



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO EN INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

**“DISEÑO DE UN RECUBRIMIENTO ACTIVO COMESTIBLE REFORZADO CON
PARTÍCULAS DE SÍLICE Y SU APLICACIÓN EN QUESO PANELA”**

TESIS

Presenta:

Luis Fernando Ríos de Benito

Dirigido por:

Dr. Carlos Regalado González

Co-dirigido por:

Dr. Prospero Di Pierro

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
2020



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

DISEÑO DE UN RECUBRIMIENTO ACTIVO COMESTIBLE REFORZADO CON PARTÍCULAS DE SÍLICE Y SU APLICACIÓN EN QUESO PANELA

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Presenta:

Luis Fernando Ríos de Benito

Dirigido por:

Carlos Regalado González

Co-dirigido por:

Dr. Prospero Di Pierro

Dr. Carlos Regalado González
Presidente

Dr. Prospero Di Pierro
Co-Director

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Secretario

Dra. Teresita Arredondo Ochoa
Vocal

Dra. Monserrat Escamilla García
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Octubre 2020
México

Nota de no plagio, declaración del estudiante.

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE: Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.



RIOS DE BENITO LUIS FERNANDO

RESUMEN

En México, el queso Panela se comercializa en fresco y considerándolo en conjunto con los de alta humedad su consumo nacional es del 54%. Debido a su alto contenido de humedad y nutrientes, es propenso a contaminación microbiana, la cual puede ser controlada mediante el uso de los recubrimientos activos comestibles. Los aceites esenciales son una alternativa natural a los aditivos sintéticos para funcionar como agentes antioxidantes y antimicrobianos. Los compuestos activos de los aceites esenciales encapsulados pueden ser liberados de manera controlada, otorgando simultáneamente un bajo efecto organoléptico en los alimentos. El uso de partículas de sílice ha sido estudiado recientemente como método de encapsulación de agentes bioactivos. El objetivo de este trabajo fue diseñar y caracterizar un recubrimiento comestible activo (RC) usando una mezcla de caseinato de sodio (CS) y quitosano (QU), reforzado con partículas de sílice mesoporosas (SM) adicionadas con aceite esencial de orégano para lograr un efecto inhibitorio contra microorganismos deterioradores y patógenos que pueden tener presencia en quesos frescos. Se usó QU con 90% de desacetilación, las SM se produjeron *in situ*, mientras que el AEO se obtuvo por hidrodestilación. Se empleó un diseño factorial 2^3 utilizando como factores y niveles CS:QU (4:1 y 8:1, p/p), volumen de suspensión (25 y 50 mL) y SM (presencia o ausencia). Se agregó glicerol al 40% (p/p, en base al CS) a todas las suspensiones filmogénicas, a las cuales se les determinó el tamaño de partícula, índice de polidispersidad, potencial ζ , solubilidad y las propiedades de barrera a gases de las películas resultantes. El efecto antimicrobiano se probó contra *Salmonella* Saintpaul y *Listeria innocua*. Resultados. La superficie de quesos panela se recubrió con la mezcla que resultó con mejores propiedades: CS:QU (8:1 p/p; 50 mL), y se almacenaron a $5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 d. Esta mezcla mostró un tamaño de partícula de $764.8 \pm 23.30 \text{ nm}$ y un índice de polidispersión de 0.5, con potencial ζ de $30.93 \pm 1.07 \text{ mV}$. La adición de AEO contenido en las partículas de SM a las películas de CS:QU (8:1 p/p) mostró un halo de inhibición contra *L. innocua* y *S. Saintpaul*. El uso de SM produjo un aumento de permeabilidad al O_2 , y disminución en la del CO_2 y vapor de agua. Después de 15 d, el % (p/p) de ácido láctico del queso control aumentó a 1.4 ± 0.1 mientras que para el recubierto fue de 0.82 ± 0.12 . El pH y % de humedad disminuyeron a 5.70 ± 0.02 y 19.28 ± 0.41 para el queso sin recubrimiento, 6.26 ± 0.2 y 38.63 ± 0.42 para el queso con recubrimiento. Conclusión. Los recubrimientos de CS:Q con SM conteniendo AEO, podrían ser una alternativa para aumentar el tiempo de vida de anaquel del queso panela

Palabras clave: Recubrimiento comestible, Caseinato de sodio, Quitosano, Aceite esencial de orégano, Queso panela

SUMARY

In Mexico, panela cheese is marketed fresh and, considering it together with those with high humidity, its national consumption is 54%. Due to its high moisture and nutrient content, it is prone to microbial contamination, which can be controlled through the use of edible active coatings. Essential oils are a natural alternative to synthetic additives to function as antioxidant and antimicrobial agents. The active compounds of encapsulated essential oils can be released in a controlled manner, simultaneously providing a low organoleptic effect in food. The use of silica particles has recently been studied as a method of encapsulation of bioactive agents. The objective of this work was to design and characterize an active edible coating (RC) using a mixture of sodium caseinate (CS) and chitosan (QU), reinforced with mesoporous silica (SM) particles added with essential oil of oregano to achieve a inhibitory effect against spoilage and pathogenic microorganisms that may be present in fresh cheeses. QU was used with 90% deacetylation, SMs were produced in situ, while AEO was obtained by hydrodistillation. A 23 factorial design was used using CS factors and levels: QU (4: 1 and 8: 1, p / p), suspension volume (25 and 50 mL) and SM (presence or absence). Glycerol at 40% (w / w, based on CS) was added to all filmogenic suspensions, to which the particle size, polydispersity index, potential ζ , solubility and gas barrier properties of the resulting movies. The antimicrobial effect was tested against *Salmonella Saintpaul* and *Listeria innocua*. Results. The surface of panela cheeses was coated with the mixture that resulted with better properties: CS: QU (8: 1 p / p; 50 mL), and they were stored at $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 15 d. This mixture showed a particle size of 764.8 ± 23.30 nm and a polydispersity index of 0.5, with potential ζ of 30.93 ± 1.07 mV. The addition of AEO contained in the SM particles to the films of CS: QU (8: 1 w / w) showed a halo of inhibition against *L. innocua* and *S. Saintpaul*. The use of SM produced an increase in permeability to O_2 , and a decrease in that of CO_2 and water vapor. After 15 d, the % (w / w) of lactic acid of the control cheese increased to 1.4 ± 0.1 while for the coated cheese it was 0.82 ± 0.12 . The pH and % moisture decreased to 5.70 ± 0.02 and 19.28 ± 0.41 for the uncoated cheese, 6.26 ± 0.2 and 38.63 ± 0.42 for the coated cheese. Conclusion. CS: Q coatings with SM containing AEO could be an alternative to increase the shelf life of panela cheese

Keywords: Edible coating, Sodium caseinate, Chitosan, Oregano essential oil, Panela cheese

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Materiales para recubrimientos	3
2.1.1 Quitosano	4
2.1.2 Caseína	6
2.1.2.1 Caseinato de sodio	8
2.1.2.2 Interacción caseína-quitosano.	8
2.1.3 Plastificante	10
2.1.4 Aceites esenciales	10
2.1.5 Partículas de sílice mesoporosa	14
2.2 Quesos.....	18
2.2.1 Criterios de clasificación	19
2.2.2 Queso Panela.....	21
2.3 Películas y recubrimientos comestibles para quesos.....	24
2.4 Propiedades del recubrimiento	26
2.5 Método de aplicación del recubrimiento.....	27
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. OBJETIVOS	29
4.1 Objetivo general	29
4.2 Objetivos específicos.....	29
5. METODOLOGÍA.....	30
5.1 Materiales.....	30
5.2 Métodos	30
5.2.1 Extracción del aceite esencial de orégano (AEO)	30
5.2.2 Síntesis de SM.....	30
5.2.3 Efecto antimicrobiano del AEO	31
5.2.4 Preparación de la solución filmogénica.....	32
5.2.5 Determinación de las propiedades físicas, de barrera y antimicrobianas del recubrimiento.....	33
5.2.6 Elaboración del queso panela.....	36
5.2.7 Evaluación del efecto de la aplicación del recubrimiento	37
5.3 Análisis estadístico.....	38

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
6.1 Extracción del AEO	39
6.2 Síntesis y caracterización de las SM	40
6.3 Actividad antimicrobiana del AEO y las SM-AEO	41
6.4 Caracterización y estabilidad de la suspensión filmogénica (SF).....	43
6.5 Propiedades mecánicas de las películas.....	45
6.6 Microestructura de las películas	48
6.6 Color de las películas	50
6.7 Solubilidad.....	52
6.8 Propiedades de barrera.....	53
6.9 Actividad antimicrobiana de las películas comestibles.....	54
6.10 Aplicación del recubrimiento comestible	56
6.11 Porcentaje de humedad	57
6.12 pH y acidez titulable	59
6.13 Análisis microbiológicos	60
7. CONCLUSIONES.....	65
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
9. ANEXOS	74

Índice de figuras

Figura	Página
1 Estructura del quitosano	4
2 Obtención, procesamiento y propiedades de una película de quitosano	5
3 Estructura de las micelas de caseína	7
4 Mecanismos de acción y tipos de administración de los aceites esenciales	12
5 Principales componentes del aceite de orégano	13
6 Síntesis de micropartículas de sílice y su estructura	15
7 Formación de coágulo de <i>p</i> -caseinato de calcio	17
8 Criterios de clasificación del queso	19
9 Queso Panela artesanal	20
10 Participación en la producción de quesos por tipo (enero-marzo 2018 p/)	21
11 Aceite esencial de orégano obtenido mediante hidrodestilación	38
12 Observaciones SEM de A) SM y B) SM-AEO	39
13 MS y MS con AEO encapsulado	40
14 Actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano mexicano a distintas concentraciones contra <i>L. innocua</i> y <i>S. Saintpaul</i>	41
15 Películas de CS:QU obtenidas del diseño experimental para las SF	45
16 Gráficos 3D obtenidos de AFM de películas	47
17 Micrografía SEM de películas A) CS:QU 8:1 a 50 mL, B) CS:QU 8:1 con MS-AEO a 50 mL.	49
18 Solubilidad en agua de las películas comestibles	51
19 Actividad antimicrobiana de las películas con 8 mg/ml de AEO y SM-AEO contra <i>L. innocua</i>	54
20 Actividad antimicrobiana de las películas con 8 mg/ml de AEO y SM-AEO contra <i>S. Saintpaul</i>	54

21	Evaluación del queso panela al día 15. A) Control, B) Recubrimiento control y C) Recubrimiento con SM-AEO	56
22	Evaluación del % de humedad de los quesos durante 15 días, almacenado a temperatura de refrigeración (4°C)	57
23	pH de los quesos con y sin recubrimiento durante el almacenamiento a 4° C (A) y usando el ajuste polinomial (B)	58
24	% de ácido láctico de los quesos con y sin recubrimiento durante el almacenamiento a 4° C (A) y usando el ajuste polinomial (B)	59
25	Log de UFC/g de Mesófilos aerobios en los quesos con y sin recubrimiento durante el almacenamiento a 4° C (A) y usando el ajuste polinomial (B)	61
26	Log de UFC/g de Hongos y levaduras en los quesos con y sin recubrimiento durante el almacenamiento a 4° C (A) y usando el ajuste polinomial (B)	62

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Índice de Cuadros

Cuadro		Página
1	Principales componentes del aceite esencial de orégano	13
2	Características del queso panela	20
3	Composición básica del queso panela	21
4	Límites máximos de contenido microbiano para quesos frescos	22
5	Diseño experimental para el diseño de los recubrimientos comestibles	29
6	Tratamientos del diseño experimental de las suspensiones filmogénicas	30
7	Diámetros de la zona de inhibición del AEO y SM-AEO	42
8	Potencial ζ , tamaño e índice de polidispersión de las SF	44
9	Espesor y propiedades mecánicas de las películas de CS:Q	46
10	Parámetros de rugosidad obtenidos del análisis AFM de películas comestibles basadas en CS:QU con y sin SM-AEO	48
11	Parámetros de color L^* , a^* , b^* y transparencia de las películas de CS:Q	50
12	Determinación de permeabilidad al CO ₂ , O ₂ y vapor de agua, de las películas	52
13	Diámetro de la zona de inhibición de la actividad antimicrobiana de las películas	54
13	Actividad antimicrobiana de los quesos control y recubiertos	60

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, por la necesidad de incrementar la vida de anaquel de los alimentos, se han buscado alternativas que permitan evitar su deterioro químico y biológico; y debido al impacto ambiental actual, existe un gran interés en el uso de materiales biodegradables y comestibles, con el objetivo de reemplazar los polímeros sintéticos y utilizar estos nuevos materiales para el recubrimiento y empaquetado de productos alimenticios.

Los objetivos principales de las películas y recubrimientos comestibles han sido principalmente para evitar pérdida de humedad y crear una superficie brillante a los alimentos con fines estéticos. El caseinato de sodio se obtiene mediante la precipitación ácida de la caseína, la proteína principal en la leche de vaca, y presenta propiedades termoplásticas y formadoras de película debido a su naturaleza aleatoria y su capacidad para formar interacciones intermoleculares débiles. Sin embargo, las películas de caseinato han mostrado propiedades antimicrobianas limitadas. El quitosano es un biopolímero natural derivado de la quitina que se encuentra en diversos materiales biológicos. Es uno de los polímeros naturales más ampliamente estudiados y utilizados en la preparación de los recubrimientos comestibles y materiales de empaque debido a su excelente formación de película, propiedades antimicrobianas y biodegradabilidad.

El queso panela es un tipo de queso fresco elaborado con leche pasteurizada de vaca. Es blanco, con textura porosa, suave y esponjosa. Su porcentaje de grasa es bajo y es muy popular en el centro del país.

El objetivo de la investigación fue formular y caracterizar un recubrimiento comestible activo, el cual tenga una base de caseinato de sodio y quitosano reforzado con partículas de sílice mesoporosa adicionadas con aceite esencial de orégano para aplicar en queso fresco tipo Panela y poder mantener su calidad por un periodo más amplio.

2. ANTECEDENTES

El avance dentro de la producción de recubrimientos y películas comestibles se han experimentado con diferentes formulaciones y diversas adiciones de compuestos de valor agregado que le pueden proporcionar distintas propiedades a los recubrimientos y las películas.

El término de película comestible solo se ha relacionado con aplicaciones alimentarias en los últimos 50 años, e indica que se cuenta con un empaque primario de un alimento mediante una capa material comestible de cierta composición para su protección de eventos físicos, fisicoquímicos y otros relacionados, durante su traslado. La historia del uso de películas se remonta a la antigua china para la protección de frutas, así como posteriormente en la protección de carne. En el año 1967, las películas comestibles tenían poco uso comercial y solo estaban limitadas a capas de cera para frutas, pero en los siguientes años se fue comercializando más esta tecnología (Pavlat & Orts, 2009).

El interés de empaques comestibles a partir de materiales de base biológica ha aumentado su interés debido a las ventajas que éstas tienen en comparación a los materiales derivados del petróleo, debido a que los empaques a base de productos petroquímicos están relacionados con la contaminación ambiental, lo cual ha provocado graves problemas ecológicos debido a su acumulación en basureros, ríos, mares y océanos.

Se han utilizado varios biopolímeros, entre ellos polisacáridos, proteínas y lípidos para la preparación de recubrimientos comestibles y películas de embalaje para el empaque de los alimentos. Estos empaques comestibles y biodegradables tienen la ventaja de que extienden la vida útil y la inocuidad de los productos recubiertos. Entre estos, se reducen las pérdidas de humedad y compuestos de sabor, oxidación y decoloración e inhibición de la contaminación microbiana.

La combinación de quitosano con otros polímeros y nanopartículas abren el camino para el desarrollo de una amplia gama de recubrimientos con propiedades adaptadas para alimentos (Lotfi et al., 2018).

El empaqueo de quesos se practica para minimizar las pérdidas de peso debido a las pérdidas de humedad, y para prevenir la contaminación microbiana y el deterioro sin afectar la maduración normal del queso (Youssef et al., 2018).

2.1 Materiales para recubrimientos

Las propiedades de las películas y recubrimientos dependen de los materiales utilizados y sus características principales (solubilidad, densidad, viscosidad y tensión superficial), ya que influirán en las propiedades de barrera, mecánicas y ópticas de los recubrimientos. La película y los materiales de recubrimiento deben seleccionarse según el tipo de queso (madurado o fresco) y las condiciones de almacenamiento (temperatura y humedad relativa). También los métodos de aplicación del recubrimiento (rociado, inmersión o bañado) se deben considerar. Los recubrimientos comestibles se aplican directamente en la superficie del alimento donde, después del secado, se forma una capa delgada, mientras que las películas se secan por separado formando un material independiente que luego se usa para cubrir el alimento (Pavlath & Orts, 2009; Costa et al., 2018).

Las proteínas, polisacáridos y lípidos son los materiales más utilizados en el desarrollo de películas y recubrimientos comestibles para su aplicación en el queso. Los polisacáridos y proteínas presentan como principal ventaja su solubilidad en agua, mientras que para la aplicación de lípidos se debe usar un solvente orgánico, y para las ceras se usan métodos de fusión en caliente durante la aplicación. Otro factor importante que debe considerarse, si se agrega un agente antimicrobiano a la formulación del recubrimiento, es la solubilidad del agente antimicrobiano y su posible interacción con el recubrimiento que puede afectar su desempeño cuando se aplica en productos de queso (Costa et al., 2018).

El uso de antimicrobianos es una de las alternativas para disminuir el crecimiento de bacterias, mohos y levaduras en el queso. Los recubrimientos comestibles tienen la capacidad de mantener altas concentraciones de la sustancia antimicrobiana en la superficie del queso evitando su migración y, por lo tanto, la concentración crítica se mantiene durante un período prolongado de tiempo y aumenta la eficiencia de la

aplicación. Hay varios compuestos que pueden usarse como antimicrobianos con diferentes propósitos; es decir, contra bacterias, mohos o levaduras, y que están aprobados para aplicaciones alimentarias (Pitak & Rakshit, 2011).

2.1.1 Quitosano

El quitosano es un derivado de la quitina que se obtiene por desacetilación en presencia de una base alcalina. Es un copolímero que consiste en unidades de β -(1-4)-2-acetamido-glucosa y β -(1-4)-2-amino-glucosa, figura (1), siendo el último generalmente más del 80%. El quitosano es descrito en términos del grado de acetilación, el peso molecular, la viscosidad y la solubilidad. Tiene muchas propiedades específicas tales como la actividad antimicrobiana, no toxicidad y la afinidad notable a las proteínas (Priyadarshi et al., 2018).

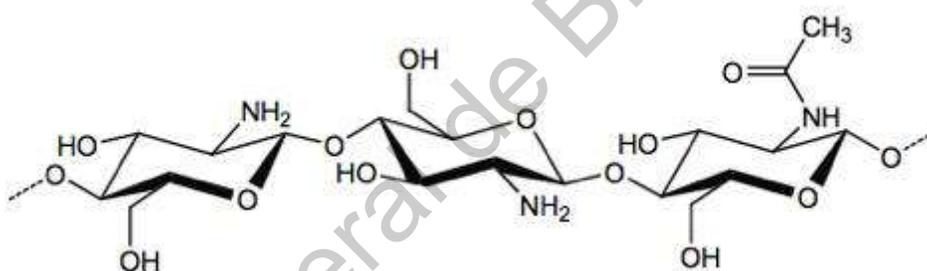


Figura 1. Estructura del quitosano. Adaptado de Porta et al. (2011).

Biodegradabilidad, biocompatibilidad, bioadhesivos, policatiónicos, antifúngicos, antibacterianos, inmunoadyuvantes, antitrombogénicos, formadores de película, un agente hidratante, capacidad de renovación, absorción, no toxicidad, agentes no alérgicos y anticolesterol son algunas de las propiedades básicas del quitosano. El grado de desacetilación, los pesos moleculares (viscosidades de las soluciones de quitosano) y, en consecuencia, las propiedades funcionales del quitosano varían enormemente de una fuente a otra. La característica sobresaliente de formación de película del quitosano lo convierte en un polímero adecuado en un amplio conjunto de aplicaciones. Cada aplicación requiere una película de quitosano con propiedades fisicoquímicas y

biológicas específicas, incluidas propiedades térmicas, de barrera, antimicrobianas y mecánicas como se muestra en la figura (2).

El quitosano típicamente se comercializa a un porcentaje de 85% de desacetilación. En solución, el quitosano forma agregados de tipo micela de segmentos totalmente acetilados de cadenas de polisacáridos, interconectados por bloques de polisacáridos casi totalmente desacetilados, estirados por repulsión electrostática.

El quitosano tiene buenas características de flujo y formación de película y es no tóxico, biodegradable, tiene propiedades bio-funcionales, es biocompatible y tiene importantes propiedades antimicrobianas. Basándose en eso y en su capacidad de recubrimiento y formación de película, los recubrimientos y películas a base de quitosano se probaron en varios tipos de quesos con el objetivo de disminuir el crecimiento microbiológico y, por lo tanto, prolongar la vida útil del queso. También se ha utilizado como portador de otros compuestos con capacidad antimicrobiana (Lotfi et al., 2018).

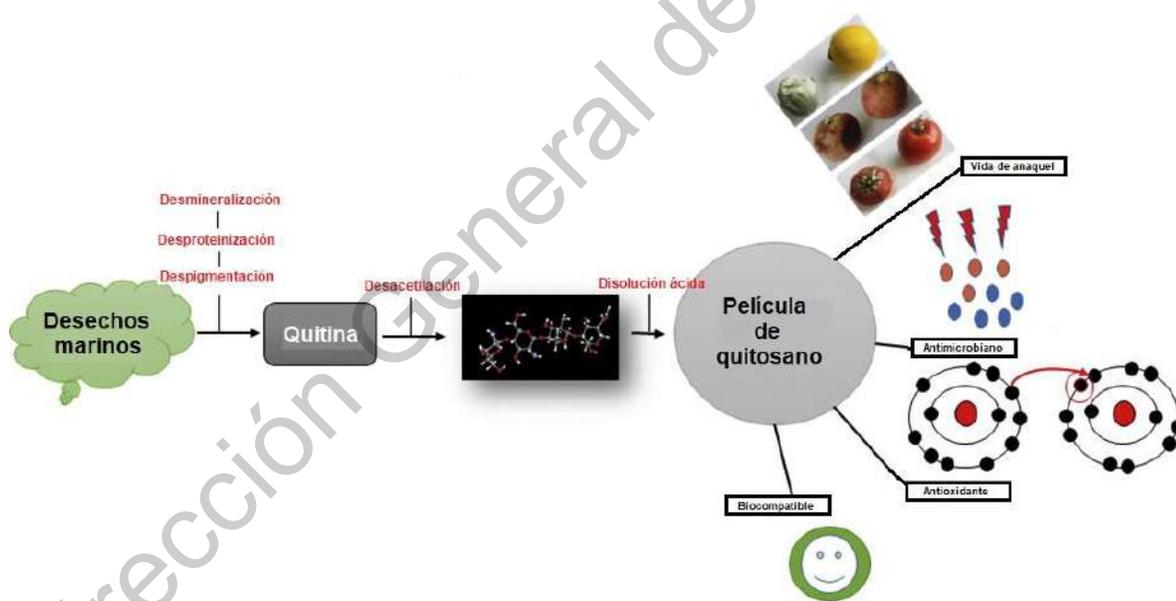


Figura 2: Obtención, procesamiento y propiedades de una película de quitosano, adaptado de Mujtaba et al., (2018).

