



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**“Uso de bioconservación y recubrimientos comestibles
con aceites esenciales en la elaboración de pan
artesanal”**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

I. en Al. Paola Itzel Bautista Espinoza

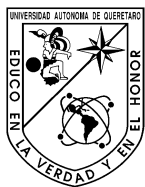
Dirigido por:

Dr. Carlos Regalado González

Co-dirigido por:

Dr. Prospero Di Pierro

Querétaro, Qro a Junio 2022



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

Uso de bioconservación y recubrimientos comestibles con aceites esenciales en la elaboración de pan artesanal

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

Paola Itzel Bautista Espinoza

Dirigido por:

Carlos Regalado González

Co dirigido por:

Prospero Di Pierro

Dr. Carlos Regalado González

Presidente

Firma

Dr. Prospero Di Pierro

Secretario

Firma

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Vocal

Firma

Dr. Everardo Mares Mares

Vocal

Firma

Dra. Blanca Estela García Almendarez

Vocal

Firma

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

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada

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



Paola Itzel Bautista Espinoza

RESUMEN

La contaminación por hongos es uno de los principales problemas a los que se enfrenta la industria de la panificación. Para combatirla, se ha optado por el uso de aditivos como las sales de ácido propiónico, benzoico y sórbico. En los últimos años se ha cuestionado acerca del uso de estos aditivos, debido a la tendencia creciente para elegir alimentos que tengan la menor cantidad de aditivos sintéticos. El uso de agentes antimicrobianos naturales puede ser una alternativa viable para evitar el crecimiento de hongos y agentes deterioradores en el pan, aplicados tanto en la masa como en la corteza, extendiendo la vida de anaquel del mismo. El objetivo de este trabajo fue diseñar y caracterizar un recubrimiento comestible (RC) y evaluar su efecto en un pan artesanal adicionado con *Lactococcus lactis* NRRL B-50307 micro encapsulada. Para la formulación se aplicó un diseño factorial completo 2^2 con tres réplicas. Los factores fueron la mezcla de quitosano (75% des-acetilación, QT 1%) y proteína de quinoa (PQ, 2%) en dos relaciones volumétricas 1:4 y 1:9 (QT:PQ) y mezcla de aceites esenciales de canela (CA) y hierba limón (HL) en relación 1:1 y 2:1 (CA:HL, p/p). El tratamiento de relación 4:1 mostró una inhibición del 63% de *Rhizopus stolonifer*, menor tamaño de partícula ($2.81 \pm 0.13 \mu\text{m}$), índice de polidispersión de 0.77 ± 1.4 y potencial ζ de $26.4 \pm 1.3 \text{ mV}$. Ambos tratamientos mostraron propiedades mecánicas similares. Los tratamientos 4:1 produjeron recubrimientos más homogéneos cuando se analizaron bajo microscopía electrónica de barrido. Se encapsuló *Lactococcus lactis* UQ2 por medio de secado por aspersión (eficiencia de encapsulación 80.8%) y se evaluó su viabilidad (2×10^6 UFC/mL). Se realizó el estudio de vida de anaquel acelerada y no se encontró crecimiento de hongos, levaduras o coliformes totales, observándose una disminución en la dureza del pan con tratamientos.

Palabras Clave: Aceite esencial de hierba limón, aceite esencial de canela, recubrimiento comestible activo, *Lactococcus lactis* UQ2, pan.

ABSTRACT

Fungi spoilage is one of the most common problems in bakery industry that have been controlled for many years by chemically synthesized food additives. However, in recent years, the use of these additives has been questioned, mostly because of the new trends of choosing foods incorporating the least possible chemical additives, with simultaneous increase in shelf life. Natural antimicrobial and antifungal agents could be a viable alternative to avoid fungi and microbial spoilage in bread, when applied as coatings or within the food product to achieve extended shelf life. The aim of this work was to design and characterize an edible coating based on chitosan (QT) (75% de-acetylation), quinoa protein (QU) and a mixture of cinnamon (CA) and lemongrass (HL) essential oils (EO), and to evaluate its performance on sourdough bread. Microencapsulated nisin producer *Lactococcus lactis* NRRL B-50307 was added to the sourdough. A 2² factorial design with three replicates was used, with factors chitosan-quinoa ratio (1:4 and 1:9 QT:QU) and steam distilled essential oils (1:1 and 1:2 HL:CA, v/v). The physicochemical, mechanical, structural and antifungal properties of the films were evaluated. The treatments at 1:4 ratio (QT:QU) inhibited 63% of the radial growth of *Rhizopus stolonifer*, showed small particle size 2.81±0.13 µm, polydispersity index 0.77±1.4, and ζ potential of 26.4±1.3 mV. Treatments using both QT:QU weight ratios showed similar mechanical properties, while the film using 1:4 weight ratio showed more homogeneous structure by using scanning electron microscopy. *Lactococcus lactis* NRRL B-50307 was microencapsulated by spray drying, achieving 2x10⁶ CFU/g and encapsulation efficiency of 80.0±0.8 %. Shelf-life analysis on a climatic chamber was evaluated and no microorganisms were found.

Keywords: lactic acid bacteria, edible films, essential oils, biopreservation

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
ÍNDICE GENERAL	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Deterioro físico.....	2
2.2.Deterioro microbiano	2
2.3 Películas y recubrimientos comestibles	5
2.3.1 Composición de los recubrimientos (RC) y películas comestibles (PC) 6	
2.3.2 Recubrimientos y películas comestibles con propiedades antimicrobianas	7
2.3.2.1 Quitosano	8
2.3.2.2 Proteína de quinoa	9
2.3.2.3 Plastificantes	9
2.3.2.4 Aceites esenciales.....	10
2.3.2.4.1 Aceite esencial de hierba limón	12
2.3.2.4.2 Aceite esencial de canela.....	13
2.3.4.3 Aceites esenciales de mezclas de limón y canela	13
2.4 Partículas de sílice mesoporosa	15
2.5 Bacterias ácido lácticas (LAB).....	15
2.5.1 Metabolitos de las BAL con propiedades antifúngicas	16
2.5.2 Encapsulación de bacterias ácido lácticas	18
2.5.2.1 Secado por aspersión.....	19
2.6 Masa madre del pan	20
2.6.1 Microbiología de la masa madre: la importancia de las BAL	20
2.6.2 El pan de masa madre en México: producción, consumo y normatividad	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. OBJETIVOS	24
4.1 Objetivo general	24
4.1 Objetivos específicos	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.2.1. Extracción del aceite esencial de hierba limón.....	25
5.2.2 Extracción del aceite esencial de canela	25
5.2.3 Determinación de la concentración mínima fungicida (CMF), concentración inhibitoria fraccional (CIF) e índice fraccional inhibitorio (FIC) de los aceites esenciales	26
5.2.4 Síntesis de partículas de sílice mesoporosa	27
5.2.5 Incorporación de los aceites esenciales a las partículas de sílice mesoporosa (NSM)	28
5.2.6 Actividad antifúngica de los aceites esenciales encapsulados.....	28

5.2.7	Diseño experimental para la elaboración de los RC	28
5.2.7.1	Extracción de la proteína de quinoa	29
5.2.7.2	Preparación de las soluciones filmogénicas.....	30
5.2.8.	Determinación de las propiedades del recubrimiento	30
5.2.8.1	Potencial ζ , tamaño de partícula e índice de polidispersión	30
5.2.8.2	Espesor	31
5.2.8.3	Solubilidad.....	31
5.2.8.4	Color y opacidad	31
5.2.9	Propiedades mecánicas.....	32
5.2.10	Microscopía electrónica de barrido (SEM) de las PC	32
5.2.11	Actividad antifúngica de las películas contra <i>Rhizopus stolonifer</i>	32
5.2.12	Permeabilidad al vapor de agua.....	33
5.3	Encapsulación de <i>L. lactis</i> UQ2	33
5.3.1	Activación de <i>L. lactis</i> UQ2	33
5.3.2	Recuperación de las células	33
5.3.3	Preparación del agente encapsulante.....	34
5.3.4	Secado por aspersion	34
5.3.5	Morfología del encapsulado de <i>L. lactis</i> UQ2.....	34
5.4	Análisis del impacto de los recubrimientos y bacterias encapsuladas sobre la vida de anaquel de un pan de masa madre	35
5.5	Análisis sensorial del pan de masa madre adicionado con <i>L. lactis</i> UQ2 encapsuladas y recubrimientos comestibles.....	36
5.6	Análisis estadístico.....	36
6.	RESULTADOS	37
6.1	Extracción del aceite esencial de hierba limón.....	37
6.2	Extracción del aceite esencial de canela	38
6.3	Concentración mínima fungicida (CMF), concentración inhibitoria fraccional (CIF) e índice fraccional inhibitorio (FIC) de los aceites esenciales	39
6.3.1	Concentración mínima fungicida del aceite esencial de canela.....	39
6.3.2	Concentración mínima fungicida del aceite esencial de hierba limón	41
6.3.3	Determinación del efecto combinado de los aceites esenciales.....	43
6.4	Síntesis de partículas de sílice mesoporosa (NSM)	45
6.4.1	Análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM)	46
6.4.2	Análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM)	47
6.4.3	Actividad antifúngica de los aceites esenciales encapsulados	47
6.5	Preparación de la solución filmogénica y formación de las PC	49
6.5.1	Obtención del extracto proteico de la harina de quinoa.....	49
6.5.2	Obtención de las soluciones filmogénicas	49
6.5.3	Caracterización de las soluciones filmogénicas	50
6.5.3.1	Espesor	50
6.5.3.2	Solubilidad.....	51
6.5.3.3	Opacidad y color	52
6.5.2.4	Potencial ζ , índice de polidispersión y tamaño de partícula	54
6.5.2.5	Propiedades mecánicas.....	56
6.5.2.6	Permeabilidad al vapor de agua.....	57
6.5.3	Actividad antifúngica de las películas comestibles	58
6.6	Encapsulación de <i>L. lactis</i> UQ2.....	60

6.7 Bioconservación de pan de masa madre	61
6.7.1 Perfil de textura.....	62
6.7.2 Color.....	62
6.7.3 Estudio microbiológico de la vida de anaquel.....	64
6.7.3.1 Conteo de hongos y levaduras.....	64
6.7.3.1 Coliformes totales.....	66
6.8 Análisis sensorial	67
7. CONCLUSIONES.....	69
7. REFERENCIAS.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Funciones principales de los recubrimientos y películas comestibles.	5
2	Estructura química del quitosano	8
3	Actividad antifúngica de los aceites esenciales	11
4	Estructura química del citral	12
5	Estructura química del cinamaldehído	13
6	Mecanismo de acción del cinamaldehído y el citral en la membrana celular	14
7	Mecanismos de inhibición de las bacterias ácido lácticas	18
8	Representación esquemática del método de encapsulado por secado por aspersión	19
9	Mecanismos de inhibición de las bacterias ácido lácticas	20
10	Control positivo	40
11	Control negativo: aceite esencial de canela	40
12	Control negativo: aceite esencial de hierba limón	40
13	Monitoreo al crecimiento de <i>Rhizopus</i> contra distintas concentraciones de AEC	40
14	Actividad antifúngica del aceite esencial de canela contra <i>Rhizopus nigricans</i>	40
15	Monitoreo al crecimiento de <i>Rhizopus</i> contra distintas concentraciones de AEL	41
16	Actividad antifúngica del aceite esencial de hierba limón contra <i>Rhizopus nigricans</i>	42
17	Isoblograma de la mezcla de aceites esenciales.	44

18	. Partículas de sílice molidas	45
19	Partículas de sílice mesoporosa sin cargar.	45
20	Partículas de sílice mesoporosa cargadas con aceite esencial de canela (A) y aceite esencial de hierba limón (B)	45
21	. Micografía de partículas de sílice mesoporosa sin cargar en aumento de 5.00 X (izquierda y 10.00 X (derecha)	46
22	Imágenes TEM de las partículas de sílice mesoporosa. (A. Sin cargar, B. Cargadas con aceite esencial de hierba limón y C. Cargadas con aceite esencial de canela)	47
23	Actividad fungicida de los aceites esenciales encapsulados en partículas de sílice mesoporosa	48
24	Actividad fungicida de los aceites esenciales encapsulados en partículas de sílice mesoporosa	48
25	Películas obtenidas a partir de las soluciones filmogénicas elaboradas	50
26	Espesor de las películas comestibles	51
27	Solubilidad de las películas comestibles	52
28	Permeabilidad a vapor de agua	58
29	Capsulas de <i>L. lactis</i> UQ2 obtenidas mediante secado por aspersion	60
30	Dureza de los panes de masa madre almacenados en una cámara climática	61
31	Niveles de aceptación de los diversos atributos del producto y aceptación general del mismo en una escala hedónica de 9 puntos.	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Descripción de los metabolitos de las LAB con propiedades antifúngicas	17
2	Límites máximos de microorganismos para pan de acuerdo con la NOM-147-SSA1-1996	22
3	Factores y niveles en el diseño experimental	29
4	Diseño experimental	29
5	Tratamientos analizados	35
6	Rendimientos de extracción de los distintos tratamientos aplicados a la hierba limón.	37
7	Rendimientos de extracción de los distintos tratamientos aplicados a la canela	38
8	Combinaciones de las fracciones individuales de los aceites esenciales de hierba limón y canela	43
9	Análisis proximales del extracto proteico de acuerdo a los métodos de la AOAC (1984)	49
10	Parámetros de color (coordenadas L*, a* y b*) y porcentaje de opacidad de las películas	54
11	Tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial ζ de las soluciones filmogénicas	55
12	Resistencia a la tensión (Mpa), porcentaje de elongación (%E) y módulo de Young de las películas comestibles	56
13	Índices antifúngicos (%) de las películas comestibles	59
14	Valores de color obtenidos durante el estudio de vida de anaquel	63
15	Espectro de colores de las coordenadas L*, a* y b* de los tratamientos	64
16	Resultados del conteo de hongos y levaduras	65
17	Resultados del conteo de coliformes totales	66

18	Niveles de aceptación general obtenidos en la evaluación sensorial	68
----	--	----

1. INTRODUCCIÓN

El pan es uno de los alimentos mayormente consumidos a nivel mundial. En Europa, este consumo está liderado por Austria, Bélgica y Bulgaria (Quilez y Salas-Salvado, 2012). En México, según los datos de la Cámara Nacional de la Industria Panificadora (CANAINPA), el consumo estimado de pan es de 33 kg por persona al año, siendo uno de los más grandes de Latinoamérica, solo después de Chile (96 kg per cápita), Argentina (75 kg per cápita) y Uruguay (62 kg per cápita). Este nivel de consumo plantea distintos retos a la industria de la panificación, siendo el principal la necesidad de asegurarse que el producto tenga una vida de anaquel duradera. El deterioro de los productos de panificación es causado principalmente por hongos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Gerez et al., 2009). Si bien no existen datos actualizados acerca del desperdicio de productos de panificación en México, se sabe que, en Estados Unidos, del 68% de productos de panificación consumidos, 20% se desperdicia en las cocinas y 16% en los anaqueles (STATISTA, 2016). Por mucho tiempo, la adición de los ácidos propiónico, benzoico y sus sales, fue la solución principal para combatir el crecimiento de microorganismos deterioradores. No obstante, debido a las exigencias del mercado, se ha reducido drásticamente su uso.

Se han buscado diversas alternativas para la conservación de los productos de panificación. El uso de recubrimientos (RC) y películas (PC) comestibles se ha posicionado en los últimos años como una de las mejores opciones, debido principalmente a los efectos de barrera que ofrecen contra diversos microorganismos. Los aceites esenciales de hierba limón (*Cymbopogon citratus*) y canela (*Cinnamomum verum*) han mostrado tener propiedades antimicrobianas, por lo que su adición a estos recubrimientos podría ayudar con la inhibición del crecimiento de diversos microorganismos deterioradores, extendiendo la vida de anaquel de los productos a los cuales se aplica el recubrimiento. Durante los últimos años, las bacterias ácido lácticas se han estudiado debido al enorme potencial antimicrobiano que han demostrado, de modo que en los últimos años se han propuesto como conservadores naturales.

Debido a todos estos factores, el objetivo principal de este trabajo fue diseñar un recubrimiento comestible a base de quitosano y proteína de quinua, adicionado con aceites esenciales de hierba limón y canela, así como evaluar sus propiedades fisicoquímicas y de barrera, para aplicarlo a un pan tipo artesanal. Al mismo tiempo, para retardar el crecimiento de microorganismos deterioradores de un pan tipo artesanal, se adicionará la bacteria ácido láctica *Lactococcus lactis* NRRL B-50307 a la masa fermentada. Se evaluó el efecto antimicrobiano de los recubrimientos y del inóculo de *L. lactis* sobre el pan artesanal, así como los efectos en las características reológicas y sensoriales del mismo.

1. ANTECEDENTES

El deterioro puede ser definido como “cualquier cambio en la composición de un alimento que puede afectar negativamente en las características organolépticas del mismo” (Smith *et al.*, 2004). En los productos de panificación, se pueden definir dos tipos principales de deterioro: físico (pérdida de humedad, etcétera) y microbiológico (levaduras, hongos, bacterias, entre otros). Algunos de los factores más comunes que tienen un papel fundamental en la degradación de estos productos son el pH, actividad de agua, condiciones de almacenamiento, humedad y aditivos.

2.1 Deterioro físico

En este tipo de deterioro se encuentran problemas como la pérdida y ganancia de humedad, que resultan en cambios de textura y promueven la proliferación de microorganismos. El principal factor de deterioro físico es el envejecimiento, el cual se define como “cualquier tipo de cambio, exceptuando los provocados por deterioro microbiano, que ocurren en el pan o en otros productos de panificación durante el periodo post horneado, haciéndolo menos aceptable al consumidor” (Soukoulis *et al.*, 2014). Este mecanismo implica reacciones que favorecen la redistribución de humedad, pérdida de sabor y olor, retro degradación de almidón y aumento en la firmeza. Generalmente, se controla mediante aditivos y el uso de atmósferas enriquecidas en CO₂.

2.2 Deterioro microbiano

Tipo de deterioro más común en productos de panificación y el que mayor impacto tiene en la vida de anaquel del producto terminado. Se estima que, tan solo en los Estados Unidos, las pérdidas de productos por este deterioro son de 1 a 3% de un total de 90 mil toneladas de productos al año (Smith *et al.*, 2004). Este deterioro está estrechamente relacionado con la actividad de agua de los productos; principalmente dado por bacterias y hongos

a) Deterioro bacteriano

Es el tipo menos común de deterioro microbiano, limitado a productos de panificación con alto nivel de humedad, debido a que la mayoría de las bacterias requieren de un elevado nivel de actividad de agua para proliferar, condición poco común en los productos de panificación. Lavermicocca *et al.*, (2016), reportan que *Bacillus cereus* es la principal especie causante de enfermedades transmitidas por productos de panificación. Las esporas de esta bacteria pueden encontrarse en las materias primas de productis de panificación, siendo termorresistentes pueden sobrevivir las temperaturas de horneado, llegando al producto final y consecuentemente arriesgando la salud del consumidor. Usualmente, este problema es controlado agregando conservadores a la masa del producto.

b) Deterioro por hongos

Considerados como los principales organismos deterioradores en productos de panificación (Figura 1), los hongos representan un gran problema para la industria, principalmente por las pérdidas económicas que se obtienen año con año por este problema. Factores como el aire, superficies y utensilios contaminados y algunos ingredientes como nueves o especias, contribuyen ampliamente al desarrollo de especies de hongos, entre los cuales se encuentran *Eurotium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Monilia*, *Mucor*, *Endomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium* y *Rhizopus* (Coda, *et al.*, 2008). La contaminación por hongos es una de las más difíciles de erradicar debido a que se pueden contaminar tanto en el exterior como en el interior del producto. Las micotoxinas de los hongos filamentosos son especialmente dañinas para el consumidor, siendo causantes de intoxicaciones que pueden llegar a ser letales (Barbosa *et al.*, 2021). La contaminación por hongos se controla principalmente por la adición de sustancias conservadoras, principalmente ácidos orgánicos o sus sales. No obstante, estas sustancias pueden impartir algunas características organolépticas no deseables al producto terminado. Para resolver este problema, diversos estudios en los últimos años se han enfocado en la investigación de aditivos naturales para corregir este problema.

2.3 Películas y recubrimientos comestibles

Son sustancias producidas a partir de biopolímeros (proteínas, polisacáridos, lípidos ya sea solos o en combinación) y aditivos de grado alimentario. Los biopolímeros tienen múltiples mecanismos para formar las películas, incluyendo enlaces covalentes (puentes disulfuro y entrecruzamiento), fuerzas intramoleculares e interacciones iónicas o hidrofóbicas (Han, 2014). Se trata fundamentalmente de una matriz delgada que se aplica a los alimentos ya sea sumergiéndolos (recubrimientos) o preformándola en una lámina sólida y envolviendo el alimento con ella (películas). En un inicio, estas matrices se utilizaban como métodos de conservación en frutas y hortalizas, debido a que crean una barrera física a los gases, permitiendo modificar la atmósfera interna de la fruta y de esta manera retrasar la maduración y senescencia (Arredondo-Ochoa *et al.*, 2018). Sin embargo, algunos recubrimientos y películas son capaces de liberar de manera controlada agentes antimicrobianos, lo que llevó a nuevos estudios donde se analiza esta propiedad, extendiendo su uso a otros grupos de alimentos (Figura 1).



Figura 1. Funciones principales de los recubrimientos y películas comestibles. (Adaptado de Salgado *et al.*, 2015)

2.3.1 Composición de los recubrimientos (RC) y películas comestibles (PC)

Una película comestible (PC) es aquella matriz preformada que después se aplica al alimento, mientras que en un recubrimiento comestible (RC) el alimento se sumerge en la solución filmogénica (Hassan *et al.*, 2018). Los materiales principales que forman los RC o PC son los biopolímeros (polisacáridos, lípidos o resinas). Las propiedades de la solución resultante estarán directamente relacionadas con la composición química y física de los biopolímeros (Han, 2014). Dependiendo de la conformación de los mismos, los RC o PC se dividirán en tres categorías principales: a base de proteínas (vegetales o animales), hidrocoloides (polisacáridos), lípidos (Ácidos grasos, acilglicérols o ceras) o bien una mezcla de dos o más de los componentes antes mencionados (Valencia y Torres, 2016). Sin embargo, para que estos puedan continuar siendo comestibles, los únicos solventes permitidos son agua y etanol.

Las proteínas son los compuestos más comúnmente usados como formadores de películas, debido a características como su desnaturalización conformacional, cargas electrostáticas y naturaleza anfílica (Han, 2013). La estructura de las proteínas puede ser fácilmente modificada para obtener las características que se deseen, por medio de distintos métodos de desnaturalización. Las proteínas pueden ser obtenidas de distintas fuentes animales o vegetales.

En el grupo de polisacáridos se encuentran carbohidratos a base de almidón, hidrocoloides, fibras y otros carbohidratos no almidonosos. A diferencia de las proteínas, la conformación de películas a partir de polisacáridos suele resultar en estructuras más complicadas y de mayor peso molecular. Las principales fuerzas involucradas en este tipo de películas son los puentes de hidrógeno.

Los lípidos son compuestos biodegradables y cohesivos que poseen fases de transición dependiente de la temperatura, por lo cual son ampliamente moldeables. Además, al ser de naturaleza hidrofóbica, son añadidos a los RC para incrementar la resistencia de los mismos a la penetración de agua, ya sea en forma de emulsión o multicapas (Mohamed *et al.*, 2020).

2.3.2 Recubrimientos y películas comestibles con propiedades antimicrobianas

Las películas y recubrimientos comestibles que integran agentes antimicrobianos tienen como objetivo extender la fase lag, minimizando o suprimiendo el rito de crecimiento de los microorganismos (Navarro-Cruz *et al.*, 2018). Estos agentes antimicrobianos pueden ser incorporados a las matrices por distintas vías, dependiendo si son o no volátiles, dentro de los polímeros o en forma de capas absorbentes antimicrobianas unidos por enlaces iónicos o covalentes (Ortega-Toro *et al.*, 2016). La difusión de estos agentes antimicrobianos depende principalmente de la composición del recubrimiento y del alimento (almacenamiento, pH, actividad de agua). Diversos estudios han demostrado que los recubrimientos comestibles adicionados con agentes antimicrobianos se presentan como alternativas de empaque bio sustentables y como aditivos naturales. Entre los principales agentes antimicrobianos naturales que se agregan a este tipo de recubrimientos se incluyen enzimas antimicrobianas, bacteriocinas, aceites esenciales y compuestos fenólicos (Boyaci *et al.*, 2016).

