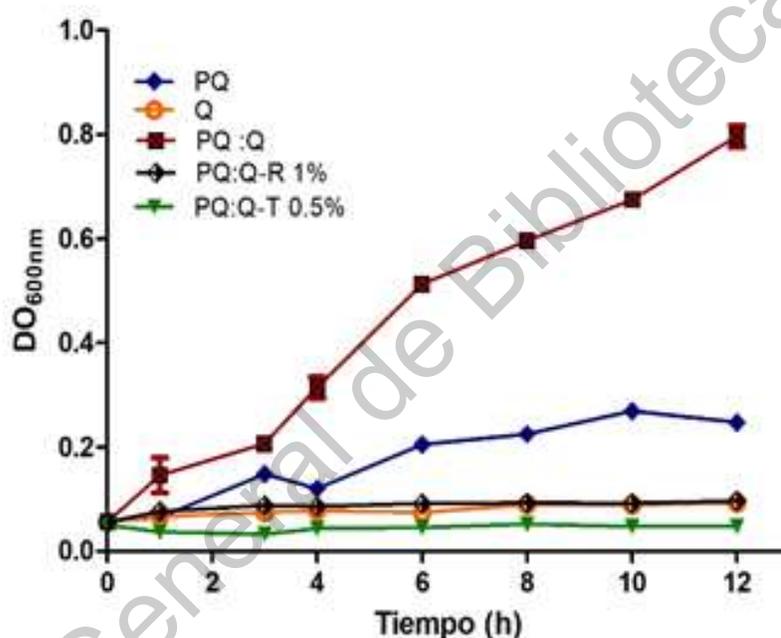


Figura 2. Curva de crecimiento de *M. luteus* en presencia de las soluciones filmogénicas.  $DO_{600\text{ nm}}$ : Densidad óptica a 600 nm; PQ: proteína de quinua; Q: quitosano; T: aceite esencial de tomillo; R: aceite esencial de romero.

En la Figura 3 se muestra el tiempo de duplicación ( $T_d$ ) de *M. luteus* en las soluciones filmogénicas estudiadas. Las solución PQ presentó el valor de  $T_d$  más bajo ( $7.36 \pm 0.05$  h), sin embargo, no presentó diferencia significativa con la solución PQ: Q. La solución Q y las emulsiones con los aceites esenciales, presentaron diferencia significativa en comparación a la solución PQ:Q, presentando el valor más alto la emulsión PQ:Q-T ( $44.54 \pm 1.10$  h), el cual fue 1.77 veces el  $T_d$  que presentó la emulsión con romero ( $25.07 \pm 1.56$  h). El Q permitió disminuir el  $T_d$ , sin embargo, los

valores presentados por dicha solución es menor que el que presentaron las soluciones PQ:Q-T y PQ:Q-R.

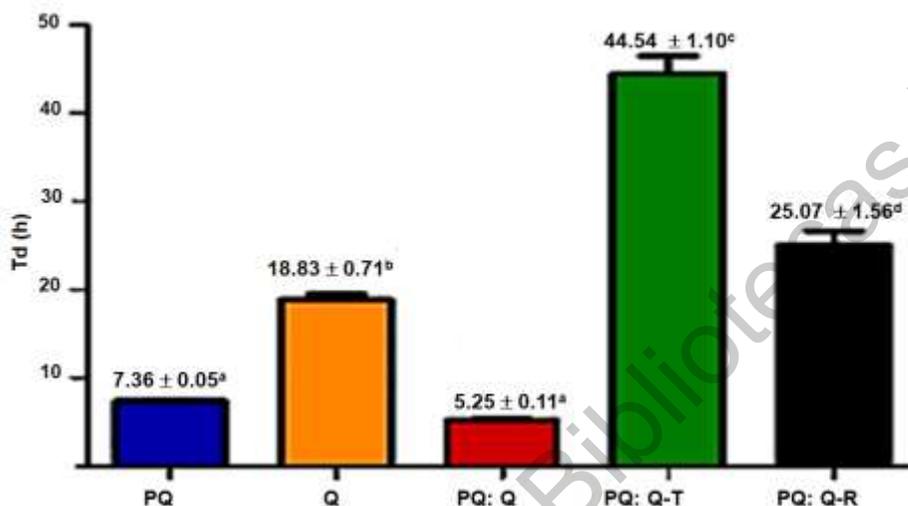


Figura 3. Efecto de los aceites esenciales incorporados a la solución filmogénica de PQ:Q en el tiempo de duplicación de *M. luteus*. Td: tiempo de duplicación; PQ: proteína de quinua; Q: quitosano; T: aceite esencial de tomillo 0.5 % (v/v); R: aceite esencial de romero 1 % (v/v). Los datos se presentan como la media ± desviación estándar. <sup>a-d</sup> Indican diferencia significativa  $p < 0.01$ .

Otro parámetro que se determinó fue la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), el cual nos indica la cantidad de gramos de biomasa que es capaz de generar cada gramo de biomasa en una unidad de tiempo. En la Figura 4, se puede observar que  $\mu$  disminuye en presencia de los aceites esenciales, tanto de tomillo como de romero, la solución PQ:Q-T presentó el valor más bajo de  $\mu$  ( $5.55 \pm 0.07 \text{ h}^{-1}$ ), lo cual indica que la mayor actividad antimicrobiana la presenta el aceite esencial de tomillo, mientras que, el mayor crecimiento se tuvo en la solución PQ:Q ( $\mu = 13.2 \pm 0.26 \text{ h}^{-1}$ ).

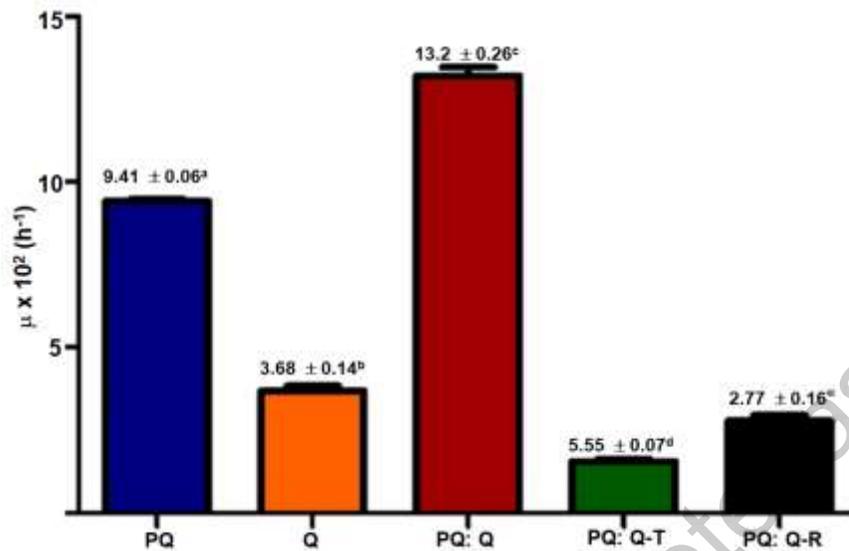


Figura 4. Efecto de los aceites esenciales en la velocidad específica de crecimiento de *M. luteus*.  $\mu$ : velocidad específica de crecimiento microbiano; PQ: proteína de quinua; Q: quitosano; T: aceite esencial de tomillo 0.5 % (v/v) ; R: aceite esencial de romero 1 % (v/v). Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar. <sup>a-e</sup> Indican diferencia significativa  $p < 0.01$

La actividad antimicrobina de las soluciones filmogénicas con y sin aceite esencial ante *Salmonella* spp. se muestra en la Figura 5, en donde la CMI para los aceites de tomillo y romero obtenidos son 0.5 % (v/v) y 1 % (v/v) respectivamente. Siendo las mismas que se obtuvieron para *M. luteus*.

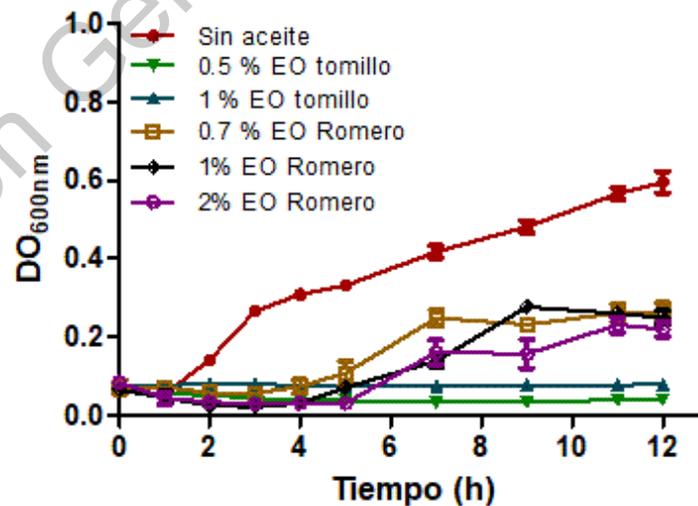


Figura 5. Curva de crecimiento de *Salmonella* spp. ante aceites esenciales libres. DO<sub>600 nm</sub>: Densidad óptica a 600 nm, EO: Aceite esencial.

