



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química

Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Tesis de Maestría

“Evaluación de las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales de carne fresca de res recubierta con nanocápsulas con aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* Kunth)”

Presenta:

I.Q. Alexis Matadamas Ortiz

Dirigido por:

Dr. Carlos Regalado González

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

2022



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

“Evaluación de las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales de carne fresca de res recubierta con nanocápsulas de aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* Kunth)”

Tesis

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

Presenta:

I.Q. Alexis Matadamas Ortiz

Dirigido por:

Dr. Carlos Regalado González

Dr. Carlos Regalado González
Presidente

Dra. Elvia Hernández Hernández
Co-Director

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Vocal

Dr. Aldo Amaro Reyes
Suplente

Dra. Blanca Estela García Almendárez
Suplente

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Directora de la Facultad de Química

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

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
2022

DEDICATORIA

A mis padres, Teresa y Arturo
y mis hermanos Idarh y Oliver.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada para la realización de este proyecto.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, por poner a mi disposición sus instalaciones y por las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

Al Laboratorio de Biotecnología Alimentaria por permitirme el uso de equipo y materiales para la realización de este proyecto.

A mi director de tesis, el Dr. Carlos Regalado González, mi co-directora, la Dra. Elvia Hernández Hernández y a mis sinodales, por el tiempo dedicado a la revisión y enriquecimiento del presente proyecto.

A mi familia, por su incansable e incondicional apoyo durante estos años de preparación y por brindarme la base de valores que guían mi vida, siendo mi ejemplo a seguir en todo momento.

A Abi, Pao, Jaquie, Rebe, Diego, Mayra y César, por su invaluable amistad y por las experiencias que hemos vivido juntos.

ÍNDICE

	PÁGINA
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	2
2.1 Carne fresca de res y vida de anaquel	2
2.1.1 Mercado nacional de carne de bovino.....	2
2.1.2 Normatividad.....	3
2.1.3 Composición química de la carne de bovino	5
2.1.4 Oxidación de los lípidos, la mioglobina y su efecto sobre la aceptabilidad de la carne de res.....	6
2.1.5 Pérdidas de producto nacional y estimación de la vida de anaquel	7
2.2 Recubrimientos comestibles.....	8
2.2.1 Proteína de amaranto.....	9
2.2.2 Plastificante	12
2.3 Aceites esenciales.....	13
2.3.1 Composición del aceite esencial de orégano.....	13
2.4 Nanopartículas de sílice mesoporosa	14
2.4.1 Toxicidad.....	15
2.4.2 Encapsulación de aceites esenciales en sílice mesoporosa	16
3 JUSTIFICACIÓN	18
4 OBJETIVOS	19
4.1 Objetivo general	19
4.2 Objetivos específicos.....	19
5 METODOLOGÍA	20
5.1 Materiales y medios de cultivo.....	20

5.2	Material biológico y cepas microbianas	20
5.2.1	Conservación de las cepas microbianas	21
5.3	Extracción de aceite esencial de orégano (<i>Lippia graveolens</i> Kunth) (AEO).....	21
5.4	Obtención del aislado de proteína de amaranto (APA)	21
5.5	Síntesis de nanopartículas de sílice mesoporosas (NSM)	22
5.5.1	Funcionalización de nanopartículas de sílice mesoporosas	22
5.6	Encapsulación del AEO en las NSMF y determinación de su concentración	23
5.7	Concentración mínima inhibitoria de AEO y Q contra <i>E. coli</i> O157:H7.....	24
5.7.1	Concentración mínima inhibitoria combinada de AEO y Q contra <i>E. coli</i> O157:H7.....	25
5.8	Tamaño y morfología de las NSMF.....	26
5.9	Preparación de las soluciones filmogénicas y películas comestibles con NSMF, AEO emulsificado y NSMA.....	26
5.9.1	Caracterización de la solución filmogénica mediante el potencial ζ	27
5.9.2	Espesor	27
5.9.3	Color y opacidad	27
5.9.4	Propiedades mecánicas.....	27
5.9.5	Permeabilidad al vapor de agua	28
5.9.6	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT IR).....	29
5.9.7	Microscopía electrónica de barrido.....	29
5.10	Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> de las PAC.....	29
5.11	Diseño experimental para la evaluación del efecto de PAC en carne fresca de res.	30
5.12	Preparación de las muestras de carne y tratamientos	30
5.13	Propiedades antimicrobianas del recubrimiento en carne fresca.....	31

5.14	Propiedades fisicoquímicas	31
5.14.1	Oxidación de lípidos	31
5.14.2	Evaluación del color de la superficie de la carne	32
5.15	Determinación del pH de las muestras de carne.....	32
5.16	Evaluación sensorial.....	32
6	RESULTADOS	33
6.1	Obtención de los aislados de proteína de amaranto.....	33
6.2	Síntesis de NSM	33
6.3	Efecto antimicrobiano del AEO y el Q	34
6.3.1	Concentración mínima inhibitoria de AEO y Q contra <i>E. coli</i> O157:H7	34
6.3.2	Concentración mínima inhibitoria combinada de AEO y Q contra <i>E. coli</i> O157:H7.....	36
6.4	Capacidad de carga de las NSMA	37
6.5	Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> de las PAC.....	38
6.6	Estabilidad de las soluciones filmogénicas	39
6.7	Color y micrografía electrónica de barrido (MEB) de las PAC	40
6.8	Espesor, propiedades mecánicas y permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las PAC.....	42
6.9	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR).....	45
6.10	Efecto de los recubrimientos comestibles en carne fresca de res	46
6.10.1	Propiedades físicas y químicas.....	46
6.10.2	Propiedades antimicrobianas.....	47
6.11	Aceptabilidad sensorial de las PAC	50
7	CONCLUSIONES	51
8	REFERENCIAS	52

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Panorama nacional de producción de carne de res.....	3
2. Representación esquemática de la síntesis de partículas de sílice mesoporosa mediante agentes direccionadores de estructuras.....	15
3. Micrografía electrónica de barrido de las nanopartículas de sílice mesoporosa (NSM) funcionalizadas (NSMF)	34
4. Concentración mínima inhibitoria de aceite esencial de orégano (AEO) y quitosano (Q) contra <i>E. coli</i> O157:H7.....	36
5. Concentración mínima inhibitoria combinada de AEO y Q contra <i>E. coli</i> O157:H7.....	37
6. Halos de inhibición contra <i>E. coli</i> O157:H7 de películas activas comestibles (PAC) 4:1 (APA:Q; p/p) adicionadas con diferentes concentraciones de NSM adicionadas con AEO (NSMA).....	38
7. Micrografía electrónica de barrido de las PAC.....	41
8. Porcentaje de elongación, resistencia a la tensión (MPa) y módulo de Young (MPa) de las PAC con proporción (p/p) 9:1; APA:Q y 4:1; APA:Q con la adición de NSMF, AEO emulsificado o NSMA.....	42
9. Espectro FT-IR de PAC de APA, Q y con proporción 4:1; APA:Q (p/p) con la adición de NSMF, AEO emulsificado o NSMA.....	45
10. Efecto de los recubrimientos comestibles en el pH, TBARS (mg malonaldehído/kg de carne) y color (valor Chroma y ángulo h) de carne fresca de res.....	48
11. Efecto de las PAC sobre el crecimiento de MMA, <i>B. thermosphacta</i> , <i>Pseudomonas</i> y <i>E. coli</i> (Log UFC/cm ²) en carne fresca de res.....	50
12. Aceptabilidad de olor y color de muestras de carne fresca de res almacenadas por 21 días evaluadas con los tratamientos usando la película (CP) o retirándola (SP).....	51

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
1. Normatividad para la producción y comercialización de carne de res.....	4
2. Análisis proximal y concentración de ácidos grasos poliinsaturados de cortes de reses alimentadas con pasto.....	5
3. Composición proximal de cortes de res	6
4. Composición de los granos de amaranto en base húmeda y base seca.	10
5. Composición de aminoácidos de las fracciones proteicas del amaranto (<i>A. hypochondriacus</i> L).....	11
6. Concentración de proteína (%P; N x 5.85) en base seca y rendimiento de extracción de los aislados de proteína de amaranto.	33
7. Áreas de inhibición (cm ²) de PAC 4:1 (APA:Q; p/p) adicionadas con diferentes concentraciones de NSMA (% p/p) contra <i>E. coli</i> O157:H7.	39
8. Potencial ζ (mV) de las soluciones filmogénicas de APA y APA:Q (4:1; p/p) con la adición de NSMF, AEO y NSMA.....	39
9. Parámetros de color CIE (L*, a* y b*), opacidad y ΔE de PAC de APA, Q y APA:Q, con proporción (p/p) 9:1 (C9) y 4:1 (C4).	40
10. Espesor (μm) de PAC de Q y APA:Q (p/p).	42
11. Permeabilidad al vapor de agua (PAV; g/día*m*Pa) de PAC de APA y Q.	44

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DEL 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.

Resumen

La carne de res posee gran importancia económica, y provee aminoácidos esenciales y micronutrientes a la dieta humana. No obstante, su alta susceptibilidad al deterioro microbiano y fisicoquímico le otorga vida útil reducida. Este trabajo tuvo como objetivo formular una película activa comestible (PAC) incorporada con nanopartículas de sílice mesoporosa amino-funcionalizadas (NSMF), y cargadas con aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) (AEO), y evaluar su efecto sobre la calidad de carne fresca de res almacenada en refrigeración. La PAC se formuló a base de aislado de proteína de amaranto (APA) y quitosano (Q) probados en proporciones 4:1 y 9:1 (APA:Q; p/p), a la cual se añadió AEO emulsificado o encapsulado en NSMF. El efecto de conservación de las PAC se estableció usando un diseño experimental unifactorial (tipo de película) con mediciones repetidas en el tiempo durante 42 días. Se determinaron las propiedades fisicoquímicas y la permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas, así como sus propiedades antimicrobianas y, usando espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier, la interacción entre sus componentes. La PAC 4:1 (APA:Q; p/p) exhibió adecuadas propiedades de elongación (4.71 ± 1.48 %), resistencia a la tensión (36.91 ± 1.37 MPa), módulo de Young (1354.80 ± 64.60 MPa) y de barrera ($PVA = 3.33 \times 10^{-5} \pm 2.46 \times 10^{-6}$ g/día*m*Pa). Se incrementó la actividad antimicrobiana *in vitro* de la PAC contra *E. coli* O157:H7 añadiendo AEO encapsulado (9% p/p) y se observaron interacciones del glicerol y las NSMF con la matriz polimérica. En carne fresca de res, la PAC redujo la decoloración de su superficie, inhibió el crecimiento (respecto al control) de *Brochothrix thermosphacta* (5.5 Log), *Escherichia coli* (3.5 Log), *Pseudomonas* spp. (2.8 Log) y mesófilos aerobios (6.8 Log) a los 42 días de almacenamiento. Además mejoró su aceptabilidad olfativa a los 21 días de almacenamiento, prolongando así su vida útil y comprobando la capacidad de conservación de esta película.

Palabras clave: conservación de carne fresca de res, empaques activos comestibles, aceite esencial de orégano, nanopartículas de sílice mesoporoso.

Abstract

Beef has great economic importance and provides essential amino acids and micronutrients to the human diet; however, its high susceptibility to microbial and physicochemical deterioration results in reduced shelf life. This work aimed to formulate an active edible film (AEF) incorporated with amino-functionalized mesoporous silica nanoparticles (A-MSN) loaded with Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth) essential oil (OEO), and evaluate its effect on fresh beef quality during refrigerated storage. The AEF was based on a mixture of amaranth protein isolate (API) and chitosan (CH) testing two ratios, 4:1 and 9:1 (API: CH; w/w) to which OEO emulsified or encapsulated in A-MSN was added. The preservation effect of the AEF on fresh beef was established using one factor experimental design with repeated measurements over time for 42 days, using the type of edible film as a factor. The physicochemical properties and water vapor permeability (WVP) of the films were determined, as well as their antimicrobial properties and the interaction between their components by Fourier-transform infrared spectroscopy. Concisely, 4:1 (API: CH) mixture produced the best AEF, good mechanical properties were observed by measuring its elongation (4.71 ± 1.48 %), tensile strength (36.91 ± 1.37 MPa), and Young's modulus (1354.80 ± 64.6 MPa), meanwhile its water vapor permeability value exhibits its appropriate barrier properties ($3.33 \times 10^{-5} \pm 2.46 \times 10^{-6}$ g/day*m*Pa). *In vitro* antimicrobial activity of AEF against *E. coli* O157:H7 was improved by adding encapsulated OEO (9% w/w) and interactions of glycerol and A-MSN with the polymeric matrix were observed. In fresh beef, AEF reduced surface discoloration and at 42 days of storage inhibited the growth (relative to the control) of *Brochothrix thermosphacta* (5.5 Log), *Escherichia coli* (3.5 Log), *Pseudomonas* spp. (2.8 Log) and aerobic mesophilic bacteria (6.8 Log). Also, at 21 days of storage improved its odor acceptability, thus enlarging its shelf life and proving the preservation capacity of this film.

Key words: fresh beef preservation, active edible packages, oregano essential oil, mesoporous silica nanoparticles.

1 INTRODUCCIÓN

Actualmente la proteína cárnica se mantiene como componente fundamental de una dieta equilibrada debido, principalmente a su contenido de aminoácidos esenciales; en México, el consumo de carne de bovino en el año 2020 fue de 15.1 kg por persona.

La carne cruda, debido a sus características de actividad de agua y su gran cantidad de nutrientes es una matriz susceptible al crecimiento de microorganismos deterioradores y patógenos, así como a reacciones de oxidación que repercuten directamente sobre la calidad sensorial del producto. Por otro lado, las reacciones de oxidación de la mioglobina, debido a la exposición de la carne al oxígeno del aire, generan cambios en su coloración que resultan poco atractivos para los consumidores. Estos problemas se han contrarrestado comúnmente mediante almacenamiento a temperaturas de refrigeración, empaques especializados y antioxidantes sintéticos. Sin embargo, actualmente el empaque primario con películas comestibles se posiciona como una alternativa prometedora debido a sus múltiples beneficios, entre los cuáles destacan sus propiedades de barrera al paso de gases, sus propiedades antimicrobianas y su capacidad para fungir como acarreadores de diferentes compuestos bioactivos. En cuanto a estos últimos, desde hace varios años una gran cantidad de estudios han mostrado la capacidad de aceites esenciales de algunas plantas como antioxidantes y antimicrobianos, además de su posible encapsulación para la protección de sus componentes volátiles, mejorando su efectividad y disminuyendo sus efectos negativos sobre la aceptabilidad de los productos alimentarios.

Con el fin de satisfacer la creciente demanda de productos naturales, que preserven las características de calidad en productos cárnicos al tiempo que aseguren su inocuidad, el presente trabajo tuvo como objetivo diseñar y caracterizar una película activa comestible a base de proteína de amaranto y quitosano, adicionada con aceite esencial de orégano encapsulado en nanopartículas de sílice mesoporosa para evaluar su efecto sobre las propiedades físicas, químicas, microbiológicas y sensoriales de carne fresca de res.

2 ANTECEDENTES

2.1 Carne fresca de res y vida de anaquel

La carne fresca es una buena fuente de nutrientes, además una matriz compleja donde los patógenos relacionados con alimentos y microorganismos de deterioro pueden crecer fácilmente. Para extender la vida de anaquel y garantizar la seguridad de estos productos se emplea el almacenamiento en refrigeración al vacío o en atmósferas modificadas. Sin embargo, estas condiciones permiten tanto la sobrevivencia como el crecimiento de cepas de patógenos y deterioradores, así como el desarrollo de reacciones de oxidación (Hernández-Hernández y col., 2019).

A pesar de que se ha intentado sustituir la proteína cárnica en las dietas actuales debido a sus probadas desventajas (costo de producción, daño al medio ambiente y huella hídrica), en la actualidad se mantiene como parte importante de una dieta equilibrada por ser fuente de aminoácidos, vitaminas y minerales esenciales para el desarrollo humano.

2.1.1 Mercado nacional de carne de bovino

Mundialmente, y a pesar de la tendencia a la alza de la producción de carne de bovino en los últimos años, la disrupción económica mundial asociada con la pandemia por COVID-19 causó que los consumidores optaran por proteínas menos caras, además se disminuyó el tráfico restaurantero, disminuyendo la demanda también y conduciendo a los productores a ajustar sus planes de producción. El efecto de la pandemia dio como resultado a nivel global un descenso en el consumo de 1.4 % al cierre del año 2020 (USDA, 2020). Sin embargo, según información del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2021) la producción estimada de carne de bovino para 2021 sería de 2,126,182 toneladas (t) (Figura 1), 2.3 % mayor respecto a 2020. De acuerdo a información del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA), se prevé que para el año 2021 México se mantenga como el séptimo productor a nivel mundial con una producción estimada de 2,190 t.



Figura 1. Panorama nacional de producción de carne de res.

(e= estimación 2021). *La producción no incluye el peso equivalente en canal del ganado exportado en pie (adaptado de Consejo Mexicano de la Carne, 2021).

Al cierre del 2020, en México se llegó a un consumo per cápita de 69 kg de carne al año. En cuanto a la carne de res, ésta ha mantenido su balanza comercial en superávit, las exportaciones incrementaron 9.7% y las importaciones decrecieron 15 %. Por otro lado, la producción creció un 2.6 % mientras que el consumo per cápita disminuyó un 0.2 %, siendo éste último de 15.1 kg por persona, ubicando a México en el 5° lugar de países consumidores de carne de bovino (Consejo Mexicano de la Carne, 2021).

El 64 % de la producción nacional en 2020 fue generado por 10 estados de la república, dentro de los cuáles destacan Veracruz (12.9 %), Jalisco (11.7 %) y San Luis Potosí (6.0 %) (SIAP, 2021). Actualmente México exporta a 10 países un promedio de 16,219 t de carne de bovino siendo los principales destinos Estados Unidos, Japón, Hong Kong y Corea del Sur (Consejo Mexicano de la Carne, 2021).

2.1.2 Normatividad

La normativa actual para la producción y comercialización de carne de res se resume en la Tabla 1.

Tabla 1. Normatividad para la producción y comercialización de carne de res.

Título	Clave
Especificaciones zoosanitarias para la construcción y equipamiento de establecimientos para el sacrificio de animales y los dedicados a la industrialización de productos cárnicos, en aquellos puntos que resultaron procedentes.	NOM-008-ZOO-1994
Proceso sanitario de la carne.	NOM-009-ZOO-1994
Información comercial-Declaración de cantidad en la etiqueta-Especificaciones.	NOM-030-SCFI-2006
Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas pre-ensados. Información comercial y sanitaria.	NOM-051-SCFI/SSA1-2010
Bienes y servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales.	NOM-086-SSA1-1994
Jamón-Denominación y clasificación comercial, especificaciones fisicoquímicas, microbiológicas, organolépticas, información comercial y métodos de prueba.	NOM-158-SCFI-2003
Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos.	NOM-194-SSA1-2004
Productos y Servicios. Productos cárnicos procesados y los establecimientos dedicados a su proceso. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.	NOM-213-SSA1-2018
Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios.	NOM-251-SSA1-2009

2.1.3 Composición química de la carne de bovino

La carne de res posee características nutritivas relevantes debido a su alto contenido de proteínas con aminoácidos esenciales y otros micronutrientes valiosos en la dieta como vitaminas (A, C, B₆ y B₁₂) así como minerales tales como hierro, zinc y potasio (Nicklas & Fulgoni, 2012). Pavan y col. (2013), realizaron el análisis proximal de ocho cortes de reses alimentadas con pasto según la clasificación estadounidense y cuyas equivalencias en la clasificación mexicana son: cuete, chuletón, pulpa negra, lomo, filete o solomillo, aguayón, espaldilla, carne molida (Consejo Mexicano de la Carne, 2019). Los resultados encontrados por estos investigadores se muestran en la Tabla 2; es importante resaltar que el aguayón es uno de los cortes con mayor contenido graso (4.52 %) y de ácidos grasos poliinsaturados (5.43 %).

