



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE QUÍMICA

“Desarrollo de una película activa basada en almidón modificado y alginato de sodio con aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) aplicada en queso crema”

## Tesis

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

Presenta:

I. en AI. Yessica Viviana Galeano Loaiza

Dirigido por:

Dr. Carlos Regalado González

Co-dirigido por:

Dr. Everardo Mares Mares

Querétaro, Qro. a julio, 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



Desarrollo de una película activa basada en almidón  
modificado y alginato de sodio con aceite esencial de  
orégano (*Lippia graveolens* Kunth) aplicada en queso  
crema

**por**

Yessica Viviana Galeano Loaiza

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0  
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

**Clave RI:** FQMAC-309125



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

“Desarrollo de una película activa basada en almidón modificado y alginato de sodio con aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) aplicada en queso crema”

**Tesis**

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

**Presenta:**

I. en AI. Yessica Viviana Galeano Loaiza

**Dirigido por:**

Dr. Carlos Regalado González

**Co dirigido por:**

Dr. Everardo Mares Mares

Dr. Carlos Regalado González  
Presidente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Everardo Mares Mares  
Secretario

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Sofía María Arvizu Medrano  
Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

M.C. Andrés Carrillo Garmendia  
Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

Centro Universitario, Querétaro, Qro  
Septiembre de 2023  
México

## **Agradecimientos**

Agradezco al Dr. Carlos Regalado González y al Dr. Everardo Mares Meres por la orientación y la guía que me brindaron para la realización de este proyecto.

Igualmente, a todos los miembros de mi comité, Dra. Sofia María Arvizu Medrano, Dra. Silvia Lorena Amaya Llano y M.C. Andrés Carrillo Garmendia por sus contribuciones y conocimientos para el mejoramiento de la investigación.

Al Dr., Mario Enrique Rodríguez García, al M.C Porfirio Esaú Martínez Muñoz y al laboratorio C4 del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la UNAM, por la guía, el acompañamiento y las enseñanzas para la realización de algunos experimentos.

A la Dra. Minerva Ramos Gómez por sus consejos y acompañamiento durante las tutorías.

Al consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por el apoyo económico brindado durante todo el desarrollo de este proyecto.

A mi familia por apoyarme incondicionalmente en cada momento y por sus enseñanzas.

## ÍNDICE

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
Resumen .....	6
1 Introducción.....	8
2 Antecedentes .....	11
2.1 Películas/recubrimientos en alimentos .....	11
2.1.1 Alginato .....	12
2.1.1.1 Uso del alginato en materiales de empaque .....	14
2.1.2 Almidón Octenil succínico .....	16
2.1.2.1 Uso del almidón modificado en materiales de empaque .....	17
2.2 Biodegradabilidad de las películas .....	17
2.3 Aceites esenciales (AE) .....	18
2.4 Aceite esencial de orégano .....	19
2.4.1 Actividad antimicrobiana .....	22
2.4.1.1 Extracción del aceite esencial mediante destilación por arrastre de vapor .....	22
2.4.1.2 Uso de películas activas con aceite esencial de orégano .....	23
2.5 Microencapsulación.....	24
2.6 Queso crema.....	26
3 Justificación.....	30
4 Objetivos .....	32
4.1 Objetivo General .....	32
4.2 Objetivos específicos .....	32
5 Materiales y métodos .....	33
5.1 Estrategia experimental.....	33
5.2 Materiales.....	33
5.2.1 Reactivos .....	33
5.2.2 Material Biológico.....	34
5.2.3 Muestras de queso crema.....	34

5.2.4	Medios de cultivo .....	35
5.3	Métodos .....	35
5.3.1	Obtención del aceite esencial de orégano .....	35
5.3.2	Microencapsulación del aceite esencial de orégano .....	36
5.3.3	Activación de las cepas bacterianas .....	36
5.3.4	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del AEO-NSM frente a bacterias deterioradoras y patógenas .....	37
5.3.5	Determinación de la concentración mínima bactericida del AEO-NSM frente a bacterias patógenas .....	39
5.3.6	Elaboración de las películas activas (PA) .....	39
5.3.6.1	Actividad antimicrobiana de las películas .....	40
5.3.7	Caracterización de las películas .....	41
5.3.7.1	Espesor .....	41
5.3.7.2	Permeabilidad al vapor de agua (PVA) .....	41
5.3.7.3	Difracción de rayos X (XRD) .....	43
5.3.7.4	Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	43
5.3.7.5	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) .....	44
5.3.7.6	Color de la superficie y opacidad .....	44
5.3.7.7	Biodegradación de las películas en compostaje vegetal .....	45
5.3.8	Aplicación de la película al queso crema comercial .....	45
5.3.8.1	Pérdida de peso y pH .....	46
5.3.8.2	Análisis de Textura .....	46
5.3.8.3	Análisis de color .....	47
5.3.8.4	Análisis sensorial .....	47
5.3.8.5	Análisis microbiológico .....	49
5.3.8.6	Análisis estadístico .....	49
6	Resultados y discusión .....	49
6.1	Actividad antimicrobiana del AEO-NSM .....	49
6.2	Actividad antimicrobiana de las películas contra microorganismos patógenos .....	52

6.3	Caracterización de las películas.....	54
6.3.1	Espesor, permeabilidad al vapor de agua (PVA) y el coeficiente efectivo de difusión de agua (Ce).....	54
6.3.2	Difracción de rayos X (DRX) .....	57
6.3.3	Microscopía electrónica de barrido (MEB) .....	59
6.3.4	Análisis mediante espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) .....	61
6.3.5	Color de la superficie.....	63
6.3.6	Biodegradación de las películas en compostaje vegetal .....	65
6.3.7	Aplicación de la película al queso crema comercial .....	68
6.3.7.1	Pérdida de peso y pH.....	69
6.3.7.2	Análisis de Textura.....	71
6.3.7.3	Análisis de color .....	73
6.3.7.4	Análisis microbiológico.....	76
6.3.7.5	Análisis sensorial .....	78
7	Conclusiones.....	80
8	Bibliografía .....	82
	Anexo 1 Carta de consentimiento informado .....	100
	Anexo 2 Formato de evaluación sensorial .....	106
	Anexo 3. Figuras del ensayo MTT y efecto de las concentraciones de AEO-NSM frente a bacterias deterioradoras y patógenas .....	107

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla No.</b>	<b>Página</b>
1. Límites máximos de contenido microbiano para quesos frescos .....	27
2. Actividad inhibitoria del AEO-NSM frente a una levadura, bacterias patógenas y deterioradoras. ....	50
3. Espesor, permeabilidad al vapor del agua (PVA) y coeficiente efectivo de difusión de agua (Ce) de las películas con y sin AEO-NSM. ....	55
4. Parámetros de color CIELAB de las películas con y sin AEO-NSM.....	63
5. Parámetros de color CIELAB y diferencia de color del queso tratado con y sin las películas con AEO-NSM durante el tiempo de almacenamiento. ....	74



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura No.</b>	<b>Página</b>
1. Composición del alginato.....	12
2. Modelo “caja de huevo” que describe la estructura del alginato. ....	13
3. Mecanismo de acción de los aceites esenciales (AE) . ....	19
4. Montaje de destilación por arrastre de vapor . ....	23
5. Estructura de la red de sílice de las partículas mesoporosas . ....	25
6. Estrategia experimental. ....	33
7. Reacción enzimática de: A) bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) a B) (E, Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenil-formazan (formazán).....	38
8. Sistema de fotoacústica diferencial empleado para determinar el coeficiente de permeabilidad al vapor de agua de las películas formuladas con y sin AEO-NSM.....	42
9. Actividad inhibitoria frente a bacterias patógenas de las películas formuladas con y sin AEO- NSM. ....	53
10. Diámetro de la zona de inhibición (mm) de las películas con y sin AEO-NSM frente a bacterias patógenas.....	53
11. Difracción de rayos X (DRX) de las películas con y sin AEO-NSM.....	58
12. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB) de las películas con y sin AEO-NSM.....	60
13. Espectros de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) de las películas con y sin AEO-NSM.....	61
14. Porcentaje de pérdida de peso durante la biodegradación por compostaje de las películas con y sin AEO-NSM modelado con el método de Gompertz (1825). ....	65
15. Apariencia visual de los cambios ocurridos en las películas mediante el ensayo de biodegradación en compostaje natural. ....	66

<b>16.</b> Porcentaje de pérdida de peso y cambios de los valores de pH del queso crema tratado con y sin las películas con AEO-NSM durante el tiempo de almacenamiento a 4 °C.....	69
<b>17.</b> Cambios en la dureza del queso crema tratado con y sin las películas con AEO-NSM durante el tiempo de almacenamiento a 4 °C. ....	72
<b>18.</b> Actividad antimicrobiana del queso crema tratado con y sin las películas adicionadas de AEO-NSM durante el tiempo de almacenamiento. (A) bacterias aeróbicas mesófilas. (B) mohos y levaduras. ....	76
<b>19.</b> Evaluación sensorial del queso crema con los diferentes tratamientos. ....	78

## DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DEL ESTUDIANTE

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

*Yessica Viviana Galeano L.*

---

Yessica Viviana Galeano Loaiza

## Resumen

El desarrollo de materiales de empaque funcionalizados con biocomponentes permite importantes avances en la industria alimentaria, debido a que aumentan la vida útil de los alimentos. Esta investigación tuvo como objetivo producir y caracterizar una película activa (PA) utilizando alginato de sodio y almidón modificado con aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) (AEO) microencapsulado en nanopartículas de sílice mesoporoso (NSM) y evaluar su efecto en las características sensoriales, fisicoquímicas y microbiológicas del queso crema durante el almacenamiento a 4°C. La PA se formuló con 0.6 y 0.9 mg/mL de la mezcla AEO-NSM (relación 1:1, p/p). Se evaluaron la permeabilidad al vapor de agua (PVA), el color (CIELAB), la morfología de la superficie, las interacciones moleculares de la película y su biodegradabilidad. La concentración mínima inhibitoria (CMI) del AEO-NSM para *Listeria innocua*, *Scheffersomyces stipitis* y *Leuconostoc mesenteroides* fue de 0.2 mg/mL, mientras que para *Staphylococcus aureus* y *Salmonella Typhimurium* la CMI fue de 0.3 mg/mL. La PA permitió reducciones de la PVA del  $25.8 \pm 0.04\%$  y del coeficiente de difusión de agua del  $27.8 \pm 0.04\%$ , comparado con la película control (PC) sin AEO-NSM. Los espectros FT-IR mostraron los estados vibracionales de las diferentes formulaciones de la matriz polimérica. Los parámetros de color  $L^*$ ,  $b^*$  y  $\Delta E^*$  se vieron afectados por la incorporación de AEO-NSM en las películas. La PA mostró una superficie rugosa y una dispersión uniforme del AEO-NSM, mientras que su degradación en compostaje vegetal fue  $>90 \pm 3.1\%$  después de 80 días. Se determinó el efecto de la PA en rebanadas de queso crema comercial durante 35 días de almacenamiento a 4 °C, realizándose pruebas de pérdida de peso, pH, textura, color y análisis microbiológico. Los quesos que contenían la PA presentaron menores cambios en el pH, pérdida de peso, dureza y carga microbiana en el transcurso del almacenamiento. La PA diseñada permitió conservar el queso crema durante 15 días, mientras que sin película duró menos de 7 días. El análisis sensorial demostró una preferencia por las muestras sin película. Consecuentemente, el AEO-NSM influyó en las propiedades físicas, estructurales y de barrera de las PA.

**Palabras Clave:** películas activas, microencapsulación, queso crema, vida útil.

## Abstract

The design of packaging materials functionalized with biocomponents has allowed important advances in the food sector, because of the shelf-life extension of foods. This research aimed to produce and characterize an active edible film (AF) comprising sodium alginate and modified starch, added with Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth) essential oil (AEO) encapsulated in mesoporous silica nanoparticles (MSN). The aim also involved the application of AF to cream cheese to evaluate its effect during shelf life. The AF was formulated with 0.6 and 0.9 mg/mL of the AEO-MSN mixture (1:1 ratio, w/w). Water vapor permeability (WVP), color (CIELAB), surface morphology, film's molecular interactions and biodegradability were determined. The minimum inhibitory concentration (MIC) of AEO-MSN for *Listeria innocua*, *Scheffersomyces stipitis* y *Leuconostoc mesenteroides* was 0.2 mg/mL, while for *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Typhimurium the MIC was 0.3 mg/mL. The AF showed a decrease of  $25.8 \pm 0.04\%$  in WVP and of  $27.8\% \pm 0.04\%$  in the water diffusion coefficient compared to the films without AEO-MSN (CF). FT-IR spectra showed the vibrational states of the different polymer matrix formulations. The color parameters  $L^*$ ,  $b^*$  and  $\Delta E^*$  varied according to the incorporation of AEO-MSN to the CF. The AF showed rough surface and uniform dispersion of AEO-MSN, while its degradation in plant compost was  $>90 \pm 3.1\%$  after 80 days. The effect of AF on cream cheese slices during 35 days of storage at 4 °C was determined by testing for weight loss, pH, texture, color (CIELAB) and microbiological analysis. Cheeses containing AF showed a lower decrease in pH, weight loss, hardness and microbial load during storage. The cream cheese was preserved for 25 days using the AF, whereas the CF allowed only 15 days. Sensory analysis showed a preference for samples without film. Consequently, AEO-MSN influenced the physical, structural and barrier properties of AF.

**Keywords:** active films, microencapsulation, cream cheese, shelf life.

## 1 Introducción

Los sistemas de envasado en el sector alimenticio tienen como principal finalidad el incrementar la vida de anaquel de los alimentos, disminuyendo la interacción con agentes patógenos que causan el deterioro y previniendo la pérdida de compuestos deseables, conservando de esta manera su calidad y frescura (Marvdashti, Yavarmanesh y Koocheki, 2019; Mohamed, El-Sakhawy y El-Sakhawy, 2020). Adicionalmente, los bioplásticos constituyen aproximadamente 1% del plástico total producido cada año a nivel mundial (368 millones de toneladas) (European Bio-plastics, 2021). Por su parte, el 42 % de los plásticos se utilizan para el envasado de alimentos, estimando que alcance el doble para el 2035 (Hahladakis *et al.*, 2020).

Por su capacidad de biodegradación, el almidón ha sido utilizado en el envasado de una variedad de alimentos, como verduras, frutas, carne y pan (Cheng *et al.*, 2021). Así mismo, el almidón y diversos polisacáridos abundantes en la naturaleza presentan ventajas por su disponibilidad y capacidad para la formación de películas (Thakur *et al.*, 2019; Ruamcharoen, *et al.*, 2019). Estimando un incremento, para el año 2026 del 38% en la producción de bioplásticos en todo el mundo (European Bio-plastics, 2021).

En este contexto, se genera un gran interés para la elaboración de envases que mejoren la protección y vida de anaquel de los alimentos a base de compuestos naturales, como diferentes lípidos, polisacáridos y proteínas. Estos biomateriales aportan distintas características funcionales a las matrices desarrolladas. Pueden ser adicionados de componentes que pueden reducir o inhibir la oxidación de lípidos, mejorar la apariencia en su empaque, reducir la permeabilidad, así como el paso de moléculas al ambiente y tener un efecto antimicrobiano y antioxidante (Sid *et al.*, 2021).

En este sentido muchos aceites esenciales han sido utilizados en biopolímeros como componentes antimicrobianos, por su capacidad para prevenir la proliferación de patógenos bacterianos presentes en alimentos (El Asbahani *et al.*, 2015). Los aceites esenciales han sido empleados ampliamente, debido a sus propiedades antimicrobianas. Sin embargo, algunos factores limitan su uso, debido a las altas tasas de volatilización, la baja solubilidad en agua, la inestabilidad al incrementarse la temperatura, el pH y la tendencia a degradarse (Sousa *et al.*, 2022).

Por consiguiente, la microencapsulación es una estrategia que ha sido empleada como una técnica que permite conservar y proteger los compuestos biológicos del aceite esencial, manteniendo sus propiedades biológicas, funcionales y fisicoquímicas (Bajac *et al.*, 2022). Es importante mencionar que los aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas presentan un amplio espectro microbicida o microbiostático frente a bacterias, hongos y levaduras, permitiendo prolongar la vida útil en una extensa variedad de alimentos (Campos-Requena *et al.*, 2018).

Entre las bacterias relevantes en alimentos lácteos destaca la *Listeria monocytogenes*. Este patógeno de alimentos está asociado con la producción de queso artesanal (usando leche cruda), y queso a partir de leche pasteurizada (Silva *et al.*, 2022). En este sentido, varios países han reportado brotes de infecciones por *L. monocytogenes* asociados al consumo de productos lácteos listos para su consumo. Destacando, la leche y los quesos blandos, con una elevada tasa de letalidad que se encuentra entre el 20 y 30%, siendo un valor considerablemente alto respecto a otras bacterias patógenas (Rodríguez-Auad, 2018).

Por su gran variedad de texturas, formas y sabores, el queso es uno de los grupos más conocidos dentro de los productos lácteos fermentados o no, elaborados globalmente (Akarca *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2018). Sin embargo, la

superficie del queso es susceptible a la contaminación por bacterias y hongos, a causa del contenido de grasa y alta humedad (López-Mendoza *et al.*, 2023). Por lo tanto, el envasado del queso tiene como propósito fundamental proteger estos productos de las deficientes condiciones ambientales. la tensión mecánica, la contaminación de agentes patógenos y deterioradores en las diferentes etapas de almacenamiento y distribución (Berti *et al.*, 2019).

En la industria alimentaria el queso crema es de gran importancia debido al crecimiento económico proyectado para el 2026 de aproximadamente 8,300 millones de dólares estadounidenses (Pombo, 2021). Por su parte, México en el 2020 presentó una producción industrial de 38,876 toneladas (CANILEC, 2021). Sin embargo, por su contenido de grasa y alta humedad; su vida útil es corta y proporciona las condiciones el desarrollo de microorganismos patógenos y deterioradores (Surber *et al.*, 2021).

Por todo lo anterior, se presenta un requerimiento para el desarrollo de materiales de envasado que permitan aumentar la vida de anaquel del queso crema. La meta consiste en reducir el deterioro microbiológico y fisicoquímico, así como mantener sus características sensoriales, pero también implicando una disminución en el impacto ambiental ocasionado al utilizar materiales plásticos (El-Sayed *et al.*, 2021). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue obtener y caracterizar una película activa a base de alginato de sodio y almidón modificado con aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) y evaluar su efecto en las características sensoriales, fisicoquímica y microbiológicas a lo largo del tiempo de almacenamiento.



## 2 Antecedentes

### 2.1 Películas/recubrimientos en alimentos

El uso de películas o recubrimientos son una tecnología prometedora dentro de los sistemas de envasado, porque han permitido incrementar las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales de los alimentos. Estos sistemas de envasado generan barreras que disminuyen el paso del vapor de agua a través del material hacia y desde el ambiente. Además, actúan como acarreadores para agregar sustancias antimicrobianas de origen natural o sintético que promuevan la inocuidad del alimento y su vida útil, evitando impactar a la contaminación ambiental (Remedio *et al.*, 2019).

El uso de películas o recubrimientos permite mantener la calidad de un alimento una vez que su empaque ha sido abierto. Esto debido al control de la migración de humedad y lípidos, permitiendo conservar los aromas, sabores y colores presentes en el alimento (Solano-Doblado *et al.*, 2018). Considerando que el crecimiento microbiano puede ocurrir sobre la superficie del alimento, lo cual se sabe que es el origen de su deterioro, la fabricación de películas con sustancias antimicrobianas representa un tema de investigación pertinente (Pandía-Estrada *et al.*, 2021). La utilización de antimicrobianos encapsulados en películas comestibles permite el uso de menores cantidades de sustancias antimicrobianas, con capacidad de migración hacia la superficie del alimento (Rawdkuen, 2019).