Entre las principales aplicaciones de los RC y PC, se encuentra aquella en la que se diseña un recubrimiento capaz de controlar y liberar agentes antimicrobianos. Estos son incorporados al recubrimiento, principalmente para prolongar la vida de anaquel del mismo, disminuyendo la proliferación de agentes fúngicos y microbianos en la superficie del alimento. Se dividen principalmente en dos grupos, basados en su mecanismo de acción: el primero consiste en la migración de compuestos activos, que pasan parcial o totalmente al alimento o a la superficie y el segundo mediante mecanismos no migratorios, que contienen compuestos con actividad antimicrobiana en la superficie de la película (Vázquez-Briones y Guerrero-Beltrán, 2017). Estos agentes pueden elegirse dependiendo del tipo de microorganismo que afecte el alimento. Además, cuando se conoce la velocidad de difusión del antimicrobiano en el producto, se puede controlar la incorporación de otros agentes a la película, como colorantes, saborizantes o antioxidantes (Avila-Sosa *et al.*, 2012).

2.3.2.1 Quitosano

Se trata de un biopolímero no tóxico, producido mediante la desacetilación de quitina, conformado principalmente por unidades de β -(1-4)-2-acetamido-D-glucosa y β -(1-4)-2-amino-D-glucosa. Su potencial como conservador de origen natural ha sido ampliamente reportado en la literatura (Nguyen *et al.*, 2020; Tokatli *et al.*, 2020; Davoodi *et al.*, 2020). Las películas obtenidas con base en quitosano han demostrado tener una permeabilidad a ciertos gases (CO_2 y O_2), además de diversas propiedades mecánicas y antimicrobianas, sin embargo, son altamente permeables al agua. En la naturaleza, este compuesto se encuentra principalmente en las corazas de crustáceos como camarones y cangrejos.

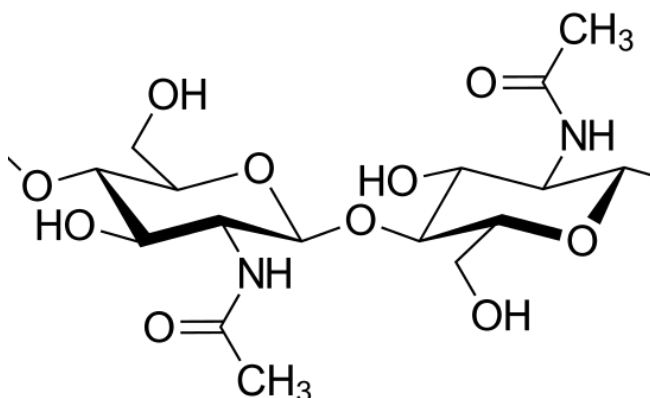


Figura 2. Estructura química del quitosano (adaptado de Sheikh *et al.*, 2013)

El grado de desacetilación del quitosano (sustitución de un grupo acetilo por un grupo amino) tiene mucha influencia en las características químicas del mismo. Además, el grado de desacetilación influye ampliamente en la capacidad antimicrobiana del quitosano (Hernandez-Téllez *et al.*, 2016). Esto se debe al mecanismo antimicrobiano del quitosano, el cual consiste en la interacción de cargas opuestas entre este y la membrana celular, alterando así la fuerza protón motriz de la célula, resultando en la interferencia de la síntesis de proteínas de la misma.

2.3.2.2 Proteína de quinua

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd), especie nativa de Sudamérica, producida principalmente en los andes de Bolivia y Perú, es una semilla presente en la dieta de las tribus nativas del continente desde antes de la conquista. Debido a esta amplia dispersión geográfica, tiene mucha importancia social y económica, ya que es un cultivo alternativo para países en vías de desarrollo. Tiene un alto contenido de proteína, que va en un rango del 12 al 23% (p/p), sus principales fracciones proteicas son albúminas y globulinas y su estructura es estabilizada por puentes disulfuro (Rojas *et al.*, 2011). La quinua se considera uno de los granos con valor nutricional más completo, debido a su alto contenido de proteínas (aproximadamente alrededor de 15%), vitaminas y minerales (Villacrés *et al.*, 2022).

La proteína de quinua ha sido utilizada en recubrimientos comestibles en algunos estudios, principalmente debido a que produce películas mecánicamente resistentes, aunque no del todo transparentes. Cuando se utiliza en combinación con el quitosano, con ácido láctico como solvente, la proteína muestra un efecto plastificante reduciendo los niveles de la fuerza de tensión, paralelamente aumentando la elongación de la misma, principalmente, debido a las interacciones iónicas y la formación de puentes de hidrogeno entre ambos compuestos.

2.3.2.3 Plastificantes

Son adicionados a los recubrimientos para mejorar su flexibilidad y funcionabilidad, consecuentemente, reduciendo su fragilidad. Los principales agentes utilizados son: glicerol, ácidos grasos, sorbitol, aceites y ceras. La reducción de la fragilidad de la película es debido a la interacción de los enlaces de hidrógeno de los polímeros formadores. Para la elección de un plastificante, se deben considerar tres aspectos principales: la compatibilidad plastificante-polímero, la eficiencia del plastificante y la permanencia del plastificante en los polímeros (Palma *et al.*, 2016).

Existen dos tipos de procesos de plastificación: externo e interno. El proceso interno modifica la cadena polimérica mediante la adición de un grupo (sustituyente) unido mediante un enlace covalente al polímero, desorganizando su estructura y

disminuyendo su rigidez. El proceso externo intercala el compuesto plastificante en la red polimérica, aumentando el volumen entre las cadenas.

Los plastificantes impactan principalmente en el comportamiento físico de la película o recubrimiento comestible (Jeevahan *et al.*, 2020). Los efectos de la adición de plastificantes en un recubrimiento o película comestible se evalúan principalmente en el comportamiento físico de los mismos.

2.3.2.4 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son compuestos volátiles naturales, extraídos de diferentes partes de plantas (flores, semillas, tallos, hojas, etc.), compuestos por estructuras de terpenos y compuestos fenólicos (Man *et al.*, 2019), los cuales han sido estudiados en los últimos años por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas, así como fungicidas. Destacan principalmente los aceites de orégano, canela, tomillo y hierba limón.

Matiacevich (2015), reporta que la mayoría de los aceites estudiados para aplicaciones en la industria alimenticia tienen baja solubilidad de agua, mientras que la mayoría de los polímeros formadores de películas (alginatos, quitosano, carrageninas, entre otros) son solubles en agua. Existe, pues, una incompatibilidad de fases entre los aceites esenciales y los polímeros, por lo cual se requiere de agentes emulsificantes para asegurarse que los aceites queden distribuidos por toda la película (Li *et al.*, 2020). Su mecanismo de acción se asocia con la capacidad de interactuar afectando la pared celular y membrana del patógeno, pero su modo de acción dependerá de cada compuesto (Shen *et al.*, 2021). Se pueden encontrar cuatro principales compuestos bioactivos en los aceites esenciales: terpenos, terpenoides, fenilopropenos, compuestos fenólicos y otros.

Los aceites esenciales han sido comúnmente utilizados en productos de panificación, principalmente por los agradables olores y sabores que confieren al alimento y sus propiedades antimicrobianas han sido ampliamente reportadas en la literatura. Hu *et al.*, (2019), en un estudio de diferentes aceites esenciales, concluyen que los aceites esenciales de canela, anís, citronella, menta, clavo y

pimienta demuestran cierto nivel de propiedades antifúngicas contra algunos hongos. Debido a su naturaleza, lipofílica, pueden atravesar la membrana citoplasmática, causando lesiones en la misma y una reducción de ergosterol (componente principal de las membranas celulares de hongos), inhibiendo su crecimiento y extendiendo la vida de anaquel del producto (Debonne *et al.*, 2018) (Figura 3).

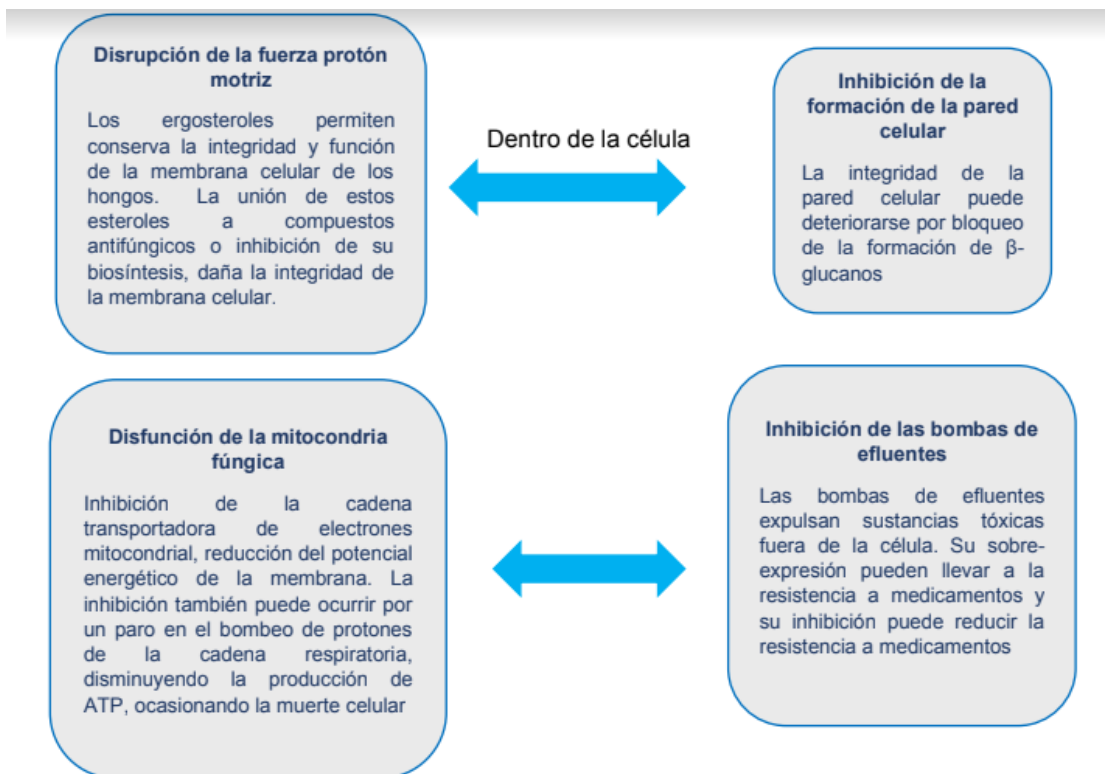


Figura 3. Actividad antifúngica de los aceites esenciales (adaptado de Nazzaro *et al.*, 2017)

El estudio de aceites esenciales como agentes antimicrobianos para ser añadidos a películas o recubrimientos se ha convertido en una grande área de oportunidad, al presentar una alternativa a los aditivos convencionales.

2.3.2.4.1 Aceite esencial de hierba limón

La hierba limón (*Cymbopogon citratus*) también conocida como té de limón o lemongrass, es una hierba perene perteneciente a la familia de las *Poaceae*. Es

ampliamente utilizado en Asia, África y América Latina en infusiones y alimentos debido a su sabor a limón y a que posee propiedades antisépticas, antibacterianas, desodorantes y estimulantes.

El aceite esencial de hierba limón es caracterizado por su contenido de monoterpenos, siendo el de mayor presencia el citral (niveles del 65-85%) (Figura 4), el cual a su vez es una mezcla de dos terpenos (geranial y neral) (Majewska *et al.*, 2019) el cual es el principal agente antifúngico y antimicrobiano de este aceite. Un tercer compuesto antifúngico reportado en la literatura es el mirceno. Se considera que su mecanismo de acción se basa en la ruptura de la membrana celular y cambios en la estructura mitocondrial (Lee *et al.*, 2020). El aceite esencial de hierba limón ha sido probado con distintos microorganismos, entre los que destacan *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *S.aureus*, *Salmonella enterica sbsp. paratyphi* y *Shigella flexneri*, obteniendo resultados antibacteriales positivos (Bermúdez-Vasquez *et al.*, 2019).

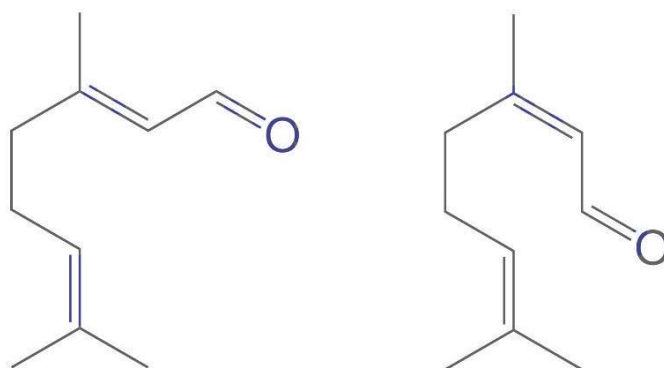


Figura 4. Estructura química del citral (adaptado de Silva et al., 2008)

2.3.2.4.2 Aceite esencial de canela

La canela (*Cinnamomun verum*) es una especia perteneciente a la familia de las *Lauraceae*, del género *Cinnamomum*, con orígenes en Sri Lanka, aunque es igualmente cultivado en India, el sur de Asia y otras zonas del mundo. Ingrediente codiciado, utilizado en cocina y por sus propiedades curativas, como agente antiinflamatorio, antioxidante, nutraceutico, etc. El aceite esencial obtenido de esta especie se conforma principalmente de cinamaldehído y eugenol (Denkova-Kostova

et al., 2021), componentes que, de acuerdo con estudios, alteran la permeabilidad y fluidez de la membrana celular, inhibiendo la formación de biopelículas (Zhang *et al.*, 2016).

El mayor constituyente del aceite esencial de canela (90%), el cinamaldehído (Figura 5) es el compuesto responsable del sabor y olor característico de la canela. Se trata de un líquido de color amarillo pálido y viscoso, de manera natural se encuentra en forma de *trans*-cinamaldehído. Afecta directamente a la membrana, incrementando el grosor de la pared celular, lo cual se atribuye a la inhibición de la β -1-3-glucano sintasa.

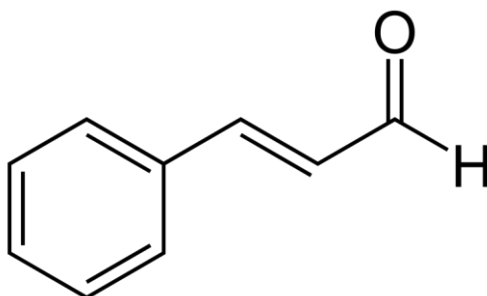


Figura 5. Estructura química del cinamaldehído (adaptado de Mahmoodnia *et al.*, 2017)

2.3.2.4.3 Aceites esenciales de mezclas de hierba limón y canela

La mayoría de los aceites esenciales tienen acción antimicrobiana y antifúngica por sí solos, debido a los compuestos bioactivos que contienen. La combinación de dos o más aceites esenciales puede tener mayores efectos de inhibición bacteriana y fúngica, debido a que los aceites pueden atacar de manera simultánea distintas partes de la célula. Los aceites esenciales de hierba limón y canela han reportado

Figura 5. Estructura química del cinamaldehído (adaptado de Mahmoodnia *et al.*, 2017) mismos.

Loeffler *et al.*, (2014), reportaron que el uso de una emulsión de cinamaldehído y el citral inhibió el crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* en jugo de manzana, mientras que Wang *et al.*, (2018) mencionan que estos compuestos demuestran cierta inhibición sobre *Penicillium expansum*. De acuerdo con los resultados de estos autores, el modo de acción de estos compuestos radica en las características

lipofílicas de los aceites esenciales, las cuales causan cambios en la permeabilidad de la membrana (provocando a su vez la pérdida de sustancias intracelulares), además de causar arrugas y hundimientos en la superficie de las células.

El citral y el cinamaldehído podrían ofrecer efectos contra la acción de hongos (Figura 6). El cinamaldehído ha sido reportado como inhibidor de las especies *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides*, *A. ochraceus* y de bacterias como *E. coli* y *S. aureus* (Hua *et al.*, 2014; Xing *et al.*, 2014, Sun *et al.*, 2016; Tian *et al.*, 2016), causándoles daño celular.

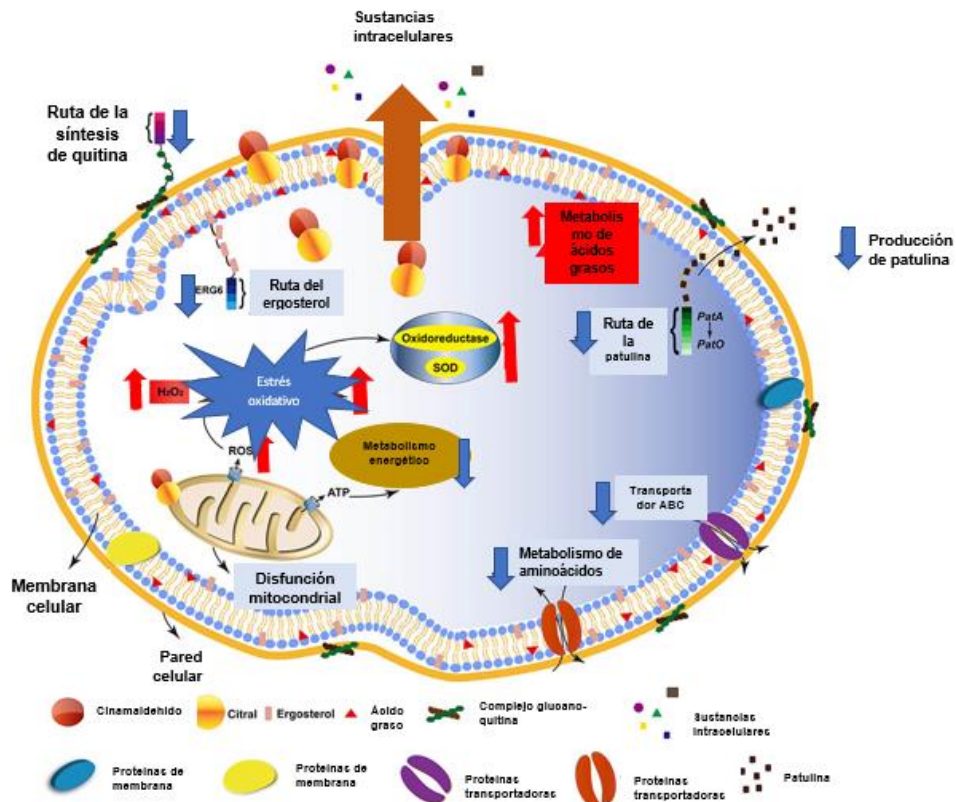


Figura 6. Mecanismo de acción del cinamaldehído y el citral en la membrana celular (adaptado de Wang *et al.*, 2018). Las flechas azules indican la inhibición o disminución de la producción de compuestos, las flechas rojas aumento. La flecha naranja indica la salida de sustancias intracelulares por daño a la membrana.

2.4 Partículas de sílice mesoporosa

Los aceites esenciales son encapsulados con el objetivo de impedir su pérdida, para protegerlos de la reacción con otros compuestos presentes en el medio, o para impedir que sufran reacciones de oxidación debido a la luz o al oxígeno (Cadena *et*

al., 2018). Entre los principales métodos de encapsulación para aceites esenciales, se encuentran las arcillas, fibras, liposomas, emulsiones y partículas de sílice mesoporosa (MSN). Estas partículas están formadas por dióxido de silicio (SiO_2), con un tamaño de pocos nanómetros hasta micrómetros, que contienen una estructura porosa (Figura 7) que permite almacenar compuestos en su interior. Pueden ser sintetizadas fácilmente a grandes escalas por medio de diversas estrategias. Son inertes, biodegradables y presentan una buena biodistribución, además de ser fácilmente sintetizables, pudiéndose obtener de distintas formas y tamaños (Lliás y Sánchez-García, 2014).

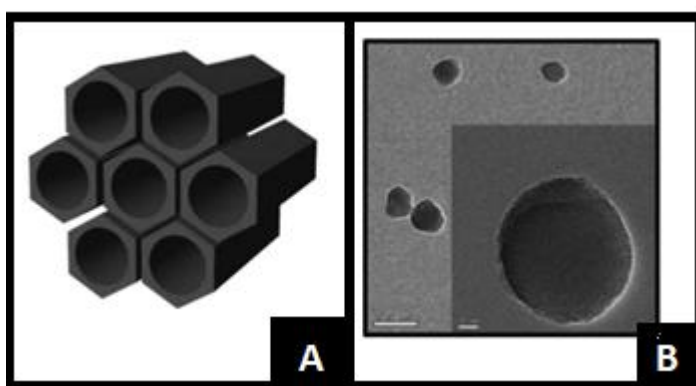


Figura 7. Representación esquemática de una partícula de sílice mesoporosa (a) y su micrografía realizada mediante microscopía electrónica de transmisión (b) (adaptado de Llinàs y Sánchez-García, 2014)

El uso de las NSM adicionadas con aceites esenciales para la formación de películas y recubrimientos comestibles han demostrado tener buenos resultados en el producto obtenido, ya que producen películas con baja resistencia a la tensión, elongación y valores bajos de permeabilidad al CO_2 y H_2O (Ríos de Benito *et al.*, 2021).

2.5 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de bacterias que fermentan azúcares como glucosa y lactosa para producir ácido láctico. Incluyen microorganismos aerobios, anaerobios y anaerobios facultativos. Se trata de bacterias Gram positivas, no formadoras de esporas. Se dividen principalmente en

homo y heterofermentativas: las primeras producen últimamente ácido láctico, mientras que las segundas producen ácido láctico, ácido acético, etanol y bacteriocinas. Por esto último han sido utilizadas como agentes conservantes, extendiendo la vida de anaquel de los productos, debido a su papel en los procesos de fermentación en alimentos como lácteos, carnes, vegetales y productos de panificación. Su estatus ante la FDA aparece como “generalmente reconocida como segura” (GRAS), mientras que la Unión Europea les da la “presunción calificada de seguridad”.

Existen tres mecanismos principales que pueden explicar la eficiencia antimicrobiana y antifúngica de las BAL: la producción de ácidos orgánicos, competencia por nutrientes y producción de compuestos antagonistas (Kareb y Aïder, (2020). En cuanto a los mecanismos específicos de acción, Kong *et al.*, (2020) proponen la modulación de la respuesta inmune del sistema celular. Estos mecanismos dependen de diversos factores, como el tiempo, temperatura, pH y medio.

2.5.1 Metabolitos de las BAL con propiedades antifúngicas

Las bacterias ácido lácticas están consideradas como potenciales conservadores naturales por todas las propiedades antifúngicas y antimicrobianas que contienen (Tabla 1). Se utilizan en la industria en productos lácteos, de panificación y en algunas bebidas fermentadas, con el fin de promover la bioconservación.

Tabla 1. Descripción de los metabolitos de las LAB con propiedades antifúngicas

Metabolito	Descripción
Ácidos orgánicos	Considerados los metabolitos principales en las LAB que son los que más afectan el crecimiento microbiano (Sadiq et al., 2019). Se disocian rápidamente en la membrana celular del hongo y se acumulan en el citoplasma. Los mayormente producidos por las LAB, son ácidos láctico, propiónicos, y el más efectivo: ácido acético (Quattrini et al., 2018).
Ácido fenilacético	Muestra propiedades bactericidas y fungicidas (Coda et al., 2011). Se sintetiza por transaminación de fenilalanina con cetoglutarato, para dar ácido fenilpiruvico (PPA), que mediante reducción, se convierte en ácido fenilacético (Chaudhari y Gokhale, 2016).

Reuterina	Producido por <i>Lactobacillus reuteri</i> . Inhibe el crecimiento de algunas bacterias Gram positivas y negativas, así como algunos hongos. Se forma durante el metabolismo del glicerol a 1,3-propanodiol catalizado por la coenzima B12 (Martín-Cabrejas et al., 2017).
Ácidos grasos	Poseen propiedades antibacteriales y antifúngicas, asociado a la longitud de la cadena de los ácidos grasos. Su mecanismo de acción se relaciona con el rompimiento de la integridad de la membrana, aumentando la fluidez de la misma (Nasrollahzadeh et al., 2022)
Péptidos	Existen diferentes péptidos antimicrobianos del tipo bacteriocinas producidas por la LAB destacando la nisina producida por <i>L. lactis</i> ssp <i>lactis</i> y la pediocina producida por <i>P. acidilactici</i> (Song et al., 2021) <i>Lactobacillus</i> es especialmente eficaz como antimicrobiano y antifúngico

Las bacterias ácido lácticas son especialmente valoradas por sus múltiples mecanismos de acción en contra de microorganismos patógenos (Figura 8), promoviendo la bioconservación, aunque algunos de estos mecanismos no han sido explorados del todo.

