



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA
REPÚBLICA (PROPAC)**

**“DISEÑO DE EMPAQUES COMESTIBLES ACTIVOS A BASE DE ALMIDÓN
MODIFICADO PARA SU POSIBLE APLICACIÓN EN ALIMENTOS EN FRESCO”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

I.B.Q. TERESITA ARREDONDO OCHOA

DIRIGIDA POR:

DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ.

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre, 2012
México



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

“DISEÑO DE EMPAQUES COMESTIBLES ACTIVOS A BASE DE ALMIDÓN
MODIFICADO PARA SU POSIBLE APLICACIÓN EN ALIMENTOS EN FRESCO”

TESIS:

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Presenta:

I.B.Q. Teresita Arredondo Ochoa

Dirigido por:

Dr. Carlos Regalado González

SINODALES

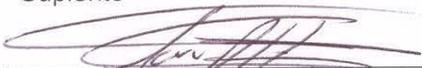
Dr. Carlos Regalado González
Presidente

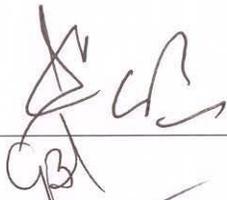
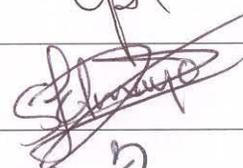
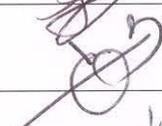
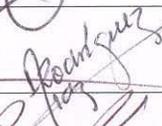
Dr. Blanca E. García Almendárez
Secretario

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Vocal

Dr. Luis Arturo Bello Pérez
Suplente

Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández
Suplente


M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad

Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre, 2012
México

DEDICATORIAS

❖ *A mis ejemplos de amor, apoyo y fortaleza...*
Mis dos grandes pilares en mi vida

Mis Papás

LOS QUIERO MUCHO!!!

❖ *A mi hermana Ale...*

Mi confidente y mi mejor amiga...

Chaparra...TE QUIERO MUCHO

❖ *A mi princesa de chocolate...*

Mi sobrina hermosa

Marifer

❖ *A mi cómplice de vida...*

Rafa

Garabato...TE AMO!!

❖ *A mis dos grandes alegrías que aún me
acompañan en mi camino*

Chispa y Nano

Agradecimientos

A Dios por permitirme continuar con estos sueños, por darme la fuerza, pero sobre todo la fe para luchar y seguir adelante.

A ustedes Papis, quienes han sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, y me han apoyado en cada paso que doy... hoy cumplo una meta más y se la debo a ustedes.

GRACIAS PAPI!!!... por esa lucha constante que haces para darme siempre lo mejor, eres la persona más admirable, trabajadora y con un gran corazón... tengo el Mejor Papá del Mundo!!

GRACIAS MAMI!!! ...por ser mi gran ejemplo a seguir de una mujer trabajadora que no se derrumba y lucha por salir adelante... sin duda alguna tengo la Mejor Mamá del Mundo!!

A mi hermana Ale, Chaparra TE QUIERO MUHO, gracias por ser mi mejor amiga, por todos los momentos súper divertidos que vivimos juntas, por las aventuras, las travesuras, los secretos, los enojos, las risas...ya estás a un paso tu también ehh... ya meritoooo???

A mi sobrinita Fer, princesa, GRACIAS por ser mi amuleto de la buena suerte con tu llegada a nuestras vidas justo cuando empecé éste gran reto...eres una niña hermosa!

A mis dos angelitos, mis abuelitos paternos, Mamavira y Papapepe, que desde el cielo me cuidan y sé que están muy orgullosos y disfrutan éste gran logro conmigo.

A mi abuelitos maternos, Eliseo y Lupita, que la vida aún me permite tenerlos en mi vida como un gran ejemplo de bondad, generosidad, amor y unión.

A mi familia materna y paterna, por ser una gran familia de la cual me siento muy orgullosa de formar parte y por brindarme siempre su apoyo y Cariño en cada etapa de mi vida.

Un agradecimiento especial al Dr. Carlos Regalado y la Dra. Blanca García, por haberme dado la oportunidad de trabajar dentro de su laboratorio y depositar su confianza en mí para la realización de éste proyecto de investigación. Gracias por todo su apoyo, paciencia y dedicación, pero sobre todo por todas las enseñanzas que me transmitieron.

A mi comité evaluador: Dra. Silvia Amaya, Dr. Luis Arturo Bello y Dra. Adriana Rodríguez, por todas sus observaciones y aportaciones en la realización de éste proyecto.

A CONACYT, por brindarme el apoyo económico que me permitió llevar a cabo éste proyecto.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología de Alimentos por todos los momentos divertidos, de locura, de éxito, de strees, de nervios...LOS QUIERO MUCHO.

Aldo, Maty-Jessy, Maestra Ely, Irais, gracias por su apoyo y compañerismo.

César, gracias por ser el único chico de servicio que no me abandonó tan rápido.

Adriana, Raquel, Martha, Dianita, hermosas, GRACIAS por ser unas grandes amigas.

Raymundo, gracias por toda tu ayuda, te toca continuar con el legado...tu puedes!!

Y por supuesto a mi Very Very Best Friend, Rodrigo, fue una gran experiencia conocerte y toparte en éste camino, tuve la fortuna de tenerte como compañero de trabajo, pero lo mejor fue tenerte como amigo y confidente, eres una gran persona, con un gran corazón, mi trabajo en el laboratorio no hubiera sido lo mismo sin que me robaras a diario una gran sonrisa de corazón...Me Caes Bien!!

A Víctor, Paola, Lex, Edgar...por ser unos grandes amigos desde que llegué a Oro.

A mis amigochas hermosas de Salamanca, María Elena, Chío, Yesenia y Bere, por esa gran amistad que perdura a través de los años...LAS QUIERO MUCHO.

A mis Amigas de Celaya, Dianita, Vicky, Ana Banana, Liliaaa!!!, Faby, Aiy...GRACIAS por su hermosa amistad niñas, por todo su apoyo y cariño. LAS KIERO MUCHO!!

A mis amigos de Celaya: Adrián, Memo, Picus, Fato, Jacinto, Jonathan, Daniel, Mando, Jorge, Timmy, por todos los momentos que hemos vivido juntos...LOS KIERO UN MONTÓN.

Y finalmente a ti Garabato!!! Que seguimos compartiendo experiencias juntos, eres mi más grande apoyo y la culminación de ésta meta se da con el comienzo de un gran sueño entre tú y yo... Gracias por tu compañía, por tu comprensión, por siempre tener una palabra de aliento, por no dejarme caer y levantarme en cada tropiezo, por todo tu cariño... TE AMO!!!!

RESUMEN

Las películas comestibles (PC) son de potencial interés en el área de la conservación de productos frescos, por su selectiva funcionalidad para conservar sus atributos de calidad y ampliar su vida de anaquel. La nueva generación de PC activas permite la incorporación de agentes antimicrobianos capaces de controlar el crecimiento de microorganismos sobre superficies de alimentos. El objetivo del presente trabajo fue diseñar y caracterizar una PC activa a base de almidón modificado de maíz ceroso, incorporando cera de abeja (CA) como agente hidrofóbico. La suspensión filmogénica se preparó mediante una dispersión acuosa del almidón modificado de maíz ceroso, [acetilado-entrecruzado (ACLS) u oxidado (OS)], sorbitol no cristalizante como plastificante y CA incorporada como nanoemulsión en concentraciones de 0.2, 0.6 y 1% w/v. A las PC obtenidas se les determinó sus propiedades fisicoquímicas, de barrera y mecánicas. Se estableció *in vitro* la concentración mínima letal (CML) de dos antimicrobianos naturales (arginato láurico (LAE) y natamicina), contra el hongo deteriorador *Botrytis cinerea* ATCC 12481, y se evaluó su efecto antimicrobiano en la mejor formulación de la PC. Las concentraciones de CA mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en cuanto al espesor ($56.78 \pm 4.14 \mu\text{m}$) y solubilidad ($96.73 \pm 0.46 \text{ \%MS}$) de las PC. Los valores más altos de opacidad se obtuvieron al 1% w/v de CA ($36.75 \pm 2.27 \text{ UA} \cdot \text{nm}$ para ACLS y $41.15 \pm 2.35 \text{ UA} \cdot \text{nm}$ para OS), lo que se tradujo en menores valores de PVA (0.57 ± 0.04 y $0.56 \pm 0.05 \text{ g} \cdot \text{mm}/\text{m}^2 \cdot \text{h} \cdot \text{KPa}$) y PO ($3.42\text{E-}14 \pm 6.70\text{E-}15$ y $3.79\text{E-}14 \pm 8.27\text{E-}15 \text{ cm}^3 \cdot \text{cm}/\text{cm}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{Pa}$). Además, se presentó un efecto directamente proporcional de la concentración de CA sobre la elongación e inversamente proporcional sobre la resistencia a la tensión y el módulo elástico. Por otra parte, se observó una inhibición completa por parte de las PC activas a $428 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para LAE y $48 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para natamicina contra *B. cinerea*. El tipo de modificación del almidón ceroso no afectó las características visuales, físicas ni de barrera de las PC. La incorporación de una nanoemulsión de CA como agente hidrofóbico en PC, puede utilizarse para aumentar la vida útil de productos frescos.

Palabras clave: Película comestible activa, almidón modificado de maíz ceroso, nanoemulsión de cera de abeja, antimicrobianos, *Botrytis cinerea*.

SUMMARY

Edible films (EF) are of potential interest in the field of fresh produce preservation, due to their selective functionality to keep their quality attributes and extend its shelf life. The new generation of active EF allows the incorporation of antimicrobial agents that are capable to control microorganism growth on the food surface. The aim of this study was to design and characterize active EF based on modified waxy corn starch, incorporating beeswax (BW) as hydrophobic agent. Starch filmogenic suspension was prepared from an aqueous dispersion of modified waxy corn starches, [acetylated crosslinked (ACLS) or oxidized (OS)], non-crystallizable sorbitol as plasticizer and BW incorporated as nanoemulsion in concentrations of 0.2, 0.6 y 1% w/v. The resulting EF were tested for physic-chemical, barrier and mechanical properties. *In vitro* minimum lethal concentration (MLC) of two natural antimicrobials (lauric arginate (LAE) and natamycin), was found against fungus deteriorative *Botrytis cinerea* ATCC 12481, and its antimicrobial effect was evaluated in the best formulation of the EF. BW concentrations tested show significant differences ($p < 0.05$) in thickness ($56.78 \pm 4.14 \mu\text{m}$) and solubility ($96.73 \pm 0.46 \text{ \%SM}$) of EF. The highest opacity values were observed at 1% w/v BW ($36.75 \pm 2.27 \text{ AU}\cdot\text{nm}$ for ACLS and $41.15 \pm 2.35 \text{ AU}\cdot\text{nm}$ for OS), also the lowest WVP values (0.57 ± 0.04 and $0.56 \pm 0.05 \text{ g}\cdot\text{mm}/\text{m}^2\cdot\text{h}\cdot\text{KPa}$) and OP ($3.42\text{E}-14 \pm 6.70\text{E}-15$ and $3.79\text{E}-14 \pm 8.27\text{E}-15 \text{ cm}^3\cdot\text{cm}/\text{cm}^2\cdot\text{s}\cdot\text{Pa}$). In addition, a directly proportional effect was observed on elongation and inversely on tension resistance and the elastic module. On the other hand, a complete inhibition of active EF was observed at $428 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ for LAE and $48 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ for natamycin against *B. cinerea*. The type of modified waxy corn starch did not affect visual characteristics, physical and barrier properties of EF. Nanoemulsified BW incorporation as hydrophobic agent in EF, provided an advantageous use which increase shelf life of fresh produce.

Key Words: Active edible films, modified waxy corn starch, nanoemulsion beeswax, antimicrobial, *Botrytis cinerea*.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Películas comestibles en la industria alimentaria	3
2.2. Propiedades funcionales de las películas comestibles	5
2.2.1. Propiedades de barrera	7
2.2.1.1. Permeabilidad al vapor de agua (PVA)	8
2.2.1.2. Permeabilidad a los gases	9
2.2.2. Propiedades mecánicas	10
2.3. Propiedades sensoriales de las películas comestibles	11
2.4. Empaques activos	11
2.4.1. Películas comestibles activas	12
2.4.1.1. Antimicrobianos naturales	13
2.4.1.1.1. Arginato Láurico (LAE)	14
2.4.1.1.2. Natamicina	15
2.5. Materiales utilizados en la formulación de películas comestibles	16
2.5.1. Polisacáridos	18
2.5.2. Proteínas	19
2.5.3. Lípidos	21
2.6. Películas comestibles a base de almidones modificados	21
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. HIPÓTESIS	30
5. OBJETIVOS	31
5.1. General	31

5.2. Específicos	31
6. MATERIALES Y MÉTODOS	32
6.1. MATERIALES	32
6.1.1. Material biológico	32
6.1.2. Medios de cultivo	32
6.1.3. Reactivos	32
6.2. MÉTODOS	33
6.2.1. Elaboración de la película comestible a base de almidón modificado incorporando un agente hidrofóbico	33
6.2.2. Determinación de las propiedades fisicoquímicas	34
6.2.2.1. Medición del espesor	34
6.2.2.2. Medición de la materia soluble total	34
6.2.2.3. Medición de la opacidad	35
6.2.3. Determinación de las propiedades de barrera	35
6.2.3.1. Permeabilidad al vapor agua (PVA)	35
6.2.3.2. Permeabilidad al oxígeno (PO)	37
6.2.4. Determinación de las propiedades mecánicas	39
6.2.4.1. Calculo del módulo de Young o módulo de elasticidad (ME)	40
6.2.5. Determinación del efecto antimicrobiano de las películas comestibles	40
6.2.5.1. Preparación del inóculo de <i>Botrytis cinerea</i> ATCC 12481	40
6.2.5.2. Concentración mínima letal (CML) de los antimicrobianos seleccionados contra <i>Botrytis cinerea</i> ATCC 12481	41
6.2.5.3. Ensayo <i>in vitro</i> de la efectividad de la película comestible contra la germinación de esporas y el crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> ATCC12481	41
6.2.6. Diseño experimental	42
7. RESULTADOS	43
7.1. Obtención de películas comestibles a base de almidones modificados incorporando cera de abeja como agente hidrofóbico	43

7.2. Propiedades <i>in vitro</i> de las películas comestibles	46
7.2.1. Propiedades fisicoquímicas	46
7.2.1.1. Medición del espesor	46
7.2.1.2. Medición de la materia soluble total	47
7.2.1.3. Medición de la opacidad	47
7.2.2. Propiedades de barrera	48
7.2.2.1. Permeabilidad al vapor de agua (PVA)	48
7.2.2.2. Permeabilidad al oxígeno (PO)	50
7.2.3. Propiedades mecánicas	52
7.3. Concentración mínima letal (CML) de los antimicrobianos seleccionados contra <i>Botrytis cinerea</i> ATCC 12481.	54
7.4 Efecto de la película comestible activa contra el crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> ATCC 12481	56
8. CONCLUSIONES	59
BIBLIOGRAFÍA	60
APÉNDICES	68

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Atributos de calidad de frutas y hortalizas frescas	4
2.	Propiedades funcionales de las películas comestibles	6
3.	Parámetros de operación para la permeabilidad al oxígeno	39
4.	Diseño de tratamientos para la producción de películas comestibles a base de almidones modificados	42
5.	Características de las películas comestibles a base de almidones modificados	43
6.	Propiedades fisicoquímicas de las películas comestibles	46
7.	Permeabilidad al vapor de agua de las películas comestibles	50
8.	Permeabilidad al oxígeno de los películas comestibles	51
9.	Propiedades mecánicas de los películas comestibles	53
10.	Datos de pérdida de peso respecto al tiempo de la PC a base de ACLS	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Principales propiedades funcionales de la película comestible aplicada en productos frescos	7
2.	Principales materiales utilizados en películas comestibles para productos frescos mínimamente procesados	17
3a.	Estructura de la amilosa	22
3b.	Estructura de la amilopectina	23
4.	Componentes de la celda empleada para la determinación de la permeabilidad al vapor de agua	36
5	Esquema del desecador para determinar la permeabilidad al vapor de agua	36
6.	Equipo VAC-V2 Gas Permeability Tested	38
7.	Películas comestibles en las cámaras de permeabilidad al oxígeno	38
8.	Texturómetro	40
9.	Apariencia de las películas comestibles a base de almidones modificados	44
10.	CML del arginato laúrico (LAE) contra <i>B. cinerea</i> ATCC 1481	55

11.	CML de la natamicina contra <i>B. cinerea</i> ATCC 1481	55
12.	CML contra <i>B. cinerea</i> ATCC 1481 en agar RBC	56
13.	Inhibición de la PC activa con LAE contra <i>B. cinerea</i> ATCC	57
14.	Inhibición de la PC activa con natamicina contra <i>B. cinerea</i> ATCC	57
15.	Pérdida de peso con respecto al tiempo para el cálculo de PVA	70
16.	Esfuerzo de tensión (σ) vs deformación unitaria (ϵ)	71

1. INTRODUCCIÓN

Los productos hortofrutícolas frescos y mínimamente procesados se deterioran con el paso del tiempo, bien por la acción de microorganismos, por la acción fisicoquímica del entorno y la actividad biológica del propio alimento. Por esto, la industria de los alimentos busca proteger la integridad y calidad de sus productos desarrollando mejores tecnologías de empackado (Krochta y Mulder-Johnston, 1997).

Los empaques en la industria alimentaria están destinados a la conservación y protección de todo tipo de alimentos y sus materias primas, en particular del deterioro físico, químico y microbiano, así como para ampliar su vida útil durante el almacenamiento. No obstante, el uso indiscriminado de empaques sintéticos ha generado serios problemas ecológicos, contribuyendo a la contaminación ambiental provocada por desechos sólidos de baja degradabilidad (Taranathan, 2003; Villada y col., 2007).