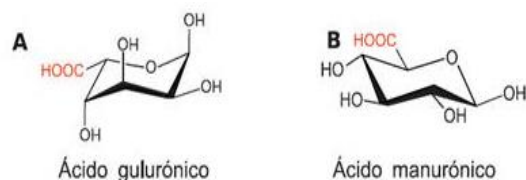
Las películas permiten incluir agentes antimicrobianos con el fin de obtener estabilidad microbiológica a los alimentos, debido a que pueden funcionar como transportadoras de un amplio número de compuestos (Umaraw *et al.*, 2020). En consecuencia, se han estudiado una variedad de materiales antimicrobianos para su uso en envases de alimentos o aplicaciones que involucran contacto con alimentos. Destacando, nanomateriales orgánicos/inorgánicos, bacteriocinas o

enzimas de origen bacteriano, extractos y aceites esenciales (AE) obtenidos de plantas y otras fuentes naturales (Priyadarshi *et al.*, 2021).

Entre los materiales que se han empleado para la formulación de películas y recubrimientos se tiene a los polisacáridos, las proteínas, los polímeros derivados de la síntesis microbiana y química obtenidos a partir de sustancias naturales. Sin embargo, las películas basadas en polímeros naturales han presentado desventajas, como relativamente alta permeabilidad al vapor de agua, pobres propiedades de barrera y baja resistencia mecánica. Por lo anterior, se han implementado varias estrategias para incrementar las propiedades de los biocompuestos, como técnicas de multicapa, en mezcla o compuesta y la reticulación, mejorando las limitaciones que presentan este tipo de materiales (Alias *et al.*, 2022).

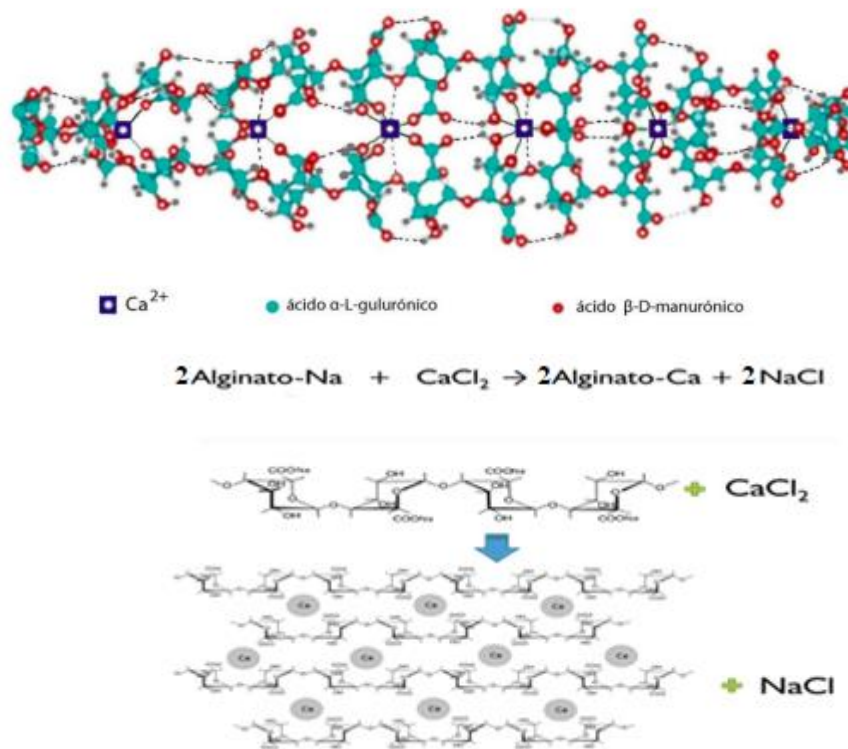
### 2.1.1 Alginato

El ácido algínico es un polisacárido que forma parte de la estructura celular de las algas marinas pardas, conocidas como feofíceas (clase *Phaeophyceae*). Los alginatos son sales del ácido algínico, los cuales pueden contener minerales como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , entre otros. Estas sales presentan distintos niveles de solubilidad en agua, lo que les confiere diferentes niveles de viscosidad (Yabur *et al.*, 2007; Pereira y Cotas, 2020). La composición principal del ácido algínico consiste en los ácidos  $\beta$ -D-manurónico (M) y  $\alpha$ -L-gulurónico (G) (Figura 1), cuya distribución es aleatoria en la estructura de la cadena del polisacárido (Meena *et al.*, 2020).



**Figura 1.** Composición del alginato. (A) Ácido gulurónico. (B) Ácido manurónico (Ore *et al.*, 2020).

Los tres tipos de bloques M, G y MG forman las sales del ácido algínico y los sitios de coordinación ocurren cuando dos cadenas del bloque G se alinean. Esto permite la formación de cavidades entre los bucles de las cadenas que permiten el acomodo/conjunción de los iones de calcio, revestidos con grupos carboxílicos y otros átomos de oxígeno que le confieren carácter electronegativo. Estos grupos funcionales están presentes en las cadenas del polisacárido, dando origen a la formación de las sales del ácido algínico por lo cual forman parte de la propia molécula. Posterior a la adición de  $\text{Ca}^{2+}$ , el alginato sufre cambios conformacionales (debido a su electronegatividad y afinidad electrónica), mediante el desplazamiento del  $\text{Na}^+$ , generando la denominación de “caja de huevo”, que describe el modelo de gelificación del alginato (Figura 2). Esta estructura puede formar dímeros utilizando las cadenas de ácido algínico, seguido por una mayor agregación de los dímeros (Avendaño-Romero *et al.*, 2013; Sreekumar y Bindhu, 2020).



**Figura 2.** Modelo “caja de huevo” que describe la estructura del alginato (Adaptado de: Avendaño-Romero *et al.*, 2013).

La sal del ácido algínico es una macromolécula polimerizada biodegradable y compatible biológicamente que presenta una gran capacidad de formación de geles cuando se tiene  $\text{Ca}^{2+}$ . Debido a su notable diversidad, este polímero ha sido ampliamente empleado como estabilizante, aglutinante, espesante, gelificante y para la formación de películas delgadas (Avendaño-Romero *et al.*, 2013). Se ha encontrado que forma una película fuerte en comparación con otros materiales como el caseinato de sodio y almidón, presentando mejores rendimientos en cuanto a permeabilidad al agua y propiedades mecánicas (Torres *et al.*, 2021).

El alginato, exhibe propiedades de renovación, lo cual significa que puede ser obtenido de forma sostenible sin agotar los recursos naturales. Las algas marinas tienen una alta tasa de crecimiento y se pueden cultivar de manera controlada, permitiendo obtener alginato de forma continua y amigable con el medio ambiente. Por su parte, el alginato es ampliamente disponible en el mercado, debido a su origen natural y su versatilidad en aplicaciones. Se produce y comercializa en diferentes formas, como polvo o gel, para su uso en diversas industrias, incluyendo alimentos, farmacéutica, cosmética y tecnológica. Además, se caracteriza por la no toxicidad, biodegradabilidad y biocompatibilidad, lo cual hace que sea un material destacado en el sector del envasado (Martău, *et al.*, 2019).

#### **2.1.1.1 Uso del alginato en materiales de empaque**

Algunos estudios han reportado que el empleo de recubrimientos con alginato en queso, incrementaron la vida útil en combinación con envasado en atmósfera modificada (MAP) en queso Mozzarella a 4 °C, incrementando su vida útil hasta 160 días (Mastromatteo *et al.*, 2014). Además, un recubrimiento basado en alginato de sodio (AS) adicionado de sorbato de potasio (3%), se aplicó en queso mozzarella fresco (almacenado a 8 °C) para evaluar la actividad antimicrobiana contra *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas* spp. Los patrones de aceptabilidad de

calidad general evaluados por análisis sensorial se mantuvieron durante 8 días, mientras que el control fue rechazado después de 4 días (Lucera *et al.*, 2014).

Por otra parte, se ha evidenciado que los recubrimientos con alginato pueden retrasar el endurecimiento e inducir una textura más suave en los quesos. En pruebas de diferentes métodos de aplicación (inmersión, recubrimiento, aspersion y aspersion electrostática) de un recubrimiento de alginato de sodio (AS) aplicado en queso mozzarella con baja humedad. Considerando la dureza del queso como principal factor de calidad; se reportó que después de 14 días a 4 °C el queso recubierto con AS presentó valores de dureza más bajos (113-135 N), en comparación con que el queso recubierto con quitosano y aislado de proteína de soja (351–522 N y 326–340 N, respectivamente) (Zhong *et al.* 2014). Así mismo, se relacionó la aplicación de un recubrimiento de AS con cúrcuma en quesos curados con una textura más suave y menores concentraciones de coliformes totales (Olivo *et al.*, 2020).

También, en un recubrimiento comestible con aislado de suero lácteo, AS y aceite esencial de jengibre aplicado en un queso semimaduro consumido en Turquía, conocido comúnmente como queso Kashar. Se evaluaron la pérdida de peso, la dureza y la actividad antimicrobiana, obteniendo disminución en la pérdida de peso con relación al control y una menor población de *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* (Kavas *et al.*, 2016).

El desarrollo y caracterización de películas comestibles de AS y pectina incorporadas con células prebióticas (*Lactiplantibacillus plantarum* KMC 45) y diferentes concentraciones de glicerol y sorbitol, permitieron observar la mayor supervivencia de *L. plantarum* KMC45 en las películas que contenían una mayor proporción de AS (60% p/p) y sorbitol, a 4 °C durante 30 días. Adicionalmente, disminuyó la permeabilidad al vapor de agua (PVA), sugiriendo que las películas comestibles a base de AS/pectina pueden emplearse como sistemas adecuados

para incorporar bacterias probióticas, especialmente a temperaturas de refrigeración (Shahrampou *et al.*, 2020).

Un recubrimiento comestible basado en AS, adicionado de cepas de *Lactococcus* productoras de bacteriocinas fueron aplicadas en queso fresco. Observándose una disminución de la concentración de *L. monocytogenes* y prevención del crecimiento de bacterias mesófilas, además se redujo la humedad y la pérdida de peso al ser almacenado a 4 °C (Silva *et al.*, 2022).

### **2.1.2 Almidón Octenil succínico**

El almidón modificado con anhídrido octenil succínico (OSA) se produce por esterificación del almidón (generalmente de maíz) (Cheng *et al.*, 2021). Con esta modificación se introduce la hidrofobicidad del OSA; mientras, se retiene la hidrofilia del esqueleto de almidón, resultando en un almidón estabilizador de emulsiones principalmente de sistemas aceite-agua (O/W; por sus siglas en inglés) (Matos *et al.*, 2018).

Específicamente para la formación de películas, se ha evidenciado que el almidón octenil succinilado (AOS) proporciona mayor estabilidad, resistencia al paso del agua y flexibilidad a las películas de almidón (Li *et al.*, 2015). Cabe destacar que la inclusión de grupos OSA en la conformación del almidón, mejoran la capacidad de encapsulación de compuestos bioactivos, proporcionando características anfífilas al almidón (Zhu, 2017).

Se ha informado que el suplemento con extractos fenólicos en películas a basadas en almidón podría sufrir cambios en ciertas propiedades de las películas, como ópticas, de barrera, mecánicas, antioxidantes, antimicrobianas, entre otras. Estos cambios pueden depender de la cantidad y naturaleza de los compuestos, así

como de su interacción con el almidón (Feng *et al.*, 2018; Knapp *et al.*, 2019; Leon-Bejarano *et al.*, 2020).

### **2.1.2.1 Uso del almidón modificado en materiales de empaque**

En las últimas décadas, ha incrementado el uso de almidón modificado en diversos tipos de empaques. Obteniendo mejores propiedades fisicoquímicas al evaluar, formulaciones de películas elaboradas con almidón de maíz octenil succinilado incorporadas con diferentes concentraciones de aceite de soja obteniendo propiedades fisicoquímicas mejoradas (Gao *et al.*, 2020). Concordando en películas formuladas con almidón de batata octenil succinilado y aceite esencial de orégano (AEO), el almidón favoreció la estabilidad de las emulsiones, la resistencia de la película, la rigidez, la humedad, la solubilidad en agua y la PVA (Li *et al.*, 2018).

## **2.2 Biodegradabilidad de las películas**

La biodegradabilidad es la capacidad de un material para degradarse de manera natural mediante la acción de organismos vivos, como bacterias, hongos u otros microorganismos (ASTM-D883-11), en condiciones ambientales adecuadas. Cuando un material es biodegradable, puede ser degradado en compuestos más simples, como H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, biomasa y minerales, mediante procesos biológicos (Sid *et al.*, 2021).

Los biopolímeros resultan ser moléculas de origen natural de mucho interés, debido a que se derivan de recursos renovables. A diferencia de los polímeros convencionales derivados del petróleo, los biopolímeros están compuestos de moléculas orgánicas y se consideran más sostenibles y amigables con el medio ambiente (Helanto *et al.*, 2019).

Por lo tanto, recientemente las investigaciones se han dirigido al estudio de materiales biodegradables. Con base en una biodegradación aeróbica, las películas de almidón-poliuretano en condiciones de enterramiento en suelo presentaron un 72.5% de CO<sub>2</sub> liberado en 180 días (Tai *et al.*, 2019). Además, en películas basadas en almidón, reforzadas con montmorillonita y nano-emulsión de aceite de limoncillo, se observó una completa biodegradabilidad por el método de enterramiento en suelo en 45 días (Singh *et al.*, 2023).

Por su parte, en películas con quitosano, AS y aceite de canela encapsulado en almidón anfifílico, se mostró una tasa de biodegradabilidad en suelo del 70% en 28 días (He *et al.*, 2021). De manera similar, en películas de almidón de maíz con compuestos nanofibrilados se obtuvo una biodegradación en suelo del 81 % después de 40 días (Malekzadeh *et al.*, 2023).

### **2.3 Aceites esenciales (AE)**

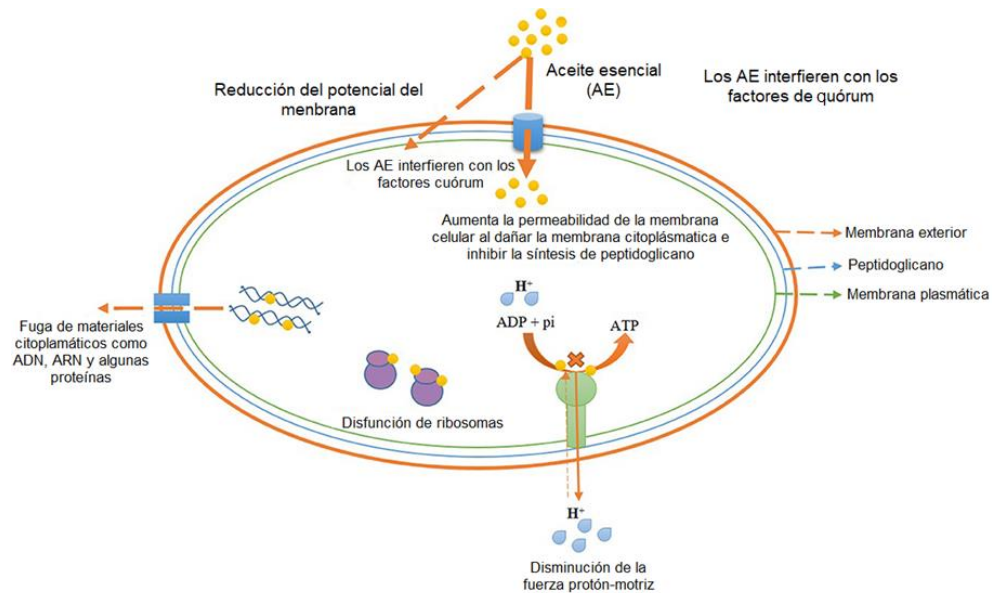
Los aceites esenciales (AE) son mezclas de compuestos sintetizados por plantas que poseen propiedades antimicrobianas. En general, su actividad antimicrobiana está relacionada con la interacción de algunos metabolitos secundarios presentes en los AE con la estructura celular bacteriana (da Silva *et al.*, 2021). Los metabolitos presentes en los AE incluyen principalmente terpenos, terpenoides, fenilpropanoides, aldehídos, ésteres, alcoholes y cetonas, cuya bioactividad varía según la configuración estructural de la molécula (Tohidi *et al.*, 2019).

El principal mecanismo de acción antimicrobiana de los aceites esenciales conlleva a la interrelación de sus compuestos hidrofóbicos con los componentes lipídicos de la membrana celular. Esto provocando la pérdida de la integridad de la membrana, conduciendo a cambios en el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones, en la absorción de nutrientes, así como en la síntesis de proteínas y



ácidos nucleicos (Figura 3). Además, se ha observado la coagulación del contenido celular y la inhibición de enzimas que son cruciales en el metabolismo energético, causando la muerte celular (Bhavaniramy *et al.*, 2019; da Silva *et al.*, 2021).

Se ha demostrado que los AE pueden inhibir el ciclo de vida de los hongos filamentosos a través de múltiples modos de acción, desde la germinación de conidios, el crecimiento del micelio hasta la esporulación (Reyes-Jurado *et al.*, 2020). La actividad antimicrobiana multifacética de los AE permite contar con un antimicrobiano potente, ecológico y sostenible con un mínimo riesgo para que se genere resistencia microbiana comparado con los antimicrobianos sintéticos (Lin *et al.*, 2022).



**Figura 3.** Mecanismo de acción de los aceites esenciales (AE) (Maurya *et al.*, 2021).

## 2.4 Aceite esencial de orégano

El AEO ha sido objeto de numerosas investigaciones debido a sus propiedades antifúngicas. Se ha demostrado que este aceite es capaz de prevenir

el crecimiento de diversos tipos de hongos, como *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp., destacando como uno de los aceites esenciales más estudiados en este ámbito (D'agostino *et al.*, 2019).

El AEO contiene diferentes proporciones de compuestos que pueden variar dependiendo de la especie, la edad fisiológica de la planta, la ubicación geográfica y el ambiente donde se desenvuelven (Ventura *et al.*, 2011; Hernández-Hernández *et al.*, 2019; Ríos de Benito *et al.*, 2021).

Se analizó la eficacia de aplicar recubrimientos de quitosano con AE de romero y orégano a queso elaborado con leche de cabra, demostrando que los recubrimientos evitaron la pérdida de peso y mejoraron la inocuidad microbiana. Las actividades lipolíticas y proteolíticas se redujeron en el queso recubierto, la evaluación sensorial mostró que los quesos que contenían quitosano-AEO doblemente recubiertos, presentaron una mejor evaluación en relación con el aroma y sabor. El doble recubrimiento consistió en sumergir el queso por 30 s en la solución filmogénica, secado en una cámara de maduración y posteriormente se repitió nuevamente este procedimiento (Cano *et al.*, 2017).

En un estudio sobre la actividad antimicrobiana de películas comestibles elaboradas con proteína de suero incorporadas con AE, como el de orégano, romero o ajo, se observó que la película con AEO al 2% demostró ser más efectiva que las que contenían extractos de ajo y romero, para inhibir *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis, *L. monocytogenes* y *Lactiplantibacillus plantarum* en comparación con aquellas (Seydim y Sarikus, 2006). De modo similar, en películas desarrolladas a base de celulosa, incorporada con AEO para la conservación de pizza refrigerada lista para el consumo. Se determinó el efecto antimicrobiano de la película por medio de un ensayo de halos de inhibición, observando un aumento de los de los halos para los microorganismos

*Penicillium* spp. y *S. aureus* a medida que aumentaba la concentración de AEO (Botre *et al.*, 2010).

Por otra parte, la actividad de los aceites esenciales de orégano y romero sobre la estabilidad oxidativa y fermentativa de un queso crema durante el almacenamiento, resultó en una capacidad de protección para evitar la oxidación de lípidos y la fermentación del queso (Olmedo *et al.*, 2013). En otro estudio, se encapsularon nanoemulsiones de AEO para evaluar la actividad antifúngica sobre *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp., aislados de muestras de queso de Minas Padrão. Este queso de tipo semicurado y pasta prensada es consumido en Brasil. Los resultados concluyeron que el AEO nanoencapsulado (5% en peso) presentó un efecto inhibitorio contra los tres géneros de hongos evaluados (Bedoya-Serna *et al.*, 2018).