Tabla 2. Análisis proximal y concentración de ácidos grasos poliinsaturados de cortes de reses alimentadas con pasto (Adaptado de Pavan y col., 2013).

Corte	N	g/100 g de corte crudo				AGPI ¹
		Humedad	Cenizas	Proteína	Lípidos	g/100 g de AGT ²
Cuete	13	74.11 ^a	1.17 ^a	23.07 ^{ab}	2.30 ^d	6.87 ^a
Chuletón	13	72.57 ^b	1.14 ^a	23.78 ^a	3.04 ^d	5.07 ^c
Pulpa negra	12	72.84 ^b	1.18 ^a	21.58 ^b	3.14 ^d	5.90 ^b
Lomo	13	72.74 ^b	1.18 ^a	23.23 ^{ab}	3.20 ^d	5.05 ^c
Aguayón	13	72.02 ^{bc}	1.15 ^a	22.20 ^{ab}	4.52 ^c	5.43 ^{bc}
Filete	13	70.05 ^d	1.17 ^a	23.34 ^{ab}	6.29 ^b	4.94 ^c
Espaldilla	13	71.36 ^c	1.04 ^b	20.20 ^c	6.91 ^b	3.64 ^d
Carne molida	13	59.44 ^c	0.84 ^c	18.54 ^c	19.93 ^a	1.99 ^e
EE		1.69	0.10	2.56	1.31	0.952

^{a, b, c, d, e}Dentro de una columna, medias sin un superíndice en común son diferentes (P<0.05). N=número de muestras. EE=error estándar.

¹AGPI (Ácidos Grasos Poliinsaturados)= C18:2 n-6+C18:3 n-3+C20:4 n-6+C20:5 n-3+C22:5 n-3+C22:6 n-3.

²AGT: ácidos grasos totales.

El contenido y el tipo de lípidos en la carne son características de relevancia debido a la susceptibilidad de estos compuestos a oxidarse, provocando cambios en sus características sensoriales y nutricionales. Cabe señalar que los cortes con mayor calidad poseen mayor contenido graso, como se observa en la Tabla 3:

Tabla 3. Composición proximal de cortes de res (adaptado de Smith y col., 2011).

Grado de calidad USDA ^a	Porcentaje			
	Grasas	Humedad	Proteína	Cenizas
Prime	14.8 ^a	60.0 ^a	24.9 ^a	1.10 ^a
Choice	7.9 ^b	66.0 ^b	26.3 ^b	1.16 ^a
Select	5.4 ^c	67.0 ^b	27.7 ^c	1.24 ^b
EEM	0.3	0.4	0.2	0.02

Medias dentro de una misma columna y fila, sin una letra en común (a-e) son diferentes ($p < 0.05$). EE= Error Estándar. ^aDepartamento de Agricultura de Estados Unidos (1997)

2.1.4 Oxidación de los lípidos, la mioglobina y su efecto sobre la aceptabilidad de la carne de res

Para los consumidores, un factor de calidad de gran relevancia es la presencia de un color rojo brillante, el cual es interpretado por los consumidores como un indicador de frescura e integridad de la carne cruda de res.

En condiciones de vacío la carne de res mantiene un color morado-rojizo debido a la formación de desoximioglobina; un acomodo de los cortes de carne en empaques altamente permeables al oxígeno asegura la formación del pigmento oximioglobina y un color rojo brillante muy atractivo. Sin embargo, la continua exposición al oxígeno favorece la oxidación de los lípidos y la mioglobina, resultando en una acumulación gradual de la metamioglobina en la superficie de la carne y una consecuente decoloración del color rojo a un color café. Por tanto, si las reacciones de oxidación son retardadas, su vida de anaquel puede extenderse (Pereira-Cardoso y col., 2016).

El empaque en atmósferas modificadas es utilizado como un método efectivo para mejorar el color de la carne cruda. Sin embargo se ha mostrado que una alta concentración de oxígeno

puede causar la degradación de la calidad por la oxidación de lípidos y proteínas, produciendo así rancidez en la carne. Lo que a su vez puede afectar el color y el sabor característicos de la carne empacada (Zakrys-Waliwander y col., 2013). Su aplicación se ha incrementado en los años recientes, pero la optimización de la composición de gases aún es crítica para asegurar la calidad y la inocuidad de los alimentos.

Una parte importante de la microbiota de la carne son las bacterias ácido-lácticas (BAL), cuya actividad metabólica resulta en un deterioro por la aparición de sabores ácidos desagradables, exudados lechosos y, frecuentemente, viscosos, hinchamiento de los empaques y enverdecimiento (Samelis y col., 2000).

Una posible alternativa para la solución del problema de la pérdida de calidad en los cortes de carne fresca de res es el uso de recubrimientos comestibles que pueden aplicarse como empaques primarios sobre la carne.

2.1.5 Pérdidas de producto nacional y estimación de la vida de anaquel

El almacenamiento en refrigeración, súper-refrigeración y congelamiento son los métodos de conservación comerciales más comunes de la carne fresca. La carne congelada es una forma segura de almacenar la carne. Sin embargo, la calidad y la palatabilidad (textura, jugosidad, sabor, etc.) puede reducirse debido a los procesos de congelamiento y descongelamiento, por lo que es menos popular entre los consumidores comparada con el almacenamiento bajo condiciones de refrigeración. Por su parte, la carne refrigerada tiene una vida de anaquel limitada, lo cual es un factor limitante para su distribución y transporte en distancias largas (Xue y col., 2020).

En 2016, Chandra y col., estimaron la vida de anaquel de carne de res empacadas con películas comestibles combinadas con clavo (*Syzygium aromaticum*) y canela (*Cinnamomum cassia*) en polvo, mediante la metodología de superficie de respuesta. Para temperaturas de 10 °C y 4 °C, la vida de anaquel estimada fue de 22 y 32 días respectivamente.

Según datos del Banco Mundial (2017), en México se desperdician 552,382 t de carne de res al año a lo largo de la cadena alimentaria, lo cual representa un 35.41% del consumo anual.

El impacto ambiental generado por los desperdicios se traduce en un fuerte costo económico debido a emisiones de CO₂ y uso de agua principalmente.

2.2 Recubrimientos comestibles

Las películas y recubrimientos comestibles son delgadas capas de materiales comestibles, a base de proteínas, carbohidratos, lípidos o la mezcla de estos, aplicadas en productos alimenticios que juegan un papel importante en su conservación, distribución y mercadotecnia. Algunas de las funciones de los recubrimientos son proteger el producto de daños mecánicos y de actividades físicas, químicas y microbiológicas (Falguera y col., 2011). Por su parte las películas usualmente se usan para el acarreo del alimento, pues no están en contacto íntimo con la superficie como los recubrimientos.

Existe una creciente demanda por parte de los consumidores por alimentos saludables e ino cuos y una exigencia de métodos de empaque con menor impacto ambiental. Los recubrimientos comestibles han adquirido un gran interés en los años recientes debido a sus beneficios sobre las películas sintéticas y sus prometedoros resultados en la conservación de alimentos. Las técnicas tradicionales usadas para la aplicación de empaques comestibles son la granulaci3n de lecho fluidizado, la aspersi3n, la inmersi3n y el barnizado (Debeaufort y col., 1998). Las películas comestibles pueden mejorar las propiedades organolépticas de algunos productos gracias a su capacidad de portar saborizantes, colorantes o endulzantes; adem1s pueden fungir como acarreadores de antimicrobianos y antioxidantes (Bourtoom, 2008).

Recubrimientos basados en polisac1ridos

Los polisac1ridos son pol1meros naturales, a veces denominados hidrocoloides o pol1meros hidrof1licos, que generalmente contienen una gran cantidad de grupos hidroxilo. Incluyen compuestos como el almid3n, el alginato, la carboximetilcelulosa, la goma ar1biga, la pectina, la goma xantana y el quitosano (Shit & Shah, 2014). Los recubrimientos de polisac1ridos son incoloros, tienen una apariencia no grasosa y un contenido cal3rico m1nimo. Adem1s, pueden ser aplicados para prolongar la vida de anaquel de frutas, verduras,

mariscos y productos cárnicos mediante la reducción significativa de su deshidratación, del oscurecimiento de su superficie así como de su rancidez oxidativa (Hassan y col., 2018).

El quitosano es un polisacárido obtenido mediante la desacetilación de quitina, la cual se extrae del exoesqueleto de crustáceos e insectos y de paredes celulares de hongos. Es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa, no es tóxico y es biodegradable; su composición se basa en unidades de glucosamina y N-acetilglucosamina, unidas por enlaces glucosídicos β -(1→4) (Vunain, Mishra & Mamba, 2017). Se ha utilizado extensivamente en películas y recubrimientos debido a su habilidad para inhibir el crecimiento de algunas bacterias y hongos patógenos (Romanazzi y col., 2002)

Recubrimientos basados en proteína

Así como los polisacáridos, las proteínas son excelentes materiales para la formación de recubrimientos debido a que muestran excelentes propiedades mecánicas y estructurales, sin embargo tienen una capacidad de barrera contra la transferencia de humedad muy pobre. Este problema no se presenta en los lípidos debido a sus propiedades hidrofóbicas, especialmente aquellos con altos puntos de fusión (Morillon y col., 2002). Para la formación de la película generalmente se forma una solución o una suspensión de la proteína en agua, etanol o una mezcla de ambos. Generalmente, las proteínas también deben ser desnaturalizadas por calor o mediante un solvente ácido o base con el objetivo de extender las cadenas proteicas para que se puedan asociar por medio de puentes de hidrógeno, enlaces iónicos, hidrofóbicos o covalentes. La interacción cadena-cadena que produce películas cohesivas es afectada por el grado de desdoblamiento de la cadena proteica y por la naturaleza y secuencia de sus residuos de aminoácidos (Kester & Fennema, 1986).

2.2.1 Proteína de amaranto

El amaranto (*Amaranthus* sp.) es una planta tradicional mexicana con aproximadamente 60 especies de plantas, la mayoría de las cuáles son silvestres (Stallknecht & Schulz-Schaeffer, 1993). Se ha cultivado en México desde hace 5,000-7,000 años, pero su cultivo se discontinuó a inicios del siglo XV hasta finales de la década de 1970 (Cai, Corke & Wu, 2004). *Amaranthus cruentus* y *Amaranthus hypochondriacus* son dos especies cultivadas

principalmente por sus granos (Singh y col., 2019). Debido a su alto contenido proteico y composición de aminoácidos balanceado, el amaranto es un pseudocereal reconocido como una potencial fuente de productos alimenticios. Alimentos tales como harinas, cereales de desayuno, pasta, bisquets libres de gluten y tortillas pueden producirse a partir de los granos de amaranto, con el objetivo de alcanzar los requerimientos de dietas especiales, enriqueciendo el contenido de proteína del pan e incrementando el contenido de lisina en los alimentos (Tosi y col., 2002).

El amaranto es una buena fuente de almidón, proteínas, lípidos, fibra dietaria y minerales (Tabla 4). El almidón es el carbohidrato más abundante en los granos de amaranto, aproximadamente 62 %-65 % p/p y tiene bajo contenido de amilosa, variando del 2 % al 12 % dependiendo del genotipo, mientras que el contenido de amilopectina está entre 90 %-98 %, que representan en promedio 1700 moléculas de amilopectina (Wilhelm y col., 2002).

Tabla 4. Composición de los granos de amaranto en base húmeda y base seca.

	Porcentaje		
Proteína	14.6±2.1	15.27±0.28	12.5±0.2 - 15.2±0.1
Carbohidratos	59.3±2.45	-	73.7±0.0-77.0±0.1
Lípidos	7.0±0.59	7.33±0.23	7.1±0.1-8.0±0.0
Ceniza	2.8±0.37	2.93±0.18	3.0±0.1-3.5±0.1
Fibra	3.92±0.54	2.04±0.04	-
Humedad	12.4±0.88	9.51±0.29	-
Referencia	Das y col., (2021)	Siwatch y col., (2019)	Shevkani y col., (2014)

Características de las proteínas del grano

Los granos de amaranto están compuestos principalmente de tres fracciones mayoritarias de proteínas: albúminas (51 %), globulinas (16 %) y glutelinas (24 %) con una pequeña reserva de prolamina (1.4-2.0 %, soluble en alcohol). Las globulinas se compone de 11S- globulina y globulina-p (nombrada previamente albúmina 2). La primera puede extraerse mediante el tratamiento de la harina de amaranto con un amortiguador neutro salino mientras que la

segunda puede extraerse con agua después de un tratamiento salino de la harina; por otro lado las glutelinas son sólo solubles en medios ácidos o alcalinos. La globulinas son principalmente del tipo 11S, la cual tiene como componente mayoritario la amarantina, constituyendo esta última un 90 % del total de las globulinas y cerca de 19 % del total del grano de amaranto. La albúmina de amaranto (AmA) se clasifica en albúmina 1 y albúmina 2; la albúmina 1 es soluble en agua y/o en soluciones salinas, mientras que la albúmina 2 es soluble en agua y se puede extraer tras la remoción de la albúmina 1 y la globulina con solución salina (Martínez y col., 1997). La albúmina 2 (globulina-*p*) es escasa y se forma por una gran cantidad de subunidades polipeptídicas, es muy similar a la amarantina excepto por la presencia de la subunidad 54 kDA y su tendencia a polimerizarse (Singh y col., 2019).

Tabla 5. Composición de aminoácidos de las fracciones proteicas del amaranto (*A. hypochondriacus* L.; adaptado de Singh y col., 2019).

Aminoácido ^a	Fracciones proteicas			
	Albúminas	Globulinas	Prolaminas	Glutelinas
Isoleucina	3.7	4.2	6.2	5.8
Leucina	5.7	5.7	5.7	10.5
Lisina	7.6	6.7	4.2	4.6
Metionina	4.1	3.4	7.4	3.1
Cisteína	5.9	3.9	6.5	6.2
Fenilalanina	5.1	5.0	9.0	6.8
Tirosina	3.3	4.3	4.0	3.8
Treonina	3.9	4.1	3.2	8.6
Valina	4.5	4.7	2.7	3.8
Histidina	2.5	1.1	1.1	4.7
Alanina	5.1	4.0	4.7	3.6
Arginina	8.1	9.5	9.4	2.7
Ácido aspártico	6.2	8.7	6.2	6.1
Ácido glutámico	17.5	17.3	13.4	13.2
Glicina	6.2	6.6	4.4	4.9
Prolina	3.7	3.9	4.7	4.6
Serina	4.8	4.9	5.1	5.3

^aExpresado como g de aminoácido/100 g de proteína cruda.

Las proteínas de amaranto contienen cantidades significativas de lisina (a diferencia de los cereales) y de aminoácidos azufrados (a diferencia de las leguminosas) (Tabla 5). Los granos de amaranto tienen más proteína que la mayoría de los cereales (11 %-17 %), son un alimento adecuado para las personas alérgicas al gluten y la digestibilidad, la lisina disponible, la utilización de la proteína neta y la razón de eficiencia de la proteína son sustancialmente más altas en la proteína de amaranto que en los granos de cereales. La harina de amaranto se ha utilizado como materia prima para la producción de películas y recubrimientos comestibles, en una escala en laboratorio (Tapia-Bácido y col., 2011). Las películas comestibles de aislado de proteína de amaranto de diferentes tratamientos a alta presión demostraron superficies uniformes, características más opacas y propiedades mecánicas mejoradas, menor solubilidad en agua y menor permeabilidad al vapor que dispersiones de proteína no tratadas (Condés y col, 2015).

2.2.2 Plastificante

Además del componente del biopolímero de alto peso molecular (matriz), otro componente importante de las películas comestibles son los plastificantes, los cuales 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; además, afectan la capacidad de atracción de agua del sistema y generalmente suelen aumentar la permeabilidad al oxígeno de los recubrimientos comestibles (Pereda y col., 2007). Los plastificantes comúnmente utilizados en películas y recubrimientos comestibles son polioles, que incluyen glicerol, sorbitol y sacarosa. La efectividad de un plastificante depende principalmente de su tamaño, forma y compatibilidad con la matriz de la película/recubrimiento, además, su concentración también resulta importante dado que los plastificantes sólidos pueden tener un efecto “antiplastificante”, disminuyendo la flexibilidad de la matriz y aumentando su permeabilidad (Dangaran & Krochta, 2007).

2.3 Aceites esenciales

Los aceites esenciales se extraen de diversos materiales vegetales (de alguno de sus componentes o del material completo), su composición es compleja, principalmente a base de compuestos aromáticos y volátiles. Se considera que son metabolitos secundarios con probadas propiedades antimicrobianas, antiparasíticas, insecticidas, antivirales, antifúngicas y antioxidantes (Hyldgaard, Mygind & Meyer, 2012).

Se sabe que la temperatura, la luz y la disponibilidad de oxígeno afectan la integridad de los aceites esenciales, siendo junto a su naturaleza volátil una limitante para su uso. La encapsulación en sólidos porosos, como las sílices mesoporosas, zeolitas y redes metal-orgánicas (RMO) hace posible inmovilizar los compuestos más volátiles de los aceites esenciales, estabilizarlos y protegerlos contra la luz, el oxígeno y el aumento de temperatura, así como modular su liberación mediante la prolongación del perfil de la cinética de difusión (Himed y col., 2019).

2.3.1 Composición del aceite esencial de orégano

El aceite esencial de orégano ha mostrado buenas propiedades antimicrobianas asociadas a su composición, estructura y grupos funcionales. Los aceites esenciales del orégano europeo (*Origanum vulgare* L.) y del orégano mexicano (*Lippia graveolens* H.B.K.) son efectivos contra bacterias, levaduras y hongos en los cuales tanto el timol como el carvacrol son los principales responsables de estas propiedades. Estos compuestos tienen diferentes mecanismos de acción: pueden incrementar la permeabilidad de las membranas celulares, generando su desintegración y por consiguiente, la disipación de la fuerza protón-motriz; además, el timol tiene influencia sobre los genes que sintetizan las proteínas de membrana (Hernández-Hernández y col, 2014). La actividad antimicrobiana puede ser influenciada por la composición y la cantidad de moléculas bioactivas en los aceites esenciales, afectadas por el origen geográfico, la variedad, las condiciones de crecimiento, las variaciones de las temporadas, ciclo vegetativo, factores ambientales y del suelo, tiempo de almacenamiento y el método de secado de las hojas.

La acción del timol y del carvacrol han mostrado un comportamiento aditivo, incrementando la permeabilidad de las membranas celulares, disipando el gradiente de pH y causando el rompimiento de iones inorgánicos, los cuales se consideran los mecanismos principales a los que se ha atribuido la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano (Lambert y col., 2001).

2.4 Nanopartículas de sílice mesoporosa

Las nanopartículas de sílice mesoporosa (NSM) son estructuras de dióxido de silicio (SiO_2), que están dispuestas de manera que crean poros de 2 a 50 nm (Zhao, 2006). La primera sílice porosa descrita con un tamaño de poro uniforme fue reportada por Yanagisawa y col. (1990). En 1992, investigadores de Mobil Company reportaron la síntesis de una familia de materiales de sílice mesoporosa denominadas M41S, la cual incluye a la hexagonal MCM-41 (Mobil Composition of Matter No. 41), la cúbica MCM-48 (Mobil Composition of Matter No. 48) y la lamelar MCM-50 (Mobil Composition of Matter No. 50) (Beck y col., 1992). Las NSM se sintetizan a partir de una plantilla (dirige la construcción de la red cristalina) y de un precursor polimérico que se organiza sobre ésta, construyendo finalmente la estructura final mediante su polimerización. Los poros se obtienen mediante la eliminación del tensoactivo y calcinación a alta temperatura entre 500 °C a 600 °C (Figura 2) (Hoffmann y col., 2006).