El crecimiento microbiano de *Salmonella* spp., fue evaluado en las soluciones filmogénicas (Figura 6). *Salmonella* spp., presentó el mayor crecimiento en la solución PQ:Q e inhibición en las emulsiones (PQ:Q-T y PQ:Q-R) durante las 12 h de monitoreo. El aumento en la densidad óptica de *Salmonella* spp. en la solución filmogénica PQ:Q se observa a partir de la primer hora después de la inoculación.

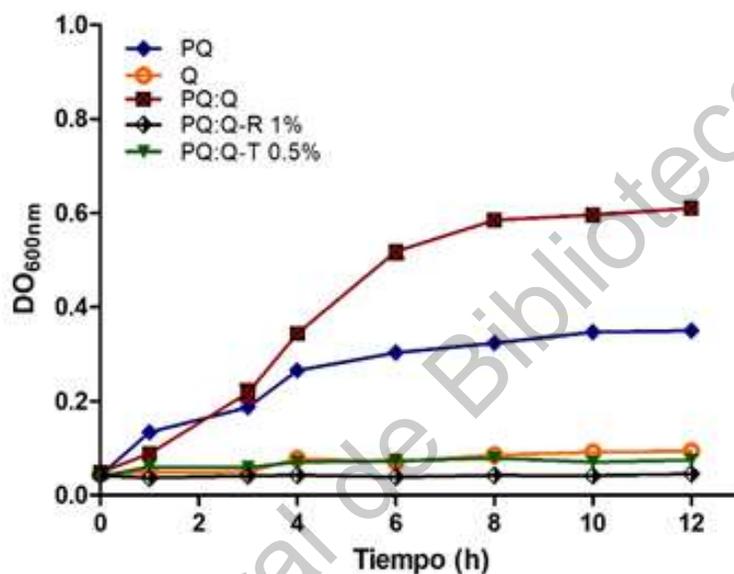


Figura 6. Curva de crecimiento de *Salmonella* spp. en la soluciones filmogénicas con y sin aceite esencial.  $DO_{600\text{ nm}}$ : Densidad óptica a 600 nm; PQ: proteína de quinua; Q: quitosano; T: aceite esencial de tomillo; R: aceite esencial de romero.

El Td de *Salmonella* spp. aumentó significativamente en presencia de los aceites esenciales de romero ( $81.40 \pm 7.01$  h) y tomillo ( $22.47 \pm 1.27$  h), comparado con las soluciones de PQ, Q y PQ (Figura 7). Para *Salmonella* spp. la solución de Q no presentó un efecto significativo en el Td. La solución en el menor Td, fue la elaborada a partir de la mezcla PQ: Q ( $6.22 \pm 0.10$  h).

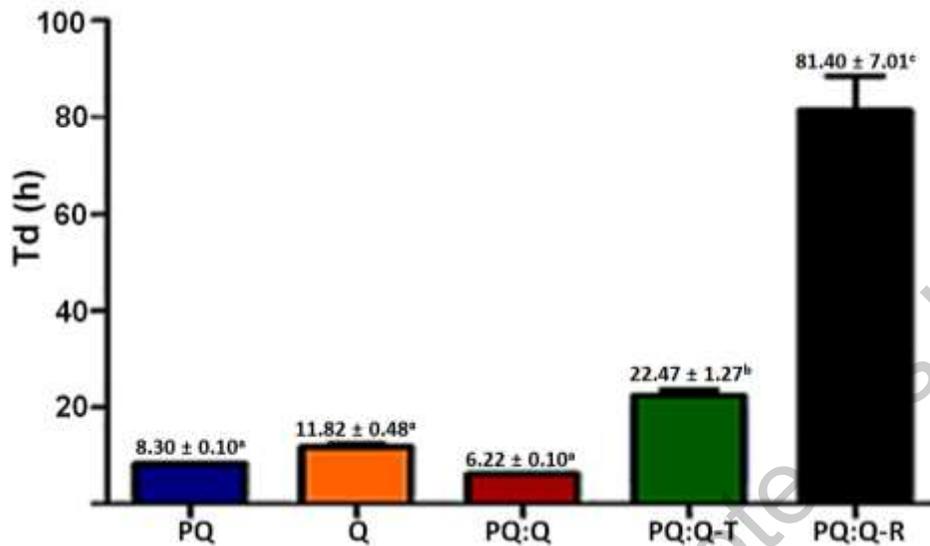


Figura 7. Tiempo de duplicación de *Salmonella* spp. en las soluciones filmogénicas con y sin aceite esencial. Td: tiempo de duplicación; PQ: proteína de quinua; Q: quitosano; T: aceite esencial de tomillo 0.5 % (v/v) ; R: aceite esencial de romero 1 % (v/v). Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar. <sup>a-d</sup> Indican diferencia significativa  $p < 0.01$

La velocidad específica de crecimiento de *Salmonella* spp. (Figura 8) mostró diferencia significativa en todas las soluciones filmogénicas. El aceite esencial que presentó mayor inhibición fue el de romero con un valor de  $\mu = 0.085 \pm 0.0008 \text{ h}^{-1}$ , sin embargo, la  $\mu$  de ambos aceites fue menor en comparación a la obtenida con las soluciones sin aceites esenciales. La solución con el valor mayor de  $\mu$  fue la de PQ:Q ( $0.1114 \pm 0.001 \text{ h}^{-1}$ ).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede observar que el aceite de tomillo tiene mayor actividad antimicrobiana ante *M. luteus*, mientras que para la inhibición de *Salmonella* spp. el aceite de romero mostró mayor efecto en los parámetros cinéticos, sin embargo, ambos aceites tienen actividad antimicrobiana para ambos microorganismos, tanto en aceite libre, como en las soluciones filmogénicas con los aceites esenciales. El quitosano mostró actividad antimicrobiana para ambos microorganismos, pero menor que la observada con los aceites esenciales.

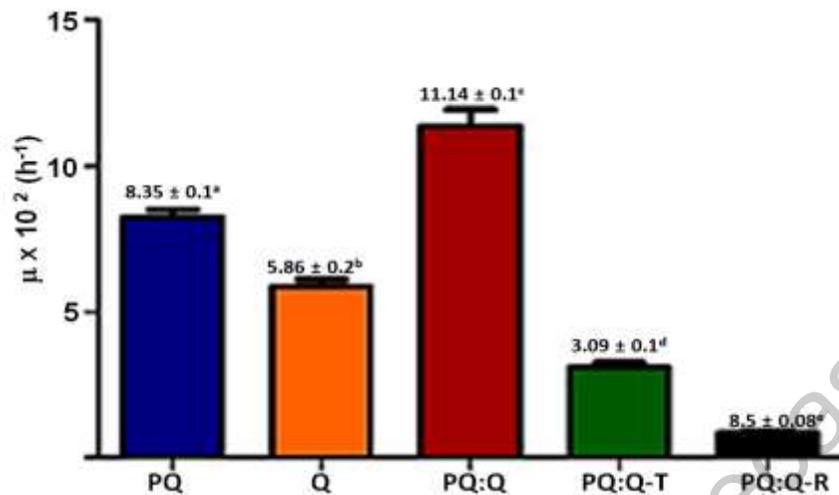


Figura 8. Velocidad específica de crecimiento de *Salmonella* spp.  $\mu$ : Velocidad específica de crecimiento; PQ: proteína de quinua; Q: quitosano; T: aceite esencial de tomillo 0.5 % (v/v) ; R: aceite esencial de romero 1 % (v/v). Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar. <sup>a-e</sup> Indican diferencia significativa  $p < 0.01$

## 5.2 Estabilidad

Para evaluar la estabilidad de las soluciones filmogénicas y las emulsiones, se evaluó tamaño de partícula, potencial Z e índice de polidispersión (IPD). El potencial Z mide la magnitud de la repulsión o atracción electrostática entre las partículas que conforman la emulsión. Los valores de potencial Z fueron evaluados al tiempo 0 y 10 de almacenamiento (Cuadro 1).

Cuadro 1. Potencial Z de las emulsiones al día 0 y 10 de almacenamiento.

Muestra	Potencial Z (mV)	
	Día 0	Día 10
PQ:Q	-47.69 ± 3.19 <sup>ab</sup>	-50.60 ± 4.04 <sup>ab</sup>
PQ:Q – T	-46.86 ± 4.38 <sup>ab</sup>	-52.01 ± 4.04 <sup>ab</sup>
PQ:Q – R	-46.21 ± 3.83 <sup>a</sup>	-54.13 ± 4.73 <sup>b</sup>

PQ: Proteína de quinua; Q: Quitosano; T: aceite esencial de tomillo, R: aceite esencial de romero. Valores con letras iguales entre columnas y en la misma, no presentan diferencia significativa ( $p > 0.01$ )

Los valores de potencial Z obtenidos se encuentran entre -46.21 a -54.13 mV, la adición de los aceites esenciales no presentó diferencia significativa en este parámetro, a los 10 días de almacenamiento se puede observar que existe un aumento en el potencial z de las soluciones, sin embargo al igual que en el tiempo 0, no se observa diferencia significativa entre las soluciones. En el tiempo 0, la solución PQ:Q presentó el valor más alto de potencial z ( $-47.69 \pm 3.19$  mV), mientras que para el día 10 fue para la emulsión con romero ( $54.13 \pm 4.73$  mV), que aumentó significativamente respecto al día 0. En el Cuadro 3 se presentan los valores de tamaño de partícula e índice de polidispersión de las emulsiones. El tamaño de partícula presentó dos poblaciones principales para cada una de las muestras, la intensidad de tamaño de partícula es un valor que proporciona el equipo indicando el tamaño de cada población, de los resultados obtenidos se observa que la población que representa a los aglomerados conforma la mayor parte de la emulsión en comparación a las partículas aisladas.