También, se evaluó la actividad antimicrobiana del AEO microencapsulado contra *Salmonella* sp., *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas fragi*, *Lactiplantibacillus plantarum* y *Micrococcus luteus*. Encontrando el timol y el carvacrol entre los principales componentes del AEO. El AE mostró una buena estabilidad después de 3 meses de almacenamiento a 4 °C, demostrando que la microencapsulación permite mantener casi en su totalidad la actividad antimicrobiana, además de mejorar la estabilidad del AEO (Hernández-Hernández *et al.*, 2014).

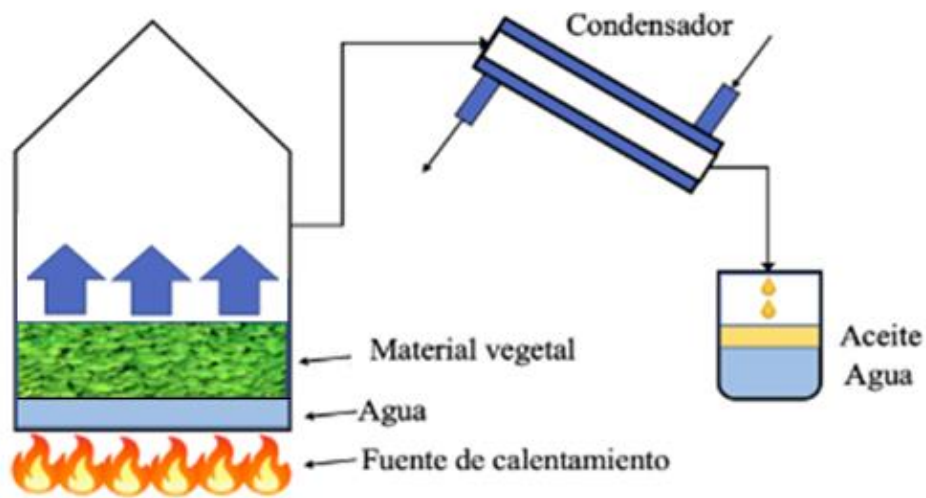
En un estudio se realizó una combinación de caseinato de sodio y quitosano (SC:CH), añadida con nanopartículas de sílice mesoporosa (SM) encapsulando AEO. La aplicación del recubrimiento en queso panela en la evaluación de las bacterias aeróbicas mesófilas y de las poblaciones de mohos y levaduras lograron una reducción de aproximadamente 2 Log<sub>10</sub> UFC/g después de 15 días de almacenamiento (Ríos de Benito *et al.*, 2021).

## **2.4.1 Actividad antimicrobiana**

La actividad antimicrobiana del AEO ha sido atribuida a sus compuestos terpenoides y fenoles volátiles, especialmente carvacrol y timol. Estas sustancias ocasionan daño en la membrana citoplasmática de los microorganismos, lo que resulta en la muerte celular (Calo *et al.*, 2015; Castro *et al.*, 2020). Ha sido identificado en el AEO Mexicano al carvacrol, timol, 1,8-cineol y p-cimeno (Ríos de Benito *et al.*, 2021) y reportado los principales compuestos químicos por cromatografía de gases-masas, identificando el timol (28,88%), eucaliptol (16,07%), p -cimeno (6,61%), terpinen-4-ol (3,9%) y linalol (3,64%) (Hernández-Hernández *et al.*, 2019).

### **2.4.1.1 Extracción del aceite esencial mediante destilación por arrastre de vapor**

Este proceso es un método que utiliza vapor como agente de extracción en la hidrodestilación y se caracteriza, porque no hay interacción entre el agua y las hojas de orégano. Se calienta agua en el fondo del equipo para producir vapor, el cual entra en contacto con el material vegetal, lo que hace que los AE se evaporen. Posteriormente se lleva a cabo una licuefacción de los vapores en un condensador, para luego recuperar los aceites esenciales (Figura 4). El condensado es una mezcla de agua y aceite esencial, que son separados empleando métodos físicos o químicos, por lo general el método más empleado es por decantación. Los tiempos de extracción depende de cada planta que se procese, aunque este método presenta la desventaja de producir menor cantidad de aceite si se compara con otros métodos de extracción (Colina-Márquez *et al.*, 2022).



**Figura 4.** Montaje de destilación por arrastre de vapor (adaptado de: Colina Márquez *et al.*, 2022).

#### 2.4.1.2 Uso de películas activas con aceite esencial de orégano

Una película con almidón de yuca, extracto de residuo de calabaza y AEO, mostró una actividad antibacteriana significativamente mejorada contra *E. coli* ATCC 8739, *L. monocytogenes* ATCC 15131 y *S. aureus* ATCC1901 (Dos Santos *et al.*, 2018). Así mismo, la evaluación del efecto de recubrimientos comestibles desarrollados con almidón de achira (*Canna indica* L.), celulosa microcristalina y sustancias antimicrobianas (AE de ajo y orégano) en el queso doble crema, no permitió el crecimiento de microorganismos patógenos durante 42 días de almacenamiento (Molina-Hernández *et al.*, 2020).

Una investigación utilizó películas comestibles de suero que contenían AEO, AE de ajo, nisina y natamicina para la inactivación microbiana en queso Kasar en rodajas. Este es un queso Turco semiduro, que mostró reducciones logarítmicas en *E. coli* O157:H7 (3.0 log), *S. Enteritidis* (3.6 log<sub>10</sub> UFC/g), *L. monocytogenes* (2.0 log<sub>10</sub> UFC/g) *S. aureus*, (2.15 log<sub>10</sub> UFC/g) y *Penicillium* spp. (1.20 log<sub>10</sub> UFC/g) durante 15 días de almacenamiento (Seydim *et al.*, 2020).

## 2.5 Microencapsulación

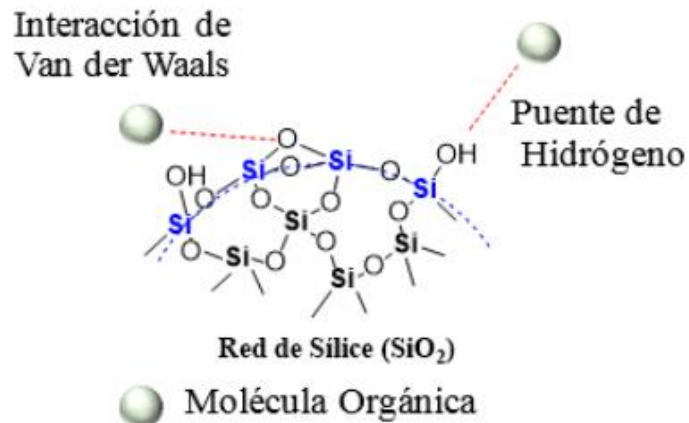
La microencapsulación es una técnica que utiliza materiales poliméricos ya sean naturales o sintéticos denominados agentes encapsulantes o material de pared. Los encapsulantes en forma de micropartículas capturan sólidos activos del núcleo y pueden cubrir sustancias líquidas, partículas sólidas o incluso gases (Sun *et al.*, 2021). La liberación de los compuestos volátiles de los AE depende del tipo de material empleado como agente encapsulante, puesto que tienen diferentes estructuras químicas y propiedades fisicoquímicas. Dichas características pueden estar influenciadas por el tamaño y la forma de las partículas, así como los desencadenantes de liberación deseados como el pH, la temperatura y la humedad (Corrêa-Filho *et al.*, 2019).

En este sentido la microencapsulación implica el atrapamiento de una sustancia objetivo en varias sustancias macromoleculares, la protección de los componentes aromáticos frente a los medios externos. Además, existe una mejora de su solubilidad o dispersión en medio acuoso, en la estabilidad oxidativa y térmica, en la actividad biológica, en el control de la volatilidad y de la liberación sostenida de los materiales encapsulados (Chen *et al.*, 2022).

Diversos componentes han sido utilizados como material de pared para la producción de microcápsulas como polisacáridos, lípidos, proteínas, o una mezcla de ellos (Corrêa-Filho *et al.*, 2019). Las características más relevantes para la elección de estos materiales son las propiedades reológicas a altas concentraciones, la capacidad de emulsionar, estabilizar y mantener el material que es encapsulado dentro de su estructura.

Entre los agentes encapsulantes se encuentra la sílice mesoporosa (SM), la cual es una red de sílice (Figura 5) que contiene internamente una gran cantidad de poros que albergan las moléculas de los compuestos bioactivos. Presentando

ventajas como la facilidad de síntesis, biocompatibilidad mejorada, composición química relativamente inerte y capacidad de funcionalizarse con diferentes materiales al ser estables en condiciones biológicas (Hincapie *et al.*, 2020).



**Figura 5.** Estructura de la red de sílice de las partículas mesoporosas (González-Cervantes *et al.*, 2019).

Resultados importantes se han logrado con este método al encapsular AE de eucalipto, naranja y canela evaluando los efectos antibacterianos y anti-adherencia, mostrando efectos inhibidores contra cepas como *S. aureus* ATCC 25923; *E. coli* ATCC 25922; y *Candida albicans* ATCC 10231 (Balaure *et al.*, 2017).

Una investigación utilizó SM como portador de AE de sándalo, siendo un portador estable para la dispersión en agua en productos de la industria cosmética (Xiao *et al.*, 2021). A través del diseño y evaluación de nano-fragancias basadas en nanopartículas de SM, se logró una liberación gradual y eficiente de fragancias (Lu *et al.*, 2020). Además, en otro estudio se diseñó un recubrimiento activo con AEO reforzado con partículas de SM para la aplicación de queso panela logrando el retraso en el crecimiento microbiano y poca pérdida de humedad (Ríos-de-Benito *et al.*, 2021).

## 2.6 Queso crema

Según el CODEX STAN 275-1973 (2015), el queso crema es “blando, untable, no madurado y sin corteza, el cual presenta una coloración que va de casi blanco a amarillo claro con una textura suave o ligeramente escamosa y sin agujeros”. De forma similar, la norma mexicana NMX-F-754- COFOCALEC-2015 señala que el queso crema puede ser tajable, untable y presenta la facilidad de mezclarse con otros alimentos. La elaboración de queso crema se basa en una gelificación lenta que puede ser inducida con cultivos lácticos mesófilos con la posterior adición de cuajo y separación del suero, siendo considerado como un queso fresco (Surber *et al.*, 2021).

Por consiguiente, muchas personas lo han utilizado para reemplazar la mantequilla y la margarina, debido a que presenta un valor calórico más bajo, cuando este es bajo en grasa. Además, es un producto muy versátil ya que permite la adición de compuestos como las finas hierbas o cereales como chía y quinua, mejorando características sensoriales como textura, sabor y aumentando las propiedades nutricionales en el producto (Lemes *et al.*, 2016).

En el queso crema se reconocen dos categorías de acuerdo con su contenido de grasa: queso doble en grasa elaborado con leche estandarizada entre 9 – 11% (p/p) de grasa y queso crema monograso elaborado con leche estandarizada a 4.5 – 5% (p/p) de grasa (Guinee *et al.*, 1993). La FDA (2016), establece que el queso crema debe tener un contenido mínimo de grasa láctea de 33 % (p/p) y un contenido de humedad no superior al 55 % (p/p). Así mismo, el Codex de la FAO (2016), establece un mínimo de sólidos no grasos del 22 % (p/p) y un contenido mínimo de grasa del 25 % (p/p).

El principal productor de queso crema en la Unión Europea es Alemania, mientras que en América es EUA. En la industria alimentaria el queso crema es de



gran importancia debido al crecimiento económico proyectado para el 2026 de aproximadamente 8,300 millones de dólares estadounidenses (Pombo, 2021), mientras que en el 2020 México presentó una producción industrial de 38,876 toneladas (CANILEC, 2021).

El queso crema es estructuralmente diferente de otros quesos, con una mayor proporción de grasa y contenido de humedad (Jeon *et al.*, 2012). Proporcionando el ambiente apropiado para microorganismos patógenos y causantes de deterioro como bacterias, levaduras y hongos (Pirsa *et al.*, 2020). La susceptibilidad de los quesos a la actividad microbiana puede estar asociada a factores intrínsecos (pH, nutrientes, actividad de agua, la microbiota competitiva, etc.) y factores extrínsecos (temperatura, atmósfera, humedad relativa) (Giammanco *et al.*, 2011; Elkot y Khalil, 2018).

**Tabla 1.** Límites máximos de contenido microbiano para quesos frescos (adaptada de: NOM-223-SCFI/SAGARPA-2018)

<b>Microorganismo</b>	<b>Límite máximo</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	1000 UFC/g
<i>Salmonella</i> spp	Ausencia en 25 g
<i>Escherichia coli</i>	100 UFC/g
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausente en 25g
<i>Vibrio cholerae</i>	Ausente en 25g
Toxina botulínica	Negativa
Mohos y levaduras	500 UFC/g

Por lo tanto, la norma Mexicana NOM-223-SCFI/SAGARPA-2018 establece los límites máximos de contenido microbiano para los quesos frescos (Tabla 1). Los microorganismos patógenos con mayor prevalencia en quesos frescos en América Latina (2007 - 2016) son *Salmonella* spp., *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *E. coli*. En el año 2016 se identificaron como países latinoamericanos con mayor incidencia

de casos de enfermedades transmitidas por alimentos a México (26,925), Ecuador (11,790), Brasil (9,907) y Colombia (8,648) (Merchán *et al.*, 2019).

El queso también es susceptible a la contaminación por hongos y micotoxinas. Los hongos comúnmente aislados en el queso son *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Mucor* y *Trichoderma*, causando efectos indeseables en el producto y por ende afectando la calidad del mismo. La evaluación de queso crema a diferentes temperaturas de almacenamiento (4 °C y 21 °C), mostró poblaciones mayores en las muestras almacenadas a temperatura ambiente, destacando la prevalencia de especies de *Penicillium*, *Aspergillus* y *Cladosporium* (Perveen *et al.* 2011).

En el 2007 se investigó *Salmonella* spp. en queso crema tropical en cinco queserías elegidas al azar en Tonalá, Chiapas (México). Algunas muestras estaban elaboradas con leche pasteurizada y otras con leche sin pasteurizar. De cinco muestras analizadas de queso elaborada con leche sin pasteurizar, la población de coliformes fecales fue de 6.7 – 7.6 Log<sub>10</sub> UFC/g y *E. coli* dio positivo en todas las muestras. Los resultados demostraron que los quesos presentaban poblaciones microbianas mayores que las permitidas por la norma (Romero-Castillo *et al.*, 2009).

Se realizó un diagnóstico de la sanidad en fábricas de elaboración de quesos en forma artesanal, del municipio de Zacazonapan en el Estado de México. Se tomaron muestras de agua, leche, cuajo, queso, superficies del equipo de procesamiento, así como manos y utensilios que tienen contacto directo con el queso. Los resultados obtenidos mostraron altas poblaciones de mohos y levaduras, bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales y la presencia de *Salmonella* spp. (Sánchez-Váldez *et al.*, 2016).

Un reporte mostró que 118 muestras de diez tipos de quesos, tomadas al azar en Cuba, con el propósito de llevar a cabo análisis de coliformes totales, *S.*

*aureus*, *Salmonella* spp., hongos y levaduras. La población de coliformes totales resultó mayor que lo permitido en la norma para queso crema y la población de hongos y levaduras fue  $>3 \log_{10}$  UFC/g para los diferentes tipos de quesos, aunque no se encontró presencia de *Salmonella* spp (Armenteros *et al.*, 2018). Finalmente, en un estudio realizado en Cali, Colombia, se analizaron diferentes tipos de quesos frescos artesanales y encontraron *L. monocytogenes* en el 27% de las muestras (Ocampo-Ibáñez *et al.*, 2019).

### 3 Justificación

La contaminación bacteriana y el desarrollo de mohos y levaduras son problemas frecuentes en productos como el queso, ocurriendo en muchas ocasiones antes de la fecha de vencimiento. Esto reduce considerablemente la calidad del producto y afecta tanto a productores como consumidores, causando pérdidas y problemas de seguridad alimentaria. Así mismo, muchos de los utensilios utilizados en el empaqueo de quesos no son biodegradables y generan problemas ecológicos.

En la industria alimentaria el queso crema es de gran importancia debido al crecimiento económico proyectado para el 2026 de aproximadamente 8,300 millones de dólares estadounidenses (Pombo, 2021). Mientras que en el 2020 México presentó una producción industrial de 38,876 toneladas (CANILEC, 2021). Sin embargo, por su contenido de grasa y alta humedad su vida útil es corta y proporciona las condiciones para la contaminación con microorganismos patógenos y deterioradores, causada por diversos factores implicados en toda su cadena productiva.

El interés actual relativo a evitar el daño y conservar el ambiente, han convertido a los recubrimientos y películas comestibles en una excelente alternativa de material de uso en el envasado de alimentos. Su aplicación en productos perecederos como los quesos permitirá reducir la pérdida de peso, prevenir el deterioro microbiano y promover la inocuidad. Todo esto mediante el control de la tasa de intercambio de oxígeno y dióxido de carbono y como portador de compuestos antimicrobianos (Costa *et al.*, 2018).

Por otra parte, los aceites esenciales son sustancias líquidas volátiles obtenidas de fuentes naturales que recientemente han generado gran interés por la variedad de compuestos bioactivos que presentan. Estos compuestos tienen

propiedades antimicrobianas, sin embargo, pueden disminuir su efectividad debido a su inestabilidad, volatilización, degradación, oxidación e interacción química. Para mitigar estos efectos negativos la encapsulación es un método eficaz que permite retener, proteger, retardar y permitir una difusión lenta y controlada de sus compuestos bioactivos.

Dada la necesidad de implementar técnicas que permitan mejorar la calidad del queso, se presentan las películas activas con aceite esencial de orégano como una alternativa que permita aumentar el tiempo de vida útil, conservando sus características fisicoquímicas y microbiológicas.

## **4 Objetivos**

### **4.1 Objetivo General**

Caracterizar una película activa basada en alginato de sodio y almidón modificado con aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) microencapsulado en partículas de sílice mesoporoso y evaluar su efecto en la calidad del queso crema durante el almacenamiento.

### **4.2 Objetivos específicos**

1. Determinar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) microencapsulado en nanopartículas de sílice mesoporoso frente a microorganismos relevantes en queso crema: *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium, *Scheffersomyces stipitis* y *Leuconostoc mesenteroides*.
2. Diseñar películas basadas en alginato de sodio y almidón de maíz octenil succinilado, conteniendo aceite esencial de orégano microencapsulado.
3. Evaluar las propiedades mecánicas, estructurales y propiedades de barrera de las películas diseñadas.
4. Evaluar el efecto de las películas aplicadas al queso comercial mediante un ensayo de estimación de vida útil, a través de análisis microbiológico, fisicoquímico y sensorial, en condiciones de refrigeración.

## 5 Materiales y métodos

### 5.1 Estrategia experimental

La estrategia general propuesta consiste en desarrollar una película activa con almidón modificado, alginato de sodio, adicionada de aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens Kunth*) microencapsulado, y su aplicación a queso crema durante 35 días de almacenamiento (Figura 6).