La red mesoporosa de las NSM le confiere una gran área superficial y un gran volumen de poro (otorgándole alta capacidad de carga), las cuales son características importantes para la encapsulación y retención de los componentes bioactivos. Además, el rango de tamaño de las MSN es importante, ya que se ha demostrado que juega un papel clave en la distribución y el comportamiento en los sistemas vivos (Pérez-Esteve y col., 2015).

La adsorción de moléculas bioactivas en sílice mesoporosa está controlada por el tamaño y la selectividad de carga. Sólo las moléculas con un tamaño menor al del tamaño del poro del soporte de sílice pueden ser atrapadas en la estructura porosa (Arcos y col., 2013). Otros factores que determinan la adsorción y la cinética de liberación de los compuestos bioactivos en un medio en específico son la longitud del poro y su ordenamiento (Izquierdo-Barba y

col., 2009a), la morfología de la partícula (Manzano y col., 2008), el área superficial (Balas y col., 2006), la forma macroscópica (Izquierdo-Barba y col., 2009b) y la modificación o funcionalización de la superficie de sílice con grupos funcionales (Nieto y col., 2008).

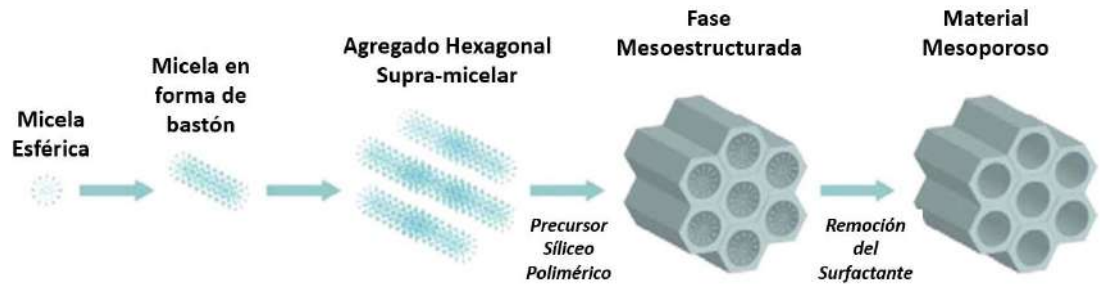


Figura 2. Representación esquemática de la síntesis de partículas de sílice mesoporosa mediante agentes direccionadores de estructuras (Adaptado de Pérez-Esteve y col., 2015).

Las NSM se pueden aplicar para administrar compuestos activos de manera controlada, razón por la cual se han usado precursores compatibles con alimentos para su síntesis, como cenizas de cáscara de arroz como fuente de sílice y los ésteres de poliglicerol de ácidos grasos, el éster de ácido mirístico de pentaglicerol y el ácido oleico como agentes generadores de NSM de calidad alimentaria (Tae y col., 2009).

2.4.1 Toxicidad

La toxicidad de las NSM se relaciona con su tamaño de partícula. Se ha demostrado que los tamaños de partícula pequeños conducen a interacciones con los eritrocitos, por lo cual es necesaria la evaluación de su biocompatibilidad con estos componentes como pruebas básicas de toxicidad. Tzankova y col., (2019) demostraron la buena biocompatibilidad de las partículas de sílice mesoporosa MCM-41 (0.1–1.0 mg/mL).

2.4.2 Encapsulación de aceites esenciales en sílice mesoporosa

La encapsulación de aceites esenciales utilizando polímeros naturales se ha mostrado como una alternativa prometedora para aumentar sus características funcionales. La encapsulación de aceites esenciales en NSM provee su protección, la prevención de su volatilización, aumenta su estabilidad, sus efectos a largo plazo y su miscibilidad en suspensión acuosa. Las NSM son biológicamente inertes, estables y su estructura porosa le confiere características adecuadas para la encapsulación de aceites esenciales (Silva-Damasceno y col., 2018).

Una ventaja adicional de las NSM es que pueden ser bloqueadas para así proteger los aceites esenciales encapsulados contra la degradación o evaporación, permitiendo una liberación prolongada del antimicrobiano. Himed y col., (2019) encontraron que la encapsulación de aceite esencial en sílice porosa amorfa no afectó su actividad antioxidante comparado con el aceite esencial libre, lo cual sugiere que este procedimiento puede producir un material listo para utilizarse como componente de empaques activos o incluso como conservador en alimentos debido a que el sílice es un aditivo alimentario común. En otro estudio realizado por Bravo-Cadena y col. (2018), la encapsulación de aceite esencial en NSM aumentó la potencia de su efecto antimicrobiano hasta 10 veces comparado con los aceites libres.

En el 2017 Hernández-Hernández y col., evaluaron la influencia de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) incorporado en un recubrimiento activo sobre carne fresca de cerdo como aceite esencial libre, nanoemulsificado y microencapsulado. El efecto *in vitro* de los recubrimientos se probó contra cepas de *Brochothrix thermosphacta*, *Micrococcus luteus*, *Lactobacillus plantarum*, *Pseudomonas fragi* y *Salmonella* Infantis. Los recubrimientos activos provocaron la inhibición del crecimiento microbiano, siendo aquél con aceite esencial microencapsulado el más eficiente en el control de la microbiota. Además, los recubrimientos activos retardaron la oxidación de los lípidos y la oximioglobina en la carne de cerdo. Después de 15 d de almacenamiento en condiciones de refrigeración, las muestras de carne protegida con recubrimientos comestibles activos fueron evaluadas como deseables por un grupo de panelistas, mientras que las muestras no recubiertas fueron rechazadas.

Azarifar (2020), aplicó un recubrimiento de gelatina y CMC (carboximetil celulosa) incorporado con nanofibras de quitina y aceite esencial de hierba de obispo (*Trachyspermum ammi*) sobre carne de res refrigerada y se evaluaron sus características de vida de anaquel. Tras 12 días de almacenamiento, se encontró que las menores cuentas microbianas, el menor cambio en las propiedades químicas y la mejor evaluación sensorial fueron obtenidos por muestras empacadas con películas incorporadas con 1 % de aceite esencial y 4 % de nanofibras de quitina. En otro estudio, Hernández-Hernández y col. (2019) determinaron la composición de aceite esencial de orégano y albahaca y su efecto en las propiedades microbiológicas y fisicoquímicas de carne de cerdo aplicados como microcápsulas en un recubrimiento de almidón. Los investigadores encontraron que tal tratamiento mostró tanto las menores concentraciones de sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico así como el menor crecimiento microbiano además las mejores evaluaciones de olor y color, con respecto a las muestras no recubiertas y recubiertas sin aceite esencial.

3 JUSTIFICACIÓN

La carne de res se ha mantenido como un componente esencial en las dietas actuales, tal hecho se ve reflejado en el constante crecimiento del mercado nacional de carne de bovino. Las principales causas asociadas a las pérdidas de este tipo de productos son el deterioro microbiano y la degradación fisicoquímica, por lo que los productores han optado por diferentes estrategias de empaque para mantener las características sensoriales del producto por el mayor tiempo posible y bajo diferentes condiciones de almacenamiento. Sin embargo, en vista de la creciente demanda de los consumidores por productos naturales y con bajo impacto ambiental, es necesario buscar alternativas a los métodos tradicionales de conservación.

Las películas comestibles se han mostrado como opciones seguras en la conservación de diferentes alimentos, siendo elaboradas a base de biopolímeros extraídos de materias primas de bajo costo, exhibiendo propiedades de barrera y antimicrobianas y ofreciendo la posibilidad de actuar como acarreadores de compuestos bioactivos. Dentro de estos últimos, destaca el uso de aceites esenciales provenientes de diferentes materiales vegetales, los cuales se han empleado en la conservación de diferentes alimentos debido a sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Sin embargo, su susceptibilidad a degradarse en condiciones ambientales y su posible efecto negativo sobre el perfil organoléptico de los productos representa una desventaja, razón por la cual se se ha propuesto su encapsulación en materiales mesoporosos, la cual puede ofrecer la protección de sus compuestos volátiles y su liberación gradual, reduciendo también su influencia en la aceptabilidad por parte de los consumidores.

Es por lo anterior que el objetivo de este trabajo fue diseñar y evaluar un empaque comestible a base de proteína de amaranto y quitosano, adicionado con aceite esencial de orégano encapsulado en nanopartículas de sílice mesoporosa como antioxidante y antimicrobiano natural, para la conservación de carne fresca de res.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Elaborar una película activa comestible que incorpora nanopartículas de sílice mesoporosa con aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) para conservar las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales de carne fresca de res.

4.2 Objetivos específicos

- Diseñar una película activa comestible (PAC) a base de un aislado de proteína de amaranto (APA) y quitosano (Q) incorporado con nanopartículas de sílice mesoporosa (NSM) adicionadas con aceite esencial de orégano mexicano (AEO).
- Determinar las propiedades mecánicas, de barrera al vapor de agua, químicas y antimicrobianas de las películas activas comestibles diseñadas.
- Monitorear las características físicas, químicas, microbiológicas y sensoriales de carne fresca de res recubierta.

5 METODOLOGÍA

5.1 Materiales y medios de cultivo

El quitosano (mediano peso molecular 375 kDa, desacetilación 75 % y alto grado de pureza), glicerol (≥ 99.5 %), D-lactosa monohidratada, trietilortosilicato, ácido clorhídrico (reactivo analítico), ácido tricloroacético (TCA), 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (BHT), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), tetraetilortosilicato (TeOS), 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES), etanol (>99 % v/v), ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), glicerol, hidróxido de sodio, ácido nalidíxico, bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), dimetil sulfóxido (DMSO), hexano, solución salina de fosfatos (PBS), cloruro de sodio, sulfato de estreptomicina, acetato de talio y cicloheximida se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis MO, EUA). El Tween 80, el sulfito de magnesio heptahidratado y el fosfato dibásico de potasio se adquirieron de J.T. Baker (Estado de México, México). El agar cuenta estándar, agar sulfito de bismuto, caldo nutritivo, extracto de levadura, agar bacteriológico y peptona de caseína se adquirieron de Bioxon (Cuautitlán, México). El agar McConkey-sorbitol se obtuvo de Gibco (Ciudad de México, México). Para el agar sulfato de estreptomicina, acetato de talio y actidiona (STAA, por sus siglas en inglés), se utilizó una base con (% p/v): peptona de caseína, 2; glicerol anhidro, 1.5; extracto de levadura, 0.2; fosfato dibásico de potasio, 0.1; sulfito de magnesio heptahidratado, 0.1; agar bacteriológico, 1.3; se suplementó con (% p/v): sulfato de estreptomicina, 0.005; acetato de talio, 0.0005 y cicloheximida, 0.0005.

5.2 Material biológico y cepas microbianas

Los granos de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) se obtuvieron del mercado local de Santiago de Querétaro (Querétaro, México); las hojas de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) se adquirieron en Cerrito Parado, Tolimán (Querétaro, México). Un specimen (voucher) se autenticó y se depositó en la colección etnobotánica del herbario de Querétaro “Dr. Jerzy Rzedowski” (QMEX), localizado en la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ (voucher specimen: E. Hernández-Hernández No. 1, Tolimán, Querétaro).

Las bacterias utilizadas se obtuvieron de la colección de cultivos del Laboratorio de Biotecnología de Alimentos del Departamento de Investigación y Posgrado de Alimentos (DIPA), Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, México. Fue utilizada una cepa de *Escherichia coli* O157:H7.

5.2.1 Conservación de las cepas microbianas

Las cepa de *E. coli* se conservó en leche descremada estéril y glicerol a -70 °C y se activó en caldo nutritivo a 37 °C; posteriormente el cultivo fue incubado a temperatura óptima hasta alcanzar la fase exponencial temprana (Hernández-Hernández, y col., 2017; 2019).

5.3 Extracción de aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) (AEO)

Se utilizaron hojas secas de orégano mexicano obtenidas del mercado de Tolimán, Querétaro. El aceite esencial se obtuvo mediante extracción por destilación agua-vapor de 300 g de orégano, la operación se llevó a cabo por 2 h, en un equipo diseñado por el Cuerpo Académico de Biotecnología en la planta piloto de Biotecnología del Parque Biotecnológico, UAQ (Querétaro, México). El condensado fue recibido en un embudo de separación de 250 mL. El AEO se recuperó por decantación y se secó con sulfato de sodio anhidro, posteriormente fue esterilizado por filtración usando una unidad Swinnex con membrana (Millipore, Burlington, MA, EUA) con tamaño de poro de 0.45 µm de polifluoruro de vinilideno para finalmente almacenarlo en viales ámbar sellados y almacenados a 4 °C hasta su uso (Hernández-Hernández y col., 2014).

5.4 Obtención del aislado de proteína de amaranto (APA)

Se realizó el método propuesto por Condés y col. (2018) con algunas modificaciones. Se obtuvo harina de amaranto (HA) mediante la molienda de granos de amaranto (sin ningún tipo de pretratamiento térmico) y se suspendió en agua destilada (100 g/L) ajustando el pH de la solución a 9.0 con NaOH 2N, la suspensión de harina se agitó por 1 h a temperatura ambiente, se filtró con una coladera para eliminar partículas grandes y en seguida se centrifugó a 10,000 x g por 20 min a 15 °C. El sobrenadante fue recuperado y filtrado con manta de poro abierto, su pH se ajustó a 5.0 con HCl 2 N y se agitó por 60 min a temperatura

ambiente. A continuación, se centrifugó a 10,000 x g por 20 min a 4 °C, finalmente se recuperó la pastilla de aislado proteico utilizando una espátula y una mínima cantidad de agua. Para aumentar la concentración de proteína en el aislado se llevaron a cabo lavados de las pastillas. El APA obtenido de 300 g de harina de amaranto se suspendió con agua destilada hasta un volumen de 1 L, y se realizó el procedimiento descrito anteriormente para su disolución y precipitación 2 veces. El APA lavado se secó a 40 °C por 48 h y se molió para obtener un polvo fino. Para su conservación se almacenó en frascos de vidrio a temperatura de refrigeración hasta el momento de su uso.

Se determinó el contenido de proteína (nitrógeno x 5.85) de la harina de amaranto y del aislado de proteína siguiendo la metodología Kjeldahl (AOAC, 1995). El rendimiento del APA se determinó de acuerdo con la ecuación 1:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{proteína en el aislado (g)}}{\text{proteína en la harina (g)}} \times 100 \quad (1)$$

5.5 Síntesis de nanopartículas de sílice mesoporosas (NSM)

Se usaron 0.5 g de CTAB (como agente generador de poros), se dispersaron por medio de un baño sonicador en 240 mL de agua destilada con 1.75 mL de NaOH 2 N a temperatura ambiente durante 15 min. La muestra se calentó a 80 °C, se agitó vigorosamente y se le adicionó 2.5 mL de TeOS gota a gota durante 5 min, la agitación y temperatura se mantuvieron constantes durante 2 h. El producto sólido formado se separó por filtración mediante un embudo de vidrio con disco de vidrio sinterizado, se lavó dos veces con agua destilada, dos veces con etanol (99 %) y se mantuvo el filtrado a temperatura ambiente hasta obtener un polvo seco. El polvo resultante se calcinó a 500 °C por al menos 5 h para eliminar los rastros del tensoactivo (Fernandez-Bats y col., 2018, Bravo-Cadena y col., 2018).

5.5.1 Funcionalización de nanopartículas de sílice mesoporosas

Las NSM se modificaron superficialmente realizando una suspensión de 500 mg de nanopartículas en 10 mL de etanol absoluto, enseguida se añadió una solución de APTES (100 mg/mL) en una proporción de 1 mL/100 mg de nanopartículas. La mezcla final se agitó

durante 12 h a temperatura ambiente. Las NSM funcionalizadas (NSMF) se separaron por filtración y se secaron usando dos lavados con etanol absoluto (Fernandez-Bats y col., 2018).

5.6 Encapsulación del AEO en las NSMF y determinación de su capacidad de carga

Se cargaron las NSMF con AEO (NSMA) mediante la disolución de 0.1 g de NSMF y 0.1 de AEO en 5 ml de etanol puro; la solución se agitó durante 24 h en una campana de extracción hasta la completa volatilización del solvente (Ríos de Benito, 2020).

Para determinar la concentración de AEO encapsulado en las NSMA se determinó la concentración de fenoles totales en las NSMA y en el AEO mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu siguiendo la metodología de Singleton & Rossi (1965) con algunas modificaciones. Se pesaron 100 mg de muestra en un matraz Erlenmeyer al cual se adicionaron 10 mL de etanol absoluto; la mezcla se mantuvo a una temperatura menor a 25 °C aproximadamente, protegida de la luz y bajo agitación constante por 12 h. El extracto obtenido se centrifugó a 4,000 rpm por 10 min y al sobrenadante fueron aplicadas dos diluciones decimales con etanol absoluto. Para la determinación se adicionaron a un tubo Eppendorf 50 µL del extracto diluido, 200 µL de agua destilada, 125 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N y tras agitación en vortex, 625 µL de carbonato de sodio al 7 % (p/v). La mezcla se dejó reposar por 2 h a temperatura ambiente y protegida de la luz; finalmente se midió la absorbancia a 760 nm. Para la determinación de los compuestos fenólicos se empleó una curva de calibración ($R^2 > 0.99$) obtenida de diferentes concentraciones de ácido gálico (0-10 µg/mL) a las cuáles se les midió la absorbancia tras realizar el procedimiento descrito anteriormente. El cálculo del porcentaje de equivalentes de ácido gálico en la muestra se realizó usando las ecuaciones (2) y (3):

$$\% \text{ de eq. de ácido gálico} = \frac{\text{mg eq. de ácido gálico}}{\text{mg de muestra}} \times 100 \quad (2)$$

$$\% \text{ de eq. de ácido gálico} = \frac{(A - A_0 + b)(F_0 * F_{10} * F_D)}{m \text{ (mg de muestra)}} \times 100 \quad (3)$$

donde:

A: Absorbancia de la muestra.

A₀: Absorbancia del blanco.

b: Ordenada al origen de la curva de calibración ajustada.

m: Pendiente de la curva de calibración ajustada.

F₀: Factor de dilución inicial (10)

F₁₀: Factor de dilución decimal (100)

F_D: Factor de dilución (20).

Por tanto:

$$\% \text{ de eq. de ácido gálico} = \frac{(A-A_0+b)(20,000)}{m \text{ (mg de muestra)}} \quad (4)$$

Para el cálculo de la concentración de AEO en las NSMA se aplicó un balance de masa por componente (eq. de ácido gálico) (ecuación 5), donde “X” es la fracción de eq. de ácido gálico:

$$X_{NSMF}NSMF + X_{AEO}AEO = X_{NSMA}NSMA \quad (5)$$

de donde:

$$AEO = \frac{X_{NSMA}NSMA - X_{NSMF}NSMF}{X_{AEO}} \quad (6)$$

5.7 Concentración mínima inhibitoria de AEO y Q contra *E. coli* O157:H7

Se realizó según la metodología descrita por Hernández-Hernández (2019) con algunas modificaciones. Se añadió AEO en caldo nutritivo con Tween 80 (10 % v/v) para producir concentraciones de 1-20 mg/mL. Por otro lado, se elaboró una solución de caldo nutritivo con Q (1 % p/v), ácido láctico (H láctico; 0.50 % v/v) y Tween 80 (10 % v/v), la cual se diluyó con Tween 80 en caldo nutritivo (10 % v/v) para producir concentraciones en el rango de 0.25-10 mg/mL de Q. Se añadió un control con las especificaciones antes mencionadas,

pero sin la adición de Q y se diluyó de manera similar para obtener una concentración de H láctico de 0.5 µL/mL (similar a la presente en 1 mg/mL de Q), además de un control de Tween 80 en caldo nutritivo (10 % v/v).