Cuadro 2. Tamaño de partícula e índice de polidispersión.

Muestra	Tamaño de partícula promedio (nm)	Intensidad de tamaño de partícula (%)	IPD
PQ:Q	$597.56 \pm 37.59^a$	$89.41 \pm 2.66^a$	$0.51 \pm 0.07^a$
	$97.55 \pm 10.79^b$	$7.28 \pm 0.49^b$	
PQ:Q – T	$677.02 \pm 50.34^c$	$73.35 \pm 4.16^c$	$0.80 \pm 0.04^b$
	$153.58 \pm 13.76^b$	$22.04 \pm 2.60^d$	
PQ:Q – R	$672.98 \pm 35.08^c$	$79.79 \pm 3.74^e$	$0.79 \pm 0.05^b$
	$120.93 \pm 20.96^b$	$16.17 \pm 3.04^d$	

PQ: Proteína de quinua; Q: Quitosano; T: aceite esencial de tomillo, R: aceite esencial de romero.  
Valores con letras iguales en la misma columna, no presentan diferencia significativa ( $p > 0.01$ ).

Al adicionar los aceites esenciales a la solución filmogénica PQ:Q se puede observar un aumento en el tamaño de partícula, para la población de mayor tamaño ( $597.56 \pm 37.59$  nm a  $677.02 \pm 35.08$  nm) hubo diferencia significativa entre la solución

filmogénica PQ:Q y las emulsiones, sin embargo para las de menor tamaño ( $97.55 \pm 10.79$  nm a  $153.58 \pm 13.76$  nm) no hubo diferencia significativa. La adición de los aceites esenciales generó un aumento significativo en el IPD.

### 5.3 Reología

Las propiedades reológicas de las soluciones de PQ:Q, PQ:Q-T y PQ:Q-R se presentan en el Cuadro 3. Las tres soluciones se ajustan al modelo reológico de Casson, con valores de  $R^2$  entre 0.995 y 0.9985, sin presentar diferencia significativa entre las muestras. El límite elástico de las muestras no presentó diferencia estadísticamente significativa, sin embargo, la emulsión elaborada con romero mostró el valor más bajo ( $9.96 \pm 0.24 \times 10^{-3}$  Pa). Otro parámetro reológico evaluado fue la viscosidad aparente, de los resultados se aprecia que no hay diferencia significativa entre la solución PQ:Q con las emulsiones (tomillo y romero). Sin embargo, existe diferencia significativa entre las soluciones con los aceites esenciales, siendo el valor más alto el de la emulsión con romero ( $3.04 \pm 0.002 \times 10^{-3}$  Pa.s).

Cuadro 3. Propiedades reológicas

Muestra	$\sigma_0$ ( $\times 10^3$ Pa)	$\eta$ ( $\times 10^3$ Pa.s)	$R^2$
PQ:Q	$11.23 \pm 1.42^a$	$2.82 \pm 0.15^a$	0.997
PQ:Q -T	$11.51 \pm 0.50^a$	$2.80 \pm 0.02^{ab}$	0.995
PQ:Q - R	$9.96 \pm 0.24^a$	$3.04 \pm 0.002^{ac}$	0.998

$\sigma_0$ : Límite elástico;  $\eta$ : Viscosidad aparente; PQ: Proteína de quinua; Q: Quitosano; T: aceite esencial de tomillo, R: aceite esencial de romero. Valores con letras iguales en la misma columna, no presentan diferencia significativa ( $p > 0.01$ ).

En la Figura 9 se muestran las curvas de viscosidad aparente y esfuerzo de corte de las soluciones filmogénicas. La viscosidad aparente de las soluciones filmogénicas disminuye al aplicar mayor velocidad de corte (Figura 9a), sin embargo, al alcanzar una velocidad aproximadamente de  $20 \text{ s}^{-1}$  la viscosidad comienza a volverse constante. En la Figura 9b se observa que el esfuerzo de corte para las soluciones es directamente proporcional a la velocidad de corte, para ambas

propiedades, no hay existe diferencia significativa entre las muestras.

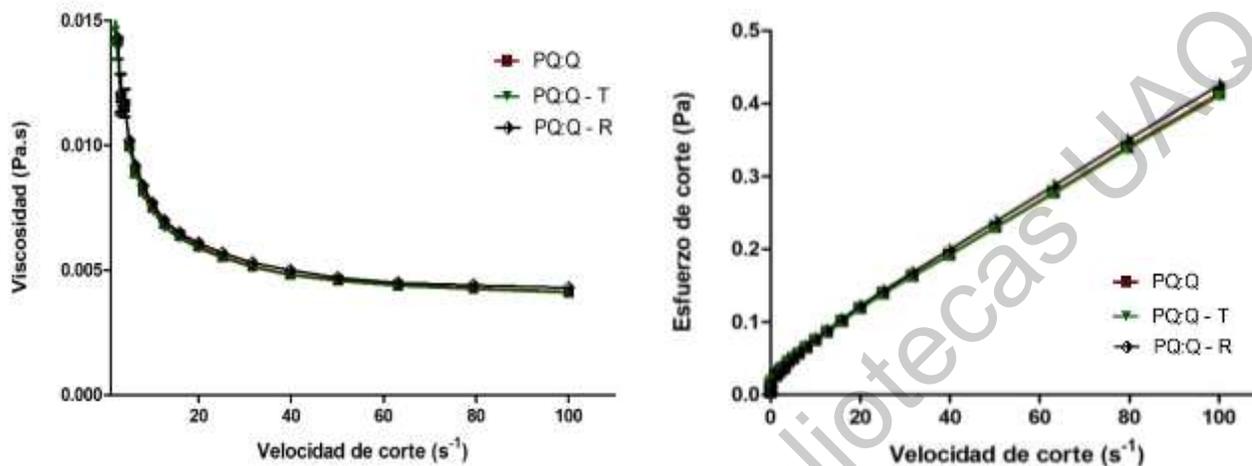


Figura 9. Reología de las soluciones filmogénicas. (a) Viscosidad aparente vs velocidad de corte de las soluciones filmogénicas con y sin aceites esenciales de romero y tomillo; (b) Esfuerzo de corte de las soluciones filmogénicas. PQ: proteína de quinua; Q: quitosano; T: aceite esencial de tomillo; R: aceite esencial de romero. Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar.

#### 5.4 Microscopía de fuerza atómica

En la Figura 10 se observa la topografía de *M. luteus* en la emulsión control y las emulsiones con aceites esenciales. *M. luteus* presenta una morfología de coco (Figura 10a), sin embargo, en presencia de los aceites esenciales de romero (Figura 10b) y tomillo (Figura 10c) *M. luteus* pierde su estructura esférica que lo caracteriza. Se puede observar que el aceite esencial de tomillo tiene un mayor efecto en *M. luteus* al presentar un deterioro total de sus estructura, por otro lado, con el aceite esencial de romero, es posible observar alguna células que conservan la forma esférica.

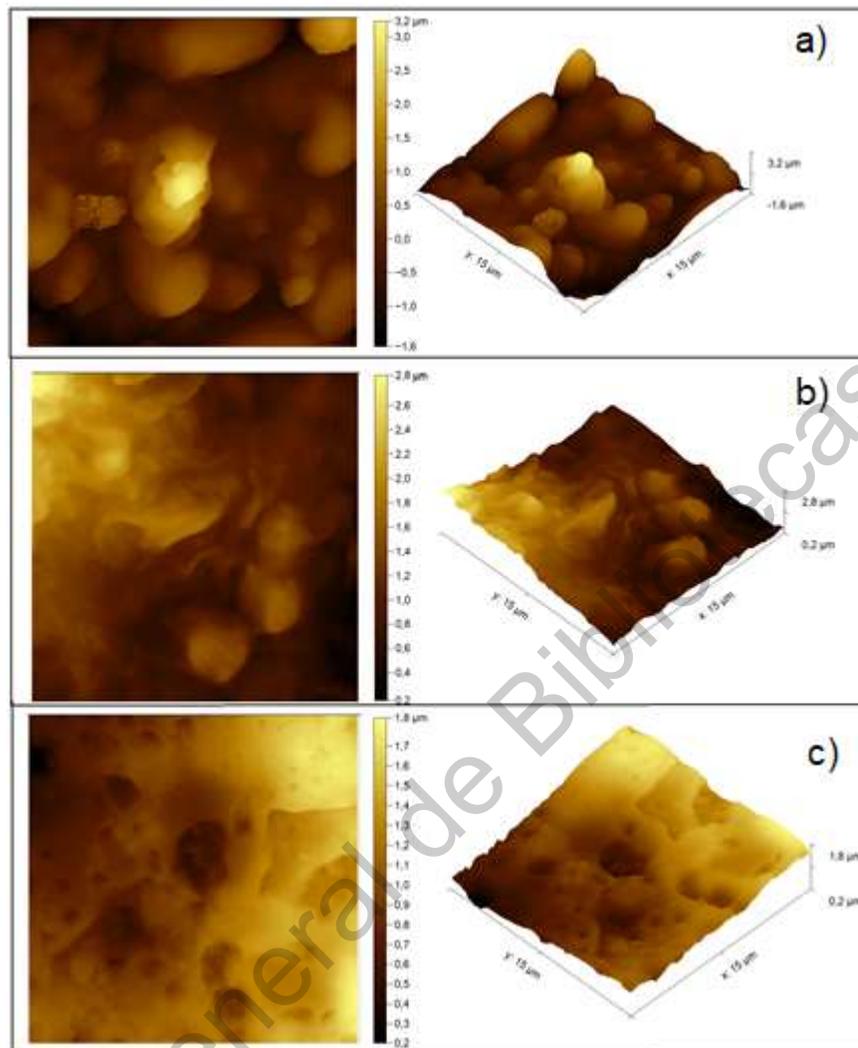


Figura 10. Micrografía de fuerza atómica *Micrococcus luteus* en emulsiones de proteína de quinua-quitosano. a) Control, b) Aceite de romero, c) Aceite de tomillo.