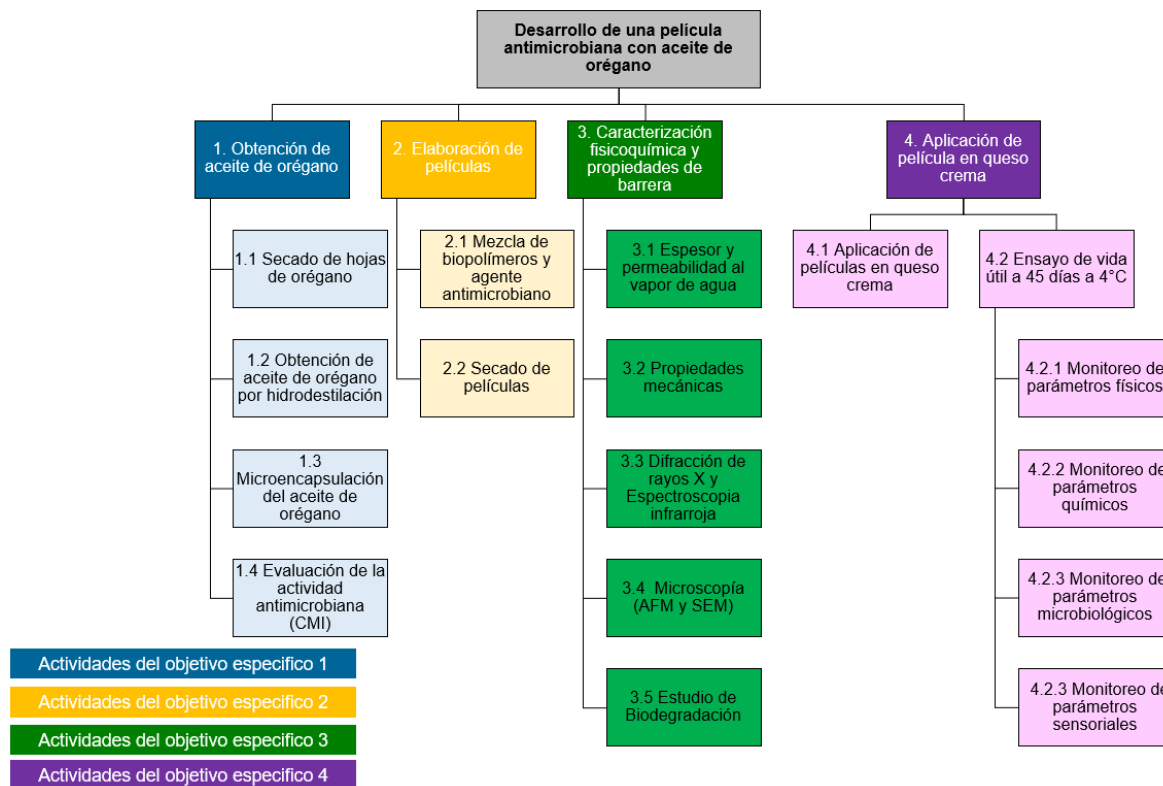


Figura 6. Estrategia experimental.

### 5.2 Materiales

#### 5.2.1 Reactivos

El glicerol anhidro y el sulfato de sodio anhidro fueron adquiridos de J.T Baker (Darmstadt, Alemania), el alginato de sodio se obtuvo de Molecular Cuisine Supplies (CDMX, México), mientras que el almidón de maíz modificado fue donado por Ingredion (San Juan del Río, Querétaro, México). El Tween 20 y Tween 80,

etanol absoluto, el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), 3-aminopropil trietoxisilano (APTES) y el ortosilicato de tetraetilo (98%) (TEOS) fueron obtenidos de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). La solución salina tamponada con fosfato se obtuvo de Scharlab (Barcelona, España).

### **5.2.2 Material Biológico**

Las hojas de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) maduras con un tamaño promedio de 5 x 3 mm se recolectaron en Cerrito Parado, Tolimán (Querétaro, México). Una muestra (voucher) fue autenticada y depositada en la Colección Etnobotánica del Herbario de Querétaro ubicada en la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Querétaro, México (especimen voucher: E. Hernández-Hernández No. 1).

El suelo vegetal fue adquirido en Huertos Urbanos (Morelia, Mich., México). El queso crema en rebanadas (Philadelphia®) fue obtenido de un mercado de Querétaro.

Las cepas bacterianas utilizadas fueron *L. innocua* (cepa no patógena, filogenéticamente relacionada con *L. monocytogenes*), *Leuconostoc mesenteroides*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, y *Scheffersomyces stipitis* de la colección de cultivos del laboratorio de Biotecnología de Alimentos, DIPA, Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, México.

### **5.2.3 Muestras de queso crema**

Se emplearon rebanadas de queso crema comercial de la marca Philadelphia® (Puebla, Pue., Mondelez, México), libre de conservadores, adquirido en un mercado local de Querétaro (Querétaro, México) y su almacenamiento se mantuvo a 4 °C. Cada rebanada tenía dimensiones de 120 x 95 x 27 mm, contenidas



individualmente en bolsas de plástico y en un empaque primario de plástico metálico.

#### **5.2.4 Medios de cultivo**

La peptona de caseína, el caldo y el agar papa dextrosa (CPD y APD, respectivamente) fueron adquiridos de BD Bioxon (Estado de México, México). El agar y caldo nutritivo se adquirieron de Oxoid (Basingstoke, Inglaterra). El bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) se obtuvo de Beijing Solarbio Science & Technology (Beijing, China).

### **5.3 Métodos**

#### **5.3.1 Obtención del aceite esencial de orégano**

Las hojas de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) fueron separadas de las partes del tallo y se procedió a un secado a 50 °C por 24 h en una estufa con circulación de aire forzado (Binder KBWF 240, Ösch Tuttligen, Germany). El aceite esencial de orégano se obtuvo por medio del método de destilación por arrastre de vapor durante 2 h (Ríos-de-Benito *et al.*, 2021). Empleando un equipo desarrollado por el grupo de investigación del Dr. Carlos Regalado González para el proceso de obtención de aceites esenciales por tres procedimientos de destilación, el cual se encuentra en solicitud de patente con número de folio Mx/E/2023/023755, ante el Instituto Mexicano de Propiedad Industrial. Finalmente, el aceite extraído se secó con sulfato de sodio anhidro y se depositó en viales de vidrio herméticos protegidos de la incidencia luminosa a 4 °C para su posterior uso.

### 5.3.2 Microencapsulación del aceite esencial de orégano

La microencapsulación del AEO se realizó de acuerdo con Ríos-de-Benito *et al.* (2021). Una solución con 240 mL de agua destilada se preparó con 1.75 mL de NaOH y 0.5 g de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB). La muestra se calentó a 80 °C durante 2 h, se adicionó por 5 min 2.5 mL gota a gota de la solución de ortosilicato de tetraetilo (TEOS). Posteriormente se filtró, se realizó un lavado con etanol y se llevó a calcinar a 500 °C por 5 h. En seguida, 0.1 g del material resultante se dispersó en 2 mL de etanol absoluto que contenía 0.1 g de aceite esencial de orégano, con el fin de eliminar el etanol de la mezcla, la cual se mantuvo agitando durante toda la noche, en campana de extracción (Emilab, El Marques, Querétaro, México). De esta manera se obtuvo el AEO microencapsulado (AEO-MSN).

### 5.3.3 Activación de las cepas bacterianas

Las cepas fueron activadas siguiendo el procedimiento empleado por Hernández-Hernández *et al.* (2014), en caldo nutritivo a 37 °C durante 24 h, a excepción de *S. stipitis*, que se activó en CPD y se incubó a 30 °C, igual que *L. mesenteroides* que también se incubó a 30 °C. A continuación, se transfirieron 0.1 mL de cada cepa a otro tubo con 9 mL de caldo nutritivo o bien CPD (para *S. stipitis*), seguido de incubación bajo las condiciones descritas de temperatura y tiempo. Después, las poblaciones se diluyeron en caldo nutritivo o CPD (para *S. stipitis*), hasta aproximadamente  $10^5$ - $10^6$  UFC/mL. Alícuotas de 20 µL se sembraron en agar nutritivo por triplicado siguiendo la técnica de la gota (Miles & Misra, 1938), posteriormente se incubaron durante 24 h a 37 °C (30 °C para *L. mesenteroides*). Para *S. stipitis* se utilizó agar papa dextrosa e incubación a 30 °C. Se realizaron lecturas de absorbancia a 600 nm cada hora, hasta obtener un valor de absorbancia ( $A_{600 \text{ nm}}$ ) de 0.25 – 0.3, que representa una población de aproximadamente  $10^5$ - $10^6$  UFC/mL.

### 5.3.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del AEO-NSM frente a bacterias deterioradoras y patógenas

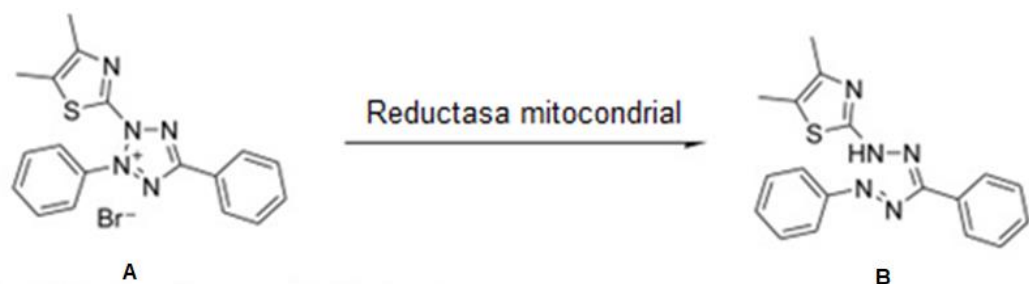
La concentración mínima inhibitoria (CMI) del AEO-NSM contra los microorganismos de interés se determinó de acuerdo con la metodología empleada por Requena *et al.* (2019) con algunas variaciones. Se mezclaron las nanopartículas de AEO-NSM (6% v/v) para ser emulsificadas con una mezcla de Tween 80 (5% v/v) y Tween 20 (5% v/v) en agua desionizada para producir concentraciones de AEO entre 0.1 - 0.7 mg/mL. Este rango de concentraciones se basó en las CMI reportadas de 0.125 mg/mL para hongos (Şahin *et al.*, 2004), 0.6 mg/mL para levaduras (Souza *et al.*, 2007), 0.3 mg/mL para *L. monocytogenes* (Sauceda, 2011), 0.106 mg/mL para *S. aureus* y 0.426 mg/mL para *S. Typhimurium* (Sarikurkcu *et al.*, 2015).

Las concentraciones reportadas en µL/mL se convirtieron con la densidad (983 mg/mL) del AEO usado en la presente investigación. Se añadieron 50 µL de la suspensión de las cepas seleccionadas ( $10^5$  -  $10^6$  UFC/mL), a cada pozo de una microplaca de poliestireno transparente de fondo plano con 96 pozos (Costar, Corning, NY, USA). Posteriormente, se añadió a cada pozo 50 µL de las diferentes concentraciones del AEO-NSM.

Se tomó como control negativo los pozos de la columna con caldo nutritivo y como control positivo los pozos de la columna que contenía bacterias con caldo nutritivo y la mezcla de Tween. Así mismo, para *S. stipitis* se tomó como control negativo los pozos de la columna con CPD y como control positivo los pozos de la columna que contenía *S. stipitis* con CPD y la mezcla de Tween. Todas las microplacas, que incluían controles positivos y negativos, se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 h a excepción de *S. stipitis* y *L. mesenteroides* que se incubaron a  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A las 24 h se determinó el efecto bactericida (inhibición bacteriana), o bien bacteriostático (crecimiento lento) del AEO-NSM frente a las cepas

evaluadas, cabe aclarar que el efecto sería fungicida o fungistático para *S. stipitis*, la cual se incubó durante 48 h.

El bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) se usó como indicador metabólico, ya que es una sal de tetrazolio amarilla, que se reduce a formazán de color púrpura. Por lo cual, la coenzima nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD(P)H) y las deshidrogenasas de células metabólicamente activas reducen las sales de tetrazolio a productos de formazán (compuesto azoico coloreado formado por la reducción de sales de tetrazolio). El MTT se reduce a (E, Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenil-formazan (formazán) (Figura 7).



**Figura 7.** Reacción enzimática de: A) bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) a B) (E, Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenil-formazan (formazán) (Kuetze *et al.*, 2017).

Se depositaron 10  $\mu$ L a cada pozo del indicador metabólico (MTT) reconstituido en solución salina (0.85% de NaCl) con fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 5 mg/mL y nuevamente se llevó a incubar a  $37 \pm 5$  °C por 2 h en la oscuridad, a excepción de *S. stipitis* y *L. mesenteroides*, las cuales se incubaron a  $30 \pm 5$  °C. Se observó visualmente el cambio de color, ya que existe una relación directamente proporcional entre el formazán producido y el número de células vivas (Stockert *et al.*, 2018).

Finalmente, se utilizó el lector de microplacas (Varioskan Flash, ThermoScientific, Waltham, MA, EUA) para determinar la  $A_{600\text{nm}}$ . La CMI se

consideró como los valores de  $A_{600nm}$  que no cambiaron significativamente ( $0.125 \pm 0.05$ ) con respecto al control negativo. Los valores de CMI se expresaron como la más baja concentración del compuesto activo en la que no se observó color púrpura (pérdida de la actividad metabólica).

### **5.3.5 Determinación de la concentración mínima bactericida del AEO-NSM frente a bacterias patógenas**

Para la determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) se usó el método de Knezevic *et al.* (2016). Se depositaron 10  $\mu$ L de una mezcla de 50  $\mu$ L AEO-NSM con 50  $\mu$ L de la suspensión de *S. aureus* y *S. Typhimurium* (aproximadamente  $10^6$  - $10^7$  UFC/mL) en placas que contenían agar nutritivo utilizando diluciones decimales. Luego se incubó a  $37 \pm 5^\circ\text{C}$  durante 24 h. Después de la incubación la ausencia de crecimiento indicó actividad bacteriostática.

### **5.3.6 Elaboración de las películas activas (PA)**

Las películas se obtuvieron siguiendo el procedimiento descrito por Yang *et al.* (2018), con algunas variaciones. Inicialmente se homogenizó una suspensión acuosa al 0.8 % (p/p) de alginato de sodio adicionado a agua destilada previamente calentada en placa de calentamiento (Corning, NY, EUA) a  $60^\circ\text{C}$ , manteniendo en agitación por 30 min a 600 rpm. Paralelamente se preparó una suspensión acuosa al 1.6 % (p/p) de almidón de maíz octenil succínico mezclado durante 15 min a temperatura ambiente, a continuación, se calentó a  $65^\circ\text{C}$  durante 15 min. Aparte se realizó una disolución de glicerol al 1% (p/p) con un calentamiento de  $35^\circ\text{C}$  por 15 min.

Una vez obtenidas las disoluciones se adicionó el AEO-MSN y se realizaron 2 concentraciones (0.6 mg/mL y 0.9 mg/mL) de acuerdo con los resultados obtenidos en la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (CMB). La homogeneización del AEO-MSN se realizó con un ultraturrax

(IKA T25, Staufen, Alemania) a 10,000 rpm durante 3 min a temperatura ambiente. Luego, la solución se sometió a un procesador ultrasónico VCX 500 (Sonics Materials, Newtown, CT, USA) utilizando 70% de amplitud y 4 pulsos de 1.5 min con descansos de 30 s. Después se dejó en agitación a 500 rpm durante 30 min. Posteriormente, se distribuyeron 18 g de la mezcla sobre cajas Petri de 90 mm de diámetro y se secaron en una estufa con circulación de aire (Binder KBWF 240, Ösch Tuttlingen, Germany) a  $35 \pm 5$  °C, durante 15 h.

Como parámetro de control fue formulada una película siguiendo la misma metodología, pero sin adición de AEO-NSM (PC). Posteriormente las películas activas con aceite esencial de orégano (PA) se retiraron de las cajas de Petri, se colocaron en una bolsa de polietileno (PE), se selló y se almacenaron lejos de la luz a 25 °C hasta la realización de los diferentes análisis.

#### **5.3.6.1 Actividad antimicrobiana de las películas**

La actividad antimicrobiana de las películas se evaluó mediante el ensayo de difusión de disco frente a *S. aureus* y *S. Typhimurium*, de acuerdo con Hernández-Hernández *et al.* (2014), con algunas modificaciones. Primeramente, se obtuvieron placas con 8 mL de agar (1.5% p/v) y se dejó solidificar. Después, se adicionaron a las mismas placas 10 mL de agar nutritivo suave (0.8% p/v) con 200 µL de suspensión con bacterias ( $10^7$  UFC/mL) y se dejó solidificar, manteniendo en la campana de flujo laminar durante media hora. Posteriormente, se colocaron sobre la capa de agar suave previamente inoculado, 2 discos de la película de 11 mm de diámetro (previamente esterilizados cada lado de la película por 5 min con luz UV-C: 254 nm). Finalmente se incubaron a  $37 \pm 5$  °C durante 24 h y la zona de inhibición se midió utilizando un Vernier.

### **5.3.7 Caracterización de las películas**

Los análisis que se describen a continuación se realizaron por triplicado.

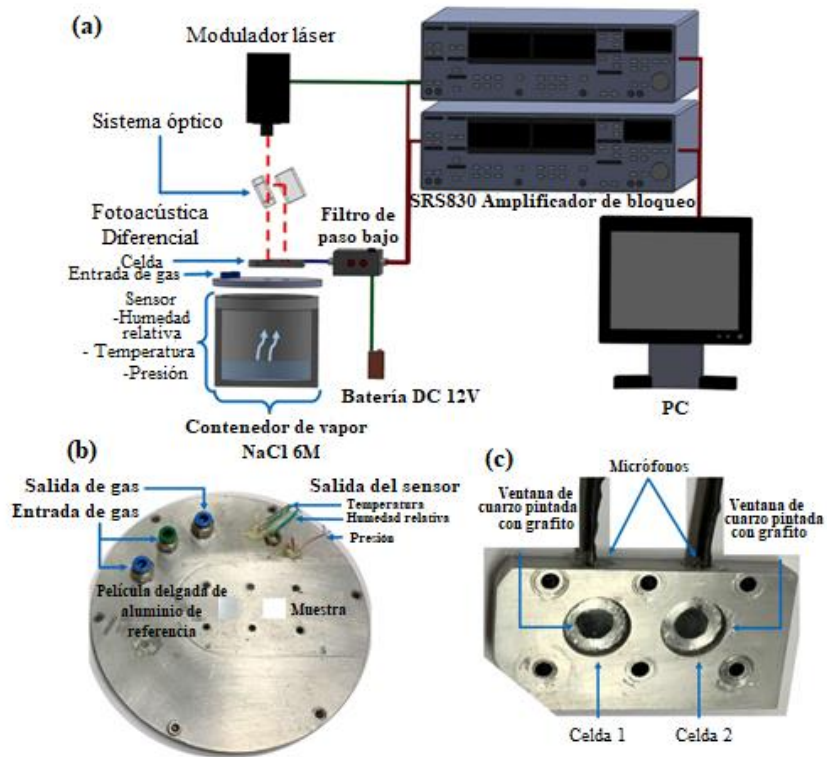
#### **5.3.7.1 Espesor**

Para el espesor de las PA se tomaron mediciones en cinco ubicaciones de las películas con un micrómetro digital (Mitutoyo, Modelo No. 2046-08, Tokio, Japón) y se utilizó el valor medio para los cálculos de permeabilidad al vapor de agua y propiedades mecánicas.

#### **5.3.7.2 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)**

La determinación de la permeabilidad al vapor de agua (PVA) consiste en cuantificar la cantidad de agua que puede pasar a través de un material por unidad de tiempo y área. En cambio, el coeficiente efectivo de difusión de agua ( $C_e$ ) mide la velocidad a la que las moléculas de agua pueden moverse a través de un material.

Para determinar la PVA de las PA se utilizó un sistema de fotoacústica diferencial (Figura 8) desarrollado por Martínez-Muñoz *et al.* (2022). Este sistema consta de una cámara con dos celdas cercanas de fotoacústica (FA) diferencial y un recipiente de aluminio (500 ml). Las celdas se llenan con aire atmosférico (34% HR, 26 °C), la humedad relativa (HR) se genera en la cámara utilizando NaCl 6 M. Una celda con papel aluminio se utiliza como referencia y en la otra celda se coloca la muestra. Previamente las muestras se estabilizaron en un desecador al 39 % de HR durante 48 horas.