El uso de empaques comestibles en alimentos, tales como las películas comestibles (PC), ha despertado un gran interés por su funcionalidad selectiva para regular la transferencia de humedad y la permeabilidad a los gases, aroma y compuestos de sabor en un sistema alimentario, lo que permite mejorar la calidad, seguridad y extender la vida útil de estos productos. Los esfuerzos en la investigación se han centrado en el diseño de empaques ecológicos a base de polímeros biodegradables, que además de disminuir los residuos de los empaques sintéticos, permitan que subproductos provenientes de la industria de los alimentos puedan ser utilizados en la elaboración de PC (Vargas y col., 2008).

El empleo de biopolímeros como lo son polisacáridos, proteínas y lípidos en forma aislada o combinados con plastificantes y agentes hidrofóbicos, han sido propuestos para generar PC con características específicas, que les permiten ser empleadas en diversos alimentos mejorando sus atributos de calidad, sin

embargo, los alimentos son susceptibles de ser contaminados por microorganismos que lo deterioran y pueden provocar enfermedades a los consumidores. Es por ello que la nueva generación de películas comestibles activas está especialmente diseñada para permitir la incorporación y liberación controlada de antioxidantes, vitaminas, productos nutracéuticos y agentes antimicrobianos naturales (Lin y Zhao, 2007).

Las PC a base de almidón, uno de los polisacáridos naturales más abundantes y el más comúnmente utilizado en la industria alimentaria debido a su amplia gama de funcionalidades y bajo costo, tienen la característica de ser barreras eficientes contra compuestos de baja polaridad, pero presentan pobres propiedades mecánicas y no ofrecen una buena barrera contra la humedad (Krochta y Mulder-Johnston, 1997; Tharanathan, 2003).

En vista de que las PC de un solo componente presentan desventajas, ya sea en sus propiedades mecánicas o de barrera, existe un gran interés en el desarrollo de PC elaboradas a base de dos o más componentes, integrando polisacáridos, proteínas y/o lípidos, que de manera individual tienen únicas pero limitadas funciones, pero junto con otros componentes tienen como objetivo mejorar sus propiedades, de aquí la necesidad de contribuir con más información sobre el comportamiento y las características de las PC elaboradas a partir de éstos compuestos, y la incorporación de agentes antimicrobianos que proporcionen al alimento un empaque con características inocuas. Los retos técnicos involucrados en su elaboración incluyen la selección del tipo y concentración de los materiales usados para la formulación, las técnicas de preparación, y la evaluación de sus propiedades funcionales para su posterior aplicación como recubrimiento comestible en la conservación de diversos alimentos como los frutos frescos y mínimamente procesados.

2. ANTECEDENTES

2.1 Películas comestibles en la industria alimentaria

Los hábitos de los consumidores han ido cambiando hacia un mayor consumo de productos hortofrutícolas frescos, en gran parte por los beneficios que éstos brindan a la salud. Paralelamente, las mejoras tecnológicas en la producción y conservación de la calidad de los productos agrícolas, permiten llevar al consumidor productos con excelentes atributos de calidad, precio accesible y conveniencia hasta sus hogares (Montero-Calderón, 2005).

Las frutas y hortalizas frescas se obtienen a través de diversas operaciones unitarias de preparación para su transporte, almacenamiento y posterior llegada al consumidor, las cuales pueden producir alteraciones responsables de cambios bioquímicos que conllevan a disminuir la calidad del producto. Controlar todos los factores que pueden influir directa o indirectamente sobre la calidad de los productos frescos, es de suma importancia para su aceptación, la cual persigue conseguir un producto fresco muy similar al original, pero que a su vez sea microbiológicamente seguro y de buena calidad, tanto sensorial como nutricionalmente; si alguno de estos requisitos no se cumple o se encuentra por debajo de los valores mínimos aceptables para cada parámetro, el producto pierde automáticamente su valor comercial (Rojas-Graü, 2006).

Obtener un producto con las características que exige el consumidor es todo un reto para el mundo científico e industrial, por lo que todos los esfuerzos actuales están dirigidos a controlar aquellos precursores que de una u otra manera puedan desencadenar características que vayan en detrimento de la calidad del producto final. En este sentido, deben aplicarse técnicas de conservación, que combinadas o no, puedan mantener o mejorar los atributos de calidad de los productos hortofrutícolas frescos (Cuadro 1), además de alargar su vida útil y

asegurar su estabilidad microbiológica (Martín-Belloso y Rojas-Graü, 2006; Lin y Zhao, 2007).

Cuadro 1. Atributos de calidad de frutas y hortalizas frescas (Lin y Zhao, 2007).

Factor de calidad	Preocupación primaria
Apariencia (visual)	Tamaño Forma Color: intensidad, uniformidad Brillo
Textura	Firmeza/Suavidad Frescura Jugosidad Consistencia
Sabor, aroma	Dulzura. Acidez. Astringencia. Amargura Compuestos volátiles
Valor nutritivo	Vitaminas Minerales
Seguridad	Sustancias tóxicas Contaminantes químicos Contaminación microbiana

La creciente demanda de los consumidores por alimentos seguros y de calidad, aunado a la conciencia ecológica de los recursos naturales limitados y el impacto ambiental de los residuos de envases, han impulsado el desarrollo y caracterización de nuevas alternativas de empackado como son la elaboración de PC, las cuales constituyen un campo innovador en el área de la conservación de frutas y hortalizas frescas por su selectiva funcionalidad, debido a que ofrecen propiedades únicas de empackado (Janjarasskul y Krochta, 2010).

Una PC es definida como una capa delgada de material comestible formada por separado vaciando la solución filmogénica en un soporte sobre una superficie nivelada, la cual se deja secar y se aplica posteriormente a un alimento, a diferencia de un recubrimiento comestible, el cual se aplica como un revestimiento directamente sobre la superficie de un alimento generalmente por inmersión del producto en una solución o por aspersion sobre el mismo. La diferencia entre una PC y un recubrimiento comestible es el modo en que es formado y su aplicación en un alimento. Ambas se elaboran a base de sustancias poliméricas naturales, de composición heterogénea, las cuales pueden ser ingeridas sin riesgo para el consumidor y que le aportan algunos nutrientes (Guilbert y col., 1995; Krochta y De Mulder-Johnston, 1997).

El enfoque actual en el estudio de estas tecnologías de empaque consiste en caracterizar las PC independientemente del sistema alimentario al que se le destine su aplicación y posteriormente orientar las investigaciones al estudio de su interacción como recubrimiento comestible sobre la superficie del alimento (Vargas y col., 2008).

2.2 Propiedades funcionales de las películas comestibles

La función principal de las PC se centra en su capacidad de actuar como un complemento para mejorar la calidad de los alimentos y extender su vida útil (Kester y Fennema, 1986).

Las propiedades funcionales de las PC (Cuadro 2) dependen del tipo de material utilizado, su formación y su método de aplicación. Por otra parte, el uso de formulaciones en combinación con otros agentes (plastificantes, antimicrobianos, antioxidantes, etc.) para su elaboración, pueden proporcionar mejores características funcionales. Estos aditivos deben ser adaptados a cada aplicación en específico, que dependen del tipo de alimento (características

físicoquímicas) y su principal vía de deterioro (Kester y Fennema, 1986; Guilbert y col., 1995).

Cuadro 2. Propiedades funcionales de las películas comestibles
(Kester y Fennema, 1986)

-
- Sensorialmente aceptable (transparente, insípido y sin olor)
 - Reducir la pérdida de humedad
 - Reducir el transporte de gases (O_2 , CO_2 y C_2H_4)
 - Reducir la migración de lípidos
 - Retener componentes volátiles y de sabor
 - Mejorar las propiedades mecánicas
 - Proveer integridad estructural
 - Servir como vehículo de aditivos (sabores, colores, antioxidantes, antimicrobianos)
 - Evitar o reducir el deterioro microbiano
-

Olivas y Barbosa-Cánovas (2005), señalaron una serie de requerimientos que deben cumplir las PC para poder ser aplicados en alimentos frescos, entre los que destacan el estar constituidos por sustancias GRAS (generalmente reconocidos como seguros), además de que la tecnología y la materia prima involucrada en la producción de estas alternativas de conservación sean accesibles y viables económicamente.

El amplio uso que se le puede destinar a las PC dentro de la industria alimentaria, abarca una categoría única del empaçado debido a sus excelentes propiedades, que además de satisfacer las necesidades de aquellos productos frescos mínimamente procesados mejorando sus propiedades funcionales y estructurales (Figura 1), ayuden a evitar la contaminación y pérdida de la calidad de los alimentos. Todos estos atributos permitirán alargar la vida de anaquel de frutos y vegetales frescos, lo que a su vez repercutirá en el éxito de técnicas de

almacenamiento y conservación, que además determinará en última instancia la preferencia del consumidor (Lin y Zhao, 2007; Janjarasskul y Krochta, 2010).

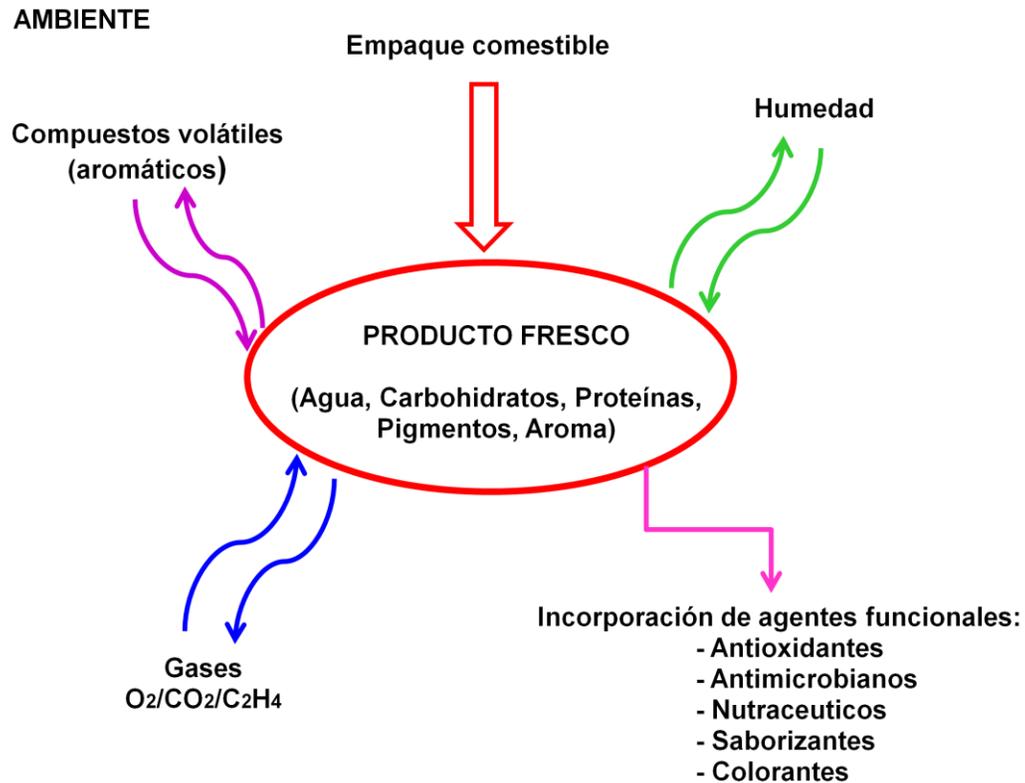


Figura 1. Principales propiedades funcionales de la película comestible aplicada en productos frescos (Lin y Zhao, 2007)

2.2.1 Propiedades de barrera

El éxito de una PC para satisfacer las necesidades específicas de los productos frescos mínimamente procesados, se encuentra fuertemente relacionado con sus propiedades de barrera a la humedad, gases (O_2 , CO_2 y C_2H_4) y compuestos volátiles, que a su vez dependen de la estructura y composición química de los polímeros que lo forman, así como de las características del producto y las condiciones de almacenamiento. Las PC se utilizan para crear una atmósfera controlada o modificada dentro de las frutas y hortalizas frescas que retrasa su maduración y senescencia de una manera similar

a la atmósfera de almacenamiento cuyo proceso es más costoso de controlar o modificar. En base a ello, la selección de una PC con una permeabilidad al vapor de agua y gases apropiada, es fundamental en la modificación del ambiente interno de los productos frescos. Además, el control de la temperatura ambiental y humedad relativa, también son características importantes en la modificación del ambiente interno de los productos frescos, ya que la permeabilidad de la PC y la respiración que el alimento produce son afectados por dichos parámetros (Lin y Zhao, 2007).

2.2.1.1 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

Para muchas aplicaciones, la característica funcional más importante de una PC es la resistencia a la migración de humedad. Esto se debe a los niveles críticos de actividad de agua (a_w) que se deben mantener en muchos alimentos, los cuales pueden comprometer la calidad, estabilidad y seguridad del producto, desencadenando reacciones deteriorativas, químicas y enzimáticas, cambios de textura indeseables y crecimiento microbiano (Kester y Fennema, 1986; Janjarasskul y Krochta, 2010).

La PVA es un fenómeno de difusión, que se define como la razón a la que el vapor de agua atraviesa una unidad de superficie o espesor de cierto material, y cuya transmisión es provocada por la diferencia de presión existente en ambos lados del material, bajo ciertas condiciones de temperatura y humedad relativa. Por ello, es necesario el desarrollo una PC que brinde una barrera eficaz contra la humedad en una amplia gama de humedades relativas, por lo que a menudo es necesario el uso de materiales que son casi o totalmente insolubles en agua, para evitar la pérdida de las cualidades de la PC a través de su desintegración en contacto con los alimentos (Guilbert y col., 1995; Mulder-Johnston y Krochta, 1997; Lacroix, 2009).

Mejorar las propiedades de barrera a la humedad representa uno de los principales retos en la elaboración de una PC diseñada para su aplicación en alimentos frescos. Al comparar la PVA de varios polímeros naturales, se hace evidente que es difícil producir una PC con una excelente tasa de permeabilidad a la humedad en comparación con los proporcionados por los plásticos convencionales. En consecuencia, actualmente los esfuerzos en la investigación se centran en este problema, con la comprensión de que los polímeros naturales a futuro deben ser capaces de imitar las características de barrera al vapor de agua de los materiales convencionales (Lacroix, 2009).

2.2.1.2 Permeabilidad a los gases

Muchos alimentos requieren condiciones atmosféricas específicas para mantener su frescura y calidad durante el almacenamiento, por lo que el empaque de un producto alimenticio debe garantizar una barrera selectiva a ciertos gases como el O₂, CO₂, N₂ o una mezcla de ellos en su interior (Lacroix, 2009).

Las propiedades de barrera a los gases de las PC son potencialmente de gran interés y deben ser específicas de acuerdo al alimento al que van ser aplicados. Las PC con permeabilidades bajas al O₂ pueden ser utilizadas para proteger aquellos alimentos que son susceptibles a la oxidación (enranciamiento, pérdida de vitaminas oxidables, etc.). Por el contrario, una permeabilidad a los gases relativamente alta es necesaria para productos hortofrutícolas frescos (especialmente la permeabilidad al CO₂). El desarrollo de una PC con una permeabilidad selectiva a los gases (O₂, CO₂, C₂H₄), permite el control en el intercambio respiratorio, desarrollo microbiano y generación de reacciones químicas y enzimáticas en un alimento, lo que parece muy prometedor para conseguir un efecto de "atmósfera modificada" en frutos frescos (Guilbert y col., 1995).

2.2.2 Propiedades mecánicas

Las PC deben de caracterizarse mecánicamente para poder adaptarse a su posterior aplicación como recubrimiento comestible al alimento de interés. Dentro de los parámetros a tomar en cuenta se encuentra su resistencia a la tensión (RT), definida como la fuerza máxima requerida por unidad de área aplicada a la PC justo antes de la ruptura de la misma. El porcentaje de elongación (%E), siendo el grado de estiramiento que puede recibir la PC antes de romperse y el módulo de Young o módulo elástico (ME), el cual es un parámetro mecánico que indica la flexibilidad o fragilidad de un material, es decir, indica el grado en el cual un material se encuentra en la región plástica o bien se inclina hacia la región elástica. Valores grandes para ME se traducen en PC más frágiles, mientras que valores pequeños involucran PC más flexibles (Ninnemann, 1968).

Las propiedades mecánicas de las PC se pueden mejorar con la adición de compuestos que promuevan reacciones entre los componentes involucrados en la formación de la PC, lo cual se puede lograr con la plastificación de la red polimérica, involucrando dos métodos diferentes, el primero es una plastificación interna, la cual se obtiene mediante la modificación de la estructura química del polímero, por la co-polimerización, hidrogenación selectiva, o transesterificación, cuando los lípidos o materiales derivados son utilizados. La plastificación externa se obtiene mediante la adición de agentes plastificantes que modifican la organización y la energía involucrada en la formación de la estructura tridimensional de la película polimérica. Las condiciones ambientales y de procesamiento también influyen en la composición y estructura de los polímeros, los cuales afectan directamente la funcionalidad mecánica de las PC (Guilbert y col., 1995; Lacroix, 2009).

2.3 Propiedades sensoriales de las películas comestibles

Una de las principales cualidades que caracteriza a las PC es tener un carácter neutro (claro, transparente, inodoro e insípido) con la finalidad de no ser detectados al ser ingeridos por el consumidor. Además, mejoran la apariencia de la superficie de un alimento proporcionándole un aspecto atractivo. Aunado a ello, también pueden funcionar como barreras para retener compuestos volátiles que tienen un papel importante en la prevención de la pérdida de las características de sabor y aroma de los alimentos durante su almacenamiento y distribución. En general, la eficacia de las propiedades de barrera al aroma se optimiza cuando un compuesto volátil presenta una baja afinidad a los materiales de la PC y la difusividad baja a través de la matriz del polímero (Guilbert y col., 1995; Lin y Zhao, 2007).