El efecto de los aceites esenciales en *Salmonella* spp. se presenta en la Figura 11. *Salmonella* spp. se caracteriza por poseer una forma de bacilo (Figura 11a), los aceites esenciales de romero (Figura 11b) y tomillo (Figura 11c) tuvieron efecto antimicrobiano ante este microorganismo, presentando ruptura en la pared celular.

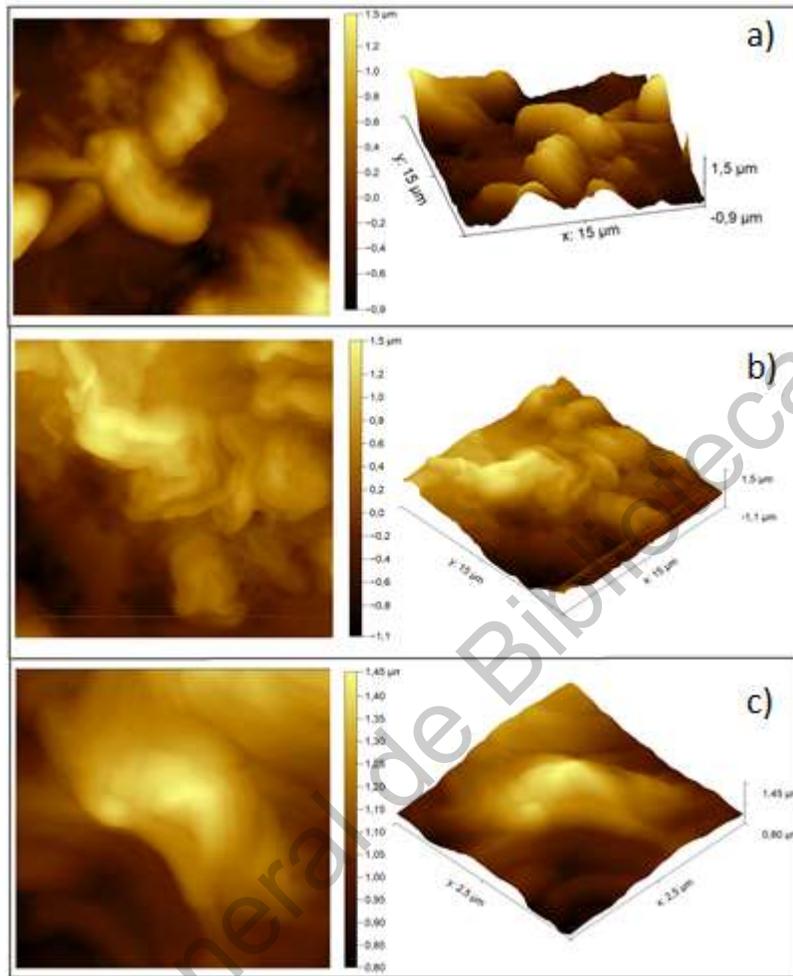


Figura 11. Micrografía de fuerza atómica de *Salmonella* spp. en emulsión de proteína de quinua-quitosano. a) Control, b) Aceite esencial de Romero, c) Aceite esencial de tomillo

### 5.5 Análisis de imagen

Con el fin de evaluar cuantitativamente las imágenes obtenidas por AFM, se evaluó la entropía (E) cuyo parámetro es una medida de la heterogeneidad de las imágenes usando el algoritmo de matriz de co-ocurrencia en escala de grises. Así como la dimensión fractal también denominada como textura fractal mediante el algoritmo Conteo Diferencial de Cajas (SDBC) dicho parámetro se relaciona con el grado de irregularidad que presenta la superficie. En este trabajo los valores de E y DF de las imágenes se utilizaron como un indicativo del crecimiento de los microorganismos.

En la Figura 12a se observa que el valor de entropía de las muestras disminuye en presencia de los aceites esenciales, sin embargo, las muestras que contenían *Salmonella* spp. no presentan diferencia significativa en este parámetro.

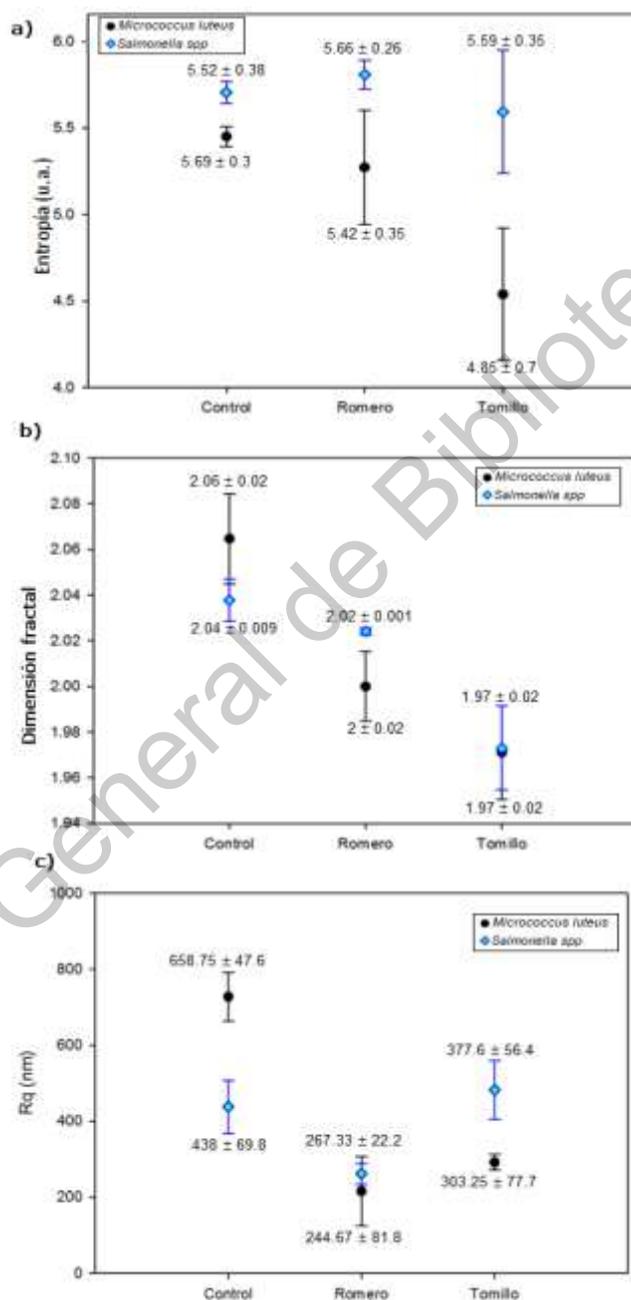


Figura 12. Análisis de imagen de micrografías de fuerza atómica de *Salmonella* spp. y *M. luteus* en emulsión de proteína de quinua-quitosano con y sin aceite esencial. a) Entropía (u.a.: unidades arbitrarias), b) dimensión fractal y c) rugosidad.

La emulsión de *M. luteus* en tomillo reporta el menor valor de entropía (Figura 12a), lo que indica una imagen más homogénea con respecto del control. La disminución de entropía de las muestras con aceites puede ser por el efecto de inhibición del crecimiento de los microorganismos en presencia de los aceites. Lo cual se correlaciona con los datos reportados en el presente trabajo respecto a la inhibición de microorganismos (sección 5.1). Otro parámetro obtenido del análisis de imagen es la dimensión fractal (Figura 12b), la cual disminuye al adicionar los aceites esencial, dicho fenómeno se observa en el valor de rugosidad (Figura 12c) dicho comportamiento puede deberse a la lisis celular causada por los aceites esenciales.