**Figura 8.** Sistema de fotoacústica diferencial empleado para determinar el coeficiente de permeabilidad al vapor de agua de las películas formuladas con y sin AEO-NSM. a) representación esquemática del sistema diferencial de fotoacústica, b) contenedor de agua/gas, c) celdas fotoacústicas (Martínez-Muñoz *et al.*, 2022)

Para determinar el coeficiente de permeabilidad, se realizó un barrido temporal durante 45 min. La frecuencia modulada del láser fue de 33 Hz. La curva obtenida se ajustó utilizando las ecuaciones (1) y (2):

$$S = S_0 + \Delta S \left[ 1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_d}\right) \right] \quad (1)$$

$$\tau_d = \frac{l_s^2}{2D} \quad (2)$$



Donde  $S$  es la señal fotoacústica (SFA),  $S_0$  es la amplitud inicial de la señal,  $\Delta S$  es la trayectoria de la señal FA hasta alcanzar el valor de saturación en el nuevo ambiente y  $\tau_d$  es el tiempo de difusión del vapor de agua. En la Ecuación 2,  $D$  es el coeficiente efectivo de difusión del vapor de agua y  $l_s$  es el espesor de la PA. Finalmente, para obtener el coeficiente de permeabilidad al vapor de agua (PVA), se utilizó la Ecuación (3), que determina el valor en mPerm, que se define como el flujo de 1 g de vapor de agua al día por  $m^2$  por mmHg (Martinez-Muñoz *et al.*, 2022).

$$\Pi = \frac{D}{(RAT_0l_s)} \quad (3)$$

Donde  $A$  es la masa molecular relativa del agua,  $R$  es la constante universal de los gases y  $T_0$  es la temperatura ambiente.

#### **5.3.7.3 Difracción de rayos X (XRD)**

La difracción de rayos X consiste en analizar la estructura cristalográfica de los materiales. Para la caracterización estructural de las PA se empleó un difractómetro de rayos X (DRX) de la marca Bruker (D8-Advance, Billerica, MA, EUA) equipado con una fuente de radiación de ánodo de Cu que emite radiación de tipo  $\lambda$  (1.543 nm), un detector con voltaje de 40 kV y corriente de 40 mA. Las muestras PA fueron compactadas en un porta-muestras y las mediciones se realizaron con un ángulo de  $3 - 60^\circ$ , donde  $0.02^\circ$  se midieron cada 3 s, con un tiempo de 2.5 h de promedio de medida para cada muestra.

#### **5.3.7.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

La microscopia electrónica de barrido (MEB) proporciona imágenes sobre la topografía y la morfología de la superficie de un material. La microestructura de las películas se analizó por SEM, utilizando un microscopio electrónico de barrido de alta resolución HITACHI (Mod. SU8230, Chiyoda, Tokio, Japón). Muestras de  $4 \times 4$

mm fueron utilizadas para obtener imágenes de la superficie de las películas. Las imágenes fueron capturadas empleando un voltaje de aceleración de 10 kV (Andrade-Mahecha *et al.*, 2012).

#### **5.3.7.5 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)**

El FTIR consiste en identificar la composición química y molecular de los materiales. La caracterización óptica de las películas se realizó por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). Las muestras fueron colocadas en un espectrómetro marca PerKin Elmer (Mod. Spectrum Two, Waltham, MA, EUA). Los espectros de las muestras se obtuvieron en rangos de números de onda comprendidos entre 600 – 4000  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponden al rango espectral del infrarrojo medio (MIR).

#### **5.3.7.6 Color de la superficie y opacidad**

El color de las películas se midió mediante un colorímetro (Vinckolor, China). Los parámetros de luminosidad ( $L^*$ ), rojo-verde ( $a^*$ ), amarillo-azul ( $b^*$ ) se obtuvieron directamente del equipo. Se utilizó una placa de color estándar blanca ( $L= 93.40$ ,  $a= -0.54$  y  $b= 3.80$ ) como fondo para las mediciones de color. Los parámetros ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ) se promediaron a partir de tres lecturas para cada muestra. La diferencia de color ( $\Delta E$ ) se calculó utilizando la ecuación (4).

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{0.5} \quad (4)$$

Donde,  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$  y  $\Delta b^*$  son las diferencias entre el color de las muestras

La opacidad se determinó por medio del método Hunterlab (Hunter Associates Laboratory, 1997). Los valores de luminosidad ( $L^*$ ) de las películas se obtuvieron al colocar las películas sobre una placa blanca ( $L^*_{\text{blanco}}$ ) y negra ( $L^*_{\text{negra}}$ ). Se calculó mediante la ecuación (5)

$$Opacidad = \frac{L^*_{negro}}{L^*_{blanco}} \times 100 \quad (5)$$

### 5.3.7.7 Biodegradación de las películas en compostaje vegetal

Para determinar la biodegradabilidad de las películas se empleó el procedimiento descrito por Malekzadeh *et al.* (2023), con algunas modificaciones. Se emplearon frascos de vidrio de 15 cm de altura y 10 cm de ancho que contenían 250 g del compostaje vegetal. Las películas fueron troqueladas en trozos de 4 cm x 4 cm y secadas a 90 °C durante 30 min o hasta peso constante para tomar el peso inicial ( $W_i$ ), posteriormente se enterraron a una profundidad de 4 cm del compostaje natural (compuesto por: fibra de coco, humus de lombriz sustrato para germinar y Bokashi). Se roció agua para mantener una humedad relativa al  $35 \pm 5\%$  utilizando un higrómetro (Mod. 4040, Control). Con el propósito de evaluar la pérdida de peso, las películas se retiraron del compostaje y se limpiaron con agua para quitar el suelo adherido a las superficies, nuevamente se secaron a  $90 \pm 5$  °C durante 30 min o hasta peso constante y posteriormente se pesaron ( $W_f$ ). Este procedimiento se repitió cada vez que las muestras fueron retiradas para el registro del peso en diferentes días y se tomaron fotografías para el seguimiento visual de la película. El porcentaje de pérdida de peso (WL%) se obtuvo por medio de la ecuación (6).

$$WL\% = \frac{(W_i - W_f)}{W_i} * 100 \quad (6)$$

### 5.3.8 Aplicación de la película al queso crema comercial

Con la finalidad de estudiar el efecto de las películas, se utilizó queso crema comercial (Philadelphia®) libre de conservadores. Asépticamente, con manejo mediante guantes estériles, en campana de flujo laminar, se cortaron rebanadas de 4 x 4 x 0.3 cm, cada una fue separada y puesta en contacto directo con la película (Previamente, para la realización de las películas todo el material fue previamente

lavado, desinfectado y se almacenaron en bolsas herméticas). Las películas manejadas con guantes estériles y en la cabina de flujo laminar, fueron situadas como separador de cada rebanada de queso. Previamente ambos lados de las películas se esterilizaron durante 5 min con luz UV-C (254 nm).

Para la aplicación de las películas se realizaron 3 niveles. Las muestras se identificaron como: queso crema almacenado sin película (QSP), queso crema almacenado con la película control (QPC) y queso crema almacenado con la película formulada con 0.9 mg/cm<sup>2</sup> AEO-NSM (QPA2). Esta película se utilizó debido a los resultados antimicrobianos obtenidos de las PA. Finalmente, se envasaron las muestras en bolsas de polietileno en bolsas de polietileno Ziploc (S.C Johnson & Son, Racine, WI, EUA) almacenándolas en refrigeración a 4 °C ± 2 °C para los posteriores análisis en los días 0, 7, 15, 20, 25, 30 y 35.

#### **5.3.8.1 Pérdida de peso y pH**

La pérdida de peso debido a la deshidratación del producto al estar almacenado en condiciones de refrigeración se calculó como el porcentaje de peso perdido a partir del peso de la muestra inicial. El valor de pH de cada muestra se registró usando un medidor de pH digital (Mod. 3310, Jenway, UK). Para la medición, se diluyó 1 g de la muestra en 10 mL de agua destilada, tomando una cantidad de 5 mL y se sumergió el electrodo, leyendo el valor del pH (Zhong *et al.*, 2014).

#### **5.3.8.2 Análisis de Textura**

La propiedad de textura en las muestras de queso se realizó empleando un texturómetro (modelo TA-XT2, Stable Microsystems, Surrey, UK) se probaron cinco ubicaciones aleatorias (borde y medio en cada muestra). La dureza del queso se midió empleando compresión con una sonda cilíndrica de 6 mm de diámetro. Los

parámetros fueron: 1.0 mm/s de velocidad de ensayo, con un tiempo de espera de 5 s entre las compresiones y se comprimió 50% de su altura (Zhong *et al.*, 2014).

### 5.3.8.3 Análisis de color

Para la evaluación de los parámetros de color en las muestras de queso, se empleó un colorímetro (Vinckolor, china), empleando un iluminante D65 y un observador estándar 10° (UNE 40-080, 1984). Se llevó a cabo la medición del color mediante las coordenadas CIELAB y los valores de reflectancia (CIE, 1976). Los parámetros de luminosidad ( $L^*$ ), rojo-verde ( $a^*$ ), amarillo-azul ( $b^*$ ) se obtuvieron de manera directa del equipo. La diferencia de color ( $\Delta E$ ) se calculó utilizando la ecuación (4).

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{0.5} \quad (4)$$

Donde,  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$  y  $\Delta b^*$  son las diferencias entre el color de las muestras.

### 5.3.8.4 Análisis sensorial

Previamente a la evaluación sensorial, se verificó que las muestras no conllevarán ningún riesgo microbiológico para los panelistas. Para esto se cuantificó la población de mesófilos totales, mohos / levaduras (Norma Oficial Mexicana NOM 111-SSA1-1994), *Salmonella* spp (NORMA Oficial mexicana NOM-114-SSA1-1994), *L. monocytogenes* (NOM-143-SSA1-1995) y *E. coli* (NMX-AA-042-SCFI-2015). Los participantes voluntarios recibieron información detallada con el propósito de que tomaran una decisión sobre su participación y brindar su consentimiento informado (Anexo 1).

Para el reclutamiento en el estudio se incluyeron 50 panelistas no entrenados. La evaluación hedónica (Hough, 2010) se conformó por hombres y

mujeres que se encontraban entre 20 a 40 años, seleccionados por ser consumidores de queso crema de la comunidad estudiantil de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Los panelistas fueron seleccionados con base al interés, el tiempo disponible y se excluyeron a aquellas personas que presentaban alguna alergia al queso, al AEO, que tenían algún padecimiento que modificara su apreciación del sabor, que presentaran alergias o se encontraran bajo algún tratamiento médico.

A los 5 días de almacenamiento del queso en contacto directo con las películas, se evaluaron los atributos sensoriales de color, sabor y aceptación general mediante una escala hedónica de nueve puntos (Anexo 2). Los panelistas degustaron cuatro muestras: 1) queso crema almacenado sin película (QSP), 2) queso crema almacenado con la película control (QPC), queso crema almacenado con la película formulada con  $0.6 \text{ mg/cm}^2$  AEO-NSM (QPA1) y queso crema almacenado con película formulada con  $0.9 \text{ mg/cm}^2$  AEO-NSM (QPA2).

Las muestras se proporcionaron de forma homogénea en porciones entre  $2 - 2.5 \pm 0.5 \text{ g}$ . Las muestras fueron presentadas de manera idéntica en platos blancos con un código numérico aleatorio de 3 dígitos y se solicitó a los consumidores que realizarán una evaluación de las muestras de queso crema en función del color, olor, la textura, el sabor y la aceptación general. Se usó una escala hedónica de 9 puntos (1 = me disgusta extremadamente; 9 = me gusta muchísimo). adicionalmente, se añadió un espacio para comentarios en la hoja de evaluación sensorial (Anexo 2).

Los evaluadores fueron provistos de agua potable a temperatura ambiente para limpiar el paladar entre muestras y galletas neutras para eliminar cualquier residuo de la muestra anterior. La evaluación sensorial se realizó en cubículos individuales a una temperatura de  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , situadas en el Parque Biotecnológico, Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. La aprobación para

llevar a cabo el estudio fue otorgada por el comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro (No. de oficio. CBQ22/024).

#### **5.3.8.5 Análisis microbiológico**

Se realizó la determinación del recuento de hongos y levaduras (Norma Oficial Mexicana NOM 111-SSA1-1994), bacterias mesofílicas de ácido láctico (Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994) (International Standard ISO 4833-1:2013). Estos análisis fueron realizados en el laboratorio de microbiología del Parque Biotecnológico, Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

#### **5.3.8.6 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando la herramienta R Studio (versión 1.4.1717). Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  desviación estándar. Todos los análisis se realizaron en tres repeticiones. Las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos y el control se determinaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación múltiple (Tukey). Finalmente, la prueba de comparación múltiple (Dunnett) se usó para la evaluación de los datos derivados de la actividad antibacteriana del AEO-NSM.

## **6 Resultados y discusión**

### **6.1 Actividad antimicrobiana del AEO-NSM**

La CMI determina la concentración más baja de AEO-NSM que evita (inhibe) que las bacterias, hongos u otros microorganismos se desarrollen. La CMI del AEO-NSM se observó a partir la concentración de 0.2 mg/mL para la levadura *S. stipitis* (cepa sustituta de *P. farinosa* y *P. fermentans*, debido a similitudes genéticas y fenotípicas) y las cepas bacterianas *L. mesenteroides* y *L. innocua* (cepa sustituta

de *L. monocytogenes*). Por otro lado, para *S. aureus* y *S. Typhimurium* se encontró la CMI a partir de 0.3 mg/mL. La CMB del AEO-NSM frente a *S. aureus* y *S. Typhimurium* fue de 0.3 y 0.4 mg/mL, respectivamente (Tabla 2).

**Tabla 2.** Actividad inhibitoria del AEO-NSM frente a una levadura, bacterias patógenas y deterioradoras.

Cepa	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)
<i>S. stipitis</i>	0.2	--
<i>L. mesenteroides</i>	0.2	--
<i>L. innocua</i>	0.2	--
<i>S. aureus</i>	0.3	0.3
<i>S. Typhimurium</i>	0.3	0.4

CMI: concentración mínima inhibitoria; CMB: concentración mínima bactericida

Los resultados evidenciaron que a concentraciones menores de 0.2 y 0.3 mg/mL de AEO-NSM se mantuvieron células viables (Anexo 3, Figura A1), pero con niveles significativamente menores ( $p < 0.05$ ) al control. El cambio de color es ocasionado por las células viables que tuvieron la capacidad de reducir el MTT a formazán, donde el valor de absorbancia está relacionada proporcionalmente al número de células vivas.

El MTT se absorbe en las células por endocitosis o por un mecanismo facilitado por proteínas de transporte, la carga positiva neta de MTT facilita su absorción celular. Las células capturan y absorben partículas o moléculas desde el medio extracelular, donde la carga positiva del MTT puede promover su unión a receptores involucrados en la endocitosis mediada por cargas en la superficie celular, facilitando su entrada en la célula. Además, la carga positiva del MTT puede interferir con el potencial de membrana y reducir la barrera del potencial eléctrico para su entrada en la célula (Nga *et al.*, 2020).



Una vez dentro de la célula, el MTT se reduce por la acción de las enzimas oxidorreductasas mitocondriales (deshidrogenasas), no mitocondriales y de membrana plasmática de células viables para producir formazán de color púrpura (Nga *et al.*, 2020). Las membranas celulares son en gran medida impermeables al formazán, lo que resulta en su acumulación dentro de las células vivas; mientras que las células muertas no tienen esta característica (Grela *et al.*, 2018).

Las CMI y CMB encontradas en este estudio difieren de las reportadas en el AEO sin encapsular, en investigaciones previas se ha informado que la CMI es de 0.4, 0.5 y 0.3 mg/mL para las bacterias *S. Typhimurium*, *S. aureus* y *L. monocytogenes*, respectivamente (Souza *et al.*, 2007; Saucedo, 2011). Así mismo, se reportó una CMI de 0.1 mg/mL para *S. aureus* y 0.4 mg/mL para *S. Typhimurium* (Sarikurkcü *et al.*, 2015)

Resultados similares fueron reportados para AEO (*Origanum vulgare*) y tomillo (*Thymus capitatus*) encapsulados en nanopartículas de poli( $\epsilon$ -caprolactona). Para *S. aureus* y *E. coli*, obtuvieron una CMI=CMB de 0.5 mg/mL, mientras que para *L. monocytogenes* ambas concentraciones fueron de 1.0 mg/mL del AEO encapsulado. Además, determinaron que tanto la CMI y CMB para el AE de tomillo encapsulado fue de 0.25 mg/mL frente a *E. coli*. Así mismo, para *S. aureus* ambas concentraciones (CMI y CMB) fueron de 0.5 mg/mL; por el contrario, para *L. monocytogenes* la CMI resultó ser de 0.25 mg/mL y la CMB fue de 0.5 mg/mL (Granata *et al.*, 2018).

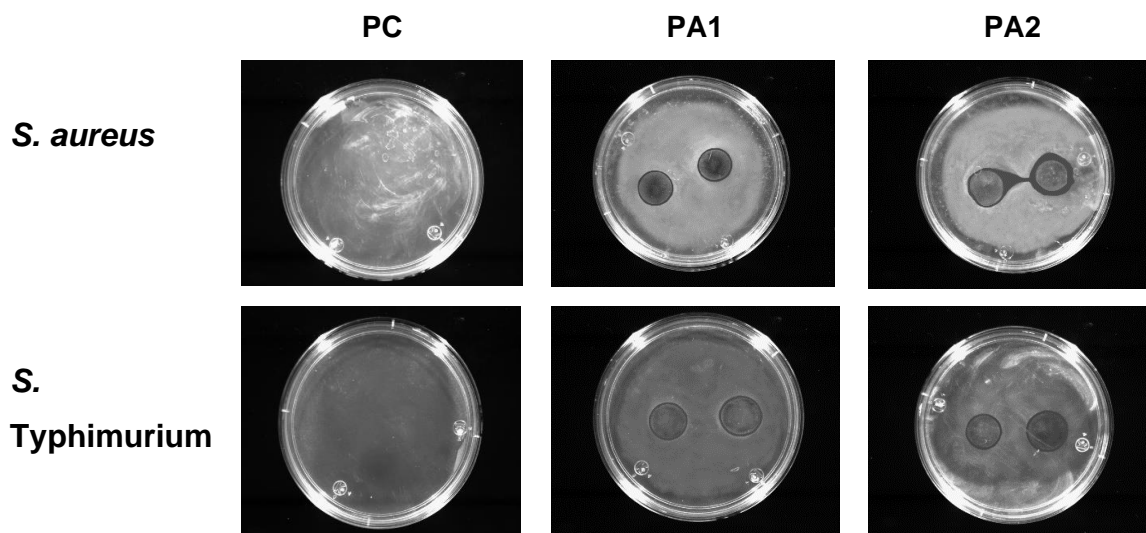
Por otra parte, se ha reportado el efecto inhibitorio y bactericida de varios AE encapsulados con polímeros naturales. El AEO encapsulado mostró valores de CMI entre 0.7 y 4.7 mg/mL, y CMB en el rango de 1.3–15.1 mg/mL, contra *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. Typhimurium*, demostrando efecto contra las bacterias Gram-positivas así como Gram-negativas (de Almeida *et al.*, 2022).

Se ha sugerido que los resultados obtenidos se atribuyen a que la encapsulación favorece la difusión del aceite esencial desde el núcleo interno al medio externo, lo que aumenta la acumulación de aceite liberado a través de la membrana celular bacteriana (Lammari *et al.*, 2020). Se ha reportado que el timol provoca inhibición de la motilidad, daños en la membrana y pared celular, causando finalmente lisis celular (Rathod *et al.*, 2021); el cual, se ha identificado como el principal componente del AEO Mexicano (Hernández-Hernández *et al.*, 2019).