El quitosano es, uno de los candidatos más interesantes para formular recubrimientos comestibles para la aplicación en diferentes tipos de queso, presentando

como ventajas principales la capacidad de prevenir el crecimiento de mohos, levaduras y algunas bacterias como *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *P. fluorescens* y *E. coli* (Costa et al., 2018).

2.1.2 Caseína

La caseína es el principal grupo de proteínas lácteas que se produce en concentración de 24 –29 g/L en la leche de bovino o de cabra. Las caseínas son fosfoproteínas únicas que están en suspensión en la leche como partículas coloidales. Las caseínas principales existen en fuerte asociación entre ellas y entre sí en forma de partículas coloidales de forma esférica, con un diámetro de ~50–500 nm (media de ~120 nm) y conocidas como “micelas de caseína”.

Hay cuatro subunidades principales: α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína y κ -caseína que constituyen el 38%, 10%, 36% y 13% de la composición de caseína, respectivamente (Dangaran et al., 2009; Farkye & Shah, 2015). Todas las caseínas son moléculas relativamente pequeñas, que varían en masa molecular entre 20 y 25 kDa (Fox et al., 2015).

Cada una de las cuatro fracciones de caseínas tiene propiedades únicas que afectan su capacidad para formar películas.

La α_{s1} es una proteína de 23.6 kDa con una carga neta de -21.9 a un pH de 6.6 y un punto Isoeléctrico de 4.94. Tiene la mayoría de su carga aislada entre los terminales N y C hidrófobos, lo que hace que la proteína sea anfipática. Es Ca^{2+} sensible, lo que significa que la proteína se agregará y precipitará en bajas concentraciones del ion. Debido a que no contiene cisteína libre, no puede participar en la formación de enlaces disulfuro y la reticulación.

La caseína α_{s2} también es sensible al Ca^{2+} . Tiene una carga neta de -13.8, un pl de 5.37 y dos regiones de alta densidad de carga, lo que la hace más hidrófila que otras fracciones de caseína.

La β -caseína es una proteína anfipática con un N-terminal polar, pero un gran dominio hidrófobo. También es Ca^{2+} sensible. La solubilidad de la beta-caseína aumenta cuando la temperatura desciende a 4 ° C.

La κ -caseína es la otra proteína de caseína principal; sin embargo, es diferente de las otras tres fracciones de caseína, ya que no es sensible a los iones de calcio. La kappa-caseína se encuentra en la capa externa de una micela de caseína y es muy anfipática con un dominio polar que interactúa con los solventes polares (Dangaran et al., 2009).

El modelo submicelular de la caseína propone que el contenido de κ -caseína de las submicelas varía y que las submicelas deficientes en κ -caseína se ubican en el interior de las micelas mientras que las de mayor abundancia se concentran en la superficie, con algunas caseínas como $\alpha\text{s}1$, $\alpha\text{s}2$ y β también expuestas, figura (2). Se propone que la región C-terminal hidrófila de la κ -caseína sobresalga de la superficie, formando una capa de 5 a 10 nm de espesor y dando a las micelas una apariencia con extremidades, figura (3). Esta capa es responsable de la estabilidad de las micelas a través de una importante contribución al potencial zeta (~ 20 mV) y la estabilización estérica. Si se elimina dicha capa, por hidrólisis específica de κ -caseína, o colapsada, la estabilidad coloidal de las micelas se destruye y se coagulan o precipitan las caseínas.

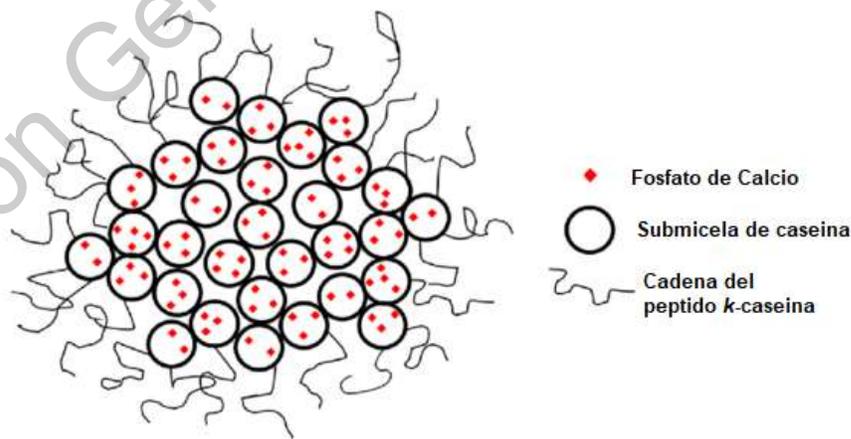


Figura 3. Diagrama esquemático de la estructura de micelas de caseína (adaptado de Fox, 2015).

2.1.2.1 Caseinato de sodio

El caseinato de sodio es un polímero soluble en agua, el cual se encuentra disponible en el mercado mediante su obtención por la precipitación ácida de la caseína, la fuente principal en la leche de vaca. El caseinato presenta propiedades termoplásticas y formadoras de película debido a su naturaleza de bobina aleatoria y su capacidad para formar interacciones intermoleculares débiles, es decir, las cadenas peptídicas parcialmente desnaturalizadas se unen principalmente a través de enlaces hidrófilos y puentes de hidrógeno que dan como resultado la formación de la matriz proteica (Pereda et al., 2007).

Los caseinatos al igual que las caseínas, se consideran proteínas anti catabólicas, por lo que pueden ser utilizados en periodos de ayuno como entre ingestas o durante el descanso nocturno, también se pueden utilizar para reducir la pérdida de masa muscular durante periodos de restricción calórica (Manab, 2017).

Los sistemas mixtos de polisacáridos y proteínas se han ido utilizando cada vez más en diversas aplicaciones alimentarias, farmacéuticas y biotecnológicas. Los complejos proteína-polisacárido han presentado mejores propiedades funcionales en comparación con proteínas o polisacáridos individuales (Pogaku et al., 2007). Por lo tanto, también es importante buscar las combinaciones de biopolímeros que produzcan un mejor rendimiento como un paquete natural y comestible (Moreira et al., 2011).

2.1.2.2 Interacción caseína-quitosano.

Los polisacáridos y las proteínas en suspensiones acuosas pueden o no interactuar entre sí. Las interacciones atractivas entre proteínas y polisacáridos se dan de muchas maneras: enlace covalente, enlace iónico, puentes de hidrógeno, interacción hidrofóbica, fuerzas de van der Waals, y enredo físico (Manab, 2017).

Existen dos tipos principales de interacciones de polisacáridos con proteínas:

- i. Asociación fuerte: unión irreversible de proteínas a polisacáridos o complejos electrostáticos fuertes;

- ii. Asociación débil: potencialmente reversible, incluye complejos electrostáticos no iónicos y débiles.

Las interacciones electrostáticas desempeñan un papel predominante con los polisacáridos cargados. Los complejos electrostáticos de fuerte atractivo se forman comúnmente entre proteínas cargadas positivamente ($pH < pI$) y polisacáridos aniónicos. Se pueden formar complejos reversibles más débiles entre los polisacáridos aniónicos y las proteínas que llevan una carga general casi cero ($pH \approx pI$) o una carga negativa neta ($pH > pI$). La caseína puede precipitar a un pH bajo, porque su solubilidad es menor en condiciones ácidas (Manab, 2017).

Se conoce que el quitosano es solo soluble en pH ácido e insoluble en pH neutro y alcalino. Los grupos amina están protonados a $pH < 6$ y cargados positivamente y el quitosano es soluble en agua a $pH \leq 4$. A un pH alto, los grupos amina se desprotonan y el polímero pierde su carga y, por lo tanto, es soluble en agua. El quitosano y los electrolitos cargados de manera opuesta interactuarán para formar un precipitado insoluble. A pH 7, la caseína tiene carga negativa, pero el quitosano está desprotonado, mientras que a pH 10, la carga negativa de caseína es mayor que a pH 7, lo que hace que los puentes de hidrógeno de la caseína con los grupos $-OH$ y NH_2 del quitosano sean más fuertes, lo que lleva a una mejor atracción entre los polímeros. A pH 4, los grupos amina del quitosano están protonados y adquieren carga positiva. La caseína también adquiere una carga positiva neta, ya que el punto isoeléctrico es 4.2, lo que lleva a la repulsión electrostática entre las dos cadenas de polímero. La interacción electrostática de la proteína de caseína cargada negativamente con quitosano cargado positivamente da como resultado la formación de una fase insoluble (Manab, 2017).

La preparación del complejo de polielectrolito entre caseinato y quitosano requiere un control cuidadoso del pH de las soluciones. El caseinato de sodio es notablemente estable al calor a $pH = 6.5$ y altamente insoluble en el punto isoeléctrico, pH entre 3.8 y 4.0. El quitosano muestra la mejor solubilidad en una solución de ácido cítrico al 1% (v/v) ($pH = 4.4$), pero permanece soluble a un pH inferior a 6.4 (Pereda et al., 2007).

2.1.3 Plastificante

Además del componente de naturaleza polimérica y de alto peso molecular (matriz), otro componente importante de las películas comestibles son los plastificantes. Los plastificantes son agentes de bajo peso molecular, que se pueden combinar con los biopolímeros formadores de película para modificar las propiedades físicas (por ejemplo, aumentar la flexibilidad y procesabilidad de la película) o para agregar funcionalidad a las películas. El uso de plastificantes reduce la fragilidad de la película al interferir con los enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares en las películas de proteínas. Los plastificantes afectan la capacidad de atracción de agua del sistema y generalmente suelen aumentar la permeabilidad al oxígeno de los recubrimientos comestibles (Pereda et al., 2007).

Los plastificantes comúnmente utilizados en películas y recubrimientos comestibles son polioles, que incluyen glicerol, sorbitol y sacarosa. La efectividad de un plastificante depende de tres aspectos: tamaño, forma y compatibilidad con la matriz del recubrimiento. El estado de almacenamiento de un plastificante en condiciones normales también puede afectar su permeabilidad y flexibilidad (Dangaran et al., 2009). Los plastificantes sólidos pueden tener un efecto “antiplastificante” y disminuir la flexibilidad de la matriz, al mismo tiempo que pueden mejorar la permeabilidad (Dangaran & Krochta, 2007).

2.1.4 Aceites esenciales

Los aceites esenciales, también llamados aceites volátiles, son líquidos oleosos concentrados que contienen compuestos aromáticos volátiles que están derivados de materiales vegetales como flores, brotes, hojas y corteza. Los aceites esenciales son mezclas complejas de sustancias volátiles, incluyendo terpenos, terpenoides (terpenos oxigenados) y fenoles. La composición química de las muestras de un aceite esencial extraído de la misma especie de planta puede ser muy variable porque depende, por ejemplo, del área geográfica, el hábitat, el tiempo de cosecha, el método de extracción y las condiciones de almacenamiento, entre otros factores (Rao et al., 2019). Se ha demostrado que los aceites esenciales y sus compuestos bioactivos han sido

ampliamente estudiados por su eficacia antimicrobiana contra patógenos transmitidos por los alimentos, es decir, bacterias, mohos y sus toxinas asociadas (Prakash et al., 2018).

Los componentes principales en un aceite esencial constituyen típicamente hasta el 85% del sistema, mientras que otros componentes están presentes solo en cantidades mínimas. Varios informes han indicado que la actividad antimicrobiana de un aceite esencial está estrechamente relacionada con sus constituyentes principales, así como con sus interacciones con algunos de los constituyentes menores. La mayoría de los constituyentes que exhiben una alta eficacia antimicrobiana son fenoles, seguidos de terpenos oxigenados y terpenoides, respectivamente (Khalili et al., 2015).

2.1.4.1 Mecanismo de acción

El principal mecanismo de acción de los aceites esenciales depende de la concentración y tipo de constituyentes químicos que estén presentes dentro del AE. Diferentes constituyentes pueden operar mediante diferentes mecanismos y pueden atacar a diferentes tipos de microorganismos, como bacterias Gram-positivas, bacterias Gram-negativas, levaduras o mohos, debido a la diferencia en la composición de sus membranas celulares. La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales puede estar regulada por más de un mecanismo de acción como se muestra en la figura (4), ya que los diferentes componentes de los aceites esenciales pueden atacar diferentes o varios microorganismos. Se han propuesto varios mecanismos de acción para la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, que incluyen alterar el perfil de ácidos grasos de la membrana celular, dañar la membrana citoplásmica y reducir la fuerza protón-motriz (Rao et al., 2019).

Se puede decir que las bacterias Gram-negativas tienen mayor tolerancia a los aceites esenciales que las Gram-positivas debido a la barrera física creada por la capa de lipopolisacáridos hidrófilos en la membrana de la pared celular externa. Como tal, uno esperaría que el mecanismo de acción de los aceites esenciales en las bacterias Gram-negativas podría ser diferente al de las bacterias Gram-positivas.

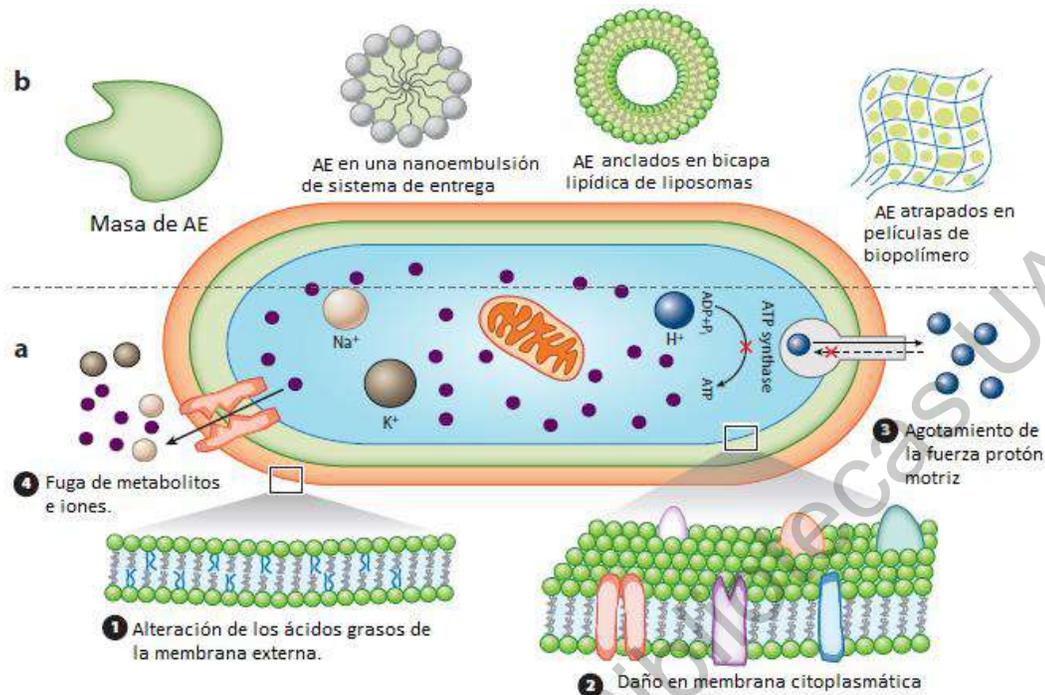


Figura 4. (a) Los mecanismos comunes de acción propuestos y los sitios objetivo de los aceites esenciales (AE) o los sistemas de administración de AE en células bacterianas. (b) Demostración de los diferentes tipos de sistemas de administración de AE (adaptado de Rao et al., 2019) (Rao et al., 2019).

Se ha informado que los aceites de clavo y orégano y sus componentes principales (timol y eugenol) eran capaces de dañar las membranas celulares de las bacterias gramnegativas como *E. coli*, con mayor eficacia que las bacterias Gram-positivas como *Bacillus subtilis* (Rhayour et al., 2003).

Otro estudio demostró que el aceite de árbol de té inhibía la respiración y aumentaba la permeabilidad de la membrana citoplásmica bacteriana al mismo tiempo que causaba una fuga de iones potasio en bacterias Gram-positivas (*S. aureus*) y bacterias Gram-negativas (*E. coli*) (Cox et al., 2000).

2.1.4.1 Aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* Kunth)

El aceite esencial de orégano es uno de los agentes antimicrobianos más efectivos; el carvacrol y el timol son los principales compuestos responsables por su actividad antimicrobiana (Burt, 2014).

El carvacrol y el timol son los compuestos primarios del orégano como se muestran en la figura (5) y cuadro (1) y contribuyen al aroma característico de su aceite esencial. Se sabe que inhiben la peroxidación lipídica. El efecto antioxidante del extracto de orégano se asocia con el alto contenido de carvacrol y timol (Yanishlieva et al., 2006).

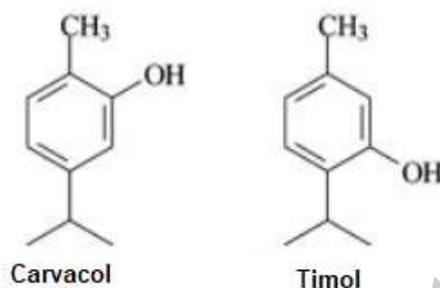


Figura 5. Principales componentes del aceite de orégano (Prakash et al., 2018).

El aceite esencial de orégano está categorizado como Generalmente reconocido como seguro (GRAS) por el Departamento de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos de América (FDA).

Cuadro 1: Principales componentes del aceite esencial de orégano que exhiben propiedades antibacterianas.

Compuesto	Composición
Carvacrol	10–64%
Timol	2–11%
<i>p</i> -cymene	2–31%
<i>γ</i> -terpinene	10–56%

(Adaptado de Prakash et al., 2018)

El efecto antimicrobiano de los componentes del aceite esencial de orégano se atribuye a la permeabilización de la membrana, lo que también afecta la fuerza protón-motriz y provoca la fuga de iones específicos. (Lambert et al., 2001; Hernández-Hernández et al., 2014). Su efecto se ha investigado previamente contra diversos agentes patógenos como: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*

enterica subs. Enteritidis, Campylobacter jejuni mostrando concentraciones mínimas inhibitorias entre 15 a 60 $\mu\text{g/ml}$ (Carmagnini et al., 2015).

2.1.5 Partículas de sílice mesoporosa

La encapsulación de aceites esenciales ofrece numerosas ventajas, como facilidad de manejo, estabilidad, protección contra oxidación, distribución mejorada, solubilidad, liberación controlada, con un menor o ningún efecto sobre las propiedades organolépticas de los alimentos a los que se le aplican con una biodisponibilidad mejorada. Por lo tanto, el uso del encapsulamiento para desarrollar conservantes a base de aceites esenciales puede mejorar su efectividad en el sistema. Con respecto a la encapsulación, se han utilizado diferentes sistemas de administración orgánica para encapsular los aceites esenciales para su aplicación directa o después de su incorporación a películas o recubrimientos para fines de conservación de alimentos (Prakash et al., 2018).

Las partículas de sílice mesoporosas (MS) son estructuras de dióxido de silicio (SiO_2), que están dispuestas de manera que crean poros de 2 a 50 nm. Son sintetizadas a partir de dos elementos principales: uno que funciona como plantilla, para dirigir la construcción de la red porosa de alta resolución (cristalina); y un precursor polimérico que se autoorganiza alrededor de la plantilla. y, tras la polimerización, construye la estructura rígida final. Los poros se obtienen mediante la eliminación del tensioactivo y calcinación a alta temperatura entre 500 a 600°C, figura (6) (Hoffmann et al., 2006).

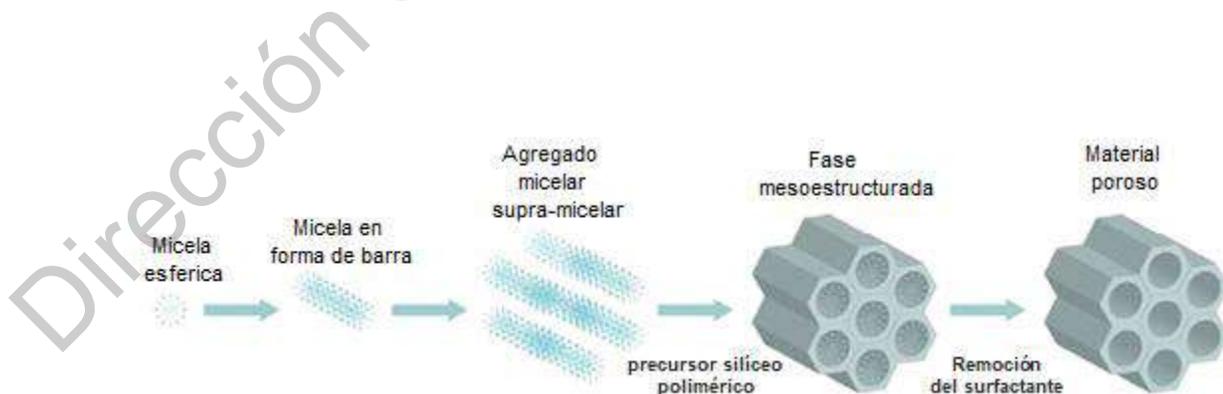


Figura 6. Síntesis de partículas de sílice mesoporosas y su estructura (Hoffmann et al., 2006).

Las partículas de sílice mesoporosa son un buen sistema para la encapsulación de aceites esenciales debido a su estructura porosa, estabilidad química, biocompatibilidad, tamaño de poro y porosidad ajustables, síntesis simple y de bajo costo, y posible ampliación para uso industrial. Además, la sílice es biológicamente inerte y tiene la capacidad de descomponerse en subproductos de ácido silícico relativamente inocuos, por lo que es un material útil para aplicaciones de suministro de biocidas en la agricultura (Bravo et al., 2018).

2.1.5.1 Tamaño de partícula

Las partículas de sílice mesoporosas (SM) pueden sintetizarse utilizando un agente tensioactivo en solución acuosa que puede ser neutra y estar cargada. Los silicatos que son ésteres de ácido ortosilícico, se polimerizan en presencia de un surfactante. Las variables que involucran el control del tamaño y la morfología de las nanopartículas de sílice mesoporosa incluyen a) tasa de hidrólisis; b) el nivel de interacción entre la plantilla ensamblada y el polímero de sílice; c) condensación de la fuente de sílice.

2.1.5.2 Tamaño de poro

Los parámetros que se utilizan para controlar la estructura de poros de las partículas de sílice porosa son la cantidad de fuente de sílice y surfactante y la capacidad de embalaje del surfactante.

La agregación de surfactante en solución depende del pH y la concentración de la solución. Las partículas de sílice mesoporosas se sintetizan a pH tanto ácido como básico con diferentes estructuras de poros. Por ejemplo, las fases meso lamelares se sintetizan a un pH alto (> 12), mientras que las estructuras hexagonales se producen a un pH básico (10-12) (Ahmad et al., 2017).

2.1.5.3 Área de superficie

El área de superficie de las SM es el factor más determinante para la cantidad de productos farmacéuticos adsorbidos. Para controlar la cantidad de antimicrobiano incorporado en la matriz, se utilizan dos enfoques diferentes que aumentan o disminuyen

el área de la superficie y modifican la afinidad del antimicrobiano de la superficie (Ahmad et al., 2017).