## 6. Discusión

### 6.1 Actividad antimicrobiana de soluciones filmogénicas

La actividad antimicrobiana de las soluciones filmogénicas y sus componentes fue evaluada en una bacteria Gram positiva (*M. luteus*) y una Gram negativa (*Salmonella* spp.), a través de la obtención de sus parámetros cinéticos de crecimiento en las distintas muestras. Como se mencionó anteriormente, la solución de quitosano al 2 % (p/v) inhibió el crecimiento de *M. luteus* y *Salmonella* spp. La inhibición se llevó a cabo debido a que bajo las condiciones en las que se elaboró la solución de quitosano, la molécula posee carga positiva, la cual al interactuar con la pared celular altera su permeabilidad, forma una barrera al oxígeno, inhibe la síntesis de RNAm y proteínas e induce la quelación de nutrientes y metales esenciales (Medina y col., 2019). Otros trabajos reportan que el quitosano muestra un efecto antimicrobiano contra *Micrococcus* sp. a una concentración de 2% (p/v), al igual que la utilizada en este trabajo (Zarayneh y col., 2018). Sin embargo, podemos observar que al combinar el quitosano con la proteína de quinua en la solución filmogénica PQ:Q dicho efecto desaparece. Al contrario, en esta muestra se obtuvieron los menores tiempos de duplicación para ambos microorganismos, lo cual indica que el crecimiento de las bacterias se ve favorecido. Lo anterior se puede deber a que el quitosano se encuentra en una concentración 10 veces menor a la de la solución de Q y a que el pH en la solución de PQ:Q es mayor (pH 11). Estudios demuestran que la actividad antimicrobiana del quitosano se ve afectada inversamente por el pH, teniendo una mayor actividad a valores de pH bajos (Kyoon y col., 2002).

### 6.2 Actividad antimicrobiana de las emulsiones

La CMI obtenida de los EO libres, fue igual para ambos microorganismos ante tomillo 0.5 % (v/v), lo que coincide con lo reportado por estudios previos, donde se demuestra que el aceite esencial de tomillo es un bactericida efectivo contra *Salmonella* a una concentración de 0.25 mg/mL (Cui y col., 2016) y contra bacterias gram positivas (Boskovic y col., 2015). No obstante, podemos notar que aunque la CMI es igual, se obtuvieron diferencias entre los parámetros cinéticos de cada microorganismo ante el mismo EO incorporado a las emulsiones. A pesar de que las

soluciones filmogénicas adicionadas con aceite esencial de tomillo mostraron actividad antimicrobiana contra ambas bacterias, el efecto fue mayor contra *M. luteus* lo que se ve reflejado en un mayor tiempo de duplicación ( $44.54 \pm 1.10$  h) el cual es 1.98 veces mayor al Td de *Salmonella* spp. ( $22.47 \pm 1.27$  h). Hosseini y col. (2009) observaron que el aceite esencial de tomillo presentaba mayor actividad contra bacterias gram positivas que contra gram negativas, la diferencia se debe a las estructuras de la pared celular de las bacterias. Las bacterias Gram positivas tienen paredes celulares que contienen capas gruesas de peptidoglucano (90-95%), mientras que las bacterias Gram negativas tienen paredes con capas delgadas de peptidoglucano (5-10%), polisacáridos y alto contenido de lípidos. Además posee una membrana externa que constituye la superficie externa de la pared (Khorshidian y col., 2018). Algunos estudios han reportado que el quitosano incorporado con EO ha mostrado una mayor actividad antimicrobiana ante bacterias Gram-positivas que ante Gram negativas, ya que la membrana externa de bacterias Gram negativas restringe la difusión de compuestos hidrófobos a través de su cubierta de lipopolisacárido (Yuan y col., 2016). Sin embargo, la efectividad de los EO en presencia de quitosano, depende su composición, estructura y grupos funcionales. En el caso del aceite de romero se observa una mayor inhibición ante *Salmonella* spp. (Td=  $81.04 \pm 7.01$  h) presentando un tiempo de duplicación 3.23 veces mayor que el de *M. luteus* (Td=  $25.67 \pm 1.56$  h).

### 6.3 Estabilidad

El IPD es un número calculado a partir de un ajuste de dos parámetros a los datos de correlación si se obtienen valores de IPD menores a 0.05 se considera una solución altamente monodispersa (homogénea), mientras que valores mayores a 0.7 indican que la muestra tiene una distribución de tamaño de partícula muy amplia (Danaei y col., 2018). Los resultados obtenidos muestran valores de IPD de  $0.5 \pm 0.07$  y  $0.80 \pm 0.05$ , por lo que las soluciones elaboradas son heterogéneas, sin embargo, los aceites esenciales provocan una mayor heterogeneidad.

Se han reportado diversos estudios que indican que la proteína de quinua es soluble a pH alcalinos. Sin embargo, a pH 11 presenta una mayor solubilidad y capacidad de absorción de agua, mayores cantidades de aminoácidos que contienen azufre, treonina y triptófano y una pequeña desnaturalización de proteínas (Dakhili y col., 2019). Las soluciones filmogénicas se elaboraron a pH 11, lo cual favoreció la formación de agregados, esto se ve reflejado en los resultados obtenidos en el tamaño de partícula donde se observan dos poblaciones de tamaños de partícula diferentes el primero con valores cercanos a los 600 nm. Dicha población podría corresponder a la interacción electrostática entre la proteína de quinua y el quitosano, debido a que la distribución de carga superficial afecta las interacciones de proteínas con el solvente y el uno al otro, por lo tanto cuanto más alejado esté el pH del punto isoeléctrico, mayor será la carga neta de la proteína, en este caso negativa, la cual pudo formar los agregados proteicos resultantes por la interacción con los grupos amino protonados del quitosano (Duran y col., 2018). Además la reticulación con TG crea una red espacial reticulada que disminuye los espacios intermoleculares que inhiben la difusión de las moléculas de agua y favorece la formación de los enlaces disulfuro entre la misma proteína, lo que permite la formación de aglomerados (Wu y col., 2017). Mientras que la segunda población, representa las partículas aisladas de la emulsión, presentando el menor tamaño de partícula la solución filmogénica sin aceite esencial ( $97.55 \pm 10.79$  nm). El tamaño de partícula de la solución filmogénica ( $597.56 \pm 37.59$  nm) aumenta al adicionar los aceites esenciales de tomillo ( $677.02 \pm 50.34$  nm) y romero ( $672.98 \pm 35.08$  nm), esto se debe al aumento de interacciones hidrofóbicas entre las gotas de aceite individuales (Yang y col., 2013).

El potencial Zeta es otro parámetro que permite determinar la estabilidad de las soluciones, partículas con valores de potencial Zeta mayores que 30 mV positivos o menores que 30 mV negativos tienen altos grados de estabilidad (Kumar y Dixit, 2017). De los resultados obtenidos se puede observar que las emulsiones son estables, los valores de potencial Z no presentan diferencia significativa al adicionar

los aceites esenciales. Ésto puede ser por la presencia del emulsionante (Tween 80), que al ser un tensoactivo no iónico (posee grupos hidrofílicos y lipofílicos sin carga) permite equilibrar el tamaño y la fuerza de estos grupos opuestos a lo que se denomina adormecimiento hidrofílico-lipofílico. Lo que permite mantener emulsiones estables, aun durante su almacenamiento (Nursakinah y col., 2015). De acuerdo a los valores obtenidos se puede observar que las emulsiones elaboradas son estables al poseer valores negativos mayores a los 30 mV. La carga negativa obtenida en el potencial Z, se adjudica a que la solución de elaboró a pH alcalino, y a pesar de que el quitosano proporciona cargas positivas, en medios con valores de pH mayores a 6 fomenta el aumento del número de especies desprotonadas en la solución y la agregación debido a la generación de enlaces de hidrógeno que involucran a los grupos  $\text{NH}_2$  neutralizados de las cadenas de quitosano (Jagadish y col., 2017). Aunado a esto se han realizado estudios que indican que el uso de Tween como surfactante puede favorecer las cargas eléctricas negativas, las cuales se atribuyen a la presencia de impurezas aniónicas (Guerra-Rosas y col., 2016). La estabilidad de las emulsiones se puede atribuir a la red de proteínas resultante por el entrecruzamiento con TG, que al tener tanto grupos hidrofílicos como hidrofóbicos permite que tanto el agua como el aceite pueden eliminarse de la emulsión sin que ésta se colapse (Hoffmann y Reger, 2014).

#### 6.4 Reología de las emulsiones

Los resultados obtenidos de la reología de las emulsiones se ajustan al modelo reológico de Casson, este tipo de fluido no newtoniano se comporta como un sólido elástico y constituye un modelo de fluido plástico que presenta características de adelgazamiento por cizallamiento, el cual muestra una viscosidad infinita a una velocidad de cizallamiento igual a cero (Animasaun y col., 2016). En el Cuadro 3 se puede observar que la emulsión elaborada con romero presenta el valor más alto de viscosidad aparente ( $3.04 \pm 0.002 \times 10^{-3}$  Pa.s). De acuerdo a lo reportado por (Dapuetto y col., 2019) este aumento en la viscosidad se puede relacionar con la formación de una mayor cantidad de agregados proteicos, ya que esto aumenta las interacciones entre los grupos reactivos de las moléculas de proteína y la capacidad

de atrapar solventes y al mismo tiempo, se ve potenciado por el entrecruzamiento efectuado por la TG. Esto a su vez se relaciona con el tamaño de partícula encontrado, el cual aumentó en presencia de los aceites, indicando un mayor grado de agregación. Un comportamiento contrario se observa en el límite elástico, aunque no hay diferencia significativa entre las tres soluciones, la elaborada con romero presenta el valor más bajo ( $9.96 \pm 0.24 \times 10^{-3}$  Pa). Las proteínas, al igual que los tensoactivos forman monocapas en soluciones acuosas, las cuales pueden tener propiedades elásticas altas generando proteínas que se comportan como gotas pegajosas (Hoffmann y Reger, 2014), cuyas interacciones con el aceite disminuyen dicha elasticidad.