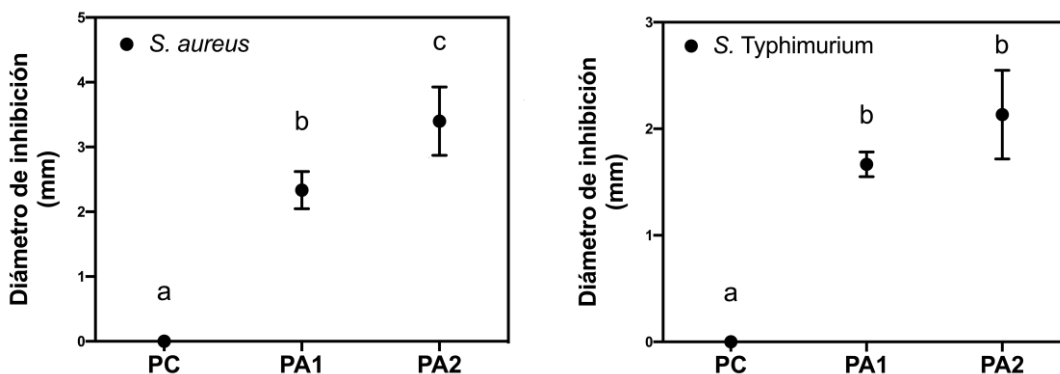
## **6.2 Actividad antimicrobiana de las películas contra microorganismos patógenos**

En la Figura 9 y Figura 10 se observan los diámetros de la zona de inhibición de las PA evaluadas frente a *S. aureus* (Gram-positiva) y *S. Typhimurium* (Gram-negativa).

Las PA con las diferentes concentraciones de AEO-MSN mostraron zonas de inhibición (Figura 9) frente a las bacterias patógenas. Para *S. aureus* (Gram-positiva), PA1 presentó una zona de inhibición de 2.5 mm (lo que representa un 21.9% menos que PA2) y PA2 mostró una zona de inhibición de 3.2 mm. En cuanto a *S. Typhimurium* (Gram-negativa) PA1 presentó una zona de inhibición de 1.6 mm (20% menos que PA2) y PA2 mostró una zona de inhibición 2.0 mm, representado valores mayores de inhibición a mayor concentración de AEO-MSN. La película control (PC) no exhibió zona de inhibición contra los microorganismos ensayados (Figura 10).



**Figura 9.** Actividad inhibitoria frente a bacterias patógenas de las películas formuladas con y sin AEO- NSM. **PC:** Película control; **PA1:** Película activa con 0.6 mg/cm<sup>2</sup> AEO-NSM; **PA2:** Película activa con 0.9 mg/cm<sup>2</sup> AEO-NSM.



**Figura 10.** Diámetro de la zona de inhibición (mm) de las películas con y sin AEO- NSM frente a bacterias patógenas. Las letras iguales indican que no hay diferencia significativa ( $p>0.05$ ). **PC:** Película control; **PA1:** Película activa con 0.6 mg/cm<sup>2</sup> AEO-NSM; **PA2:** Película activa con 0.9 mg/cm<sup>2</sup> AEO-NSM.

Concordando con estos resultados la determinación antimicrobiana de películas a base de mucilago de Chía, gelatina y AEO, mostró una mayor inhibición de las PA frente a *S. aureus* que contra *E. coli* (Luo *et al.*, 2019). De manera similar

se reportó que un aumento en la cantidad de AEO en películas de quitosano, aumentaba el efecto inhibitorio contra *E. coli* y *L. monocytogenes* (Chen *et al.*, 2020).

Por otra parte, la determinación de la actividad antibacteriana en películas de semillas de membrillo incorporadas con AEO contra 10 cepas bacterianas, mostró mayores zonas de inhibición a mayor concentración de AEO (Jouki *et al.*, 2014).

Los anteriores resultados indican que *S. aureus* fue ligeramente más sensible que *S. Typhimurium*, sugiriendo una mayor susceptibilidad en las bacterias Gram-positivas al AEO que las Gram-negativas. Este efecto probablemente es debido a que la pared celular de las bacterias Gram-negativas está formada por una capa fina de peptidoglicano, mientras que, la membrana celular externa está compuesta por lipoproteínas (Lepe y Martínez-Martínez, 2022), impidiendo que los componentes del AE atraviese la membrana y pueda llegar al interior. Además, la actividad antibacteriana de las PA varía según factores como la cantidad, variedad de AE y la interacción con la matriz biopolimérica (De Souza *et al.*, 2020).

### **6.3 Caracterización de las películas**

#### **6.3.1 Espesor, permeabilidad al vapor de agua (PVA) y el coeficiente efectivo de difusión de agua (Ce)**

Los datos obtenidos de los espesores, la permeabilidad al vapor del agua y el coeficiente efectivo de difusión de agua (Ce) de las películas con y sin AEO-NSM se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Espesor, permeabilidad al vapor del agua (PVA) y coeficiente efectivo de difusión de agua (Ce) de las películas con y sin AEO-NSM.

<b>Película</b>	<b>Espesor (mm)</b>	<b>PVA [mol/ (kg·m<sup>2</sup>·s·Pa)]</b>	<b>Ce (m<sup>2</sup>/s)</b>
<b>PC</b>	0.066 ± 0.017 <sup>a</sup>	3.574 ± 0.02 x 10 <sup>-8 a</sup>	1.122 ± 0.05 x 10 <sup>-10 a</sup>
<b>PA1</b>	0.074 ± 0.014 <sup>a</sup>	12.964 ± 0.01 x 10 <sup>-9 b</sup>	5.015 ± 0.03 x 10 <sup>-11 b</sup>
<b>PA2</b>	0.081 ± 0.011 <sup>b</sup>	9.217 ± 0.04 x 10 <sup>-9 c</sup>	3.124 ± 0.04 x 10 <sup>-11 c</sup>

Los resultados se reportan como la media ± la desviación estándar (n=3). Diferentes letras en la misma columna indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ; Tukey test). **PC**: Película control; **PA1**: Película activa con 0.6 mg/cm<sup>2</sup> AEO-NSM; **PA2**: Película activa con 0.9 mg/cm<sup>2</sup> AEO-NSM

Los espesores de las películas con AEO-NSM aumentaron a medida que se incrementaba la concentración de AEO-NSM, pero solamente PA2 mostró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) comparada con PC (Tabla 3).

Estos resultados coinciden con lo reportado empleando películas a base de proteína de soja y AEO, tanto libre como encapsulado. Se observó que la PC presentó un espesor menor que las películas adicionadas con AEO (dos Santos *et al.*, 2019). Así mismo, se encontró un aumento significativo del espesor en películas a base de almidón con eugenol encapsulado (Talón *et al.*, 2019). En contraste, Chen *et al.* (2020), encontraron que las películas de quitosano con AEO y nanofibrillas de celulosa mostraron un menor espesor que las PC.

Un mayor espesor puede deberse a un aumento del contacto molecular entre los grupos CH del almidón y los componentes del AEO. Esto debilita las fuerzas de agregación de la cadena del polímero y da lugar a una matriz más abierta, conduciendo a un mayor espesor de la película (Aguilar- Sánchez *et al.*, 2019). Además, se ha sugerido que el grosor depende de la naturaleza y composición de la película al aumentar el contenido de sólidos (Alizadeh-Sani *et al.*, 2018; Roy *et al.*, 2021).

Por otra parte, la PVA y el Ce son dos mediciones diferentes de la propiedad de un material de dejar pasar agua a través de él. El Ce mide la velocidad a la que las moléculas de agua pueden moverse a través de un material; mientras que la PVA mide la cantidad de vapor de agua que puede pasar a través de un material por unidad de tiempo y área (Baschetti y Minelli 2020).

Se observó que las PA (Tabla 3) presentaron valores de PVA más bajos  $\{12.964 \times 10^{-9}$  y  $9.217 \times 10^{-9}$   $[\text{mol}/(\text{kg}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^1\cdot\text{Pa}^1)]\}$  en comparación con la película control (PC)  $\{3.574 \times 10^{-8}$   $[\text{mol}/(\text{kg}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^1\cdot\text{Pa}^1)]\}$ . La diferencia de los resultados obtenidos entre la PC y las PA se debe a que la incorporación de AEO-NSM genera una ruta más compleja y alargada para las moléculas de agua. Disminuyendo la velocidad de permeación del agua, por lo tanto, se reduce la PVA (Singh *et al.*, 2023). Además, el AEO puede promover la formación de enlaces de hidrógeno con el grupo hidroxilo del almidón, lo que reduce la fuerza de unión entre el agua y el almidón, dando como resultado un menor paso de agua por la matriz de la película (Long *et al.*, 2022).

Los valores obtenidos de PVA en esta investigación son mayores a los reportados para papel Kraft y poliestireno utilizando un sistema de fotoacústica. La PVA fue de  $4.18 \times 10^{-11}$   $[\text{mol}/(\text{kg}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^1\cdot\text{Pa}^1)]$  para el papel Kraft y  $6.80 \times 10^{-11}$   $[\text{mol}/(\text{kg}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^1\cdot\text{Pa}^1)]$  para el poliestireno (Martínez-Muñoz *et al.*, 2022), representando cerca de dos órdenes de magnitud menor. Debe aclararse que el poliestireno es un polímero sintético con largos tiempos de biodegradación, mientras que el papel Kraft es opaco y no permite ver el producto que está envolviendo.

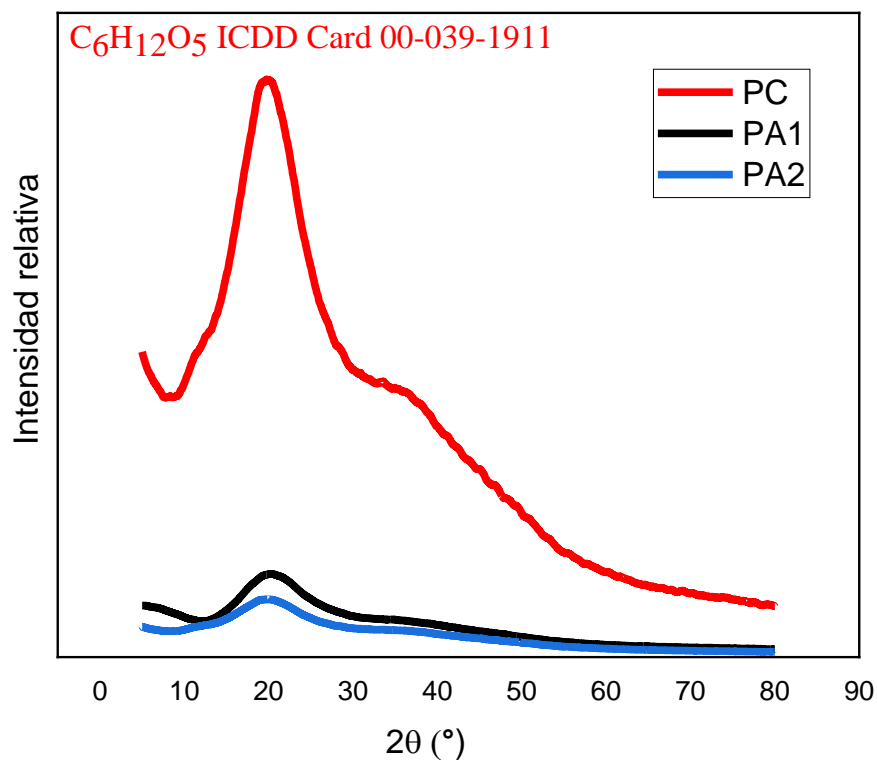
Otros autores han reportado disminución de los valores de PVA, usando la metodología gravimétrica de la Sociedad Estadounidense para pruebas y materiales (ASTM) o dispositivos medidores de la velocidad de transmisión de vapor de agua. En películas de almidón de tapioca esterificado con AEO-MSN se observó una PVA

en el rango  $1.97 - 2.06 \times 10^{-9}$  (g/m s Pa) (Yan *et al.*, 2022). Igualmente, en películas a base de AS con AEO-MSN la PVA para la PC (sin AEO) fue de  $10.97 \times 10^{-9}$  (g/h m Pa) y para la película con 0.8% en peso de AEO encapsulado de  $8.50 \times 10^{-9}$  (g/h m Pa) (Lu *et al.*, 2021). Por otra parte, se reportó una PVA de 2.77 g·mm/(kPa·h·m<sup>2</sup>) para la película control (sin aceite) y 2.18 g·mm/(kPa·h·m<sup>2</sup>) para la película con hidroxipropilmetilcelulosa con 5 % de nanoemulsión de AEO (Lee *et al.*, 2019).

Se evidenció una disminución en el valor del Ce en las PA ( $5.015 \times 10^{-11}$  m<sup>2</sup>/s y  $3.124 \times 10^{-11}$  m<sup>2</sup>/s) en comparación con la PC ( $1.122 \pm 0.05 \times 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s) (Tabla 3). Al igual, se han reportado valores de coeficiente de difusión de agua que oscilaron entre  $3.57 \times 10^{-10} - 6.43 \times 10^{-11}$  m<sup>2</sup>/s en películas de almidón de maíz con nanocristales de celulosa (Slavutsky y Bertuzzi, 2014). Así mismo, se obtuvieron valores entre  $4.3$  y  $7.0 \times 10^{-11}$  m<sup>2</sup>/s en películas basadas en almidón, cuyos valores tienen una magnitud similar que los presentados en esta investigación (Basiak *et al.*, 2018).

### **6.3.2 Difracción de rayos X (DRX)**

La difracción de rayos X permite analizar la estructura cristalográfica de los materiales, ya que los rayos X dispersados interactúan con los átomos de las películas. Esta interacción, genera patrones de difracción que revelan información sobre la distancia entre los planos atómicos y la orientación de la estructura. Los difractogramas de rayos X de las películas se presentan en la Figura 11. La PC exhibió un pico amplio a  $2\theta = 19.6^\circ$  y dos picos leves a  $2\theta = 11.5^\circ$  y  $35.9^\circ$ ; en contraste, al incorporar AEO-NSM estos picos leves no se observaron en PA1 ni en PA2. Estos picos fueron comparados con la base de del Centro Internacional de Datos de Difracción (ICDD) (Card No. 00-039-1911) y los reportados por la literatura.



**Figura 11.** Difracción de rayos X (DRX) de las películas con y sin AEO-NSM. **PC:** Película control; **PA1:** Película activa con 0.6 mg/cm<sup>2</sup> AEO-NSM; **PA2:** Película activa con 0.9 mg/cm<sup>2</sup>AEO-NSM

Se ha observado que a mayor proporción de NSM en películas a base de AS disminuía la intensidad del pico a  $2\theta = 13^\circ$  (Júnior *et al.*, 2021). Por el contrario, empleando películas de agar/AS se observó un pico a  $2\theta = 14.01^\circ$ , pero este pico no se observó en las películas a las que se les agregó NSM (Hou *et al.*, 2019). Esto indica que la incorporación de NSM produce una interferencia constructiva o destructiva entre los rayos X difractados. Esto debido a que, si el material es amorfo, es decir, no tiene una estructura cristalina ordenada, no producirá picos nítidos en el patrón de difracción, haciendo que los picos se vuelvan muy débiles o incluso indetectables en el patrón de difracción de rayos X.

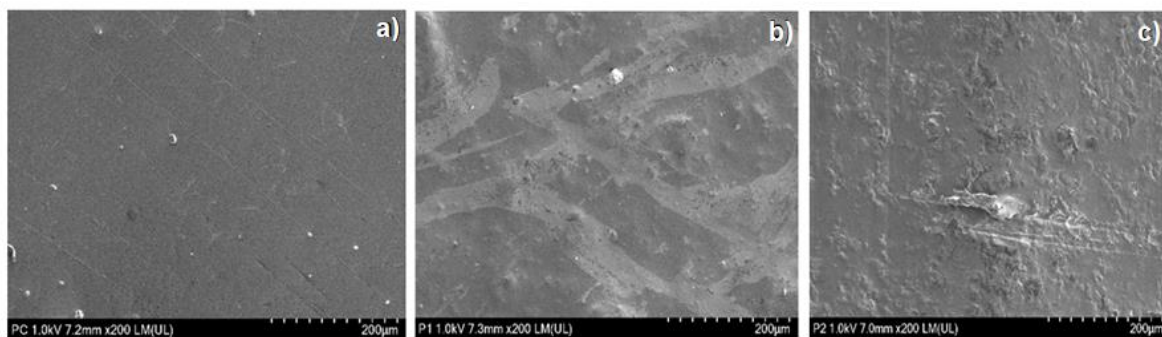


En general todas las películas mostraron un pico de difracción amplio a  $2\theta = 19.6^\circ$ ; sin embargo, conforme incrementaba la concentración de AEO-NSM fue menor la intensidad en este pico. PA1 y PA2 presentaron una disminución del 85.3% y 89.8%, respectivamente en comparación con la película control (PC), indicando un cambio inducido en la fase semi cristalina del almidón y el AS al incorporar AEO-NSM en las películas. Esto puede atribuirse a la interacción intramolecular entre los enlaces de hidrógeno del AEO-NSM y el almidón/AS (Yang *et al.*, 2018). Por lo anterior, se induce la densidad estructural (relación entre la masa y el volumen) en la matriz polimérica restringiendo el grado de cristalización (Aziz y Almasi, 2018), lo cual está acorde con los hallazgos observados en FTIR.

Resultados similares fueron reportados, en películas a base de AS y AEO-NSM (Lu *et al.*, 2021). Así mismo, se observó en películas de almidón de patata con AE de canela encapsulado en NSM (Zhang *et al.*, 2019).

### **6.3.3 Microscopía electrónica de barrido (MEB)**

Por medio de la microscopia electrónica de barrido (MEB), se obtienen imágenes tridimensionales y de alta resolución de la topografía y la morfología de la superficie de un material. En particular, la película control (PC) exhibió una superficie lisa y plana, así como uniformidad en la estructura (Figura 12a). En cambio, las PA presentaron una superficie rugosa, aunque una dispersión uniforme del AEO-NSM (Figura 12 b, c).



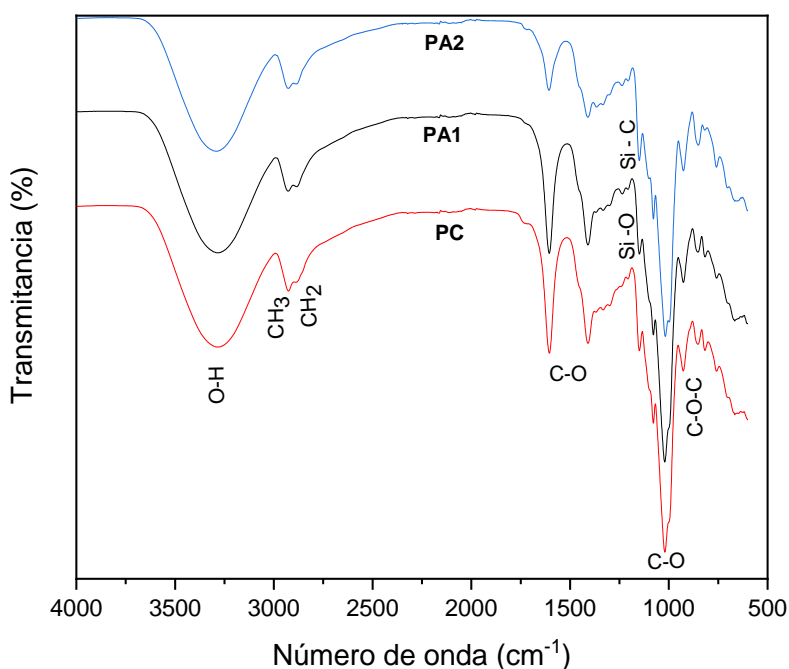
**Figura 12.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB) de las películas con y sin AEO-NSM. a) **PC**: Película control; b) **PA1**: Película con 0.6 mg/cm<sup>2</sup> AEO-NSM; c) **PA2**: Película activa con 0.9 mg/cm<sup>2</sup> AEO-NSM. La magnificación de todas las imágenes fue de 200X.

En general en todas las formulaciones se observaron gránulos visibles de almidón, lo cual, ha sido corroborado por algunos investigadores en películas de almidón (Mittal *et al.*, 2020; Pantelic *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2021).

Por otro lado, se observó una distribución uniforme en películas de almidón de patata con AE de canela encapsulado en NSM, atribuyendo esta característica a la disminución de los grupos -OH en la superficie de las nanopartículas (Zhang *et al.*, 2019). Así mismo, se reportó una estructura rugosa y sin burbujas en películas a base de AS y AEO-NSM. Sin embargo, a concentraciones superiores del 1% en peso de AEO-NSM las nanopartículas suelen tener una mayor aglomeración y formar una estructura discontinua, afectando las características fisicoquímicas de las películas (Lu *et al.*, 2021).