En general, el volumen de poros en el rango de $2 \text{ cm}^3/\text{g}$ cuando el tamaño de los poros es inferior a 15 nm y el área de superficie es de aproximadamente $1000 \text{ m}^2/\text{g}$. La interacción del fármaco con los mesoporos es un fenómeno de superficie, mientras que las interacciones deficientes entre dos tipos diferentes de fármacos pueden llevar al llenado de poros (Contado et al., 2013).

El atrapamiento de compuestos antimicrobianos en estos materiales puede proteger a las sustancias bioactivas del estrés provocado en el ambiente, enmascarar propiedades sensoriales indeseables, prevenir interacciones con componentes de alimentos y lograr la liberación controlada del compuesto antimicrobiano en el sitio de acción (Ruiz-Rico et al., 2017). Para lograr la adsorción de moléculas bioactivas en las partículas de sílice porosa, es importante considerar el tamaño y la selectividad de carga, debido a que solo las moléculas con tamaño menor que el poro del soporte pueden quedar atrapadas (Pérez-Esteve et al., 2015).

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

2.1.5.4 Toxicidad

Se sabe que un tamaño de partícula pequeño de un vehículo puede conducir a interacciones con eritrocitos de manera diferente a las observadas para los productos antimicrobianos y farmacéuticos convencionales. Las partículas MCM-41 se consideran transportadores alternativos para moléculas pequeñas y la evaluación *in vitro* de su biocompatibilidad con componentes sanguíneos es una parte necesaria de las pruebas de toxicidad básicas. Otro estudio confirmó que las partículas de sílice mesoporosa

MCM-41 (0.1–1.0 mg / mL) no inducían la lisis de los glóbulos rojos y demostraron su buena biocompatibilidad (Tzankova et al., 2019).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

2.2 Quesos

El queso se define como un producto elaborado de la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida de la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior, por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado (Villegas de Gante et al., 2016).

El proceso de elaboración de un queso es relativamente sencillo, sin embargo, involucra fenómenos físicos y químicos complejos. Se trata esencialmente de un proceso de concentración, a partir de la coagulación de la caseína contenida en la leche por una acción enzimática (cuajo) o coagulación con un ácido (comúnmente ácido láctico) (Ramírez & Vélez, 2012). El paso indispensable en la elaboración de los quesos es la coagulación de la caseína, provocada mediante la acción combinada de enzimas proteolíticas (cuajos de distintos tipos) y calcio. El proceso de formación del coágulo incluye 2 etapas, como se muestra en la figura (7).

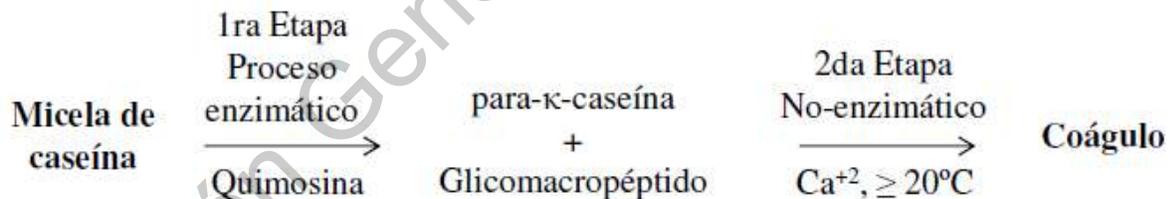


Figura 7: Formación del coágulo de caseína. Adaptado de Udayarajan (2007).

En la primera, se desarrolla un proceso enzimático modulado por la quimosina, la cual rompe los enlaces entre los aminoácidos fenilalanina y metionina (Fen-105 y Met-106) presentes en la κ -caseína, liberándose el glicomacropéptido en la solución. En la segunda etapa, los agregados de para- κ -caseína interaccionan con las otras caseínas para producir el coágulo (Udayarajan, 2007).

Una vez que la leche se ha coagulado, se debe proceder al cortado del coágulo (cortes verticales y horizontales) en pequeños cubos, para favorecer la eliminación del suero (desuerado). Posteriormente se procede a su moldeado. El moldeado tiene como finalidad dar forma al queso y ayudar a que los gránulos de la cuajada se aglomeren. Los moldes pueden ser cilíndricos, cuadrados o alargados. Comúnmente en el caso de quesos suaves como del tipo fresco, no es necesario aplicar presión, pues es suficiente con la que provoca el propio peso del queso. El salado, además de proporcionar sabor al producto, evita la proliferación de microorganismos y contribuye a la formación de la corteza del queso. En el proceso, se utiliza sal cristalizada o salmueras de diferentes concentraciones, de acuerdo con el tipo de queso (Ramírez & Vélez, 2012).

2.2.1 Criterios de clasificación

Existen diversos criterios de clasificación con base en las condiciones de proceso o las características fisicoquímicas del tipo de queso:

- a) Por contenido de humedad, se clasifican en quesos duros (20-42%), semiduros (44- 55%) y blandos o suaves (aprox. 55%).
- b) Conforme al tipo de coagulación de la caseína, se clasifican en quesos de coagulación enzimática, quesos de coagulación ácida y quesos de coagulación ácida/térmica.
- c) Conforme su estado de maduración: frescos (6 días), semi-madurados (40 días) y madurados (>70 días).

El queso fresco presenta distintos nombres según la región de producción y numerosas variantes en cuanto a las técnicas de elaboración. De acuerdo con la norma oficial mexicana (NOM-121-SSA1-1994) el queso fresco se caracteriza por un contenido de humedad elevado, un sabor suave y un periodo de vida de anaquel corto, por lo que debe ser refrigerado. Se consideran como quesos frescos los siguientes: panela, fresco, ranchero, blanco, Oaxaca, asadero, adobera, requesón, queso crema, entre otros, figura (8) (Ramírez & Vélez, 2012).

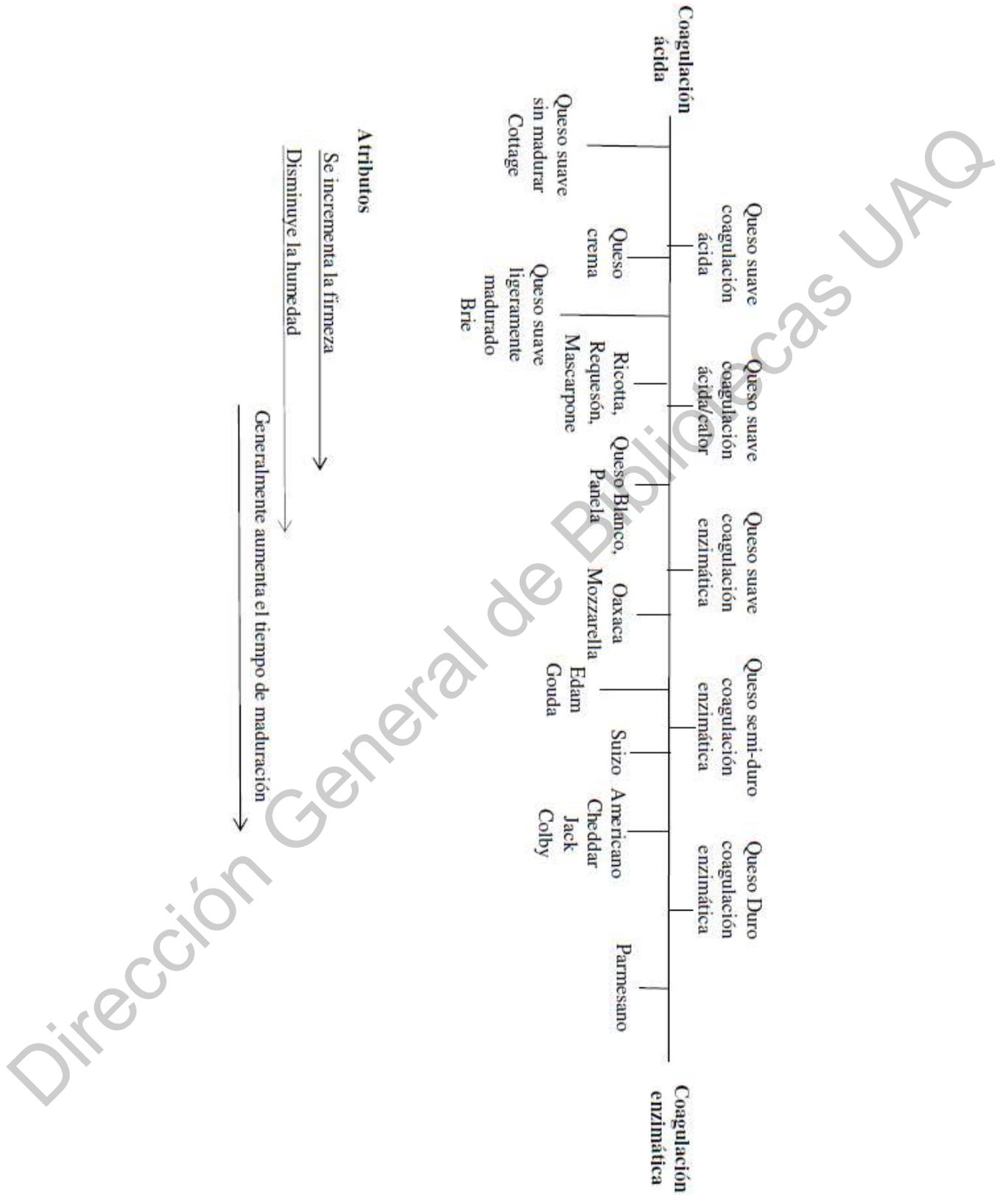


Figura 8. Criterios de clasificación del queso, (adaptado de Farkye, 2004).

2.2.2 Queso Panela

El queso panela forma parte de los quesos frescos, los cuales además general de queso se caracterizan por su alto contenido de humedad, y por no tener corteza o tener corteza muy fina, pudiendo o no adicionarles aditivos e ingredientes opcionales (NOM-243-SSA1-2010).

El queso Panela llamado también "Queso de la canasta" porque lleva la impresión de la cesta en la que se moldea o "Queso Blanco", es un queso fresco, suave, blanco de pasta blanda, auto prensado, servido más a menudo como parte de una bandeja de aperitivo o como bocado, figura (9).



Figura 9: Queso Panela Mexicano Artesanal (González-Córdova et al., 2016).

Como todos los quesos frescos mexicanos su composición incluye un porcentaje elevado de agua (hasta 58%) y por ello es altamente perecedero, de ahí que tenga que conservarse bajo refrigeración desde el momento de su elaboración lo que dificulta su distribución lejos de sus centros de producción (Villegas de Gante et al., 2016).

Cuadro 2: Características del queso panela.

Macrorregión	Tipo de pasta	Nivel de producción
Planicies templadas	Pasta blanda, cortable, no prensada	Artesanal, semiindustrial e industrial, con leche pasteurizada, poco con leche cruda.

Fuente: (Villegas de Gante et al., 2016)

El queso panela, al comercializarse poco tiempo después de elaborado muestra un color blanco brillante (indicador de frescura), una pasta fácilmente cortable y un sabor lácteo, pero agradable. Es precisamente debido al color blanco, muy apreciado, por lo que a menudo la leche se descrema parcialmente para hacer un queso más magro, y por tanto más blanco. La presencia en grasa butírica es la que hace que al desecarse la periferia aparezca una coloración amarillenta y la presencia de una costra coriácea, desagradable para la mayoría de los consumidores (Villegas de Gante et al., 2016).

2.2.2.1 Composición química

Aunque muchos quesos tienen un pH que oscila entre 4.8 y 5.2, el queso Panela no se fermenta y tiene un pH casi neutro, lo que puede ser ventajoso para la supervivencia de los probióticos. La matriz sólida y el alto contenido de grasa del queso Panela son factores adicionales que favorecen la adición de probióticos. Su popularidad probablemente reside en el hecho de que los consumidores la consideran "saludable" debido a su bajo contenido de grasa. Sin embargo, debido a su contenido de humedad (53–58%), es muy perecedero. Se comercializa en porciones que pesan aproximadamente entre 0.5 y 2 kg (Amaya-Llano et al., 2012; González-Córdova et al., 2016).

La Procuraduría federal del consumidor (Profeco) en 2016 analizó diferentes marcas de quesos panela que cumplieron con las expectativas, ya que mostraron contenidos de humedad entre el 50% y 60%, entre el 16% y 20% de proteína, y contenidos de grasa entre el 19% y 29%. En el cuadro (3) se puede observar el porcentaje de cada componente contenido en el queso panela.

Cuadro 3: Composición básica del queso panela (% en peso).

Composición	Porcentaje
Agua	53 - 58%
Sólidos totales	42%
Grasa	12 - 18%
Proteína total	18 - 20%
Cenizas	2.5 – 2.7%
Sal	1.3 – 1.8%
pH	5.6 – 6.4
Valor energético (kJ/100 g)	1066 ± 37

Fuente: (Ramírez & Vélez, 2012; Villegas de Gante et al., 2016)

2.2.2.2 Producción, consumo y normatividad en México

México ocupa el décimo lugar en el mundo en la producción de queso y el octavo para el consumo. El 10% del total de la producción de leche en el país se dedica a la fabricación de productos lácteos, de la cual la mayoría se destina a la producción del queso (ICAR, 2016). Por su parte, la industria de quesos produjo 65 mil 942 toneladas con un valor en el mercado de 3 mil 322 millones de pesos, figura (10) (SIAP, 2018).

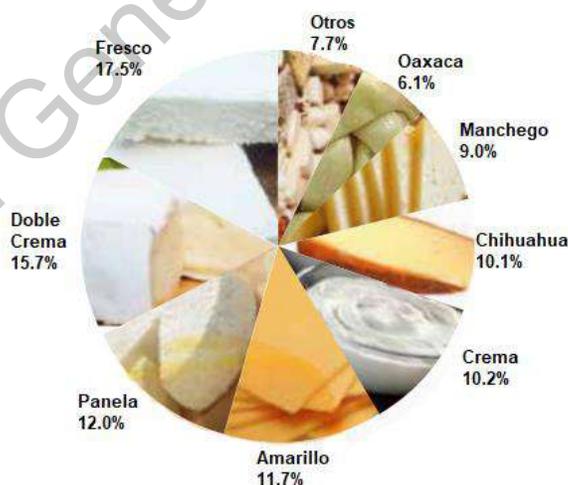


Figura 10: Participación en la producción de quesos por tipo (enero-marzo 2018 p/), adaptado de SIAP

Los productos lácteos en general se rigen bajo normas oficiales mexicanas (NOM), una de las normas más completas es la NOM-243-SSA1-2010, la cual es de carácter obligatorio en territorio nacional y establece las especificaciones sanitarias y nutrimentales que debe cumplir la leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y los derivados lácteos. Esta norma incluye las nuevas disposiciones para los quesos, en donde el monitoreo de patógenos como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y de la toxina estafilocócica, ayuda a disminuir la incidencia de las enfermedades causadas por estos microorganismos y facilita su exportación, ya que la mayoría de los socios comerciales de México incluyen en sus legislaciones este tipo de determinaciones, además proporciona los límites máximos permisibles de microorganismos que pueden contener quesos frescos, los cuales se enlistan en el cuadro (4):

Cuadro 4: Límites máximos de contenido microbiano para quesos frescos.

Microorganismo	Límite máximo
Organismos coliformes totales	≤100 UFC/g o mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	1000 UFC/g
<i>Salmonella spp</i>	Ausente en 25 g o mL
<i>Escherichia coli</i>	100 UFC/g o mL
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausente en 25 g o mL
<i>Vibrio cholerae</i>	Ausente en 25 g
Enterotoxina estafilococcica	Negativa
Toxina botulínica	Negativa
Mohos y levaduras	500 UFC/g o mL

Fuente: NOM-243-SSA1-2010

2.3 Películas y recubrimientos comestibles para quesos

Los quesos en general tienen una composición compleja debido a las muchas reacciones biológicas y bioquímicas que ocurren desde la producción hasta el

almacenamiento, lo que influye en sus características físicas, sensoriales y químicas, como la textura, el sabor y el color (Cui et al., 2016).

El crecimiento de las levaduras, mohos y bacterias puede ocurrir en la superficie del queso debido a las condiciones ambientales durante el manejo y almacenamiento, lo que reduce considerablemente la calidad del queso y las demandas para el desarrollo de materiales de empaque a medida para evitar el deterioro. Los requisitos para su empaquetado cambian según el tipo de queso, ya que las tasas de maduración, el contenido de agua y la estabilidad mecánica dependerán de su composición. Se ha sugerido que los quesos frescos (por ejemplo, queso crema, queso panela y requesón) deben envasarse en una atmósfera modificada que contenga N_2 y/o CO_2 en lugar de O_2 . Sin embargo, debido a la presencia de levaduras y bacterias, el deterioro aún puede ocurrir incluso con niveles bajos de O_2 y altos de CO_2 , lo que hace que el empaquetado en atmósfera modificada sea una solución que debe usarse con cuidado teniendo en cuenta estos factores (Costa et al., 2018).

Algunos de los materiales utilizados para el envasado de quesos, como polietileno, poliamida o polipropileno, no son biodegradables ni comestibles y pueden provocar problemas ecológicos y estar limitados por una legislación estricta sobre la migración de los materiales al queso. Estas preocupaciones principales llevaron a la industria a buscar nuevas soluciones de empaque y, posteriormente los ha llevado a una creciente investigación relacionada con los materiales de empaque comestibles. Las películas y recubrimientos comestibles basados en estos materiales pueden garantizar la calidad de los alimentos, actuando como una barrera semipermeable al oxígeno, dióxido de carbono y vapor de agua, permitiendo la reducción de la pérdida de agua y el control de la tasa de maduración. Además, las películas y recubrimientos comestibles se pueden usar como portadores de agentes antimicrobianos y, por lo tanto, evitan el crecimiento microbiano no deseado en la superficie del queso (Costa et al., 2018).

Las películas y recubrimientos comestibles se pueden usar para mejorar la calidad y seguridad de los alimentos, principalmente a través de la extensión de la vida útil, pero también para mantener el sabor, el color y el valor nutricional del queso. Además, presentan otras características valiosas que pueden consumirse con el queso evitando

la generación de residuos, ya que no hay empaques residuales que desechar (incluso si no se consumen) ya que son biodegradables; Las propiedades organolépticas y nutricionales del queso pueden mejorarse, ya sea debido a la composición de la película/recubrimiento que puede tener propiedades beneficiosas por sí mismas, o a su capacidad para incorporar componentes tales como agentes aromatizantes, teñidos o edulcorantes, que se comen con el recubrimiento; pueden actuar como portadores de ingredientes activos, por ejemplo con propiedades antimicrobianas y antioxidantes, y por lo tanto promueve la conservación del queso con el control simultáneo de la tasa de difusión de esas sustancias en el queso (Costa et al., 2018; Cui et al., 2016).

Las propiedades antimicrobianas de las películas de quitosano pueden mejorarse utilizando el quitosano en combinación con otro tipo de antimicrobianos, por lo tanto, produce un mayor efecto antimicrobiano. Esto permite una extensión de la vida útil en términos de carga microbiológica y, en algunos casos, la mejora de las características sensoriales del queso. Sin embargo, es importante mencionar que cuando se usa quitosano, se deben tomar algunas precauciones debido al medio ácido en el que debe disolverse y al color rojo anaranjado que puede presentar (Costa et al., 2018).

2.4 Propiedades del recubrimiento

Para lograr los objetivos de conservación, la suspensión filmogénica de un recubrimiento debe extenderse uniformemente sobre el alimento y luego formar una película que tenga una adecuada adherencia, cohesión y durabilidad. El espesor del recubrimiento comestible debe estar bien controlado para crear cierta atmósfera modificada para suprimir la tasa de respiración de los productos hortícolas o retrasar el deterioro de la calidad de los alimentos de abiosis. La viscosidad de la solución del recubrimiento puede afectar la capacidad de esparcimiento y la uniformidad de la capa de recubrimiento líquido, que a su vez afecta el espesor y el rendimiento de la película resultante. Dado que el valor de pH de una solución de recubrimiento puede afectar su estabilidad (como el cambio de viscosidad) y su funcionalidad (como la propiedad antibacteriana), es necesario medir el pH inicial de la solución de recubrimiento (Zhong et al., 2014).

2.5 Método de aplicación del recubrimiento

El efecto de protección de un recubrimiento comestible depende de la composición, la morfología de la superficie, el tamaño y la forma de la matriz del producto a recubrir. Los recubrimientos comestibles se pueden aplicar en o incluso dentro de los alimentos por varios métodos, y los diferentes métodos de recubrimiento tienen sus propias ventajas y desventajas. La inmersión es la vía de laboratorio más común debido a su simplicidad, bajo costo y buena cobertura en superficies de alimentos irregulares. Sin embargo, el método de inmersión tiene desventajas obvias, por ejemplo, conduce a la dilución de la solución de recubrimiento y al residuo de una gran cantidad de materiales de recubrimiento, y con frecuencia produce un crecimiento de microorganismos en el tanque de inmersión (Homez-Jara et al., 2018).

Durante el proceso de barnizado, la solución filmogénica se coloca con la ayuda de una brocha en los alimentos. Para una buena calidad del producto y un control preciso del peso, la viscosidad de la solución de recubrimiento es un parámetro clave y la superficie de los alimentos debe ser plana.

El método de aspersión es otra forma ampliamente utilizada para aplicar recubrimientos. Esta técnica ofrece un recubrimiento uniforme, control de espesor y la posibilidad de aplicaciones sucesivas que no contaminan la solución de recubrimiento. Este método puede controlar el tamaño de la gota, aumentar la cobertura y deposición de la gota, producir una distribución homogénea y reducir el desperdicio. Para poder evaluar el comportamiento de los recubrimientos comestibles, el espesor del recubrimiento es un parámetro importante el cual se debe medir, ya que puede influir en la morfología, la opacidad, las propiedades mecánicas y la capacidad de barrera de las películas resultantes. Los rendimientos de los recubrimientos comestibles no solo dependen de los métodos de recubrimiento empleados, sino también de las propiedades de los materiales de recubrimiento (tipo, cantidad, densidad, viscosidad y tensión superficial) (Zhong et al., 2014).

3. JUSTIFICACIÓN

El empaqueo de los alimentos es un área importante de la tecnología de alimentos, se encarga entre otros aspectos, de la preservación y protección contra el deterioro fisicoquímico y microbiano a todo tipo de alimentos.

En México, los patógenos reportados con mayor frecuencia en quesos tipo fresco, han sido *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*; Por motivo que se llegan a reportar de 200 a 500 casos de salmonelosis por 100 000 habitantes cada año.

La presencia de estos microorganismos patógenos son indicadores de la incorrecta manipulación y de una deficiente calidad sanitaria, respectivamente.

Las películas y recubrimientos comestibles desempeñan un papel importante en los alimentos para su conservación, distribución y comercialización.

Debido a que, en este trabajo, se combinará el quitosano con caseinato de sodio y reforzado con partículas de sílice mesoporosa conteniendo aceite esencial de orégano, es probable tener una mejor vida de anaquel de queso panela sin la necesidad de conservadores químicos como los usados actualmente en este tipo de productos (sorbato o natamicina).