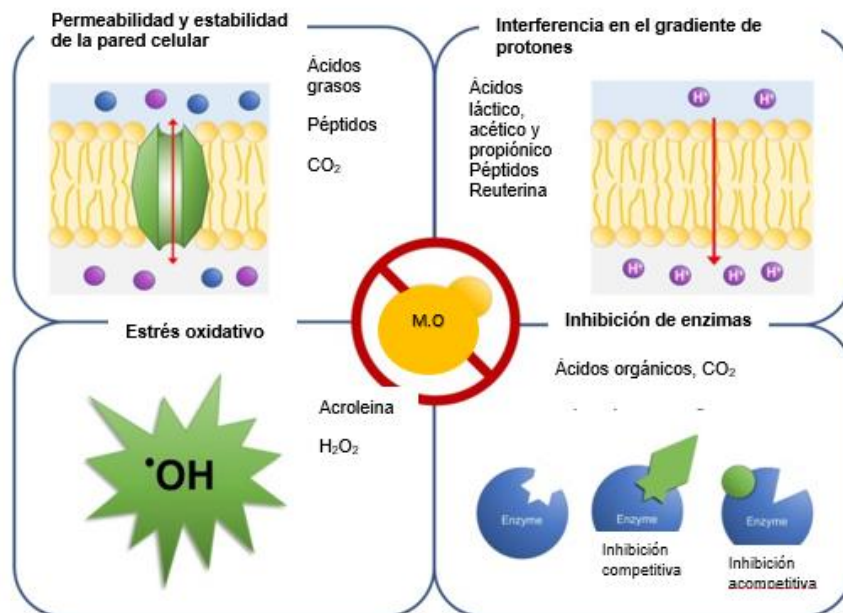


Figura 8. Mecanismos de inhibición de las bacterias ácido lácticas (adaptado de Siedler et al., 2019)

2.5.2 Encapsulación de bacterias ácido lácticas (BAL)

En las últimas décadas, el uso y optimización de BAL ha ido tomando importancia en la industria de los alimentos, principalmente en la formulación de nuevos cultivos iniciadores para alimentos fermentados, principalmente para mejorar sus características nutricionales y sensoriales. El principal reto a considerar es el mantenimiento y viabilidad del mismo, en especial la producción de aquellos compuestos antimicrobianos asociados a su crecimiento. Como solución a este reto, se ha propuesto la encapsulación de las células viables para protección de las mismas (Haffner *et al.*, 2017). La fermentación usando cultivos iniciadores encapsulados ofrece numerosas ventajas en comparación con los cultivos tradicionales: rapidez en la fermentación, aumento en la densidad celular, aumento en la tolerancia a altas temperaturas.

El proceso de encapsulación consiste en la captura de la sustancia activa dentro de otra sustancia, la cual actúa como una barrera de la sustancia activa dentro de otra sustancia, que actúa como una barrera la cual producirá partículas en diversas escalas. Los tipos de encapsulación pueden clasificarse por tamaño (macro encapsulación, de milímetros a centímetros y micro encapsulación, en nanómetros, Petraitytė y Šipailienė, 2019) o por el equipo utilizado: extrusión, emulsión y secado por aspersión.

2.5.2.1 Secado por aspersión

Técnica utilizada para obtener capsulas de menos de 40 μm . Los principales compuestos utilizados en esta técnica son polisacáridos, lípidos y proteínas. El proceso consta de la atomización del material acarreador homogeneizado dentro de un sistema de aire caliente, lo cual resulta en capsulas secas. Este método (Figura 9) es el más rápido, de bajo costo y altamente reproducible, aunque debe usar altas temperaturas

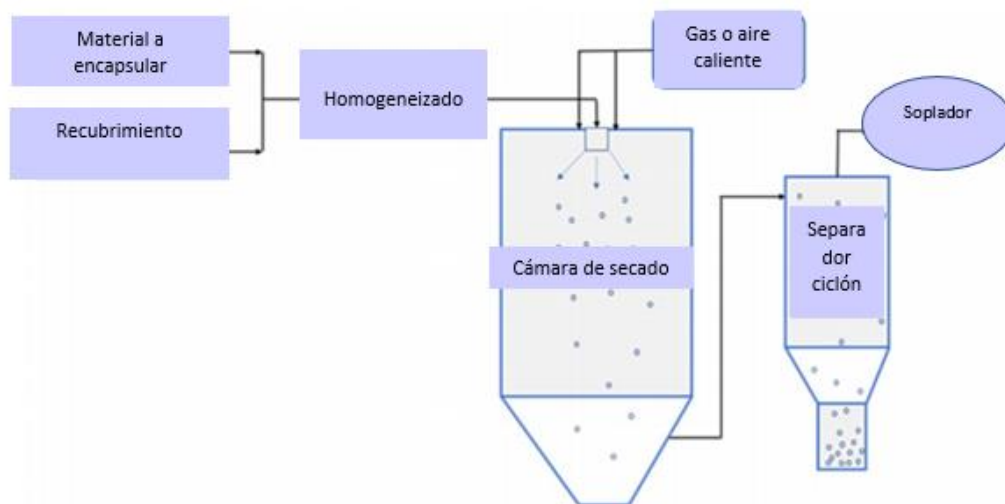


Figura 9. Representación esquemática del método de encapsulado por secado por aspersión (adaptado de Kavitate et al., 2018)

Los principales agentes encapsulantes incluyen alginatos, hidrocoloides, almidones (y sus derivados) y proteínas de la leche. Para las BAL, diversos estudios han probado su estabilidad y beneficios al momento de ser encapsuladas, siendo el principal el aumento de su viabilidad.

La microencapsulación de las bacterias ácido lácticas tiene como fin frenar la pérdida o daño celular y controlar la liberación de las mismas (Frakolaki *et al.*, 2020). La viabilidad sobre el uso de bacterias ácido lácticas microencapsuladas para productos de panificación fue reportada por Seyedain-Ardabili *et al.*, (2016), quienes en sus conclusiones mencionan el incremento de viabilidad y resistencia térmica de las bacterias ácido lácticas microencapsuladas sin tener efectos adversos en la textura y sabor del pan.

2.6 Masa madre del pan

El pan de masa madre es un alimento consumido a nivel mundial, también conocido en francés como “levain” y en inglés como “sourdough”. Tradicionalmente, se compone de la harina de algún cereal (o pseudocereal), agua, sal y algún agente

leudante. Los principales agentes usados son los químicos, levadura comercial y masa madre. Esta última es utilizada principalmente en panadería tradicional, se trata de una mezcla de harina, agua y otros ingredientes, fermentada de manera natural usando bacterias ácido lácticas y levaduras, quienes se propagan durante la fermentación mediante un proceso en el cual la masa madre del ciclo de fermentación previo es usado como iniciador para fermentar una nueva mezcla de harina y agua (Canesin y Cazarin, 2021). Aunque este tipo de pan es consumido principalmente en Europa, en los últimos años se ha producido un aumento en la demanda de consumo de este alimento a nivel mundial (Global Sourdough Market, 2019-2025). Este alimento ha sido recomendado, no solo por su sabor debido a procesos de hidrólisis y compuestos generados en la reacción de Maillard durante el proceso de horneado, sino por el alto valor nutricional que contiene (Rizzello *et al.*, 2017). La masa madre reduce el pH del producto terminado, lo cual induce a la inhibición del desarrollo microbiano y a la descomposición del almidón durante la fermentación ácido láctica (Fernández-Peláez *et al.*, 2020).

2.6.1 Microbiología de la masa madre: la importancia de las BAL

Las BAL tienen el potencial para actuar como compuestos bioactivos en la masa del pan, debido a sus diversas propiedades, ya que se involucran en el fenómeno conocido como “bioconservación”, concepto que se refiere a la extensión de la vida útil del alimento empleando ya sea la microbiota natural o los metabolitos del mismo).

Diversos estudios han reportado la capacidad de las BAL para actuar como conservadores naturales. Sadiq *et al.*, (2019) proponen la posibilidad de mezclar dos diferentes productores de propionato, *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus diolivorans* como forma de conservar productos de panificación. Sus resultados reportan una inhibición de hongos de las familias de *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mortierella* y *Penicillium* hasta por 12 días. Coda *et al.*, (2011) evaluaron las propiedades antifúngicas de *Lactobacillus plantarum* (*Wickerhamomyces anomalus* LCF1695) en masas madres, encontrando en los extractos acuosos péptidos

antifúngicos, etanol y etilacetato. El pan elaborado con esos microorganismos controló la contaminación por hongos hasta por 28 días de almacenamiento.

2.6.2 El pan de masa madre en México: producción, consumo y normatividad

En México, en los últimos 50 años fueron creadas 46 empresas del rubro de panificación, compitiendo con las ya existentes 34 mil empresas de panadería tradicional en la República. Según datos de la Asociación Nacional de Proveedores Profesionales de la Industria del Pan, Repostería y Similares A.C (ANPROPAN), para 2015, la venta de pan blanco y dulce dejó una derrama económica de 116 mil 200 millones de pesos anuales. La importancia de pan en el país es tal que incluso se encuentra como parte de la canasta básica de alimentación.

Como otros bienes, servicios y productos en el país, los productos de panificación se rigen bajo las normas oficiales mexicanas (NOM), específicamente en la NOM-147-SSA1-1996. Las especificaciones más importantes a considerar en el producto terminado son las especificaciones sanitarias (Tabla 2).

Tabla 2. Límites máximos de microorganismos para pan de acuerdo con la NOM-147-SSA1-1996

Especificaciones	Límite Máximo
Mesofílicos aerobios	1000 UFC/g
Coliformes totales	<10 UFC/g
Mohos	20 UFC/g
Levaduras	20UFC/g

3 JUSTIFICACION

Las nuevas tendencias alimentarias se inclinan cada vez más hacia productos lo más naturales posibles, pero que al mismo tiempo tengan una vida de anaquel duradera, al mismo tiempo que las nuevas tendencias de consumo demandan que se produzcan cada vez más alimentos con estilo casero, entre los que se encuentra el pan elaborado con masa madre. Para la industria de la panificación constituye un reto elaborar productos que satisfagan las recientes demandas de los consumidores, debido a que los panes son una fuente rica de carbohidratos y lípidos, lo que propicia el crecimiento de diversos hongos (*Aspergillus*, *Penicillium*, etc.) y otros microorganismos deterioradores, tanto en el interior como en el exterior del producto. De acuerdo a datos de la FAO, se estima que cada año se pierden o desperdician 28 millones de toneladas de alimentos en México, con el pan blanco representando el 43.1% de este total. El uso de películas y recubrimientos comestibles constituyen una posible solución para la conservación durante el almacenamiento de los productos panaderos, cuando se les adicionan componentes antimicrobianos pueden actuar como una barrera protectora al producto a nivel superficial o de corteza, sin embargo, no existe garantía de inhibir el crecimiento de hongos al interior de los productos, ya que su presencia es atribuida a la falta de prácticas de inocuidad en el procesamiento. Debido a lo anterior, es posible la incorporación de bacterias ácido-lácticas durante la preparación de la masa madre, ya que su presencia le puede conferir a la masa propiedades contra hongos y bacterias y favorecer las propiedades reológicas, actuando, por tanto, como conservantes naturales.-Por lo tanto, en el presente trabajo se busca desarrollar un sistema de conservación integral en el pan, mediante la utilización de principios activos naturales aplicados en la corteza en forma de recubrimiento comestible y la incorporación de bacterias ácido lácticas al interior del producto.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Desarrollar un sistema de bioconservación integral para extender la vida útil de pan artesanal con una bacteria ácido-lácticas microencapsulada y la aplicación de un recubrimiento comestible adicionado de aceites esenciales de hierba limón-canela inmovilizados en partículas de sílice mesoporosa.

4.2 Objetivos específicos

- Definir los parámetros para mejorar el rendimiento en la obtención de aceites esenciales de hierba limón y canela por medio de destilación por arrastre de vapor
- Obtener la concentración mínima fungicida (CMF) de cada aceite esencial y de sus mezclas binarias mediante la elaboración de un isoblograma
- Sintetizar partículas de sílice mesoporosa y evaluar la capacidad antifúngica de los aceites esenciales encapsulados en las mismas
- Realizar un recubrimiento comestible hecho de proteína de quinoa y quitosano, adicionado con aceites esenciales de hierba limón y canela encapsulados en partículas de sílice mesoporosa y evaluar sus propiedades mecánicas, efecto barrera y efecto antifúngico
- Encapsular la bacteria ácido láctica *L. lactis* NRRL B-50307 por medio de secado por aspersión
- Aplicar el recubrimiento comestible en un pan de masa madre adicionado con la bacteria láctica microencapsulada y evaluar su impacto en la vida de anaquel del mismo, así como sus propiedades organolépticas y de textura.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

El quitosano (375 kDa, con un nivel de desacetilación de $\geq 75\%$ y alto grado de pureza) y el ácido láctico fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). La quinoa (*Chenopodium quinoa*) fue obtenida de Las Balsas (Perú). La canela (*Cinnamomum zeylanicum*) fue obtenida de la Central de Abastos de Irapuato, Guanajuato (País de origen: Sri Lanka). La hierba de limón (*Cymbopogon citratus*) fue obtenida del Mercado Josefa Ortiz de Domínguez “La Cruz”, Santiago de Querétaro, Querétaro, México. Agar bacteriológico, peptona bacteriológica, sulfato magnésico, fosfato de potasio, dextrosa, rosa bengala, caldo papa-dextrosa (CPD), medio M17, lactosa, agar PBC fueron obtenidos de Bioxon (CDMX, México). *L. lactis* NRRL B-50307 es una bacteria láctica productora de nisina y fue depositada con fines de patente por la Dra. Blanca García.

5.2 Métodos

5.2.1 Extracción del aceite esencial de hierba limón

El aceite esencial de hierba limón (AEL) se obtuvo por medio de destilación por arrastre de vapor, utilizando el hidrodestilador UAQ-001 (Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México). Se usaron 300 g del material fresco en 5 L de agua destilada, durante un tiempo de 2 h. La capa oleosa del destilado obtenido se secó con sulfato de sodio anhidro (Hach Company, Loveland, CO, USA). El AEL se esterilizó por filtración mediante el uso de una unidad Swinnex con membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF, Millipore, Burlington, MA, EE. UU.) de tamaño de poro de 0.45 μm y se almacenó en viales protegidos de la luz a 4 °C hasta su posterior uso (Hernández-Hernández et al., 2014).

5.2.2 Extracción del aceite esencial de canela

La canela fue sometida a un pre tratamiento de sonicación en un procesador ultrasónico VCX 500 (Sonics Materials, Newtown, CT, USA). Los parámetros del proceso fueron: 100 g de materia prima/L de agua destilada, 70% de amplitud, pulsos de 27 s:33 s (prendido:apagado), por 10 min. Una vez terminado el proceso,

se colectó el agua usada en el mismo para su posterior uso en el proceso de destilación. Para el mismo, se usaron 300 g del material sonicado en 5 L de agua destilada en un tiempo de 3 h, utilizando un hidroddestilador UAQ-001. La capa oleosa del destilado obtenido se secó con sulfato de sodio anhidro (Hach Company, Loveland, CO, USA). El AEL se esterilizó por filtración con uso de una unidad Swinnex con membrana de PVDF (Millipore) de tamaño de poro de 0.45 μm y se almacenó en viales protegidos de la luz a 4 °C para su posterior uso (Hernández-Hernández et al., 2014).

5.2.3 Determinación de la concentración mínima fungicida (CMF), concentración inhibitoria fraccional (CIF) e índice fraccional inhibitorio (FIC) de los aceites esenciales

Rhizopus nigricans (o *stolonifer*), también conocido como “moho negro del pan”, crece rápidamente y se propaga a través de los estolones (los cuales proporcionan una estructura aérea para el crecimiento del micelio, facilitando la ocupación de grandes áreas). Estas características impiden su crecimiento de forma radial, por lo cual se decidió utilizar el método de la norma ISO 21527, para la determinación de su población viable. Para la concentración mínima fungicida (concentración del agente o solución que disminuye en 99.9% el crecimiento del hongo a partir de un inóculo de subcultivo puro; Luz et al., 2020) se inocularon 100 μL de solución de esporas de *R. nigricans* (concentración final 10^5 UFC/mL) a 900 μL de caldo papa dextrosa (Bioxon, CDMX, México). Después, se agregaron las distintas concentraciones de aceite esencial (0.1-0.5 mg/mL para el aceite esencial de canela, 0.5-2.5 mg/mL para el aceite esencial de té de limón) (Manso et al., 2013). Los inóculos se dejaron 24 h en agitación, a 28°C. Una vez pasado ese tiempo, se tomaron 100 μL del inóculo y se sembraron por extensión en superficie con un asa estéril en agar rosa de bengala (RBC) suplementado con cloranfenicol (concentración final 0.1%, p/v). Las cajas Petri fueron incubadas a 28°C, el recuento de colonias viables se hizo a las 24 h. Se consideró la concentración mínima fungicida (CMF) aquella donde ya no se observó ningún tipo de crecimiento en las placas (Arredondo-Ochoa, 2019).

Una vez obtenidas las concentraciones mínimas fungicidas se analizó el efecto combinado, para explorar la posibilidad de usar menos cantidades de aceite que las mínimas fungicidas. Se realizó un isoblograma, que consiste en una gráfica en coordenadas rectangulares de pares de dosis o concentraciones de las sustancias respectivas que producen un nivel determinado de efecto (por ejemplo 100 % del efecto) cuando se aplican en forma conjunta (Chou, 2022).

El reto antimicrobiano se llevó a cabo siguiendo la misma metodología que en la sección 5.2.3, donde la CMF de cada aceite fueron los límites máximos de los cuales se partió. Fracciones de un aceite se probaron en mezcla con concentraciones variables del otro antimicrobiano, hasta obtener la concentración mínima que logró la inhibición completa.

5.2.4 Síntesis de partículas de sílice mesoporosa

Se preparó una solución de 240 mL de agua destilada y 1.75 mL de NaOH 2 N y 0.5 g de bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) (Illinois Tool Works, IL, EE. UU.) como el agente surfactante generador de poros. La mezcla se dispersó mediante un baño ultrasónico (Baño ultrasónico 8892, VelaQuin, CDMX, México) a temperatura ambiente, durante 5 min. La suspensión se calentó a 80°C en agitación constante (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y después se adicionaron 2.5 mL de tetraetil ortosilicato (TeOS, precursor de sílice) gota a gota por medio de un embudo de separación durante 5 min, después se dejó en agitación continua durante 2 h. El resultante sólido se separó por medio de filtración y se lavó con etanol absoluto (EtOH) (J. T. Baker, Waltham, MA, EE. UU.), dos veces, después se secó a temperatura ambiente. El polvo resultante se calcinó en una mufla a 500 °C durante 5 h. Para la funcionalización de las partículas, 5.85 mL de 3-aminopropiltrióxido de silano (APTES) se añadieron a 6 mL de EtOH. A la solución se le agregaron 0.5 g de partículas y se dejó en agitación toda la noche. La solución después fue filtrada dos veces con EtOH y las partículas recolectadas y secadas a temperatura ambiente (Ríos de Benito *et al.*, 2021). Una vez sintetizadas y cargadas con aceite, las partículas fueron llevadas a análisis por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM).

5.2.5 Incorporación de los aceites esenciales a las partículas de sílice mesoporosa (NSM)

Se agregó una relación 1:1 (p/p) de partículas de sílice mesoporosa (NSM):aceite esencial de canela o hierba limón, según correspondiera. Se les agregaron 5 mL de EtOH y se dejaron en agitación en campana de flujo laminar por 12 h. Una vez pasado este tiempo, se recolectaron las partículas y se resguardaron a temperatura ambiente en frascos cerrados hasta su posterior uso (Fernandez-Bats *et al.*, 2018).

5.2.6 Actividad antifúngica de los aceites esenciales encapsulados

Para evaluar la actividad antifúngica de los aceites esenciales, se realizó una emulsión de las NSM cargadas de aceite esencial (5% Tween 80, 5% Tween 20 (p/v), partículas y agua destilada); se llevó a baño de sonicación por 5 min.

En placas de agar papa dextrosa, se realizó una siembra por extensión en superficie de solución de esporas de *R. nigricans* (concentración final 10^6 esporas/mL). Membranas de papel filtro de 15 mm de diámetro fueron impregnadas con la emulsión de partículas cargadas con aceite esencial (concentración: 12% de aceite esencial, p/p?) y después colocadas en el centro de las placas Petri. Se incubaron a 28°C y se observaron los halos de inhibición después de 24 h (Fernandez-Bats *et al.*, 2018).

5.2.7 Diseño experimental para la elaboración de los RC

Se realizó un diseño factorial completo 2^2 con tres réplicas, con tratamientos aleatorizados. Los factores a evaluar fueron la mezcla de proteína de quinoa:quitosano (PQ:QT) y la relación de las NSM cargadas con aceite esencial de hierba limón (AEL) y de canela (AEC). Cada factor se evaluó en dos niveles, la relación PQ:QT fue de 1:4 y 1:9 (p/p) y la de AEL:AEC fue 1:1 y 2:1 (p/p) (Tabla 3), considerando los experimentos sin aceite esencial, resultaron un total de 10 tratamientos (Tabla 4).

Tabla 3. Factores y niveles en el diseño experimental

Factor	Nivel	
Relación proteína quinoa-quitosano	1:4	1:9
Relación aceite esencial canela- aceite esencial limón	1:1	1:2

Tabla 4. Diseño experimental

Tratamiento	PQ:QT	AEC-AEL
T1	1:4	--
T2	1:4	1:1
T3	1:4	1:1
T4	1:4	1:2
T5	1:4	1:2
T6	1:9	--
T7	1:9	1:1
T8	1:9	1:1
T9	1:9	1:2
T10	1:9	1:2

Las variables respuesta fueron: propiedades mecánicas, fisicoquímicas, antifúngicas, de permeabilidad, índice de polidispersión, potencial ζ y tamaño de partícula.

5.2.7.1 Extracción de la proteína de quinoa

Las semillas de quinoa fueron trituradas con un molino de café Krups (CDMX, México) hasta obtener harina, la cual después fue suspendida en agua destilada (relación 1:10 PQ:agua). Se ajustó el pH a 11 durante 1 h para la solubilización de las proteínas, pasado ese tiempo la solución se filtró y el filtrado se sometió a centrifugación a 4000 rpm (equivale a 2,580 x g) durante 20 min a 4°C en una centrífuga Avanti J 301 (Beckman, CA, EE. UU.) se colectó el sobrenadante, el cual fue ajustado a pH 4.5 para la precipitación de las proteínas, durante 30 min. La solución fue centrifugada nuevamente. Se recuperó el precipitado y se colocó en un

horno a 50°C para su secado, para luego mediante el método Kjeldahl determinar el contenido de proteína (Nx6.25) (Sandoval, 2021).

5.2.7.2 Preparación de las soluciones filmogénicas

Las proporciones de proteína de quinoa (PQ) y quitosano (QT) fueron PQ:QT 4:1 y 9:1 (p/p). La solución de QT fue preparada al 2% (p/v), añadiendo ácido láctico al 0.5% (p/v), manteniéndose en agitación hasta la completa disolución del quitosano. La solución de PQ se preparó al 1% (p/v), ajustando el pH a 11 para la solubilización de la misma, manteniéndose en agitación durante 1 h; pasado ese tiempo, ambas soluciones se mezclaron y se ajustó el pH a 4, dejando en agitación durante 40 min. Posteriormente, se añadieron los aceites esenciales encapsulados en las NSM o en emulsiones con Tween 80 en relaciones 1:1 y 2:1 (p/v) (AEL y AEC). Todos los tratamientos fueron homogeneizados durante 3 min a 9500 rpm en un homogeneizador de alta velocidad (IKA T25-Ultra-Turrax, Wilmington, DE, USA). Posteriormente, se redujo el tamaño de partícula mediante un sonicador de alta intensidad (Sonics, CT, EE. UU.), utilizando una sonda de 3 mm de diámetro (Vibra-Cell VCX 500, Newtown, CT, EE. UU.). Se utilizaron tres periodos de 1.5 min, con intervalos de 5 minutos en cada periodo con una amplitud de 70%.

Una vez obtenidas las soluciones, por medio del método de vertido, se vaciaron los tratamientos en cajas Petri, y fueron llevados a un horno durante 12 h a 36°C (Ríos de Benito *et al.*, 2021).