### 6.3.4 Análisis mediante espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

El FTIR estudia la composición química y molecular de los materiales. Esta técnica se fundamenta en la interacción de las moléculas con la radiación infrarroja, que provoca vibraciones moleculares específicas que son características de los enlaces químicos presentes en el material. En la Figura 13 se muestran las bandas de absorción de los espectros infrarrojos con transformada de Fourier, obtenidos de las PA diseñadas.



**Figura 13.** Espectros de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) de las películas con y sin AEO-NSM. **PC:** Película control; **PA1:** Película activa con 0.6 mg/cm<sup>2</sup> AEO-NSM; **PA2:** Película activa con 0.9 mg/cm<sup>2</sup> AEO-NSM.

Los grupos funcionales de los componentes de la matriz polimérica se observaron en los espectros FTIR mostrando bandas similares (Figura 13). Sin

embargo, se presentó una variación en el corrimiento de algunas de las bandas, dependiendo de la concentración de AEO-NSM incorporado en la película.

Las bandas entre 3600 y 3100  $\text{cm}^{-1}$  pertenecen a las vibraciones de estiramiento del enlace O-H de los grupos hidroxilo, las moléculas de agua y las interacciones agua-matriz (Fabra *et al.*, 2018). Con el aumento de la concentración de AEO-NSM se presentó desplazamiento de estas dos bandas, lo que puede evidenciar la interacción intramolecular de enlaces de hidrógeno entre AEO-NSM, el almidón, el AS y el glicerol (Lu *et al.*, 2021). Además, se ha reportado que existen cambios en esta región debido a los polifenoles presentes en el AEO que se incorporan en películas con almidón (Cruz *et al.*, 2020).

Las bandas a 2925 y 2880  $\text{cm}^{-1}$  se deben a las frecuencias de estiramiento antisimétricas y simétricas de los enlaces  $-\text{CH}_3$  y  $-\text{CH}_2$ . Los valores de las frecuencias de vibración a 1610 y 1416  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a las vibraciones de flexión y estiramiento de los grupos O-H del agua unida a la matriz (Dang & Yoksan, 2015). Además, estas bandas se han atribuido a las vibraciones de estiramiento asimétricas y simétricas del enlace C-O del grupo  $-\text{COO}$  (Yang *et al.*, 2018; Alves *et al.*, 2020). Sin embargo, se observan cambios en la intensidad y la longitud de onda al incorporar AEO-NSM en las películas, lo que sugiere una interacción con las moléculas de almidón y el AS.

La señal a 1155  $\text{cm}^{-1}$  está relacionada con el estiramiento C-O presente en la estructura del almidón (Hejna *et al.*, 2019). En cuanto a los cambios observados en la posición de la banda de absorción a 1075  $\text{cm}^{-1}$ , se sugiere la posible formación de enlaces de hidrógeno entre las moléculas de AEO-NSM, almidón y AS. Esto puede ser atribuido a la formación de enlaces Si-O y Si-C, que pueden reducir la frecuencia vibratoria de la banda de absorción (Lu *et al.*, 2021).

Las bandas localizadas a 1021 y 922  $\text{cm}^{-1}$  están asociadas con las frecuencias de estiramiento de los enlaces C-O en las cadenas C-O-C y con la vibración de estiramiento del anillo de piranosa, respectivamente (Dang & Yoksan, 2015; Gutiérrez *et al.*, 2019). Finalmente, por debajo de 800  $\text{cm}^{-1}$  se presentan espectros con una estructura compleja relacionado con una gran cantidad de vibraciones esqueléticas de los anillos de glucopiranososa (Hejna *et al.*, 2019).

### 6.3.5 Color de la superficie

El color es un indicador visual del efecto que tienen los componentes de las películas, siendo un factor fundamental que puede afectar su utilización en una matriz alimentaria. Se observó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en el parámetro de luminosidad/brillo ( $L^*$ ) y un ligero decremento en el valor del parámetro  $a^*$  (rojo/verde) a medida que incrementaba la concentración de AEO-NSM. En cambio, el valor del parámetro  $b^*$  (azul/amarillo) y la diferencia de color total ( $\Delta E^*$ ) aumentaron significativamente ( $p < 0.05$ ). Esto indica que la película se vuelve menos clara y adquiere un color más intenso con el aumento de AEO-NSM.

**Tabla 4.** Parámetros de color CIELAB de las películas con y sin AEO-NSM

Película	Parámetros de color				Opacidad (%)
	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E^*$	
PC	$85.4 \pm 0.5^a$	$-1.6 \pm 0.1^a$	$0.6 \pm 0.4^a$	$8.7 \pm 0.6^a$	$20.6 \pm 0.2^a$
PA1	$84.1 \pm 0.2^b$	$-1.7 \pm 0.1^a$	$3.2 \pm 0.5^b$	$9.4 \pm 0.2^a$	$21.3 \pm 0.6^a$
PA2	$82.7 \pm 0.4^c$	$-1.9 \pm 0.3^a$	$7.2 \pm 0.3^c$	$12.7 \pm 0.5^b$	$21.8 \pm 0.4^a$

$L^*$ : luminosidad/brillo;  $a^*$ : verde/rojo;  $b^*$ : azul/amarillo;  $\Delta E^*$ : Diferencia total de color. Los resultados se informan como la media  $\pm$  la desviación estándar ( $n=3$ ). Diferentes letras en la misma columna indican una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ; Tukey test). **PC**: Película control; **PA1**: Película activa con 0.6  $\text{mg}/\text{cm}^2$  AEO-NSM; **PA2**: Película activa con 0.9  $\text{mg}/\text{cm}^2$  AEO-NSM.

Concordando con estos resultados, en películas activas con nanopartículas de ácido berberina-cinámico. Reportaron un aumento en la diferencia de color ( $\Delta E^*$ ) y en el valor de  $b^*$ ; mientras que los parámetros  $L^*$  y  $a^*$  disminuyeron al aumentar la concentración de las nanopartículas (Ma *et al.*, 2022). Igualmente, se mostró una disminución de la luminosidad ( $L^*$ ) de las películas con nanocompuestos y AEO (Aguilar-Sánchez *et al.*, 2019). Además, observaron la presencia de los pigmentos presentes en el AEO, como los monoterpenos fenólicos y el color característico del almidón de maíz, los cuales podrían impactar la percepción del color y la apariencia de las películas.

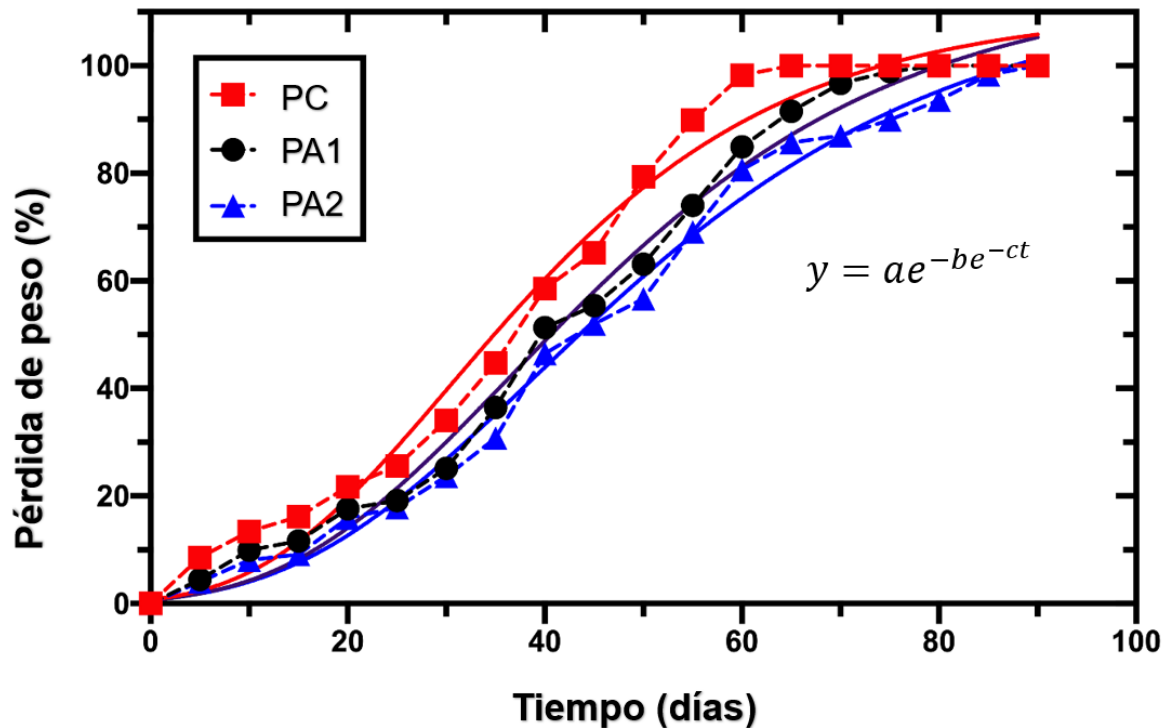
Con relación a la opacidad, que es un factor utilizado para evaluar la transparencia de la película y el grado de obstrucción a la transmisión de la luz visible, no se detectaron cambios significativos ( $p > 0,05$ ) entre la película control (PC) y las PA. No obstante, un valor de opacidad más bajo indica una mayor transparencia (Pareda *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2018). Los valores obtenidos para la PC (20.6%) y para las PA1 y PA2 (21.3% y 21.8%) indicaron un ligero aumento de la opacidad al incorporar AEO-NSM en las películas de esta investigación.

Resultados similares fueron obtenidos en películas a base de almidón de tapioca con AEO-NSM, encontrando mayores valores de opacidad que los de la película sin adición de AEO-NSM (Yan *et al.*, 2022). Además, se ha sugerido que tanto el grado de polimerización de la amilosa y las moléculas presentes en el almidón, pueden influir en el grado de opacidad de las películas de almidón (Llanos *et al.*, 2021).

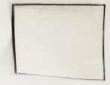
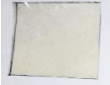










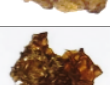




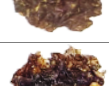








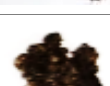



Por consiguiente, la inclusión de aceites en la estructura de la película reduce la cantidad de luz que puede atravesarla (Tessaro *et al.*, 2021). Este efecto se puede deber a la dispersión de la luz en la superficie de las gotas de aceite (Bonilla *et al.*, 2018), lo que resulta en una disminución del valor de  $L^*$  y un ligero aumento en la opacidad de las películas.

### 6.3.6 Biodegradación de las películas en compostaje vegetal

En la Figura 14 se muestra la biodegradabilidad de las películas sometidas a compostaje natural con respecto al tiempo y en la Figura 15 se presenta la apariencia y los cambios de las películas a través del tiempo en que se estudió la biodegradabilidad.



**Figura 14.** Porcentaje de pérdida de peso durante la biodegradación por compostaje de las películas con y sin AEO-NSM modelado con el método de Gompertz (1825). La línea continua es el modelo (Gompertz) y los símbolos son los datos. En el eje Y se muestra la pérdida de peso de las películas a lo largo del tiempo, a: es la pérdida de peso máxima, c: describe la tasa específica de pérdida de peso, b es la diferencia entre el peso inicial y el peso final a un tiempo t. **PC:** Película control; **PA1:** Película activa con 0.6 mg/cm<sup>2</sup> AEO-NSM; **PA2:** Película activa con 0.9 mg/cm<sup>2</sup> AEO-NSM.

Día	PC	PA1	PA2
0			
3			
7			
15			
25			
30			
50			
55			
60			
70			
75			
80			

**Figura 15.** Apariencia visual de los cambios ocurridos en las películas mediante el ensayo de biodegradación en compostaje natural. **PC:** Película control; **PA1:** Película activa con 0.6 mg/cm<sup>2</sup> AEO-NSM; **PA2:** Película activa con 0.9 mg/ cm<sup>2</sup> AEO-NSM



El proceso de descomposición de materiales poliméricos en condiciones de enterramiento en el suelo se caracteriza por ser un proceso complejo que involucra, tanto, la acción de la hidrólisis química como la degradación bacteriana. Esta última comprende tanto la hidrólisis biológica como la oxidación, lo que contribuye a la descomposición del material (Mahajan y Gupta 2015).

Después de la exposición al compostaje se observó que las películas se tornaron rígidas y quebradizas. La PC presentó una mayor pérdida de peso y se degradó en 60 días; sin embargo, las películas con AEO-NSM requirieron un mayor tiempo de compostaje. La PA1 se degradó a los 75 días y PA2 a los 85 días. La menor pérdida de peso que presentaron las películas con AEO-NSM podría estar influenciada a la presencia de AEO-NSM que actúa como barrera y promueve la resistencia en la absorción y difusión del agua a través de las películas (Singh *et al.*, 2023). Adicionalmente el efecto antimicrobiano, podría haber limitado la actividad de los microorganismos degradadores en el suelo.

Todas las películas mostraron aceleración en su pérdida de peso después de 35 días. Estos polímeros son macromoleculares y biodegradables, con una naturaleza hidrófila, lo que significa que el agua del suelo puede penetrar fácilmente en la estructura de los polímeros. Esto debilita las cadenas poliméricas y permite que sean hidrolizadas por microorganismos presentes en el suelo (He *et al.*, 2021). Además, el entorno del suelo brinda una condición propicia para que los microorganismos puedan encontrar fuentes de carbono, lo que conduce a la disminución del peso de las biopelículas (Maran *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2019).

Empleando una formulación de una película de almidón de maíz, quitosano y alcohol polivinílico, se demostró que la formulación que contenía entre el 10 al 20 % en peso del alcohol polivinílico, se degradaron a los 90 días (Kochkina y Lukin, 2020). Así mismo, se evidenció que las películas biocompuestas con almidón y extractos de flor de Jamaica se biodegradaban al 100% después de 90 días

(Gutiérrez *et al.*, 2019). En contraste, empleando películas de almidón reforzadas con celulosa, obtuvieron una biodegradación entre 20 y 25 días (Trujillo-Hernández *et al.*, 2021).

Por lo anterior, puede considerarse que la variedad de factores contribuye a la biodegradación de los polímeros en el medio ambiente. Se determinó que una forma más amorfa y una composición menos compleja del polímero hace susceptible el material a la biodegradación por microorganismos (Emadian *et al.*, 2017). También el medio ambiente al que se expone este tipo de materiales es clave para la biodegradación como la temperatura, pH, humedad y el nivel de oxígeno (Castro-Aguirre *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2016).

### **6.3.7 Aplicación de la película al queso crema comercial**

El queso crema es un alimento lácteo con una duración limitada por tener un alto contenido de humedad y composición rica en grasas. Una vez que se abre el envase, el queso crema queda expuesto al aire y a posibles contaminantes microbianos presentes en el ambiente; adicionalmente la exposición a condiciones aeróbicas favorece el desarrollo de una diversidad de microorganismos deterioradores y patógenos (López-Mendoza *et al.*, 2023).

Con el tiempo, los microorganismos pueden comenzar a multiplicarse en el queso crema expuesto, lo que aumenta el riesgo de deterioro y proliferación de bacterias patógenas y deterioradoras. Además, la humedad y las grasas presentes en el queso crema proporcionan un ambiente favorable para el crecimiento bacteriano y el crecimiento de mohos (López-Mendoza *et al.*, 2023).

La recomendación de consumir el queso crema en menos de 10 días después de abrirlo se basa en asegurar la calidad y la seguridad alimentaria. En este tiempo, es menos probable que los microorganismos alcancen niveles

perjudiciales, siempre y cuando el queso se mantenga refrigerado correctamente. Pasado ese tiempo, el queso crema puede volverse rancio, adquirir sabores desagradables o desarrollar mohos visibles, lo que indica que ya no es seguro para el consumo (Rodríguez-Jerez, 2022).

Los siguientes análisis se realizaron en queso crema comercial de la marca Philadelphia®, debido a que este producto declara no tener conservadores. Cabe resaltar que las muestras de queso crema almacenadas sin película (QSP) se descartaron después de los 20 días por el evidente desarrollo de hongos, la cual se podía apreciar a simple vista.

### 6.3.7.1 Pérdida de peso y pH

La pérdida de peso y los cambios en el pH de las muestras con los diferentes tratamientos durante el tiempo de almacenamiento se muestran en las

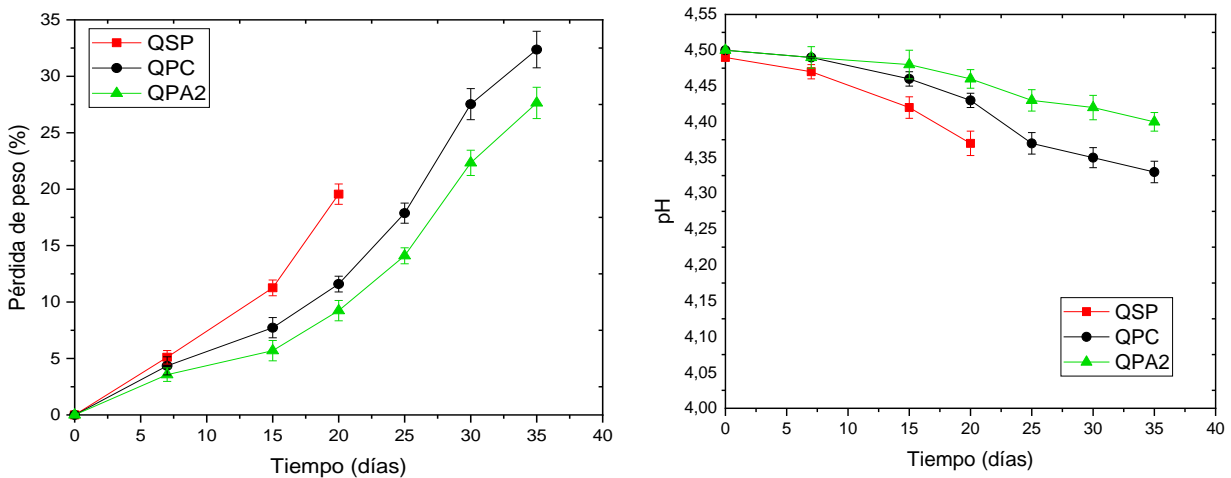


Figura 16.

**Figura 16.** Porcentaje de pérdida de peso y cambios de los valores de pH del queso crema tratado con y sin las películas con AEO-NSM durante el tiempo de almacenamiento a 4 °C. **QSP:** Queso crema almacenado sin película; **QPC:**

Queso crema almacenado con la película control y **QPA2**: Queso crema almacenado con la película formulada con 0.9 mg/cm<sup>2</sup>.

Los resultados reflejaron que la pérdida de peso de las muestras QPC y QPA2 después de los 7 días, fueron significativamente menores ( $p < 0.05$ ) en relación con QSP. Con respecto a los valores de pH del queso crema, QPC y QPA2, permanecieron estables durante los 7 días de almacenamiento, pero luego de este tiempo QPC decreció significativamente ( $p < 0.05$ ) con el incremento del tiempo de almacenamiento, sin embargo, QSP evidenció una mayor disminución de los valores de pH (4.50 – 4.37) a través del tiempo de almacenamiento.

Esta disminución del pH se asocia a la producción de ácido por bacterias ácido lácticas, como es el caso de lactobacilli (*Lactobacillus* spp.) (Dermiki *et al.*, 2008; Jafarzadeh *et al.*, 2019). Además, el descenso del pH puede ser resultado de la generación de dióxido de carbono por parte de microorganismos durante la descomposición del lactato y la conversión de aminoácidos en la superficie del queso (Youseef *et al.*, 2016; Amjadi *et al.*, 2019).

Resultados similares fueron reportados en recubrimientos de 8 diferentes biopolímeros con y sin lípidos aplicados en quesos prensados sin madurar. Los quesos presentaron una pérdida de masa total más baja (23.8%) frente a las muestras sin recubrimiento (26.4%) (Ordoñez *et al.*, 2021). Igualmente, se presentó mayor pérdida de peso en quesos sin recubrimiento en comparación con las muestras que fueron tratadas con los recubrimientos de quitosano adicionado con AEO, o con AE de romero (Cano Embuena *et al.*, 2017).