#### 6.5 Microscopía de fuerza atómica

Las emulsiones elaboradas tienen el propósito de ser utilizadas como recubrimientos comestibles aplicados en alimentos, por lo que fue de interés analizar mediante microscopía de fuerza atómica la rugosidad y homogeneidad de las mismas, y así predecir su apariencia sobre un alimento de interés. Previo a la adición de aceites esenciales, las soluciones filmogénicas poseen superficies rugosas y heterogéneas formadas por aglomerados de materia con estructuras que coinciden con la morfología de *M. luteus* y *Salmonella* spp., cuyas formas son esféricas con dimensiones de 0.5-3.5  $\mu\text{m}$  agrupados (Figura 10a) y geometría de barra corta (Figura 11a) respectivamente (Hafedh y col., 2010; Liu y col., 2019), sin embargo, al adicionar los aceites esenciales estas formas se pierden. La hidrofobicidad de los aceites esenciales permite la separación de los lípidos presentes en la membrana celular de las bacterias, alterando su estructura y haciéndolas permeables provocando lisis celular (Tariq y col., 2019), estos resultados confirman lo antes mencionado en la sección 6.2.

#### 6.6 Análisis de imagen

De los resultados obtenidos se puede observar que el valor de DF disminuye en presencia de los aceites esenciales. La dimensión fractal es un concepto matemático en el que un conjunto de escalas múltiples exhibe el mismo patrón repetitivo en cada escala, lo cual puede transferirse al análisis de textura. Este parámetro está

correlacionados con la rugosidad, cuanto mayor es la dimensión fractal, más rugosa es la textura (Cataldo y Ficarra, 2017). Por lo que el aceite esencial generó superficies más lisas en comparación a las muestras sin aceite esencial, la disminución en la rugosidad se de adjudica a la lisis celular ocasionada por los aceites. . Las estructuras características de *M. luteus* y *Salmonella* spp. son las que proporcionan valores altos de DF y rugosidad, y baja entropía. La entropía es la aleatoriedad o el grado de desorden que presenta la imagen. El valor de la entropía es mayor cuando todos los elementos de la matriz de co-ocurrencia son iguales y pequeños cuando los elementos son diferentes (Reis et al., 2018), por lo que la inhibición de crecimiento microbiano además genera superficies más homogéneas.

## 7. Conclusiones

La adición de los aceites esenciales a la solución filmogénica mejoró la actividad antimicrobiana contra *M. luteus* y *Salmonella* spp. a una concentración de 0.5% (v/v) para el EO de tomillo y 1% (v/v) para el de romero. Sin embargo, el EO de romero mostró mayor efecto contra *Salmonella* spp., mientras el de tomillo tuvo mayor actividad contra *M. luteus*.

Las solución filmogénica y las emulsiones de PQ:Q con aceites esenciales son emulsiones estables durante su almacenamiento (10 días) y heterogéneas por la formación de agregados. La adición de los aceites esenciales generó un aumento significativo en la dispersión de la distribución del tamaño de las partículas, mostrándose dos poblaciones mayoritarias.

La reología de las emulsiones se ajustan al modelo reológico de Casson, lo que las describe como un fluido no newtoniano que se comporta como un sólido elástico. La formación de agregados proteicos permitió mayor interacción entre la proteína y solventes, lo cual aumentó la viscosidad aparente de la PQ:Q -R respecto al control.

A pesar de que las emulsiones obtenidas son heterogéneas, son estables durante su almacenamiento debido al tipo de fluido no newtoniano al que pertenece, ya que al comportarse como un sólido elástico tiene un menor movimiento de moléculas que dan lugar a una mayor estabilidad. La reducción de dicho movimiento molecular también puede ser favorecido por la acción de la transglutaminasa.

Las estructuras características de *M. luteus* y *Salmonella* spp. son las que proporcionan valores altos de DF y rugosidad, y baja entropía, por lo que la inhibición de crecimiento microbiano generó superficies más homogéneas.

## 8. Referencias

**Abasi S**, Minaei S, Jamshidi B. Dedicated non-destructive devices for food quality measurement: a review. *Trends Food Sci Technol.* **2018**;75:115-123.

**Abugoch J**. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): composition, chemistry, nutritional, and functional properties. *Adv Food Nutr Res.* **2014**;58:1-31.

**Ahmed I**, Hong L, Zou L, Brody A L, Li Z, Qazi I M, Pavase R. A comprehensive review on the application of active packaging technologies to muscle foods. *Food Control.* **2017**;82:163-178.

**Amirdivani S**, Khorshidian N, Fidelis M, Granato D, Reza M., Mohammadi M, Khoshtinat K, Mohammad A. Effects of transglutaminase on health properties of food products. *J Food Sci.* **2018**;22:74-80.

**Anchundia K**, Santacruz S, Coloma J. Caracterización física de películas comestibles a base de cáscara de plátano (*Musa Paradisiacaparadisiaca*). *Rev Chil Nutr.* **2016**;43(4):394-399.

**Ancos B**, González-Peña D, Colina-Coca C, Sánchez-Moreno C. Uso de películas/recubrimientos comestibles en los productos de iv y v gama. *Rev Iber Tecnol Poscosecha.* **2015**;16(1):8-17.

**Animasaun IL**, Adebile E A, Fagbade AI. Casson fluid flow with variable thermo-physical property along exponentially stretching sheet with suction and exponentially decaying internal heat generation using the homotopy analysis method. *J Nigerian Math Soc.* **2016**;35:1-17.

**Artiga-Artigas M**, Acevedo-Fani A, Martín-Belloso O. Improving the shelf life of low-fat cut cheese using nanoemulsion-based edible coatings containing oregano essential oil and mandarin fiber. *Food Control.* **2017**;76:1-12.

**Arzate-Vázquez I**, Chanona-Pérez JJ, Calderón-Domínguez G, Terres-Rojas E, Garibay-Febles V, Martínez-Rivas A, Gutiérrez-López GF. Microstructural characterization of chitosan and alginate films by microscopy techniques and texture image analysis. *Carbohydr Polym.* **2012**;87:289–299.

**Arzate-Vázquez I**, Chanona-Pérez JJ, Perea-Flores MJ, Calderón-Domínguez G, Moreno-Armendáriz MA, Calvo H, Godoy-Calderón S, Quevedo R, Gutiérrez-López G. Image processing applied to classification of avocado variety hass (*Persea*

*americana* Mill.) During the Ripening Process. Food and Bioprocess Technology. **2011**;4:1307–1313.

**Asbahani** A, Miladi K, Badri W, Sala M, Addi EHA, Casabianca H, El-Mousadik A, Hartmann D, Jilale A, Renaud FNR, Elaissari A. Essential oils: from extraction to encapsulation. Int J Pharm. **2015**;483: 220–243.

**Avila-Ruiz** G, Xiao W, van-Boekel M, Minor M, Stieger M. Effect of extraction pH on heat-induced aggregation, gelation and microstructure of protein isolate from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). Food Chem. **2016**;209:203-210.

**Azeredo** C, Waldron W. Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact: a review. Trends Food Sci Technol. **2016**; 52:52-55.

**Barkhordari** MR, Fathi M. Production and characterization of chitin nanocrystals from prawn shell and their application for stabilization of pickering emulsions. Food Hydrocoll. **2018**;82:338-345.

**Benjemaa** M, Neves MA, Falleh H, Isoda H, Ksouri R, Nakajima M. Nanoencapsulation of thymus *Thymus capitatus* essential oil: formulation process, physical stability characterization and antibacterial efficiency monitoring. Ind Crops Prod. **2018**;113:414–421.

**Berk**, Z. Food packaging. En: Food process engineering and technology. 3a edición. London: Academic Press, **2018**: 625-641.

**Boskovic** M, Zdravkovic N, Ivanovic J, Janjic J, Djordjevic J, Starcevic M, Baltic MZ. Antimicrobial activity of thyme (*Tymus vulgaris*) and oregano (*Origanum vulgare*) essential oils against some food-borne microorganisms. Procedia Food Sci. **2015**;5:18–21.

**Cataldo** SD, Ficarra, E. Mining textural knowledge in biological images: applications, methods and trends. Computational and Structural Biotechnol J. **2017**;15:56-67.

**Caro** N, Medina E, Díaz, López L, Abugoch L, Tapia C. Novel active packaging based on films of chitosan and chitosan/quinoa protein printed with chitosan-tripolyphosphate-thymol nanoparticles via thermal ink-jet printing. Food Hydrocoll. **2016**;52:520-532.

**Cohen-Bouhacina** T. Detrimental impact of silica nanoparticles on the nanomechanical properties of *Escherichia coli*, studied by AFM. J Colloid Interface

Sci. **2018**;529:53-64.

**Costa** M J, Maciel L C, Texeira J A, Vicente A A, Cerqueira M A. Use of edible films and coatings in cheese preservation: opportunities and challenges. *Food Res Int.* **2018**;107:84-92.

**Cui** H., Ma C., Li C, Lin L. Enhancing the antibacterial activity of thyme oil against *Salmonella* on eggshell by plasma-assisted process. *Food Control.* **2016**;70:183–190.

**Danaei** M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh-Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, Khorasani S, Mozafari MR. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics.* **2018**;10:57.