5.2.8 Determinación de las propiedades del recubrimiento

5.2.8.1 Potencial ζ , tamaño de partícula e índice de polidispersión

El tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial ζ de las soluciones filmogénicas fueron medidas con un Zetasizer Nano ZS (ZEN 3600 Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Cada medición se realizó por triplicado en cada muestra (1 mL por muestra). Todas las mediciones se realizaron por triplicado, aplicando un voltaje de 200 mV. El potencial ζ se calculó utilizando la ecuación de Henry y Smoluchowski (Duca *et al.*, 2019).

5.2.8.2 Espesor

Se elaboraron PC mediante el método de vertido siguiendo la metodología previamente establecida en la sección 5.2.7. El espesor se midió con un micrómetro digital marca Mitutoyo (Kanagawa, Japón), realizándose 10 mediciones aleatorias en cada película, expresándose el espesor como el promedio de dichas mediciones \pm desviación estándar (DE) (Giosafatto *et al.*, 2014).

5.2.8.3 Solubilidad

Se determinó el peso de materia seca inicial de las PC, secadas a 60°C por 24 h. Posteriormente, cada PC se pesó y fue colocada en tubos Falcon y 50 mL de agua destilada. Los tratamientos fueron colocados en una incubadora con agitación orbital y se agitaron a 180 rpm durante 24 h, a 25°C. Posteriormente, las PC fueron filtradas y secadas a 60°C por 24 h (Silva *et al.*, 2019). La solubilidad se reportó en forma de porcentaje (%), siguiendo la ecuación (1):

$$\text{Solubilidad (\%)} = \frac{(\text{Peso seco inicial (g)} - \text{Peso seco final (g)})}{\text{Peso seco inicial (g)}} \times 100 \quad (1)$$

5.2.8.4 Color y opacidad

Se usó un colorímetro portátil NR60CP (Shenzen, China). Los parámetros evaluados fueron la luminosidad (L^* blanco a negro), el espectro verde a rojo (a^*) y el espectro amarillo a azul (b^*). El equipo fue calibrado en fondo negro y blanco y se tomaron como mediciones 10 puntos de cada película (Quiroz, 2021). Para calcular el valor de opacidad, se hicieron mediciones del parámetro L^* en fondo negro y blanco. El valor de opacidad se calculó siguiendo la siguiente ecuación (2) (Cecchini *et al.*, 2017):

$$\text{Opacidad} = \frac{L^*(\text{Fondo negro})}{L^*(\text{fondo blanco})} \times 100 \quad (2)$$

5.2.9 Propiedades mecánicas

La resistencia a la tensión (TS), porcentaje de elongación (EF) y el módulo de Young (EM) se midieron usando un equipo Instron Universal modelo 5543A Instron (MA, EUA). Las películas fueron cortadas en tiras de 7 cm de largo y 1 cm de ancho, se llevaron a humedad relativa durante 2 h antes de realizar las mediciones.

Se empleó un analizador de textura TA-XT (TA Plus, Lloyd Instruments) equipado con pinzas mecánicas con una separación inicial de 50 mm y operando a una velocidad de desplazamiento de 1 mm/s. De los datos de fuerza-desplazamiento generados en el equipo, se determinaron los valores de esfuerzo y deformación, a partir de los cuales se determinó el esfuerzo a la tensión y el porcentaje de elongación a la fractura.

5.2.10 Microscopía electrónica de barrido (SEM) de las PC

Las películas fueron cubiertas con una capa fina de oro y se analizaron en un microscopio electrónico de barrido EVO-50 (Carl Zeiss UltraPlus, Alemania) para analizar su microestructura superficial (Arredondo *et al.*, 2016). Se tomaron micografías de diferentes secciones a 10,000, 5,000 y 2,500 aumentos.

5.2.11 Actividad antifúngica de las películas contra *Rhizopus stolonifer*

Se determinó la actividad antifúngica de las películas comestibles por medio del cálculo del índice de inhibición antifúngica (Olicón-Hernández *et al.*, 2019). Se creció *Rhizopus stolonifer* en placas de agar PDA por 72 h. Después de este tiempo, círculos de aproximadamente 1 cm² de diámetro fueron cortadas de la placa con el hongo crecido. Se colocaron las películas sobre nuevas placas de agar y se inocularon con los círculos de agar en el centro de la película. El índice antifúngico se calculó usando la ecuación 3:

$$\text{Índice Antifúngico (\%)} = \left(1 - \frac{Da}{Db}\right) \times 100 \quad (3)$$

Donde:

Da: diámetro del micelio en las muestras tratadas

Db: diámetro del micelio control (Sin tratar)

5.2.11 Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua de las películas se determinó siguiendo el método estándar ASTM E96-00 conocido como el método de la copa. Las muestras fueron cortadas en forma circular con un diámetro de 41 mm. Para realizar el análisis, se llenó parcialmente con agua destilada la celda de permeabilidad, se colocó la muestra circular y la celda fue sellada utilizando su tapadera horadada colocando la película entre empaques de silicón. El área total para la transferencia de vapor de agua fue de 0.00090 m². Posteriormente la celda conteniendo la película se introdujo en la cámara de permeabilidad con control de temperatura, la cual se mantuvo a 30 °C. Para mantener un gradiente de humedad relativa a través de la película, dentro de la cámara de permeabilidad se colocó sílica gel (previamente desecada). La pérdida de peso se determinó gravimétricamente durante un lapso de 12 horas.

5.3 Encapsulación de *L. lactis* UQ2

5.3.1 Activación de *L. lactis* UQ2

Se realizaron tres activaciones. En la primera, se colocaron chaquiras de una conserva a -70°C en un tubo de 10mL de caldo M17 adicionado al 0.5% (p/v) con una solución de lactosa estéril al 10% y se incubó el inóculo durante 24 h a 30°C. En la segunda activación, se inoculó el cultivo al 1% (v/v) en 20 mL de caldo M17 adicionado al 0.5% de lactosa y se incubó a 30°C durante 12 h. La tercera activación se realizó en 1 L de caldo M17 adicionado con 0.5% de lactosa y se incubó a 30°C por 8 h. Se determinó la población final del cultivo por medio del método Miles y Misra en placar de agar PBC (Patiño, 2014).

5.3.2 Recuperación de las células

El cultivo de *L. lactis* UQ2 activado se centrifugó en tubos Falcon estériles de 50 mL, las condiciones de centrifugación fueron 4000 rpm, 20 minutos a 4°C. una vez pasado el tiempo de centrifugado, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en solución salina estéril al 0.85% (p/v). Este proceso se repitió 2 veces. El precipitado obtenido se suspendió en 100 mL de buffer de fosfatos 0.1

mM (pH 7) y se reservó para más tarde en condiciones de refrigeración (Patiño, 2014).

5.3.3 Preparación del agente encapsulante

El agente encapsulante se preparó en un buffer de fosfatos 0.1mM estéril a pH 7, en el cual se suspendió una mezcla de polímeros (concentrado de proteína de suero y almidón modificado), previamente esterilizados por 30 minutos en luz UV. Se mantuvo la solución en agitación constante y se le añadió la solución de bacterias obtenida en la sección 5.3.2. La solución se homogeneizó durante toda la noche a 4°C (Patiño, 2014)

5.3.4 Secado por aspersión

La solución obtenida en la sección 5.3.3 fue llevada a un secador Mini Spray Dryer Büchi, Modelo B-290. Las condiciones de secado fueron las siguientes: temperatura de entrada, 90°C, capacidad de bomba de alimentación 13% y porcentaje de aspiración 95%. Los valores de temperatura del aire de salida variaron de 41 a 46°C. Las capsulas resultantes se colectaron en un frasco de vidrio estéril con sello hermético a 4°C hasta su uso. La viabilidad de las bacterias encapsuladas se calculó con la siguiente ecuación (4)

$$\% Viabilidad = \frac{(Población ME)(Peso de cápsulas)}{(Población en AE)(Volúmen de activación)} \times 100$$

Donde:

AE: población de *L. lactis* en los agentes encapsulantes

ME: población de *L. lactis* en el microencapsulado

5.3.5 Morfología del encapsulado de *L. lactis* UQ2

Las capsulas obtenidas del encapsulado fueron llevadas a su análisis por microscopía electrónica de barrido. Las muestras fueron cubiertas con una capa fina

de oro y se analizaron en un microscopio electrónico de barrido EVO-50 (Carl Zeiss UltraPlus, Alemania) para analizar su microestructura superficial (Arredondo *et al.*, 2016). Se tomaron micografías de diferentes secciones a 10,000, 5,000 y 2,500 aumentos.

5.4 Análisis del impacto de los recubrimientos y bacterias encapsuladas sobre la vida de anaquel de un pan de masa madre

Para elaborar los panes, se obtuvo la masa madre de una panadería local. Se realizaron cuatro tratamientos (tabla 5) y los tratamientos fueron almacenados en una cámara climática (Climacell 540#370#530MM) donde se midió la vida de anaquel acelerada del producto. Para productos derivados de maíz y trigo, por cada día de almacenamiento en condiciones aceleradas equivale de 3 a 4 días en condiciones a temperatura ambiente en tiempo real para estudio de vida de anaquel. Las variables del estudio fueron: Temperatura: $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa: $55\% \pm 5\%$, aire: 10% y tiempo de almacenamiento: 3 días. Una vez pasado ese tiempo, se realizaron las determinaciones de textura, color y conteo de hongos, levaduras y coliformes totales de acuerdo a las especificaciones de las Normas Oficiales Mexicanas (NOM-247-SSA1-2008, NOM-111-SSA1-1994 y NOM-113-SSA1-1994).

Tabla 5. Tratamientos analizados

Tratamiento	Recubrimiento	Bacterias ácido lácticas encapsuladas
1	Ausencia	Ausencia
2	Presencia	Ausencia
3	Ausencia	Presencia
4	Presencia	Presencia

5.5 Análisis sensorial del pan de masa madre adicionado con *L. lactis* UQ2 encapsuladas y recubrimientos comestibles.

Todos los tratamientos fueron elaborados siguiendo las Buenas Prácticas de Higiene recomendadas por la Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009.

Se utilizó un panel no entrenado de 50 consumidores (Hough, 2010) y se les pidió que evaluaran las siguientes características de las muestras: aroma, color, sabor y aceptación global utilizando una escala hedónica de 9 puntos (anexo 1). El reclutamiento se llevó a cabo a través de redes sociales y avisos impresos, los participantes fueron principalmente alumnos de licenciatura y posgrado de la Universidad Autónoma de Querétaro. Como criterios de exclusión se consideraron personas alérgicas a los ingredientes presentes en el producto. Se proporcionó a cada panelista un consentimiento informado (anexo 2) con la información y especificaciones del estudio. Dicho consentimiento quedó a resguardo del personal a cargo de la prueba como evidencia.

Las muestras fueron presentadas de forma homogénea y siguiendo la misma preparación. A cada participante se le otorgaron cuatro muestras las cuales fueron:

- 1) Pan sin recubrimiento ni encapsulado (control; CTR)
- 2) Pan con recubrimiento sin encapsulado (PP)
- 3) Pan con encapsulado sin recubrimiento (PB)
- 4) Pan con encapsulado y recubrimiento (PBR)

Entre cada degustación, se les pidió a los participantes limpiar su paladar con agua y trozos de manzana. Las muestras se mostraron en porciones de $5 \text{ g} \pm 1$.

5.6 Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron por triplicado, reportándose los resultados como la media \pm la desviación estándar. Se aplicaron pruebas de Tukey y Dunnett para la comparación de medias utilizando el software GraphPad Prism 8

6 RESULTADOS

6.1 Extracción del aceite esencial de hierba limón

Se realizó el método de destilación por arrastre de vapor de agua. Si bien en un principio se utilizó la materia prima seca, el rendimiento fue bajo (tabla 6), por lo cual se procedió a aplicar distintos tratamientos, utilizando un estudio de un factor a la vez (OFAT).

Tabla 6. Rendimientos de extracción de los distintos tratamientos aplicados a la hierba limón.

Aceite esencial de hierba limón	
Tratamiento	Rendimiento
Hojas enteras secas	0.66% ± 0.152
Hojas cortadas secas	0.053% ± 0.030
Hojas enteras frescas	1.09% ± 0.100
Hojas cortadas frescas	0.02 ± 0.017

El máximo rendimiento se obtuvo cuando las hojas fueron sometidas al proceso de destilación sin cortar y lo más frescas que se pudiera. Se obtuvo un rendimiento de 1.09% ± 0.100. Se trata de un valor menor al reportado por Lal *et al.*, (2018), quienes reportan un rendimiento medio de 1.35%, sin embargo, es un valor bastante aproximado al reportado por Parikh y Desai (2011) quienes reportan un rendimiento de 1.04%. Estos autores reportan la pérdida de aproximadamente 9% de aceite esencial durante el secado de las hojas de té de limón. El tamaño de la materia prima es uno de los factores que influyen en el rendimiento del aceite esencial, puesto que se ha encontrado que, mientras menor sea el tamaño de partícula, disminuirá la cantidad de aceite esencial a obtener, puesto que este se volatilizará durante el proceso de cortado (Tran *et al.*, 2019). Se observó también que el tiempo de proceso de destilación es más rápido, comparado con la extracción de otros aceites como canela y orégano.

6.2 Extracción del aceite esencial de canela

Para la extracción del aceite esencial de canela, se realizó el método de destilación por arrastre de vapor de agua. Debido al poco rendimiento que se obtuvo durante las primeras destilaciones ($0.23\% \pm 0.115$) se realizaron distintos tratamientos para intentar mejorar el rendimiento del proceso (tabla 7), utilizando el método de un factor a la vez (OFAT). De acuerdo con Morsy *et al.*, (2015), aplicar un pre tratamiento de sonicación a la materia prima puede incrementar el rendimiento de la extracción de los aceites esenciales, puesto que la cavitación de burbujas formadas durante la sonicación penetra las células vegetales, mejorando la transferencia de masa entre la célula y el solvente, liberando el aceite esencial y reduciendo el tiempo de extracción e incrementando el rendimiento.

Tabla 7. Rendimientos de extracción de los distintos tratamientos aplicados a la canela

Aceite esencial de canela	
Tratamiento	Rendimiento
Canela entera sin sonicar	$0.23\% \pm 0.115$
Canela en trozos sin sonicar	$0.33\% \pm 0.152$
Canela en trozos, sonicada	$1.33\% \pm 0.116$
Canela en polvo sin sonicar	$0.026\% \pm 1.920$

El tratamiento con el que se obtuvo el menor porcentaje de rendimiento fue en el de canela en polvo (0.026%). Esta disminución podría deberse a que, por su naturaleza de compuestos volátiles, el aceite esencial se pierda durante el proceso de molienda, lo cual corresponde con lo mencionado por Ghodki y Goswami (2016). Debido a esto, se eligió no sonicar la canela en polvo, para evitar más pérdida del aceite.

El tratamiento con el que se obtuvo el mejor porcentaje de rendimiento fue aquel en el que se le dio el tratamiento de sonicación (10 min, 60% de amplitud, pulsos de 27:33 segundos on:off). Se eligieron estos parámetros ya que, de acuerdo con lo reportado por Jadhav *et al.*, (2021), estas condiciones son las óptimas para aumentar el rendimiento del aceite esencial de canela (en su estudio, se obtiene un

3.17% de rendimiento). Sin tratamiento de sonicación, el porcentaje de rendimiento osciló entre 0.026% y 0.33%, mientras que el tratamiento con sonicación elevó el rendimiento a un 1.33%. Valores similares a los encontrados han sido reportados en la literatura, Zhang *et al.*, (2021), reportan rendimientos con valores entre 1.58% y 2.10%, mientras que Fajar *et al.* (2019) reportan rendimientos de aproximadamente 1.44%. Sin embargo, es importante destacar que el rendimiento de la extracción de aceites esenciales dependerá de diversos factores, tales como las condiciones de cultivo y origen de la materia prima y el equipo utilizado para la extracción (Leon-Mendez, 2018).

6.3 Concentración mínima fungicida (CMF), concentración inhibitoria fraccional (CIF) e índice fraccional inhibitorio (FIC) de los aceites esenciales

La concentración mínima fungicida (CMF) se considera como la concentración mínima de algún agente antifúngico necesaria para prevenir la formación de unidades formadoras de colonias en un medio sólido (Stupar, *et al.*, 2014). Para el aceite esencial de canela se utilizaron concentraciones de 0.1 a 0.5 mg/mL, mientras que para el aceite de hierba limón se utilizaron concentraciones de 0.5 a 2.5 mg/mL. Paralelamente, se prepararon dos controles negativos (aceite de canela sin inóculo de esporas, aceite de hierba limón sin inóculo de esporas) y un control positivo (inóculo de esporas sin aceite) (Figuras 10-12).

6.3.1 Concentración mínima fungicida del aceite esencial de canela

Se encontró que la concentración mínima fungicida (CMF) para el aceite esencial de canela fue aquella de 0.4 mg/mL, ya que es aquel donde no se observó crecimiento de colonias (Figura 13). Se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) y se graficaron (Figura 14). He *et al.*, (2018) reportaron CMF de 0.2 µl/mL y 0.175 µl/mL para la inhibición micelial y esporulación de *Colletotrichum acutatum* aislada de kiwis. Por otro lado, Clemente *et al.*, (2019), reportan valores de CMF de entre 25 y 200 µg/mL, contra *Rhizopus stolonifer*. El amplio espectro de CMF del aceite esencial de canela puede deberse a distintos factores, entre los que se encuentran la fuente de obtención del aceite esencial, condiciones de cosecha, tipo de microorganismo contra el que se está actuando y

el mecanismo de acción del aceite esencial a utilizar. En el caso del aceite esencial de canela, se especula que los compuestos lipofílicos del aceite causan disrupción de la fuerza protón motriz a nivel de la membrana celular, lo cual puede desembocar en la pérdida de sustancias celulares (He *et al.*, 2018). Partiendo de un control de 5.5 ± 0.3 log, se logró la inhibición completa del microorganismo en la concentración de 0.4 mg/mL.

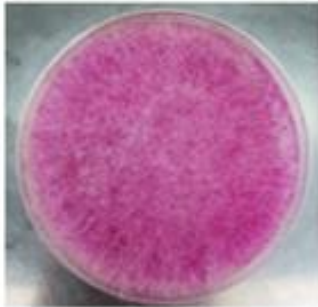


Figura 10. Control positivo



Figura 11. Control negativo: aceite esencial de canela

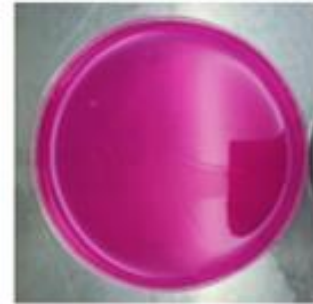


Figura 12. Control negativo: aceite esencial de hierba limón



Figura 13. Monitoreo al crecimiento de *Rhizopus* contra distintas concentraciones de AEC. De izquierda a derecha, arriba hacia abajo: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/mL

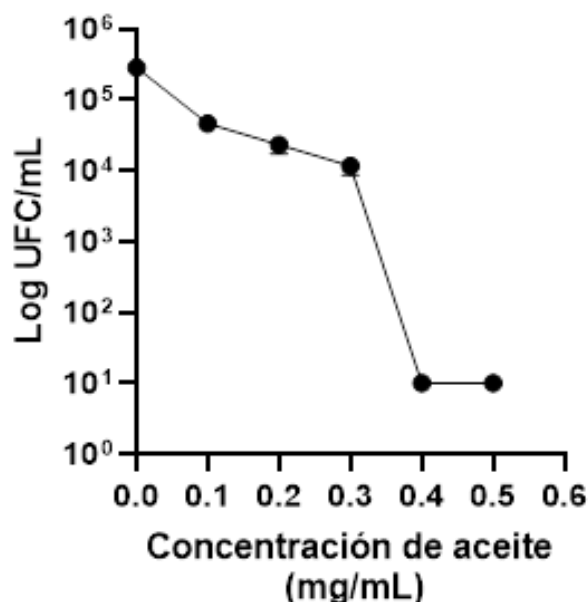


Figura 14. Actividad antifúngica del aceite esencial de canela contra *Rhizopus nigricans*

6.3.2 Concentración mínima fungicida del aceite esencial de hierba limón

Para el aceite esencial de hierba limón, la concentración mínima fungicida fue de 2.0 mg/mL, aquella donde no se observó crecimiento de colonias, partiendo de un control de 5.5 ± 0.3 log (Figura 15). Este valor se corresponde con el reportado por Sahal *et al.*, (2020), donde se probó el efecto antifúngico del aceite esencial de hierba limón contra diferentes especies del género *Candida tropicalis* (reportando CMF de 1 a 3.9 μ l/mL). Perdana *et al.*, (2021) reportan valores de concentración mínima fungicida de 0.18 a 1.56 μ l/mL contra *Aspergillus niger* y *Candida albicans*. Al igual que con el aceite esencial de canela, es importante recalcar que la cantidad de aceite esencial obtenido dependerá de factores tanto de la materia prima como el equipo a utilizar. Para el aceite esencial de hierba limón, se ha demostrado que sus compuestos, principalmente el citral, tienen la capacidad de destruir la integridad de la membrana celular, liberando sustancias intracelulares e inhibiendo

el crecimiento micelial (Tao *et al.*, 2014). Se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) y se graficaron (Figura 16).

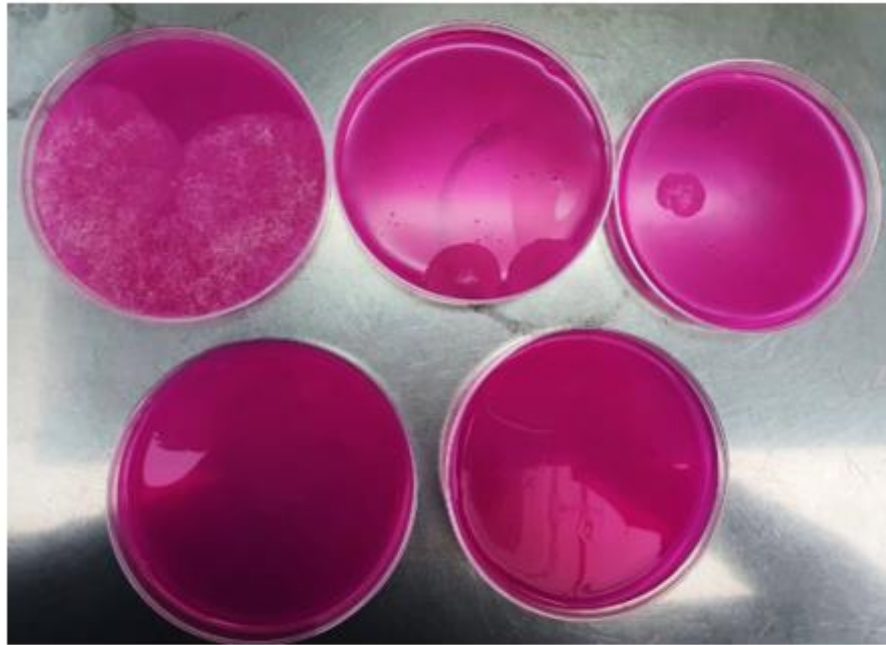


Figura 15. Monitoreo al crecimiento de *Rhizopus* contra distintas concentraciones de AEL. De izquierda a derecha, arriba hacia abajo: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mg/mL

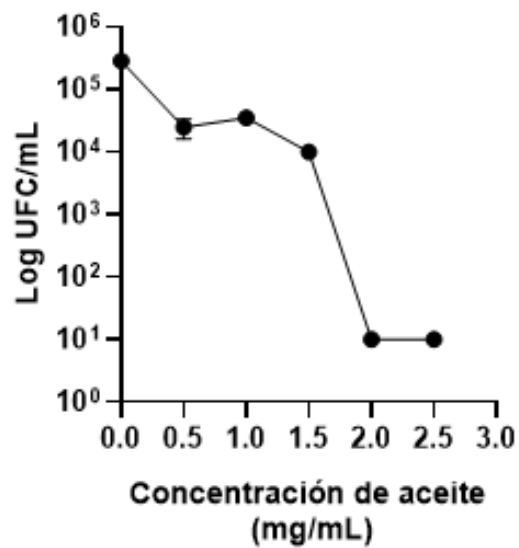


Figura 16. Actividad antifúngica del aceite esencial de hierba limón contra *Rhizophus nigricans*

6.3.3 Determinación del efecto combinado de los aceites esenciales

Se probaron distintas combinaciones de las fracciones individuales (tabla 8) de los aceites esenciales, encontrando en todas las combinaciones un efecto antifúngico (Figura 17). Para calcular el índice de concentración inhibitoria fraccional (FIC) se eligió la concentración de 0.3 mg/mL AEC y 0.5 mg/mL AEL. El cálculo de la FIC se obtuvo de la siguiente manera: $FIC = (Ac/Aa) + (Bc/Ba)$, donde Ac y Bc son la concentración inhibitoria mínima (CMI) de los compuestos en combinación, y Aa y Ba son las CFM de los compuestos puros (Caleffi-Ferracioli et al., 2013; Mataraci y Dosler, 2012; Pérez-Palma et al., 2019). Sustituyendo los valores, se encuentra que:

$$FIC_{AEC} + FIC_{AEL} = 0.75 + 0.25 = 1$$

Cuando la FIC es <1 , el efecto será sinérgico. Si la FIC >1 , el efecto será aditivo (Rivera-Carrilles et al., 2005).