Todas las concentraciones fueron probadas contra *E. coli* O157:H7 (10^5 UFC/mL) en etapa exponencial temprana. Finalmente, tras 6, 18 y 24 h de incubación a 37 °C, se tomaron alícuotas de 20 µL y se sembraron por triplicado en agar nutritivo siguiendo el método de la gota (Miles & Misra, 1938). La concentración mínima inhibitoria se definió como la menor concentración (mg/mL) que inhibió por completo a *E. coli* O157:H7.

5.7.1 Concentración mínima inhibitoria combinada de AEO y Q contra *E. coli* O157:H7

Para estudiar el efecto antimicrobiano combinado del AEO y del Q se elaboró una solución de caldo nutritivo con quitosano (1 % v/v), ácido láctico (0.50 % v/v) y Tween 80 (10 % v/v) la cual se diluyó con Tween 80 en caldo nutritivo (10 % v/v) para producir concentraciones en el rango de 0.25-1.0 mg/mL de Q. A las mezclas anteriores se añadió AEO para alcanzar una concentración de 1 mg/mL. Las combinaciones de Q y AEO fueron probadas contra *E. coli* O157:H7 (10^5 UFC/mL) en etapa exponencial temprana. Se tomaron muestras por triplicado tras 6, 18 y 24 h de incubación a 37 °C y se sembraron como se detalla en el apartado 5.10.

El índice de concentración inhibitoria fraccionaria ($CIF_{\text{índice}}$) se calculó como $CIF_Q + CIF_{AEO}$, donde $CIF_Q = (CMI_Q \text{ en combinación} / CMI_Q \text{ solo})$ y $CIF_{AEO} = (CMI_{AEO} \text{ combinado} / CMI_{AEO} \text{ solo})$. Se ha interpretado, por varios autores, la interacción entre antimicrobianos como sinérgica, aditiva o antagónica si el $CIF_{\text{índice}}$ es menor a 1, igual a 1 o mayor a 1, respectivamente (Davindson & Parish, 1993). Sin embargo, Odds (2003) propone una interpretación más conservadora de las interacciones sinérgicas ($CIF_{\text{índice}} < 0.5$), aditivas ($0.5 \leq CIF_{\text{índice}} \leq 4$) o antagónicas ($CIF_{\text{índice}} > 4$) para evitar problemas de reproducibilidad.

5.8 Tamaño y morfología de las NSMF

El tamaño y la morfología de las nanopartículas se caracterizaron mediante el uso de un microscopio electrónico de barrido (FEI Quanta-250 FEG, Hillsboro, OR, USA). Las nanopartículas fueron recubiertas con oro y se observaron utilizando un voltaje de aceleración de 10 kV. El tamaño promedio de las NSM se determinó mediante el software de análisis de imágenes Image J versión 1.53 (disponible como software libre en <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>).

5.9 Preparación de las soluciones filmogénicas y películas comestibles con NSMF, AEO emulsificado y NSMA

La solución de APA se preparó mediante su disolución en agua destilada (2 % p/v) la cual fue ajustada a un pH de 3.0 con HCl 2N y finalmente agitada por 1 h a temperatura ambiente. La solución de quitosano se preparó suspendiendo quitosano (1 % p/v) en una solución de ácido láctico (0.5 % v/v). La suspensión se agitó por 1 h a 80 °C y se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de ser utilizada.

Se prepararon películas comestibles a partir de mezclas de soluciones de APA y Q, utilizando 2 proporciones 4:1 y 9:1 (APA:Q; p/p). El quitosano se colocó en vasos de precipitados de 50 mL y bajo agitación vigorosa se añadió la solución de APA, se adicionó glicerol como plastificante (30 % p/p respecto al APA) y se mantuvo en agitación por 15 minutos. En seguida se homogenizó (Ultraturrax T25 Basic) por 1 min a 6,500 rpm y 2 min a 9,500 rpm y finalmente en un ultrasonificador con 70% de amplitud, por 1.5 min en dos rondas de 45 s para evitar el sobrecalentamiento usando lapsos de trabajo y descanso de los pulsos de 1 s. Para obtener las películas activas comestibles, las soluciones filmogénicas se vertieron en placas Petri de 64 cm² y se secaron a 38 °C por 15 h en un secador con flujo de aire.

Las NSMF se adicionaron a la solución filmogénica suspendidas a una concentración de 10 mg/mL en agua destilada a pH 3.0 por 5 min con la ayuda de un baño ultrasónico antes de la adición de glicerol. Las NSMA se adicionaron a la solución filmogénica siguiendo el mismo método. Para la adición del AEO se preparó una emulsión de Tween 80 (5 % v/v), Tween 20 (5 % v/v) y AEO (5 % v/v) en agua destilada a temperatura ambiente; antes y después de la

adición del AEO, la mezcla se homogenizó a 6,500 rpm (Ultraturrax T25 Basic) por 1 min. Enseguida la emulsión se colocó en el baño ultrasónico por 5 min y finalmente se agregó a la solución filmogénica. En todos los casos la formación de las películas comestibles se llevó a cabo como se describió anteriormente (Fernandez-Bats y col., 2018; Hernández-Hernández, 2019).

5.9.1 Caracterización de la solución filmogénica mediante el potencial ζ

El potencial eléctrico ζ se midió utilizando el equipo Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Se realizaron mediciones por triplicado de las soluciones filmogénicas de todos los tratamientos con proporción 4:1 (APA:Q; p/p) y de una solución filmogénica de proteína como control (Porta y col., 2016).

5.9.2 Espesor

Se realizaron cinco mediciones de espesor en puntos aleatoriamente seleccionados de las PAC con un micrómetro digital (Mitutoyo, MDC-Lite, No. 99 MAB015M, Serie No. 293, Naucalpan, Estado de México). Las mediciones se realizaron por triplicado y el promedio de las mediciones realizadas fue expresado en $\mu\text{m} \pm \text{D.E}$ (Giosafatto y col., 2014).

5.9.3 Color y opacidad

Se utilizó un colorímetro (Konica, Minolta, Osaka, Japón) para evaluar los parámetros L^* (luminosidad), a^* (verde-rojo) y b^* (amarillo-azul) en tres puntos aleatoriamente seleccionados por cada película. De la misma forma se determinó el parámetro L^* de las películas en fondo negro y fondo blanco para el cálculo de la opacidad según la ecuación 7:

$$\text{Opacidad} = \frac{L^*_{\text{FN}}}{L^*_{\text{FB}}} \times 100 \quad (7)$$

5.9.4 Propiedades mecánicas

Se utilizó un diseño experimental bifactorial, siendo los factores a evaluar la proporción APA:Q de las PAC en dos niveles: 9:1 y 4:1; y el tipo de recubrimiento “R” en 4 niveles, dados por la adición de NSMF, AEO o NSMA a las PAC más un tratamiento control sin adiciones. Las variables de respuesta fueron la fuerza de tensión, el porcentaje de elongación

y el módulo de Young. Para el análisis de los datos se realizó una tabla de análisis de varianza (ANOVA) factorial, mientras que las medias se compararon mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

La fuerza de tensión, porcentaje de elongación, y el módulo de Young se midieron usando un equipo Instron Universal (Mod. 5543A, Norwood, MA, EUA), de acuerdo con la norma ASTM D882-10 (2010). Se elaboraron PC de cada uno de los tratamientos las cuales se cortaron en tiras de 1 cm de ancho x 5 cm de largo; las tiras se acondicionaron a 50 % de humedad relativa (HR) y a 23 °C en una cámara ambiental. La separación inicial de agarre se programó a 90 mm y las tiras fueron estiradas a una velocidad de 30 mm min⁻¹ hasta su ruptura (Giosafatto y col., 2014; Porta y col., 2016).

5.9.5 Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las PAC se determinó usando un método gravimétrico, el cual es una modificación de la norma ASTM:E96-00 (2000) basada en la ley de Fick. Se elaboraron PAC de cada uno de los tratamientos a las cuales se les determinó el espesor como se indica en la sección 5.15.1. Las PAC se cortaron y se colocaron en celdas impermeables compuestas de un frasco de vidrio de 5 cm de altura con una abertura de diámetro interno de 3.5 cm y agua destilada en su interior (HR₁= 100 %) y una tapa horadada con rosca que permitió un área de exposición de 9.079 x10⁻⁴ m²; las PAC se colocaron entre dos empaques de teflón para asegurar el cierre hermético. Una vez armadas, las celdas se colocaron dentro de un desecador con gel de sílice (HR₂≈ 0 %). El vapor de agua que se difundió a través de las PAC fue absorbido por la atmósfera creada. El peso de las celdas se monitoreó automáticamente en intervalos de tiempo de 1 min durante 11 h a una temperatura de 30 °C. La PVA se calculó mediante las ecuaciones 8 y 9 (Arredondo y col., 2012):

$$PVA = \frac{G/t \cdot x}{A \Delta P} \quad (8)$$

De donde:

$$\Delta P = \frac{P^*}{100} (HR_2 - HR_1) \quad (9)$$

Donde:

$\frac{G/t}{A}$ = Permeanza. G/t: pendiente de la gráfica de la pérdida de peso respecto al tiempo

x= Espesor de la PAC

A= Área de la película

P*= Presión de vapor del agua

HR₁= Humedad al interior de la celda

HR₂= Humedad al exterior de la celda

5.9.6 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT IR)

La interacción química entre el quitosano, la proteína de amaranto y las nanopartículas con AEO se analizaron mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) (LabRAM IR², Horiba Jobin Yvon, Kioto, Japón). Se obtuvieron espectros de las PAC en la región entre 4000-600 cm⁻¹, con una resolución de 4 cm⁻¹.

5.9.7 Microscopia electrónica de barrido

Se estudió la morfología de las películas comestibles mediante microscopía electrónica de barrido siguiendo la metodología indicada en la sección 5.12.1. Se obtuvieron micrografías con amplificación de hasta 10,000 X de las PAC APA:Q (p/p): 4:1, 9:1, 9:1+NSMF, 9:1+NSMA y de las NMSA.

5.10 Actividad antimicrobiana *in vitro* de las PAC

Se determinó empleando la metodología de difusión de disco en agar de Hernández-Hernández (2017) con algunas modificaciones. Se elaboraron PAC 4:1 (APA:Q; p/p) con concentraciones crecientes de NSMA (0-12 %) y se cortaron en círculos de 2.5 mm de diámetro. Los discos se colocaron sobre 10 mL de agar nutritivo suave (0.85 % p/v) previamente inoculado con 10⁵ UFC/mL de *E. coli* O157:H7 y vertido sobre 15 mL de agar nutritivo. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. El área de inhibición contra *E. coli* O157:H7 se midió empleando el software de análisis de imágenes Image J v.1.53.

5.11 Diseño experimental para la evaluación del efecto de PAC en carne fresca de res

Se planteó el diseño experimental de mediciones repetidas en el tiempo usando el factor “Tipo de PAC” en 4 niveles: muestra control sin recubrimiento (SR), muestra con recubrimiento sin adición de AEO ni NSMA (CR); muestra con recubrimiento adicionado con AEO emulsificado (RA) y muestra con recubrimiento adicionado con NSMA (RN). Las variables de respuesta pH, TBARS y color de las muestras se evaluaron en tres diferentes tiempos (0, 7 y 14 días) mientras que la actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *Pseudomonas* spp., *Brochothix termosphaeta* y microorganismos mesófilos aerobios (MMA) en 6 diferentes tiempos (0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días).

5.12 Preparación de las muestras de carne y tratamientos

Se adquirió la pieza completa de aguayón en un mercado local de Santiago de Querétaro (Querétaro, México) y se transportó inmediatamente y en refrigeración al laboratorio para su corte. La superficie de la carne se roció con etanol al 70 % y se flameó con un soplete; la parte quemada de la carne se retiró con un cuchillo estéril sin retirar más de 0.5 cm de espesor de la superficie; finalmente, se cortaron piezas de 3 x 3 cm y 1 cm de espesor. Se aplicaron de forma aleatoria los tratamientos de PAC de la siguiente manera: se elaboraron previamente los tres diferentes R en placas Petri de 55 mm de diámetro, de manera aséptica se colocaron un R en la parte inferior y otro en la parte superior de la muestra de carne, se colocó la muestra en bolsas Food Saver V3800 (Antwep, New York, EUA) de polietileno multicapa de baja densidad y finalmente se empacaron al vacío (50.7 kPa). Las muestras se almacenaron a 4 °C y se analizaron en los 5 diferentes tiempos de almacenamiento: 0, 7, 14, 21 y 28 d.

Para los análisis fisicoquímicos se elaboraron soluciones filmogénicas de las diferentes R y, de forma aleatoria, se distribuyeron sobre muestras de carne a razón de 0.06 mL/cm² mediante un bastón de vidrio estéril, tras lo cual se dejaron secar en campana de flujo laminar por 30 min previo a una segunda aplicación. El procedimiento se repitió para la otra cara de la muestra. Las muestras se empacaron y almacenaron como se indicó anteriormente para su análisis tras 0, 7 y 14 días.

5.13 Propiedades antimicrobianas del recubrimiento en carne fresca

La microbiota presente en ambos lados de la superficie de la carne se recuperó utilizando un hisopo estéril humedecido en solución salina estéril (0.85 % de NaCl p/v) y finalmente se intrdujo en 10 mL de ésta misma. Se aplicaron diluciones decimales y por triplicado se colocaron en placas utilizando los medios adecuados para cada cepa. Agar cuenta estándar, para microorganismos mesófilos aeróbicos (MMA); agar STAA, para *B. thermosphacta*; agar nutritivo adicionado con sacarosa al 2 % (p/v) para *Pseudomonas* y agar McConkey-sorbitol para *E. coli* O157:H7. Las poblaciones microbianas se cuantificaron por el método de extensión en superficie (dispersión de 100 μ L en la superficie del agar), excepto para los mesofílicos aerobios para los cuales se usó la técnica de vaciado en placa (Hernández-Hernández, 2019). Las placas se incubaron por 48 h a 30 °C para *B. thermosphacta* y *Pseudomonas* y a 37 °C para *E. coli* O157:H7 y MMA.

5.14 Propiedades fisicoquímicas

5.14.1 Oxidación de lípidos

La carne contiene ácidos grasos insaturados que pueden oxidarse produciendo radicales libres que participan en las reacciones de propagación y terminación de la autoxidación. Los peróxidos formados se descomponen en una gran variedad de sustancias como cetonas, alcoholes, aldehídos, entre otros como malondialdehído (MDA). MDA puede reaccionar con dos moléculas de TBA produciendo un pigmento rosa con una longitud de onda de absorción máxima de 532 nm. La determinación de la oxidación de lípidos se realizó mediante la homogenización de 0.50 ± 0.01 g de carne en 2.5 mL de una solución de TBA (0.375 % p/v de TBA, 15 % p/v de ácido tricloroacético y HCl 0.25 N), el homogenado se transfirió a un baño de agua ebuliendo, por 10 min y posteriormente se enfrió en un baño de hielo. La muestra se centrifugó a $4,000 \times g$ por 10 min a 4 °C, y se determinó la absorbancia del sobrenadante a 532 nm (A_{532}) en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Para el control se utilizaron 0.5 g de agua destilada en lugar de la muestra de carne, y la concentración de TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) se calcularon de acuerdo a la siguiente ecuación (Hernández-Hernández, 2019):

$$\text{TBARS} \left(\frac{\text{mg de malonaldehído}}{\text{kg de muestra}} \right) = A_{532} \times 2.77 \quad (10)$$

5.14.2 Evaluación del color de la superficie de la carne

La medición del color en las muestras de carne se realizó siguiendo la metodología indicada en la sección 5.14.2. Los componentes de luminosidad (L^*), abundancia de color rojo (a^*) y abundancia de color amarillo (b^*) se utilizaron para el cálculo de las coordenadas polares chroma (C^*) y ángulo de matiz (h^*) mediante (Pereira-Cardoso y col., 2016):

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (11)$$

$$h^* = \tan^{-1} (b^*/a^*) \quad (12)$$

5.15 Determinación del pH de las muestras de carne

El pH de las muestras de carne de res se determinó usando un potenciómetro Orion Star A211 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Para la determinación, 10 g de la muestra se homogenizaron en 90 mL de agua destilada (Emiroglu y col., 2010).

5.16 Evaluación sensorial

Se llevó a cabo una evaluación sensorial con el objetivo de evaluar el olor y el color de la carne fresca recubierta con las diferentes PAC siguiendo la metodología de Hernández-Hernández y col. (2019). La evaluación se llevó a cabo tras 21 días de almacenamiento de las muestras a 4 °C. Los tratamientos se aplicaron como se indica en la sección 5.18. Las muestras de carne fueron analizadas por 50 jueces no entrenados. Se utilizó una escala hedónica descriptiva de 9 puntos para la evaluación donde 1= extremadamente indeseable; 2= muy indeseable, 3= moderadamente indeseable; 4= ligeramente indeseable, 5= ni aceptable ni rechazable; 6= ligeramente deseable; 7= moderadamente deseable; 8= muy deseable y 9= extremadamente deseable. Se determinó un puntaje promedio <6 para para indicar una muestra de carne no aceptable (Hunt y col., 2012). Se aplicó una segunda evaluación sensorial para observar el efecto de la remoción de las PAC en la aceptabilidad de carne fresca previamente recubierta. Para ello, fue retirada la PAC de las muestras de carne mediante un lavado con agua a temperatura ambiente previo a la evaluación.

6 RESULTADOS

6.1 Obtención de los aislados de proteína de amaranto

Se determinó un porcentaje de proteína en la harina de amaranto de 13.98 ± 0.17 , lo cual concuerda con lo reportado por otros autores (Tabla 6). Se logró incrementar el porcentaje de proteína en el aislado de un 57.95 % inicial a 61.34 % tras dos lavados. Ésta concentración de proteína resultó menor a las obtenidas por Das y col., (2021) y Cortez-Trejo y col., (2021) quienes, a pesar de usar un método similar de obtención de APA, indican un desgrase con solventes orgánicos previo a la molienda de los granos de amaranto y una deshidratación de la harina, a lo cual puede atribuirse la diferencia, dado el porcentaje de grasas (7.0-7.33) y de humedad (9.51-12.4) en el grano (ver sección 2.2.1.), cuya remoción aumentaría la concentración de proteína en la harina tratada. Adicionalmente, cabe resaltar que estos autores reportan el secado del aislado mediante liofilización, mientras que en el presente estudio éste se realizó por medio de un tratamiento térmico a 40 °C. En contraste, el rendimiento del aislado fue superior indicando una buena solubilización de la proteína en solución acuosa a pH 9 y una eficiencia de obtención del APA (g APA/g de HA) aproximadamente 2 veces mayor.

Tabla 6. Concentración de proteína (%P; N x 5.85) en base seca y rendimiento de extracción de los aislados de proteína de amaranto.

Proteína HA (%)	Proteína APA (%)	Rendimiento (%)	Referencia
13.98±0.17	61.34±0.45	19.71±2.46	-
14.6±2.1	85.42±1.26	12.78	Das y col., (2021)
-	85.13±0.01	-	Cortez-Trejo y col., (2021)

Se reporta la media (n=3) ±D.E. HA: harina de amaranto; APA: aislado de proteína de amaranto.