Aunque los estudios a la permeabilidad de compuestos volátiles en PC son relativamente difíciles y limitados en comparación con la medición de la humedad y el transporte de gases, los métodos para determinar la permeabilidad de aroma ya han sido propuestos, y se han convertido en un reto en el área de investigación de los empaques comestibles (Janjarasskul y Krochta, 2010).

2.4 Empaques activos

Un empaque activo es definido como un sistema en el cual el producto, el empaque y el ambiente interactúan de manera positiva para extender la vida útil de almacenamiento o para alcanzar características que no se pueden obtener de otra forma. Durante las dos últimas décadas, la popularidad de los empaques activos en alimentos ha sido el mayor paradigma alcanzado, ya que éste ha pasado de ser pasivo a ser activo. Previamente, los materiales de empaque se consideraban pasivos, ya que solo funcionaban como una barrera inerte para proteger el producto contra gases como el O₂ y la humedad. Recientemente, una serie de nuevos materiales se han desarrollado para proveer una protección

“activa” para el producto, que no solo proporcione protección al alimento contra agentes externos, y reaccione a eventos que tienen lugar dentro del empaque. Los principales compuestos “activos” que pueden ser añadidos para el desarrollo de PC con propiedades activas, son agentes antimicrobianos, antioxidantes, enzimas, sabores, entre otros (Yam y col., 2005).

2.4.1 Películas comestibles activas

La principal causa de deterioro de muchos productos alimenticios es el crecimiento de la superficie microbiana. La reducción en los niveles de actividad de agua (a_w) y la protección con una PC a prueba de humedad, son métodos utilizados para evitar el deterioro del producto. Sin embargo, una reorganización del agua en el interior de la PC, debido a los cambios de temperatura, puede inducir a la condensación de humedad en la superficie de los alimentos, aumentando la posibilidad de un desarrollo microbiano (Quezada-Gallo, 2009)

El crecimiento de levaduras, hongos y bacterias durante el almacenamiento y distribución, puede reducir drásticamente la calidad de los alimentos y comprometer su seguridad alimentaria. La incorporación de agentes antimicrobianos en PC, ha sido el principal propósito para la nueva generación de empaques activos debido a su biodegradabilidad, su capacidad de reducir la pérdida de humedad y principalmente evitar el crecimiento superficial de microorganismos en productos alimenticios por su eficacia en la retención de aditivos en las superficies de los alimentos (Ozdemir y Floros, 2003; Quezada-Gallo, 2009).

Varias condiciones deben ser consideradas cuando se diseña un PC activa, como la difusión o liberación del agente antimicrobiano para ser efectivo a través de la PC. La difusividad, representa la velocidad de difusión de las moléculas a través de la matriz de la PC, y el efecto inhibitorio de los agentes antimicrobianos que se aplican sobre la superficie de los alimentos puede verse

limitado por ésta propiedad fisicoquímica. Este comportamiento puede llevar a una reducción en la concentración superficial y tener repercusiones en su efecto inhibitorio, resultando eventualmente en un incipiente crecimiento microbiano y posteriormente un deterioro del alimento (Torres y col., 1985; Vodjani y Torres, 1990; Suppakul y col., 2003).

Dada la liberación del agente antimicrobiano al alimento, esto colocaría a la PC dentro de la clasificación de aditivo alimentario indirecto y es necesaria una evaluación por las agencias gubernamentales correspondientes de cada país, si contiene sustancias no permitidas por la legislación correspondiente. Generalmente, la aprobación no es difícil una vez que se ha usado eficientemente como aditivo alimenticio directo. Otro factor importante es la proporción costo-beneficio, ya que algunos sistemas antimicrobianos pueden ser efectivos solamente si son producidos en gran escala, por lo que se requeriría un gasto inicial importante para aumentar la vida de anaquel del producto y para mejorar la calidad de los alimentos. Por último, existen numerosos retos técnicos relacionados con la elaboración de PC activas, y los efectos en sus propiedades físicas y mecánicas, así como la habilidad del agente antimicrobiano para ser efectivo durante el ciclo de vida del producto alimenticio (Cooksey, 2005).

2.4.1.1 Antimicrobianos naturales

Varios estudios han sido reportados sobre el uso y la aplicación de agentes antimicrobianos naturales incorporados en la elaboración de PC activas para retardar el crecimiento microbiano en un alimento. Compuestos antimicrobianos de origen natural han sido aislados de fuentes vegetales, dentro de los que se incluyen, extractos de especias tales como canela, pimienta, tomillo, clavo, romero y orégano, los cuales han mostrado tener actividad antimicrobiana. Otros extractos de plantas con efectos similares sobre el crecimiento de microorganismos, son la cebolla, el ajo, el rábano, la mostaza y rábano picante. Por otro lado, existen otras clases de sustancias de origen natural, las cuales se

producen a partir de la acción de bacterias y hongos. El más notable de los derivados es el polipéptido nisina. Se encuentran, entre otros, la natamicina, la ϵ -Polilisina-L y el Arginato Láurico (LAE) (Brody y col., 2001).

2.4.1.1.1 Arginato Láurico (LAE)

Su nombre sistemático es: cloruro del éster etílico de $N\alpha$ - lauroil-L-arginina, en lo sucesivo, Arginato Láurico (LAE) etiquetado en virtud de la FDA. Es derivado del ácido láurico, L-arginina y etanol y su síntesis es llevada a cabo por el Laboratorio Miret, SA (Lamirsa), con el nombre comercial de Mirenat-D. El LAE se hidroliza en el cuerpo humano a través de reacciones químicas y metabólicas rompiendo la molécula en componentes comunes de la dieta humana; dicha función le adjudica un notable grado de seguridad y ha sido demostrada por numerosos estudios toxicológicos realizados en los últimos años:

- El 1 de septiembre de 2005, la FDA emitió la carta de no objeción con respecto al uso del LAE con estatus GRAS para su utilización como antimicrobiano en varias categorías de alimentos a niveles de hasta 250 ppm.
- En julio de 2006, la Secretaría de Salud en México publicó en su Diario Oficial, que el LAE es una sustancia permitida para ser utilizado como aditivo alimentario para el consumo humano.
- La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) evaluó este nuevo aditivo con un dictamen positivo en abril de 2007.

Es un sólido blanco, soluble en agua por debajo de una concentración de 247 g/kg, con un punto de fusión de 50 a 58 °C, lo que le adjudica la característica de ser termorresistente. Muestra estabilidad química en un rango de pH entre 3-7 y mantiene su actividad antimicrobiana en este intervalo. Cuando se ingiere se hidroliza en componentes naturales. Su coeficiente de partición entre el agua y el

aceite (de soya, girasol, oliva) es superior a 10, lo que significa que la molécula de LAE se sitúa principalmente en la fracción de agua, la cual es más susceptible a la contaminación microbiana, otorgándole una ventaja sobre otros agentes de conservación, con diferente estructura química, destinados a las mismas aplicaciones. Es un antimicrobiano de amplio espectro contra todo tipo de bacterias, hongos y levaduras. Las principales características de esta molécula son una amplia gama de propiedades antimicrobianas que derivan de su estructura química surfactante y de los rendimientos de ciertas propiedades tensoactivas. Su mecanismo de acción es sobre las membranas citoplasmática de los microorganismos, de tal manera que sus procesos metabólicos se alteran y su ciclo normal es inhibido pero sin lisis celular (VEDEQSA, 2009).

2.4.1.1.2 Natamicina

La natamicina, es un antimicrobiano que se ha utilizado durante varios años para inhibir el crecimiento de hongos en una gran variedad de alimentos, sin afectar el aspecto, color, sabor y aroma de los productos, ya que no penetra en el interior. Para las industrias alimentarias que se basan en fermentaciones de bacterias, se ha demostrado que la natamicina es muy útil, ya que no interfiere con los procesos de fermentación o maduración. Sin embargo, su espectro de inhibición es muy específico ya que no presenta actividad contra bacterias y virus.

La natamicina, es un antifúngico producido por la fermentación de una cepa no modificada genéticamente de *Streptomyces natalensis* aislada de una muestra del suelo. Comercialmente está disponible en un 50% de ingrediente activo generalmente combinado con un acarreador de NaCl o de lactosa.

Químicamente, es una macromolécula cuyo peso molecular es de 665.7 Daltones. Su fórmula química es $C_{33}H_{47}NO_{13}$. En su forma cristalina se encuentra trihidratada, pero como polvo es muy estable y puede ser almacenada por muchos años con una pérdida mínima de su actividad. Sin embargo, diferentes factores

dentro de los que se encuentran valores de pH extremos, luz, oxidantes y metales pesados pueden comprometer su estabilidad. Como muchos macrólidos polienos, la natamicina es anfotérica y tiene baja solubilidad en agua (40 µg/mL), lo cual representa una ventaja para el tratamiento sobre la superficie de los alimentos, debido a que asegura que el antimicrobiano permanezca sobre la superficie de los alimentos donde más se necesita, en lugar de migrar al interior de ellos (Delves-Broughton, 2005).

2.5 Materiales utilizados en la formulación de películas comestibles

Diversos materiales son utilizados en la formulación de PC, las cuales, generalmente, se elaboran a base de hidrocoloides que incluyen a los polisacáridos, las proteínas y compuestos hidrofóbicos como son los lípidos. A menudo, pueden utilizarse en forma única o combinada y su selección toma en cuenta características tales como su naturaleza hidrofílica e hidrofóbica, su facilidad de formación y sus propiedades sensoriales, que sin duda alguna dependerán específicamente del tipo de aplicación que se le destine a la PC (Olivas y Bárbosa-Cánovas, 2009; Vargas y col., 2008).

En la Figura 2 se muestran los componentes más comúnmente utilizados en la elaboración de PC aplicadas en productos frescos mínimamente procesados (Olivas y Bárbosa-Cánovas, 2009).

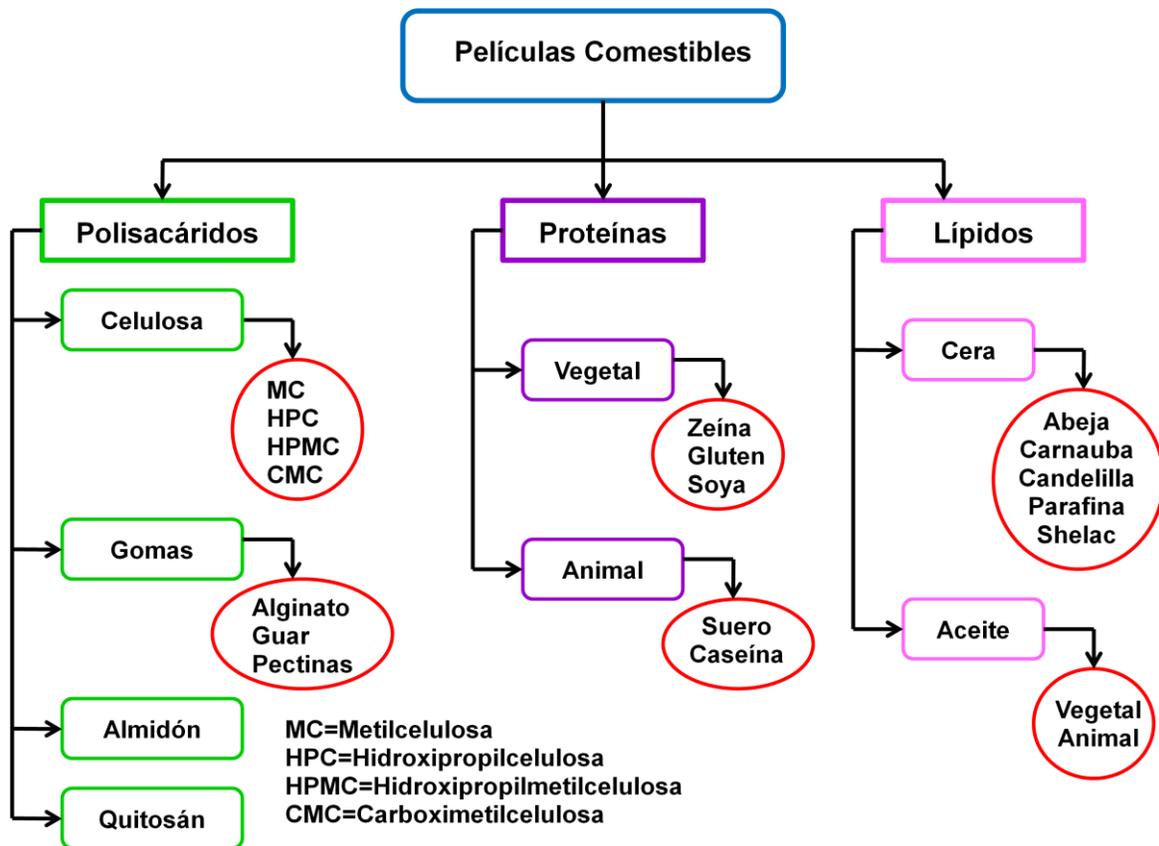


Figura 2. Principales materiales utilizados en películas comestibles para productos frescos mínimamente procesados (Olivas y Barbosa-Cánovas, 2009).

Además del compuesto de naturaleza polimérica, otro componente importante de las PC son los plastificantes. Estos son sustancias de bajo peso molecular, poco volátiles y con naturaleza química similar a la del biopolímero formador. Se usan para mejorar la flexibilidad y extensibilidad de las PC reduciendo los enlaces de hidrógeno internos entre las cadenas de polímeros y aumentando el espacio intermolecular, además afectan la capacidad de atracción del agua del sistema y suelen aumentar la PO de la PC. Su elección depende de diversos factores como el tamaño molecular, el número total de grupos hidroxilo, su configuración y concentración. Dentro de los agentes plastificantes frecuentemente utilizados se encuentran los polioles tales como el glicerol, sorbitol y polietilenglicol, seguidos de los aceites y ceras (McHugh y Krochta, 1994).

La adición de surfactantes y emulsificantes, los cuales se caracterizan por ser compuestos activos de superficie con carácter polar y no polar capaces de modificar la energía de la interfaz de los sistemas inmiscibles, reducen el agua superficial y la velocidad de pérdida de humedad al estabilizar la fase dispersa en una solución polimérica antes del secado de la PC o antes de aplicarla como recubrimiento comestible sobre la superficie de un alimento. La mayoría de los emulsificantes son derivados del glicerol y ácidos grasos tales como el polisorbato (Tween) o la lecitina, los cuales tienen la capacidad de mejorar la adherencia en la interfase entre el alimento y la PC (Quezada-Gallo, 2009; Janjarasskul y Krochta, 2010).

Una de las funciones importantes que surgen de la aplicación de las PC, es su uso como soporte de antimicrobianos con el fin de asegurar la estabilidad microbiológica del alimento y vida útil de almacenamiento. Además, pueden ser utilizados como soportes de nutrientes y antioxidantes para aumentar la calidad y el valor nutricional de los alimentos frescos, ya que se ha demostrado que algunos aditivos actúan más eficazmente cuando forman parte del recubrimiento comestible que cuando son aplicados a soluciones acuosas mediante aspersion o inmersión al mantenerse en la superficie del alimento durante más tiempo (Quezada-Gallo, 2009).

2.5.1 Polisacáridos

Los polisacáridos, son polímeros de cadena larga formados a partir de unidades repetidas de monosacáridos o disacáridos unidos mediante enlaces glucosídicos. Como resultado de la gran cantidad de grupos hidroxilo y otros restos hidrofílicos presentes en su estructura, los enlaces de hidrógeno tienen un papel importante en la formación de la PC que a su vez le confieren características especiales. En general, las PC elaboradas a partir de éstos biopolímeros se forman por interacciones interrumpidas entre los segmentos de cadena larga del polímero durante el proceso de coacervación y la formación de nuevos enlaces de

hidrógeno intermoleculares a través de la evaporación del solvente para crear la matriz estructural de la PC (Janjarasskul y Krochta, 2010).

A nivel molecular, los polisacáridos varían en función de su peso molecular, grado de ramificación, conformación, carga eléctrica e hidrofobicidad. Las diferencias en estas características moleculares conducen a variaciones en su capacidad de formación como PC, así como de sus propiedades físicoquímicas y de rendimiento (Lin y Zhao, 2007).

Una gran variedad de polisacáridos y sus derivados han sido probados para su uso potencial en la elaboración de PC debido a su gran abundancia, bajo costo y fácil manejo, entre los que se encuentran el almidón y sus derivados, derivados de celulosa: metilcelulosa (MC), carboximetilcelulosa (CMC), hidroxipropilcelulosa (HPC) e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), alginatos, carragenina, quitosano, pectina y diversas gomas (Vargas y col., 2008).

Las PC a base de polisacáridos, poseen la capacidad de modificar el ambiente interno de un alimento creando una barrera contra gases como el O₂ y el CO₂, sin embargo, poseen propiedades mecánicas pobres debido a su naturaleza hidrofílica, ofrecen poca resistencia a la migración de agua y por tanto sus valores de permeabilidad al vapor de agua (PVA) son muy altos si se comparan con los empaques formados con polímeros sintéticos, por lo que una alternativa viable son los procesos de modificación empleando diferentes métodos, con el objetivo de mejorar las propiedades del polisacárido para su uso en la elaboración de PC (Lin y Zhao, 2007; Vargas y col., 2008; Janjarasskul y Krochta, 2010).