Asimismo, se ha analizará el efecto de la incorporación del aceite esencial de orégano a las películas de quitosano a través de los cambios inducidos en las propiedades de la película y la actividad antimicrobiana de la película en queso fresco tipo panela.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Formular y caracterizar un recubrimiento comestible activo a base de caseinato de sodio y quitosano reforzado con partículas de sílice adicionadas con aceite esencial de orégano para aplicar en queso fresco tipo Panela.

4.2 Objetivos específicos

- Obtener partículas de sílice mesoporosas como modelo de liberación controlada de agentes bioactivos.
- Obtener aceite esencial de orégano mediante hidrodestilación y determinar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano.
- Diseñar un recubrimiento comestible a base de caseinato de sodio y quitosano, adicionando con partículas de sílice y aceite esencial de orégano.
- Evaluar las características fisicoquímicas, propiedades mecánicas, de barrera y antimicrobianas de la película.
- Aplicar el recubrimiento activo en queso panela y evaluar su efecto en las características de calidad del queso.

5. METODOLOGÍA

5.1 Materiales

Caseinato de sodio 91.4% de proteína, 1.2% sodio y 100% soluble en agua (New Zealand Dairy Board, Auckland, NZ), glicerol, ácido láctico 85%, bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), etanol, hidróxido de sodio y trietil ortosilicato (TeOS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Quitosano desacetilación $\geq 90\%$ (Chemsavers, Bluefield, VA, USA), aceite esencial de orégano (AEO), Tween 80 (J.T. Baker, Radnor, PA, USA), caldo soya tripticaseina (TSB), agar soya tripticaseina (TSA), agar cuenta estándar (Bioxon, CDMX, México).

5.2 Métodos

5.2.1 Extracción del aceite esencial de orégano (AEO)

El material vegetal de partida fue orégano (*Lippia graveolens* Kunth) que se obtuvo de Tolimán, Qro. La muestra se secó naturalmente a temperatura ambiente, de 4 a 6 días. El material seco se almacenó en bolsas de polietileno hasta su uso (Geraci et al., 2018). El AEO se obtuvo por hidrodestilación de cada una usando 250 g del material seco en 5 L de agua destilada en un tiempo de 3 h, utilizando un equipo tipo Clevenger. La capa oleosa del destilado obtenido fue removida y secada con sulfato de sodio anhídrido. El AEO fue esterilizado por filtración con uso de una unidad Swinnex con membrana (Millipore, Burlington, MA, EUA) de polifluoruro de vinilideno (PVDF) de tamaño de poro de 0.45 μm y posteriormente almacenado en viales protegidos de la luz a 4 °C para su posterior uso (Hernández-Hernández et al., 2014).

5.2.2 Síntesis de SM

Se preparó una solución de 240 mL de agua destilada y 1.75 mL de NaOH 2N para dispersar mediante un baño ultrasónico a temperatura ambiente, 0.5 g de bromuro de CTAB como el agente para generar poros, durante 5 min. La suspensión se calentó a 80°C en agitación constante y después se adicionó 2.5 mL de TeOS gota a gota durante 5 min, después se dejó en agitación continua durante 2 h. El resultante sólido se separó por medio de filtración y se lavó con etanol (EtOH) absoluto dos veces, después se secó

a temperatura ambiente. El polvo resultante se calcinó en una mufla (Thermolyne, Thermo scientific, EUA) a 500 °C durante 5 h para eliminar los rastros del tensoactivo. (Fernandez-Bats et al., 2018).

5.2.2.1 Adsorción del AE en las SM

Se cargaron las micropartículas de sílice mesoporosa con AEO, tomando 0.100 g de micropartículas, mezclando con 0.100 g de AEO disuelto en 5 ml de etanol puro, agitando durante 24 h en una campana de extracción. La cantidad de AE encapsulado se midió colocando las muestras encapsuladas en un desecador durante 24 h (Fernandez-Bats et al., 2018).

5.2.3 Efecto antimicrobiano del AEO

La determinación de efecto antimicrobiano de las partículas de sílice mesoporosas activadas con aceite de orégano se midieron usando *Salmonella* Saintpaul y *Listeria innocua* como microorganismos de prueba debido a su capacidad de crecer en queso fresco. Las cepas se activaron en caldo nutritivo a 37°C, transcurridas 24 h se resembraron en TSB durante 6 h y se realizó un conteo mediante el método de Miles & Mishra para la determinación de las UFC/mL. La población bacteriana se ajustó a 10⁷ UFC / mL en una solución de peptona.

Se empleo el método de difusión en agar para determinar la capacidad antibacteriana del AE libre y PSM con AEO. Se inoculó 10⁷ UFC/mL de *Salmonella* Saintpaul y *Listeria innocua* en agar suave (0.8% p/v) para verter en las placas con TSA solidificado (1.5 % p/v).

El AE libre con Tween 80 al 10% (v/v) en diferentes concentraciones (15% a 25% p/v) y las PSM con AEO se suspenderán en agua destilada estéril (40 mg/mL).

En membranas de polifluoruro de vinilideno (Millipore, Irlanda) de 25 mm de diámetro se impregnaron con 75 µL de cada dilución de AEO libre y 6 y 8 mg de PSM con AEO respectivamente. Las membranas se colocarán en la parte superior del agar blando y se dejaron difundir durante 3 h a 4°C y se incubaron a 37°C durante 120 h. Se midió la zona de inhibición del crecimiento usando un vernier, el efecto del surfactante se tomó como control (Hernández-Hernández et al., 2014).

5.2.4 Preparación de la solución filmogénica

5.2.4.1 Diseño experimental

Se evaluó el efecto de una mezcla para la generación de un recubrimiento a base de caseinato de sodio (CS), Quitosano (QU) y PSM a diferente volumen final de la solución filmogénica. Se realizaron dos proporciones de la mezcla de CS:QU (4:1, 8:1 p/p) con la presencia o ausencia de PSM en diferente volumen final de la mezcla (25 y 40 mL). Se realizó un diseño factorial completo 2^3 con tres réplicas. Cuadro (5).

Cuadro 5: Diseño experimental para el diseño de los recubrimientos comestibles.

Factor	Niveles	
CS:QU	4:1	8:1
Volumen (mL)	25	50
SM	Presencia	Ausencia

En el cuadro (6) se observan los 6 tratamientos utilizados en este proyecto.

Cuadro 6. Tratamientos del diseño experimental de las suspensiones filmogénicas

Tratamiento	CS:QU	Volumen (mL)	SM
T1	4:1	25	Presencia
T2	4:1	25	Ausencia
T3	4:1	50	Presencia
T4	4:1	50	Ausencia
T5	8:1	25	Presencia
T6	8:1	25	Ausencia
T7	8:1	50	Presencia
T8	8:1	50	Ausencia

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

5.2.4.2 Solución de caseinato de sodio con quitosano

La suspensión filmogénica de CS y QU se prepararon en dos relaciones diferentes 4:1 y 8:1 (CS:QU, p/p). El CS se disolvió en agua destilada (3.5% de proteína, p/v), posteriormente se ajustó el pH a 5.3. De manera similar, se llevó a cabo una solución de QU (1% p/v) dispersando el quitosano en una solución de ácido láctico 0.1 M, una vez disuelto, se ajustó la solución a pH 5.8. Cada suspensión se mantuvo bajo agitación hasta su completa disolución. El CS se agregó al QU dependiendo a cada relación, bajo agitación a 700 rpm. Para la adición del AEO libre, primero se disolvió en Tween 80 (2 g de Tween 80/g de AEO). Para la adición de las SM, se suspendieron en agua destilada (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se añadió a la suspensión filmogénica (2% SM) a CS:QU. Cada mezcla se ajustó a pH 5.0 y se agitó suavemente durante 20 min. Se agregó glicerol (Gly) como plastificante a una relación de peso Gly/CS de 30%.

Para las pruebas fisicoquímicas se vertieron la solución filmogénica en cajas Petri para obtener películas. La suspensión en las cajas se secó en una cámara climática a 35 °C. Las películas se despegaron y acondicionaron durante 24 h a 50% HR antes de las mediciones.

5.2.5 Determinación de las propiedades físicas, de barrera y antimicrobianas del recubrimiento

5.2.5.1 Potencial ζ y tamaño de partícula

El potencial eléctrico (potencial), el tamaño de partícula y el índice de polidispersión se midieron con el equipo Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Se realizaron tres mediciones de potencial ζ en cada muestra de solución filmogénica (1 mL). Se hizo a una temperatura de análisis de 25 °C. El equipo determina el diámetro medio de las partículas utilizando dispersión de luz dinámica. El

equipo usa un láser de helio-neón con potencia de operación de 4 mW y se fija a $\lambda = 633$ nm de emisión roja (Porta et al., 2016).

5.2.5.2 Espesor

El espesor de las PC se midió con un micrómetro con sensibilidad de 1 μm (Mod. IP65 Mitutoyo, Japón) colocando tiras de las PC entre las mandíbulas del micrómetro y el espacio se redujo hasta la fricción mínima. Se realizó el cálculo de el grosor promedio a partir de cinco mediciones en posiciones aleatorias (Giosafatto et al., 2014).

5.2.5.3 Color y Transparencia

Se utilizó un colorímetro para evaluar los parámetros L^* (luminosidad, blanco-negro), a^* (verde-rojo) y b^* (amarillo-azul). Se tomó la medición de 3 puntos por cada película.

La transparencia de las películas se determinó de acuerdo con el método descrito por (Lin et al., 2020) con modificaciones. La película comestible se cortó en tiras (1 x 4 cm). Los bordes superior e inferior de la muestra se fijaron en la superficie de una cubeta de cuarzo con cinta adhesiva y se midió la absorbancia a 600 nm usando un espectrofotómetro. La transparencia se calculó usando la ecuación:

$$T = \frac{A_{600}}{\delta}$$

Donde:

T= Transparencia

A= Absorbancia

δ = Espesor

5.2.5.4 Propiedades mecánicas

Se utilizó un equipo Instron Universal (Mod. 5543A, Norwood, MA, EUA) para medir la resistencia a la tensión (TS), elongación al punto de rotura (EF) y módulo elástico (EM) de acuerdo al método ASTM D882-10 (2010) con modificaciones utilizando el método de ensayo A, peso estático, velocidad de separación constante. La velocidad de separación de la cruceta fue de 5 mm/min en el modo de tensión (Giosafatto et al., 2014; Porta et al., 2016). estas tiras se equilibraron colocándolas a 50% de humedad relativa y 23°C en una cámara ambiental.

5.2.5.5 Permeabilidad a gases

La permeabilidad al oxígeno (O₂), dióxido de carbono (CO₂) y vapor de agua (H₂O) se midieron usando la técnica ASTM D3985 (1981) con modificaciones usando un equipo Multiperm (Extrasolution s.r.l., Pisa, Italia). Antes de la medición las muestras se acondicionaron a 50 % HR durante 2 h. La prueba se realizó a 25 °C y 50 % HR (Porta et al., 2015).

5.2.5.6 Solubilidad

La solubilidad de las películas se determinó de acuerdo con el método descrito previamente por Vahedikia et al. (2019). La materia seca inicial de las muestras se determinó colocando las películas en un desecador que contenía sulfato de calcio a 25 °C y 0% de humedad relativa (HR) durante 24 h. Luego se sumergieron las películas en 50 ml de agua destilada y luego se colocaron en una incubadora con agitador a 25 °C y se agitaron durante 24 h a 250 rpm. La solubilidad de la película (%) se calculó:

$$\text{Solubilidad en agua (\%)} = \frac{\text{Peso seco inicial} - \text{Peso seco final}}{\text{Peso seco inicial}} \times 100$$

5.2.5.8 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

El análisis microestructural de las secciones transversales de las películas se llevó a cabo utilizando la técnica SEM en un microscopio electrónico (FEI Quanta-250 FEG, Hillsboro, OR, USA). Se cortaron piezas de 6 mm x 1 mm de películas y fueron montados sobre cabos de cobre perpendicularmente a su superficie. Las muestras se recubrieron con oro y se observaron, utilizando un voltaje de aceleración de 10 kV.

5.2.5.8 Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)

La superficie de las películas se estudió mediante AFM, utilizando un instrumento multimodo NanoScope IIIa (Veeco Metrology Group, Digital Instruments, Fremont, CA, USA). Las formulaciones probadas fueron T3, T4, T7 y T8. En cada ensayo se obtuvo una imagen tridimensional de la superficie de una película (50 x 50 μm) y se capturaron tres imágenes por formulación. Se calcularon dos parámetros estadísticos relacionados

con la rugosidad de la muestra (método ASME B46.1, 1995): rugosidad promedio (R_a : promedio del valor absoluto de las desviaciones de altura de una superficie media), y rugosidad raíz-cuadrada media (R_q : raíz cuadrática promedio de las desviaciones de altura tomadas del plano de datos medio).

5.2.5.9 Efecto antimicrobiano de las películas

La actividad antimicrobiana se evaluó poniendo en contacto directo la PC de 25 mm de diámetro sobre la placa de agar correspondiente para cada microorganismo. Se usó el método de difusión en agar con inóculos de *Salmonella ser. Saintpaul* y *Listeria innocua*. El medio de cultivo se enfrió a 45°C y se inoculó con 1% (v/v) del microorganismo (10^7 UFC/mL, concentración final). Se identificó la zona de inhibición con un vernier restando el diámetro del disco de la película. El efecto antimicrobiano se determinó midiendo el diámetro de la zona de inhibición (Fernandez-Bats et al., 2018).

5.2.6 Elaboración del queso panela

Para la elaboración del queso panela se utilizó leche pasteurizada entera, la cual se llevó a una temperatura de 35 °C y se le agregó cloruro de calcio (0.4 ml/L). Posteriormente, se adicionó el cuajo (0.02 g/L) y se agitó constantemente para lograr su completa incorporación. Se dejó reposar por 30 min para favorecer la formación de la cuajada, y posteriormente realizar el corte de esta. Se procedió a la eliminación parcial del suero seguido de la etapa de salado, empleando NaCl al 0.6% (p/v) respecto al volumen inicial de leche (Villegas de Gante et al., 2016).

La pasta obtenida fue colocada en moldes por un periodo de 8 a 12 h en refrigeración para favorecer un mejor desuerado, concluido este periodo el queso se desmoldó para después aplicar la SF.

5.2.6.1 Diseño experimental

Para evaluar el efecto del recubrimiento se realizó a cabo un diseño unifactorial con el factor recubrimiento en tres niveles: sin recubrimiento, CS:QU y CS:QU PSM-AEO. Se utilizó como recubrimiento a los quesos la SF que presentó mejores características fisicoquímicas y antimicrobianas. La unidad experimental constó de dos recubrimientos

con y sin MS-AEO en quesos con réplica con un queso control, almacenando el queso en recipientes de polivinileno. Los tratamientos fueron aleatorizados. Se realizaron cinco mediciones en el tiempo de cada parámetro evaluado a los 0, 5, 10 y 15 días de almacenamiento. Los parámetros evaluados fueron: Humedad, pH, acidez titulable, cuenta de mesófilos aerobios y cuenta de mohos y levaduras.

5.2.6.2 Aplicación del recubrimiento comestible

El recubrimiento se aplicó en muestras de queso Panela usando una pistola de aspersión, las muestras se rociaron 2 veces dejando 2 min entre cada rociada. Después del proceso de recubrimiento, todas las muestras se drenaron en mallas de acero inoxidable y se secaron en una campana de flujo laminar durante 20 min, luego se colocaron en recipientes de plástico "clam-shell" estándar (Mod. 9756Z, Pactiv Corp., México) luego se almacenaron a 4 °C y se evaluaron a los 0, 5, 10 y 15 días de almacenamiento. Los quesos no recubiertos se usaron como control y se almacenaron y analizaron al mismo tiempo.

5.2.7 Evaluación del efecto de la aplicación del recubrimiento

5.2.7.5 Humedad

La humedad se determinó usando 1 g del queso homogeneizado mediante analizador de humedad (Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Switzerland) a 105 °C y las mediciones se realizaron por triplicado, expresándose la humedad como % en peso.

5.2.7.6 Determinación del pH y de la acidez titulable

Los valores de pH del queso se midieron mediante el uso de un potenciómetro Orion Star A211 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Esta medición se realizó por triplicado, se tomaron 10 g por pieza y se mezclaron con 20 mL de agua destilada.

La acidez titulable se determinó de acuerdo con la metodología descrita en la NOM-243-SSA1-2010. Se tomaron 18 g de muestra, homogenizando con 36 ml de agua destilada adicionando 0.5 mL de indicador de fenolftaleína y se tituló con solución de hidróxido de sodio 0.1 N hasta la aparición de un color rosa permanente por lo menos 30 s. Los resultados se reportan como % acidez titulable expresada como ácido láctico.

5.2.7.7 Determinación de cuenta bacteriana total y mohos y levaduras en queso durante el almacenamiento

El queso panela con y sin recubrimiento a los 0, 5, 10 y 15 días de almacenamiento se analizó por triplicado. Las muestras se prepararon de acuerdo con NOM-110-SSA1-1994. Se pesaron diez gramos de cada muestra, se mezclaron con 90 mL de agua Peptonada estéril y se homogenizó en un Stomacher (Seward).

El análisis de mohos y levaduras se realizó de acuerdo con la NOM-111-SSA1-1994 con algunas modificaciones. Se vertieron 1 ml de la muestra en cajas Petri y posterior se vació 15 mL de agar papa y dextrosa ($\text{pH} = 3.5 \pm 0.1$), se incubaron a 25 ± 1 °C; Las colonias (UFC/g) se evaluaron después de 3 días de incubación. Los resultados se informaron como Log_{10} UFC/g.

El recuento de bacterias aerobias mesófilas se realizó como se describe en NOM-092-SSA1-1994, usando agar cuenta estándar, vertiendo 1 ml de muestra e incubando durante 48 h a 35 °C. Los resultados se informaron como Log_{10} UFC/g.

5.3 Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron por triplicado y se reportó el promedio \pm desviación estándar. Se utilizó el análisis de varianza para determinar diferencias entre los tratamientos. Para determinar diferencias entre las medias se efectuó la prueba de Tukey, con un nivel de significancia $\alpha < 0.05$, utilizando el software estadístico JMP (versión 13).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Extracción del AEO

El AEO obtenido mediante el método de hidrodestilación, figura (11) presentó un color amarillento y olor característico a la planta (parámetros no determinados cuantitativamente). El rendimiento obtenido fue de 2.03% (p/p base seca), el cual se encuentra dentro del rango reportado por Guevara-Valderrama (2019) de 0.67 a 2.54% (p/p) para la misma variedad de orégano proveniente de la misma zona geográfica.

La cantidad y calidad del aceite extraído de plantas aromáticas pueden depender de diversos factores como tipo de suelo, condición de floración, parte utilizada de la planta, edad de la planta y condiciones de extracción (Asbahani et al., 2015; Rao et al., 2019). Por lo cual al tener el mismo orégano mexicano extraído de la misma zona geográfica es posible que por distinta condición ambiental y edad de la planta el rendimiento obtenido sea diferente al 4.29% (p/p) reportado por Hernández-Hernández et al. (2014).



Figura 11: Aceite esencial de orégano obtenido mediante hidrodestilación.

Se considera que el AEO utilizado en este trabajo tiene una composición alta en timol junto con γ -terpineno, debido a que Hernández-Hernández et al. (2014), reportaron la composición del AEO obtenido mediante el uso del mismo método de extracción, además de que las plantas usadas en ambos casos se encontraban en la etapa de

floración y es proveniente de la misma zona geográfica (Tolimán, Querétaro) que en este trabajo.

6.2 Síntesis y caracterización de las SM

Las SM poseen sistemas de poros ordenados con forma hexagonal y un tamaño dentro del rango de 2-50 nm. Este tipo de material posee características particulares que le brindan gran utilidad, ya que posee una baja toxicidad y una alta estabilidad química, un área de superficie con la capacidad de retención de compuestos debido a la absorción en sus poros. Además, de que han logrado demostrar que las PSM son capaces de reforzar las propiedades mecánicas de distintos materiales (Fernandez-Bats et al., 2018).

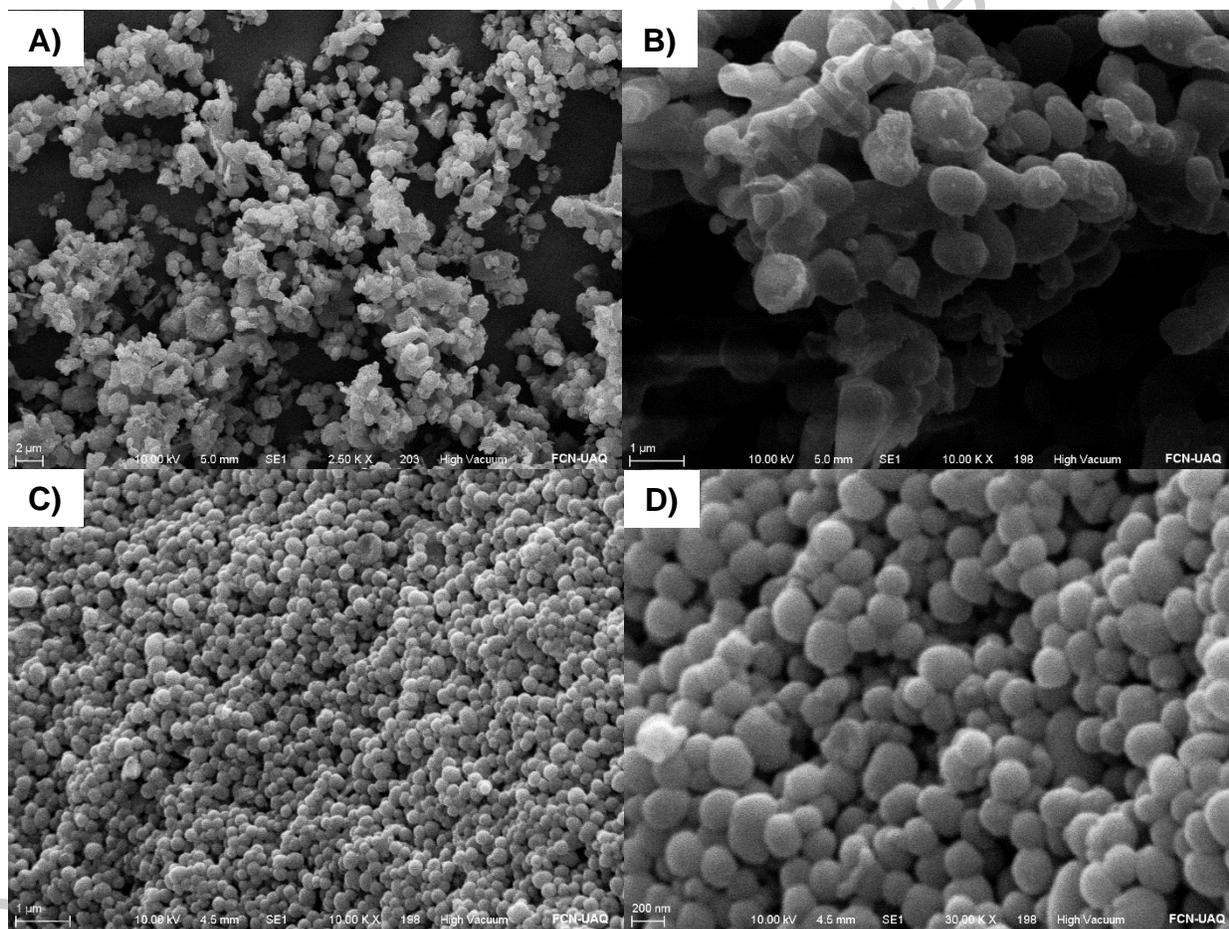


Figura 12: Observaciones SEM de A) 2.50k X SM B) 10.00k X SM C) 10.00k X SM-AEO y D) 30.00k X SM-AEO

En las observaciones por SEM de SM en la figura (12) se pueden observar que el tamaño de partícula es un aproximado de 1200 nm, al momento de adicionar el AEO con

las SM y etanol, estas reducen su tamaño a 360 nm y se muestran con una forma más homogénea, el cual se debe a que al momento de la absorción del aceite en las MS, estas se encuentran en agitación con el AEO y etanol, lo cual puede provocar que éstas por la misma agitación se pulan hasta reducir el tamaño, eliminando el tensoactivo restante y logrando encapsular el AEO dentro de sus poros como se puede observar en la figura (13).