Tabla 8. Combinaciones de las fracciones individuales de los aceites esenciales de hierba limón y canela

Concentración de aceite de canela (mg/mL)	Concentración de aceite de hierba limón (mg/mL)
0.4	0.0
0.3	0.5
0.2	1.0
0.1	1.5
0.0	2.0

De la misma manera, se elaboró el isoblograma (Figura 17) obtenido con los resultados de las combinaciones de aceites esenciales. En el eje de las abscisas se representan las concentraciones del aceite esencial de canela y en el eje de las ordenadas, las concentraciones del aceite esencial de hierba limón. En los extremos se sitúan las concentraciones mínimas fungicidas (CMF) de los aceites en individual. Al unir los puntos de las concentraciones, se obtiene como resultado una línea recta, representando un efecto aditivo

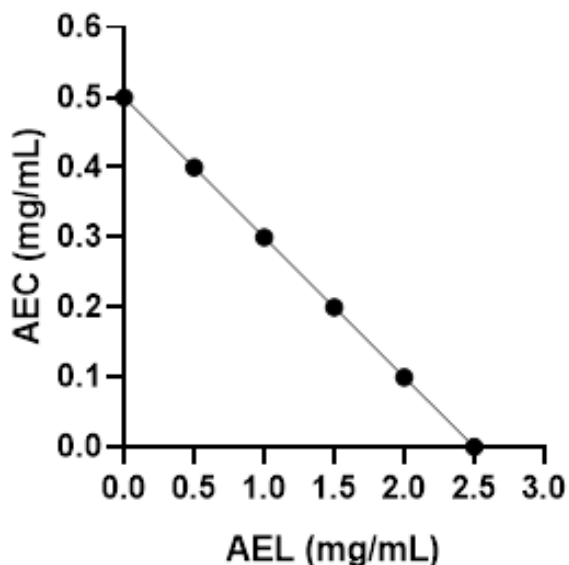


Figura 17. Isoblograma de la mezcla de aceites esenciales.

Peach *et al.*, (2019), utilizaron una mezcla de aceite esencial de canela y aceite esencial de hierba limón como agente para repeler mosquitos, sin embargo, plantean que se deberían utilizar distintas formulaciones a la usada para incrementar su efectividad. Existe poca literatura acerca del efecto combinado de los aceites esenciales de hierba limón y canela utilizado en hongos. Singh *et al.*, (2019) mencionan un efecto sinérgico en la acción de una mezcla de aceites esenciales de hierba limón y canela utilizados en manera de repelentes para parásitos. Nikkhah *et al.*, (2017) también reportan actividades sinérgicas entre mezclas de tomillo, canela y romero (FIC de 0.5 y 0.375) contra *B. cinerea* y *P. expansum*, al igual que la combinación de mejorana, canela y tomillo también demostró ser sinérgica (FIC de 0.625 contra *P. expansum* y 0.375 para *B. cinérea*).

6.4 Síntesis de partículas de sílice mesoporosa (NSM)

El rendimiento de las partículas de sílice mesoporosa fue de 90.8%. A simple vista se aprecia un polvo blanco (figuras 18 y 19) que después cambiará de color dependiendo del aceite que se le adicione



Figura 18. Partículas de sílice molidas



Figura 19. Partículas de sílice mesoporosa sin cargar.



Figura 20. Partículas de sílice mesoporosa cargadas con aceite esencial de canela (A) y aceite esencial de hierba limón (B)

Una vez cargadas las nanopartículas con los aceites esenciales, las principales diferencias observables son en el color (Figura 20). Las partículas cargadas con

aceite esencial de canela se observan de un tono amarillo oscuro, mientras que aquellas cargadas con aceite esencial de hierba limón son de un tono amarillo más claro.

6.4.1 Análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM)

En las micografías SEM (figuras 21-22) pueden observarse las aglomeraciones de las nanopartículas esféricas). Debido a la porosidad del material, no fue posible obtener mediciones de una sola partícula, excepto en el caso de las partículas cargadas con aceite esencial de canela (cuyas mediciones tuvieron rangos de entre 120 y 180 nm). No se observan diferencias en la morfología de las partículas una vez cargadas con diferencias más significativas encontradas corresponden en una aglomeración de partículas más compacta en el caso de las que están cargadas con los aceites esenciales.

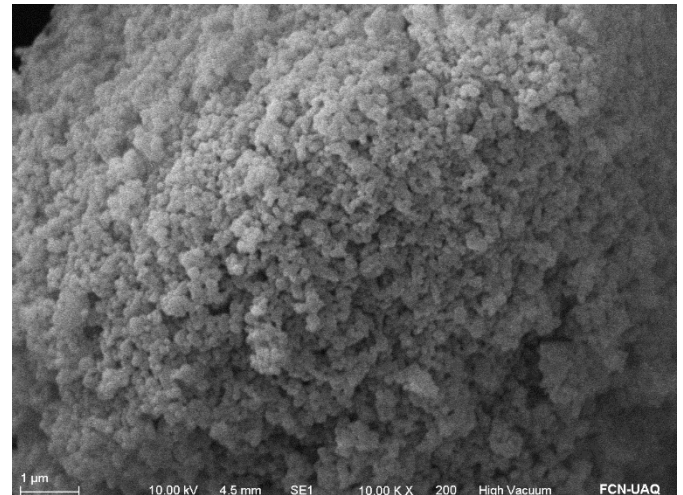
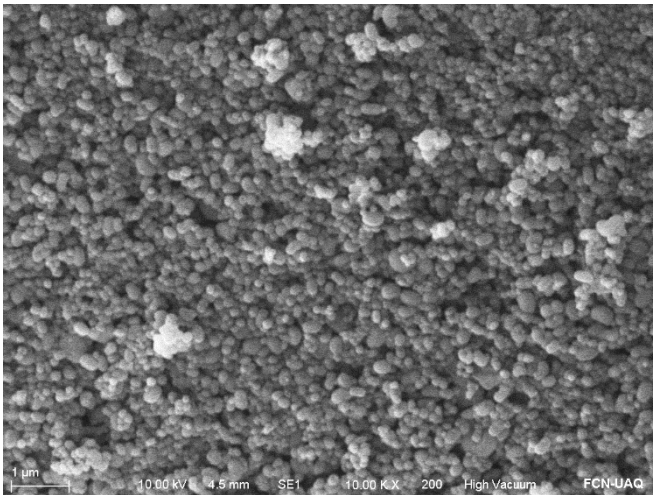


Figura 21. Micografía de partículas de sílice mesoporosa sin cargar en aumento de 5.00 X (izquierda) y 10.00 X (derecha)

Las características morfológicas de las nanopartículas corresponden a lo reportado por Vo *et al.*, (2017); quienes obtuvieron partículas con tamaños menores a 50 nm. Paralelamente, Ribes *et al.*, (2019), encapsularon distintos componentes de aceites esenciales (carvacrol, eugenol, timol and vanillina) y obtuvieron partículas aglomeradas, similares a los obtenidos en el presente estudio

6.4.2 Análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La figura 22 muestra la morfología de las partículas de sílice mesoporosa sin cargar y con los dos aceites esenciales. Se observa una morfología similar a la observada en las micrografías SEM: partículas ovaladas, de menos de una micra de tamaño. Continuando con las semejanzas entre los análisis SEM y TEM, se observa mayor aglomeración de partículas cuando se cargan de aceites esenciales (figuras 14B y 14C).

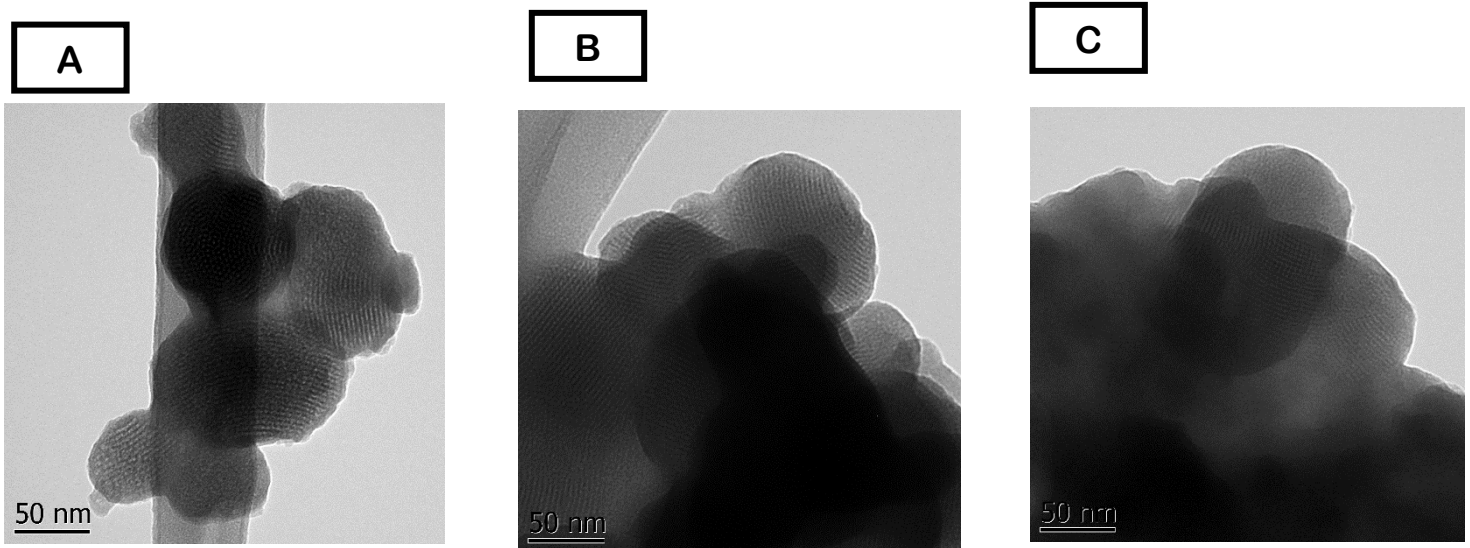


Figura 22. Imágenes TEM de las partículas de sílice mesoporosa. (A. Sin cargar, B. Cargadas con aceite esencial de hierba limón y C. Cargadas con aceite esencial de canela)

6.4.3 Actividad antifúngica de los aceites esenciales encapsulados

La actividad antifúngica de las partículas fue medida en el día 3 de incubación, partiendo de un inóculo de 10^5 esporas/mL. Por parte de ambos aceites se observó menor actividad comparada con los aceites en emulsión contra *R. nigricans* (figuras 23 y 24). Esta disminución podría deberse a una mala distribución y absorción de la emulsión de los aceites esenciales en la membrana en la que se colocaron o al tipo de crecimiento no radial del microorganismo.

No existen muchos reportes sobre la actividad específica de una emulsión de aceite esencial de canela y otra de aceite esencial de hierba limón contra *R. nigricans*. No obstante, existen reportes sobre la actividad de aceites esenciales encapsulados en partículas de sílice mesoporosa. Zhang *et al.*, (2021) reportan la acción antifúngica de las partículas de sílice mesoporosa cargadas con aceite esencial de canela contra *Mucor sp. F* y *Mucor circinelloides C*. cuando se añaden a recubrimientos a base de almidón de papa. Para el aceite esencial de hierba limón, Sattary *et al.*, (2020) reportan que el aceite esencial de hierba limón cuando se encapsula en partículas de sílice mesoporosa aumenta hasta 3 veces su capacidad antifúngica contra *Gaeumannomyces graminis spp. tritici* (aunque utilizando una metodología distinta a la seguida en este estudio).

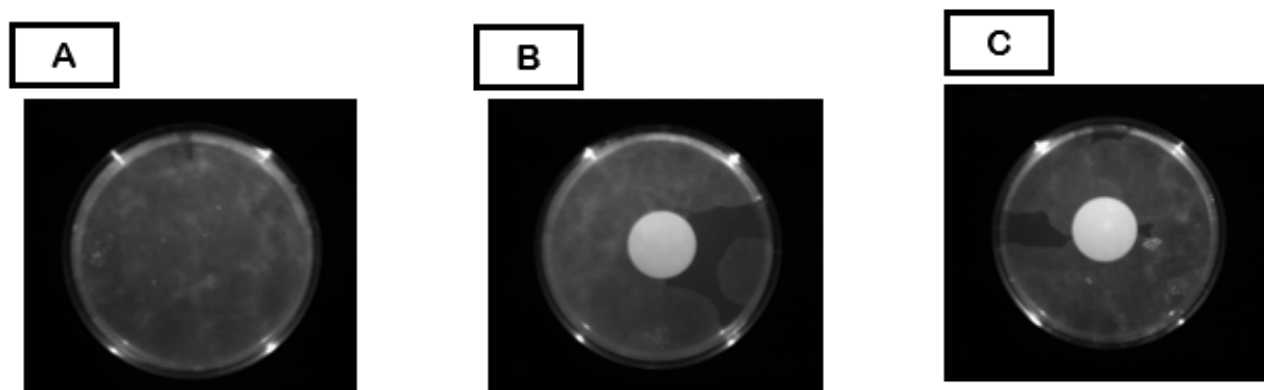


Figura 23. Actividad fungicida de los aceites esenciales encapsulados. A) Control B) Aceite esencial de canela, C) Aceite esencial de hierba limón

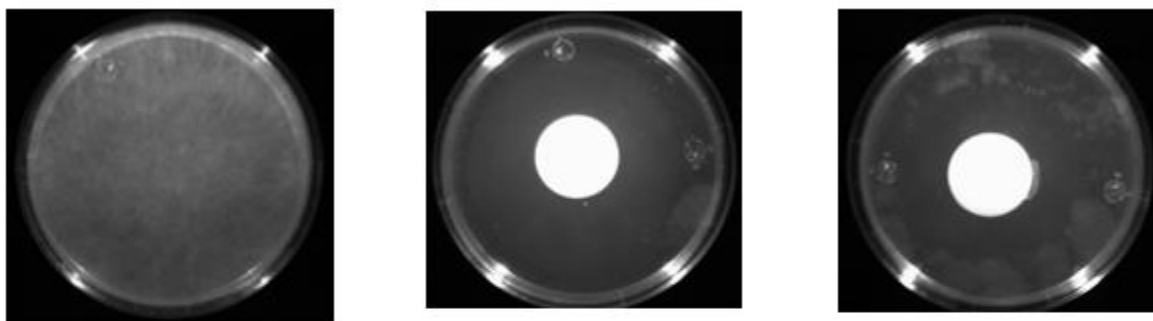


Figura 24. Actividad fungicida de los aceites esenciales en emulsión. A) Control B) Aceite esencial de canela, C) Aceite esencial de hierba limón

6.5 Preparación de la solución filmogénica y formación de las PC

6.5.1 Obtención del extracto proteico de la harina de quinoa

Por medio del método Kjeldahl, se obtuvo que la cantidad de proteína en el extracto seco es de 62.97%. Se realizaron los análisis proximales correspondientes (Tabla 9). Se obtuvo un contenido de cenizas de 2.57% y un contenido de humedad de 2.32% (AOAC, 1984).

Tabla 9. Análisis proximales del extracto proteico de acuerdo a los métodos de la AOAC (1984).

Análisis	Contenido (%)
Proteína	62.97 ± 0.15
Humedad	2.32 ± 0.15
Cenizas	2.57 ± 0.27

Abugoch *et al.*, (2009), reporta que las principales proteínas presentes en la semilla de quinoa son las globulinas (37%), seguidas de las albúminas (35%) y por último las prolaminas (0.5-7%). La proteína de quinoa es utilizada en las formulaciones de recubrimientos y películas comestibles debido a sus efectos en la solubilidad y gelificación cuando se añaden a las soluciones filmogénicas (Quiroz, 2021; Alak *et al.*, 2019).

6.5.2 Obtención de las soluciones filmogénicas

Se obtuvieron diez películas comestibles (figura 25). Si bien al principio los tratamientos con una relación 09:01 proteína de quinoa:quitosano produjeron películas quebradizas, una vez que se aumentó la concentración de glicerol hasta el 40% en relación de los sólidos totales, se logró obtener películas fáciles de despegar y aparentemente flexibles en ambos casos. No se observan diferencias de color en los tratamientos donde se añaden los aceites esenciales. El color de las películas es de un tono amarillo traslúcido, similar a las reportadas por Vera *et al.*, (2019), quienes elaboraron películas de quitosano, proteína de quinoa y

transglutaminasa. Las películas obtenidas a partir de la solución 09:01 muestran tonalidades más oscuras que las películas de 04:01, lo cual podría deberse por el incremento de la concentración de proteína en la solución.

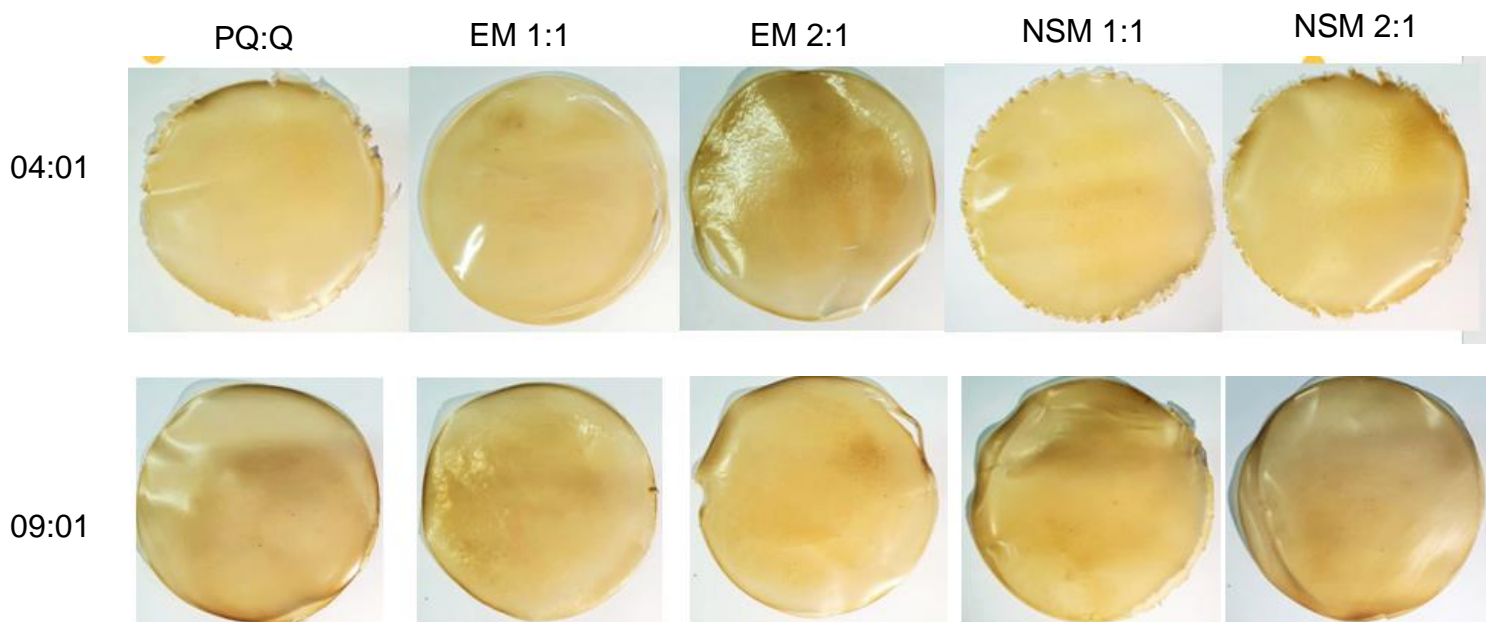


Figura 25. Películas obtenidas a partir de las soluciones filmogénicas elaboradas. 09:01 y 04:01 indican relación de proteína de quinoa:quitosano

6.5.3 Caracterización de las soluciones filmogénicas

6.5.3.1 Espesor

De acuerdo con los promedios de espesor (figura 26), las películas que no tienen adicionadas las partículas de sílice mesoporosa están en rangos de 100 a 130 μm . No se mostró una diferencia significativa entre las dos relaciones de proteína y quitosano, sin embargo, se observa una diferencia significativa en las películas que son adicionadas con partículas de sílice mesoporosa (grosor de 30 a 60 μm). El espesor de las películas dependerá de la naturaleza de los polímeros que las conforman (Di Pierro *et al.*, 2006).

Los datos de espesor obtenidos indican que todos los tratamientos se encuentran dentro de las especificaciones requeridas para ser considerados recubrimientos o películas comestibles, dado que los límites máximos de grosor son de 0.33 mm (Embuscado y Huber, 2000).

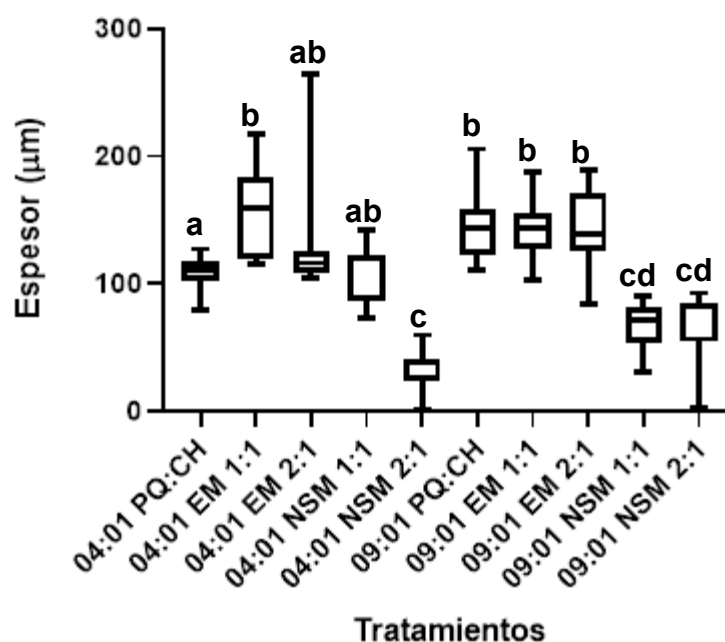


Figura 26. Espesor de las películas comestibles. Se muestra la media de los tratamientos \pm la desviación estándar ($n=10$). Letras iguales indican que no hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba Tukey ($\alpha=0.05$)

Se observa de manera general un aumento en el espesor cuando se le añaden partículas de sílice mesoporosa cargadas con aceite esencial. Esto puede deberse, entre otras razones, al aumento de los sólidos totales de la solución filmogénica (Quiroz, 2021). Se ha reportado que la adición de partículas de sílice mesoporosa disminuye la permeabilidad a vapor de agua y a gases de algunos recubrimientos, incrementando en general las propiedades de barrera de los mismos.

6.5.3.2 Solubilidad

De acuerdo con la figura 27, se observan que los valores de solubilidad oscilan entre 50 y 80%, lo cual indica una estabilidad intermedia y baja de la red de polímeros. Las películas más solubles fueron aquellas que solamente contenían quitosano y proteína de quinoa, mientras que cuando se les adicionan los aceites esenciales, ya sea en emulsión o encapsulados en las partículas, disminuye la solubilidad. Esto

podría deberse a que la adición de los aceites refuerza la red de polímeros de la película, haciendo que disminuya la permeabilidad al agua de la misma.