6.2 Síntesis de NSM

Las NSM se produjeron a razón de 0.40 ± 0.07 g por cada 0.5 g de CTAB. En la Figura 3 se muestra la morfología de las NSMF, observándose partículas de apariencia circular, cuyo tamaño promedio fue de 146.49 ± 20.49 nm.

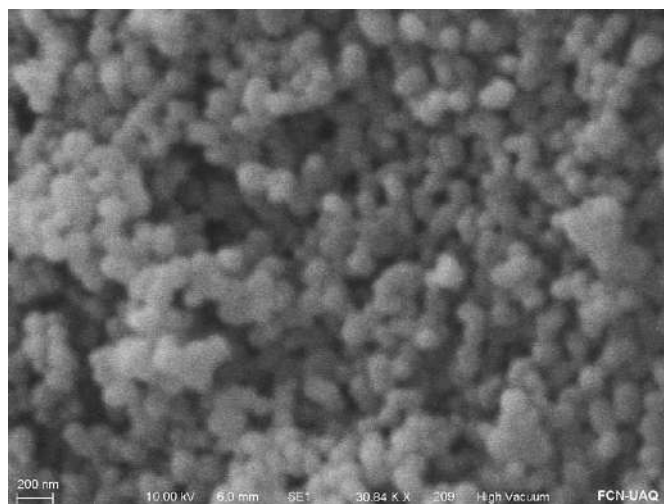


Figura 3. Micrografía electrónica de barrido de las NSM funcionalizadas (NSMF). Amplificación ≈ 30 KX.

El tamaño exhibido por las NSMF sugiere su uso seguro sobre matrices alimentarias. Gou y col., (2021) mencionan que la bioseguridad de las NSM se ve influenciada por factores como su tamaño de partícula, su tamaño de poro, su forma y las posibles modificaciones superficiales. Lu y col., (2009) reportaron la tasa de captación por células HeLa de NSM con tamaños de partícula de 30, 50, 110, 170 y 280 nm; las partículas de 50 nm mostraron la mayor tasa de internalización, mientras que la menor fue exhibida por las partículas de 170 nm. Según los autores, las NSM más pequeñas son más adecuadas para el acarreo de agentes terapéuticos para aplicaciones biológicas, sin embargo, para su aplicación en alimentos como acarreadores de compuestos bioactivos con fines de bioconservación, el uso de NSM con mayor tamaño de partícula podría prevenir su interacción con las células. Adicionalmente, Lin & Haynes (2009) realizaron pruebas de hemólisis y citotoxicidad en eritrocitos, de NSM con tamaños de partículas de 25, 42, 93, 155 y 225 nm, demostrando que las partículas más pequeñas causaron un mayor daño celular y un mayor incremento de la actividad hemolítica que las partículas de mayor tamaño.

6.3 Efecto antimicrobiano del AEO y el Q

6.3.1 Concentración mínima inhibitoria de AEO y Q contra *E. coli* O157:H7

De las concentraciones que se utilizaron de AEO no se pudo observar una completa inhibición de *E. coli* O157:H7. No obstante, la concentración más grande utilizada de AEO

(20 mg/mL) resultó en un efecto bacteriostático ya que la población se conservó en 5.56 ± 0.07 Log UFC/mL, efecto que se vió rebasado después de 18 h, ya que la población aumentó a 7.54 ± 0.06 (Figura 4a). Este aumento en la población microbiana se atribuyó a un efecto subletal del AEO, que puede ser explicado por un aumento en el número ó concentración de ácidos grasos saturados de la membrana bacteriana ocasionando una disminución no específica de la permeabilidad celular, de acuerdo a los reportes de Heipieper (1994) y Ultee (2000). Por otra parte, en el caso de Q se observó que después de 6 h de incubación, hubo una disminución en la población microbiana a las concentraciones de 0.25 y 0.5 mg/mL; sin embargo, el efecto de inhibición no se mantuvo después de 18 h ya que a este tiempo hubo un aumento en la población microbiana. *E. coli* O157:H7 fue completamente inhibido después de una incubación de 18 h, usando 1 mg/mL de Q, mientras que mayores concentraciones (2.5-10 mg/mL) fueron requeridas para completa inhibición a las 6 h de incubación (Figura 4b). Por lo anterior, para *E. coli* O157:H7 la concentración mínima inhibitoria (CMI) fue >20 mg AEO/mL y 2.5 mg Q/mL; sin embargo Hernández-Hernández y col. (2019) reportaron una CMI <5 mg/mL para el AEO sobre el mismo microorganismo. Debe aclararse que estos autores mencionan que las hojas de orégano se procesaron inmediatamente después de cosechadas y secadas, mientras que en esta investigación se obtuvieron ya deshidratadas y con tiempo de almacenamiento desconocido. Hernández-Hernández y col., (2014) reportaron que la inhibición de *Micrococcus luteus* por el AEO se redujo en 40.7 % después de 3 meses de almacenamiento refrigerado en viales de color ámbar, indicando una pobre estabilidad de sus componentes. Dadas estas condiciones, el tiempo de almacenamiento se considera un factor significativo en la calidad de las hojas de orégano y de su aceite esencial, lo cual pudiera relacionarse también con el menor rendimiento de extracción obtenido (3.36 ± 0.8 %, p/p, base seca) comparado con el reportado por estos autores (4.29 % p/p, base seca). Aunado además a que la composición de los aceites esenciales puede ser afectada por una variedad de factores, tales como la parte de la planta usada para la extracción, el tipo de secado, la etapa de maduración de la planta durante la cosecha y las condiciones de crecimiento como el tipo de suelo, la temperatura y los fertilizantes usados (Brandao Melo y col., 2015). Por su parte, el efecto antimicrobiano del Q está asociado a las condiciones utilizadas, pues se comporta como un compuesto

catiónico, ejerciendo interacciones electrostáticas a través de sus grupos amino (cargados positivamente) con la membrana celular bacteriana que presenta carga negativa y esto se asocia a la lisis celular (Ninthya y col., 2017). Además, su actividad antimicrobiana se ve beneficiada por las características de las paredes celulares de las bacterias Gram-negativas, las cuales tienen un grosor menor comparado con la de las bacterias Gram-positivas, haciéndolas más susceptibles (Goy y col., 2016). Adicionalmente, debe enfatizarse que se utilizó un pH de 3.1 para disolver al Q, ocasionado por el uso de 0.05 % v/v de ácido láctico (cuya actividad antimicrobiana está ampliamente reportada); promoviendo una fuerte interacción iónica debido a los grupos amino protonados, ocasionando una disrupción a la pared celular (Ngamviriyavong y col., 2010; Goy y col., 2016).

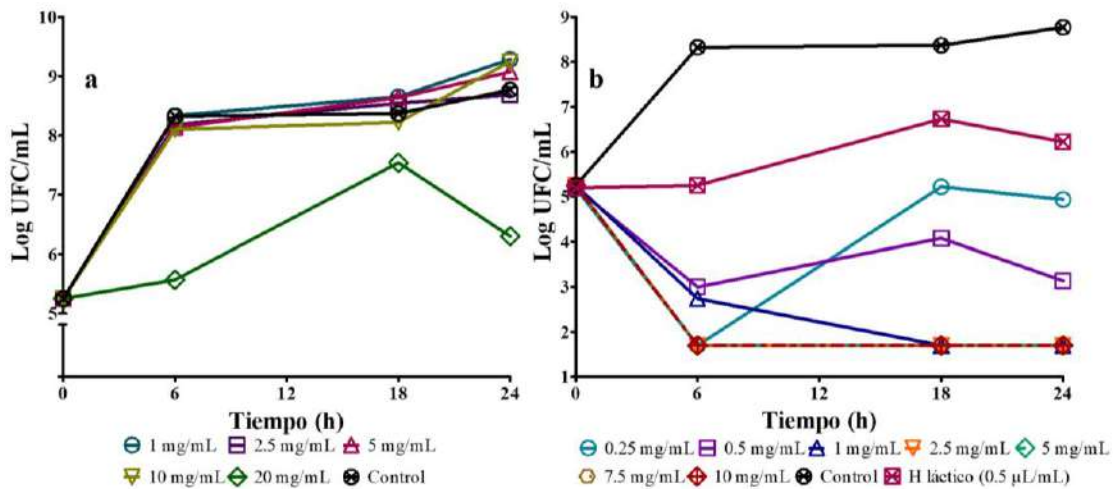


Figura 4. Concentración mínima inhibitoria (mg/mL) de AEO (a) y Q (b) contra *E. coli* O157:H7.

6.3.2 Concentración mínima inhibitoria combinada de AEO y Q contra *E. coli* O157:H7

La combinación de AEO y Q mostró mayor actividad antimicrobiana que su aplicación de manera individual. Como se observa en la Figura 5, la aplicación de 0.25 mg/mL de Q más 1 mg/mL de AEO exhibió un efecto bacteriostático que se mantuvo por 24 h mientras que la combinación de 0.5 mg/mL de Q y 1 mg/mL de AEO mostró un efecto bactericida hasta por 24 h. Se determinó que $CIF_Q = 0.2$ y $CIF_{AEO} < 0.05$, por tanto $0.20 < CIF_{\text{índice}} < 0.25$, indicando

un efecto sinérgico entre el Q y el AEO. Hyldgaard y col., (2012) indicaron mecanismos teóricos de interacciones sinérgicas de antimicrobianos: inhibición secuencial de varios pasos de una ruta bioquímica, inhibición de enzimas que degradan o excretan antimicrobianos, interacción con la pared o con la membrana celular; aunque los detalles de éstas interacciones aún no están claros.

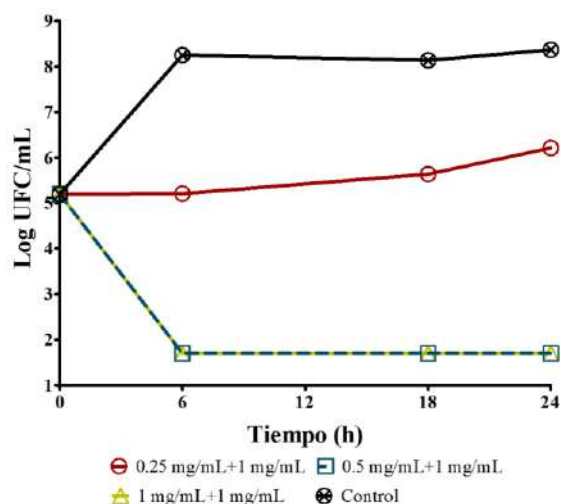


Figura 5. Concentración mínima inhibitoria combinada (mg/mL Q + mg/mL AEO) contra *E. coli* O157:H7.

6.4 Capacidad de carga de las NSMA

El porcentaje de equivalentes de ácido gálico en las NSMA fue de 27.89 ± 1.43 % mientras que en el AEO fue de 53.70 ± 1.17 %. Desarrollando el balance de masa por componente se determinó que 51.94 % del peso de las NSMA es AEO. Esta concentración, que indica que la totalidad del AEO permaneció en la mezcla con las NSMF, no corresponde sólo al AEO encapsulado, sino también al adsorbido en la superficie de las NSMF. Por lo anterior la cantidad de AEO encapsulado en las NSMF puede ser mucho menor a la añadida a la mezcla, lo cual concuerda con Rehman y col., (2018) que reportan un 22% hasta 48 % de capacidad de carga en sílice mesoporosa SBA-15 (Santa Barbara Amorphous-15), Wang y col. (2020) que reportan 29.12 % en sílice mesoporosa nanotubular funcionalizada con APTES y Zhang y col., (2021) que reportan de ≈ 30.0 % a 63.7 % en NSM. De acuerdo con los resultados anteriores, para los siguientes experimentos la adición de AEO y NSMF se realizaron en un 50 % (p/p) con respecto a las NSMA.

6.5 Actividad antimicrobiana *in vitro* de las PAC

Los halos de inhibición de las PAC adicionadas con NSMA no fueron uniformes (Figura 6), esto posiblemente debido a la entrada de las moléculas de agua del agar, provocando la dilatación de las PAC y contribuyendo a la liberación del AEO en el agar debido al carácter hidrofílico del APA (dos Santos Paglione y col., 2019). Aunado a lo anterior, la difusión del AEO, a través de la volatilización de sus componentes, pudo ser poco homogénea. Por lo anterior, se determinaron las áreas de inhibición de las diferentes PAC (Tabla 7); la adición de NSMA a una concentración a partir de 9 % (p/p) incrementó la inhibición de *E. coli* O157:H7. Ésta concentración, correspondiente a 4.5 % de AEO (p/p) de acuerdo con resultados anteriormente mencionados, es superior a la sugerida por Chen y col., (2020) para asegurar buenas propiedades antimicrobianas contra *E. coli*, la cual oscila entre 2 % y 3 % (p/p). Sin embargo, cabe resaltar que existen discrepancias acerca de la efectividad del aceite esencial de orégano, debido a la variabilidad en su composición (Lee y col., 2019).

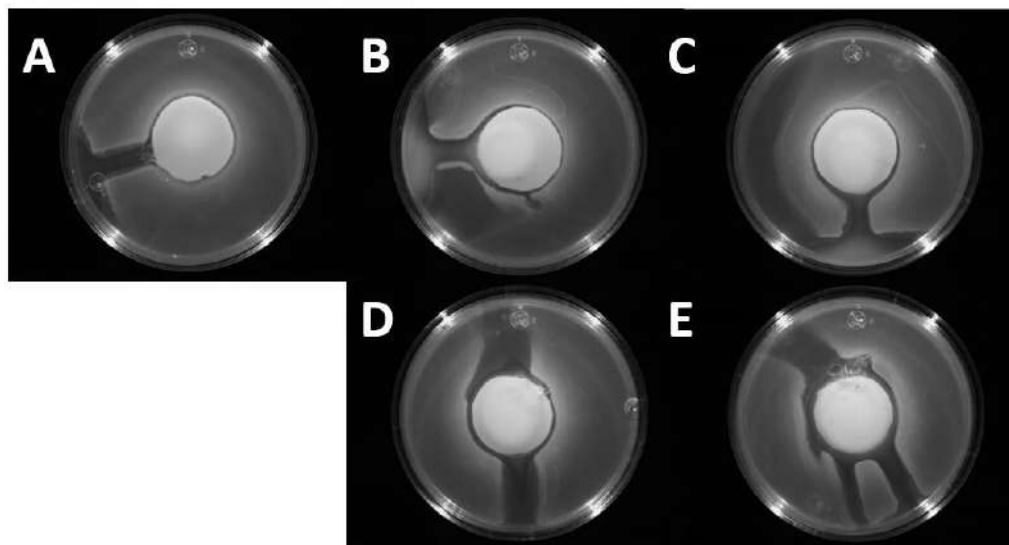


Figura 6. Halos de inhibición contra *E. coli* O157:H7 con 24 h de incubación de PAC 4:1 (APA:Q; p/p) adicionadas con diferentes concentraciones (% p/p) de NSMA; A:control, B: 3%; C: 6%; D: 9%, E: 12%.

Los resultados de este trabajo se suman a otros citados por Zhang y col., (2021) en los que películas con Q aumentaron sus actividades antimicrobianas contra varios deterioradores y patógenos transmitidos por alimentos mediante la adición de aceites esenciales.

Tabla 7. Áreas de inhibición (cm²) de PAC 4:1 (APA:Q; p/p) adicionadas con diferentes concentraciones de NSMA (% p/p) contra *E. coli* O157:H7 con 24 h de incubación.

Control	3 %	6 %	9 %	12 %
11.80 ^b ± 0.79	13.30 ^b ± 0.73	12.16 ^b ± 0.72	17.66 ^a ± 1.87	17.38 ^a ± 0.76

Los valores se reportan como media±D.E. (n=3). Medias no conectadas por la misma letra son estadísticamente diferentes ($p<0.05$).

6.6 Estabilidad de las soluciones filmogénicas

El grado de repulsión entre partículas adyacentes en las soluciones filmogénicas, expresado como potencial ζ (mV), es un indicativo de su estabilidad, relacionándose con la obtención de PAC más manejables. Esto debido a que las partículas se aglomeran en menor medida durante la evaporación del solvente, distribuyéndose de forma homogénea (Fernández-Bats y col., 2018). De acuerdo con Sabbah y col., (2016) las soluciones con potencial $\zeta > |30|$ mV poseen muy alta estabilidad, siendo éste el caso para todas las soluciones filmogénicas de las diferentes PAC (Tabla 8).

Tabla 8. Potencial ζ (mV) de las soluciones filmogénicas de APA y APA:Q (4:1; p/p) con la adición de NSMF, AEO y NSMA.

Solución Filmogénica	Potencial ζ
APA	21.3 ± 0.3 ^d
Control (C)	44.3 ± 0.2 ^b
C + NSMF	45.9 ± 0.7 ^a
C + AEO	40.1 ± 0.4 ^c
C + NSMA	44 ± 0.5 ^b

Medias (n=3) no conectadas por la misma letra son estadísticamente diferentes ($p<0.05$).

La estabilidad de la solución filmogénica de APA y Q se vio incrementada por la adición de NSMF, probablemente debido a la repulsión entre las NSMF cargadas superficialmente de forma positiva y los aminoácidos con grupos cargados positivamente. Lo anterior debido a que el pH resultante en la soluciones filmogénicas (3.11) fue inferior al pH de menor solubilidad reportado para el APA (5.00), el cual se relaciona directamente con el punto

isoelectrico de las proteínas del amaranto (López y col., 2018). La adición de AEO disminuye la estabilidad de la solución filmogénica debido a su carácter hidrofóbico; sin embargo, esto se vio contrarrestado mediante su encapsulación en NSMF (NSMA). Cabe resaltar que la solución filmogénica de APA y Q (control) presentó mayor estabilidad que la solución filmogénica de sólo APA; debido a que, como se mencionó anteriormente, al pH final de las soluciones existe repulsión entre el Q (protonado) y el APA (carga neta positiva).

6.7 Color y microscopia electrónica de barrido (MEB) de las PAC

Todas las PAC formuladas mostraron un color amarillento (valores positivos de b) y con alta opacidad. No hubo diferencia significativa del color entre ninguno de los tratamientos (Tabla 9), únicamente siendo diferentes las PAC compuestas totalmente de quitosano. Según el parámetro ΔE , no hubo diferencias de color apreciables entre PAC con la misma formulación indicando su homogeneidad.

Tabla 9. Parámetros de color CIE (L^* , a^* y b^*), opacidad y ΔE de PAC de APA, Q y APA:Q, con proporción (p/p) 9:1 (C9) y 4:1 (C4).

Película	L	a	b	Opacidad (%)	ΔE^*
APA	39.07 ^a	-0.34 ^{ab}	6.66 ^a	64.23 ^a	
Q	33.34 ^b	-0.63 ^b	0.69 ^b	47.23 ^b	2.67
C9	37.40 ^a	-0.15 ^{ab}	7.58 ^a	59.47 ^a	1.71
C9 + NSMF	37.69 ^a	-0.34 ^{ab}	7.02 ^a	61.79 ^a	0.34
C9 + AEO	37.12 ^a	-0.05 ^a	8.1 ^a	61.31 ^a	0.44
C9 + NSMA	37.12 ^a	-0.05 ^a	8.1 ^a	61.71 ^a	1.18
C4	37.74 ^a	-0.06 ^a	8.27 ^a	60.28 ^a	0.57
C4 + NSMF	38.70 ^a	-0.30 ^{ab}	7.78 ^a	60.91 ^a	1.46
C4 + AEO	37.81 ^a	-0.27 ^{ab}	7.86 ^a	59.71 ^a	0.89
C4 + NSMA	38.4 ^a	-0.32 ^{ab}	7.29 ^a	61.19 ^a	0.71

En una columna, medias (n=3) no conectadas por la misma letra son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). *Diferencia de color calculada entre un par de duplicados de una misma PAC.