Figura 13: MS y MS con AEO encapsulado

La forma y el tamaño de la SM varían debido al estado de agregación de las micelas del tensoactivo y su concentración. Debido a ello, el CTAB es el tensoactivo más usado ya que tiene la capacidad de servir como base para crear partículas de sílice con dimensiones entre 200 a 400 nm con poros ordenados y paralelos, que pueden usarse en como sistema de entrega de algún antimicrobiano. Sin embargo, existen otros factores que pueden modificar la morfología de las PSM durante su síntesis, como son la velocidad de agitación, la velocidad de goteo del TEOS y la temperatura de la síntesis (Fernandez-Bats et al., 2018).

6.3 Actividad antimicrobiana del AEO y las SM-AEO

En este estudio se utilizó AEO debido a que ya ha sido reportado su efecto antimicrobiano contra una gran variedad de microorganismos deterioradores en los alimentos (Hernández-Hernández et al., 2014; Carmagnini et al., 2015, Guevara-Valderrama, 2018).

La actividad antimicrobiana del AEO libre y el atrapado (t probablemente con una parte adsorbida) en SM se estableció determinando la inhibición de dos microorganismos

transmitidos por los alimentos al representar un ejemplo de bacterias Gram-positivas (*L. innocua*) y Gram-negativas (*S. Saintpaul*).

Se puede apreciar en la Figura (14) que el microorganismo más sensible al agente antimicrobiano fue *L. innocua*. Los resultados del diámetro de inhibición se detallan en el Cuadro (7).

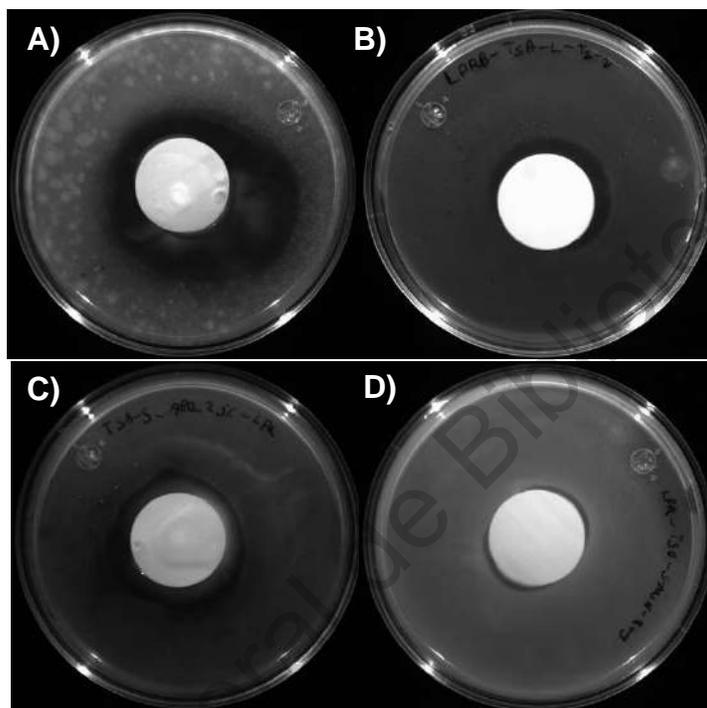


Figura 14: Actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano mexicano a distintas concentraciones contra *L. innocua* A) AEO 25% B) SM-AEO 8mg y *S. Saintpaul* C) AEO 25% D) SM-AEO

El AEO y las SM-AEO lograron presentar actividad antimicrobiana. El mayor efecto se observó contra *L. innocua*, y con *S. spp. Saintpaul*; sin embargo, no se presentó halo de inhibición usando 6 mg de PSM-AEO.

Carmagnini et al., (2015) demostraron un halo de inhibición en AEO al 25% para *L. monocytogenes* y *S. Enteritidis* de 5 mm. Ruiz-Rico et al., (2017) muestran actividad antimicrobiana con SM MCM-41 conteniendo componentes volátiles de AEs logrando obtener inhibición con 0.15 mg/mL para *L. innocua* y 0.2 mg/mL para *E. coli* como Gram-negativa.

Cuadro 7: Diámetros de la zona de inhibición del AEO y SM-AEO

Microorganismo	Diámetro de la zona de inhibición (mm)			
	AEO		SM-AEO	
	15 %	25 %	6 mg	8 mg
<i>L. innocua</i>	18.67 ± 1.53 ^a	24.83 ± 2.36 ^a	0.93 ± 0.12 ^a	6 ± 0.2 ^a
<i>S. Saintpaul</i>	8.33 ± 2.52 ^b	14.64 ± 2.08 ^b	0.00 ^b	2.67 ± 1.53 ^b

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

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

La diferencia en la cantidad necesaria de los aceites esenciales para lograr actividad antimicrobiana puede deberse a los cambios en la composición, ya que ésta se les atribuye a los compuestos aromáticos (fenólicos) presentes en los aceites, debido a que tienen una función para permeabilizar la membrana. El mecanismo de acción de los aceites esenciales contra microorganismos es complejo y no ha sido explicado en su totalidad, siendo lo más probable que su actividad antimicrobiana no sea atribuible únicamente a un mecanismo en específico sino que existan distintos sitios afectados en la célula (Rao et al. 2019), como se sugiere en la Figura (4).

Cabe mencionar que los microorganismos Gram-positivos son generalmente más sensibles a los aceites esenciales que los Gram-negativos (Varga et al., 2015).

6.4 Caracterización y estabilidad de la suspensión filmogénica (SF)

El tamaño de partícula, potencial ζ e índice de polidispersión son datos que ayudan a explicar la estabilidad de una solución formadora de película. Se evaluó el potencial ζ y tamaño de partícula de las diferentes mezclas de CS y QU, como se observa en el cuadro (8) utilizadas para la elaboración de los recubrimientos comestibles. Sabbah et al., (2016) y Croissant et al., (2018) mencionan que entre más grande sea el valor absoluto del potencial ζ (>30 mV), las partículas en suspensión son más estables como consecuencia de la repulsión electrostática y se mantendrán en suspensión más tiempo.

En el **anexo 1** se muestra la interacción de la titulación del CS en QU con relación a su potencial ζ y tamaño de partícula promedio de la mezcla y su comportamiento, a medida de la adición de SC en el QU se comporta estable, hasta que el aumento de la

proteína llega a desestabilizar el pH de la solución, provocando el aumento del tamaño de partícula y la precipitación de los compuestos. En el **anexo 2** se muestra la titulación del QU en el CS, donde se puede observar un potencial ζ inestable, a lo que puede llevar a la precipitación de los compuestos, la cual forma un complejo tipo goma entre el CS y QU.

En los resultados del cuadro (8), los tratamientos se encuentran en un intervalo de potencial ζ de 17.8 a 36.9 mV, mostrando un valor ζ estable en los tratamientos de 50 mL. Los valores menores de 30 mV pueden deberse a que la proteína se encuentra cerca de su punto isoeléctrico, puede haber presencia de agregación molecular evitando una interacción con el QU por la ausencia o casi ausencia de interacciones electrostáticas. También se observó que, en los tratamientos sin precipitación del CS, las SM ayudaron a incrementar el potencial ζ debido a las interacciones entre partículas formando una solución más estable.

El tamaño de partícula por lo general es reportado como el promedio del tamaño de todas las partículas dentro en una suspensión. Este valor es una representación del diámetro de una partícula que representa el número total de partículas de la muestra (Esposito et al., 2016). El volumen de las soluciones filmogénicas determina la velocidad del secado para obtener las películas y estas pueden obtener diferentes comportamientos debido a la organización de las partículas de la solución al momento del secado. El cuadro (8) muestra un menor tamaño de partícula en las soluciones con volumen de 50 mL en comparación de las de 25 mL (**anexos 3 y 4**), esto puede atribuirse a la presencia de partículas precipitadas de la proteína CS al momento de ajustar el pH, por lo que debido al bajo volumen (25 mL), es más probable que los H^+ se concentren y permitan que al menos parte de la proteína alcance su punto isoeléctrico. Así mismo en el **anexo 4** se logra identificar la predominancia de partículas de menor tamaño en las soluciones SF.

Cuadro 8: Potencial ζ , tamaño e índice de polidispersión de las SF.

<i>Tratamiento</i>	<i>Potencial ζ (mV)</i>	<i>Tamaño de partícula (nm)</i>	<i>Índice de polidispersión</i>
4:1 CS:Q 25 mL PSM	17.2 ± 7.28 ^d	1438 ± 59.77 ^a	0.87 ± 0.05 ^b
4:1 CS:Q 25 mL	18.5 ± 0.76 ^d	1369 ± 45.21 ^a	0.66 ± 0.20 ^{bc}
4:1 CS:Q 50 mL PSM	36.93 ± 1.22 ^a	1008.00 ± 4.58 ^b	0.39 ± 0.06 ^d
4:1 CS:Q 50 mL	34.77 ± 1.23 ^{abc}	1010.64 ± 8.14 ^b	0.54 ± 0.01 ^c
8:1 CS:Q 25 mL PSM	17.5 ± 2.43 ^d	5352 ± 704.01 ^c	1 ^a
8:1 CS:Q 25 mL	18.4 ± 1.51 ^d	5257 ± 522.18 ^c	0.91 ± 0.15 ^b
8:1 CS:Q 50 mL PSM	30.93 ± 1.07 ^{bc}	764.8 ± 23.30 ^d	0.50 ± 0.01 ^{cd}
8:1 CS:Q 50 mL	30.33 ± 1.33 ^c	781.33 ± 11.72 ^d	0.53 ± 0.02 ^{cd}

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

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

Las SF presentaron valores de IP en un intervalo de 0.39 a 0.54 para los tratamientos con 50 mL, lo que indica que mostraron una distribución muy amplia en el tamaño de las partículas de la suspensión, caso contrario con los tratamientos de 25 mL los cuales debido a su gran tamaño de partícula por precipitación del CS. El índice de polidispersión muestra la distribución de tamaño de las partículas en una suspensión, mostrando que tan homogéneas son las partículas de un material. Este es cero para una población monodispersa. Un índice de polidispersión >0.5 nos indica una distribución muy amplia en el tamaño de las partículas de un material (Schwarz & Mehnert, 1999).

6.5 Propiedades mecánicas de las películas

Se elaboraron películas con las SF para determinar su grosor y sus propiedades mecánicas y de barrera. Las películas obtenidas se pueden observar en la figura (15).

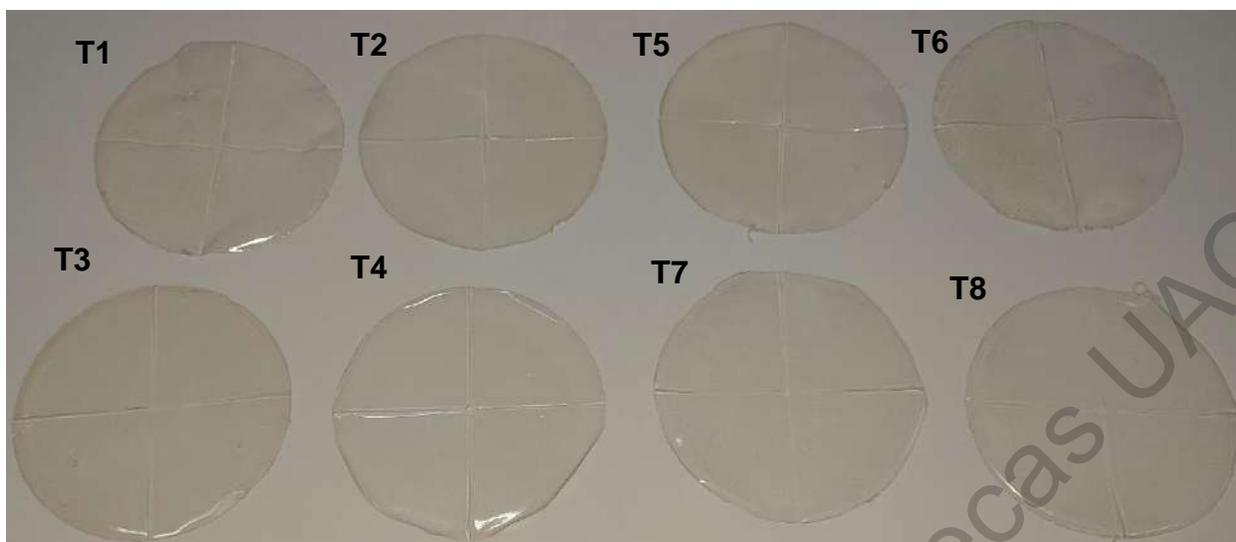


Figura 15: Películas de CS:QU obtenidas del diseño experimental para las SF, según el Cuadro (6).

Fue posible obtener películas translúcidas de todos los tratamientos con presencia de pequeños grumos resultado de la posible precipitación del caseinato de sodio debido al pH de 5.3 para formar la suspensión filmogénica, el cual se encuentra próximo a su punto isoeléctrico.

En el cuadro (9) se presentan las variables respuesta correspondientes a las propiedades mecánicas y al espesor de las películas.

Se midió el espesor en 5 puntos de cada película y los resultados muestran que los 8 tratamientos se encuentran en un rango de 57 a 73 μm , reduciendo el rango reportado por Pereda et al. (2007) que obtuvieron resultados similares para películas elaboradas con caseinato de sodio y quitosano 0.8:1 (CS:Q) que se encontraban en un rango de 50 a 90 μm . Se puede observar una disminución en el espesor con la presencia de las SM-AEO en SF con 50 mL, esto puede explicarse debido a que las SF con mayor volumen puede dispersarse mejor la proteína e interactuar con las SM evitando aglomeramiento de partículas, logrando formar una película más delgada.

Cuadro 9: Espesor y propiedades mecánicas de las películas de CS:Q

Tratamiento ^a	Espesor (μm)	Resistencia a la tensión (MPa)	Elongación (%)	Módulo de Young (MPa)
T1	63 \pm 2.94 ^{ab}	9.74 \pm 0.58 ^a	78.83 \pm 10.34 ^b	51.01 \pm 8.62 ^a
T2	71.5 \pm 11.03 ^a	5.80 \pm 2.46 ^b	62.17 \pm 2.93 ^d	38.50 \pm 2.49 ^b
T3	59.75 \pm 4.99 ^{ab}	8.71 \pm 1.57 ^a	99.52 \pm 1.32 ^{ab}	15.71 \pm 1.39 ^c
T4	69.25 \pm 5.44 ^{ab}	7.06 \pm 0.92 ^{ab}	103.24 \pm 2.42 ^a	12.48 \pm 1.38 ^c
T5	72.75 \pm 4.99 ^a	1.52 \pm 0.29 ^c	107.90 \pm 7.30 ^a	2.44 \pm 0.94 ^d
T6	62.5 \pm 4.51 ^{ab}	4.55 \pm 0.98 ^b	91.16 \pm 5.31 ^b	8.96 \pm 4.09 ^{cd}
T7	57.5 \pm 4.51 ^b	9.11 \pm 1.90 ^a	66.04 \pm 2.24 ^d	13.70 \pm 2.26 ^c
T8	65 \pm 4.83 ^{ab}	4.59 \pm 0.59 ^b	97.81 \pm 0.32 ^{ab}	7.60 \pm 2.96 ^{cd}

^a Los factores usados para cada tratamiento se pueden observar en el cuadro (6).

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

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

Los tratamientos con presencia de SM presentaron diferencias significativas ($\alpha<0.05$) en cuanto a la resistencia a la tensión (RT), el % de elongación (%E) y el módulo de Young (MY); ya que se requirió mayor fuerza para romper esas películas y disminuyó su capacidad de extenderse que las que no contenían SM.

Este resultado puede ser debido a que las propiedades mecánicas de los materiales se pueden asociar en gran medida con la distribución y la densidad de las interacciones intra e inter moleculares de los biopolímeros que pueden determinar la red para formar películas (Giosafatto *et al.*, 2019).

Pereda *et al.* (2007), reportaron para películas de CS:QU (8:10) una RT de 19.6 \pm 2.8 MPa, %E de 47.9 \pm 5.7 % y M de 223.6 \pm 63.8 MPa. Lin *et al.* (2020) reportaron películas de CS entrecruzadas con genipino, RT de 8.45 \pm 0.99 MPa, %E de 24.94 \pm .84 % y M de 356.7 \pm 22.1 MPa. Se observa que las propiedades mecánicas de un material de empaque se deben a las interacciones intra e inter moleculares de los biopolímeros, y estas dependen por completo de la naturaleza de los componentes. Se puede ver una mejora significativa en la RT y %E al agregar SM, y una disminución significativa del MY en

presencia de estas; esto se puede observar en los resultados de películas con los tratamientos 1, 3, 5 y 7.

6.6 Microestructura de las películas

AFM realizó imágenes topográficas para evaluar las rugosidades de la superficie de las películas de los tratamientos 3, 4, 7 y 8. Las imágenes representativas en 3D, para áreas de exploración de $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$, de las superficies de películas con y sin SM-AEO se muestran en la figura (16). Se logra observar una mayor rugosidad en las películas con relación 4:1 CS:QU, así mismo, la adición de SM-AEO condujo a un aumento notable en la rugosidad de las películas, manifestado por el aumento de la rugosidad.

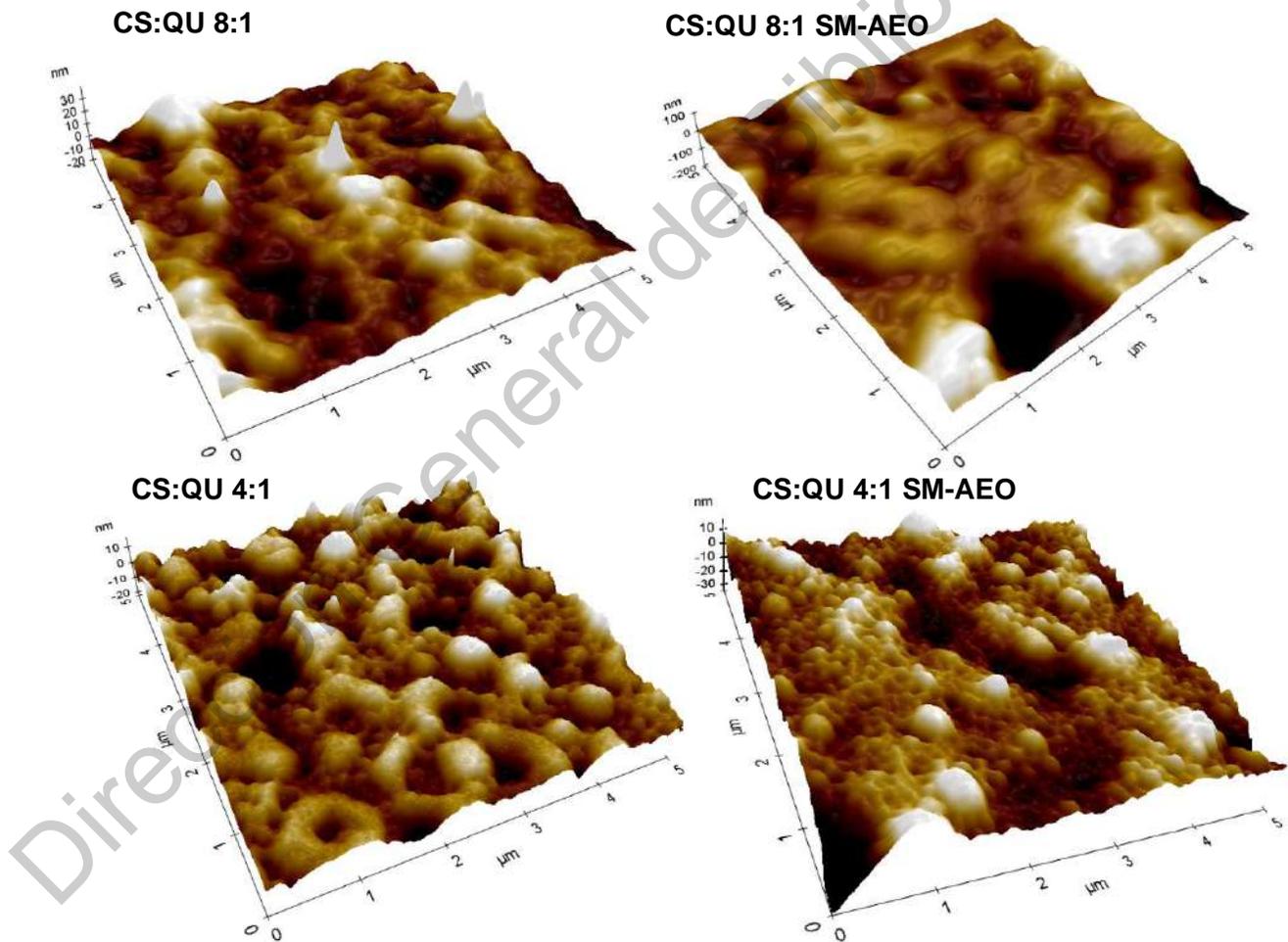


Figura 16: Gráficos 3D obtenidos de AFM de películas.

La superficie de las películas se pueden observar algunas micropartículas aisladas y pequeñas burbujas de aire, como se muestra en la figura (16). La presencia de SM-AEO logra conducir a un aumento de la rugosidad en la relación 8:1 CS:QU probablemente debido a su adición se extiende sobre la superficie de la matriz que contiene más CS reduciendo sus irregularidades. De la misma manera, en la formulación de 4:1, se observó un aumento de R_a y R_q , cuadro (10).