2.5.2 Proteínas

Las proteínas, son biomoléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos unidas mediante enlaces peptídicos que dependiendo de su estructura se clasifican en fibrosas y globulares. Molecularmente, las proteínas

proporcionan una variedad casi ilimitada de materiales que provienen de diversas fuentes y que naturalmente difieren en la secuencia de aminoácidos, pero que pueden utilizarse en la elaboración de PC. Dentro de los mecanismos más importantes involucrados en la formación de una PC a base de proteínas en solución, se encuentran la desnaturalización de la proteína mediante la aplicación de calor o la variación en el pH. La matriz estructural de una PC se forma posteriormente cuando las cadenas peptídicas se asocian a través de enlaces intermoleculares entrecruzados, cuyas propiedades dependen de las condiciones de la proteína, sus interacciones, el tratamiento y su fabricación (Janjarasskul y Krochta, 2010).

Las proteínas que se han utilizado en la elaboración de PC incluyen el aislado de proteína de suero de leche (WPI) y la caseína, ambas de origen animal, o las obtenidas a partir de fuentes vegetales como la zeína, el gluten de trigo, la proteína de soya e incluso la proteína de semilla de algodón (Vargas y col., 2008; Olivas y Barbosa-Cánovas, 2009).

Las proteínas presentan una variedad amplia de diferentes características moleculares en base a su origen biológico y su función, que involucran su peso molecular, conformación espacial, características eléctricas, flexibilidad y estabilidad térmica, que determinarán en última instancia la capacidad de una proteína para formar una PC y conferirle características específicas (Vargas y col., 2008).

Al igual que las PC a base de polisacáridos, las PC a base de proteínas exhiben buenas propiedades de barrera al O₂, CO₂ y compuestos lipídicos, sobre todo en condiciones de baja humedad relativa, pero son en general pobres barreras contra el agua, además de ser frágiles y susceptibles a la rotura debido a la fuerte densidad de energía cohesiva de los polímeros (Lin y Zhao, 2007).

2.5.3 Lípidos

A diferencia de otras macromoléculas, los lípidos y resinas no son considerados como biopolímeros debido a que no poseen un gran número de unidades repetidas unidas por enlaces covalentes para formar una estructura molecular grande. Como consecuencia, son frágiles y no forman una estructura autosuficiente, por lo que su uso siempre está asociado como un agente de incorporación a un polímero que proporcione resistencia mecánica a la PC (Janjarasskul y Krochta, 2010).

Lípidos neutros, ácidos grasos, ceras (candelilla, carnauba y abeja) y resinas, son comúnmente utilizados en la elaboración de PC y pueden ser adicionados como una capa lipídica dispersa en una red de hidrocoloide o como una capa secundaria, esto es, una capa lipídica sobre una capa de hidrocoloide (Lin y Zhao, 2007; Olivas y Barbosa-Cánovas, 2009).

La función primaria de la incorporación de lípidos en la formulación de PC, además de conferirle brillo al alimento, es la barrera contra la humedad, ya que el agua posee poca movilidad dentro de una matriz lipídica debido a su poca afinidad, baja polaridad y densidad. Las propiedades finales de las PC adicionadas con lípidos dependerán de las características de estos componentes tales como su estado físico, grado de saturación y longitud de la cadena (Guilbert y col. 1995; Vargas y col., 2008; Olivas y Barbosa-Cánovas, 2009).

2.6 Películas comestibles a base de almidones modificados

El almidón ha sido parte fundamental de la dieta del hombre desde tiempos prehistóricos además de su amplio uso a nivel industrial. Después de la celulosa, es probablemente el polisacárido más abundante e importante desde el punto de vista comercial. Se encuentra presente en los cereales, leguminosas,

tubérculos y en algunos frutos como polisacárido de reserva, y aunque está ampliamente distribuido en la naturaleza, las fuentes más comunes del almidón son: el maíz, la papa, el trigo, la tapioca y el arroz. Este polisacárido está organizando en partículas discretas conocidas como gránulos, cuya morfología, composición química y estructura son características de cada especie botánica (Bello-Pérez y Paredes-López, 1999; Badui, 2006).

Químicamente, está conformado por dos macromoléculas: la amilosa formada exclusivamente por cadenas lineales de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos α -D-(1-4), conteniendo aproximadamente de 200-2500 unidades (Figura 3a), donde la α -maltosa es la unidad repetitiva y puede adquirir una conformación espacial helicoidal, en la que cada vuelta de la hélice consta de 6-8 unidades de D-glucosa (Bello-Pérez y Paredes-López, 1999; Badui, 2006; Kramer, 2009).

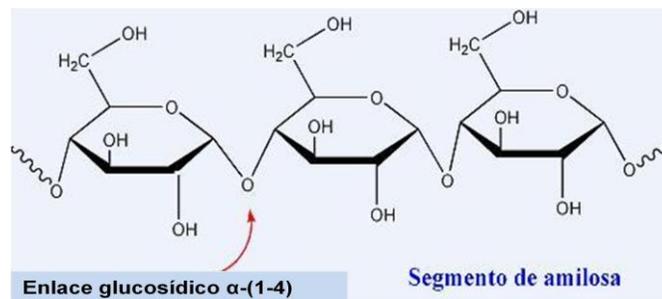


Figura 3a. Estructura de la amilosa (Kramer, 2009).

Por su parte, la amilopectina está conformada por cadenas de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos α -D-(1,4) así como por ramificaciones que ocurren cuando el enlace es α -D-(1,6). Las ramificaciones se localizan cada 15-25 unidades de moléculas lineales de D-glucosa (Figura 3b). La amilopectina es el componente mayoritario del almidón, normalmente se encuentra en una proporción del 70-80%, aunque en ciertos casos alcanza niveles de hasta un 98-99% los cuales son definidos como almidones cerosos. El peso molecular de la amilopectina es mucho mayor que el de la amilosa y la funcionalidad del almidón

y organización física dentro de su estructura granular se debe a éstas macromoléculas (Bello-Pérez y Paredes-López, 1999; Badui, 2006; Kramer, 2009).

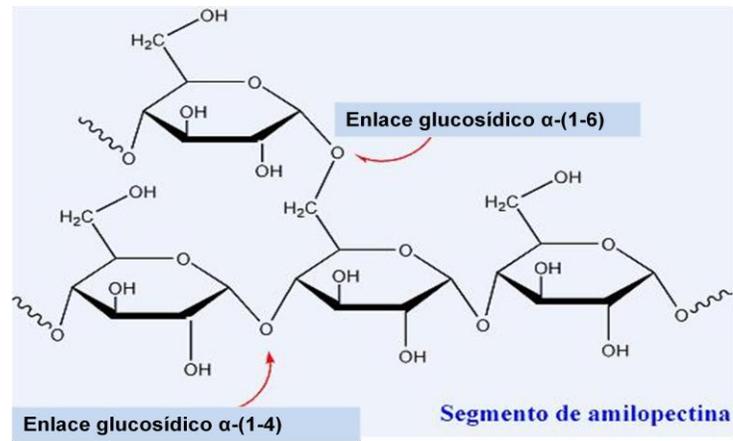


Figura 3b. Estructura de la amilopectina (Kramer, 2009).

La estructura de los gránulos de almidón varía en su forma (elíptica, esférica, angular o irregular) y en su tamaño, donde los diámetros varían en un rango de 1 μm a 200 μm ; se caracterizan por tener un núcleo (hilum), el cual se cree, es el punto de inicio de la biosíntesis y alrededor del cual se ubican las cadenas poliméricas de manera radial y ordenada, la cual resulta evidente al observar un patrón de birrefringencia conocido como “cruz de malta”, donde el centro de la cruz corresponde con el hilum, el centro de crecimiento de gránulo (Zobel, 1988; Jane, 2006).

Dentro de los gránulos, el almidón tiene un arreglo semicristalino, el cual se debe al ordenamiento y longitud de las cadenas de amilopectina, donde las zonas cristalinas (micelas) y no cristalinas (amorfas), se encuentran arregladas en capas concéntricas. Las zonas cristalinas están conformadas por dobles hélices de las ramificaciones de la amilopectina dentro del gránulo, mientras que la región amorfa está formada por los puntos de ramificación. El almidón presenta un grado de cristalinidad entre 20-40%, donde se ha revelado, mediante estudios de difracción de rayos X, que existen tres tipos de cristalinidad: tipo A, común en almidones de cereales; tipo B de tubérculos y tipo C de ciertas raíces y semillas.

En el almidón de maíz, produce un patrón de difracción de rayos X tipo A, cuyo modelo químico está basado en el empaquetamiento de las dobles hélices, en las cuales cada giro está formado por seis moléculas de glucosa y forman un arreglo monoclinico que puede unir dentro de esta estructura seis moléculas de agua (Zobel, 1988; Badui, 2006; Jane, 2006).

Comúnmente, se usan almidones nativos o modificados en la formulación de PC tanto por su disponibilidad y variedad, como por la cantidad de amilosa y amilopectina que pueden contener. Para que este material forme la matriz de la PC se requiere de una gelatinización mediante un tratamiento en frío y en condiciones alcalinas con NaOH o un tratamiento térmico, el cual es el más utilizado, donde mediante la aplicación de calor y en presencia de agua, los gránulos comienzan a captarla y conforme aumenta la temperatura el gránulo se hidrata hasta hincharse completamente perdiendo el orden molecular, a este fenómeno se le conoce como gelatinización y para cada almidón el rango de temperaturas en el que se produce es diferente (Liu y Han, 2005; Singh y col., 2007).

Las PC elaboradas a partir de este carbohidrato son claras, flexibles, transparentes y presentan excelentes barreras al O₂ y el CO₂. Sin embargo, la principal limitante es su naturaleza hidrofílica aunado a sus pobres propiedades mecánicas. La amilosa es la molécula del almidón mayormente asociada con su capacidad para formar una PC en vista de su naturaleza lineal. La preponderancia de la amilosa (>70%) en almidones provenientes del maíz otorgan mayor fuerza y flexibilidad a PC elaboradas con éste tipo de materiales. Por otro lado, la estructura ramificada de la amilopectina generalmente conlleva a PC con pobres propiedades mecánicas, es decir, la fuerza de tensión y elongación son bajas, por lo que para mejorar sus características y diversificar sus aplicaciones, los almidones con un alto contenido en amilopectina o almidones cerosos, pueden modificarse por diversos tratamientos (García y col., 1998; Tharanathan, 2003; Kramer, 2009).

Los procesos de modificación en los almidones cerosos van encaminados a cambiar las características del gránulo de almidón al producir una alteración en una o más de sus propiedades físicas, químicas o estructurales, debido a la incorporación de un componente ajeno a su estructura, para satisfacer la función deseada en la elaboración de empaques comestibles. Los almidones cerosos pueden ser modificados por diferentes vías físicas y químicas, siendo ésta última la más comúnmente utilizada. La modificación química consiste en introducir a la molécula de almidón, grupos funcionales mediante reacciones de esterificación, eterificación o entrecruzamiento o someterlo a reacciones de descomposición ácida, hidrólisis enzimática u oxidación (García y col., 2009; Kim y col., 2002; López y col., 2008).

Los almidones oxidados se obtienen empleando hipoclorito de sodio bajo condiciones de pH y temperatura controladas. Durante este tratamiento los grupos hidroxilo (OH^-) del almidón son oxidados primero a grupos carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) y luego a grupos carboxilo (COOH). Las PC formadas a partir de éste almidón son rígidas y resistentes (Wang y Wang, 2003).

Por su parte, la acetilación es una modificación química del almidón por esterificación, en el cual se sustituyen sus grupos hidroxilo (OH^-), por grupos acetilos ($\text{CH}_3\text{-C}=\text{O}$) que le brindan mayor estabilidad, variando sus propiedades fisicoquímicas y funcionales, otorgándole mayor resistencia a la retrodegradación y aumentando su hidrofobicidad la cual depende de la longitud de cadena, provocando que sea soluble en otros polímeros. Las PC elaboradas a base de éste almidón son más claras y presentan mayor estabilidad (Saartrat y col., 2005).

El tratamiento por entrecruzamiento es la introducción aleatoria de enlaces covalentes intra e inter-moleculares en el gránulo de almidón, los cuales refuerzan los enlaces de hidrógeno que actúan como puentes entre sus moléculas. Los gránulos entrecruzados son más resistentes a altas temperaturas, condiciones ácidas y al cizallamiento alto, lo que permite mejorar las propiedades de textura de

las PC. Por otro lado, se ha demostrado que la combinación de dos modificaciones químicas, como el almidón acetilado-entrecruzado o doblemente modificado, le confieren características diferentes, ya que proveen estabilidad en condiciones ácidas, degradación térmica y mecánica, y retarda la retrodegradación durante un almacenamiento prolongado (Yue y Waring, 1998; Wu y Seib, 1990).

Finalmente, ya se ha reportado el uso de almidones modificados en la elaboración de empaques y recubrimientos comestibles aplicados e incluso en combinación con otros biopolímeros o agentes hidrofóbicos, que sirven de barrera para el vapor de agua y otras aplicaciones en diversos productos, por lo que su caracterización es de potencial interés dentro de la industria de alimentos (Kramer, 2009).

3. JUSTIFICACIÓN

El interés en el desarrollo y uso de películas comestibles a base de biopolímeros naturales para prolongar la vida de anaquel y mejorar la calidad de los productos hortofrutícolas frescos mínimamente procesados, ha venido creciendo debido a la necesidad de reducir y sustituir el empleo de plásticos y envases sintéticos de baja degradabilidad, por materiales menos agresivos con el medio ambiente, aunado a la demanda de alimentos frescos, seguros y con mayor vida de anaquel. Por tal razón, las películas comestibles pueden resultar en una forma innovadora y efectiva de proteger los alimentos.

Son pocos los estudios en cuanto a películas comestibles activas, de aquí la necesidad de contribuir con más información sobre el comportamiento y las características de dichos empaques comestibles a partir de almidón modificado con la incorporación de agentes hidrofóbicos y antimicrobianos que proporcionen al alimento de un empaque con características inocuas.

4. HIPÓTESIS

Es posible obtener un empaque comestible a base de almidón modificado, adicionado de agentes hidrofóbicos y antimicrobianos, con propiedades que permitan ser utilizadas para prolongar la vida de anaquel de productos hortofrutícolas frescos mínimamente procesados.

5. OBJETIVOS

5.1 GENERAL

Diseñar y caracterizar un empaque comestible activo a base de almidón modificado, incorporando cera de abeja como agente hidrofóbico.

5.2 ESPECÍFICOS

- Formular una película comestible a base de almidón modificado, incorporando cera de abeja como agente hidrofóbico.
- Evaluar las propiedades fisicoquímicas, de barrera y mecánicas de las películas comestibles.
- Determinar la concentración mínima letal (CML) apropiada de los agentes antimicrobianos LAE y Natamicina contra el hongo deteriorador *Botrytis cinerea* ATCC 12481.
- Evaluar el efecto antimicrobiano de las películas comestibles activas formuladas contra el crecimiento del hongo deteriorador *Botrytis cinerea* ATCC 12481.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIALES

6.1.1 Material Biológico

- *Botrytis cinerea* ATCC 12481

6.1.2 Medios de Cultivo

- Agar papa-dextrosa (PDA) Bioxon (Edo. México, México), que contiene 0.4% (w/v) de infusión de papa, 2% (w/v) de glucosa y 1.5% de agar bacteriológico.
- Caldo papa-dextrosa (PDC) Difco (Maryland, EUA), que contiene 0.4% (w/v) de almidón de papa y 2% (w/v) de glucosa.
- Medio rosa de bengala-cloranfenicol (RBC) Difco (Maryland, EUA), cuya composición en (g/L): peptona de caseína, 5; glucosa, 10; KH_2PO_4 , 1; Mg_2SO_4 , 0.5; rosa de bengala, 0.05; cloranfenicol, 0.05 y agar bacteriológico, 15.0.

6.1.3 Reactivos

Almidón modificado OS o ACLS CPIngredientes (San Juan del Río, Qro), sorbitol no cristalizable CPIngredientes (San Juan del Río, Qro), Tween 80 y Tween 20 Baker (New Jersey, EUA), cera de abeja Sigma (St. Louis, MO, EUA), ácido esteárico Baker (New Jersey, EUA), morfolina Sigma (St. Louis, MO, EUA), carbonato de potasio Sigma (St. Louis, MO, EUA), LAE Vedeqsa-LAMIRSA (Valencia, España), Natamicina EcoBio (Tianjin, China).

6.2 MÉTODOS

6.2.1 Elaboración de la película comestible a base de almidón modificado incorporando un agente hidrofóbico.

La solución filmogénica de almidón se preparó mediante una dispersión acuosa del almidón modificado (ACLS/OS) y el sorbitol no cristizable como plastificante en agua destilada, bajo agitación magnética, a temperatura ambiente, hasta su completa disolución. Posteriormente se calentó a 90 °C por 20 min para completar la gelatinización del almidón y se enfrió en baño de hielo.

La nanoemulsión de cera y el Tween 80 se incorporaron a la suspensión filmogénica en frío, empleando un mezclador de alta velocidad a 21, 500 rpm durante 3 min. La solución final se desgasificó al vacío por 10 min.

La nanoemulsión de cera se preparó según lo expuesto por Hagenmaier y Baker (1994) y Kentish y col. (2008). Se mezclaron 100 g de cera de abeja y 15 g de ácido esteárico los cuales se fundieron a 128 °C; posteriormente se añadieron 15 g de morfolina y la mezcla obtenida se adicionó a 350 mL de agua en ebullición, bajo la acción de un mezclador de alta velocidad a 21, 500 rpm por 3 min. Inmediatamente se enfrió en baño de hielo y se filtró a través de tela tipo manta de cielo. La emulsión de cera obtenida se expuso a 5 pulsos de 2000 V con periodos de descanso de 1 min utilizando un equipo de ultrasonido (Vibra-Cell VCX 500, Newtown, CT, USA) para finalmente obtener una nanoemulsión de cera con un contenido de 20% de sólidos.

La solución filmogénica final a base de almidón modificado, se extendió sobre superficies de vidrio o acrílico de 10x10 cm previamente niveladas. El volumen añadido fue de 120 μL por cm^2 y se dejó secar por 48 horas a temperatura y humedad controladas.