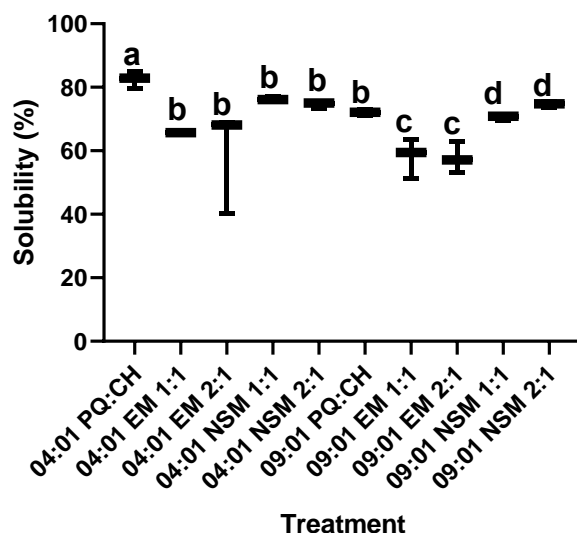


Figura 27. Solubilidad de las películas comestibles. Se muestra la media de los tratamientos \pm la desviación estándar ($n=10$). Letras iguales indican que no hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba Tukey ($\alpha=0.05$)

La solubilidad es una característica importante para los recubrimientos, debido a que, para que se pueda consumir un alimento junto con el recubrimiento, se requiere que este último tenga valores altos de solubilidad de agua (Mohammadi *et al.*, 2017). Además, la solubilidad de la PC definirá en gran medida a que tipo de alimento será conveniente su aplicación.

6.5.3.3 Opacidad y color


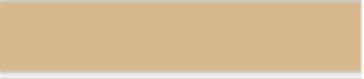








Los parámetros de opacidad y color fueron determinados mediante la escala de color CIE $L^* a^* b^*$, donde los valores de L^* representan la luminosidad, a^* las coordenadas de rojo a verde (+a rojo, -a verde) y b^* las coordenadas de amarillo a azul (+b amarillo, -b azul). Esta escala es ampliamente utilizada, debido a que correlaciona valores (coordenadas) numéricos con la percepción visual humana.

Un material se conoce como opaco cuando no deja pasar luz en una proporción apreciable. Por el contrario, un material será traslúcido cuando deja pasar la luz de manera media y transparente cuando deja pasar fácilmente la luz.

En la tabla 10, se muestran los índices de color y opacidad de los diferentes tratamientos de las PC. Los valores de los tratamientos 9:1 fueron ligeramente más altos en el caso de la luminosidad (L^*), y más bajos en los valores a^* y b^* . La relación de luminosidad con el aumento de tonalidad podría deberse al incremento de sólidos totales en las PC. Todas las películas tuvieron tendencia al color amarillo pálido, probablemente debido al color tanto de la proteína de quinoa como de las NSM cargadas con aceites esenciales. El tono amarillo corresponde con el reportado por Vera *et al.*, (2020) quienes elaboraron películas comestibles de proteína de quinoa, quitosano, transglutaminasa y nanopartículas cargadas con timol.

El color de los recubrimientos también es una característica importante a considerar, puesto que de ella dependerá la aceptación sensorial del recubrimiento una vez que esté integrado en un alimento. Del mismo modo, la opacidad es un factor a considerar, puesto que, a mayor transparencia de las películas, es menos probable los cambios físicos en el alimento (Velickova *et al.*, 2013). De los tratamientos analizados, todos demostraron valores de opacidad de menos del 50%. La diferencia significativa encontrada entre tratamientos fue en las películas a las que les fueron añadidas partículas de sílice mesoporosa, ya que aquellas con la formulación 4:1 reportaron valores de 36 y 43%, mientras que la formulación 9:1 tuvo valores de 27 a 29%

Tabla 10. Parámetros de color (coordenadas L*, a* y b*) y porcentaje de opacidad de las películas

Tratamiento	Color			Opacidad (%)	Paleta de colores
	L*	a*	b*		
04:01 PQ:CH	69.85 ± 12.83 ^a	5.49 ± 1.39 ^a	23.20 ± 5.20 ^a	35.53 ± 6.61 ^a	
04:01 EM 1:1	76.82 ± 0.72 ^a	5.28 ± 0.72 ^a	26.97 ± 1.71 ^a	32.89 ± 1.64 ^a	
04:01 EM 2:1	75.15 ± 1.99 ^a	7.24 ± 1.89 ^b	31.25 ± 2.99 ^b	41.53 ± 2.38 ^b	
04:01 NSM 1:1	78.52 ± 1.61 ^a	5.15 ± 0.76 ^a	23.84 ± 3.32 ^a	36.72 ± 2.88 ^a	
04:01 NSM 2:1	76.40 ± 2.30 ^a	6.56 ± 1.27 ^a	28.43 ± 4.01 ^a	43.22 ± 3.33 ^c	
09:01 PQ:CH	78.19 ± 0.92 ^a	5.39 ± 0.40 ^a	23.57 ± 1.89 ^c	33.66 ± 2.32 ^a	
09:01 EM 1:1	75.68 ± 1.28 ^a	6.49 ± 0.54 ^a	31.28 ± 2.34 ^b	33.99 ± 0.29 ^a	
09:01: EM 2:1	78.37 ± 0.69 ^a	4.60 ± 0.35 ^c	25.04 ± 2.24 ^c	31.16 ± 0.65 ^d	
09:01 NSM 1:1	78.10 ± 0.56 ^a	4.92 ± 0.41 ^c	23.91 ± 1.22 ^a	27.62 ± 0.31 ^e	
09:01 NSM 2:1	78.27 ± 2.13 ^a	4.66 ± 0.59 ^c	19.06 ± 2.20 ^a	29.82 ± 2.02 ^e	

PQ:CH proteína de quinoa: quitosano, EM emulsión, NSM partículas de sílice mesporosa. Se muestra la media de los tratamientos ± la desviación estándar (n=10). Letras iguales indican que no hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba Tukey ($\alpha=0.05$)

6.5.3.4 Potencial ζ , índice de polidispersión y tamaño de partícula

En la tabla 11 se muestran los resultados de índice de polidispersión, potencial ζ y tamaño de partícula de cada tratamiento. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en todos los análisis exceptuando el índice de polidispersión. Este índice indica la heterogeneidad de

una mezcla. Cuanto más se aproxime el valor a 1, más polidispersa será la mezcla (Mudalige *et al.*, 2019).

En las soluciones filmogénicas, todos los tratamientos reportaron valores cercanos a 1, indicando que todas las soluciones son muy polidispersas. Esto podría deberse a varios factores, como la cantidad de sólidos totales presentes en la solución.

Tabla 11. Tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial ζ de las soluciones filmogénicas

Tratamiento	Tamaño de partícula (d.nm)	Índice de polidispersión (PI)	Potencial ζ (mV)
04:01 PQ:CH	2810.67 ± 139.15 ^a	0.790 ± 0.07 ^a	41.20 ± 6.51 ^a
04:01 EM 1:1	3889.00 ± 319.01 ^a	0.774 ± 0.11 ^a	39.93 ± 4.37 ^a
04:01 EM 2:1	4992328.67 ± 8632256.59 ^b	0.875 ± 0.21 ^a	26.37 ± 1.28 ^b
04:01 NSM 1:1	2103.67 ± 443.04 ^a	0.772 ± 0.28 ^a	31.30 ± 3.14 ^{ab}
04:01 NSM 2:1	1626.67 ± 108.42 ^c	0.991 ± 0.01 ^a	23.75 ± 3.44 ^b
09:01 PQ:CH	1920.67 ± 406.74 ^{ac}	0.840 ± 0.13 ^a	27.17 ± 1.20 ^{ab}
09:01 EM 1:1	2755.33 ± 126.06 ^a	1.000 ± 0.00 ^a	22.13 ± 4.60 ^b
09:01 EM 2:1	22353333.33 ± 5582296.42 ^d	0.736 ± 0.22 ^a	3.83 ± 1.54 ^c
09:01 NSM 1:1	7751.67 ± 2031.78 ^e	1.000 ± 0.00 ^a	8.61 ± 1.04 ^e
09:01 NSM 2:1	1937.67 ± 82.00 ^{ac}	1.000 ± 0.00 ^a	21.47 ± 3.00 ^{ab}

PQ:CH proteína de quinoa: quitosano, EM emulsión, NSM partículas de sílice mesporosa. Se muestra la media de los tratamientos ± la desviación estándar (n=10). Letras iguales indican que no hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba Tukey ($\alpha=0.05$).

El potencial ζ es la diferencia de potencial entre la fase móvil y el medio de dispersión de una mezcla. Esta característica es muy importante, puesto que está relacionado con la estabilidad de las emulsiones a largo y corto plazo (Lu y Gao, 2010). Cuando el valor de potencial ζ es mayor a 25 mV, las partículas se repelen manteniendo la solución estable. Por otro lado, valores entre -10 mV y 10 mV indican que la suspensión es altamente inestable. Las soluciones filmogénicas tuvieron todas valores arriba de 10 mV, salvo los tratamientos 09:01 EM 2:1 y 09:01 NSM 1:1.

El tamaño de partícula se refiere al valor promedio de todas las partículas que se encuentran en la suspensión. Las soluciones filmogénicas que reportaron mayores tamaños de partícula fueron aquellas que estaban adicionadas con emulsiones, mientras que las que reportaron menores tamaños de partículas fueron aquellos tratamientos a los que se les adicionaron partículas de sílice mesoporosa.

6.5.3.5 Propiedades mecánicas

Las propiedades de resistencia a la tensión, porcentaje de elongación y módulo de Young se presentan en la tabla 12. Se encontró que todas las películas tienen propiedades mecánicas diferentes.

Tabla 12. Resistencia a la tensión (Mpa), porcentaje de elongación (%E) y módulo de Young de las películas comestibles

Tratamiento	Resistencia a la tensión (Mpa)	Elongación (%E)	Módulo de Young (Mpa)
04:01 PQ:CH	5.833 ± 0.487 ^a	2.257 ± 0.436 ^a	400.752 ± 0.552 ^a
04:01 EM 1:1	8.072 ± 0.079 ^b	24.671 ± 0.090 ^b	141.770 ± 0.351 ^b
04:01 EM 2:1	6.627 ± 0.065 ^c	15.794 ± 0.242 ^c	214.963 ± 0.496 ^c
04:01 NSM 1:1	9.746 ± 0.285 ^d	10.105 ± 0.078 ^d	332.603 ± 0.084 ^d
04:01 NSM 2:1	28.76 ± 0.070 ^e	15.918 ± 0.135 ^c	722.482 ± 0.076 ^e
09:01 PQ:CH	4.871 ± 0.060 ^a	21.089 ± 0.020 ^e	134.555 ± 0.136 ^f

09:01 EM 1:1	6.148 ± 0.012 ^c	16.581 ± 0.090 ^c	195.909 ± 0.078 ^g
09:01 EM 2:1	5.114 ± 0.064 ^a	14.387 ± 0.299 ^c	165.321 ± 2.343 ^h
09:01 NSM 1:1	7.834 ± 0.154 ^b	6.264 ± 0.054 ^a	393.975 ± 4.922 ⁱ
09:01 NSM 2:1	6.895 ± 0.100 ^c	14.548 ± 0.009 ^c	187.156 ± 0.665 ^j

Se muestra la media de los tratamientos ± la desviación estándar (n=10). Letras iguales indican que no hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba Tukey ($\alpha=0.05$).

Los valores de resistencia a la tensión variaron entre 4 y 28 Mpa. Comparado con estos valores, Quiroz (2021) reporta valores entre 0.9 y 1.10 Mpa para películas elaboradas con quitosano, proteína de quinoa y enzima transglutaminasa. El aumento de la resistencia podría deberse a que se ha reportado que las partículas de sílice mesoporosa refuerzan la estructura de la red de polímeros, aumentando así las propiedades mecánicas.

El porcentaje de elongación (%E) se refiere al largo de la muestra después del estiramiento dividido entre el largo original y multiplicado por cien. Los tratamientos demostraron diferencias estadísticamente significativas. En el caso de los tratamientos 04:01 los valores menores (la película que menos pudo estirarse) es la que solamente contiene quitosano y proteína de quinoa (%E 2.2.), mientras que los valores más altos fueron los que contenían emulsiones de los aceites esenciales (15 y 24%). Para la relación 09:01, los valores más bajos fueron aquellos donde la PC tenía partículas adicionadas (6 y 14%).

El módulo de Young es un parámetro que caracteriza el comportamiento de un material elástico, según la dirección en la que se aplica una fuerza. Los valores más altos corresponden a aquellos de los tratamientos 04:01, lo cual indica mayor elasticidad de las muestras.

6.5.3.6 Permeabilidad al vapor de agua

Los valores de permeabilidad de agua se reportan en la figura 28. La permeabilidad es la capacidad de un material para permitir que un fluido lo atraviese sin alterar su estructura interna. De ambos tratamientos, se observa que los valores más bajos

de permeabilidad (es decir, aquellas PC menos permeables), corresponden a los tratamientos 04:01. De estos valores, el mas bajo corresponde al tratamiento adicionado con partículas de sílice mesoporosa. Los valores de permeabilidad al vapor de agua es una característica que dependerá del alimento al cual se aplicarán (Sahraee *et al.*, 2019). Los valores encontrados en este trabajo corresponden con los reportados por Escamilla-García *et al.*, (2019), valores de 2.85 a 9.95 (g cm Pa⁻¹ cm⁻² s⁻¹) para películas de quitosano con proteína de quinoa entrelazadas con enzima transglunitasa.

6.5.3 Actividad antifúngica de las películas comestibles

Los resultados de las actividades antifúngicas se muestran en la tabla 13. Se mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos. Para los tratamientos con relación 04:01, que fueron los que demostraron mayores índices antifúngicos (de 18 a 98%), mientras que los tratamientos de relación 09:01 mostraron valores del 0 al 60%. En ambos tratamientos se observa que el mayor porcentaje de inhibición se da cuando se agregan los aceites esenciales, ya sea en emulsión o encapsulados. Esto se podría deber a una buena conservación de las propiedades antifúngicas de los aceites esenciales durante el proceso de

Figura 28. Permeabilidad a vapor de agua. Se muestra la media de los tratamientos \pm la desviación estándar (n=10). Letras iguales indican que no hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba Tukey ($\alpha=0.05$)

encapsulación.

Tabla 13. Índices antifúngicos (%) de las películas comestibles

Tratamiento	Índice antifúngico (%)
04:01 PQ:CH	18.333 \pm 0.43
04:01 EM 1:1	71.773 \pm 0.11
04:01 EM 2:1	98.130 \pm 3.23
04:01 NSM 1:1	63.033 \pm 0.84

04:01 NSM 2:1	70.506 ± 0.14
09:01 PQ:CH	0 ± 0
09:01 EM 1:1	3.686 ± 0.35
09:01 EM 2:1	70.816 ± 1.20
09:01 NSM 1:1	29.660 ± 0.31
09:01 NSM 2:1	68.220 ± 0.23

Se muestra la media de los tratamientos ± la desviación estándar (n=10). Letras iguales indican que no hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba Tukey ($\alpha=0.05$).

Los datos obtenidos en el presente estudio concuerdan con los que reportan Maness y Zubov (2019), quienes realizaron recubrimientos comestibles de almidones modificados y muestran valores de inhibición de 79.4% contra *R. stolonifer* durante 21 días.

6.6 Encapsulación de *L. lactis* UQ2

Por medio de la técnica de secado por aspersión, se obtuvieron microcápsulas de entre 5 y 9 μm aproximadamente (figura 29). Se observa una formación correcta de encapsulado. Se obtuvo una eficiencia de encapsulado de 80.02%, mientras que la viabilidad de las células durante el encapsulado fue de 57.2%. las capsulas obtenidas presentaron formas esféricas, con hundimientos en la superficie. Las capsulas más pequeñas muestran tendencia a formar aglomerados. La morfología de las capsulas corresponde a la reportada por diversos autores, como Fazilah *et al.*, (2019), que reportan capsulas de forma esférica.

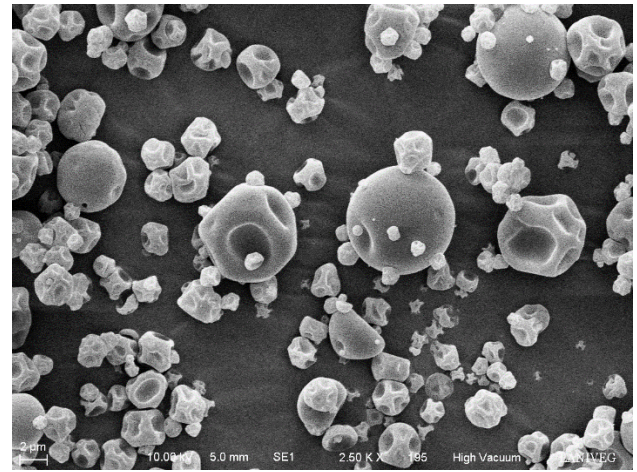
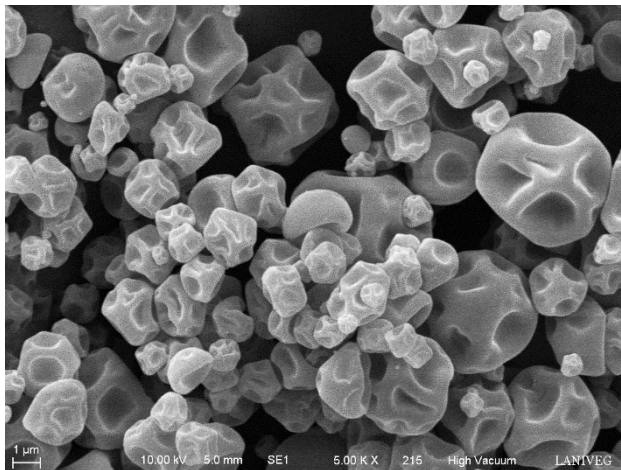
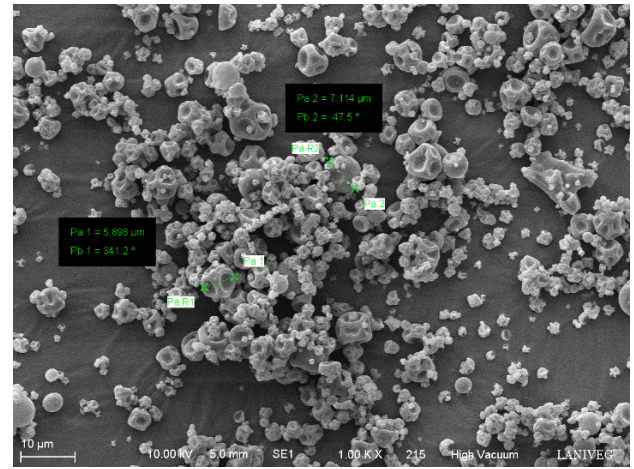
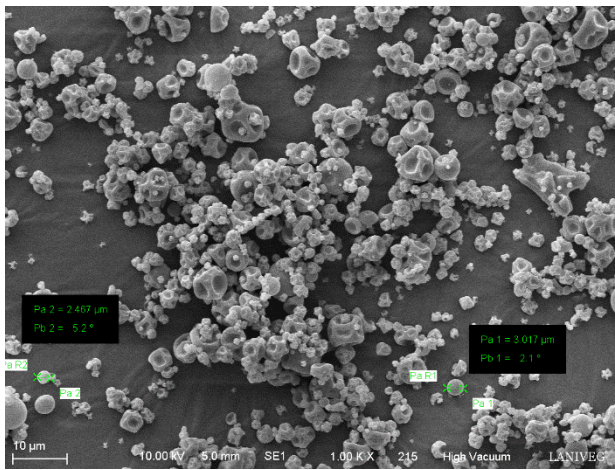


Figura 29. Capsulas de *L. lactis* UQ2 obtenidas mediante secado por aspersión

Se observan pequeñas abolladuras en las capsulas obtenidas, si bien no se llega a ver poros o alguna otra imperfección en las mismas. Dichas abolladuras podrían deberse principalmente a cambios en la temperatura dentro del equipo al momento de realizarse el encapsulado.

6.7 Bioconservación de pan de masa madre mediante la adición del recubrimiento comestible y capsulas de *L. lactis* UQ2

6.7.1 Perfil de textura

La textura del pan es uno de los atributos sensoriales que mayor impacto tienen en los consumidores (Sun *et al.*, 2020). La dureza del producto terminado es uno de los principales factores de deterioro causantes del desperdicio de productos de panificación (Axel *et al.*, 2017).

La figura 30 muestra el impacto de los tratamientos aplicados en la dureza (N) del pan de masa madre a lo largo del estudio de vida de anaquel acelerada. A partir del día 3.5 se observa de manera significativa un incremento en la dureza del pan control comparado con aquellos panes a los que se les aplicaron el recubrimiento comestible, las bacterias ácido lácticas o ambos, manteniendo dicha tendencia a lo largo del estudio.

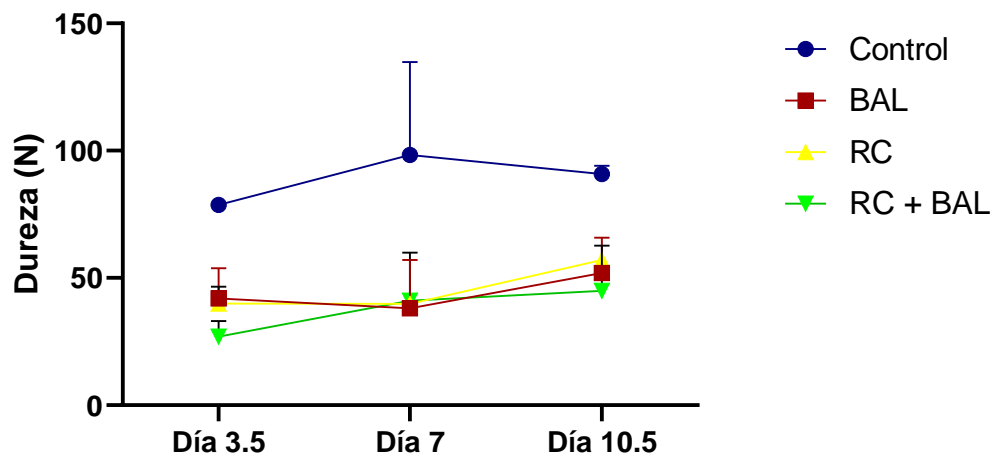


Figura 30. Dureza de los panes de masa madre almacenados en una cámara climática. Control: pan control, BAL: pan adicionado con bacterias ácido lácticas sin recubrimiento, RC: pan con recubrimiento sin bacterias ácido lácticas, RC + BAL: pan con recubrimiento y bacterias ácido lácticas

Se sabe que la masa madre tiende a alargar la vida de anaquel del pan al cual se adiciona debido, entre otras cosas, a la acción de las bacterias ácido lácticas (Nionelli y Rizzello, 2016). El mecanismo de acción de estas bacterias para impactar en la textura del pan se debe, principalmente, a la acidificación que las BAL otorgan al producto terminado, lo cual tiene un impacto directo en la estructura de diversos compuestos, como el gluten o el almidón (Melini y Melini, 2018). En el análisis realizado, se observa un incremento en la dureza del pan adicionado con bacterias ácido lácticas a partir del día 10.5 (aunque los valores siguen por debajo de aquellos reportados en el control, sin bacterias ácido lácticas).

Se ha reportado que los recubrimientos comestibles con bajos valores de permeabilidad al vapor de agua influyen de manera positiva en el retraso de la deshidratación, disminución de la respiración, mejoras de la calidad de la textura de los productos terminados (Rossi Marquez *et al.*, 2014) así como para prevenir la pérdida de la textura crujiente y la migración de la humedad (Chakravartula *et al.*, 2019). La dureza del pan (*staling* en inglés) es un fenómeno principalmente causado por la retrodegradación del almidón, aparece durante la pérdida de humedad durante el almacenamiento del producto. Los tratamientos a los cuales fue adicionado el recubrimiento comestible reportan menores valores de dureza a lo largo del estudio a comparación con el control, lo cual podría sugerir que la baja permeabilidad a vapor de agua tiene un incremento positivo en la conservación de la textura del pan. Todos los tratamientos conservaron valores de dureza bajos a comparación del control para el día 10.5 de almacenamiento.