**Dapueto** N, Troncoso E, Mella C, Zúñiga RN. The effect of denaturation degree of protein on the microstructure, rheology and physical stability of oil-in-water (O/W) emulsions stabilized by whey protein isolate. *J Food Eng.* **2019**;263:253-261.

**Dehghani** S, Vili-Hosseini S, Regenstein J M. Edible films and coatings in seafood preservation: a review. *Food Chem.* **2018**;240:505-513.

**Dias-Gonçalves** N, Lima-Pena F, Sartoratto A, Derlamelina C, Teixeira-Duarte MC, Costa-Antunes AE, Prata AS. Encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil used as a natural preservative in bakery product. *Food Res Int.* 2017;96:154–160.

**Donsi** F, Ferrari G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *J Biotechnol.* **2016**;233:106-120.

**Drapala** K P, Mulvihill D M, O'Mahony J A. A review of the analytical approaches used for studying the structure, interactions and stability of emulsions in nutritional beverage systems. *Food Struct.* **2018**;16:27–42.

**Duran** NM, Galante M, Spelzini D, Boeris V. The effect of carrageenan on the acid-induced aggregation and gelation conditions of quinoa proteins. *Food Res Int.* **2018**;107:683-690.

**Elsabee** M, Entsar A. Chitosan based edible films and coatings: a review. *Mater Sci Eng.* **2013**;33:1819-1841.

**Elsohaimy** SA, Refaay TM, Zaytoun M A. Physicochemical and functional properties of quinoa protein isolate. *Ann Agric Sci.* **2015**;60(2):297-305.

**Enujiugha** V, Oyinloye A. Protein-lipid interactions and the formation of edible films and coatings. Elsevier: Encyclopedia of Food Chemistry, **2018**:478-482.

**Escamilla-García** M, Calderón-Domínguez G, Chanona-Pérez JJ, Mendoza-Madrigal AG, Di Pierro P, García-Almendárez BE, Amaro-Reyes A., Regalado-González C. Physical, structural, barrier, and antifungal characterization of chitosan–zein edible films with added essential oils. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**;18(11):2370.

FAOSTAT. Base de datos estadísticos de la FAO, 2015 [Consultado 2018 mayo 12].

Disponible en: <http://faostat.fao.org/>

**Escamilla-García** M, Delgado-Sánchez LF, Ríos-Romo RA, García-Almendárez BE, Calderón-Domínguez G, Méndez-Méndez JV, Amaro-Reyes A, Di Pierro P, Regalado-González C. Effect of transglutaminase cross-linking in protein isolates from a mixture of two quinoa varieties with chitosan on the physicochemical properties of edible films. *Coatings.* **2019**;9:1-18.

**Fernández-Pan** I, Carrión-Granda X, Maté J I. Antimicrobial efficiency of edible coatings on the preservation of chicken breast fillets. *Food control.* **2014**;36(1):69-75.

**Fernández-Valdés** D, Bautista-Baños S, Fernández-Valdez D, Ocampo-Ramírez A, García-Pereira A, Falcón-Rodríguez A. Películas y recubrimientos comestibles: una alternativa favorable en la conservación poscosecha de frutas y hortalizas. *Rev Cie Téc Agr.* **2015**;24(3):50-61.

**Garavand** F, Rouhi M, Razavi H, Cacciotti I, Mohammadi R. Improving the integrity of natural biopolymer films used in food packaging by crosslinking approach: a review. *Int J Biol Macromol.* **2017**;104:687-707.

**Guerra-Rosas** MI, Morales-Castro J, Ochoa-Martínez LA, Salvia-Trujillo L, Martín-Belloso O. Long-term stability of food-grade nanoemulsions from high methoxyl pectin containing essential oils. *Food Hydrocoll.* **2016**;52:438-446.

**Grande-Tovar** CD, Chaves-Lopez C, Serio A, Rossi C, Paparella A, Chitosan coatings enriched with essential oils: effects on fungi involved in fruit decay and mechanisms of action. *Trends Food Sci Technol.* **2018**;78:61-71.

**Guo** M, Yadavb MP, Jin TZ. Antimicrobial edible coatings and films from microemulsions and their food applications. *Int J Food Microbiol.* **2017**;263:9-16.

**Gurung** N, Ray S, Bose S, Rai V. A Broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *Bio Med Res Int.* **2013**;329:1-18.

**Hafedh** H, Fethi BA, Mejdi S, Emira N, Amina B. Effect of *Mentha longifolia* L. ssp

longifolia essential oil on the morphology of four pathogenic bacteria visualized by atomic force microscopy. *African Journal of Microbiology Research*. **2010**;4:1122–1127.

**Hassan B**, Shahid-Chatha S A, Hussain A, Mahmood-Zia K, Akhtar N. Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: a review. *Int J Biol Macromol*. **2018**;109:1095-1107.

**Hoffmann H**, Reger M. Emulsions with unique properties from proteins as emulsifiers. *Adv Colloid Interfac*. **2014**;205:94-104.

**Hosseini MH**, Razavi SH, Mousavi MA. Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils. *J Food Process Pres*. **2009**;33:727–743.

**Hu YT**, Ting Y, Hu JY, Hsieh SC. Techniques and methods to study functional characteristics of emulsion systems. *J Food Drug Anal*. **2017**;25:16–26.

Jiménez IP. Elaboración de productos vegetales. INAV0109. [monografía en internet]. Antequera: IC Editorial. 2013 [consultado 2018 mayo 22]. Disponible en: [https://books.google.com.mx/books?id=UTX4AwAAQBAJ&pg=PT23&dq=metodos de+conservacion+de+alimentos+2014&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiC5sLpmZrbAhVBSq0KHdJfDWQQ6AEIMzAC#v=onepage&q=metodos%20de%20conservacion%20de%20alimentos%202014&f=true](https://books.google.com.mx/books?id=UTX4AwAAQBAJ&pg=PT23&dq=metodos+de+conservacion+de+alimentos+2014&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiC5sLpmZrbAhVBSq0KHdJfDWQQ6AEIMzAC#v=onepage&q=metodos%20de%20conservacion%20de%20alimentos%202014&f=true)

**Jost V**, Kobsik K, Schmid M, Noller K. Influence of plasticizer on the barrier on the barrier, mechanical and grease resistance properties of alginate cast films. *Carbohydr Polym*. **2014**;110:309–319.

**Khorshidian N**, Yousefi M, Khanniri E, Mortazavian AM. Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. *Innov Food Sci Emerg Technol*. **2018**;45:62-72.

**Kumar A**, Dixit CK. Methods for characterization of nanoparticles. En *Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids*, Ed. Woodhead Publishing, **2017**;43-58.

**Kyoon-No H**, Young-Park Na, Ho-Lee S, Meyers S. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Biol Macromol*. **2002**;74:65-72.

**Lauriano-Souza** VG, Pires JRA, Vieira ÉT, Coelho IM, Duarte MP, Fernando AL. Activity of chitosan-montmorillonite bionanocomposites incorporated with rosemary essential oil: from in vitro assays to application in fresh poultry meat. *Food Hydrocoll.* **2019**;89:241-252.

**Li** Q, Wang Z, Dai C, Wang Y, Chen W, Ju X, He R. Physical stability and microstructure of rapeseed protein isolate/gum Arabic stabilized emulsions at alkaline pH. *Food Hydrocoll.* **2019**;88:50-57.

**Li** T, Li J, Hu W, Li X. Quality enhancement in refrigerated red drum (*Sciaenopsocellatus*) fillets using chitosan coatings containing natural preservatives. *Food Chem.* **2013**;138:821-826.

**Li** Y, Wu C, Wu T, Wang L, Chen S, Ding T, Hu Y. Preparation and characterization of citrus essential oils loaded in chitosan microcapsules by using different emulsifiers. *J Food Eng.* **2018**;217:108-114.

**Liu** M, Zhang Y, Yu C, Cao S. Preparation and structural analysis of chitosan films with and without sorbitol. *Food Hydrocoll.* **2013**;33(2):186-191.

**Liu** Y, Mollaeian K, Ren J. Finite element modeling of living cells for AFM indentation-based biomechanical characterization. *Micron.* **2019**;116:108-115.

**Ma** Z, Garrido-Maestu A, Casey-Jeong K. Application, mode of action and in vivo activity of chitosan and its micro- and nanoparticles as antimicrobial agents: a review. *Carbohydr Polym.* **2017**;176:257–265.

**Majid** I, Ahmad-Nayik G, Mohammad-Dar, S, Nanda V. Novel food packaging technologies: innovations and future prospective. *J Saudi Soc Agric Sci.* **2018**;17(4):454-462.

**Malhotra** B, Keshwani A, Kharkwal H. Antimicrobial food packaging: potential and pitfalls. *Front Microbiol.* **2015**;6(611):1–9.

**Mathelié-Guinlet** M, Grauby-Heywang C, Martin A, Février H, Moroté F, Vilquin A, Béven L, Delville MH, Cohen-Bouhacina T. Detrimental impact of silica nanoparticles on the nanomechanical properties of *Escherichia coli*, studied by AFM. *J Colloid Interface Sci.* **2018**;529:53-64.

**Mathelié-Guinlet** M, Grauby-Heywang C, Martin A, Février H, Moroté F, Vilquin A, Ruiz G A, Xiao W, van Boekel M, Minor M, Stieger M. Effect of extraction pH on heat-

induced aggregation, gelation and microstructure of protein isolate from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). Food Chem. **2016**;209:203-210.