6.2.2 Determinación de las propiedades fisicoquímicas

6.2.2.1 Medición del espesor

Las PC evaluadas fueron recortadas del diámetro adecuado y se realizaron cinco mediciones en puntos aleatoriamente seleccionados con un micrómetro digital (Mitutoyo, MDC-Lite, No. 99 MAB015M, Serie No. 293, Naucalpan, Edo. de México) sobre el área de prueba de la PC; el promedio de las mediciones realizadas fue expresado en micrómetros (μm) \pm desviación estándar (DE).

6.2.2.2 Medición de la materia soluble total

Se midió la solubilidad de acuerdo a lo descrito por Márquez-Hernández (2010) que es una modificación de lo expuesto por Romero-Bastida y col. (2005) y López y col. (2008). Una vez obtenidas las PC se cortaron en cuadros de 3x4 cm, los cuales se secaron a peso constante a 60 °C. Después de pesarlos con una precisión cercana a 0.1 mg, se colocaron en frascos de vidrio de 100 mL con 80 mL de agua destilada por 1 h en agitación suave y a temperatura ambiente. Se filtró la solución y se recuperó la película no disuelta en un papel filtro (whatman #4), el cual se secó nuevamente a 60° C hasta peso constante. Se calculó el porcentaje de materia soluble (% MS) mediante la ecuación 1:

$$\% MS = \frac{P_o - P_f}{P_o} \quad [1]$$

Donde:

MS = Porcentaje de materia soluble

Po = Peso seco inicial de la película

Pf = Peso seco final de la película

6.2.2.3 Medición de la opacidad

Se determinó usando un espectrofotómetro UV-Vis (Perkin-Elmer, Lambda 40, Madison, WI, EUA), para lo cual se cortó un rectángulo de la PC de cada tratamiento del tamaño de uno de los lados internos por los que pasa el haz de luz en una celda espectrofotométrica. Se hizo un espectro de absorbancia de 400 a 700 nm para cada muestra. La opacidad se definió como el área bajo la curva y se expresó como unidades de absorbancia x nanómetro (UA x nm). Lo anterior en base a lo expuesto por López y col. (2008) y Hu y col. (2009).

6.2.3 Determinación de las propiedades de barrera

6.2.3.1 Permeabilidad al vapor de agua (PVA).

La PVA de las PC se determinó de acuerdo al método gravimétrico expuesto por Magaña-Alemán (2007) que es una modificación de la norma ASTM: E96-00 (2000), la cual se basa en la aplicación de la ley de Fick (Ecuaciones 2 y 3).

Las PC obtenidas, a las que previamente se les determinó su espesor y área de transferencia, se colocaron en celdas impermeables las cuales consisten en un recipiente de vidrio con un diámetro interno de 3.5 cm y una profundidad de 5 cm con agua destilada en su interior ($HR_1 = 100\%$) y una tapa horadada con rosca, que permitió un área de exposición de $9.079 \times 10^{-4} \text{ m}^2$ y dos empaques de teflón que aseguraron el sello hermético (Figura 4).

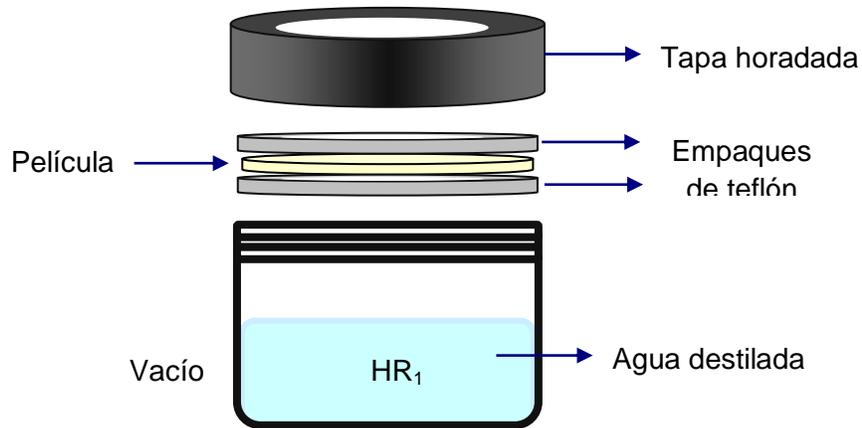


Figura 4. Componentes de la celda empleada para la determinación de la permeabilidad al vapor de agua (Magaña-Alemán, 2007).

Posteriormente se colocaron dentro de un desecador que contenía un solución salina saturada (K_2CO_3) que mantuvo un ambiente a una humedad relativa externa ($HR_2 = 43\%$). El vapor de agua que se difundió a través de la PC fue absorbido por la atmósfera creada (Figura 5).

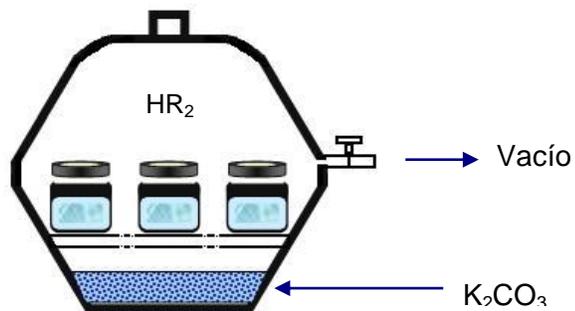


Figura 5. Esquema del desecador para determinar la permeabilidad al vapor de agua (Magaña-Alemán, 2007).

Se pesaron cada una de las celdas en intervalos de tiempo de 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8 y 24 h. En cada determinación se registró también la humedad relativa y la temperatura.

La PVA se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$PVA = \frac{G/t \cdot x}{A \Delta P} \quad [2]$$

$$\Delta P = \frac{P^*}{100} (HR_2 - HR_1) \quad [3]$$

Donde: PVA = Permeabilidad al vapor de agua

$\frac{G/t}{A}$ = Permeanza

x = Espesor medio de la película

A = Área de la película

P* = Presión de vapor del agua a la temperatura del experimento

HR₁ = Humedad al interior de la celda

HR₂ = Humedad del interior de la cámara

El término G/t de la ecuación (2), se obtuvo con la pendiente de la línea recta resultante de graficar la pérdida de peso respecto al tiempo.

6.2.3.2 Permeabilidad al oxígeno (PO)

La determinación de la PO se realizó de acuerdo a los estándares de la ASTM: D3985-02 (2002), utilizando un equipo VAC-V2 Gas Permeability Tester (Labthink Instruments Co., Ltd, China) (Figura 6), donde se obtuvo la tasa de transmisión de gas (GTR) y el coeficiente de permeabilidad al oxígeno (PO).



Figura 6. Equipo VAC-V2 Gas Permeability Tested (Labthink Instruments Co., Ltd, China)

Las PC de cada tratamiento se cortaron en círculos de 11 cm de diámetro, a las que previamente se les midió su espesor en 5 puntos aleatoriamente seleccionados y se acondicionaron a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y $50 \pm 2\%$ HR por 24 h; trascurrido el tiempo se sometieron a la prueba de PO (Figura 7) bajo las condiciones de operación descritas en el cuadro 3.



Figura 7. Películas comestibles en las cámaras de permeabilidad al oxígeno

Cuadro 3. Parámetros de operación para la permeabilidad al oxígeno

-
- Proporción de transmisión de O₂: 10%
 - Área de transmisión: 38.48 cm²
 - Presión: 1.01 Kgf/cm²
 - Temperatura: 25 ± 2 °C
 - Humedad Relativa: 50 ± 2%
 - Tiempo de prueba: 15 min
 - Tiempo de análisis: 5 min
-

6.2.4 Determinación de las propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas se determinaron con un texturómetro (TA-XT2i, TA-XT Plus, Inglaterra) (Figura 8) de acuerdo a los estándares del ASTM: D882-02 (2002).

Las PC se cortaron en tiras de 8 cm de largo y 1 cm de ancho aproximadamente. El texturómetro cuenta con dos pinzas neumáticas, una fija y otra móvil, donde para cada determinación, la tira de PC se colocó entre ellas a una distancia inicial de separación de 5 cm y la prueba se corrió a una velocidad de estiramiento de 1mm/s. Del software se obtuvieron datos del esfuerzo de tensión, aquel aplicado antes de la ruptura de la PC (σ), así como de la deformación unitaria en el punto de cedencia (ϵ), para calcular la resistencia a la tensión (RT) y el porcentaje de elongación (%E). También se obtuvieron los datos de esfuerzo en la región elástica de la cual se determinó el módulo de Young o módulo de elasticidad (ME).



Figura 8. Texturómetro (TA-XT2i, TA-XT Plus, Inglaterra)

6.2.4.1 Cálculo del módulo de Young o módulo de elasticidad (ME)

Con los datos obtenidos en la prueba de estiramiento de las PC, se graficó el esfuerzo de tensión (σ) vs. la deformación unitaria (ϵ), donde al aplicar la siguiente relación (Ecuación 4) se obtiene el ME:

$$ME = \frac{\sigma}{\epsilon} \quad [4]$$

Donde ME es el módulo elástico (MPa), σ es el esfuerzo de tensión, definido como la fuerza de tensión por unidad de área (MPa) y ϵ es la deformación unitaria (adimensional), ambos determinados en la región elástica.

6.2.5 Determinación del efecto antimicrobiano de las películas comestibles

6.2.5.1 Preparación del inóculo de *Botrytis cinerea* ATCC 12481

Botrytis cinerea se sembró en cajas petri con medio PDA y se incubó por 13 días a 25 °C o hasta que el micelio cambiara de un color blanco a gris lo que es indicativo de esporulación. Las esporas se recuperaron con un asa de vidrio estéril

adicionando a cada caja petri 5 mL de solución estéril de Tween 20 al 0.1 %; se contaron en una cámara Neubauer y se ajustó a la concentración deseada con la misma solución estéril.

6.2.5.2 Concentración mínima letal (CML) de los antimicrobianos seleccionados contra *Botrytis cinerea* ATCC 12481

Para establecer la concentración mínima letal (CML) se evaluaron dos antimicrobianos: El LAE a 100, 150, 200 y 250 ppm y la Natamicina a 5, 10, 15 y 20 ppm respectivamente. Para esta evaluación, se prepararon tubos de ensaye con medio PDC junto con el antimicrobiano a la concentración deseada, además de una concentración de 1×10^6 de esporas/mL para un volumen total de 4 mL en cada tubo. Se llevó a cabo el conteo de esporas en una cámara de Neubauer y se ajustó el volumen para la adición de cada tubo. Posteriormente se sembró por extensión en superficie 100 μ L de cada tubo de ensaye en placas con agar RBC. Se monitoreó el crecimiento del hongo hasta el quinto día de incubación y las pruebas se hicieron por triplicado según lo expuesto por López-Malo y col (2005).

6.2.5.3 Ensayo *in vitro* de la efectividad de la película comestible contra la germinación de esporas y el crecimiento de *Botrytis cinerea* ATCC 12481

Los antimicrobianos LAE y Natamicina se adicionaron a la formulación seleccionada, cuyo proceso de obtención de la PC fue el descrito en el apartado 2.2.1. Después de desmoldar las PC, se cortaron cuadros de 4 x4 cm que se esterilizaron con una lámpara de luz ultravioleta por 12 horas. Se colocaron sobre una caja petri con medio PDA preparado con tween 20 al 50% (2mL/ 100mL de agar). Se probaron tres concentraciones de cada antimicrobiano en base a la CML obtenida y se incubaron por 5 días.

6.2.6 Diseño Experimental

Se empleó un diseño experimental completamente aleatorizado (2x3), tomando en cuenta los siguientes factores: (1) el tipo de almidón, donde los niveles fueron el ACLS y el OS y (2) la concentración de cera de abeja como agente hidrofóbico al 0.2, 0.6 y 1% (w/v). Las variables respuesta fueron el espesor, la solubilidad (%MS), la opacidad, la PVA, la PO, la RT, el %E y el ME.

En el Cuadro 4 se muestra el diseño de tratamientos que se llevó a cabo; cada variable respuesta se midió por triplicado y los resultados se expresaron como la media \pm DE, los cuales fueron analizados haciendo una comparación de medias mediante una prueba Tukey utilizando el paquete estadístico JMP versión 5.0.1.

Cuadro 4. Diseño de tratamientos para la producción de películas comestibles a base de almidones modificados

Tratamiento	Tipo de almidón	Agente hidrófobo (%)
1	ACLS	0.2
2	ACLS	0.6
3	ACLS	1
4	OS	0.2
5	OS	0.6
6	OS	1

ACLS: Almidón acetilado-entrecruzado; OS: Almidón Oxidado

7 RESULTADOS

7.1 Obtención de películas comestibles a base de almidones modificados incorporando cera de abeja como agente hidrofóbico

Primeramente se probaron tres diferentes concentraciones de cada almidón modificado (ACLS y OS), partiendo de una concentración de 3, 6 y 12% (w/v) respectivamente, en base a lo reportado por Márquez-Hernández (2010) y Pérez-Gallardo (2012), con la finalidad de encontrar la mejor formulación con la que se lograra formar la PC y con ella las características deseadas (Cuadro 5). La concentración de sorbitol como plastificante fue seleccionada de acuerdo con lo reportado por Pérez-Gallardo (2012), el cual observó que para PC elaboradas a base de almidones cerosos modificados ACLS, OS, hidrolizado-octenilsuccinilado (H-OSA) y almidón sin modificar (WCS), utilizando una relación de 0.8 g sorbitol/g almidón, se obtenían una PC con buenas características de flexibilidad y extensibilidad. Con lo que respecta al Tween 80 como surfactante, se manejó a una concentración de 0.15% (w/v).

Cuadro 5. Características de las películas comestibles a base de almidones modificados

Tipo de Almidón	Almidón (%)	Características de la película
ACLS	3	Continuas y transparentes
ACLS	6	Gruesa, quebradiza y opaca
ACLS	12	Totalmente quebradiza
OS	3	No se logró formar
OS	6	Continuas y transparentes
OS	12	Totalmente quebradiza

ACLS: Almidón acetilado-entrecruzado; OS: Almidón Oxidado

De acuerdo a los resultados obtenidos en el Cuadro 5, en base al comportamiento observado para cada uno de los almidones modificados en la formación de la PC, la concentración seleccionada fue del 3% (w/v) para el ACLS

y 6% (w/v) para el OS al obtenerse PC delgadas, continuas y transparentes, ya que a una concentración del 3% (w/v) para el OS no se logró formar la PC, y al 12% (w/v) para ambos almidones resultó ser una concentración muy elevada, provocando un aumento en la viscosidad de la suspensión filmogénica, lo que dificultó su manejo, especialmente durante el vaciado en las placas de vidrio y/o acrílico, dando como resultado una PC totalmente quebradiza (Figura 9).

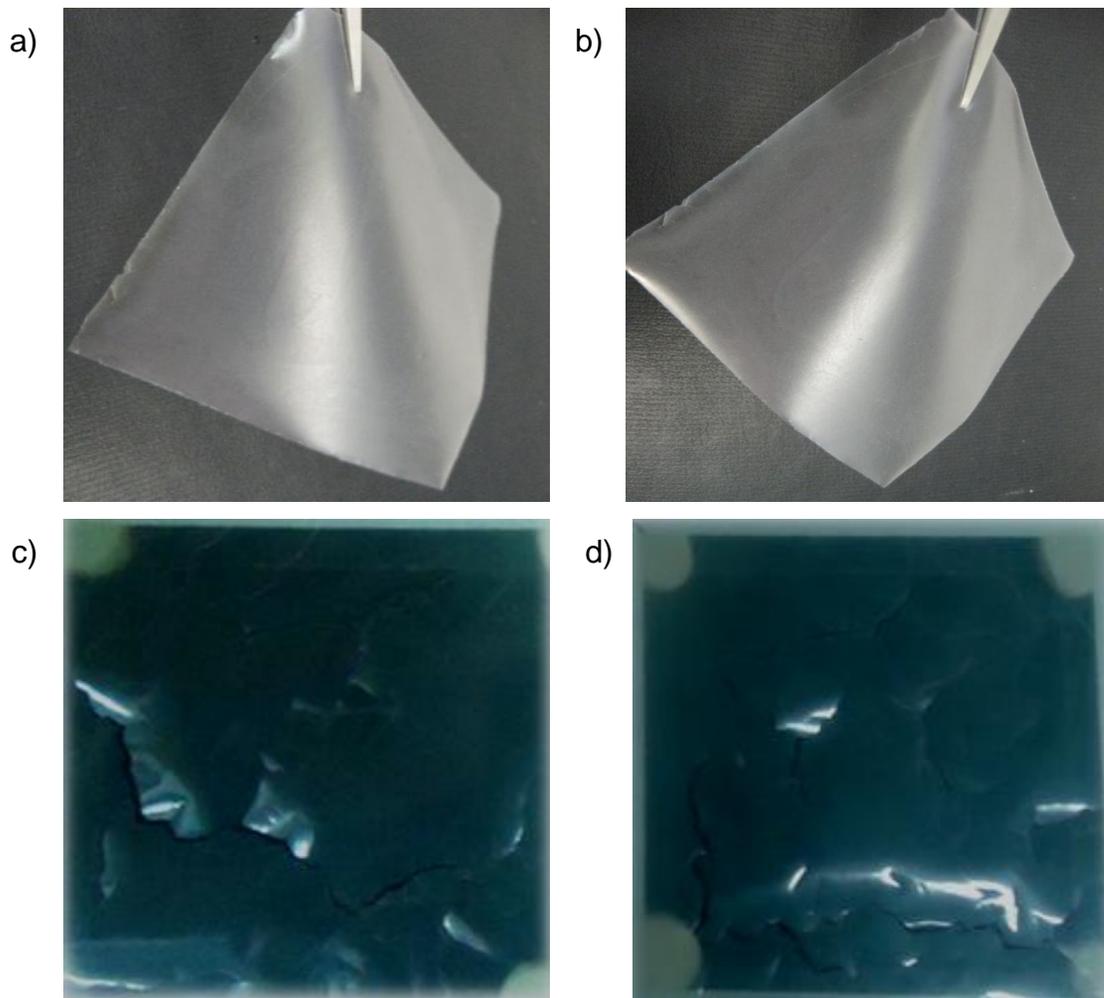


Figura 9. Apariencia de las películas comestibles a base de almidones modificados a) ACLS 3% (w/v); b) OS 6% (w/v); c) ACLS 12% (w/v); d) OS 12% (w/v)

De acuerdo al diseño experimental descrito en el apartado 6.2.6, una vez obtenidas las concentraciones del almidón modificado como componente principal de la matriz estructural de la PC, se decidió adicionar la cera de abeja como agente hidrofóbico, ya que se ha reportado que incorporándose como componente lipídico en PC a base de almidones, reduce los valores de PVA y mejora las propiedades mecánicas, disminuyendo los valores de RT y %E y aumentando el ME (Han y col., 2006).