En la Figura 7 se muestra una micrografía de diferentes PAC, adicionadas con NSMF y NSMA. En las Figuras 7A y 7B se observa una superficie lisa y homogénea, y la presencia de algunas aglomeraciones que se incrementan al aumentar el contenido de proteína en la mezcla. Lo anterior puede deberse a la aglomeración de una fracción no soluble del APA, relacionada a su vez con un estado intermedio de desnaturalización de sus proteínas en pH ácido, la consecuente exposición de sus grupos hidrofóbicos. Además, la globulina-*p* (componente de la proteína de amaranto) tiende a formar agregados de alto peso molecular y es susceptible a la desnaturalización a pH por debajo de 5 (Cortez-Trejo y col., 2021; Castellani y col., 1998). La presencia de las aglomeraciones no se incrementa de forma apreciable al añadir NSMF (Figura 7C), pero sí al añadir NSMA (Figura 7D), que al estar cargadas con AEO poseen menor solubilidad en la suspensión filmogénica de las PAC.

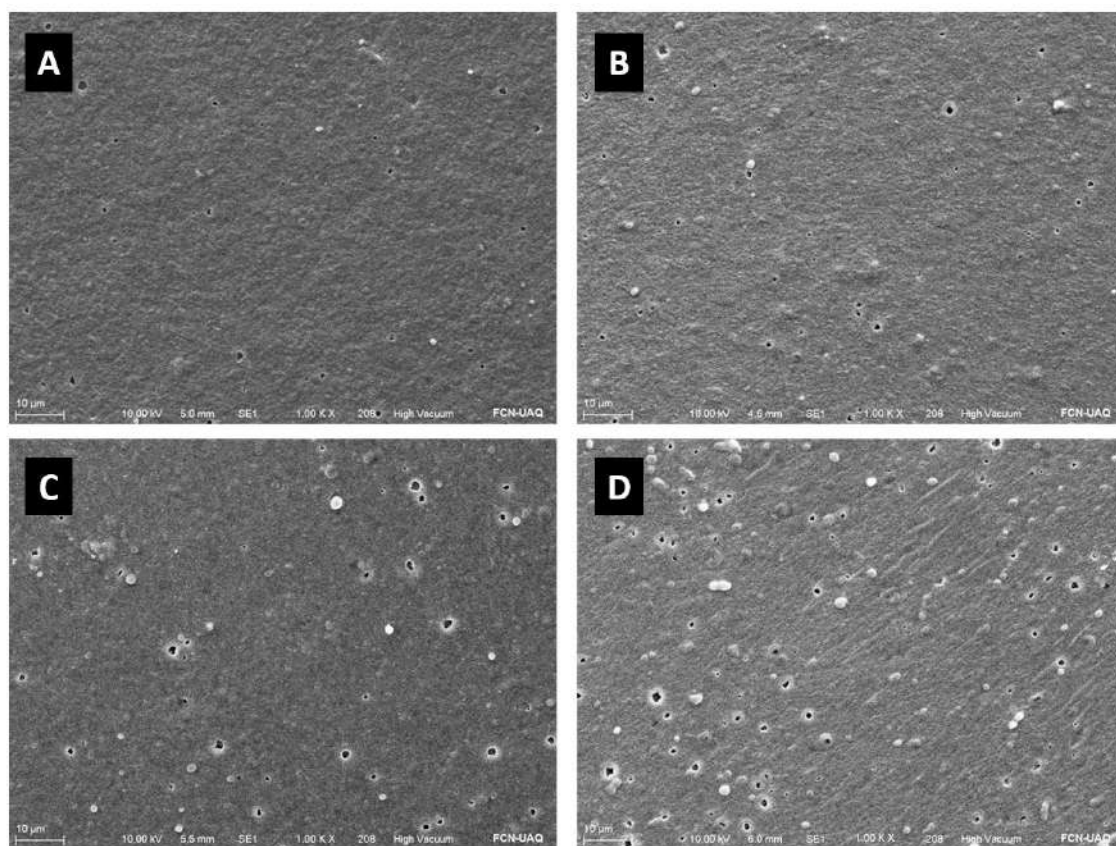


Figura 7. Micrografía electrónica de barrido de las PAC (amplificación 1,000x). A) C4; B) C9; C) C9 + NSMF; D) C9 + NSMA.

6.8 Espesor, propiedades mecánicas y permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las PAC

La adición de diferentes cantidades de NSMF y/o AEO, dio lugar a una diferencia en la cantidad de sólidos totales, misma que no afectó de forma significativa el espesor de las PAC tal como se reporta en la Tabla 10:

Tabla 10. Espesor (μm) de PAC de Q y APA:Q (p/p).

PAC	Q	C9*	C9+ NSMF	C9+ AEO	C9+ NSMA	C4**	C4+ NSMF	C4+ AEO	C4+ NSMA
Espesor	118 ^a	135.8 ^a	159.4 ^a	166.8 ^a	139.8 ^a	120.2 ^a	140.4 ^a	158.2 ^a	134 ^a
D.E.	38.2	32.4	72.5	22.4	46.4	10.1	20.3	4.0	20.1

Medias (n=5) no conectadas por la misma letra son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

*PAC 9:1 (APA:Q; p/p). ** PAC 4:1 (APA:Q; p/p)

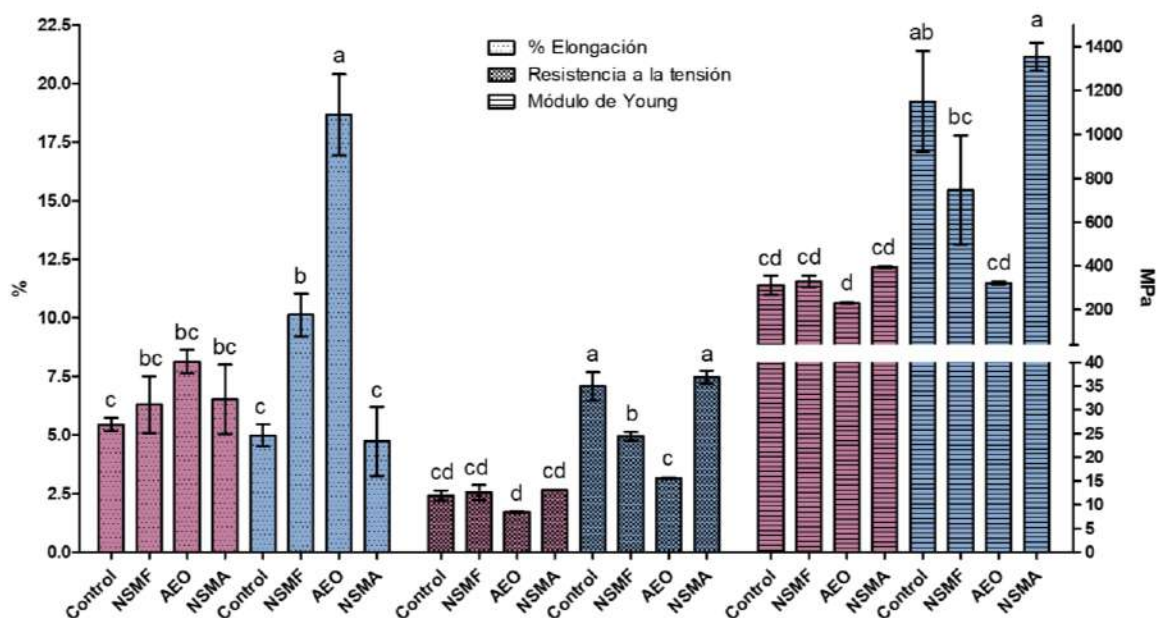


Figura 8. Porcentaje de elongación, resistencia a la tensión (MPa) y módulo de Young (MPa) de las PAC con proporción p/p 9:1 (APA:Q) (rojo) y 4:1 (APA:Q) (azul) con la adición de NSMF, AEO emulsificado o NSMA. Columnas no conectadas por la misma letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En la Figura 8 se muestran los resultados de las propiedades mecánicas de las PAC, las cuales se contrastan a continuación con los valores reportados por Bastarrachea y col. (2011) de porcentaje de elongación, resistencia a la tensión y módulo de Young de diferentes materiales de empaque. Sólo los tratamientos con proporción 4:1 (APA:Q) y 4:1 (APA:Q) con AEO emulsificado mostraron diferencias en la elongación, con un porcentaje de 18.66 ± 1.73 %, siendo similar al porcentaje de elongación del polietileno de alta densidad (20-50 %), a diferencia de los demás tratamientos que mostraron bajo porcentaje de elongación, similar al poliestireno (2-3 %).

En cuanto a la resistencia a la tensión, no hubo diferencias entre los tratamientos con proporción 9:1, mostrando una resistencia similar al polietileno de baja densidad (7-25 MPa); de forma similar, los tratamientos 4:1 con la adición de NSMF y AEO exhibieron valores más bajos comparados con los tratamientos con proporción 4:1 sin añadidos y aquél con la adición de NSMA; estos últimos siendo más similares al polietileno de alta densidad (19-31 MPa) o el poliestireno (31-49 MPa).

El módulo de Young es una propiedad de los materiales relacionada directamente con su rigidez; éste denota la relación entre el esfuerzo longitudinal aplicado para lograr la deformación lineal de un material elástico, por lo que valores más elevados indican que se debe aplicar mayor fuerza para deformarlo. De acuerdo con los resultados de Módulo de Young, las PAC mostraron características similares al polietileno de baja densidad (150-340 MPa), a excepción de los tratamientos con proporción 4:1; APA:Q sin añadidos y con la adición de NSMA, que muestran similitud con el polietileno de alta densidad.

Los factores “Proporción APA:Q” y “R”, como su interacción, resultaron significativos ($p < 0.001$), indicando, a su vez, un alto grado de interacción entre los componentes de las PAC. Los valores superiores de resistencia a la tensión y módulo de Young en las PAC con proporción 4:1 (APA:Q; p/p) se deben al mayor contenido de Q en la mezcla, pues éste presentó valores muy elevados de estas propiedades (732.7 ± 248.31 MPa y $27,169.90 \pm 2,957.94$ MPa, respectivamente). Además, la formulación del Q previo a su adición a la solución filmogénica de APA no incluye glicerol, por lo que una mayor proporción de Q en la mezcla generará una menor concentración de plastificante, volviendo las PAC más rígidas.

Lo anterior se ve contrarrestado mediante la adición de AEO pues, como se observa en los resultados, éstas PAC exhibieron mayor flexibilidad (valores superiores de elasticidad y menores de módulo de Young) mostrando, a su vez, un efecto plastificante del AEO. Las características hidrofóbicas del aceite esencial pueden evitar su interacción química con la matriz, quedando atrapado dentro de sus cadenas poliméricas, interfiriendo en ellas y, por consecuencia, reduciendo la resistencia a la tensión de las películas (Moreira y col., 2020). De acuerdo con los datos anteriores, la mezcla 4:1 (APA:Q; p/p) produjo las mejores PAC.

Las PAC no mostraron diferencia en la PVA (Tabla 11), lo cual resulta similar a lo reportado por Aguirre y col., (2013) quienes, en concordancia con Atarés y col., (2010) indican que la adición de un componente hidrofóbico a la matriz no asegura la reducción de la PVA. Se ha reportado que la adición de AEO puede incluso incrementar la PVA debido a las discontinuidades causadas en la red polimérica por el AEO, provocando una pérdida de cohesión en la película y un incremento de los fenómenos de transporte a través de ella (Hosseini y col., 2015). Los valores de PVA fueron similares al reportado por Tapia-Blácido (2013), quien realizó películas de harina de amaranto con una permeabilidad de 1.2×10^{-5} g/día*m*Pa.

Tabla 11. Permeabilidad al vapor de agua (PVA; g/día*m*Pa) de PAC de APA y Q.

PAC	PAV
C4*	$3.01 \times 10^{-5} \text{ a} \pm 0.48 \times 10^{-5}$
C4 + NSMF	$4.01 \times 10^{-5} \text{ a} \pm 0.81 \times 10^{-5}$
C4 + AEO	$3.68 \times 10^{-5} \text{ a} \pm 0.48 \times 10^{-5}$
C4 + NSMA	$3.33 \times 10^{-5} \text{ a} \pm 0.25 \times 10^{-5}$
C9** + AEO	$3.15 \times 10^{-5} \text{ a} \pm 0.51 \times 10^{-5}$
Q	$3.46 \times 10^{-5} \text{ a} \pm 0.89 \times 10^{-5}$

Medias (n=3) no conectadas por la misma letra son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

C4*=PAC 4:1 (APA:Q; p/p). C9**= PAC 9:1 (APA:Q; p/p).

6.9 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

Las interacciones químicas entre los componentes de las PAC se pueden visualizar en la Figura 9. El espectro del APA muestra los picos correspondientes a la amida I y la amida II, generados por la vibración de grupos peptídicos y relacionados con la estructura secundaria de los polipéptidos y las proteínas. La banda de la amida I ($1600-1700\text{ cm}^{-1}$) se genera por la vibración de tensión del enlace C=O en el grupo peptídico, mientras que la banda de la amida II ($1500-1600\text{ cm}^{-1}$) se genera por la torsión del enlace N-H y la tensión del enlace C-N (Haris & Severcan, 1999). Es posible identificar una disminución del pico de absorción de ambas amidas del APA en presencia del Q, y más aún, con la adición de NSMF y NSMA.

Por su parte, el espectro del Q, además de presentar el pico característico de la amida II, también muestra uno en la frecuencia de $1042-1045\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a los grupos carboxilados asociados con su actividad antimicrobiana (Lagaron y col., 2007).

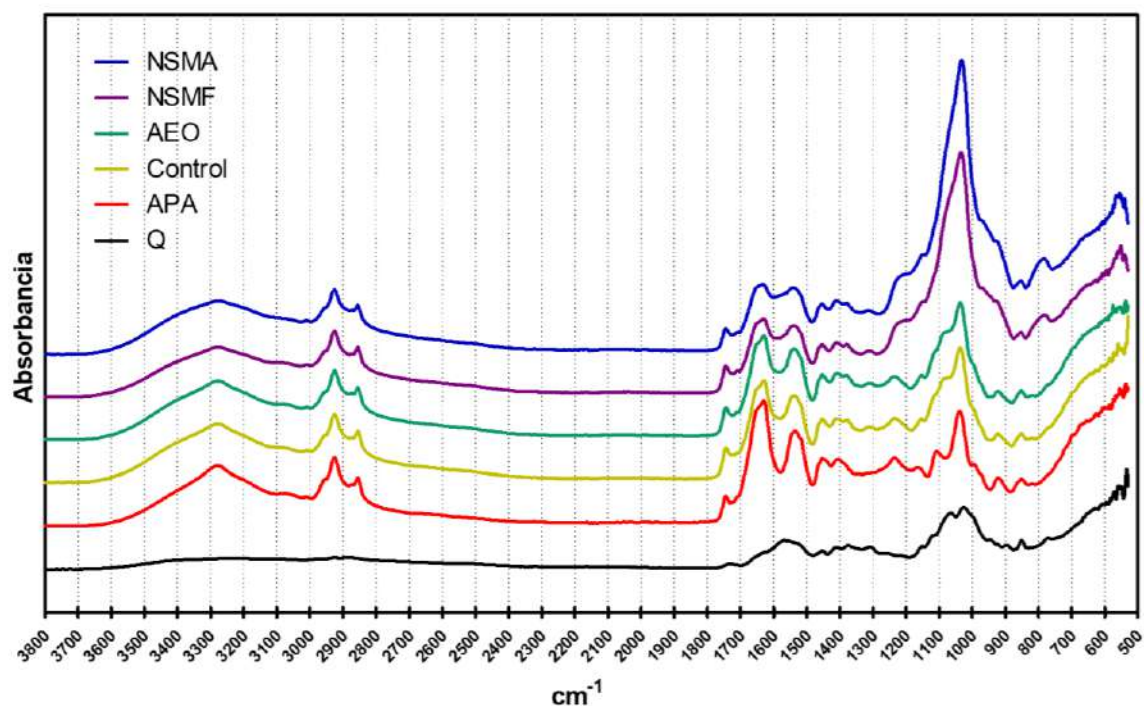


Figura 9. Espectro FT-IR de PAC de APA, Q y con proporción 4:1; APA:Q (p/p) con la adición de NSMF, AEO emulsificado o NSMA.

El pico de absorción en $1042\text{-}1045\text{ cm}^{-1}$, asociado a la tensión del enlace C-O y al grupo -OH del glicerol, pudo haber incrementado su intensidad en las PAC debido a interacciones químicas entre este último y los grupos hidroxilo del quitosano y la matriz polimérica a través de puentes de hidrógeno (Leceta y col., 2013; Moreira y col., 2020). Por otro lado, en los espectros de las PAC adicionadas con NSMF y NSMA, se observa una fuerte absorbancia en la frecuencia de $1037\text{-}1039\text{ cm}^{-1}$ y un pico en la frecuencia de 800 cm^{-1} , los cuales pueden asociarse a un desplazamiento de los picos característicos de la tensión asimétrica y simétrica, respectivamente, del enlace Si-O-Si de la red del SiO_2 (Dai y col., 2014). El desplazamiento del pico en $1037\text{-}1039\text{ cm}^{-1}$, previamente identificado por otros autores en un rango entre $1075\text{-}1102\text{ cm}^{-1}$ (Alahmadi y col., 2012; Dai y col., 2014; Gao y col., 2020) pudiera deberse a la interacción de las NSM con la matriz polimérica y a un solapamiento con el pico en $1042\text{-}1045\text{ cm}^{-1}$.

6.10 Efecto de los recubrimientos comestibles en carne fresca de res

6.10.1 Propiedades físicas y químicas

Las propiedades físicas y químicas de carne fresca de res recubierta se reportan en la Figura 10. Los pH de las muestras de los diferentes tratamientos no mostraron diferencias comparados con el del control. Por otro lado, únicamente el tratamiento RN mostró actividad antioxidante en la disminución de la concentración de malonaldehído, esto tras 14 días de almacenamiento comparado con los tratamientos sin AEO. Las propiedades antioxidantes del aceite esencial de orégano se atribuyen a su contenido de compuestos fenólicos, como el timol que constituye un 66.3% de su composición (Hernández-Hernández, 2014). Los grupos hidroxilo del anillo fenólico de estos compuestos pueden donar un átomo de hidrógeno, nulificando radicales libres y, en consecuencia, bloqueando la formación de compuestos oxidantes (Jaspal y col., 2021).

En cuanto al color, no hubo diferencias entre los tratamientos, sin embargo, los tratamientos con aceite esencial emulsificado o encapsulado no disminuyeron su saturación de color (valor C) con el paso del tiempo, a diferencia de los tratamientos sin aceite esencial añadido. Esto puede deberse al efecto antioxidante del aceite esencial que puede disminuir la formación de metamioglobina (de color café grisáceo), la cual se acumula en la superficie de la carne

generando su decoloración (Faustman y col., 2010), fenómeno que, además, se ve promovido por bajas concentraciones de oxígeno (Kontominas, 2014) similares a las producidas por el empaque al vacío.