6.7.2 Color

Los parámetros de color se midieron a lo largo del estudio de vida de anaquel, son presentados en la tabla 14. Los valores de luminosidad (L*) presentaron una disminución significativa en el control, mientras que en los tratamientos adicionados con el recubrimiento comestible mantuvieron estables sus valores. Esto parece indicar que el recubrimiento comestible no afecta las características externas de luminosidad en el producto. Para las coordenadas a* (espectro rojo a verde) y b* (espectro amarillo a azul) tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas en los diferentes días de almacenamiento, lo cual parece indicar que el recubrimiento comestible no tiene efecto sobre las características de color del pan, algo que se refuerza con los valores de opacidad reportados en la sección 6.5.3.3, los cuales indicaban que el material obtenido tiende a ser translúcido (valores de opacidad menores a 50%)

Tabla 14. Valores de color obtenidos durante el estudio de vida de anaquel

Tratamiento	Día 3.5			Día 7			Día 10.5		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*

Control	53.89 ± 6.76 ^a	13.00 ± 3.82 ^a	28.87 ± 6.03 ^a	47.44 ± 5.47 ^a	12.88 ± 1.51 ^a	25.31 ± 5.93 ^a	42.54 ± 5.45 ^a	11.51 ± 1.48 ^a	27.76 ± 2.73 ^a
BAL	57.98 ± 1.53 ^a	15.42 ± 2.55 ^b	34.29 ± 2.22 ^b	58.69 ± 7.94 ^b	6.08 ± 0.64 ^b	22.16 ± 4.49 ^b	66.01 ± 9.27 ^b	13.09 ± 3.49 ^a	30.00 ± 3.25 ^a
Película	57.49 ± 9.50 ^a	13.13 ± 4.27 ^a	28.90 ± 6.54 ^a	58.58 ± 3.07 ^b	12.82 ± 5.67 ^a	23.83 ± 6.44 ^b	58.63 ± 9.32 ^c	10.47 ± 2.05 ^b	31.44 ± 6.14 ^a
Película + BAL	58.14 ± 2.32 ^a	13.28 ± 1.57 ^a	31.62 ± 1.68 ^a	63.91 ± 7.28 ^c	7.94 ± 2.65 ^b	25.26 ± 3.64 ^a	59.04 ± 2.53 ^c	14.68 ± 5.30 ^a	33.09 ± 3.91 ^b

Se muestra la media de los tratamientos ± la desviación estándar (n=10). Letras iguales indican que no hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba Tukey ($\alpha=0.05$).

En la tabla 15, se observan las coordenadas de los distintos tratamientos en la paleta de colores. Los cambios más evidentes se dan en aquellos tratamientos a los cuales no fue adicionado el recubrimiento comestible, debido a que las mediciones de color fueron realizadas únicamente en la corteza exterior del pan.

Cuando se aplica un recubrimiento comestible, es preferible que el tratamiento no tenga un impacto directo sobre la apariencia del producto, puesto que puede influir en la aceptación por parte de los consumidores (Kumar *et al.*, 2021). Los datos de color obtenidos durante el presente estudio

Tabla 15. Espectro de colores de las coordenadas L*, a* y b* de los tratamientos

Tratamiento	Paleta de colores		
	Día 3.5	Día 7	Día 10.5
Control			
BAL			
Película			
Película + BAL			

6.7.3 Estudio microbiológico de la vida de anaquel

6.7.3.1 Conteo de hongos y levaduras

Se evaluaron los microorganismos siguiendo el método indicado en la NOM-247-SSA1-2008 y los resultados se reportaron en la tabla 16. En todos los tratamientos se mantuvo el número de colonias por debajo de los límites máximos permitidos establecidos por la norma (300 UFC/g), una tendencia que permaneció a lo largo del estudio (10.5 días). Cabe destacar que los únicos tratamientos donde no se observó ningún tipo de crecimiento de microorganismos fueron aquellos en los cuales se adicionó el recubrimiento comestible, comprobando así el efecto antifúngico del mismo y el efecto de bioconservación cuando son adicionados al pan, atribuyendo dicho efecto directamente al recubrimiento y a la acción antifúngica de los aceites esenciales presentes en él. Se aclara que se considera “valor estimado” por encontrarse fuera de los rangos de especificación de la NOM-092-SSA1-1994.

Tabla 16. Resultados del conteo de hongos y levaduras

Tratamiento		3.5 días	7 días	10.5 días
Control	No. Colonias	0	2 (10^{-1})	6 (10^{-1})
	UFC/g	0	20	60
	Resultado	Valor estimado <10 UFC/g	Valor estimado 20 UFC/g	Valor estimado 60 UFC/g
Película	No. Colonias	0	0	0
	UFC/g	0	0	0
	Resultado	Valor estimado <10 UFC/g	Valor estimado <10 UFC/g	Valor estimado <10 UFC/g
BAL	No. Colonias	0	1 (10^{-2})	2 (10^{-2})
	UFC/g	0	100	200
	Resultado	Valor estimado <10 UFC/g	Valor estimado 100 UFC/g	Valor estimado 200 UFC/g
	No. Colonias	0	0	0

Películas + bacterias	UFC/g	0	0	0
	Resultado	Valor estimado <10 UFC/g	Valor estimado <10 UFC/g	Valor estimado <10 UFC/g

Hu *et al.*, (2019) elaboraron panes de masa madre y evaluaron el efecto de la misma en la vida de anaquel del producto, reportando la aparición de hongos a partir del día 6 de almacenamiento. En el presente estudio, aún en el día 10.5 de almacenamiento, no se observó aparición de hongos en los panes con recubrimiento.

6.7.3.2 Coliformes totales

En un alimento la aparición de coliformes totales es uno de los principales indicadores de malas prácticas de higiene durante la preparación del mismo. En el pan, generalmente se reportan apariciones de estos microorganismos debido a contaminaciones en la harina o utensilios con los cuales es preparado el producto.

En la tabla 17 se reportan los resultados obtenidos del conteo de coliformes totales. No se reporta crecimiento en ninguno de los tratamientos, lo cual indica que estos fueron correctamente elaborados siguiendo las buenas prácticas de higiene recomendadas por las normas oficiales mexicanas.

Tratamiento		1er día	2do día	3 días
Control	No. Colonias	0	0	0
	UFC/g	0	0	0
	Resultado	Valor estimado <10 UFC/g	Valor estimado <10 UFC/g	Valor estimado <10 UFC/g
Película y sin bacteria	No. Colonias	0	0	0
	UFC/g	0	0	0
	Resultado	Valor estimado <10 UFC/g	Valor estimado <10 UFC/g	Valor estimado <10 UFC/g
	No. Colonias	0	0	0

Bacterias y sin película	UFC/g	0	0	0
	Resultado	Valor estimado <10 UFC/g	Valor estimado <10 UFC/g	Valor estimado <10 UFC/g
Películas + bacterias	No. Colonias	0	0	0
	UFC/g	0	0	0
	Resultado	Valor estimado <10 UFC/g	Valor estimado <10 UFC/g	Valor estimado <10 UFC/g

Tabla 17. Resultados del conteo de hongos y levaduras

Los resultados obtenidos de los análisis microbiológicos, pruebas de color y perfil de textura indican que se logró realizar el efecto de bioconservación esperado al momento de administrar los tratamientos. Se considera que la vida útil del pan de masa madre almacenado a temperatura ambiente es de 5 a 7 días, por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren un incremento en la vida de anaquel de 3 días cuando se aplican los tratamientos.

6.8 Análisis sensorial de los panes con recubrimiento comestible y bacterias ácido lácticas

Se realizó una prueba sensorial con escala hedónica de 9 puntos a un panel de 50 jueces no entrenados. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el nivel de aceptación de los tratamientos (figura 31), lo que indica que todos los panes tienen niveles parecidos de aceptación por parte de los consumidores.

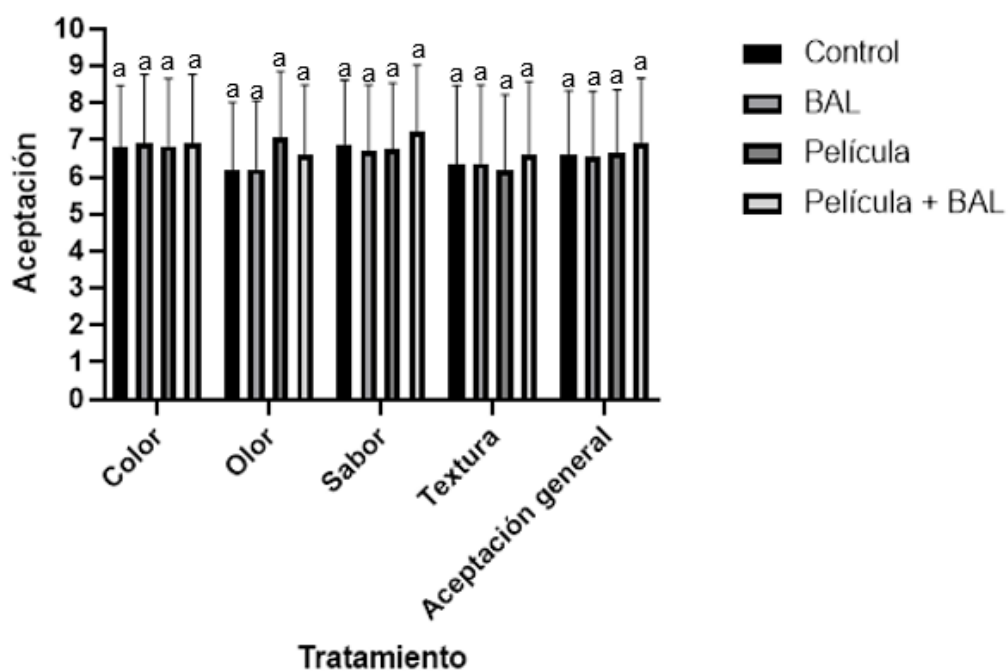


Figura 31. Niveles de aceptación de los diversos atributos del producto y aceptación general del mismo en una escala hedónica de 9 puntos.

Se recopiló la información y se presentaron los resultados de aceptación general en la tabla 18. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras, lo cual indica que todos obtuvieron valores de aceptación similares.

Tabla 18. Niveles de aceptación general obtenidos en la evaluación sensorial

Muestra	Aceptación general
531	6.61 ± 1.72 ^a
489	6.57 ± 1.75 ^a
710	6.64 ± 1.72 ^a
612	6.93 ± 1.74 ^a

Se muestra la media de los tratamientos \pm la desviación estándar (n=10). Letras iguales indican que no hay diferencia significativa de acuerdo a la prueba Tukey ($\alpha=0.05$).

Todas las muestras obtuvieron valores entre 6 y 7 puntos, lo cual, de acuerdo a la escala hedónica utilizada, se reporta como los valores de “me gusta un poco” y “me gusta”. Esto podría deberse a diversos factores, principalmente relacionados con el panel de consumidores no entrenados. El pan de masa madre es un pan con un nivel de acidez y textura características, lo cual podría haber tenido impacto en la aceptación de los consumidores, especialmente en aquellos que no estén habituados a consumir este tipo de productos regularmente.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el control y los tratamientos con película y bacterias ácido lácticas, lo cual indica que el recubrimiento puede ser aplicado al pan de masa madre y no interferirá con los atributos sensoriales del producto terminado.

7. CONCLUSIONES

El método de extracción de aceites esenciales por arrastre de vapor resulta más efectivo cuando se le realizan pre tratamientos de sonicación. Los aceites esenciales de hierba limón y canela presentan propiedades antifúngicas contra *Rhizopus stolonifer* ya sea en combinación o separados.

Las partículas de sílice mesoporosa resultan una matriz adecuada para la encapsulación de aceites esenciales, conservando su actividad antimicrobiana.

La proteína de quinoa y quitosano obtiene una solución homogénea, estable y monodispersa. La adición de partículas de sílice mesoporosa cargadas con aceites esenciales otorga al recubrimiento características antimicrobianas contra *Rhizopus stolonifer* y provee refuerzo a la matriz de polímeros, obteniendo como resultado una película flexible y delgada, con alta solubilidad. De acuerdo con los resultados de la evaluación sensorial, el recubrimiento no interfiere con las características del pan al cual es aplicado.

Se encapsuló de manera exitosa *L. lactis* UQ2, obteniendo un alto rendimiento de encapsulación y viabilidad celular. La adición de las capsulas a la masa del pan no afectó el nivel de aceptación sensorial por parte de los consumidores.

La bioconservación de pan de masa madre mediante recubrimientos comestibles y bacterias ácido lácticas encapsuladas es una técnica que puede implementarse para alargar de manera exitosa la vida de anaquel de pan producido artesanalmente, alargando la vida de anaquel 2 días más.

8. REFERENCIAS

1. Abugoch, L., Castro, E., Tapia, C., Añón, M. C., Gajardo, P., & Villarroel, A. (2009). Stability of quinoa flour proteins (*Chenopodium quinoa* Willd.) during storage. *International Journal of Food science & Technology*, 44(10), 2013-2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02023.x>
2. Alak, G., Guler, K., Ucar, A., Parlak, V., Kocaman, E. M., Yanik, T., & Atamanalp, M. (2019). Quinoa as polymer in edible films with essential oil: Effects on rainbow trout fillets shelf life. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(12), e14268. DOI: 10.1111/jfpp.14268
3. Arredondo-Ochoa, T., Regalado-González, C., & Martín-Belloso, O. (2018). Current processing methods in the development of micro-and nanoencapsulation from edible polymers. In *Polymers for Food Applications* (pp. 423-445). Springer, Cham.
4. Avila-Sosa, R., Palou, E., Jiménez Munguía, M. T., Nevárez-Moorillón, G. V., Navarro Cruz, A. R., & López-Malo, A. (2012). Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. *International Journal of Food Microbiology*, 153(1–2), 66–72. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.017>
5. Axel, C.; Zannini, E.; Arendt, E.K. Mold spoilage of bread and its biopreservation: A review of current strategies for bread shelf life extension. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2017, 57, 3528–3542. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1147417>
6. Barbosa, J. R., Silva, S. B. D., Silva Martins, L. H. D., Bezerra, F. W. F., Freitas, L. C., Ferreira, M. C. R., & Carvalho Junior, R. N. D. (2021). Microbial Degradation of Food Products. In *Recent Advances in Microbial Degradation* (pp. 155-172). Springer, Singapore.
7. Bermúdez-Vásquez, M. J., Granados-Chinchilla, F., & Molina, A. (2019). Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Psidium guajava* y *Cymbopogon citratus*. *Agronomía Mesoamericana*, 30(1), 147-163. DOI: <http://dx.doi.org/10.15517/am.v30i1.33758>

8. Boyaci, D., Korel, F., & Yemenicioğlu, A. (2016). Development of activate-at-home-type edible antimicrobial films: An example pH-triggering mechanism formed for smoked salmon slices using lysozyme in whey protein films. *Food Hydrocolloids*, 60, 170–178. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.03.032>
9. Cadena, M. B., 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.081>
10. Caleffi-Ferracioli, K. R., Maltempe, F. G., Siqueira, V. L. D., & Cardoso, R. F. (2013). Fast detection of drug interaction in *Mycobacterium tuberculosis* by a checkerboard resazurin method. *Tuberculosis*, 93(6), 660-663. DOI: [10.1016/j.tube.2013.09.001](https://doi.org/10.1016/j.tube.2013.09.001)
11. Canesin, M. R., & Cazarin, C. B. B. (2021). Nutritional quality and nutrient bioaccessibility in sourdough bread. *Current Opinion in Food Science*, 40, 81-86. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.007>
12. Cecchini, J. P., Spotti, M. J., Piagentini, A. M., Milt, V. G., & Carrara, C. R. (2017). Development of edible films obtained from submicron emulsions based on whey protein concentrate, oil/beeswax and brea gum. *Food Science and Technology International*, 23(4), 371-381. DOI: [10.1177/1082013217695170](https://doi.org/10.1177/1082013217695170)
13. Chaudhari, S. S., & Gokhale, D. V. (2016). Phenyllactic acid: A potential antimicrobial compound in lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology and Mycology. Open Access*, 2(1). DOI: [10.15406/jbmoa.2016.02.00037](https://doi.org/10.15406/jbmoa.2016.02.00037)
14. Chakravartula, S. S. N., Soccio, M., Lotti, N., Balestra, F., Dalla Rosa, M., & Siracusa, V. (2019). Characterization of composite edible films based on pectin/alginate/whey protein concentrate. *Materials*, 12(15), 2454. DOI: [10.3390/ma12152454](https://doi.org/10.3390/ma12152454)
15. Chou, T. C. (2022). Mathematical definitions of “additive effect of two (or more) drugs” and their synergism and/or antagonism based on mass-action

- law (MAL) algorithms for pharmacodynamics (PD), biodynamics (BD) and bioinformatics (BI) simulations. *The FASEB Journal*, 36. DOI: <https://doi.org/10.1096/fasebj.2022.36.S1.0R290>
16. Clemente, I., Aznar, M., & Nerín, C. (2019). Synergistic properties of mustard and cinnamon essential oils for the inactivation of foodborne moulds *in vitro* and on Spanish bread. *International Journal of Food Microbiology*, 298, 44-50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.03.012>
 17. Coda, R., Cassone, A., Rizzello, C. G., Nionelli, L., Cardinali, G., & Gobbetti, M. (2011). Antifungal activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during sourdough fermentation: identification of novel compounds and long-term effect during storage of wheat bread. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(10), 3484–3492. DOI: 10.1128/AEM.02669-10
 18. Coda, R., Rizzello, C. G., Nigro, F., De Angelis, M., Arnault, P., & Gobbetti, M. (2008). Long-term fungal inhibitory activity of water-soluble extracts of *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto and sourdough lactic acid bacteria during bread storage. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(23), 7391-7398. DOI: 10.1128/AEM.01420-08
 19. Davoodi, S., Davachi, S. M., Ghorbani Golkhajeh, A., Shekarabi, A. S., & Abbaspourrad, A. (2020). Development and characterization of *Salvia macrosiphon*/chitosan edible films. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(3), 1487-1496.
 20. Debonne, E., Van Bockstaele, F., Samapundo, S., Eeckhout, M., & Devlieghere, F. (2018). The use of essential oils as natural antifungal preservatives in bread products. *Journal of Essential Oil Research*, 30(5), 309-318. DOI: 10.1080/10408398.2018.1525601
 21. Denkova-Kostova, R., Teneva, D., Tomova, T., Goranov, B., Denkova, Z., Shopska, V., ... & Hristova-Ivanova, Y. (2021). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of essential oils from tangerine (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.), lemon (*Citrus lemon* L.) and

- cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 76(5-6), 175-185. DOI: <https://doi.org/10.1515/znc-2020-0126>
22. Desai, M. A., Parikh, J., & De, A. K. (2014). Modelling and optimization studies on extraction of lemongrass oil from *Cymbopogon flexuosus* (Steud.) Wats. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(5), 793-803. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2013.08.011>
23. Di Pierro, P., Chico, B., Villalonga, R., Mariniello, L., Damiao, A. E., Masi, P., & Porta, R. (2006). Chitosan– whey protein edible films produced in the absence or presence of transglutaminase: Analysis of their mechanical and barrier properties. *Biomacromolecules*, 7(3), 744-749. DOI: <https://doi.org/10.1021/bm050661u>
24. Duca, A., Borcan, F., Muntean, D. M., Alexa, E. C., & Soica, C. M. (2019). Formulation and characterization of polyurethane microstructures with propolis extract. *Materiale Plastice*, 56(2), 321. DOI: 10.37358/MP.19.2.5179
25. Escamilla-García, M., Delgado-Sánchez, L. F., Ríos-Romo, R. A., García-Almendárez, B. E., Calderón-Domínguez, G., Méndez-Méndez, J. V., ... & Regalado-González, C. (2019). Effect of transglutaminase cross-linking in protein isolates from a mixture of two quinoa varieties with chitosan on the physicochemical properties of edible films. *Coatings*, 9(11), 736. DOI: <https://doi.org/10.3390/coatings9110736>
26. Embuscado, M. E., & Huber, K. C. (2009). Edible films and coatings for food applications (Vol. 9). New York, NY, USA:: Springer.
27. Fajar, A., Ammar, G. A., Hamzah, M., Manurung, R., & Abduh, M. Y. (2019). Effect of tree age on the yield, productivity, and chemical composition of essential oil from *Cinnamomum burmannii*. *Current Research on Biosciences and Biotechnology*, 1(1), 17-22. DOI: 10.5614/crbb.2019.1.1
28. Fernández-Peláez, J., Paesani, C., & Gómez, M. (2020). Sourdough technology as a tool for the development of healthier grain-based products: an update. *Agronomy*, 10(12), 1962. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy10121962>

29. Frakolaki, G., Giannou, V., Kekos, D., & Tzia, C. (2020). A review of the microencapsulation techniques for the incorporation of probiotic bacteria in functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–22. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1761773>
30. Gerez, C. L., Torino, M. I., Rollán, G., & de Valdez, G. F. (2009). Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food control*, 20(2), 144-148. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.03.005>
31. Ghodki, B. M., & Goswami, T. K. (2016). Physico-thermal and flavoring characteristics of essential oil of cassia. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(4), 854-862. DOI: <https://doi.org/10.1080/0972060X.2016.1187091>
32. 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.015>
33. Global Sourdough Market (2018). Sourdough Market Size, Share & Trends Analysis Report By Type, By Application (Breads, Cookies, Cakes, Waffles, Pizza), By Region, Competitive Landscape, And Segment Forecasts, 2019 - 2025. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/sourdough-market>
34. Haffner, F. B., Diab, R., & Pasc, A. (2016). Encapsulation of probiotics: insights into academic and industrial approaches. *AIMS Materials Science*, 3(1), 114-136. DOI: 10.3934/matricsci.2016.1.114
35. Han, J. H. (2014). Edible films and coatings: a review. *Innovations in Food Packaging*, 213-255. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00009-6>
36. 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.097>

37. He, J., Wu, D., Zhang, Q., Chen, H., Li, H., Han, Q., ... & Qin, W. (2018). Efficacy and mechanism of cinnamon essential oil on inhibition of *Colletotrichum acutatum* isolated from 'Hongyang' kiwifruit. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1288. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01288
38. 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* HBK) and European (*Origanum vulgare* L.) oregano essential oils. *The Scientific World Journal*, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/641814>
39. Hernández-Téllez, C. N., Plascencia-Jatomea, M., & Cortez-Rocha, M. O. (2016). Chitosan-based bionanocomposites: development and perspectives in food and agricultural applications. En: Bautista-Baños, S., Romanazzi, G., & Jiménez-Aparicio, A. (Eds.), *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities 12*, (pp. 315-338). USA: Academic Press/Elsevier
40. Hu, F., Tu, X. F., Thakur, K., Hu, F., Li, X. L., Zhang, Y. S., ... & Wei, Z. J. (2019). Comparison of antifungal activity of essential oils from different plants against three fungi. *Food and Chemical Toxicology*, 134, 110821. DOI: 10.1016/j.fct.2019.110821
41. Jadhav, H., Jadhav, A., Morabiya, Y., Takkalkar, P., Qureshi, S. S., Baloch, A. G., ... & Mubarak, N. M. (2021). Combined impact of ultrasound pre-treatment and hydrodistillation on bioactive compounds and GC–MS analysis of *Cinnamomum cassia* bark extract. *Waste and Biomass Valorization*, 12(2), 807-821. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01031-3>
42. Jeevahan, J. J., Chandrasekaran, M., Venkatesan, S. P., Sriram, V., Joseph, G. B., Mageshwaran, G., & Durairaj, R. B. (2020). Scaling up difficulties and commercial aspects of edible films for food packaging: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 100, 210-222. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.014>
43. Kareb, O., & Aïder, M. (2020). Quorum sensing circuits in the communicating mechanisms of bacteria and its implication in the biosynthesis of bacteriocins

- by lactic acid bacteria: a review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(1), 5-17. DOI: 10.1007/s12602-019-09555-4
44. Kavitate, D., Kandasamy, S., Devi, P. B., & Shetty, P. H. (2018). Recent developments on encapsulation of lactic acid bacteria as potential starter culture in fermented foods – A review. *Food Bioscience*, 21(17), 34–44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.11.003>
45. Kong, Y., Gao, C., Du, X., Zhao, J., Li, M., Shan, X., & Wang, G. (2020). Effects of single or conjoint administration of lactic acid bacteria as potential probiotics on growth, immune response and disease resistance of snakehead fish (*Channa argus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 102, 412-421. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.05.003>
46. Kumar, L., Ramakanth, D., Akhila, K., & Gaikwad, K. K. (2021). Edible films and coatings for food packaging applications: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 1-26. DOI: 10.1007/s10311-021-01339-z
47. Lal, M., Dutta, S., Munda, S., & Pandey, S. K. (2018). Identification and registration of a high essential oil yielding variety (Jor Lab L-14) of Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* L.) through mutation breeding technique. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(6), 1604-1611. DOI: <https://doi.org/10.1080/0972060X.2018.1559105>
48. Lavermicocca, P., Valerio, F., De Bellis, P., Sisto, A., & Leguérinel, I. (2016). Sporeforming bacteria associated with bread production: spoilage and toxigenic potential. In *Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-eat foods* (pp. 275-293). Academic Press.
49. Lee, J. E., Seo, S. M., Huh, M. J., Lee, S. C., & Park, I. K. (2020). Reactive oxygen species mediated-antifungal activity of cinnamon bark (*Cinnamomum verum*) and lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oils and their constituents against two phytopathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 168, 104644. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104644>
50. Leon-Méndez, G., Osorio-Fortich, M., Ortega-Toro, R., Pajaro-Castro, N., Torrenegra-Alarcón, M., & Herrera-Barros, A. (2018). Design of an emulgel-type cosmetic with antioxidant activity using active essential oil microcapsules

of thyme (*Thymus vulgaris L.*), Cinnamon (*Cinnamomum verum J.*), and clove (*Eugenia caryophyllata T.*). *International Journal of Polymer Science*, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/2874391>

51. Li, C., Pei, J., Xiong, X., & Xue, F. (2020). Encapsulation of grapefruit essential oil in emulsion-based edible film prepared by plum (*Pruni domesticae* semen) seed protein isolate and gum acacia conjugates. *Coatings*, 10(8), 784. DOI: 10.3390/coatings10080784
52. Llinàs, M. C., & Sánchez-García, D. (2014). Nanopartículas de sílice: preparación y aplicaciones en biomedicina. *Afinidad*, 71(565).
53. Loeffler, M., Beiser, S., Suriyarak, S., Gibis, M., & Weiss, J. (2014). Antimicrobial efficacy of emulsified essential oil components against weak acid-adapted spoilage yeasts in clear and cloudy apple juice. *Journal of food protection*, 77(8), 1325-1335.
54. Lu, G. W., & Gao, P. (2010). Emulsions and microemulsions for topical and transdermal drug delivery. In *Handbook of non-invasive drug delivery systems* (pp. 59-94). William Andrew Publishing.
55. Luz, C., Izzo, L., Ritieni, A., Manes, J., & Meca, G. (2020). Antifungal and antimycotoxigenic activity of hydrolyzed goat whey on *Penicillium* spp: An application as biopreservation agent in pita bread. *Lwt*, 118, 108717.
56. Mahmoodnia, L., Aghadavod, E., & Rafieian-Kopaei, M. (2017). Ameliorative impact of cinnamon against high blood pressure; an updated review. *Journal of Renal Injury Prevention*, 6(3), 171-176.
57. Majewska, E., Kozłowska, M., Gruszczynska-Sekowska, E., Kowalska, D., & Tarnowska, K. (2019). Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil: extraction, composition, bioactivity and uses for food preservation-a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 69(4).
58. Man, A., Santacroce, L., Iacob, R., Mare, A., & Man, L. (2019). Antimicrobial activity of six essential oils against a group of human pathogens: A comparative study. *Pathogens*, 8(1), 15.