Cuadro 10: Parámetros de rugosidad obtenidos del análisis AFM de películas comestibles basadas en CS:QU con y sin SM-AEO

Tratamiento	R_q (nm)	R_a (nm)
CS:QU 8:1	3.196 ± 0.974 ^a	1.048 ± 0.227 ^a
CS:QU 8:1 SM-AEO	5.039 ± 0.599 ^b	3.886 ± 0.473 ^b
CS:QU 4:1	3.756 ± 0.892 ^b	2.880 ± 0.620 ^b
CS:QU 4:1 SM-AEO	4.500 ± 0.255 ^b	3.439 ± 0.158 ^b

*Los resultados se reportan como la media ± la desviación estándar (n=3).
Letras iguales indican que no existe diferencia significativa por la prueba Tukey ($\alpha < 0.05$).*

La microestructura final de las películas resulta de las interacciones entre los componentes y los fenómenos desestabilizadores que tienen lugar durante la etapa de secado. En la figura (17) se muestran las micrografías de SEM de los tratamientos 7 y 8. Un diferente arreglo puede ser observado conforme la composición de la película. La película que contiene solo la relación 8:1 CS:QU y GLY muestra una microestructura suave, lisa y homogénea, mientras que las películas que ya contienen las MS-AEO muestran una estructura discontinua con las partículas ya incrustadas en la superficie de la película.

Un comportamiento similar fue reportado por Fabra et al., (2009) con películas de CS conteniendo mezclas de ácido oleico y cera de abeja, las cuales las microestructuras de sus películas control que contenían solamente CS y GLY muestran una superficie homogénea y lisa y conforme se le añadía la mezcla de ácido oleico y cera de abeja, la cual se puede observar que la masa lipídica se incrustaba en la matriz de la película.

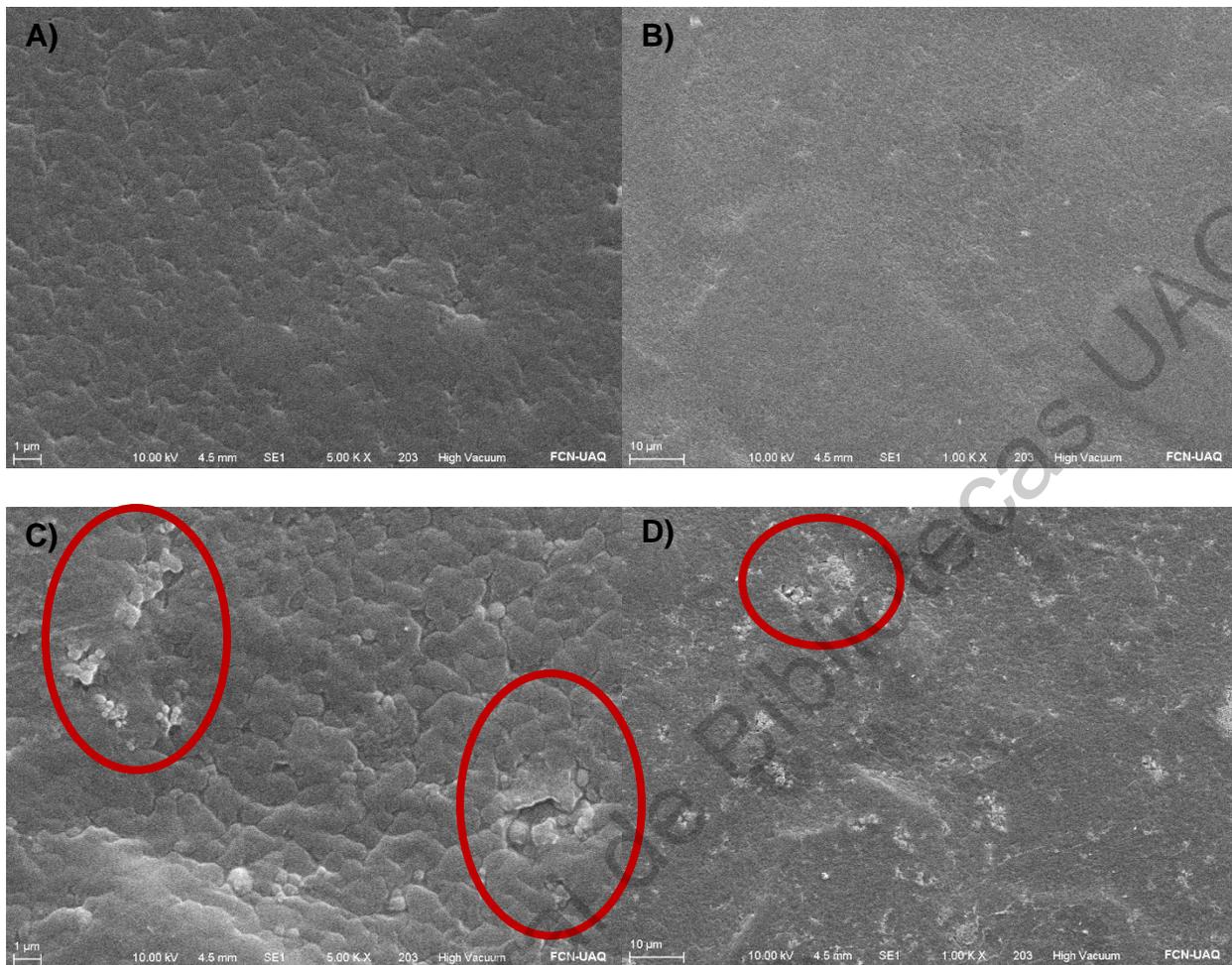


Figura 17: Micrografía SEM de películas A) 5.00k X B) 1.00k X CS:QU 8:1 a 50 mL y C) 5.00k X D) 1.00k X CS:QU 8:1 con MS-AEO a 50 mL.

En conclusión, las diferencias estructurales son notables debido a la adición de las MS-AEO están determinadas por el diferente comportamiento durante el secado, las cuales resultan la exposición de éstas y cubiertas bajo escamas del complejo de la CS y el QU.

6.6 Color de las películas

Las películas obtenidas fueron translúcidas, el color en materiales de empaque proporciona un aspecto estético debido a que es favorable no interferir con la apariencia de los alimentos. En los resultados obtenidos al medir el color de las películas se puede apreciar que se observa un valor L alto, cuadro (11). Además, este cuadro muestra que la adición de las SM en las películas no presentó diferencia significativa.

Las propiedades ópticas de las películas dependen en parte de las características del disolvente, los aditivos y de las condiciones de preparación de la película: pH, homogenización y secado (Vahedikia et al., 2019).

Los valores negativos en b^* se pueden deber al precipitado de las partículas de CS en los tratamientos con menor volumen.

Cuadro 11: Parámetros de color L^* , a^* , b^* y transparencia de las películas de CS:Q

Tratamiento ^a	L^*	a^*	b^*	Transparencia
T1	88.99 ± 0.12 ^d	-0.18 ± 0.05 ^d	4.33 ± 0.27 ^a	1.15 ± 0.15 ^{ab}
T2	90.29 ± 0.13 ^c	0.15 ± 0.05 ^c	1.01 ± 0.19 ^b	0.95 ± 0.06 ^b
T3	91.62 ± 0.13 ^b	0.33 ± 0.01 ^{ab}	-1.16 ± 0.22 ^c	0.89 ± 0.01 ^b
T4	92.00 ± 0.11 ^{ab}	0.34 ± 0.01 ^{ab}	-1.39 ± 0.14 ^c	1.04 ± 0.08 ^{ab}
T5	90.03 ± 0.03 ^c	0.15 ± 0.03 ^c	1.80 ± 0.35 ^b	1.42 ± 0.22 ^a
T6	91.70 ± 0.06 ^{ab}	0.34 ± 0.01 ^{ab}	1.12 ± 0.05 ^b	1.01 ± 0.01 ^b
T7	92.01 ± 0.28 ^{ab}	0.29 ± 0.04 ^b	-1.18 ± 0.37 ^c	0.82 ± 0.02 ^b
T8	92.19 ± 0.13 ^a	0.39 ± 0.01 ^a	-1.79 ± 0.04 ^c	1.03 ± 0.02 ^{ab}

^a Los factores usados para cada tratamiento se pueden observar en el cuadro 6. Los resultados se reportan como la media ± la desviación estándar (n=3). Letras iguales indican que no existe diferencia significativa por la prueba Tukey ($\alpha < 0.05$).

La transparencia podría afectar el aspecto, la comercialización y las aplicaciones prácticas de las películas de envasado de alimentos. Una mayor transparencia en películas y recubrimientos comestibles pueden conferir una mejor visibilidad para los alimentos. En los resultados mostrados en la cuadro (11), se puede observar que las películas de CS preparadas con SM en volumen de 50 mL tuvieron la mayor transparencia (0.82±0.02). En los tratamientos 1 y 5, muestran una menor transparencia. Esto se debe a la presencia de agregados de la proteína en la película lo que provoca que con la adición de las PSM disminuya aun mas su transparencia.

Lin et al. (2020) presentaron valores de transparencia para películas de CS (0.97±0.29) y con la adición de 1.5 mg de genipino de (3.69±0.38). Los valores de transparencia para películas sintéticas hechas de polietileno de baja densidad, polipropileno direccional y cloruro de polivinilo presentadas por Shiku et al. (2003) fueron 3.05, 1.67 y 4.58,

respectivamente. La transparencia de las películas comestibles CS adicionadas con SM preparadas en este estudio fue relativamente mayor con las películas de CS con y sin genipino, así mismo son comparables a las películas plásticas sintéticas.

6.7 Solubilidad

La solubilidad en las películas y recubrimientos comestibles es una característica que puede afectar en alimentos que liberen su contenido de agua, provocando que los biomateriales de empaque se disuelvan en ésta.

Los resultados de la prueba de solubilidad se muestran en la Figura (18). Todos los tratamientos de 50 mL obtuvieron una solubilidad menor de 37%.

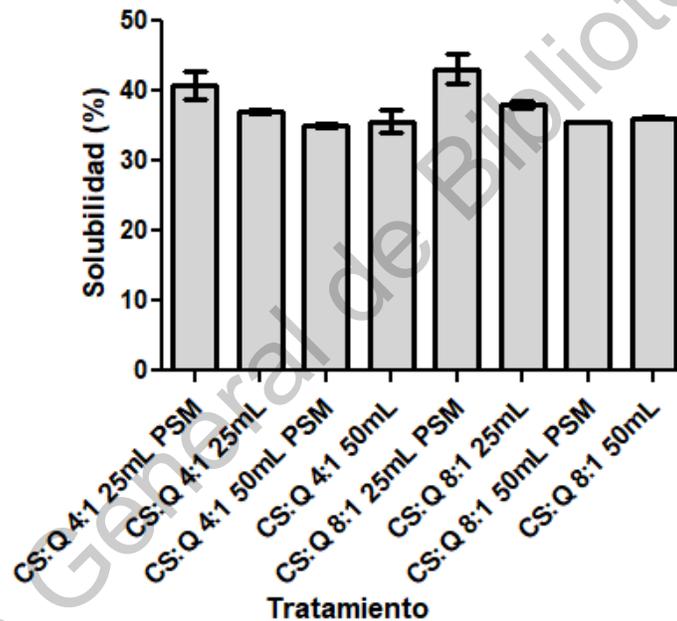


Figura 18: Solubilidad en agua de las películas comestibles.

Vahedikia et al. (2019), reportaron una solubilidad para películas de proteína de zeína de 40.08 % y con la adición de nanopartículas de quitosano adicionadas con aceite esencial de canela de 39.13 %. La adición de nanocompuestos muestran un patrón más hidrofóbico, debido principalmente a la interacción de los componentes del aceite esencial en los ésteres y los grupos de aminoácidos de la matriz de la proteína.

6.8 Propiedades de barrera

Además de poseer buenas propiedades mecánicas, los empaques de alimentos deben tener la capacidad de ser una barrera contra los gases, sabores y aroma para mantener la calidad de los alimentos durante su vida anaquel. Aunque debido a su alta sensibilidad a la humedad, la aplicación de empaques a base de proteínas y polisacáridos pueden verse afectados (Giosafatto *et al.*, 2014).

En esta investigación se consideró evaluar el efecto de la presencia y ausencia de las SM-AEO en las propiedades de barrera de las películas de CS con QU en el volumen total de 50 mL de SF. Los resultados se pueden observar en el Cuadro (12).

Cuadro 12: Determinación de permeabilidad al CO₂, O₂ y vapor de agua, de las películas

Tratamiento	O₂	CO₂	H₂O
CS:Q 8:1 (Control)	0.217 ± 0.015 ^a	0.514 ± 0.022 ^a	0.0735 ± 0.0100 ^a
CS:Q 8:1 c/SM-AEO	0.328 ± 0.019 ^b	0.340 ± 0.018 ^b	0.0321 ± 0.0142 ^a
Mater-BI*	22.690 ± 0.110	8.350 ± 0.230	15.68 ± 0.11
Polietileno de baja densidad**	7	1	0.2
Polietileno de alta densidad**	1	0.03	0.04

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

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

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

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

El tratamiento control mostró tener mayor permeabilidad al CO₂, aunque no fue significativamente diferente al que se le adicionó SM. La incorporación de SM demostró tener un efecto positivo debido a que disminuyó la permeabilidad a CO₂ y H₂O, lo anterior

demuestra que las SM-AEO fueron eficientes para reforzar las películas y además de disminuir permeabilidad a gases, lo anterior puede deberse a que el AEO presente en las películas crea un carácter hidrófobo que es menos sensible al vapor de agua.

Fernandez-Bats *et al.*, (2018) y De Jesús-Fuentes (2019) reportaron una reducción en la permeabilidad al O₂ y CO₂ al agregar SM en películas elaboradas a base de proteína de chícharo y proteína de chícharo con quitosano, respectivamente.

Es importante mencionar la baja permeabilidad al O₂ en las películas con y sin SM ya que es 70 veces menor que Mater BI, película disponible comercialmente y 20 veces menor que el polietileno de baja densidad. La permeabilidad al O₂, es de vital importancia, ya que su presencia en ciertos alimentos provoca desarrollo de microorganismos y reacciones de oxidación que afectan el sabor, calidad y aceptabilidad de los alimentos.

De igual manera, la baja permeabilidad al H₂O en las películas con y sin SM representa un valor significativamente menor que el Mater BI y polietileno de baja densidad y ligeramente menor a la permeabilidad del polietileno de alta densidad. La permeabilidad al vapor de H₂O es muy importante en los recubrimientos, ya que al ser aplicados sobre una matriz alimentaria pueden ayudar a disminuir la transferencia de agua entre el alimento y su ambiente, provocando menor deterioro de éste y alargando su vida de almacenamiento.

6.9 Actividad antimicrobiana de las películas comestibles

Se determinó la actividad antimicrobiana de las películas que contenían SM-AEO, cuadro (13). Se eligió usar el tratamiento de CS:QU 8:1 (p/p), 50 mL, con SM, debido a sus sobresalientes propiedades mecánicas y de barrera, y se hizo una comparación con una película conteniendo aceite esencial libre (aproximado de 16 mg por película).

Cuadro 13: Diámetro de la zona de inhibición de la actividad antimicrobiana de las películas

Microorganismo	Diámetro de la zona de inhibición (mm)		
	8:1 CS:QU (Control)	8:1 CS:QU con AEO	8:1 CS:QU con SM- AEO
<i>L. innocua</i>	0.18 ± 0.04 ^a	1.8 ± 0.64 ^a	3.5 ± 0.50 ^a
<i>S. Saintpaul</i>	0 ^b	0.73 ± 0.09 ^b	2.17 ± 1.04 ^a

Los resultados se reportan como la media ± la desviación estándar (n=3).
 Letras iguales por columna indican que no existe diferencia significativa por la prueba Tukey($\alpha < 0.05$)

Se observó que la película con SM-AEO mostró zonas de inhibición en todos los microorganismos, ya que presentó mayor difusión del agente antimicrobiano.

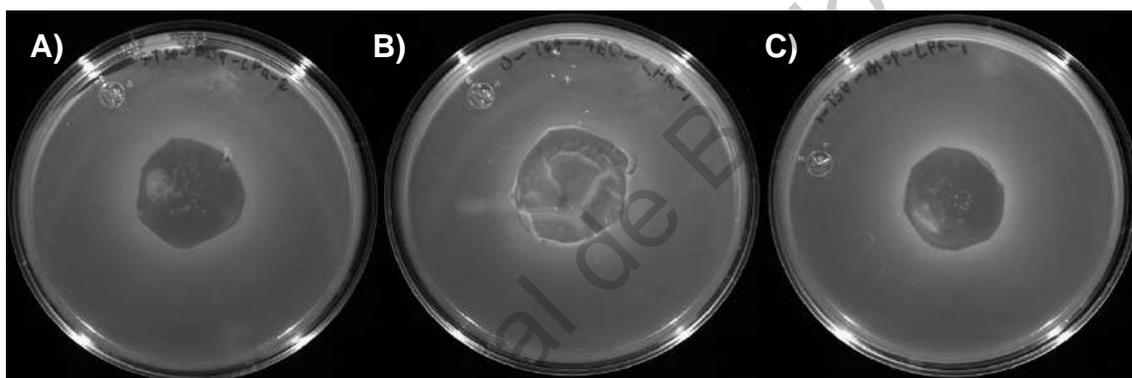


Figura 19: Actividad antimicrobiana de las películas con 8 mg / ml de AEO y SM-AEO contra *L. innocua*. A) Película control (sin AEO), B) Película con AEO libre C) Película con SM-AEO.

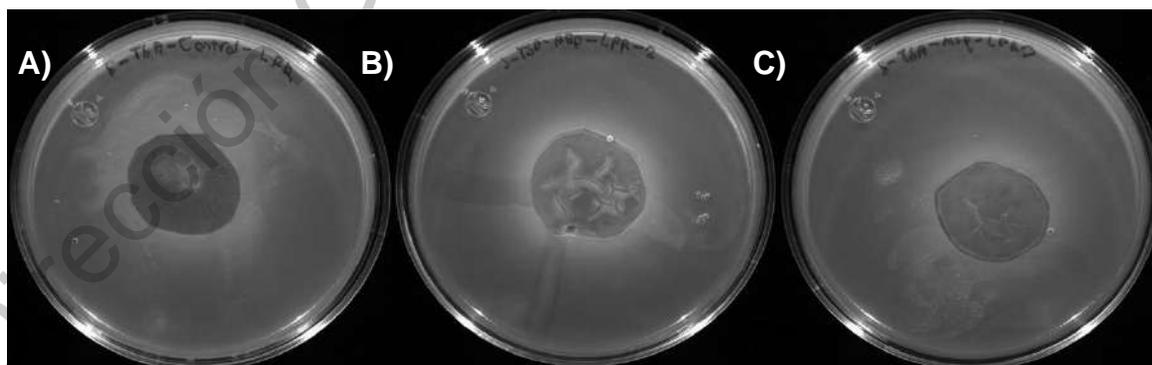


Figura 20: Actividad antimicrobiana de las películas con 8 mg / ml de AEO y SM-AEO contra *S. Saintpaul*. A) Película control (sin AEO), B) Película con AEO libre C) Película con SM-AEO.

Iturriaga et al. (2012) mostraron la actividad antimicrobiana para *L. innocua* con diferentes EO y observaron una zona de inhibición más alta a una temperatura más baja (4 °C).

La razón de que se ve disminuida la actividad antimicrobiana del AEO libre y SM-AEO, es debido a que al momento de incorporarse a un recubrimiento comestible, el efecto antimicrobiano del AEO se ve afectado, ya que la presencia de otros compuestos pueden reducir la difusión del de estos agentes antimicrobianos (Arredondo-Ochoa *et al.*, 2017).

También se observó una diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) entre la actividad antimicrobiana de las películas con AEO libre y SM-AEO, debido que al momento del secado de las películas, el AEO libre puede perder sus componentes volátiles lo que disminuye significativamente su actividad antimicrobiana, por lo que la adsorción y absorción en poros capilares del AEO en SM dan ciertas ventajas al liberar a éste gradualmente, asimismo otorgando al recubrimiento buenas propiedades mecánicas, de barrera y buena actividad antimicrobiana sin afectar las propiedades organolépticas al alimento.

6.10 Aplicación del recubrimiento comestible

En esta investigación se realizó la evaluación del efecto fisicoquímico y antimicrobiano del recubrimiento en queso Panela. Se eligió el recubrimiento CS:Q 8:1 (p/p) con SM-AEO. Este tratamiento fue elegido debido a sus propiedades fisicoquímicas y antimicrobianas previamente descritas. Se usaron como control quesos sin recubrir y quesos recubiertos con CS:Q 8:1 (p/p). Los quesos control y recubiertos fueron evaluados durante 15 d de almacenamiento en refrigeración, figura (16).

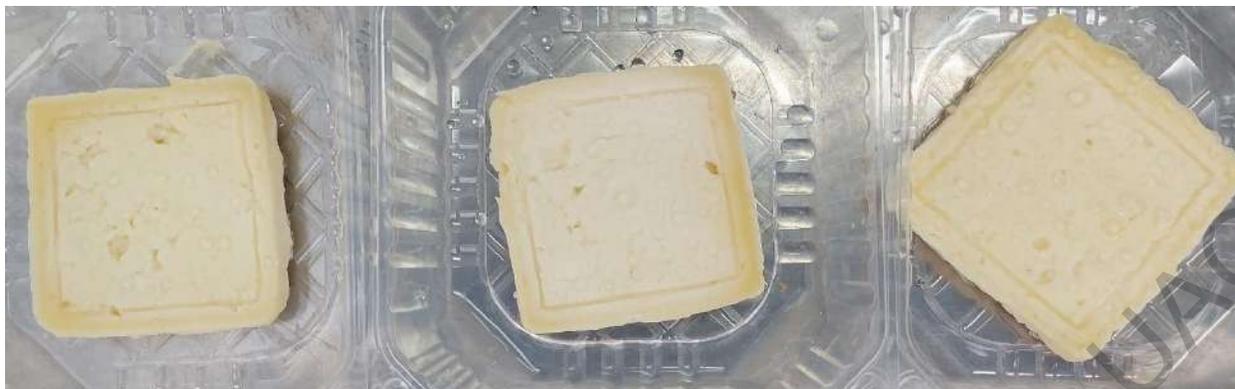


Figura 21: Evaluación del queso panela al día 15. A) Control, B) Recubrimiento control y C) Recubrimiento con SM-AEO

El queso es un alimento altamente nutritivo con muchos sabores y texturas diversos. Se puede ingerir como bocadillo, parte de la comida o puede ser pre-empaquetado. Aproximadamente un tercio de la producción mundial de leche se utiliza en la fabricación de queso (Farkye, 2004). El queso Panela es popular debido a su alto valor nutricional, sabor y textura. Sin embargo, si éste se prepara con leche sin pasteurizar o se contamina por bacterias patógenas después de su elaboración, las bacterias se multiplican rápidamente en condiciones eutróficas (Ramírez & Vélez, 2012).

6.11 Porcentaje de humedad

En cuanto al porcentaje de humedad de los quesos control y recubiertos, los resultados se muestran en la Figura (22). Se puede observar una diferencia entre los resultados a través del tiempo de almacenamiento, esta disminución se debe al desuerado que comúnmente se da en quesos frescos .