La cera de abeja se adicionó en forma de nanoemulsión con la finalidad de lograr una mejor incorporación en la suspensión filmogénica y una mayor homogeneidad en la PC, ya que se ha reportado que las emulsiones son dispersiones de dos o más líquidos inmiscibles y tienen la característica de ser sistemas termodinámicamente inestables (Hagenmaier y Baker, 1994), por lo que es necesario la aplicación de tecnologías externas de emulsificación como lo es el ultrasonido, el cual se caracteriza por ser un método eficiente al disipar la energía mecánica necesaria para romper en forma de pequeñas gotas la fase líquida (fase dispersa) en una fase continua (fase dispersante), mediante la acción de ondas ultrasónicas a través de una sonda (Behrend y col., 2000). Dentro de la formulación de la nanoemulsión de cera de abeja, el ácido esteárico cumple la función de surfactante, el cual es un componente necesario para fomentar la dispersión de la cera de abeja en el medio acuoso, incrementando su viscosidad y con ello reduciendo la movilidad de las gotas de la fase dispersa para prevenir la coalescencia. La morfolina toma el papel de disolvente, el cual es permitido por la FDA (21 CFR 172.235) como recubrimiento sobre la superficie de productos frescos.

7.2 Propiedades *in vitro* de las películas comestibles

7.2.1 Propiedades fisicoquímicas

7.2.1.1 Medición del espesor

Las PC analizadas fueron seleccionadas de acuerdo a su ausencia de daños y los resultados obtenidos fueron el promedio de cinco mediciones aleatoriamente seleccionadas. De acuerdo con los resultados mostrados en el Cuadro 6, el espesor de las PC obtenidas a base de almidones modificados osciló entre los 52.67 ± 0.50 y 64.47 ± 0.95 μm , encontrándose dentro de los valores límite para no ser detectado por el consumidor una vez que la PC sea aplicada como recubrimiento comestible a un alimento (Longares y col., 2004). El análisis estadístico mostró una interacción significativa entre el tipo de almidón modificado y el porcentaje de cera de abeja al aumentar el espesor conforme aumenta la concentración de agente hidrofóbico, obteniéndose el valor más alto para el OS al 1% (w/v) de cera de abeja. Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Márquez-Hernández (2010), al obtener valores de 59 μm de espesor para una PC a base de ACLS y 0.3% de cera de abeja.

Cuadro 6. Propiedades fisicoquímicas de las películas comestibles

Tratamiento	Espesor ($\mu\text{m} \pm \text{DE}$)	Solubilidad (%MS \pm DE)	Opacidad (UA*nm \pm DE)
ACLS-0.2c	$52.67 \pm 0.50^{\text{d}}$	$97.38 \pm 0.15^{\text{a}}$	$23.48 \pm 0.90^{\text{c}}$
ACLS-0.6c	$55.20 \pm 0.72^{\text{bc}}$	$96.65 \pm 0.07^{\text{bc}}$	$29.98 \pm 0.84^{\text{c}}$
ACLS-1c	$56.87 \pm 0.70^{\text{b}}$	$96.03 \pm 0.12^{\text{d}}$	$36.75 \pm 2.27^{\text{ab}}$
OS-0.2c	$54.13 \pm 0.31^{\text{cd}}$	$97.01 \pm 0.13^{\text{b}}$	$26.56 \pm 1.29^{\text{c}}$
OS-0.6c	$57.33 \pm 1.21^{\text{b}}$	$96.82 \pm 0.07^{\text{bc}}$	$35.00 \pm 3.02^{\text{b}}$
OS-1c	$64.47 \pm 0.95^{\text{a}}$	$96.51 \pm 0.20^{\text{c}}$	$41.15 \pm 2.35^{\text{a}}$

ACLS: Almidón acetilado-entrecruzado; OS: Almidón oxidado; c: Cera de abeja
Letras iguales indican que no existe diferencia significativa ($p < 0.05$ %).

7.2.1.2 Medición de la materia soluble total

El comportamiento de las PC ante la presencia de agua, es un parámetro importante que determina en primera instancia su aplicación sobre algún producto en específico, por lo que su tolerancia o afinidad por el agua depende directamente de su composición química (Pérez-Gago y col., 1999).

De acuerdo con los resultados reportados para la solubilidad de las PC (Cuadro 6), se observa que existe una interacción significativa entre el tipo de almidón modificado al 0.6% (w/v) de cera de abeja, además los valores más bajos de solubilidad se obtuvieron de 96.03 ± 0.12 %MS para ACLS y 96.51 ± 0.20 %MS para OS, al incorporar la mayor concentración de cera de abeja (1% w/v) en cada formulación para cada tipo de almidón modificado; sin embargo, las PC al contacto con el agua mantuvieron por poco tiempo su integridad y conforme aumentó el tiempo de exposición (1 h), ésta se perdió completamente. Éste efecto pudo deberse a la formación de complejos de lípido con los componentes de la matriz estructural de la PC. En base a lo expuesto por Pérez-Gallardo (2012), con micrografías realizadas a PC a base de ACLS y OS, se observa que la estructura abierta y desorganizada del ACLS pudo haber permitido la pérdida de materiales solubles a través de ésta y para el OS, donde su estructura es mucho más compacta, la separación de las partículas de cera de abeja les permite actuar protegiendo la cara superior de la PC de la hidratación, mientras que otras partículas pueden permanecer embebidas dentro de la matriz de la PC.

7.2.1.3 Medición de opacidad

La apariencia es el parámetro de aceptación más importante durante la selección de un producto por parte del consumidor. Por su parte, la opacidad puede predecir la perceptibilidad de la PC por el ojo humano al aplicarla como recubrimiento comestible sobre un alimento, por lo que se vuelve importante determinarla (López y col., 2008).

La opacidad se calculó conociendo el área bajo la curva de un barrido de absorción en la región visible del espectro electromagnético (400 a 700 nm) aplicado a la PC; mayor área bajo la curva incidirá en mayor opacidad o menor transparencia de la PC. En base a los resultados expuestos en el Cuadro 6, los valores van aumentando para cada tipo de almidón modificado conforme aumenta el contenido de cera de abeja, encontrándose los valores más altos de opacidad al 1% (w/v) de 36.75 ± 2.27 UA*nm para el ACLS y 41.15 ± 2.35 UA*nm para el OS, los cuales coinciden con la formulación de PC con mayor espesor. Éstos resultados coinciden con lo reportado por Pérez-Gallardo (2012) al obtener PC a base de ACLS y OS al 0.2% de cera de abeja con valores de 28 y 23 UA*nm respectivamente. Por el contrario se obtienen valores más bajos de opacidad que por los reportados por López y col., (2008) para PC a base de almidón acetilado (AS) y glicerol (52.31-11.125 UA*nm) y por Chen y col., (2009) en PC a base de almidón de tapioca y goma de hoja de hsian-tsao (46-96 UA*nm).

7.2.2 Propiedades de barrera

7.2.2.1 Permeabilidad al vapor de agua

La determinación de la PVA como una propiedad de barrera de las PC, puede contribuir a la predicción de la vida útil de productos frescos y mínimamente procesados, con la finalidad de preservar los parámetros de calidad que el consumidor exige; para que tal fin se logre, la PC debe funcionar como un medio de control de reacciones deteriorativas en el alimento, por lo que caracterizar sus propiedades de barrera a la humedad bajo ciertas condiciones de temperatura y humedad relativa, dependerán directamente de los materiales utilizados en su formulación (Janjarasskul y Krochta, 2010).

La PVA es una medida de la facilidad con la que el vapor de agua puede penetrar a través de una PC, por lo que valores mayores de esta propiedad, indican mayor transferencia de vapor de agua a través de la PC y, en términos

prácticos, esto constituiría una barrera pobre para productos frescos, por lo que la mejor formulación es la que presente los menores valores de PVA. Por otro lado, McHugh y col. (1993) consideran que el espesor de una PC es un factor importante a tomar en cuenta en la determinación de la PVA, ya que a medida que el espesor aumenta, se incrementa la resistencia a la transferencia de masa a través de ella y en consecuencia la presión parcial de vapor de agua de equilibrio en la superficie inferior de la PC se incrementa. Por su parte, los plastificantes hidrofílicos como el sorbitol, son compatibles con el material polimérico que forma la PC, provocando un aumento en la capacidad de absorción de moléculas polares tales como el agua, al reducir las fuerzas intermoleculares entre las cadenas del polímero, provocando que exista un mayor espacio en su estructura para que las moléculas de agua migren a través de la PC; por ello la incorporación de agentes hidrofóbicos tales como la cera de abeja se convierte en una alternativa útil para elaborar una PC con menores valores de PVA, útil para aplicarse a productos frescos. Los resultados obtenidos para la PVA de los distintos tratamientos evaluados se muestran en el cuadro 7 y el cálculo para la obtención de dicho parámetro se describe en el apéndice 1; de acuerdo con el análisis estadístico, se observa que no existe una interacción entre el tipo de almidón y el porcentaje de cera de abeja, siendo solo significativo los tratamientos al 1% (w/v) de cera de abeja, donde se obtienen los valores más bajos de PVA de 0.57 ± 0.04 g•mm/m²•h•KPa para ACLS y 0.56 ± 0.05 g•mm/m²•h•KPa para OS, respectivamente. Pérez-Gallardo (2012) reportó valores similares, de 0.45 ± 0.00 g•mm/m²•h•KPa y 0.48 ± 0.01 g•mm/m²•h•KPa en PC a base de ACLS y OS con 0.2% (w/v) de cera de abeja.

Cuadro 7. Permeabilidad al vapor de agua de las películas comestibles

Tratamiento	PVA (g·mm/m²·h·KPa ± DE)
ACLS-0.2c	0.77 ± 0.01 ^a
ACLS-0.6c	0.69 ± 0.06 ^{bc}
ACLS-1c	0.57 ± 0.04 ^d
OS-0.2c	0.74 ± 0.02 ^b
OS-0.6c	0.63 ± 0.04 ^{bc}
OS-1c	0.56 ± 0.05 ^c

ACLS: Almidón acetilado-entrecruzado; OS: Almidón oxidado; c: Cera de abeja;
Letras iguales indican que no existe diferencia significativa ($p < 0.05$ %)

7.2.2.2 Permeabilidad al oxígeno

Durante el transporte de gases a través de un empaque comestible pueden ocurrir dos mecanismos de difusión: la difusión capilar y la difusión activa. El primero ocurre en materiales que son porosos o que presentan imperfecciones, y el segundo mecanismo incluye la solubilización del gas en la PC, la difusión a través de la misma y finalmente el paso del gas al otro lado de la PC. Por otro lado, la velocidad de difusión a través de un empaque comestible aumenta con el tamaño y número de cavidades causadas por la presencia de sustancias como los plastificantes y otros aditivos incorporados en su formación, ya que reducen la fuerza cohesiva entre las cadenas del polímero que forma la matriz estructural del empaque comestible causando una movilidad de la cadena y, por tanto, un incremento en la PO debido a la interposición del plastificante con las cadenas del polímero. Por tanto, la difusión activa dependerá del tamaño y polaridad del gas penetrante y de la cristalinidad, de los enlaces y el movimiento de las cadenas del polímero (Lacroix, 2009).

Los parámetros a estimar dentro de la prueba de PO incluyen la velocidad de transmisión de gas (GTR) la cual se define como el volumen de un gas (O₂)

que fluye normal a través de dos superficies paralelas, en condiciones de estado estacionario por unidad de área, bajo un diferencial de presión y bajo condiciones de prueba (temperatura y espesor), y el coeficiente de PO, el cual, a diferencia del primero, se calcula bajo las mismas condiciones de estado estacionario a la temperatura del ensayo pero sin tomar en cuenta el espesor de la PC, siendo una propiedad básica a estimar en un material independiente de su geometría (ASTM: D3985-02, 2002).

De acuerdo con las PC evaluadas, solo se pudieron obtener valores al 1% (w/v) de cera de abeja para ambos almidones (Cuadro 8), los cuales se encuentran por encima de lo reportado para empaques a base de plásticos sintéticos (polietileno de baja densidad) cuyo valor de PO es de $2.1 \text{ E-}10 \text{ cm}^3 \cdot \text{cm} / \text{cm}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{cmHg}$ (Shuichi y col., 1968).

Con lo que respecta al resto de los tratamientos analizados no fue posible obtener resultados debido a que las PC no soportaron la prueba, lo que pudo atribuirse, en primera instancia, a los valores de espesor tan pequeños que se manejaron ($50\text{-}65 \text{ }\mu\text{m}$) y por otro lado, a la alta sensibilidad del equipo al detectar pequeñas microfisuras en las PC, ya que se observó que el flujo de O_2 que pasa a través de la PC fue de cero, lo que nos permitió concluir que estaba pasando una gran cantidad de O_2 a través de la PC provocando que el sensor del equipo por seguridad se inhibiera para evitar que se saturara, haciendo imposible obtener un coeficiente de PO.

Cuadro 8. Permeabilidad al oxígeno de las películas comestibles

Tratamiento	PO ($\text{cm}^3 \cdot \text{cm} / \text{cm}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{cmHg} \pm \text{DE}$)
ACLS-1c	$4.56 \text{ E-}11 \pm 8.93^a$
OS-1c	$5.05 \text{ E-}11 \pm 1.10^b$

ACLS: Almidón acetilado-entrecruzado; OS: Almidón oxidado; c: Cera de abeja;
PO: Permeabilidad al oxígeno

Letras iguales indican que no existe diferencia significativa ($p < 0.05 \%$).

Han y col. (2006) reportan que un aumento en la concentración de cera de abeja puede provocar un incremento significativo en la PO de la PC. Dado que el mecanismo de permeación de un gas se compone de un mecanismo de difusión y absorción, dicho efecto puede explicarse mediante dos teorías: la primera, la difusión de las moléculas de O_2 se efectúa a través de los canales hidrofóbicos de la cera de abeja y dado que las moléculas de O_2 son solubles en agua así como en aceite, la PC a base de almidón no contienen agua libre que podría ser utilizada como una ruta de difusión del oxígeno dando lugar a un valor de difusividad mayor. La segunda teoría es que el aumento en la concentración de cera de abeja en las PC de almidón expone más moléculas de dicho agente hidrofóbico en la superficie de PC y en consecuencia disminuye su energía superficial, provocando que se acelere el proceso de absorción del O_2 de la atmósfera y aumente la solubilidad del O_2 , lo que conlleva a un incremento en la PO. Ambas teorías pueden explicar los valores tan altos que se obtienen de dicho parámetro en las PC evaluadas al 1% (w/v) de cera de abeja.

7.2.3 Propiedades mecánicas

Debido a que las PC deben de caracterizarse mecánicamente con el objetivo de conocer su comportamiento y poder adaptarse a su posible deformación una vez que sean aplicadas como recubrimiento comestible al producto de interés, a las PC analizadas se les determinó su RT, definida como la fuerza de tensión por unidad de área necesaria para romper la película, el %E siendo el grado de estiramiento que puede recibir la PC antes de romperse y el ME, el cual está dado por la relación de la fuerza de tensión por unidad de área a la deformación unitaria de la PC. Valores grandes de RT y %E, combinados con bajos valores de ME, representan PC difíciles de estirar y romper. Por el contrario, valores bajos de RT y ME combinados con altos valores de %E, representan PC fáciles de estirar, pero difíciles de romper.

Los resultados obtenidos para cada uno de los tratamientos evaluados se muestran el Cuadro 9 y el estimación del ME describe en el apéndice 2; de acuerdo con el análisis estadístico si existe una interacción entre el tipo de almidón y el porcentaje de cera de abeja para la RT y el ME de las PC, y se observó un efecto directamente proporcional de la concentración de cera de abeja sobre el %E e inversamente proporcional sobre la RT y el ME. Además, para ambos almidones al 1% (w/v) de cera de abeja se obtuvieron las mejores propiedades mecánicas, al tener los valores más bajos de RT y ME y más altos de %E, lo cual puede deberse a que la cera de abeja, al tener menor concentración de hidrocarburos y mayor concentración de ésteres, puede interaccionar con la red tridimensional formada por el almidón y el sorbitol, actuando también como plastificante y con ello mejorando las propiedades mecánicas de la PC. Por otro lado, las PC a base de OS al 0.2% (w/v) de cera de abeja mostraron los valores más bajos de RT y %E, dando como resultado PC sumamente quebradizas y difíciles de analizar.