59. Maness, L. R., & Zubov, T. (2019). The inhibitory effect of essential oils on *Rhizopus stolonifer*, *Trichophyton mentagrophytes*, and *Microsporum gypseum*. *Laboratory Medicine*, 50(2), e18-e22.
60. Martín-Cabrejas, I., Langa, S., Gaya, P., Rodríguez, E., Landete, J. M., Medina, M., & Arqués, J. L. (2017). Optimization of reuterin production in cheese by *Lactobacillus reuteri*. *Journal of food science and technology*, 54(5), 1346-1349.
61. Martín-Cabrejas, I., Langa, S., Gaya, P., Rodríguez, E., Landete, J. M., Medina, M., & Arqués, J. L. (2017). Optimization of reuterin production in cheese by *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Food Science and Technology*, 54(5), 1346-1349.
62. Martínez, J. (3 de julio de 2019). Tendencias de panadería en México y el mundo. Universidad del Claustro de Sor Juana. <https://www.elclastro.edu.mx/claustro/nomia/index.php/investigacion/item/120-tendencias-de-panaderia-en-mexico-y-el-mundo>
63. Mataraci, E., & Dosler, S. (2012). In vitro activities of antibiotics and antimicrobial cationic peptides alone and in combination against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(12), 6366-6371.
64. Matiacevich, S., Acevedo, N., & López, D. (2015). Characterization of edible active coating based on alginate–thyme oil–propionic acid for the preservation of fresh chicken breast fillets. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 2792-2801.
65. Melini, V., & Melini, F. (2018). Strategies to extend bread and GF bread shelf-life: From Sourdough to antimicrobial active packaging and nanotechnology. *Fermentation*, 4(1), 9.
66. Mohamed, S. A., El-Sakhawy, M., & El-Sakhawy, M. A. M. (2020). Polysaccharides, protein and lipid-based natural edible films in food packaging: A review. *Carbohydrate Polymers*, 238, 116178.
67. Mohammadi Nafchi, A., Olfat, A., Bagheri, M., Nouri, L., Karim, A. A., & Ariffin, F. (2017). Preparation and characterization of a novel edible film based on

- Alyssum homolocarpum seed gum. Journal of food science and technology, 54(6), 1703-1710.
68. Morsy, N. F. (2015). A short extraction time of high quality hydrodistilled cardamom (*Elettaria cardamomum* L. Maton) essential oil using ultrasound as a pretreatment. *Industrial Crops and Products*, 65, 287-292.
69. Mudalige, T., Qu, H., Van Haute, D., Ansar, S. M., Paredes, A., & Ingle, T. (2019). Characterization of nanomaterials: Tools and challenges. *Nanomaterials for food applications*, 313-353.
70. Nasrollahzadeh, A., Mokhtari, S., Khomeiri, M., & Saris, P. E. (2022). Antifungal preservation of food by lactic acid bacteria. *Foods*, 11(3), 395.
71. Navarro-Cruz, A. R., Ochoa-Velasco, C. E., Caballero-Alvarez, F. J., Lazcano-Hernández, M. A., Vera-Lopez, O., Lopez-Malo, A., & Avila-Sosa, R. (2018). Effect of pH and Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) essential oil added to carboxymethyl cellulose and starch edible films on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Quality*, 2018.
72. Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & Feo, V. D. (2017). Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals*, 10(4), 86.
73. Nguyen, T. T., Dao, U. T. T., Bui, Q. P. T., Bach, G. L., Thuc, C. H., & Thuc, H. H. (2020). Enhanced antimicrobial activities and physicochemical properties of edible film based on chitosan incorporated with *Sonneratia caseolaris* (L.) Engl. leaf extract. *Progress in Organic Coatings*, 140, 105-487.
74. Nikkhah, M., Hashemi, M., Najafi, M. B. H., & Farhoosh, R. (2017). Synergistic effects of some essential oils against fungal spoilage on pear fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 25
75. Nionelli, L., & Rizzello, C. G. (2016). Sourdough-based biotechnologies for the production of gluten-free foods. *Foods*, 5(3), 65.
76. Ochoa, T. A. (2019). Diseño y caracterización de una nanoemulsión antimicrobiana a base de almidón y cera de abeja para su uso como recubrimiento comestible.

77. Olicón-Hernández, D. R., Acosta-Sánchez, Á., Monterrubio-López, R., & Guerra-Sánchez, G. (2019). Chitosan and *Opuntia ficus-indica* mucilage as the base of a polymeric edible film for the protection of tomatoes against *Rhizopus stolonifer*. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 22(1), 1-9.
78. Oliveira, M. A., Gonzaga, M. L., Bastos, M. S., Magalhães, H. C., Benevides, S. D., Furtado, R. F., ... & Garruti, D. S. (2020). Packaging with cashew gum/gelatin/essential oil for bread: Release potential of the citral. *Food Packaging and Shelf Life*, 23, 100431.
79. Ortega-Toro, R., Muñoz, A., Talens, P., & Chiralt, A. (2016). Improvement of properties of glycerol plasticized starch films by blending with a low ratio of polycaprolactone and/or polyethylene glycol. *Food Hydrocolloids*, 56, 9–19.
80. Palma, F., Michniak-Kohn, B., Pérez-Correa, J. R., Hernandez, E., Romañach, R. J., & Valenzuela, L. M. (2016). Near-infrared chemical imaging and its correlation with the mechanical properties of chitosan–gelatin edible films. *Carbohydrate polymers*, 136, 409-417.
81. Patiño Galván, H. (2014). Micro encapsulación de nisina a partir de *Lactococcus lactis* UQ2 y su incorporación en queso tipo panela (Doctoral dissertation).
82. Peach, D. A., Almond, M., Gries, R., & Gries, G. (2019). Lemongrass and cinnamon bark: plant essential oil blend as a spatial repellent for mosquitoes in a field setting. *Journal of Medical Entomology*, 56(5), 1346-1352.
83. Perdana, M. I., Ruamcharoen, J., Panphon, S., & Leelakriangsak, M. (2021). Antimicrobial activity and physical properties of starch/chitosan film incorporated with lemongrass essential oil and its application. *LWT*, 141, 110934.
84. Petraitytė, S., & Šipailienė, A. (2019). Enhancing encapsulation efficiency of alginate capsules containing lactic acid bacteria by using different divalent cross-linkers sources. *Lwt*, 110, 307-315.
85. Quattrini, M., Bernardi, C., Masotti, F., Passera, A., Ricci, G., Vallone, L., Noni, I. De, Brasca, M., Fortina, M. G., & Sciences, N. (2018). Functional

- characterization of *Lactobacillus plantarum* ITEM 17215: a potential biocontrol agent of fungi with plant growth promoting traits, able to enhance the nutritional value of cereal products. *Food Research International*, 106, 1–39.
86. Quilez, J., & Salas-Salvado, J. (2012). Salt in bread in Europe: potential benefits of reduction. *Nutrition reviews*, 70(11), 666-678.
87. Ribes, S., Ruiz-Rico, M., Pérez-Esteve, É., Fuentes, A., & Barat, J. M. (2019). Enhancing the antimicrobial activity of eugenol, carvacrol and vanillin immobilised on silica supports against *Escherichia coli* or *Zygosaccharomyces rouxii* in fruit juices by their binary combinations. *LWT*, 113, 108326.
88. Ríos-de-Benito, L. F., Escamilla-García, M., García-Almendárez, B., Amaro-Reyes, A., Di Pierro, P., & Regalado-González, C. (2021). Design of an Active Edible Coating Based on Sodium Caseinate, Chitosan and Oregano Essential Oil Reinforced with Silica Particles and Its Application on Panela Cheese. *Coatings*, 11(10), 1212.
89. Ríos-de-Benito, L. F., Escamilla-García, M., García-Almendárez, B., Amaro-Reyes, A., Di Pierro, P., & Regalado-González, C. (2021). Design of an Active Edible Coating Based on Sodium Caseinate, Chitosan and Oregano Essential Oil Reinforced with Silica Particles and Its Application on Panela Cheese. *Coatings*, 11(10), 1212.
90. Rivera-Carriles, K., Argai, A., Palou, E., & Lopez-Malo, A. (2005). Synergistic inhibitory effect of citral with selected phenolics against *Zygosaccharomyces bailii*. *Journal of food protection*, 68(3), 602-606.
91. Rizzello, Carlo G., Verni, M., Koivula, H., Montemurro, M., Seppa, L., Kemell, M., Katina, K., Coda, R., & Gobbetti, M. (2017). Influence of fermented faba bean flour on the nutritional, technological and sensory quality of fortified pasta. *Food and Function*, 8(2), 860–871.
92. Rojas, W., Alandía, G., Irigoyen, J., Blajos, J., & Santivañez, T. (2011). *La Quinua: Cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial*. Oficina Regional Para America Latina y El Caribe, FAO, 37, 66.

93. Rossi Marquez, G., Di Pierro, P., Esposito, M., Mariniello, L., & Porta, R. (2014). Application of transglutaminase-crosslinked whey protein/pectin films as water barrier coatings in fried and baked foods. *Food and Bioprocess Technology*, 7(2), 447-455.
94. Sadiq, F. A., Yan, B., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., & Chen, W. (2019). Lactic acid bacteria as antifungal and anti-mycotoxigenic agents: a comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(5), 1403–1436.
95. Sahal, G., Woerdenbag, H. J., Hinrichs, W. L., Visser, A., Tepper, P. G., Quax, W. J., ... & Bilkay, I. S. (2020). Antifungal and biofilm inhibitory effect of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) essential oil on biofilm forming by *Candida tropicalis* isolates; an in vitro study. *Journal of ethnopharmacology*, 246, 112188.
96. Sandoval, C. V. Q. (2021). Diseño de un recubrimiento comestible basado en proteína de quinua-quitosano entrecruzado con transglutaminasa y su aplicación en totopos.
97. Sattary, M., Amini, J., & Hallaj, R. (2020). Antifungal activity of the lemongrass and clove oil encapsulated in mesoporous silica nanoparticles against wheat's take-all disease. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 170, 104696.
98. Seyedain-Ardabili, M., Sharifan, A., & Ghiassi Tarzi, B. (2016). The production of synbiotic bread by microencapsulation. *Food technology and biotechnology*, 54(1), 52-59.
99. Shen, Y., Ni, Z. J., Thakur, K., Zhang, J. G., Hu, F., & Wei, Z. J. (2021). Preparation and characterization of clove essential oil loaded nanoemulsion and pickering emulsion activated pullulan-gelatin based edible film. *International Journal of Biological Macromolecules*, 181, 528-539.
100. Siedler, S., Balti, R., & Neves, A. R. (2019). Bioprotective mechanisms of lactic acid bacteria against fungal spoilage of food. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 138–146.

101. Silva, C. D. B. D., Guterres, S. S., Weisheimer, V., & Schapoval, E. E. (2008). Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 12(1), 63-66.
102. Silva, O. A., Pella, M. G., Pella, M. G., Caetano, J., Simões, M. R., Bittencourt, P. R., & Dragunski, D. C. (2019). Synthesis and characterization of a low solubility edible film based on native cassava starch. *International journal of biological macromolecules*, 128, 290-296.
103. Singh, N. K., Singh, H., Mehta, N., & Rath, S. S. (2019). In vitro assessment of synergistic combinations of essential oils against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental parasitology*, 201, 42-48.
104. Smith, P. R., & Johansson, J. (2004). Influences of the proportion of solid fat in a shortening on loaf volume and staling of bread. *Journal of food processing and preservation*, 28(5), 359-367.
105. Soukoulis, C., Yonekura, L., Gan, H. H., Behboudi-Jobbehdar, S., Parmenter, C., & Fisk, I. (2014). Probiotic edible films as a new strategy for developing functional bakery products: The case of pan bread. *Food Hydrocolloids*, 39, 231-242.
106. STATISTA (2016). Distribution of consumption and waste of bread in the United States as of 2016. Recuperado de Statista.
107. Stupar, M., Grbić, M. L., Džamić, A., Unković, N., Ristić, M., Jelikić, A., & Vukojević, J. (2014). Antifungal activity of selected essential oils and biocide benzalkonium chloride against the fungi isolated from cultural heritage objects. *South African Journal of Botany*, 93, 118-124.
108. Sun, Q., Li, J., Sun, Y., Chen, Q., Zhang, L., & Le, T. (2020). The antifungal effects of cinnamaldehyde against *Aspergillus niger* and its application in bread preservation. *Food Chemistry*, 317, 126405.
109. Sun, L., Li, X., Zhang, Y., Yang, W., Ma, G., Ma, N., ... & Pei, F. (2020). A novel lactic acid bacterium for improving the quality and shelf life of whole wheat bread. *Food Control*, 109, 106914.

110. Tao, N., OuYang, Q., & Jia, L. (2014). Citral inhibits mycelial growth of *Penicillium italicum* by a membrane damage mechanism. *Food Control*, 41, 116-121.
111. Tian, W. L., Lei, L. L., Zhang, Q., & Li, Y. (2016). Physical stability and antimicrobial activity of encapsulated cinnamaldehyde by self-emulsifying nanoemulsion. *Journal of Food Process Engineering*, 39(5), 462-471.
112. Tokatlı, K., & Demirdöven, A. (2020). Effects of chitosan edible film coatings on the physicochemical and microbiological qualities of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Scientia Horticulturae*, 25(9), 108-656.
113. Tran, T. H., Nguyen, D. C., Phu, T. N. N., Bach, L. G., & Nguyen, T. D. (2019). Research on lemongrass oil extraction technology (hydrodistillation, microwave-assisted hydrodistillation). *Indonesian Journal of Chemistry*, 19(4), 1000-1007.
114. Vázquez-Briones, M., & Guerrero-Beltrán, J. (2017). Effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in the physicochemical properties of chitosan films. *Scientia Agropecuaria*, 8(4), 401–409.
115. Vázquez-Briones, M., & Guerrero-Beltrán, J. (2017). Effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in the physicochemical properties of chitosan films. *Scientia Agropecuaria*, 8(4), 401–409.
116. Velickova, E., Winkelhausen, E., Kuzmanova, S., Alves, V. D., & Moldão-Martins, M. (2013). Impact of chitosan-beeswax edible coatings on the quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa* cv Camarosa) under commercial storage conditions. *LWT-Food Science and Technology*, 52(2), 80-92.
117. Vera, A., Tapia, C., & Abugoch, L. (2020). Effect of high-intensity ultrasound treatment in combination with transglutaminase and nanoparticles on structural, mechanical, and physicochemical properties of quinoa proteins/chitosan edible films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 144, 536-543.

118. Villacrés, E., Quelal, M., Galarza, S., Iza, D., & Silva, E. (2022). Nutritional Value and Bioactive Compounds of Leaves and Grains from Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Plants*, 11(2), 213.
119. Wang, Y., Feng, K., Yang, H., Zhang, Z., Yuan, Y., & Yue, T. (2018). Effect of cinnamaldehyde and citral combination on transcriptional profile, growth, oxidative damage and patulin biosynthesis of *Penicillium expansum*. *Frontiers in microbiology*, 9, 597.
120. Xing, F., Hua, H., Selvaraj, J. N., Zhao, Y., Zhou, L., Liu, X., & Liu, Y. (2014). Growth inhibition and morphological alterations of *Fusarium verticillioides* by cinnamon oil and cinnamaldehyde. *Food Control*, 46, 343-350.
121. Zhang, L., Li, Z., Qiao, Y., Zhang, Y., Zheng, W., Zhao, Y., ... & Cui, Z. (2019). Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by a maltohexaose producing α -amylase. *Journal of Cereal Science*, 87, 165-171.
122. Zhang, J., Song, H. S., Zhang, C., Kim, Y. B., Roh, S. W., & Liu, D. (2021). Culture-independent analysis of the bacterial community in Chinese fermented vegetables and genomic analysis of lactic acid bacteria. *Archives of Microbiology*, 203(7), 4693-4703.
123. Zhang, R., Cui, Y., Cheng, M., Guo, Y., Wang, X., & Wang, J. (2021). Antifungal activity and mechanism of cinnamon essential oil loaded into mesoporous silica nanoparticles. *Industrial Crops and Products*, 171, 113846.
124. Zhang, R., Cui, Y., Cheng, M., Guo, Y., Wang, X., & Wang, J. (2021). Antifungal activity and mechanism of cinnamon essential oil loaded into mesoporous silica nanoparticles. *Industrial Crops and Products*, 171, 113846.
125. Zhang, Y., Liu, X., Wang, Y., Jiang, P., & Quek, S. (2016). Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, 59, 282-289.

Anexo 1. Formato de evaluación sensorial

EVALUACIÓN DE MASA MADRE

Fecha: _____

Sexo: _____

Edad: _____

¿Es usted consumidor frecuente de pan? Si ____ No ____

Antes de comenzar la evaluación, lea cuidadosamente las instrucciones:

Frente a usted se encuentran cuatro muestras de pan, cada una con un código diferente. Tome una muestra y, de acuerdo con su preferencia, evalúe los atributos que se le solicitan colocando un punto en la línea.

Ejemplo:



Muestra: _____

Color | |

Olor | |

Sabor | |

Textura | |

Aceptación general | |

Muestra: _____



Muestra: _____



Muestra: _____



|

Comentarios (opcional)

Anexo 2. Consentimiento informado



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

C.U, Cerro de las Campanas s/n, Colonia Las Campanas

C.P 76010, Querétaro, Qro.

Consentimiento informado

Título del proyecto: Uso de bioconservación y recubrimientos comestibles con aceites esenciales en la elaboración de pan artesanal

Investigador: Dr. Carlos Regalado González

Evaluador: Paola Itzel Bautista Espinoza

Resumen

Se desea realizar un estudio en el que se considera que usted es apto para participar, el cual consiste en probar muestras de pan artesanal que pueden o no contener recubrimientos comestibles y microcápsulas. El pan está hecho con harina de trigo, agua y sal, además está fermentado con masa madre (una mezcla de harina y agua). El recubrimiento comestible esta hecho a partir de harina de quinoa, quitosano adicionado con ácido láctico. Las microcápsulas están compuestas por polímeros industriales derivados del suero de leche y encapsulan al microorganismo *Lactococcus lactis*, bacteria que se encuentra en el intestino y es productora de una bacteriocina. Todos los ingredientes utilizados en el presente estudio están aprobados como seguros por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) de Estados Unidos. El producto fue elaborado siguiendo las Buenas Prácticas de Higiene (BPH) establecidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009 (Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios) para asegurar su inocuidad. La actividad es de tipo experimental, los datos recabados en la misma son de carácter confidencial y de carácter voluntario.

Si usted desea retirarse de esta actividad puede hacerlo en cualquier momento. Si usted tiene alguna duda en cualquier momento del estudio, el evaluador se la aclarará.

Justificación del estudio

En los últimos años, el consumo de pan artesanal de masa madre se ha incrementado alrededor del mundo, debido a que se trata de un producto principalmente libre de aditivos y conservadores químicos. Sin embargo, la vida de anaquel de estos productos suele ser corta, lo que dificulta su comercialización. Entre las principales causas de deterioro de este producto se encuentran los cambios físicos (dureza y pérdida de humedad) y la aparición de microorganismos deterioradores (principalmente hongos de las familias *Rhizopus*, *Aspergillus* y *Penicillium*). Es necesario proponer alternativas de solución para extender la vida de anaquel de este tipo de productos y que al mismo tiempo aseguren su inocuidad.

Entre estas alternativas, se encuentra la bioconservación, la cual se define como la extensión de la vida útil de los alimentos empleando conservantes que empleen la microbiota natural, o sus metabolitos. Entre los principales conservantes naturales utilizados en este proceso se encuentran los aceites esenciales y las bacterias ácido lácticas, debido a la actividad bactericida que han demostrado contra diversos microorganismos.

Objetivo del estudio

Desarrollar un sistema de bioconservación integral para extender la vida de anaquel de un pan de masa madre, utilizando bacterias ácido lácticas encapsuladas y un recubrimiento comestible hecho a base de quitosano y proteína de quinoa, reforzado con aceites esenciales de hierba limón y canela encapsulados en partículas de sílice mesoporosa.

Procedimiento del estudio

- 1) Se le presentarán las muestras de pan organizadas de manera aleatoria. Cada muestra estará identificada por tres dígitos junto con una boleta de evaluación

- 2) Se le pedirá que pruebe cada muestra y registre en la boleta sus impresiones con respecto a los atributos sensoriales de la misma. Entre cada muestra usted limpiará su paladar con trozos de manzana y agua natural purificada.
- 3) Una vez finalizado el estudio, entregará las boletas al evaluador externo

Duración de la prueba: 15 a 20 minutos

Riesgos asociados con el estudio:

Todos los tratamientos se realizaron siguiendo las buenas practicas de higiene solicitadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009 (Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios) y las recomendaciones de las buenas prácticas solicitadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos.

Los ingredientes utilizados en el presente estudio se enlistan a continuación

Para el pan: harina, agua, sal.

Para el recubrimiento comestible: pueden contener o no aceites esenciales de hierba limón y canela, proteína de quinoa, quitosano (compuesto extraído principalmente de los caparzones de crustáceos como camarones o langostinos)

Para el encapsulado: *Lactococcus lactis* es una bacteria presente en la flora intestinal, ampliamente utilizada en la industria de alimentos como agente conservante. Polímeros industriales derivados del suero de leche.

Aclaraciones

- La decisión de participar es completamente voluntaria
- No se recibirá apoyo económico por la participación
- Podrá solicitar la información que desee en cualquier momento del estudio
- Podrá retirarse en cualquier momento del estudio

- La información recabada será utilizada para realizar análisis estadístico, será de carácter completamente confidencial

Cualquier duda con respecto a este estudio, comunicarse con:

Paola Itzel Bautista Espinoza. Evaluadora

Correo: paolaespinoza9606@gmail.com

Dr. Carlos Regalado Gonzalez. Investigador responsable

Correo: regcarlos@gmail.com

Si usted desea participar, le pedimos firmar la siguiente hoja, de lo contrario, se respeta su decisión