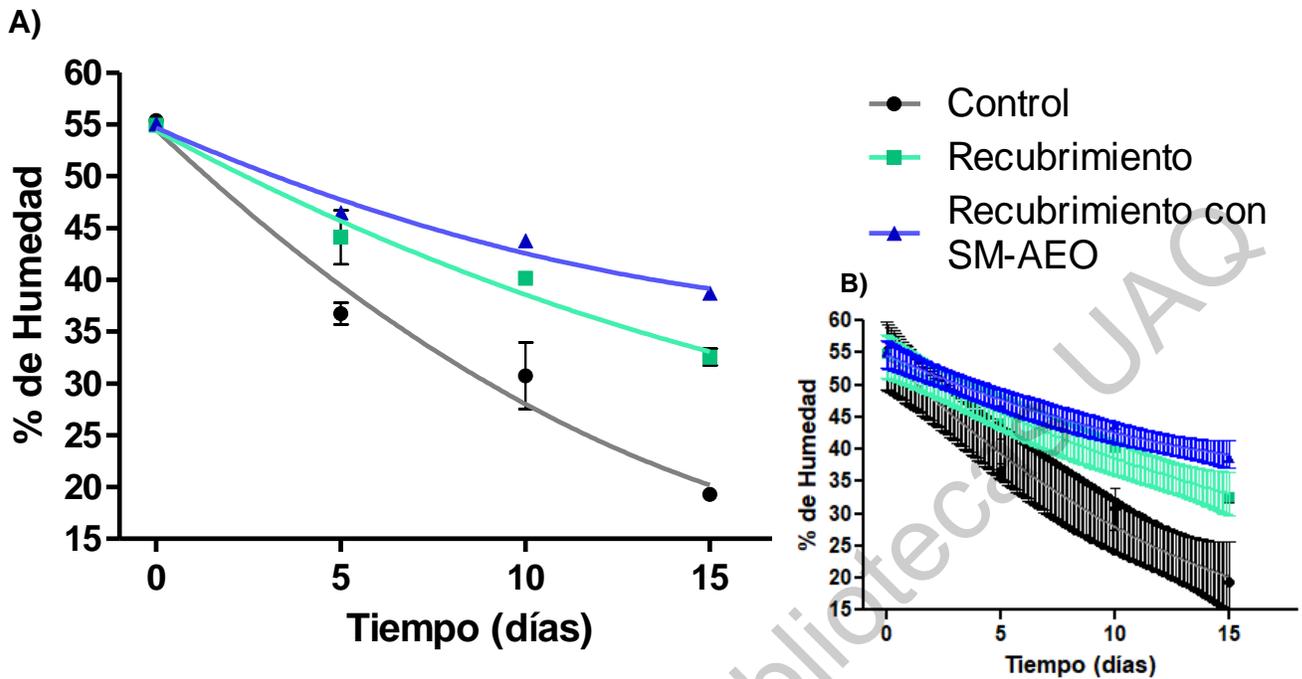


Figura 22: Evaluación del % de humedad de los quesos durante 15 días, almacenado a temperatura de refrigeración (4°C), (A) y usando el ajuste polinomial (B).

El porcentaje de humedad presentó diferencia significativa entre los quesos recubiertos y el queso control, ya que los quesos con recubrimiento logran mantener el contenido de humedad conforme pasa el tiempo a diferencia de los quesos control sin recubrimiento que comienzan a perder mayor humedad después del quinto día de almacenamiento.

La humedad del queso control sin recubrimiento disminuyó un 65%, mientras que los quesos con recubrimiento control y el recubrimiento solo disminuyeron un 40% y un 29% respectivamente. Los cambios en el porcentaje de humedad son esperados, por la pérdida del suero por exudación que sucede a través del almacenamiento de los quesos frescos. La presencia en grasa butírica es la que hace que, al desecarse la superficie aparezca una coloración amarillenta y la presencia de una costra coriácea, desagradable para la mayoría de los consumidores (Villega-de-Gante et al., 2016).

Zhong, et al. (2014), analizaron la pérdida de humedad de quesos mozzarella recubiertos y no recubiertos, los quesos no recubiertos presentaron una pérdida del 14% de humedad, tomaron en cuenta, en la medición del tiempo cero, los quesos

recubrimientos se encontraban húmedos por el recubrimiento y la humedad de los quesos recubiertos era significativamente mayor que la de los quesos no recubiertos. Durante el almacenamiento, la humedad se evaporó tanto del recubrimiento como del queso, y la pérdida de humedad del queso recubierto aumentó en consecuencia.

Para esta esta investigación, el porcentaje de humedad de los quesos recubiertos se midieron después de que se secura el recubrimiento. Las diferencias que se observan entre el queso recubierto y el control sugieren que el recubrimiento ayuda a mantener la humedad del queso a través del tiempo, característica deseable ya que así puede retrasarse la oxidación de la grasa butírica.

6.12 pH y acidez titulable

En la figura (23) se presenta el pH de los quesos control y con recubrimiento a través del tiempo de almacenamiento evaluado. Se presentaron diferencias en dicho parámetro entre el control y el recubierto. En general el valor del pH se redujo a lo largo del tiempo. El pH final del queso control fue de 5.7 ± 0.69 , el del recubierto control de 6.0 ± 0.12 y el recubierto con SM-AEO 6.2 ± 0.24 .

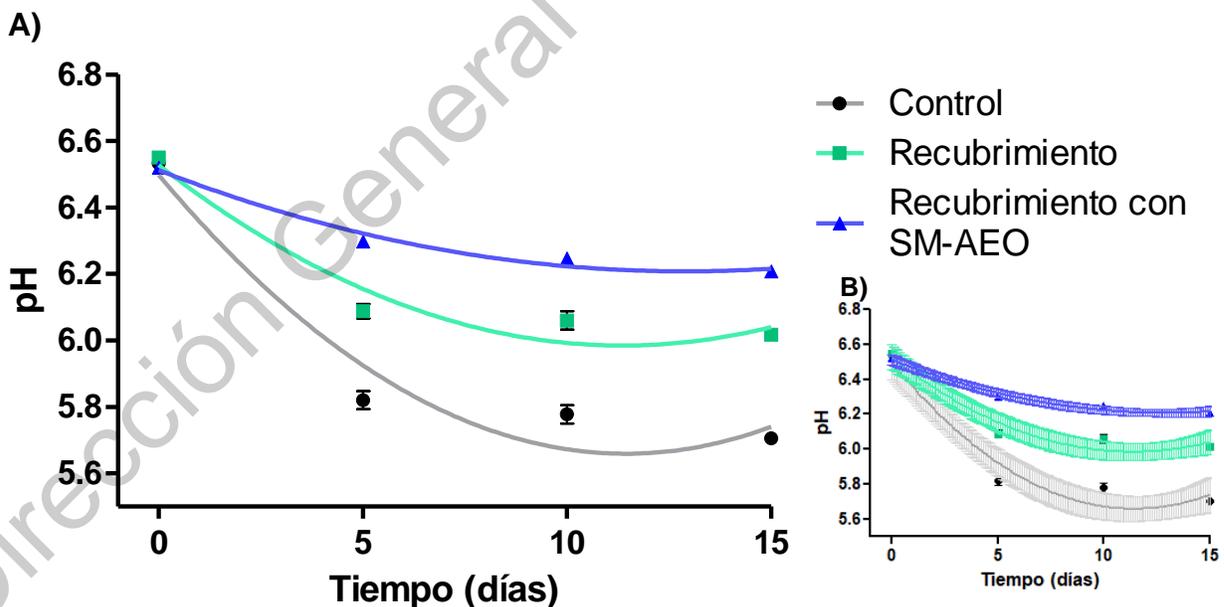


Figura 23. Valor de pH de los quesos con y sin recubrimiento durante el almacenamiento a 5° C (A) y usando el ajuste polinomial (B).

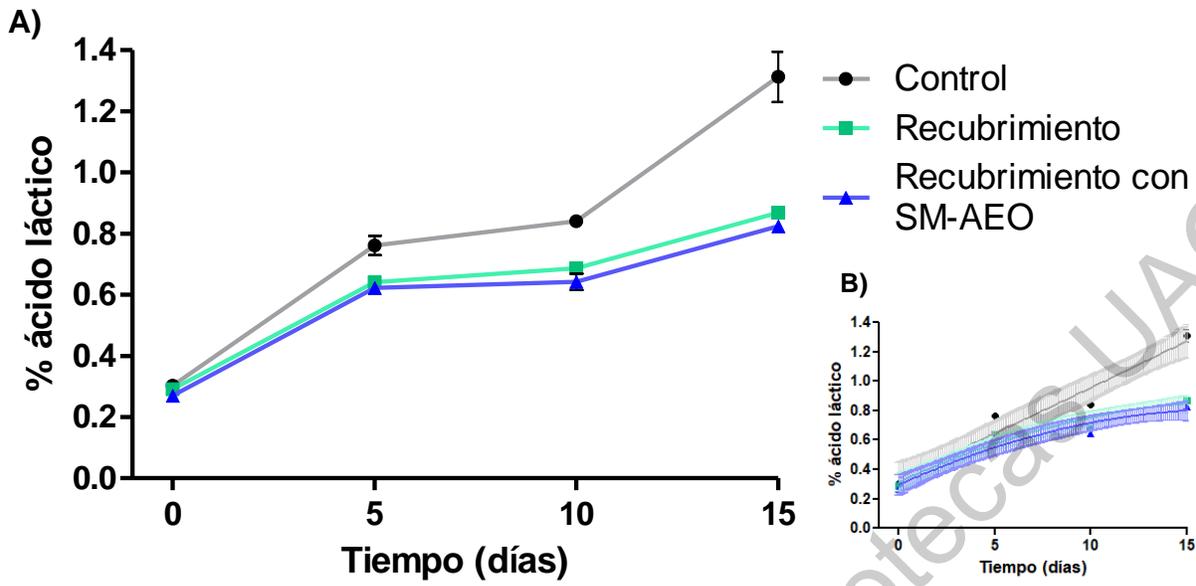


Figura 24: % de ácido láctico de los quesos con y sin recubrimiento durante el almacenamiento a 5° C (A) y usando el ajuste polinomial (B).

En la figura (24) se presenta el porcentaje de acidez titulable expresada como % de ácido láctico de queso control y con recubrimiento a través del tiempo de almacenamiento evaluado. Se presentaron diferencias significativas en dicho parámetro entre el queso control y los recubiertos, este fue aumento a través del tiempo. Los resultados similares a lo reportado por Di Pierro et al. (2010) para queso Ricotta recubierto con una película de proteína de leche y quitosano observaron que la acidez de las muestras variaron entre 1.10% y 2.82%.

El aumento en la acidez es causado por la producción de ácidos orgánicos, principalmente por bacterias productoras de ácido láctico que aumentaron durante el almacenamiento. Debido a la actividad antimicrobiana del AEO puede mostrar inhibición de bacterias lácticas, lo que podría explicar los valores altos de ácido láctico en los quesos no recubiertos.

6.13 Análisis microbiológicos

Se llevó a cabo un ensayo de cuenta estándar y de hongos y levaduras a lo largo de 15 d de almacenamiento, cuadro (14). Se observa de forma general que tanto los mesófilos aerobios y las levaduras incrementaron (UFC/mL) a lo largo del tiempo esto

como resultado de la disminución del pH e incremento de acidez probablemente debido a la fermentación microbiana.

Se observa que al inicio del análisis (día 0) el recuento de hongos y levaduras fue menor al límite de detección estipulado en la norma (500 UFC/g) a partir del día 5 se observa un incremento en la población de hongos y levaduras, sin embargo, hay menor crecimiento en los quesos con recubrimiento, el cual rebasa la NOM al día 15.

Cuadro 14: Actividad antimicrobiana de los quesos control y recubiertos.

Día	Tratamiento	Mesófilos aerobios	Hongos y Levaduras
		log UFC/g	
0	Control	2.93 ± 0.04 ^a	2.65 ± 0.07 ^b
	CS:Q	2.81 ± 0.05 ^a	2.54 ± 0.09 ^b
	CS:Q con SM-AEO	2.60 ± 0.01 ^b	2.00 ± 0.01 ^c
5	Control	6.04 ± 0.02 ^a	3.77 ± 0.01 ^b
	CS:Q	4.81 ± 0.02 ^c	3.15 ± 0.04 ^e
	CS:Q con SM-AEO	4.32 ± 0.06 ^d	2.54 ± 0.09 ^f
10	Control	6.20 ± 0.03 ^a	5.09 ± 0.02 ^b
	CS:Q	4.87 ± 0.02 ^c	3.15 ± 0.04 ^e
	CS:Q con SM-AEO	4.47 ± 0.03 ^d	2.69 ± 0.01 ^f
15	Control	6.32 ± 0.01 ^a	5.38 ± 0.01 ^b
	CS:Q	4.91 ± 0.02 ^c	3.32 ± 0.03 ^e
	CS:Q con SM-AEO	4.62 ± 0.01 ^d	3.10 ± 0.09 ^f

Los resultados se reportan como la media (n=2) ± la desviación estándar.

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

El recubrimiento con SM-AEO tuvo mayor efecto antimicrobiano, ya que transcurridos los 15 días de almacenamiento existió diferencia significativa, presentando los quesos recubiertos con SM-AEO una reducción de 31% en la concentración con respecto al queso control. En el recuento de mesófilos aerobios existió diferencia

significativa entre el control y el recubierto a partir del día 10. Mei et al. (2013) reporto, para la aplicación de recubrimiento a base almidón-quitosano en queso mongol, controlar las poblaciones microbianas. Después de 15 días, el queso recubierto resulto con menor recuento total de mesofilos aerobios y hongos en comparación al queso sin recubrimiento el día 15.

Los resultados muestran que la población de mesófilos aerobios fue mayor con respecto a la población de hongos y levaduras. El recubrimiento tuvo un mayor efecto antimicrobiano contra los hongos y levaduras ya que a lo largo de los 15 días de almacenamiento existió diferencia significativa entre los quesos control y los quesos con recubrimiento, presentando éstos últimos una menor concentración de UFC/g.

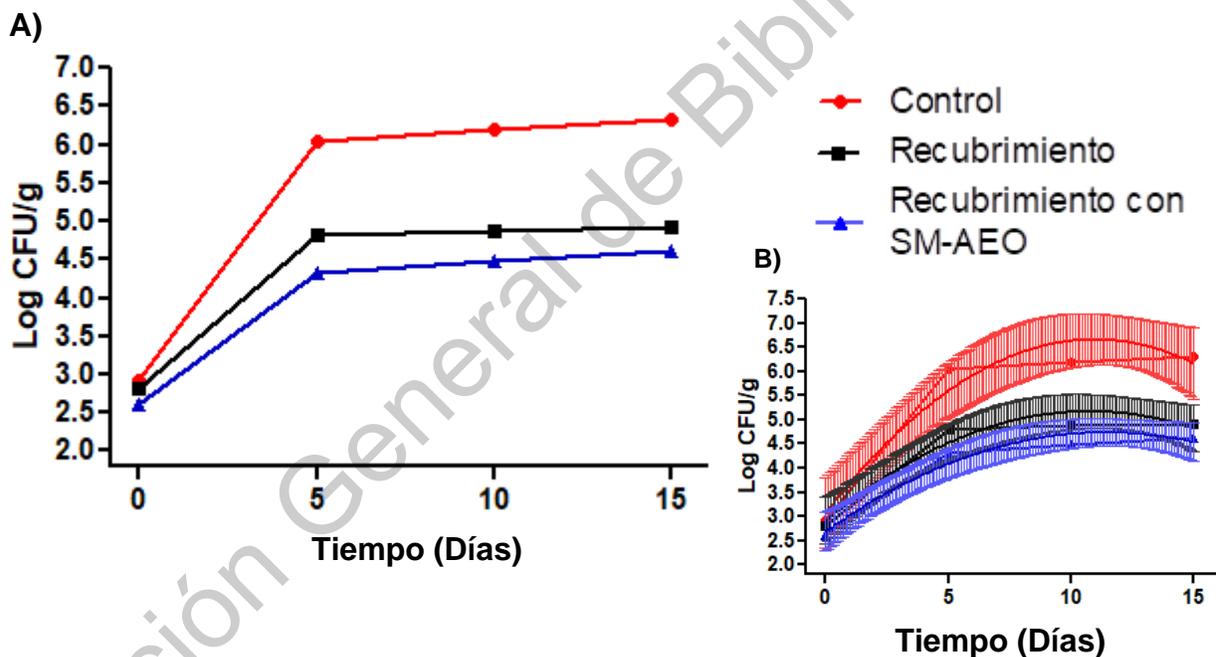


Figura 25: Log de UFC/g de Mesófilos aerobios en los quesos con y sin recubrimiento durante el almacenamiento a 5° C (A) y usando el ajuste polinomial (B).

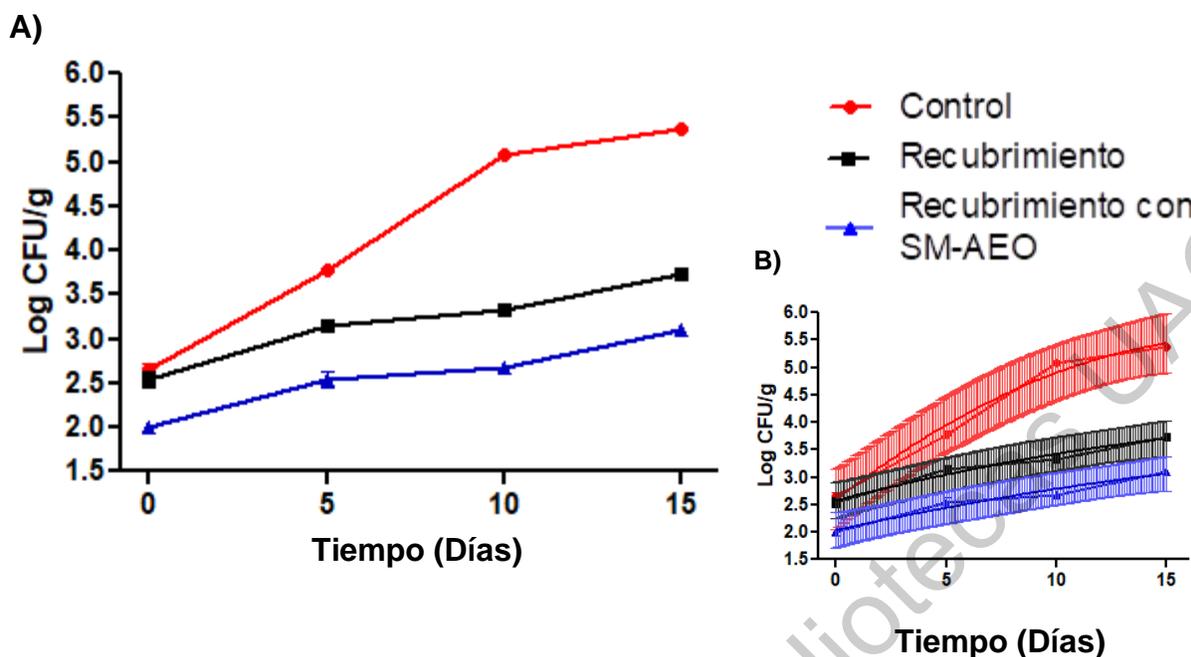


Figura 26: Log de UFC/g de Hongos y levaduras en los quesos con y sin recubrimiento durante el almacenamiento a 5° C (A) y usando el ajuste polinomial (B).

Esto puede explicarse ya que el recubrimiento se encuentra sólo en la superficie del queso y para disminuir el desarrollo de mesófilos aerobios, es necesario incorporar el agente antimicrobiano en el interior del queso, y así mismo estas bacterias se desarrollan en el interior del queso y no sólo en la superficie. Para disminuir el crecimiento es probable que se necesite almacenar los quesos al vacío, para evitar contacto del queso con aire del ambiente húmedo de su almacenamiento. Un ejemplo de esto es lo reportado por Artiga-Artigas et al., (2017), que usó recubrimiento de alginato de sodio y fibra de mandarina con 2% (p/p) de aceite esencial de orégano, el cual una vez recubiertas las barras de queso bajo en grasa, se colocaron en bandejas de polietileno para posteriormente usar una película hecha de poliamida y polietileno para sellar por calor las bandejas, este procedimiento protegió eficazmente el queso contra hongos y levaduras después de 13 días de almacenamiento.

El almacenamiento de quesos en empaques representa una barrera para su conservación; ya que protege de la contaminación, de la deshidratación y de la pérdida de apariencia. Sin embargo, éste es susceptible a la presencia de microorganismos vivos y viables, suficientes nutrientes para éstos, y también enzimas activas. Estos microorganismos deterioradores pueden alterar la pasta del queso produciendo diversos

cambios sensoriales, e incluso poner en riesgo la salud del consumidor. La velocidad de alteración depende de varios factores, como la cantidad y variedad de microorganismos, el contenido de agua, la temperatura ambiente, la concentración de sal en la pasta y su grado de acidez (Villegas et al., 2016).

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

Dirección General de Bibliotecas UNAO

7. CONCLUSIONES

Las SM sintetizadas lograron encapsular y liberar el AEO, ayudando a mantener su actividad antimicrobiana; logrando mostrar inhibición tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas.

Los valores de potencial ζ y tamaño de partícula ayudan a determinar la estabilidad de las suspensiones filmogénicas, de las cuales aquellas elaborada con CS:Q 8:1 (p/p) tuvieron los mejores valores.

El uso de las SM representa una buena estrategia para la incorporación de AEO en la solución formadora de película, ya que se obtuvieron películas con mayor resistencia a la tensión y elongación, así como valores bajos de permeabilidad al CO₂ y H₂O, en comparación con otros recubrimientos comerciales y polímeros; lo que las convierte en una buena alternativa para su uso como recubrimiento en productos lácteos con desuerado.

Las películas con 8 mg/mL de SM-AEO presentaron actividad antimicrobiana contra *L. innocua* y *S. Saintpaul*, mostrando la eficiencia de la liberación del AEO.

El recubrimiento con SM-AEO aplicado en queso fue capaz de disminuir la pérdida de humedad y retrasó el crecimiento de hongos y levaduras, además de controlar la disminución del pH y el aumento de acidez.