**Medina E**, Caro N, Abugoch L, Gamboa A, Díaz-Dosque M, Tapia C. Chitosan thymol nanoparticles improve the antimicrobial effect and the water vapour barrier of chitosan-quinoa protein films. J Food Eng. **2019**;240:191–198.

**Melina-Guerreiro T**, Noin-deOliveira D, Rodrigues-Melo C F O, Oliveira-Lima E, Ramos-Catharino R. Migration from plastic packaging into meat. Food Res Int. **2018**;109:320-324.

**Mendoza F**, Dejmek P, Aguilera J. Colour and image texture analysis in classification of commercial potato chips. Food Res Int. **2007**;40:1146–1154.

**Mohsenabadi N**, Rajaei A, Tabatabaei M, Mohsenifar A. Physical and antimicrobial properties of starch-carboxy methyl cellulose film containing rosemary essential oils encapsulated in chitosan nanogel. Int J Biol. Macromol. **2018**;112:148–155.

**Musumeci T**, Puglisi G, Antimicrobial agents. En: Drug-biomembrane interaction studies: the application of calorimetric techniques. Cambridge: Woodhead Publishing Series in Biomedicine, **2013**: 305-333.

**Niu F**, Han B, Fan J, Kou M, Zhang B, Feng Z J, Pan W, Zhou W. Characterization of structure and stability of emulsions stabilized with cellulose macro/nano particles. Carbohydr Polym. **2018**;199:314–319.

**Okoh OO**, Sadimenko AP, Afolayan AJ. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. Food Chem. **2010**;120(1):308–312.

**Olivares-Marin IK**, González-Hernández JC, Regalado-Gonzalez C, Madrigal-Perez LA. *Saccharomyces cerevisiae* exponential growth kinetics in batch culture to analyze respiratory and fermentative metabolism. JoVE. **2018**;139:1-10.

**Oyeneyin B**. Integrated and Management for effective hydrocarbon flow assurance. En Developments in petroleum science. Oxford: John Cubitt, **2015**:2-266.

**Pantic I**, Dacic S, Brkic P, Lavrnja I, Jovanovic T, Pantic S, Pekovic S. Discriminatory ability of fractal and grey level co-occurrence matrix methods in structural analysis of hippocampus layers. J Theor Biol. **2015**;370:151-156.

**Quinzio C**, Ayunta C, López-Mishima, B, Iturriaga L. Stability and rheology properties

of oil-in-water emulsions prepared with mucilage extracted from *Opuntia ficus-indica* (L). Miller. Food Hydrocoll. **2018**;84:154–165.

**Reis** MM, Beers RV, Al-Sarayreh M, Shorten P, Yan WQ, Saeys W, Klette R, Craigie C. Chemometrics and hyperspectral imaging applied to assessment of chemical, textural and structural characteristics of meat. Meat Sci. **2018**;144:100-109.

**Rizzo** V, Amoroso L, Licciardello F, Mazzaglia A, Muratore G, Restuccia C, Lombardo S, Pandino G, Strano G, Mauromicale G. The effect of sous vide packaging with rosemary essential oil on storage quality of fresh-cut potato. LWT. **2018**;94:111–118.

**Robledo** N, Vera P, López L, Yazdani-Pedram M, Tapia C, Abugoch L. Thymol nanoemulsions incorporated in quinoa protein/chitosan edible films; antifungal effect in cherry tomatoes. Food Chem. **2018**;246:211-219.

**Rodríguez** L, Cobos A, Díaz O. Effects of microbial transglutaminase added edible coatings based on heated or ultrasound-treated whey proteins in physical and chemical parameters of frozen Atlantic salmon (*Salmo salar*). J Food Eng. **2013**;119:433-438.

**Sadekuzzaman** M, Rahaman-Mizan M F, Kim HS, Yang S, Ha SD. Activity of thyme and tea tree essential oils against selected foodborne pathogens in biofilms on abiotic surfaces. LWT. **2018**;89:134–139.

**Sales** de Almeida W, Lima SG, Medeiros-Barreto H, Sousa Andrade LM, Fonseca L, Sobrinho CA, Beserra-Santos AR, Sanches-Muratori MC. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia lasiocalycina* cham. (verbenaceae). Ind Crops Prod. **2018**;125:236–240.

**Sebastian-V** B, Unnikrishnan A, Balakrishnan K. Gray level co-occurrence matrices: generalisation and some new features. IJCSEIT. **2012**;2:151-157.

**Siang-Ying** C, Be-Jen W, Yih-Ming W. Antioxidant and antimicrobial edible zein/chitosan composite films fabricated by incorporation of phenolic compounds and dicarboxylic acids. LWT-Food Sci Techol. **2015**;63:115-121.

**Sotelo-Boyás** M, Correa-Pacheco Z, Bautista-Baños S, Gómez-Gómez Y. Release study and inhibitory activity of thyme essential oil-loaded chitosan nanoparticles and nanocapsules against foodborne bacteria. Int J Biol Macromol. **2017**;103:409–414.

**Speight** J. Introduction into the environment. En: Enviromental organic chemistry for

engineers. Oxford: Butterworth-Heinemann, **2017**:263-303.

**Szczepańska** N, Kudlak B, Namieśnik J. Recent advances in assessing xenobiotics migrating from packaging material. *Anal Chim Acta*. **2018**;1023:1-21.

**Talavera-Martínez** L, Bibiloni P, González-Hidalgo M. Computational texture features of dermoscopic images and their link to the descriptive terminology: a survey. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. **2019**;182:1-19.

**Tariq** S, Wani S, Rasool W, Shafi K, Bhat MA, Prabhakar A, Shalla AH, Rather MA. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microb Pathog*. **2019**;134:103580.

**Tavernier** I, Wijaya W, Van der Meeren P, Dewettinck K, Patel A R. Food-grade particles for emulsion stabilization. *Trends Food Sci Technol*. **2016**;50:159–174.

**Thakur** R, Pristijono P, Bowyer M, Singh S, Scarlett C J, Stathopoulos S, Vuong Q V. A starch edible surface coating delays banana fruit ripening. *LWT*. **2019**;100:341-347.

**Turasan** H, Sahin S, Sumnu G. Encapsulation of rosemary essential oil. *LWT*. **2015**;64(1):112–119.

**Vitanza** L, Maccelli A, Marazzato M, Scazzocchio F, Comanduccia A, Fornarini S, Crestoni ME, Filippi A, Frascchetti C, Rinaldi F, Goldonia MAP, Contea MP, Ammendolia MG, Longhi C. *Satureja montana* L. essential oil and its antimicrobial activity alone or in combination with gentamicin. *Microb Pathogenesis*. **2019**;126:323-331.

**Wang** D, Mao L, Dai L, Yuan F, Gao Y. Characterization of chitosan-ferulic acid conjugates and their application in the design of  $\beta$ -carotene bilayer emulsions with propylene glycol alginate. *Food Hydrocoll*. **2018**;80:281–291.

**Wu** X, Liu Y, Liu A, Wang W. Improved thermal-stability and mechanical properties of type I collagen by crosslinking with casein, keratin and soy protein isolate using transglutaminase. *Int J Biol Macromol*. 2017;98:292-301.

**Xu** T, Gao CC, Yang Y, Shen X, Huang M, Liu S, Tang X. Retention and release properties of cinnamon essential oil in antimicrobial films based on chitosan and gum arabic. *Food Hydrocoll*. **2018**;84:84-92.

**Yang** M, Liu F, Tang C. Properties and microstructure of transglutaminase-set soy

protein-stabilized emulsion gels. *Food Res Int.* **2013**;52:409-418.

**Youssef** AM, Assem FM, Abdel-Aziz ME, Elaaser M, Ibrahim OA, Mahmoud M, Abd El-Salam MH. Development of bionanocomposite materials and its use in coating of Ras cheese. *Food Chem.* **2019**;270:467-47.

**Yuan** G, Chen X, Li D. Chitosan films and coatings containing essential oils: the antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems. *Food Res Int.* **2016**;89:117–128.

**Zaletel** I, T. Milošević N, Todorović V, Kovačević-Filipović M, Puškaš N. Fractal and gray level co-occurrence matrix texture analysis of senescent and non-senescent deciduous teeth stem cells: a pilot study. *FGNAMB.* **2016**;2:1-6.

**Zarayneh** S, Akhavan-Sepahi A., Jonoobi M, Rasouli H. Comparative antibacterial effects of cellulose nanofiber, chitosan nanofiber, chitosan/cellulose combination and chitosan alone against bacterial contamination of Iranian banknotes. *Int J Biol Macromol.* **2018**;118:1045–1054.

**Zhang** J, Reineccius GA. Factors controlling the turbidity of submicron emulsions stabilized by food biopolymers and natural surfactant. *LWT.* **2016**;71:162-168.

**Zhao** X, Liu F, Ma C, Yuan F, Gao Y. Effect of carrier oils on the physicochemical properties of orange oil beverage emulsions. *Food Res Int.* **2015**;74:260-268.

**Zhang** Y, Li D, Yang N, Jin Z, Xu X. Comparison of dextran molecular weight on wheat bread quality and their performance in dough rheology and starch retrogradation. *LWT.* **2018**;98:39–45.