Cuadro 9. Propiedades mecánicas de las películas comestibles

Tratamiento	RT (MPa)¹	E (%)²	ME (MPa)³
ACLS-0.2c	681.74 ± 91.64 ^b	31.56 ± 23.33 ^{ab}	3210.84 ± 59.04 ^a
ACLS-0.6c	883.19 ± 71.43 ^a	44.92 ± 12.58 ^a	2601.43 ± 96.03 ^b
ACLS-1c	613.72 ± 28.13 ^{bc}	40.57 ± 11.17 ^{ab}	2102.97 ± 82.06 ^c
OS-0.2c	220.96 ± 26.29 ^d	8.32 ± 0.32 ^b	83.19 ± 13.01 ^d
OS-0.6c	461.62 ± 35.38 ^c	40.20 ± 12.73 ^{ab}	2416.33 ± 38.3 ^{bc}
OS-1c	626.06 ± 91.79 ^{bc}	55.76 ± 1.61 ^a	2010.83 ± 4.87 ^c

ACLS: Almidón acetilado-entrecruzado; OS: Almidón oxidado; c: Cera de abeja

¹RT: Resistencia a la tensión. ²E: Elongación. ³ME: Módulo elástico

Letras iguales indican que no existe diferencia significativa ($p < 0.05$ %).

7.3 Concentración mínima letal (CML) de los antimicrobianos seleccionados contra *Botrytis cinerea* ATCC 12481.

La CML es definida como la concentración mínima de antimicrobiano a la que se produce el 99.9% de reducción de los microorganismos. Por otro lado, la concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la concentración de antimicrobiano más baja a la que no hay crecimiento visible del microorganismo partiendo de un inóculo inicial de aproximadamente 10^5 ufc/mL (López-Malo y col., 2005).

Primeramente, se llevó a cabo la interacción directa del antimicrobiano contra el hongo deteriorador *B. cinerea* ATCC 1481 mediante el método de dilución, con la finalidad de determinar la CML de los antimicrobianos seleccionados (LAE y Natamicina). Se probaron cuatro concentraciones de cada antimicrobiano en base a estudios preliminares realizados por Márquez-Hernández (2010), donde se mostró inhibición del hongo y basándonos en los límites permitidos reportados para su uso en alimentos. La inhibición completa de *B. cinerea* ATCC 1481 se encontró para LAE a una concentración de 250 ppm, partiendo de una población inicial de 5.5 ufc/ml (Figura 10). Un comportamiento similar se observó para la natamicina, cuyo efecto antimicrobiano se encontró, en 20 ppm (Figura 11) lográndose una completa inhibición del hongo.

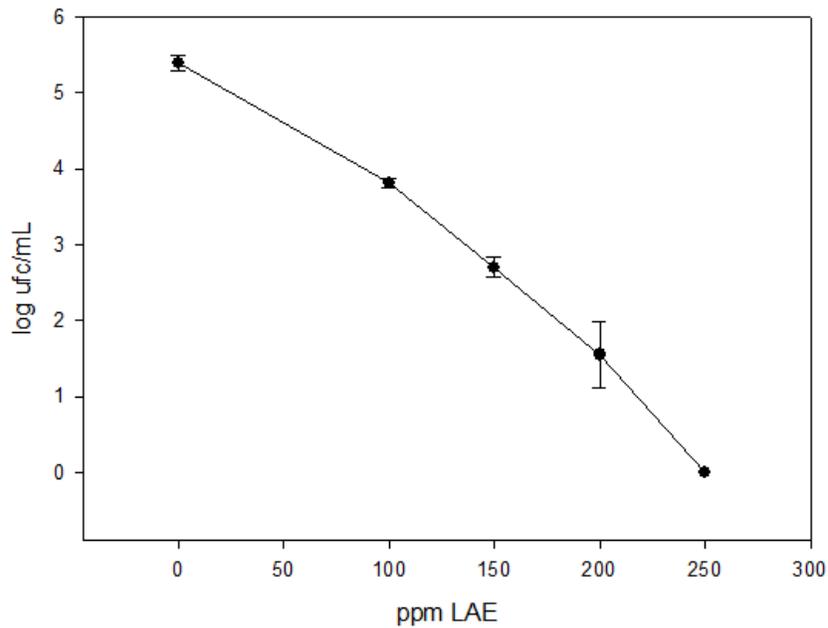


Figura 10. CML del arginato laúrico (LAE) contra *B. cinerea* ATCC 1481

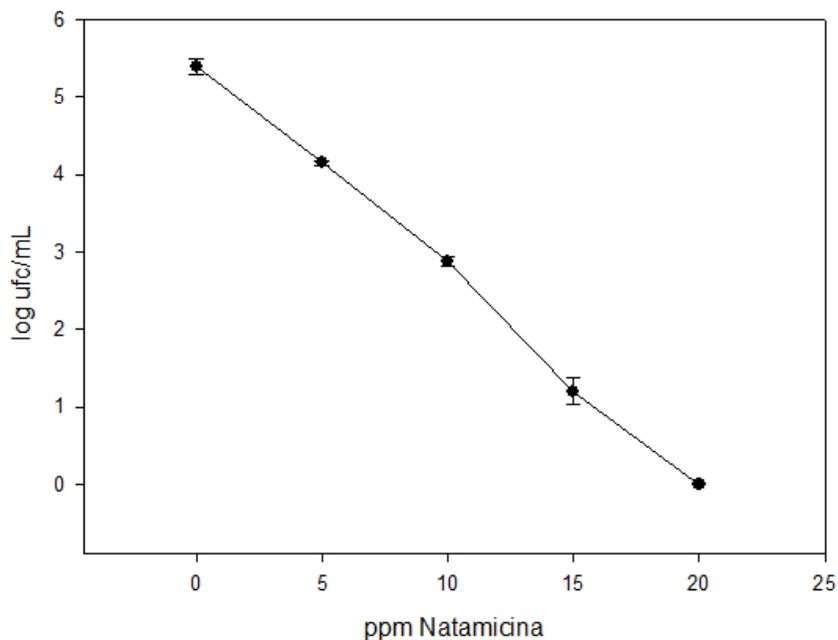


Figura 11. CML de la natamicina contra *B. cinerea* ATCC 1481

En la figura 12 se muestra la inhibición de *B. cinerea* ATCC 1481 por parte de los antimicrobianos LAE y Natamicina al quinto día de incubación, mediante el método de extensión en placa en agar RBC, con la finalidad de tener un monitoreo selectivo de la germinación de las esporas.

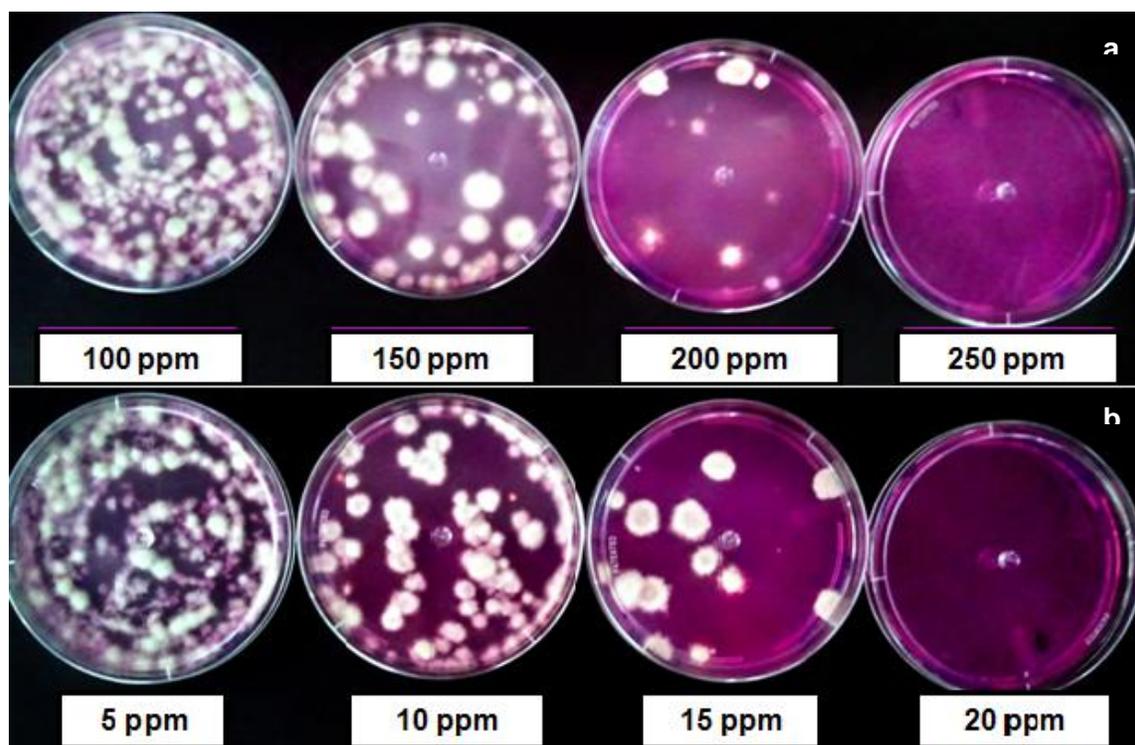


Figura 12. CML contra *B. cinerea* ATCC 1481 en agar RBC a) LAE; b) Natamicina

7.4 Efecto de la película comestible activa contra el crecimiento de *Botrytis cinerea* ATCC 12481.

La CML de cada antimicrobiano se adicionó a la formulación seleccionada de la PC que presentó las mejores características fisicoquímicas, de barrera y mecánicas evaluadas, con la finalidad de obtener una PC activa. Con los resultados obtenidos se eligió la formulación al 1% (w/v) para ambos almidones. Por su parte, se evaluó el efecto antimicrobiano de la PC incorporando cada antimicrobiano en su concentración original y aumentando en proporción de 10 y 20 veces más, encontrándose una completa inhibición a 428 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para LAE (Figura 13) y 48 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para la natamicina (Figura 14).

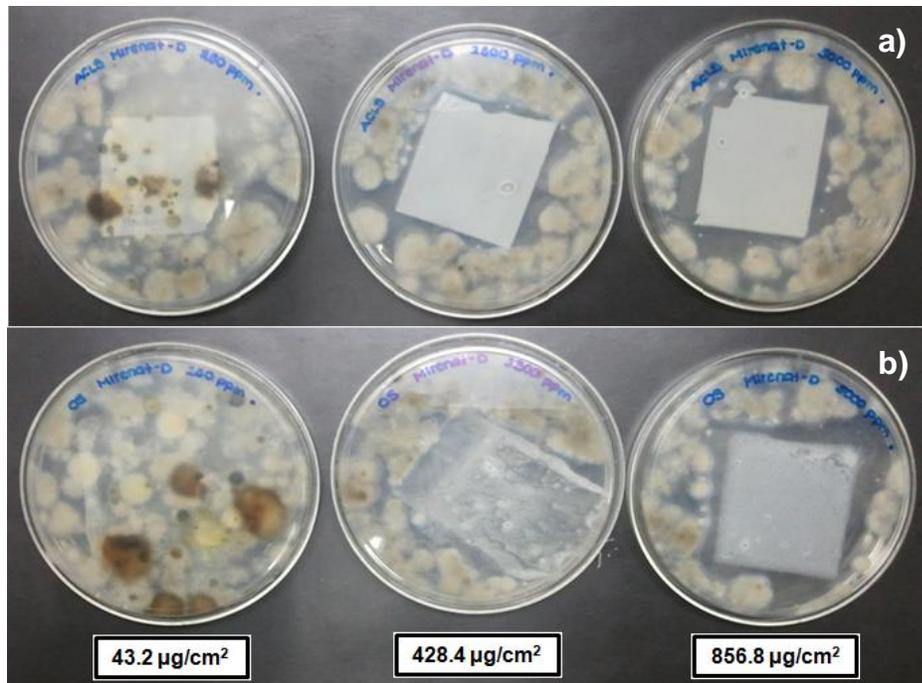


Figura 13. Inhibición de la PC activa con LAE contra *B. cinerea* ATCC
a) ACLS; b) OS

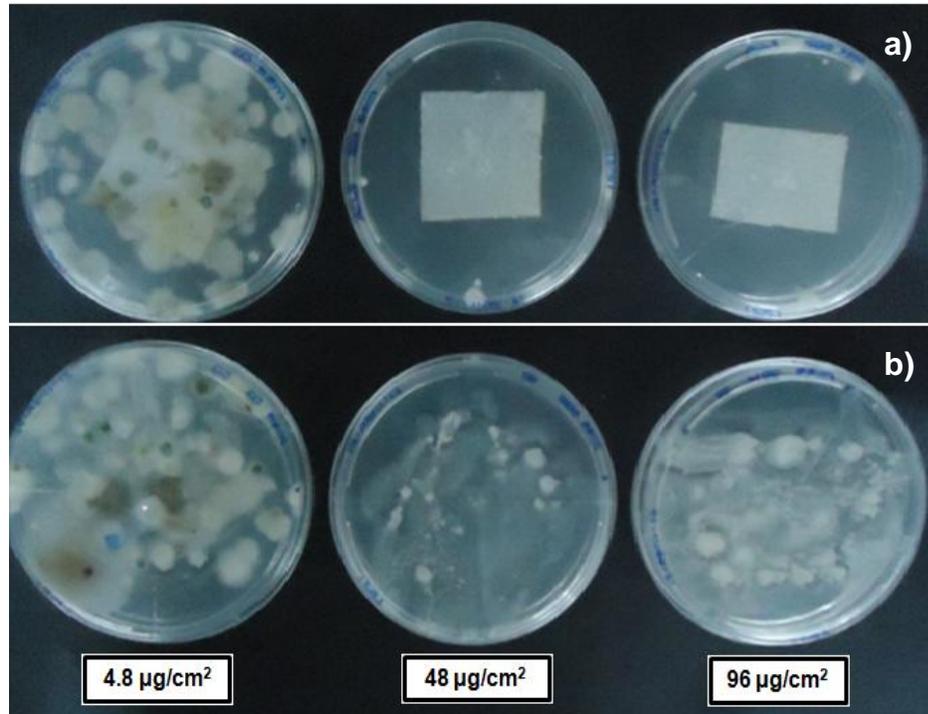


Figura 14. Inhibición de la PC activa con natamicina contra *B. cinerea* ATCC
a) ACLS; b) OS

Ozdemir y Floros (2003) demostraron que existen diferentes factores que pueden afectar la liberación de un agente antimicrobiano al encontrarse incorporado en una PC. Entre ellos se encuentran la cantidad de cada material que está involucrado en su composición. Así pues, se ha demostrado que al aumentar la cantidad de polímero estructural en la PC, como lo es el almidón, ocurre una disminución en la liberación del antimicrobiano, debido a un incremento en el entrecruzamiento de las cadenas del polímero. En cuanto a los agentes hidrofóbicos como la cera de abeja, el comportamiento es similar, ya que al aumentar su concentración se disminuye la liberación del agente antimicrobiano, debido a que las partículas de cera de abeja generan tortuosidad en las PC, dificultando la migración del antimicrobiano. Por otra parte, los plastificantes como el sorbitol, muestran un comportamiento opuesto, ya que al incrementar su concentración, el nivel de migración es mayor debido a que tiene la habilidad de reducir los puentes de hidrógeno internos y de aumentar el espacio intermolecular entre las cadenas de almidón.

8 CONCLUSIONES

Los almidones modificados acetilado-entrecruzado y oxidado como componentes principales de la matriz estructural de un empaque comestible, a una concentración del 3% w/v y 6% w/v respectivamente, lograron formar PC con buenas características visuales y mecánicas.

El uso de cera de abeja como agente hidrófobo a una concentración de 1% (w/v) proporciona buenas propiedades de barrera al vapor de agua y al oxígeno y menor solubilidad a las películas comestibles, siendo ésta una buena alternativa para aumentar la vida útil de productos frescos.

El tipo de almidón modificado no afecta las propiedades físicas o de barrera de las películas comestibles, los cuales pueden utilizarse para el desarrollo de recubrimientos comestibles para productos alimenticios específicos.

El uso de los antimicrobianos arginato láurico y natamicina en una PC a concentraciones de 428 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para LAE y 48 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente, logra la completa inhibición del hongo deteriorador *Botrytis cinerea* ATCC 12481.

BIBLIOGRAFÍA

ASTM. 2002. Standard test method for oxygen gas transmission rate through plastic film and sheeting using a colorimetric sensor. Standard Designation D3985-02.

ASTM. 2002. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Standard Designation D882-02.

ASTM. 2000. Standard test method for water vapor transmission of materials. Standard Designation E96-00.

Behrend, O., Ax, K. y Schubert, H. 2000. Influence of continuous phase viscosity on emulsification by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*. 7: 77-85.

Bello-Pérez, L.A. y Paredes-López, O. 1999. El almidón: lo comemos pero no lo conocemos. *Ciencia*. 50: 29-33.

Brody, A.L., Strupinsky, E.R. y Kline, L.R. 2001. Active packaging for food applications. CRC Press. p. 131-194.

Chen, C.H., Kuo, W.S. y Lai, L.S. 2009. Rheological and physical characterization of film forming solutions and edible films from tapioca starch/decolorized hsian-tsau leaf gum. *Food Hydrocolloids*. 23(8): 2132-2140.

Cooksey, K. 2005. Effectiveness of antimicrobial food packaging materials. *Food Additives Contaminants*. 22(10): 980-987.

Delves-Broughton, J., Thomas, L.V., Doan, C.H. y Davidson, P.M. 2005. Natamycin. En: Davidson, M.P., Sofos, J.N. y Branen, A.L. Antimicrobials in Food. 3rd Ed. CRC, Taylor & Francis. p. 275-303.

García, M.A., Martino, M.N. y Zaritzky, N.E. 1998. Starch based coatings: effect on refrigerated strawberry (*Fragaria ananassa*) quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 76: 411-420.

García-Garibay, M., Revah, S. y Gómez, R. L. 2004. Biotecnología Alimentaria. Noriega Editores, México D.F. p. 196-197.

García, M.A., Pinotti, A., Martino, M.N. y Zaritzky, N.E. 2009. Characterization of starch and composite edible films and coating. En: Milda E. Embuscado y Kerry C. Huber (Ed.). *Edible films and coatings for food applications*. Springer, New York. p.169-210.