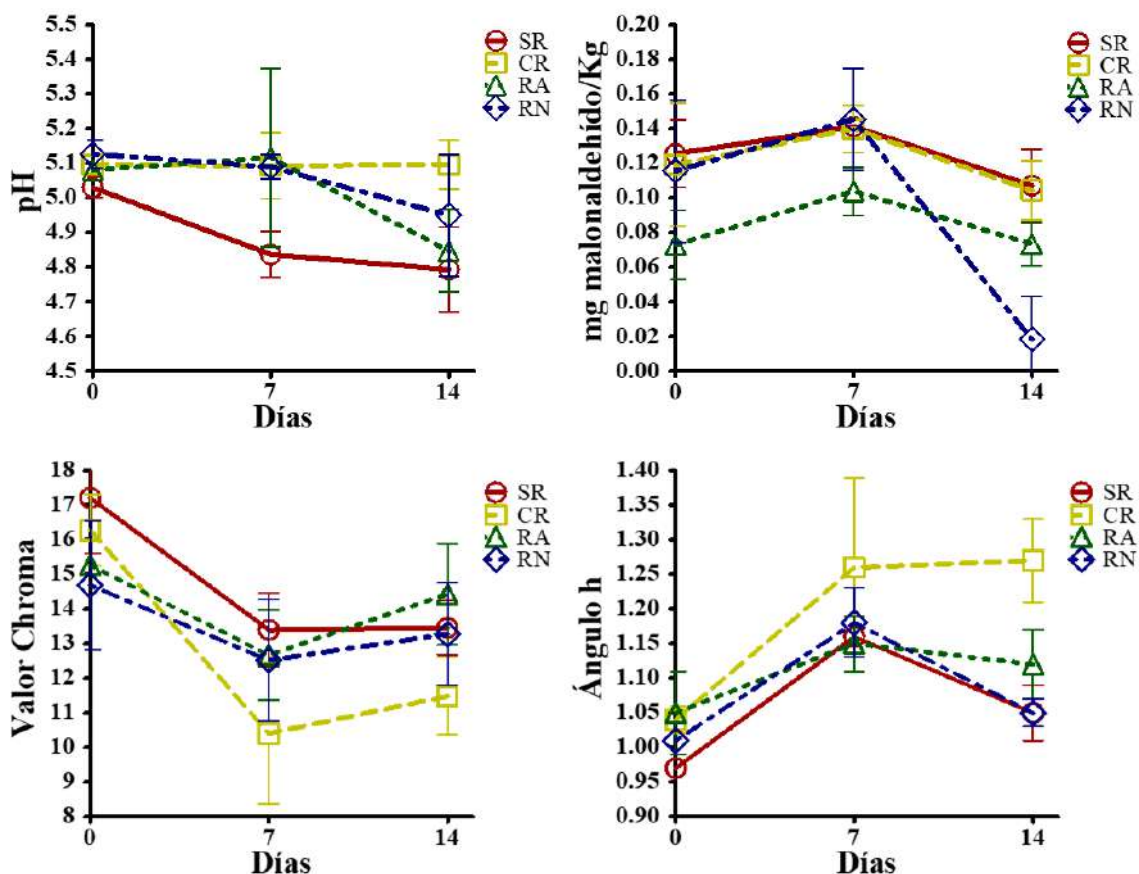


Figura 10. Efecto de los recubrimientos comestibles en el pH, TBARS (mg malonaldehído/kg de carne) y color (valor Chroma y ángulo h) de carne fresca de res. SR: muestra control sin recubrimiento; CR: muestra con recubrimiento sin adición de AEO ni NSMA; RA: muestra con recubrimiento adicionado con AEO emulsificado; RN: muestra con recubrimiento adicionado con NSMA.

6.10.2 Propiedades antimicrobianas

Los recubrimientos comestibles exhibieron excelentes propiedades antimicrobianas contra los microorganismos de prueba (Figura 11); todas las muestras comenzaron el experimento con poblaciones mínimas de MMA y *B. thermosphacta* e indetectables de *Pseudomonas spp* y *E coli*. Tras 21 días de almacenamiento la muestra sin recubrimiento alcanzó una población de MMA de 6.57 ± 0.01 Log UFC/cm²; se ha reportado que olores desagradables se presentan

cuando la población de MMA alcanza cerca de 10^7 UFC/cm² (Comi, 2017; Pellissery y col., 2020). En contraste los tratamientos CR y RN no mostraron desarrollo de MMA, mientras que el tratamiento RA exhibió una población de 5.16 ± 0.05 Log UFC/cm² tras 42 días. La muestra control no superó 7 Log UFC/cm² a lo largo del experimento.

En cuanto a *Pseudomonas*, la muestra control superó 6 Log UFC/cm² tras 14 días de almacenamiento y alcanzó 7.07 ± 0.03 Log UFC/cm² al día 42. *Pseudomonas* metaboliza aminoácidos como fuente de energía tras el consumo de la glucosa y tras alcanzar una población entre 10^6 y 10^8 UFC/cm² produce compuestos azufrados, ésteres y aminos, seguido de viscosidad y olores afrutados, pútridos, sulfurosos y caseosos (Samelis, 2006). Por su parte, se observó desarrollo de *Pseudomonas* spp. en el tratamiento RA al día 28, alcanzando una población de 4.17 ± 0.02 Log UFC/cm², población similar a la alcanzada por el tratamiento RN tras 42 días (4.22 ± 0.08 Log UFC/cm²). El tratamiento CR mostró la mayor cuenta obtenida por los tratamientos con recubrimientos comestibles (5.14 ± 0.02 Log UFC/cm²) tras 42 días de almacenamiento. El crecimiento anticipado en el tratamiento RA puede deberse a la solubilización y rompimiento de la PAC en contacto con la humedad de la carne fresca de res. El incremento en la materia soluble puede atribuirse a una menor densidad de interacciones de la matriz polimérica en presencia del AEO (Aguirre y col., 2013), esto debido al efecto pastificante del aceite esencial que puede provocar una disrupción de la matriz del recubrimiento y, en consecuencia, una estructura polimérica menos compacta (Lee y col., 2019) y una difusión más veloz del agua dentro de la PAC (Hosseini y col., 2009). De esta manera, las propiedades de barrera al oxígeno de la PAC pudieron verse mermadas, siendo menos eficaces en la prevención del crecimiento de bacterias aeróbicas como *Pseudomonas* spp (Azarifar y col., 2020). La encapsulación del AEO en NSM evitó éste efecto en el tratamiento RN, al tiempo que preservó la actividad antimicrobiano del AEO mostrando una población de *Pseudomonas* menor que la observada en el tratamiento CR tras 42 días.

Por otro lado, no se detectó desarrollo de *B. thermosphacta* en los tratamientos CR y RN tras 42 días de almacenamiento, en contraste con el tratamiento SR que superó una población de 6 Log UFC/cm² y 7 Log UFC/cm² tras 28 y 42 días, respectivamente, y el tratamiento RA

que llegó a 4.62 ± 0.03 Log UFC/cm² tras 28 días. Lo anterior puede estar relacionado con lo descrito anteriormente, pues el oxígeno favorece el desarrollo de *Pseudomonas* spp, pero *B. thermosphacta* y las bacterias ácido-lácticas también pueden crecer y contribuir al deterioro (Comi, 2017). Se puede destacar que, a pesar de que se ha reportado una mayor efectividad de los aceites esenciales contra bacterias Gram-positivas (como *B. thermosphacta*) que contra bacterias Gram-negativas (Hosseini y col., 2015, da Silva y col., 2021), también se ha reportado que un alto contenido de proteína en la matriz alimentaria puede reducir sus propiedades antimicrobianas debido a la unión de algunos constituyentes volátiles del aceite esencial con las proteínas (Pateiro y col., 2021, da Silva y col., 2021).

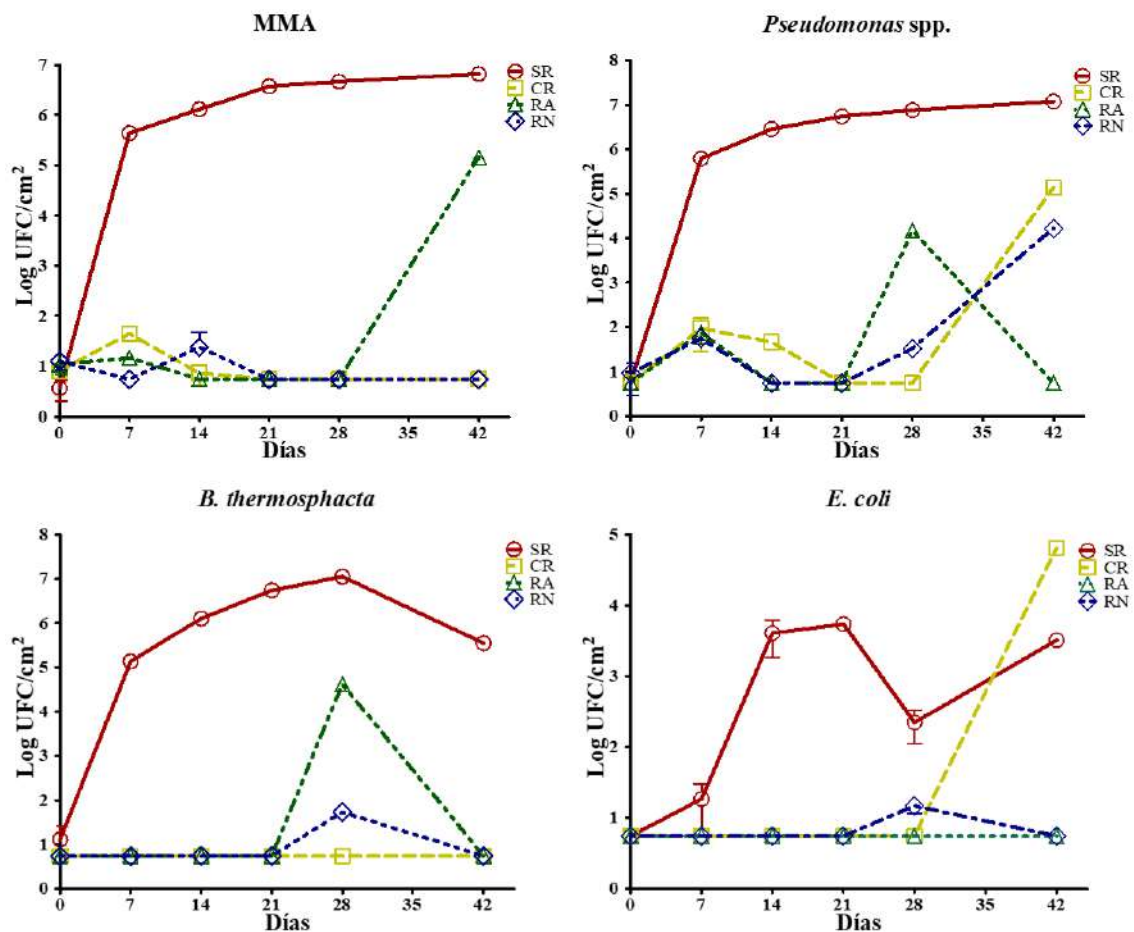


Figura 11. Efecto de las PAC sobre el crecimiento de MMA, *B. thermosphacta*, *Pseudomonas* y *E. coli* (Log UFC/cm²) en carne fresca de res. SR: muestra control sin recubrimiento; CR: muestra con recubrimiento sin adición de AEO ni NSMA; RA: muestra con recubrimiento adicionado con AEO; RN: muestra con recubrimiento adicionado con NSMA.

En el caso de *E. coli*, el tratamiento SR, tras 14 días de almacenamiento, superó el límite microbiológico establecido por la NOM-194-SSA1-2004 de 3 Log UFC/g. El tratamiento CR alcanzó la población más elevada (4.81 ± 0.08 Log UFC/cm²) tras 42 días, mientras que los tratamientos con AEO no permitieron el desarrollo del microorganismo, posiblemente debido a su actividad antimicrobiana. La actividad antimicrobiana del AEO contra *E. coli* se ha reportado en numerosos estudios y se atribuye a la disrupción y despolarización de la membrana citoplasmática generada por el timol y el carvacrol (Xu y col., 2008).

6.11 Aceptabilidad sensorial de las PAC

Los resultados de los análisis sensoriales (Figura 12) muestran que, tras 21 días de almacenamiento, el olor de las muestras con recubrimiento fue apenas aceptable, no importando si éste fue removido, mientras que la muestra control fue rechazada. Esto puede deberse a la presencia de olores desagradables en la muestra control debido al deterioro microbiano. Por otro lado, la aceptabilidad visual de las muestras se ve mermada por la presencia del recubrimiento; su remoción otorgó una aceptabilidad visual similar a la del tratamiento control, la cual fue apenas aceptable. No hubo diferencias en la aceptabilidad, tanto de olor y color, de las muestras con diferentes tipos de recubrimientos.

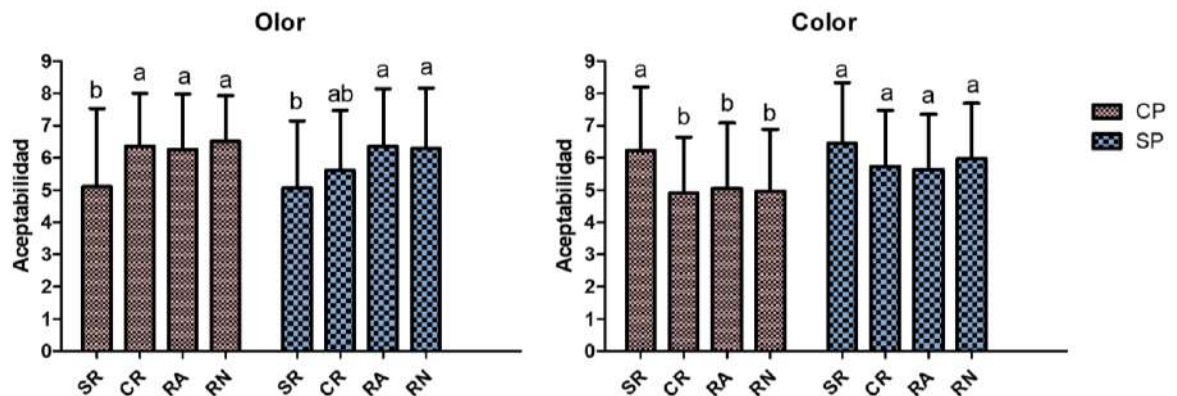


Figura 12. Aceptabilidad de olor y color de muestras de carne fresca de res almacenadas por 21 días evaluadas con los tratamientos usando la película (CP) o retirándola (SP). En un mismo grupo (CP o SP) columnas no conectadas por la misma letra son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

7 CONCLUSIONES

Se observaron buenas propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua de la película conteniendo las nanopartículas de sílice mesoporoso incorporadas con el aceite esencial de orégano, además de mostrar una buena homogeneidad superficial.

Se observaron interacciones del glicerol y las NSM con la matriz polimérica, lo cual permitió una mejor estructura de las PAC.

La encapsulación del aceite esencial de orégano en las nanopartículas de sílice mesoporosa logró satisfactoriamente la preservación de sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas y redujo su efecto desestabilizante en la matriz de la película activa comestible.

La película activa comestible diseñada otorgó un claro incremento en la vida de anaquel de carne fresca de res almacenada en refrigeración, inhibiendo el desarrollo de microorganismos patógenos y deterioradores por 42 días, al tiempo que consiguió la aceptabilidad por parte de los consumidores hasta por 21 días, de esta forma demostrando su potencial uso en la conservación de este tipo de productos.

Se requieren investigaciones encaminadas a determinar los mecanismos sinérgicos del aceite esencial con otros antimicrobianos así como la determinación de los mecanismos específicos de inhibición contra microorganismos de interés.

8 REFERENCIAS

- Aguirre, A., Borneo, R., & León, A. (2013). Antimicrobial, mechanical and barrier properties of triticale protein films incorporated with oregano essential oil. *Food Bioscience*, *1*, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2012.12.001>
- Alahmadi, S. M., Mohamad, S., & Maah, M. J. (2012). Synthesis and characterization of mesoporous silica functionalized with Calix[4]arene derivatives. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(12), 13726–13736. <https://doi.org/10.3390/ijms131013726>
- Arcos, D., & Vallet-Regí, M. (2013). Bioceramics for drug delivery. *Acta Materialia*, *61*(3), 890–911. <https://doi.org/10.1016/j.actamat.2012.10.039>
- Arjunan, N., Singaravelu, C. M., Kulanthaivel, J., & Kandasamy, J. (2017). A potential photocatalytic, antimicrobial and anticancer activity of chitosan-copper nanocomposite. *International Journal of Biological Macromolecules*, *104*, 1774–1782. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.006>
- Azarifar, M., Ghanbarzadeh, B., Sowti Khiabani, M., Akhondzadeh Basti, A., & Abdulkhani, A. (2020). The effects of gelatin-CMC films incorporated with chitin nanofiber and *Trachyspermum ammi* essential oil on the shelf life characteristics of refrigerated raw beef. *International Journal of Food Microbiology*, *318*, 108493. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108493>
- Balas, F., Manzano, M., Horcajada, P., & Vallet-Regí, M. (2006). Confinement and controlled release of bisphosphonates on ordered mesoporous silica-based materials. *Journal of the American Chemical Society*, *128*(25), 8116–8117. <https://doi.org/10.1021/ja062286z>

- Bastarrachea, L., Dhawan, S., & Sablani, S. S. (2011). Engineering properties of polymeric-based antimicrobial films for food packaging: A review. *Food Engineering Reviews*, 3(2), 79–93. <https://doi.org/10.1007/s12393-011-9034-8>
- Beck, J. S., Vartuli, J. C., Roth, W. J., Leonowicz, M. E., Kresge, C. T., Schmitt, K. D., Chu, C. T. W., Olson, D. H., Sheppard, E. W., McCullen, S. B., Higgins, J. B., & Schlenker, J. L. (1992). A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates. *Journal of the American Chemical Society*, 114(27), 10834–10843. <https://doi.org/10.1021/ja00053a020>
- Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 15(3), 237–248.
- Bravo Cadena, M., Preston, G. M., van der Hoorn, R. A., 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, 582–590. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.081>
- Brendao Melo, A. D., Figueiredo Amaral, A., Schaefer, G., Bittencourt Luciano, F., de Andrade, C., Batista Costa, L., & Rostagno, M. H. (2015). Antimicrobial effect against different bacterial strains and bacterial adaptation to essential oils used as feed additives. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 79, 285–289.
- Cai, Y., Corke, H., & Wu, H. (2004). Amaranth. En C. Wrigley, H. Corke, & C. Walker, *Encyclopedia of grain science* (págs. 1-10). Oxford: Elsevier.
- Cardoso, G. P., Dutra, M. P., Fontes, P. R., Ramos, A. D. L. S., Gomide, L. A. D. M., & Ramos, E. M. (2016). Selection of a chitosan gelatin-based edible coating for color

- preservation of beef in retail display. *Meat Science*, *114*, 85–94.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.12.012>
- Castellani, O. F., Martínez, E. N., & Añón, M. C. (1998). Structural modifications of an amaranth globulin induced by pH and NaCl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(12), 4846–4853. <https://doi.org/10.1021/jf9802427>
- Changes in AOAC® official methods of analysis. (1995). *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, *78*(1), 284–288. <https://doi.org/10.1093/jaoac/78.1.284>
- Chen, S., Wu, M., Wang, C., Yan, S., Lu, P., & Wang, S. (2020). Developed chitosan/oregano essential oil biocomposite packaging film enhanced by cellulose nanofibril. *Polymers*, *12*(8), 1780. <https://doi.org/10.3390/polym12081780>
- Comi, G. (2017). Spoilage of Meat and Fish. *The Microbiological Quality of Food*, 179–210. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100502-6.00011-x>
- Condés, M. C., Añón, M. C., Dufresne, A., & Mauri, A. N. (2018). Composite and nanocomposite films based on amaranth biopolymers. *Food Hydrocolloids*, *74*, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.07.013>
- Condés, M. C., Añón, M. C., & Mauri, A. N. (2015). Amaranth protein films prepared with high-pressure treated proteins. *Journal of Food Engineering*, *166*, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.05.005>
- da Silva, B. D., Bernardes, P. C., Pinheiro, P. F., Fantuzzi, E., & Roberto, C. D. (2021). Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products. *Meat Science*, *176*, 108463. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108463>