El recubrimiento CS:QU 8:1 (p/p) con SM-AEO es una alternativa con gran potencial para mantener la calidad del queso panela durante su almacenamiento.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, B., Yaqoob, S., Mehmood, A., Gohar, U. F., & Ghafar, H. (2017). Mesoporous silica nanoparticles: A review. *Journal of Developing Drugs*, 06(02). <https://doi.org/10.4172/2329-6631.1000174>
- Amaya-Llano, S. L., Castaño-Tostado, E., Van Tassell, M. L., Miller, M. J., Martínez-Bustos, F., Singh, M., & Escobar, M. C. (2012). Characterization of a Panela cheese with added probiotics and fava bean starch. *Journal of Dairy Science*, 95(6), 2779–2787. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4655>
- Arredondo-Ochoa, T., García-Almendárez, B. E., Reyes, A. A., Pastrana, D. M. R., López, G. F. G., Belloso, O. M., & González, C. R. (2017). Design and characterization of corn starch edible films including beeswax and natural antimicrobials. *Food and Bioprocess Technology*, 10(1), 103–114. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1800-4>
- Artiga-Artigas, M., Acevedo-Fani, A., & Martín-Belloso, O. (2017). Improving the shelf life of low-fat cut cheese using nanoemulsion-based edible coatings containing oregano essential oil and mandarin fiber. *Food Control*, 76, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.01.001>
- Asbahani, A. El, Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., Mousadik, A. El, Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F. N. R., & Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. In *International Journal of Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>
- ASTM D3985-81. (1981). Anual Book of ASTM standards. In *American Society for Testing and Materials* (p. 534).
- Bravo, M., Preston, G. M., Van der Hoorn, R. A. L., Townley, H. E., & Thompson, I. P. (2018). Species-specific antimicrobial activity of essential oils and enhancement by encapsulation in mesoporous silica nanoparticles. *Industrial Crops and Products*, 122(May), 582–590. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.081>
- Carmagnini, L., Calesini, F., Pesavento, G., Di Martino, M. C., Bilia, A. R., Barnabei, M.,

- Calonico, C., Mencarelli, L., Lo Nostro, A., & Addona, R. (2015). Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. *Food Control*, *54*, 188–199. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.045>
- Contado, C., Ravani, L., & Passarella, M. (2013). Size characterization by sedimentation field flow fractionation of silica particles used as food additives. *Analytica Chimica Acta*, *788*, 183–192. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.05.056>
- Costa, M. J., Maciel, L. C., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., & Cerqueira, M. A. (2018). Use of edible films and coatings in cheese preservation: Opportunities and challenges. *Food Research International*, *107*, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.013>
- Cui, H. Y., Wu, J., Li, C. Z., & Lin, L. (2016). Anti-listeria effects of chitosan-coated nisin-silica liposome on Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, *99*(11), 8598–8606. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11658>
- Dangaran, K., Tomasula, P. M., & Qi, P. (2009). Structure and function of protein-based edible films and coatings. In K. C. Huber & M. E. Embuscado (Eds.), *Edible Films and Coatings for Food Applications* (1st ed., pp. 25–56). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1_2
- Di Pierro, P., Sorrentino, A., Mariniello, L., Giosafatto, C. V. L., & Porta, R. (2010). Chitosan/whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life. *LWT - Food Science and Technology*, *44*(10), 2324–2327. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.031>
- Esposito, M., Di Pierro, P., Regalado-Gonzales, C., Mariniello, L., Giosafatto, C. V. L., & Porta, R. (2016). Polyamines as new cationic plasticizers for pectin-based edible films. *Carbohydrate Polymers*, *153*, 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.087>
- Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2009). Microstructure and optical properties of sodium caseinate films containing oleic acid-beeswax mixtures. *Food Hydrocolloids*,

23(3), 676–683. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.04.015>

Farkye, N. Y. (2004). Cheese technology. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2–3), 91–98. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00146.x>

Farkye, N. Y., & Shah, N. (2015). Milk Proteins. In *Applied Food Protein Chemistry* (1st ed., Vol. 9781119944, pp. 427–458). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118860588.ch16>

Fernandez-Bats, I., Di Pierro, P., Villalonga-Santana, R., Garcia-Almendarez, B., & Porta, R. (2018). Bioactive mesoporous silica nanocomposite films obtained from native and transglutaminase-crosslinked bitter vetch proteins. *Food Hydrocolloids*, 82, 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.041>

Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., & O'Mahony, J. A. (2015). Milk Proteins. In *Dairy Chemistry and Biochemistry* (pp. 145–239). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2_4

Geraci, C., Stefani, S., Cafiso, V., Stracquadio, S., Napoli, E., Leonardi, M., Consoli, G. M. L., & Granata, G. (2018). Essential oils encapsulated in polymer-based nanocapsules as potential candidates for application in food preservation. *Food Chemistry*, 269(June), 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.140>

Giosafatto, C. Valeria L., Di Pierro, P., Gunning, P., Mackie, A., Porta, R., & Mariniello, L. (2014). Characterization of Citrus pectin edible films containing transglutaminase-modified phaseolin. *Carbohydrate Polymers*, 106(1), 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.015>

Giosafatto, Concetta Valeria Lucia, Sabbah, M., Al-Asmar, A., Esposito, M., Sanchez, A., Santana, R. V., Cammarota, M., Mariniello, L., Di Pierro, P., & Porta, R. (2019). Effect of mesoporous silica nanoparticles on glycerol-plasticized anionic and cationic polysaccharide edible films. *Coatings*, 9(3), 172. <https://doi.org/10.3390/coatings9030172>

González-Córdova, A. F., Ortiz-Estrada, Á. M., Vallejo-Cordoba, B., Hernández-Mendoza, A., Yescas, C., & De la Rosa-Alcaraz, M. de los Á. (2016). Invited review:

Artisanal Mexican cheeses. *Journal of Dairy Science*, 99(5), 3250–3262.
<https://doi.org/10.3168/jds.2015-10103>

Guevara-Valderrama, R. (2018). *DISEÑO DE UN RECUBRIMIENTO COMESTIBLE ACTIVO A BASE DE ALMIDÓN OXIDADO-ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO MEXICANO (Lippia graveolens Kunth) Y SU APLICACIÓN EN PIMIENTO MORRÓN (Capsicum annuum L.)*. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO.

Guti, T. J. (2018). *Polymers for Food Applications* (T. J. Gutiérrez (ed.)). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-94625-2>

Hernández-hernández, E., Regalado-gonzález, C., Vázquez-landaverde, P., Guerrero-legarreta, I., & García-almendárez, B. E. (2014). Antimicrobial Activity of Mexican (*Lippia graveolens* H . B . K .) and European (*Origanum vulgare* L .) Oregano Essential Oils. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–12.
<https://doi.org/10.1155/2014/641814>

Hernández-Hernández, E., Regalado-González, C., Vázquez-Landaverde, P., Guerrero-Legarreta, I., & García-Almendárez, B. E. (2014). Microencapsulation, chemical characterization, and antimicrobial activity of Mexican (*Lippia graveolens* H.B.K.) and European (*Origanum vulgare* L.) oregano essential oils. *Scientific World Journal*, 2014, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2014/641814>

Hoffmann, F., Cornelius, M., Morell, J., & Fröba, M. (2006). *Silica-Based Mesoporous Organic – Inorganic Hybrid Materials Angewandte*. 3216–3251.
<https://doi.org/10.1002/anie.200503075>

Homez-Jara, A., Daza, L. D., Aguirre, D. M., Muñoz, J. A., Solanilla, J. F., & Váquiro, H. A. (2018). Characterization of chitosan edible films obtained with various polymer concentrations and drying temperatures. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 1233–1240. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.057>

Iturriaga, L., Olabarrieta, I., & de Marañón, I. M. (2012). Antimicrobial assays of natural extracts and their inhibitory effect against *Listeria innocua* and fish spoilage bacteria, after incorporation into biopolymer edible films. *International Journal of Food*

Microbiology, 158(1), 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.001>

Jin, L., Teng, J., Hu, L., Lan, X., Xu, Y., Sheng, J., Song, Y., & Wang, M. (2019). Pepper fragrant essential oil (PFEO) and functionalized MCM-41 nanoparticles: formation, characterization, and bactericidal activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture, April*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9776>

Khalili, S. T., Mohsenifar, A., Beyki, M., Zhavah, S., Rahmani-Cherati, T., Abdollahi, A., Bayat, M., & Tabatabaei, M. (2015). Encapsulation of Thyme essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 502–508. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.054>

Lin, H. C., Wang, B. J., & Weng, Y. M. (2020). Development and characterization of sodium caseinate edible films cross-linked with genipin. *Lwt*, 118(June), 108813. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108813>

Lotfi, M., Tajik, H., Moradi, M., Forough, M., Divsalar, E., & Kuswandi, B. (2018). Nanostructured chitosan/ monolaurin film: Preparation, characterization and antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes* on ultrafiltered white cheese. *Lwt*, 92, 576–583. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.020>

Manab, A. (2017). Casein polysaccharides interaction – A Review. *International Journal of ChemTech Research*, 10(5), 1–9.

Mei, J., Yuan, Y., Wu, Y., & Li, Y. (2013). Characterization of edible starch-chitosan film and its application in the storage of Mongolian cheese. *International Journal of Biological Macromolecules*, 57, 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.03.003>

Moreira, M. del R., Pereda, M., Marcovich, N. E., & Roura, S. I. (2011). Antimicrobial Effectiveness of Bioactive Packaging Materials from Edible Chitosan and Casein Polymers: Assessment on Carrot, Cheese, and Salami. *Journal of Food Science*, 76(1), 54–63. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01910.x>

Pavlat, A. E., & Orts, W. (2009). Edible Films and Coatings: Why, What, and How? In

Edible Films and Coatings for Food Applications (pp. 1–23). Springer New York.
https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1_1

Pereda, M., Aranguren, M. I., & Marcovich, N. E. (2008). Characterization of chitosan/caseinate films. *Journal of Applied Polymer Science*, *107*(2), 1080–1090.
<https://doi.org/10.1002/app.27052>

Pérez-Esteve, É., Ruiz-Rico, M., Martínez-Máñez, R., & Barat, J. M. (2015). Mesoporous Silica-Based Supports for the Controlled and Targeted Release of Bioactive Molecules in the Gastrointestinal Tract. *Journal of Food Science*, *80*(11), E2504–E2516. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13095>

Pitak, N., & Rakshit, S. K. (2011). Physical and antimicrobial properties of banana flour/chitosan biodegradable and self sealing films used for preserving Fresh-cut vegetables. *LWT - Food Science and Technology*, *44*(10), 2310–2315.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.05.024>

Pogaku, R., Eng Seng, C., Boonbeng, L., & Kallu, U. R. (2007). Whey Protein Isolate-Starch System- A Critical Review. *International Journal of Food Engineering*, *3*(6).
<https://doi.org/10.2202/1556-3758.1164>

Porta, R., Di Pierro, P., Sabbah, M., Regalado-Gonzales, C., Mariniello, L., Kadivar, M., & Arabestani, A. (2016). Blend films of pectin and bitter vetch (*Vicia ervilia*) proteins: Properties and effect of transglutaminase. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *36*, 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.07.001>

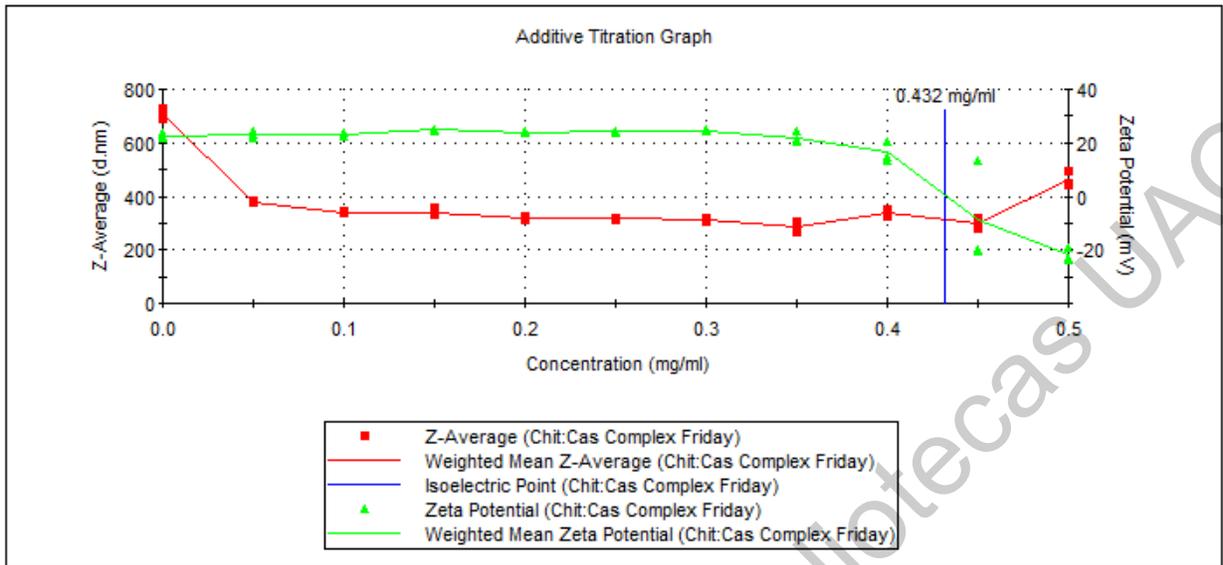
Prakash, B., Kujur, A., Yadav, A., Kumar, A., Singh, P. P., & Dubey, N. K. (2018). Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. *Food Control*, *89*, 1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.01.018>

Priyadarshi, R., Sauraj, Kumar, B., & Negi, Y. S. (2018). Chitosan film incorporated with citric acid and glycerol as an active packaging material for extension of green chilli shelf life. *Carbohydrate Polymers*, *195*(December 2017), 329–338.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.089>

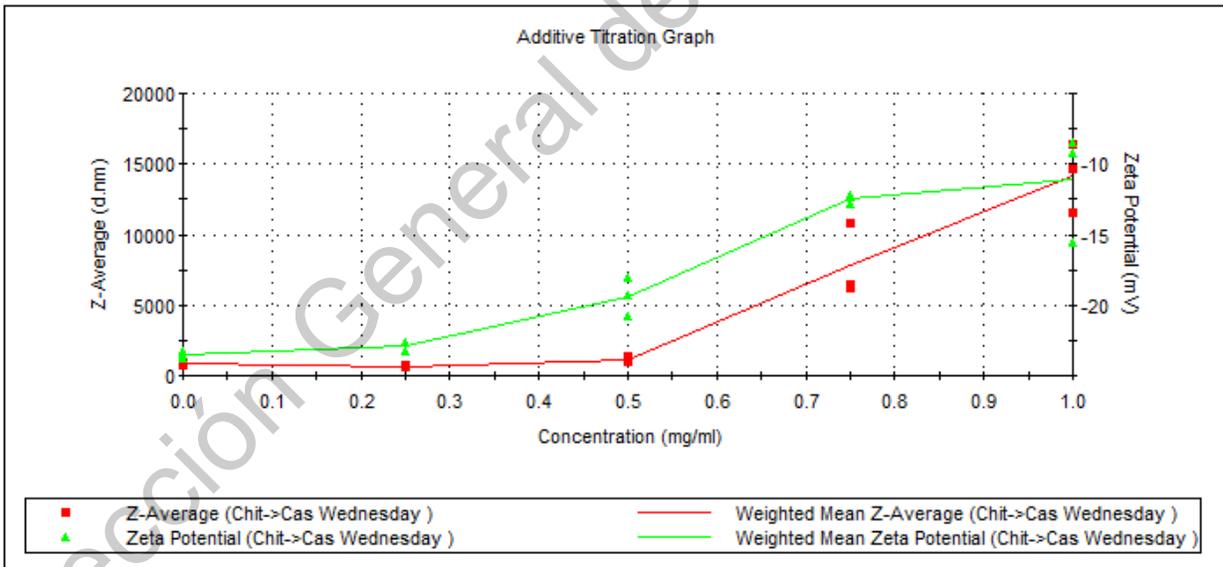
- Ramírez, C., & Vélez, J. F. (2012). Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. *Temas Selectos De Ingeniería De Alimentos*, 2(January), 131–148. <https://doi.org/10.1177/002795011623500115>
- Rao, J., Chen, B., & McClements, D. J. (2019). Improving the Efficacy of Essential Oils as Antimicrobials in Foods: Mechanisms of Action. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10(1), annurev-food-032818-121727. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121727>
- Ruiz-Rico, M., Pérez-Esteve, É., Bernardos, A., Sancenón, F., Martínez-Mañez, R., Marcos, M. D., & Barat, J. M. (2017). Enhanced antimicrobial activity of essential oil components immobilized on silica particles. *Food Chemistry*, 233, 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.118>
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., & Cháfer, M. (2011). Use of Essential Oils in Bioactive Edible Coatings: A Review. *Food Engineering Reviews*, 3(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s12393-010-9031-3>
- Tae, H., Park, Y., Sig, Y., Yun, J., & Margandan, B. (2009). *International Journal of Greenhouse Gas Control Highly siliceous MCM-48 from rice husk ash for CO₂ adsorption*. 3, 545–549. <https://doi.org/10.1016/j.ijggc.2009.02.008>
- Tzankova, V., Aluani, D., Yordanov, Y., Valoti, M., Frosini, M., Spassova, I., Kovacheva, D., & Tzankov, B. (2019). In vitro toxicity evaluation of lomefloxacin-loaded MCM-41 mesoporous silica nanoparticles. *Drug and Chemical Toxicology*, 0(0), 1–12. <https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1571503>
- Udayarajan, C. (2007). *Relating physicochemical characteristics of cheese to its functional performance*. Universidad de Wisconsin-Madison.
- Vahedikia, N., Garavand, F., Tajeddin, B., Cacciotti, I., & Mahdi, S. (2019). Biodegradable zein film composites reinforced with chitosan nanoparticles and cinnamon essential oil: Physical , mechanical , structural and antimicrobial attributes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 177(December 2018), 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.01.045>

- Varga, E., Bardocz, A., Belák, Á., Maráz, A., Boros, B., Felinger, A., Böszörményi, A., & Horváth, G. (2015). Antimicrobial activity and chemical composition of thyme essential oils and the polyphenolic content of different *Thymus* extracts. *Farmacia*, 6(3), 357–361.
- Villegas de Gante, A., Santos Moreno, A., & Cervantes Escoto, F. (2016). *Los Quesos Mexicanos Tradicionales* (1st ed., Issue March). Juan Pablos Editor. <https://books.google.com/books?id=P7-OAAAACAAJ&pgis=1>
- Yanishlieva, N. V., Marinova, E., & Pokorný, J. (2006). Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(9), 776–793. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200600127>
- Youssef, A. M., El-Sayed, S. M., El-Sayed, H. S., Salama, H. H., Assem, F. M., & Abd El-Salam, M. H. (2018). Novel bionanocomposite materials used for packaging skimmed milk acid coagulated cheese (Karish). *International Journal of Biological Macromolecules*, 115(2017), 1002–1011. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.165>
- Zhong, Y., Cavender, G., & Zhao, Y. (2014). Investigation of different coating application methods on the performance of edible coatings on Mozzarella cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 56(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.11.006>

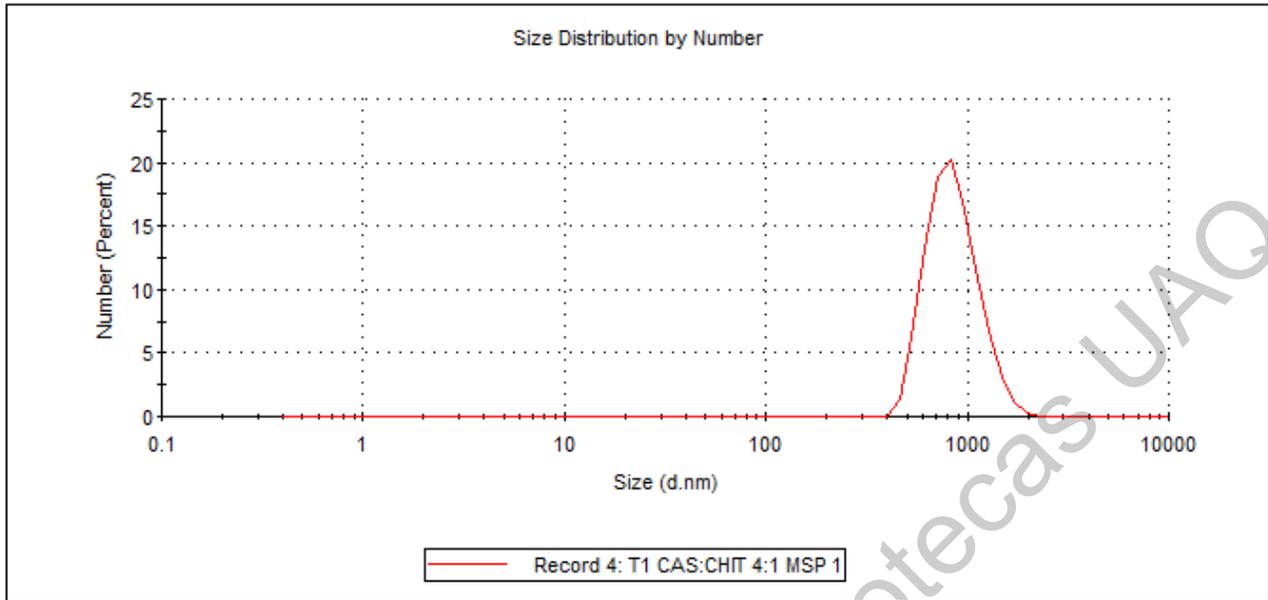
9. ANEXOS



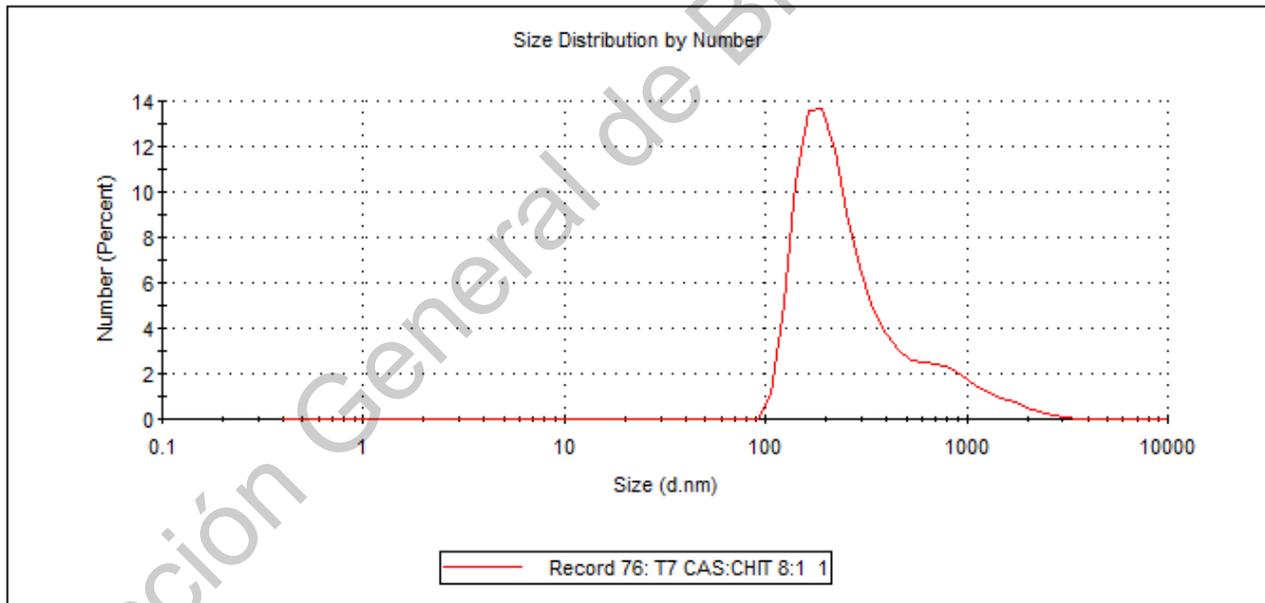
Anexo 1: Titulación del CS (5mg/mL) en una solución de QU.



Anexo 2: Titulación del QU (8mg/mL) en una solución de CS.



Anexo 3: Relación del tamaño de partícula en la mezcla CS:QU 4:1 25 mL



Anexo 4: Relación del tamaño de partícula en la mezcla CS:QU 8:1 50 mL