Gontard, N., Duchez, C., Cuq, J. y Guilbert, S. 1993. Water and glicerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *Journal of Food Science*. 58: 206-211.

Guilbert, S., Gontard, N. y Cuq, B. 1995. Technology and applications of edible protective films. *Packaging Technology and Science*. 8: 339-346.

Han, J.H., Seo, G.H., Park, I.M., Kim, G.N. y Lee, D.S. 2006. Physical and mechanical properties of pea starch edible films containing beeswax emulsion. *Journal of Food Science*. 71: 290-296.

Hagenmaier, R.D. y Baker, R.A. 1994. Wax microemulsions and emulsions as citrus coatings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42: 899-902.

Hu, G., Chen, J. Y Gao, J. 2009. Preparation and characteristics of oxidized potato starch films. *Carbohydrate polymers*. 76: 291-298

Jane, J. 2006. Current understanding on starch granule structures. *The Japanese Society of Applied Glycoscience*. 53: 205-213.

Janjarasskul, T. y Krochta, M.J. 2010. Edible packaging materials. *The Annual Review of Food Science and Technology*. 1: 415-448.

Kentish, S., Wooster, T.J., Ashokkumar, M., Balachandran, S., Mawson, R. y Simons, L. 2008. The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 9: 170-175.

Kester, J.J. y Fennema, O.R. 1986. Edible films and coatings: a review. *Food Technology*. 40(12): 47-59.

Kim, K.W., Ko, C.J., Park, H.J. 2002. Mechanical properties, water vapor permeabilities and solubilities of highly carboxymethylated starch-based edible films. *Journal of Food Science*. 67: 218-222.

Kramer, M.E. 2009. Structure and function of starch-based edible films and coatings En: Milda E. Embuscado y Kerry C. Huber. Edible films and coatings for food applications. Springer, New York. p. 113-134.

Krochta, J.M. y De Mulder-Johnston, C. 1997. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food Technology*. 51(2): 61-74.

Lacroix, M. 2009. Mechanical and permeability properties of edible films and coatings for food and pharmaceutical applications. En: Embuscado M.E. y Huber, K.C. (Ed.). Edible films and coatings for food applications. Springer, New York. p. 347-366.

Lin, D. y Zhao, Y. 2007. Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 6(3): 60-71.

Liu, Z. y Han, J.H. 2005. Film-forming characteristics of starches. *Journal of Food Science*. 70(1): 31-34.

Longares, A., Monahan, F.J., O'Riordan, E.D., y Sullivan, M.O. 2004. Physical properties and sensor y evaluation of WPI films of varying thickness. *Food Science and Technology*. 37(5): 545-550.

López-Malo, A., Palou, E., Parish, M.E. y Davidson, M. 2005. Methods for activity assay and evaluation of results. En: Davidson, M.P., Sofos, J.N. y Branen, A.L. *Antimicrobials in Food*. 3rd Ed. CRC, Taylor & Francis. p. 659-680.

López, O.V., García, M.A. y Zaritzky, N.E. 2008. Film forming capacity of chemically modified corn starches. *Carbohydrate Polymers*. 73: 573-581.

McHugh, T. H., Avena-Bustillos, R. y Krochta, J. M. 1993. Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*. 58(4):899-903.

Magaña-Alemán, F. 2007. Diseño de un material de empaque biodegradable a base de aislado de proteína de suero adicionado con agentes antimicrobianos naturales. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro.

Márquez-Hernández, Y.M. 2010. Formulación y caracterización de recubrimientos comestibles a base de proteína de suero de leche y almidones modificados. Tesis para obtener el título de Ingeniero Químico en Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro.

Martin-Belloso, O., Rojas-Graü, M.A. y Oms-Oliu, G. **2006**. Calidad de frutas frescas cortadas y películas comestibles. Universidad de Lleida, España.

McHugh, T.H. y Krochta, J.M. **1994**. Edible coatings and films to improve food quality. CRC Press, Florida. p. 139-141.

Montero-Calderón, M., Rojas-Graü, M.A. y Martín-Belloso, O. **2008**. Effect of packaging conditions on quality and shelf life of fresh cut pineapple (*Ananas comosus*). *Postharvest Biology and Technology*. 50: 182–189.

Ninnemann, K.W. **1968**. Measurement of physical properties of flexible films. *The Science and Technology of Polymer Films*. Interscience: Londres, Inglaterra. p. 546-646.

Olivas, G.I. y Barbosa-Cánovas, G.V. **2005**. Edible coating for fresh-cut fruits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45: 657-670.

Olivas, G.I. y Barbosa-Cánovas, G. **2009**. Edible films and coatings for fruit and vegetables. En: Milda E. Embuscado y Kerry C. Huber (Ed.). *Edible films and coatings for food applications*. Springer, New York. p. 211-244.

Ozdemir, M. y Floros, J. **2003**. Film composition effects on diffusion of potassium sorbate through whey protein films. *Journal of Food Science*. 68: 511-516.

Pérez-Gago, M.B., Serra, M., Alonso, M., Mateos, M. y Del Río, M.A. **2003**. Effect of solid content and lipid content of whey protein isolate-beeswax edible coatings on color change of fresh-cut apples. *Journal of Food Science*. 68: 2186-2191.

Quezada-Gallo, J.A. 2009. Delivery of food additives and antimicrobials using edible films and coatings. En: Milda E. Embuscado y Kerry C. Huber (Ed.). Edible films and coatings for food applications. Springer, New York. p. 315-334.

Regalado, C., Pérez-Pérez, C., Lara-Cortés, E. y García-Almendárez, B. 2006. Whey protein based edible food packaging films and coatings. En: Guevara-González, R.G. y Torres-Pacheco, I. (Ed.). Advances in Agricultural and Food Biotechnology. Research Signpost, Kerala. p. 237-231.

Rojas-Graü, M.A. 2006. Recubrimientos comestibles y sustancias de origen natural en manzana fresca cortada. Una nueva estrategia de conservación. Tesis Doctoral. Universidad de Lleida. España.

Romero-Bastida, C.A., Bello-Pérez, L.A., García, M.A., Martino, M.N., Solorza-Feria, J., Zaritzky, N.E. 2005. Physicochemical and microstructural characterization of films prepared by thermal and cold gelatinization from non-conventional sources of starches. *Carbohydrate Polymers*. 60: 235-244.

Saartrat, S., Puttanlek, C., Rungsardthong, V. y Uttapap, D. 2005. Paste and gel properties of low-substituted acetylated canna starches. *Carbohydrate Polymers*. 61: 211-221.

Singh, J., Kaur, L., McCarthy, O.J. 2007. Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications- A review. *Food Hydrocolloids*. 21: 1-22.

Shuichi, A., Minoru, O. y Shih-Yow, H. 1968. Determination of oxygen permeability of polymer membranes. *I & EC Fundamentals*. 7(3): 497-502.

Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K. y Bigger, S.W. 2003. Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *Journal of Food Science*. 68: 408-420.

Torres, J., Bouzas, J. y Karel, M. 1985. Microbial stabilization of intermediate moisture food surfaces III. Effect of surface preservative concentration and surface pH control on microbial stability of an intermediate moisture cheese analog. *Journal of Food Processing and Preservation*. 9: 107-119.

Tharanathan, R.N. 2003. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science and Technology*. 14: 71-78.

Vargas, M., Pastor, C., Chiralt, A., McClements, J.D. y González-Martínez, Ch. 2008. Recent advances in edible coating for fresh and minimally processed fruits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 48: 496-511.

VEDEQSA. 2009. LAE New active preservative. Technical leaflet. Grupo LAMIRSA.

Villada, H.S., Acosta, H.A. y Velasco, R.J. 2007. Biopolímeros naturales usados en empaques biodegradables. *Temas agrarios*. 12(2): 5-13.

Vodjani, F. y Torres, J.A. 1990. Potassium sorbate permeability of methylcellulose and hydroxypropyl methylcellulose coatings: Effect of fatty acids. *Journal of Food Science*. 55: 841-6.

Wang, Y., y L. Wang. 2003. Physicochemical properties of common and waxy corn starches oxidized by different levels of sodium hypochlorite. *Carbohydrate Polymers*. 52: 207–217.

Wu, Y. y Seib, P.A. **1990**. Acetylated and hydroxypropylated distarch phosphates from waxy barley: Paste properties and freeze-thaw stability. *Cereal Chemistry*. 67(2): 202-208.

Yam K., Takhistov P. y Miltz J. **2005**. Intelligent packaging: Concepts and applications. *Journal of Food Science*. 70: 1-9

Yue, P. y Waring, S. 1998. Functionality of resistant starch in food applications. *Food Australia*. 50(12): 615-621

Zobel, H.F. **1988**. Molecules to granule: a comprehensive starch review. *Starch/St*. 40(2): 44-50

APÉNDICES

A.1 Determinación de la permeabilidad al vapor de agua

Se escogió arbitrariamente una medición correspondiente a uno de los tratamientos del diseño experimental que se llevó a cabo con ACLS al 3% (w/v), sorbitol como plastificante al 2.4% (w/v), cera de abeja como agente hidrofóbico al 1% (w/v) y Tween 80 al 0.15% (w/v), para mostrar cómo se obtuvo la PVA en todos los tratamientos del diseño experimental.

Los datos de pérdida de peso obtenidos durante el experimento se muestran en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Datos de la pérdida de peso con respecto al tiempo de la PC a base de ACLS

Tiempo (h)	Peso (g)
0	102.67
0.5	102.66
1	102.65
1.5	102.65
2	102.64
3	102.63
4	102.62
5	102.61
6	102.60
7	102.58
8	102.57
12	102.53
24	102.42

La gráfica y la ecuación obtenida a partir de la regresión lineal de los datos mencionados se muestran en la Figura 15.

La humedad relativa promedio registrada en este experimento fue de 44% y la temperatura promedio de 19.9 °C obteniendo una presión de vapor de agua

de 2.3234 KPa, el área expuesta fue de $8.76 \times 10^{-4} \text{ m}^2$ y el espesor medio de la película fue de $56 \mu\text{m}$ (0.056mm).

Con la ecuación 2 y 3 descritas en el apartado 6.2.3.1 se llevaron a cabo los cálculos como a continuación se muestra:

$$PVA = \frac{G/t \cdot x}{A \cdot \Delta P} \quad [2]$$

$$\Delta P = \frac{P^*}{100} (HR_2 - HR_1) \quad [3]$$

Cálculo de ΔP con la ecuación 3:

$$\Delta P = \frac{2.3234 \text{ KPa}}{100} (100 - 44)$$

$$\Delta P = 1.5606 \text{ KPa}$$

Cálculo de la PVA con la ecuación 2, de donde G/t, según la Figura 15, es de 0.0104 g/h, así:

$$PVA = \frac{(0.0104 \text{ g/h}) (0.056 \text{ mm})}{(0.000876 \text{ m}^2) (1.5606 \text{ KPa})}$$

$$PVA = 0.52 \text{ g} \cdot \text{mm}/\text{m}^2 \cdot \text{h} \cdot \text{KPa}$$

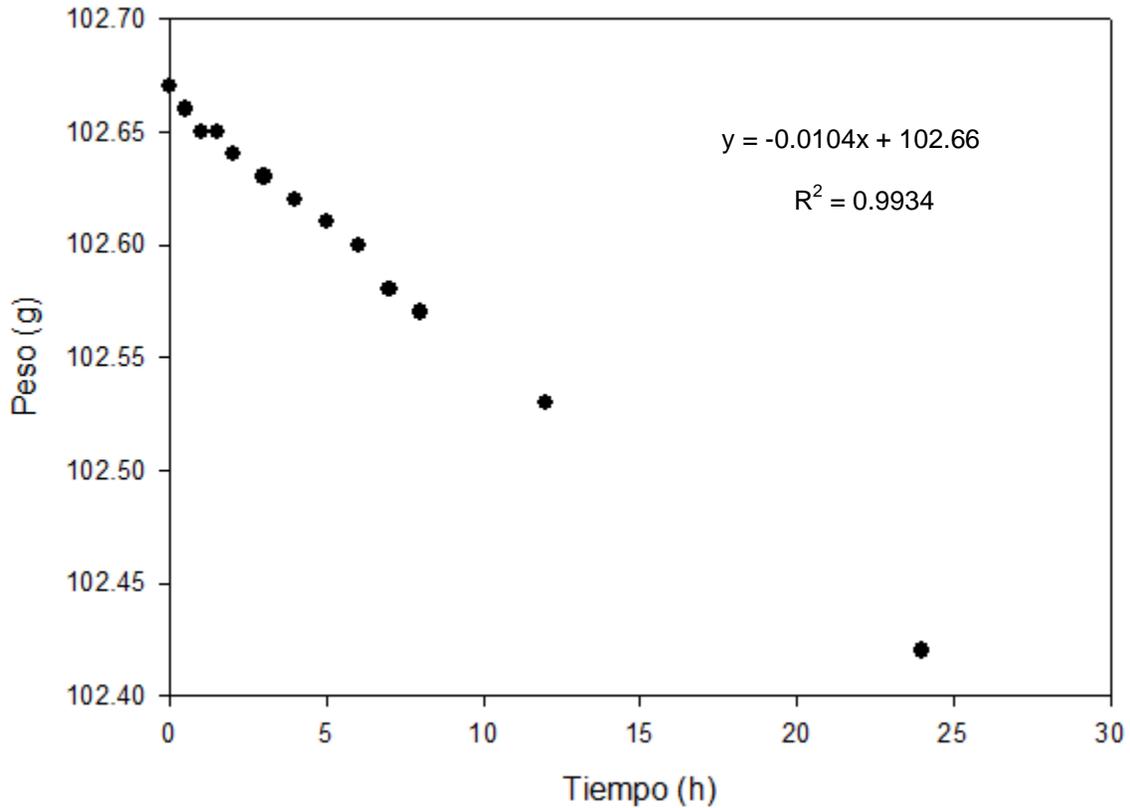


Figura 15. Pérdida de peso con respecto al tiempo para cálculo de PVA.

A.2 Determinación del módulo elástico

Se escogió arbitrariamente una medición correspondiente a uno de los tratamientos del diseño experimental que se llevó a cabo con OS al 6% (w/v), sorbitol como plastificante al 2.4% (w/v), cera de abeja como agente hidrofóbico al 1% (w/v) y Tween 80 al 0.15% (w/v), para mostrar cómo se estimó el ME en cada uno de los tratamientos.

Se generó una ecuación polinómica de tercer grado, con la finalidad de determinar la RT en el punto máximo de estiramiento de la PC en la región elástica, el cual está dado por el punto de inflexión de la curva generada de graficar los datos de esfuerzo de tensión(σ) vs. deformación unitaria (ϵ) (Figura 16A). Por su parte, el ME o Módulo de Young es un parámetro mecánico que se generó con la pendiente en la región elástica del mismo gráfico (Figura 16A).

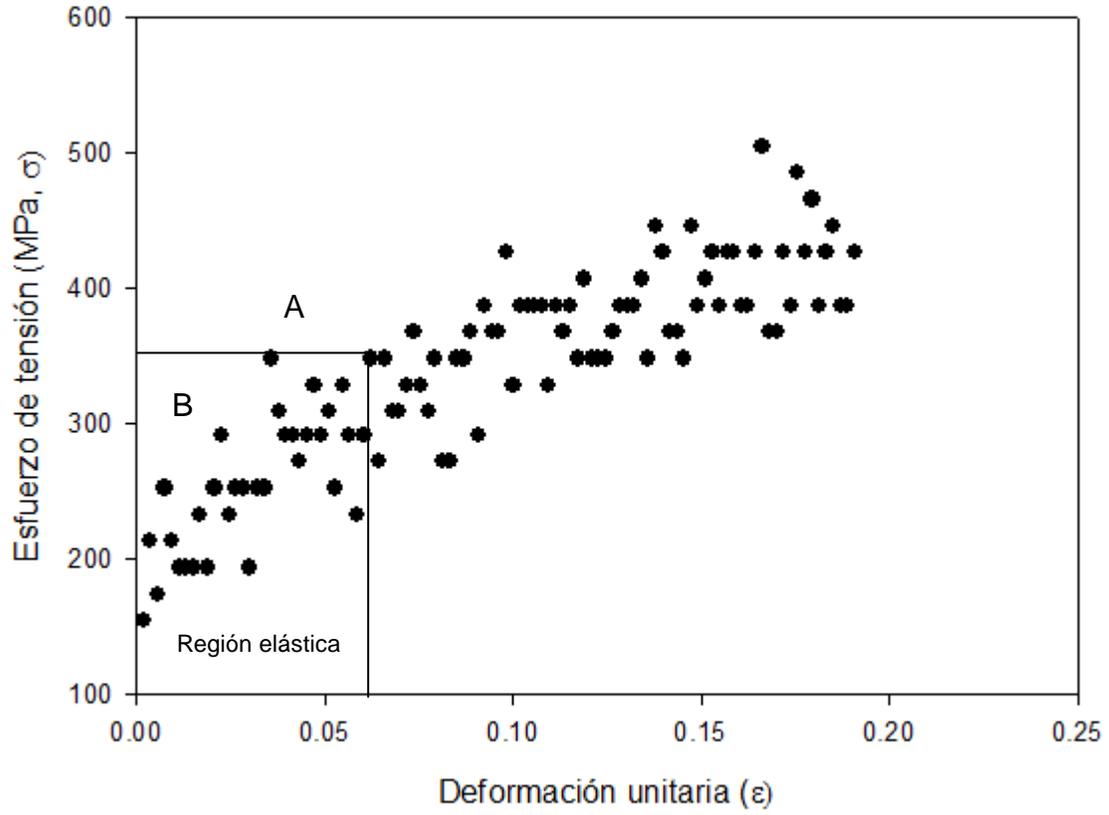


Figura 16. Esfuerzo de tensión (σ) vs deformación unitaria (ϵ)