- Consejo Mexicano de la Carne. (2018). Compendio Estadístico. México. Recuperado el 19 de abril de 2020, de <https://comecarne.org/wp-content/uploads/2019/04/Compendio-Estadi%CC%81stico-2018-VF.pdf>
- Das, D., Mir, N. A., Chandla, N. K., & Singh, S. (2021). Combined effect of pH treatment and the extraction pH on the physicochemical, functional and rheological characteristics of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed protein isolates. *Food Chemistry*, 353, 129466. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129466>
- Dangaran, K. L., & Krochta, J. M. (2007). Preventing the loss of tensile, barrier and appearance properties caused by plasticiser crystallisation in whey protein films. *International Journal of Food Science & Technology*, 42(9), 1094–1100. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01355.x>
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J. A., & Voilley, A. (1998). Edible films and coatings: tomorrow's packagings: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(4), 299–313. <https://doi.org/10.1080/10408699891274219>
- dos Santos Paglione, I., Galindo, M. V., de Medeiros, J. A. S., Yamashita, F., Alvim, I. D., Ferreira Grosso, C. R., Sakanaka, L. S., & Shirai, M. A. (2019). Comparative study of the properties of soy protein concentrate films containing free and encapsulated oregano essential oil. *Food Packaging and Shelf Life*, 22, 100419. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100419>
- Emiroğlu, Z. K., Yemiş, G. P., Coşkun, B. K., & Candoğan, K. (2010). Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science*, 86(2), 283–288. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.016>

- Escamilla-García, M., Reyes-Basurto, A., García-Almendárez, B., Hernández-Hernández, E., Calderón-Domínguez, G., Rossi-Márquez, G., & Regalado-González, C. (2017). Modified starch-chitosan edible films: physicochemical and mechanical characterization. *Coatings*, 7(12), 224. <https://doi.org/10.3390/coatings7120224>
- Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A., & Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6), 292–303. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.02.004>
- Faustman, C., Sun, Q., Mancini, R., & Suman, S. P. (2010). Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Science*, 86(1), 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.025>
- 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>
- Giosafatto, C. V. L., di Pierro, P., Gunning, P., Mackie, A., Porta, R., & Mariniello, L. (2014). Characterization of citrus pectin edible films containing transglutaminase-modified phaseolin. *Carbohydrate Polymers*, 106, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.015>
- Gou, K., Wang, Y., Xie, L., Guo, X., Guo, Y., Ke, J., Wu, L., Li, S., & Li, H. (2021). Synthesis, structural properties, biosafety and applications of chiral mesoporous silica nanostructures. *Chemical Engineering Journal*, 421, 127862. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.127862>

- Goy, R. C., Morais, S. T., & Assis, O. B. (2016). Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(1), 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.09.010>
- Haris, P. I., & Severcan, F. (1999). FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 7(1–4), 207–221. [https://doi.org/10.1016/s1381-1177\(99\)00030-2](https://doi.org/10.1016/s1381-1177(99)00030-2)
- Hassan, B., Chatha, S. A. S., Hussain, A. I., Zia, K. M., & Akhtar, N. (2018). Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 1095–1107. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.097>
- Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M., & von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-Negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3590–3595. <https://doi.org/10.1021/jf980154m>
- Hernández-Hernández, E., Castillo-Hernández, G., González-Gutiérrez, C. J., Silva-Dávila, A. J., Gracida-Rodríguez, J. N., García-Almendárez, B. E., di Pierro, P., Vázquez-Landaverde, P., & Regalado-González, C. (2019). Microbiological and physicochemical properties of meat coated with microencapsulated mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth) and basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oils mixture. *Coatings*, 9(7), 414. <https://doi.org/10.3390/coatings9070414>
- Hernández-Hernández, E., Lira-Moreno, C. Y., Guerrero-Legarreta, I., Wild-Padua, G., di Pierro, P., García-Almendárez, B. E., & Regalado-González, C. (2017). Effect of nanoemulsified and microencapsulated mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth)

- essential oil coatings on quality of fresh pork meat. *Journal of Food Science*, 82(6), 1423–1432. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13728>
- 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. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2014/641814>
- Himed, L., Merniz, S., Monteagudo-Olivan, R., Barkat, M., & Coronas, J. (2019). Antioxidant activity of the essential oil of citrus limon before and after its encapsulation in amorphous SiO₂. *Scientific African*, 6, e00181. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00181>
- Hoffmann, F., Cornelius, M., Morell, J., & Froeba, M. (2006). Silica-based mesoporous organic—inorganic hybrid materials. *ChemInform*, 37(34). <https://doi.org/10.1002/chin.200634291>
- Hosseini, M., Razavi, S., & Mousavi, M. (2009). Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils. *Journal of Food Processing and Preservation*, 33(6), 727–743. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2008.00307.x>
- Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M., & Farahmandghavi, F. (2015). Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare* L. essential oil. *Industrial Crops and Products*, 67, 403–413. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.062>
- Hunt, M., & King, A. (2012). *AMSA Meat Color Measurement Guidelines*. American Meat Science Association.

- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>
- Izquierdo-Barba, I., Sousa, E., Doadrio, J. C., Doadrio, A. L., Pariente, J. P., Martínez, A., Babonneau, F., & Vallet-Regí, M. (2009). Influence of mesoporous structure type on the controlled delivery of drugs: release of ibuprofen from MCM-48, SBA-15 and functionalized SBA-15. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 50(3), 421–429. <https://doi.org/10.1007/s10971-009-1932-3>
- Izquierdo-Barba, I., Vallet-Regí, M., Kupferschmidt, N., Terasaki, O., Schmidtchen, A., & Malmsten, M. (2009). Incorporation of antimicrobial compounds in mesoporous silica film monolith. *Biomaterials*, 30(29), 5729–5736. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.003>
- Jang, H. T., Park, Y., Ko, Y. S., Lee, J. Y., & Margandan, B. (2009). Highly siliceous MCM-48 from rice husk ash for CO₂ adsorption. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 3(5), 545–549. <https://doi.org/10.1016/j.ijggc.2009.02.008>
- Jaspal, M. H., Ijaz, M., Haq, H. A. U., Yar, M. K., Asghar, B., Manzoor, A., Badar, I. H., Ullah, S., Islam, M. S., & Hussain, J. (2021). Effect of oregano essential oil or lactic acid treatments combined with air and modified atmosphere packaging on the quality and storage properties of chicken breast meat. *LWT*, 146, 111459. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111459>
- Kester, J. J., & Fennema, O. R. (1986). Edible films and coatings: A review. *Food Technology*, 40(12), 47–59.

- Kontominas, M. G. (2014). Modified atmosphere packaging of foods. En R. K. Robinson, C. A. Batt, & P. D. Patel (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (Vol. 2, pp. 1012–1016). Elsevier.
- Lagaron, J. M., Fernandez-Saiz, P., & Ocio, M. J. (2007). Using ATR-FTIR spectroscopy to design active antimicrobial food packaging structures based on high molecular weight chitosan polysaccharide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(7), 2554–2562. <https://doi.org/10.1021/jf063110j>
- Lambert, R., Skandamis, P., Coote, P., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, *91*(3), 453–462. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>
- Leceta, I., Guerrero, P., Ibarburu, I., Dueñas, M., & de la Caba, K. (2013). Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. *Journal of Food Engineering*, *116*(4), 889–899. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.022>
- Lee, J. Y., Garcia, C. V., Shin, G. H., & Kim, J. T. (2019). Antibacterial and antioxidant properties of hydroxypropyl methylcellulose-based active composite films incorporating oregano essential oil nanoemulsions. *LWT*, *106*, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.061>
- Lin, Y. S., & Haynes, C. L. (2010). Impacts of mesoporous silica nanoparticle size, pore ordering, and pore integrity on hemolytic activity. *Journal of the American Chemical Society*, *132*(13), 4834–4842. <https://doi.org/10.1021/ja910846q>
- López, D. N., Galante, M., Robson, M., Boeris, V., & Spelzini, D. (2018). Amaranth, quinoa and chia protein isolates: Physicochemical and structural properties. *International Journal*

- of *Biological Macromolecules*, 109, 152–159.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.080>
- Lu, F., Wu, S. H., Hung, Y., & Mou, C. Y. (2009). size effect on cell uptake in well-suspended, uniform mesoporous silica nanoparticles. *Small*, 5(12), 1408–1413.
<https://doi.org/10.1002/sml.200900005>
- Lu, W., Cui, R., Zhu, B., Qin, Y., Cheng, G., Li, L., & Yuan, M. (2021). Influence of clove essential oil immobilized in mesoporous silica nanoparticles on the functional properties of poly(lactic acid) biocomposite food packaging film. *Journal of Materials Research and Technology*, 11, 1152–1161. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.01.098>
- Manzano, M., Aina, V., Areán, C., Balas, F., Cauda, V., Colilla, M., Delgado, M., & Vallet-Regí, M. (2008). Studies on MCM-41 mesoporous silica for drug delivery: Effect of particle morphology and amine functionalization. *Chemical Engineering Journal*, 137(1), 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2007.07.078>
- Martínez, E. N., Castellani, O. F., & Añón, M. C. (1997). Common molecular features among amaranth storage proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(10), 3832–3839. <https://doi.org/10.1021/jf9700384>
- Miles, A. A., Misra, S. S., & Irwin, J. O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Epidemiology and Infection*, 38(6), 732–749.
<https://doi.org/10.1017/s002217240001158x>
- Moreira Gonçalves, S., Gomes Motta, J. F., Ribeiro-Santos, R., Hidalgo Chávez, D. W., & Ramos De Melo, N. (2020). Functional and antimicrobial properties of cellulose acetate films incorporated with sweet fennel essential oil and plasticizers. *Current Research in Food Science*, 3, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2020.01.001>

- Morillon, V., Debeaufort, F., Blond, G., Capelle, M., & Voilley, A. (2002). Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(1), 67–89. <https://doi.org/10.1080/10408690290825466>
- Ngamviriyavong, P., Thananuson, A., Pankongadisak, P., Tanjak, P., & Janvikul, W. (2010). Antibacterial hydrogels from chitosan derivatives. *Journal of Metals, Materials and Minerals*, 20, 113–117.
- Nicklas, T. A., O’Neil, C. E., Zanovec, M., Keast, D. R., & Fulgoni, V. L. (2012). Contribution of beef consumption to nutrient intake, diet quality, and food patterns in the diets of the US population. *Meat Science*, 90(1), 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.06.021>
- Nieto, A., Balas, F., Colilla, M., Manzano, M., & Vallet-Regí, M. (2008). Functionalization degree of SBA-15 as key factor to modulate sodium alendronate dosage. *Microporous and Mesoporous Materials*, 116(1–3), 4–13. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.03.025>
- Odds, F. C. (2003). Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(1), 1. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg301>
- Ortega-Nieblas, M. M., Robles-Burgueño, M. R., Acedo-Félix, E., González-León, A., Morales-Trejo, A., & Vázquez-Moreno, L. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of oregano (*Lippia palmeri* S. Wats) essential oil. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 34(1), 11. <https://doi.org/10.35196/rfm.2011.1.11>
- Parish, M. E., & Davidson, P. M. (1993). Antimicrobials in Foods. En P. M. Davidson & A. L. Branen (Eds.), *Methods for evaluation* (2.a ed., pp. 597–615). Marcel Dekker.

- Pateiro, M., Munekata, P. E., Sant'Ana, A. S., Domínguez, R., Rodríguez-Lázaro, D., & Lorenzo, J. M. (2021). Application of essential oils as antimicrobial agents against spoilage and pathogenic microorganisms in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 337, 108966. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108966>
- Pellissery, A. J., Vinayamohan, P. G., Amalaradjou, M. A. R., & Venkitanarayanan, K. (2020). Spoilage bacteria and meat quality. *Meat Quality Analysis*, 307–334. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819233-7.00017-3>
- Pérez-Esteve, D., Ruiz-Rico, M., Martínez-Mañez, 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>
- Porta, R., di Pierro, P., Rossi-Marquez, G., Mariniello, L., Kadivar, M., & Arabestani, A. (2015). Microstructure and properties of bitter vetch (*Vicia ervilia*) protein films reinforced by microbial transglutaminase. *Food Hydrocolloids*, 50, 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.008>
- Porta, R., di Pierro, P., Sabbah, M., Regalado-Gonzales, C., Mariniello, L., Kadivar, M., & Arabestani, A. (2016). Blend films of pectin and bitter vetch (*Vicia ervilia*) proteins: Properties and effect of transglutaminase. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 36, 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.07.001>
- Rehman, F., Ahmed, K., Rahim, A., Muhammad, N., Tariq, S., Azhar, U., Khan, A. J., Us Sama, Z., Volpe, P. L., & Airoidi, C. (2018). Organo-bridged silsesquioxane incorporated mesoporous silica as a carrier for the controlled delivery of ibuprofen and fluorouracil.

- Journal of Molecular Liquids*, 258, 319–326.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.03.057>
- Romanazzi, G., Nigro, F., Ippolito, A., DiVenere, D., & Salerno, M. (2002). Effects of pre- and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *Journal of Food Science*, 67(5), 1862–1867. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08737.x>
- Sabbah, M., & Esposito, M. (2016). Insight into zeta potential measurements in biopolymer film preparation. *Journal of Biotechnology & Biomaterials*, 6(2).
<https://doi.org/10.4172/2155-952x.1000e126>
- Samelis, J. (2006). Managing microbial spoilage in the meat industry. *Food Spoilage Microorganisms*, 213–286. <https://doi.org/10.1533/9781845691417.2.213>
- Samelis, J., Kakouri, A., & Rementzis, J. (2000). Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. *Food Microbiology*, 17(3), 329–340.
<https://doi.org/10.1006/fmic.1999.0316>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2019). Tablero agroalimentario de productos básicos y estratégicos: reporte del mercado de bovino. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Recuperado el 19 de abril de 2020, de https://www.cima.aserca.gob.mx/work/models/cima/pdf/cadena/2019/Reporte_mercado_bovino_050919.pdf
- Shevkani, K., Singh, N., Kaur, A., & Rana, J. C. (2014). Physicochemical, pasting, and functional properties of amaranth seed flours: effects of lipids removal. *Journal of Food Science*, 79(7), C1271-C1277. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12493>

- Shit, S. C., & Shah, P. M. (2014). Edible polymers: challenges and opportunities. *Journal of Polymers*, 2014, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/427259>
- Silva Damasceno, E. T., Almeida, R. R., de Carvalho, S. Y. B., de Carvalho, G. S. G., Mano, V., Pereira, A. C., & de Lima Guimarães, L. G. (2018). *Lippia origanoides* Kunth. essential oil loaded in nanogel based on the chitosan and ρ -coumaric acid: Encapsulation efficiency and antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 125, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.074>
- Singh, N., Singh, P., Shevkani, K., & Singh Viridi, A. (2019). Amaranth: potential source for flour enrichment. En *Flour and breads and their fortification in health and disease prevention* (págs. 123-135). Elsevier Inc.
- Siwatch, M., Yadav, R., & Yadav, B. (2019). Chemical, physicochemical, pasting and microstructural properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) flour as affected by different processing treatments. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 11(1), 3–13. <https://doi.org/10.3920/qas2017.1226>
- Stallknecht, G., & Schulz-Schaeffer, J. (1993). Amaranth rediscovered. En J. Janick, & J. Simon, *New crops* (págs. 211-8). New York: John Wiley & Sons.
- Tapia-Blácido, D., do Amaral Sobral, P., & Menegalli, F. (2011). Optimization of amaranth flour films plasticized with glycerol and sorbitol by multi-response analysis. *LWT-Food Science and Technology*, 44(8), 1731–1738. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.04.004>
- Tapia-Blácido, D., Sobral, P. D. A., & Menegalli, F. (2013). Effect of drying conditions and plasticizer type on some physical and mechanical properties of amaranth flour films. *LWT - Food Science and Technology*, 50(2), 392–400. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.09.008>

- Tosi, E., Ré, E., Masciarelli, R., Sánchez, H., Osella, C., & de la Torre, M. (2002). Whole and defatted hyperproteic amaranth flours tested as wheat flour supplementation in mold breads. *LWT - Food Science and Technology*, 35(5), 472–475. <https://doi.org/10.1006/fstl.2002.0892>
- United States Department of Agriculture. (1997). United States standards for grades of carcass beef. Washington, DC: United States Department of Agriculture, agricultural marketing service. Recuperado el 17 de abril de 2020, de <https://www.ams.usda.gov/?dDocName=STELDEV3002979>
- United States Department of Agriculture. (2020). Foreign Agricultural Service, Livestock and poultry. Production, supply and distribution database. Recuperado el 19 de abril de 2020, de <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/downloads>
- Vunain, E., Mishra, A. K., & Mamba, B. B. (2017). Fundamentals of chitosan for biomedical applications. En J. A. Jennings & J. D. Bumgardner (Eds.), *Chitosan based biomaterials* (Vol. 1, pp. 3–20). Woodhead Publishing.
- Wang, Y., Ke, J., Gou, K., Guo, Y., Xu, X., Li, S., & Li, H. (2020). Amino functionalized mesoporous silica with twisted rod-like shapes: Synthetic design, in vitro and in vivo evaluation for ibuprofen delivery. *Microporous and Mesoporous Materials*, 294, 109896. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2019.109896>
- Wilhelm, E., Aberle, T., Burchard, W., & Landers, R. (2001). Peculiarities of Aqueous Amaranth Starch Suspensions. *Biomacromolecules*, 3(1), 17–26.
- Xu, J., Zhou, F., Ji, B. P., Pei, R. S., & Xu, N. (2008). The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 47(3), 174–179. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2008.02407.x>

- Yanagisawa, T., Shimizu, T., Kuroda, K., & Kato, C. (1990). The Preparation of Alkyltrimethylammonium–Kanemite Complexes and Their Conversion to Microporous Materials. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 63(4), 988–992. <https://doi.org/10.1246/bcsj.63.988>
- Zhang, R., Cheng, M., Wang, X., & Wang, J. (2019). Bioactive mesoporous nano-silica/potato starch films against molds commonly found in post-harvest white mushrooms. *Food Hydrocolloids*, 95, 517–525. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.060>
- Zhang, T., Lu, Z., Wang, J., Shen, J., Hao, Q., Li, Y., Yang, J., Niu, Y., Xiao, Z., Chen, L., & Zhang, X. (2021). Preparation of mesoporous silica nanoparticle with tunable pore diameters for encapsulating and slowly releasing eugenol. *Chinese Chemical Letters*, 32(5), 1755–1758. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2020.12.033>
- Zhang, X., Ismail, B. B., Cheng, H., Jin, T. Z., Qian, M., Arabi, S. A., Liu, D., & Guo, M. (2021). Emerging chitosan-essential oil films and coatings for food preservation - A review of advances and applications. *Carbohydrate Polymers*, 273, 118616. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118616>
- Zhao, X. (2006). Novel porous materials for emerging applications. *Journal of Materials Chemistry*, 16(7), 623. <https://doi.org/10.1039/b600327n>