Se observó una disminución progresiva del pH en queso doble crema sin recubrimiento. Por el contrario, las muestras que tenían el recubrimiento de almidón de achira (*Canna indica* L.), celulosa microcristalina y AEO logró mantener el pH y tener una menor pérdida de peso del queso doble crema almacenado durante 42 días a 5 °C (Molina-Hernández *et al.*, 2020).

En contraste, durante la evaluación del efecto del AEO en queso tipo panela durante 15 días de almacenamiento, se mostró una disminución del pH en las muestras tratadas con AEO y en las muestras control (sin AE) (Sánchez-Zamora *et al.*, 2020). Sin embargo, la pérdida de peso no fue diferente entre los tratamientos. Además, se presentó un menor incremento en los valores de pH en queso alto en grasa (80% en peso), con películas de quitosano y procianidina comparado con la película control (sin procianidina) (Zhang *et al.*, 2021).

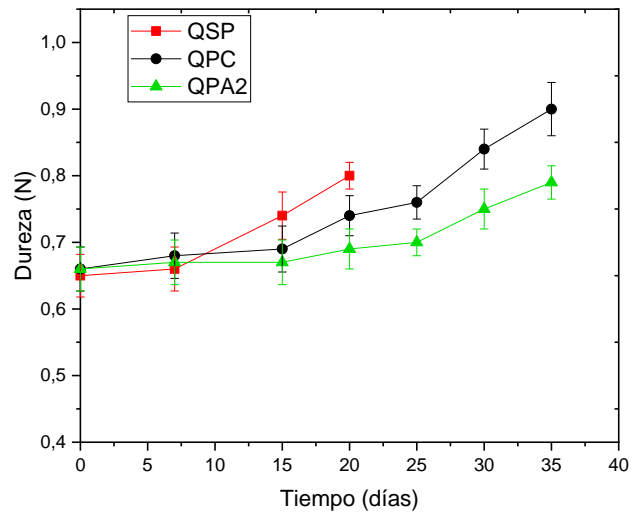
Los resultados obtenidos demuestran que las películas basadas en materiales de origen natural pueden asegurar la calidad de los alimentos al ejercer una barrera semipermeable al oxígeno, dióxido de carbono y vapor de agua. Esto conduce en una menor pérdida de peso, ya que se evita la pérdida de agua y el intercambio de gases en el alimento (Costa *et al.*, 2018).

Después de los 20 días, las muestras tratadas con la PA mostraron una pérdida de peso del 10%. A los 30 y 35 días de almacenamiento se observó una pérdida entre el 23% y 28%. Mientras, que QPC presentó una pérdida de peso entre el 27% y 33 % a los 30 y 35 días de almacenamiento. Esto indica que la incorporación de AEO-NSM genera una ruta más compleja y alargada para las moléculas de agua, disminuyendo la velocidad de permeación del agua por la matriz de la película y por lo tanto se reduce la pérdida de peso (Singh *et al.*, 2023).

#### **6.3.7.2 Análisis de Textura**

En la Figura 17 se presentan los cambios de dureza de las muestras con los diferentes tratamientos durante el tiempo de almacenamiento. De manera general, los diferentes tratamientos presentaron aumentos en la dureza a medida que transcurría el tiempo. Sin embargo, se observó un mayor incremento ( $p > 0.05$ ) en

las muestras QSP (0.65 – 0.80 N) y QPC (0.66 – 0.90 N) en comparación con QPA2 (0.66 - 0.79 N).



**Figura 17.** Cambios en la dureza del queso crema tratado con y sin las películas con AEO-NSM durante el tiempo de almacenamiento a 4 °C. **QSP:** Queso crema almacenado sin película; **QPC:** Queso crema almacenado con la película control y **QPA2:** Queso crema almacenado con la película formulada con 0.9 mg/cm<sup>2</sup>.

Empleando recubrimientos antimicrobianos a base de almidón de achira (*Canna indica* L.) y celulosa microcristalina. Se aplicaron dos tratamientos de recubrimiento diferentes en muestras de queso doble crema almacenadas durante 42 días a 5 °C, uno con AEO y otro con AE de ajo. Las muestras recubiertas presentaron valores más bajos de dureza en comparación con las muestras sin recubrimiento (Molina-Hernández *et al.*, 2020)

De manera similar se aplicó un recubrimiento comestible con AEO en quesos bajos en grasa. Los resultados revelaron que las muestras control (sin recubrimiento) presentaron una mayor dureza (3 N), en contraste, las muestras

tratadas con AE mostraron una menor dureza (1 N), después de 25 días de almacenamiento en refrigeración (Artiga-Artigas *et al.*, 2017).

Por su parte, se observó que la dureza en queso Karish (queso ácido de Egipto), aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) en las muestras control (sin recubrimiento) comparado con los quesos recubiertos con alcohol polivinílico, glicerol y nanopartículas de dióxido de titanio durante 25 días de almacenamiento (Youseef *et al.*, 2018).

En este sentido, la dureza del queso se ve influenciada principalmente por el contenido de agua, lo cual, coincide con los resultados obtenidos entre el % de pérdida de peso (

Figura 16) y dureza (Figura 17). Las muestras con QPA2 mostraron un 28% de pérdida de peso y una dureza 0.79 N, mientras que cuando se usaron películas de QPC que presentó un 33% de pérdida de peso y una dureza de 0.9 N durante el día 35 de almacenamiento. Por lo cual, el uso de películas con compuestos antimicrobianos disminuye la pérdida de agua, lo que contribuye a mantener las características texturales del queso y disminuir la pérdida de peso en las matrices alimentarias (Molina-Hernández *et al.*, 2020; Jafarzadeh *et al.*, 2021).

### **6.3.7.3 Análisis de color**

Los cambios en los parámetros de color ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ) y la diferencia de color se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Parámetros de color CIELAB y diferencia de color del queso tratado con y sin las películas con AEO-NSM durante el tiempo de almacenamiento.

Tratamiento	L*	a*	b*	ΔE*
	Día 0 de almacenamiento			
QSP	88.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	-1.9 ± 0.1 <sup>a</sup>	6.3 ± 0.4 <sup>a</sup>	--
QPC	88.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	-1.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	6.6 ± 0.3 <sup>a</sup>	--
QPA2	88.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	-1.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	6.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	--
Día 7 de almacenamiento				
QSP	84.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	-2.2 ± 0.2 <sup>a</sup>	6.83 ± 0.4 <sup>a</sup>	0.73 ± 0.1 <sup>a</sup>
QPC	85.2 ± 0.6 <sup>a</sup>	-2.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	8.02 ± 0.4 <sup>b</sup>	4.14 ± 0.6 <sup>b</sup>
QPA2	85.0 ± 0.3 <sup>a</sup>	-2.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	8.07 ± 0.3 <sup>b</sup>	4.93 ± 0.9 <sup>b</sup>
Día 15 de almacenamiento				
QSP	82.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	-2.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	6.90 ± 0.6 <sup>a</sup>	3.84 ± 0.6 <sup>a</sup>
QPC	84.1 ± 0.2 <sup>b</sup>	-2.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	8.80 ± 0.1 <sup>a</sup>	6.27 ± 0.2 <sup>b</sup>
QPA2	84.9 ± 0.6 <sup>b</sup>	-2.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	8.13 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.91 ± 0.5 <sup>c</sup>
Día 20 de almacenamiento				
QSP	83.3 ± 0.4 <sup>a</sup>	-2.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	8.23 ± 0.4 <sup>a</sup>	5.03 ± 0.3 <sup>a</sup>
QPC	83.0 ± 0.8 <sup>a</sup>	-2.2 ± 0.3 <sup>b</sup>	8.70 ± 0.2 <sup>b</sup>	6.21 ± 0.2 <sup>b</sup>
QPA2	84.6 ± 0.4 <sup>b</sup>	-2.3 ± 0.1 <sup>b</sup>	7.20 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.85 ± 0.3 <sup>a</sup>
Día 25 de almacenamiento				
QSP	---	---	---	---
QPC	85.2 ± 0.9 <sup>b</sup>	-2.2 ± 0.2 <sup>a</sup>	9.8 ± 0.8 <sup>a</sup>	6.34 ± 0.9 <sup>a</sup>
QPA2	87.7 ± 0.6 <sup>c</sup>	-2.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	7.95 ± 0.9 <sup>b</sup>	4.92 ± 0.6 <sup>b</sup>
Día 30 de almacenamiento				
QSP	---	---	---	---
QPC	83.0 ± 0.8 <sup>a</sup>	-2.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	10.33 ± 0.3 <sup>a</sup>	6.45 ± 0.7 <sup>a</sup>
QPA2	87.1 ± 0.7 <sup>b</sup>	-2.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	7.2 ± 0.3 <sup>b</sup>	5.07 ± 0.7 <sup>b</sup>
Día 35 de almacenamiento				
QSP	---	---	---	---
QPC	83.0 ± 0.7 <sup>a</sup>	-2.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	10.43 ± 0.5 <sup>a</sup>	6.87 ± 0.6 <sup>a</sup>
QPA2	86.43 ± 0.4 <sup>b</sup>	-2.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	7.91 ± 0.3 <sup>b</sup>	5.35 ± 0.5 <sup>b</sup>

L\*: luminosidad/brillo; a\*: verde/rojo; b\*: azul/amarillo; ΔE\*: Diferencia total de color. Los resultados se informan como la media ± la desviación estándar (n=3). Diferentes letras en la misma columna indican una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ; Tukey test). **QSP**: Queso crema sin película; **QPC**: Queso crema con película control; **QPA2**: Queso crema con película con 0.9 mg/ cm<sup>2</sup> AEO-NSM.

Los valores obtenidos de los parámetros (L\*, a\* y b\*) y la diferencia de color evidenciaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre QSP, QPC y QPA2 durante el tiempo de almacenamiento. Para las muestras QSP y QPC se evidenciaron mayores cambios durante el tiempo de almacenamiento, presentando una mayor



disminución en la luminosidad/brillo ( $L^*$ ), aumento en la tendencia hacia el amarillo ( $b^*$ ) y aumentos en el cambio de color a través del tiempo de almacenamiento.

También se observaron cambios en el parámetro  $a^*$  (rojo/verde) en las muestras QSP a partir del día 15 de almacenamiento. En concordancia, se ha evidenciado este comportamiento en queso cheddar recubierto con nanofibras aisladas de proteína de suero y carvacrol en las muestras sin recubrir y recubiertas. Los autores atribuyeron este cambio al deterioro microbiano presente en las muestras de queso (Wang *et al.*, 2019).

Además, la adición de AEO en la leche utilizada para elaborar queso tipo panela y al evaluar los parámetros ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ) durante 15 días de almacenamiento, se obtuvieron incrementos significativos en el parámetro  $b^*$ , atribuyendo estos resultados a los pigmentos del aceite de orégano (Sánchez-Zamora *et al.*, 2020).

Por el contrario, se evidenció un aumento en los valores de  $L^*$  y menores aumentos en el valor  $b^*$  (amarillez), en queso blanco aplicado con película de gelatina que contenía nanopartículas de ZnO reforzado con nanofibra de quitosano (Amjadi *et al.*, 2019).

Estos resultados se atribuyen a un incremento en los procesos bioquímicos, como la lipólisis y proteólisis, así como a una alta actividad del agua. Lo anterior permite que el QSP sea más susceptible a la oxidación, el deterioro microbiológico y la reducción de su vida útil (Zheng *et al.*, 2021); lo que es consecuente con los resultados microbiológicos obtenidos. Por lo tanto, las películas pueden actuar como un material de barrera al oxígeno y a la luz, logrando controlar la oxidación de los lípidos (Ali *et al.*, 2022).

#### 6.3.7.4 Análisis microbiológico

Los cambios en las poblaciones microbianas evaluadas durante 35 días de almacenamiento a 4 °C en las muestras de queso crema con los diferentes tratamientos, se presentan en la

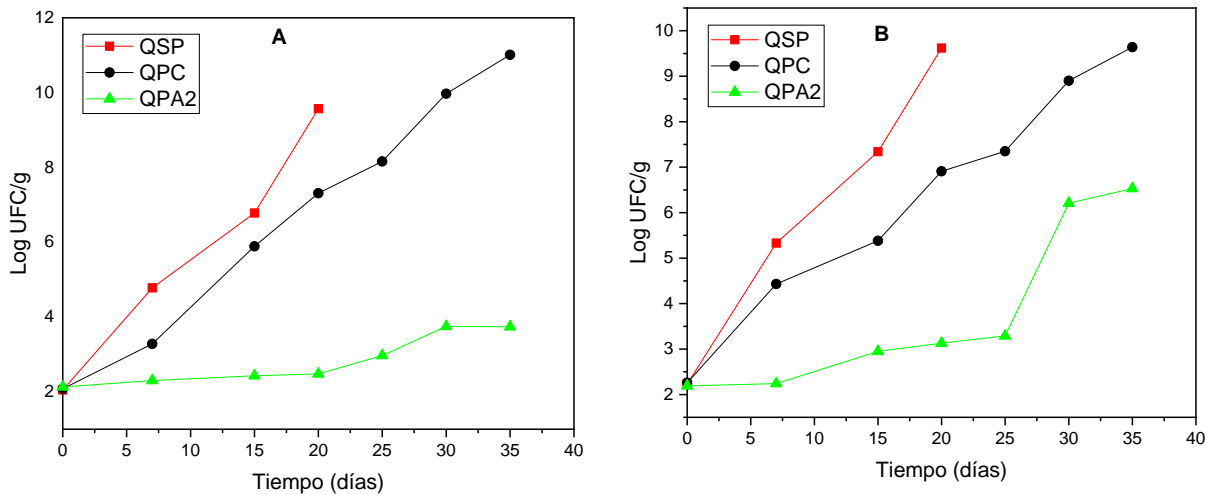


Figura 18.

**Figura 18.** Actividad antimicrobiana del queso crema tratado con y sin las películas adicionales de AEO-NSM durante el tiempo de almacenamiento. (A) bacterias aeróbicas mesófilas. (B) mohos y levaduras. **QSP:** Queso crema almacenado sin película; **QPC:** Queso crema almacenado con la película control y **QPA2:** Queso crema almacenado con la película formulada con 0.9 mg/cm<sup>2</sup>.

Los resultados muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre todos los tratamientos (QSP, QPC y QPA2). Se evidenciaron menores conteos de bacterias aeróbicas mesófilas, así como de mohos y levaduras para las muestras tratadas con QPA2 durante el tiempo de almacenamiento.

La

Figura 18 muestra que los conteos iniciales (día 0) de mohos y levaduras de todas las muestras cumplían con el límite permitido por las normas mexicanas (500 UFC/g). La presencia de mohos y de levaduras en la superficie del queso crema fue evidente (9.57 Log<sub>10</sub> UFC/g) en QSP, después, de 15 días de almacenamiento; mientras que las muestras con QPC superaron el límite permitido por la norma a los 20 días, evidenciando el deterioro del queso en estos dos tratamientos. Por otro lado, las muestras tratadas con QPA2 superó el límite de la norma (500 UFC/g) a partir de los 15 días de almacenamiento. Sin embargo, cabe mencionar que en las muestras tratadas con QPA2 no se observó crecimiento de mohos, pero sí de levaduras durante los 35 días de almacenamiento.

En cuanto a las bacterias aerobias mesófilas, los resultados evidenciaron menores poblaciones en las muestras tratadas con QPA2 durante los 35 días de almacenamiento. Por el contrario, QSP y QPC presentaron los mayores recuentos durante el tiempo de almacenamiento.

Resultados similares fueron reportados en un recubrimiento activo con AEO-NSM aplicado en queso panela. Logrando reducciones de aproximadamente 2 Log<sub>10</sub> UFC/g en las poblaciones de bacterias aeróbicas mesófilas y mohos y levaduras durante 15 días de almacenamiento a 4 °C (Ríos-de-Benito *et al.*, 2021).

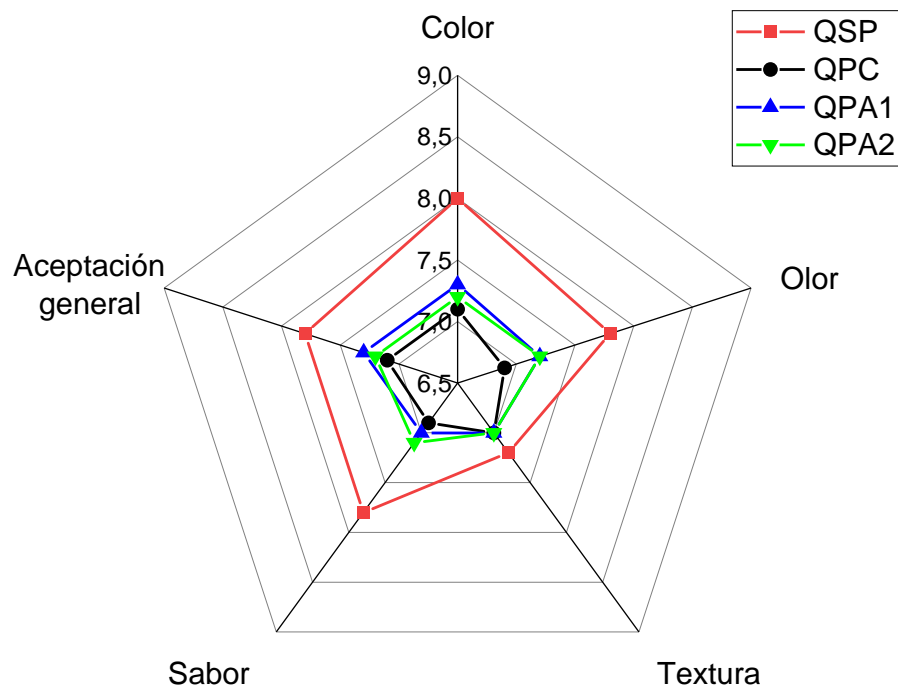
Así mismo, se reportó una mayor población microbiana para las muestras control. Además, se presentaron reducciones en la población de mohos y levaduras en queso Kasar en rodajas que contenían películas de proteína de suero con compuestos antimicrobianos (AE de orégano y ajo, nisina y natamicina) (Seydim *et al.*, 2020).

Puede observarse que hubo un mayor efecto antimicrobiano de las PA en la población de mesófilos aerobios que en hongos y levaduras. Dado que la población de hongos y levaduras fue limitante para la conservación del queso crema con la

mejor película activa (QPA2), puede concluirse que la duración del queso crema se mantuvo durante 15 días de almacenamiento. Por su parte, el queso crema sin película (QSP) mostró una población de hongos y levaduras mayor al límite permitido a los 7 días de almacenamiento. Por lo tanto, se ha comprobado que las PA proporcionan protección a los alimentos, extendiendo su durabilidad y conservando su calidad, debido a sus propiedades antimicrobianas, en concordancia con El-Sayed, *et al.* (2021) y Pluta-Kubica *et al.* (2020).

### 6.3.7.5 Análisis sensorial

Los resultados de la evaluación sensorial de las diferentes muestras de queso crema se presentan en la Figura 19.



**Figura 19.** Evaluación sensorial del queso crema con los diferentes tratamientos. Donde: **QSP**-Queso crema almacenado sin película; **QPC**-Queso crema almacenado con la película control; **QPA1**- Queso crema almacenado con

la película formulada con 0.6 mg/cm<sup>2</sup> AEO-NSM; **QPA2**- Queso crema almacenado con la película formulada con 0.9 mg/cm<sup>2</sup>. *Evaluación en una escala hedónica de 1 a 9. \*p-valor < 0.05 según la prueba de Kruskal-Wallis.*

En general las muestras de queso crema con la película control (QPC), con la película que contenía 0.6 mg/cm<sup>2</sup> AEO-NSM (QPA1) y la película con 0.9 mg/cm<sup>2</sup> AEO-NSM (QPA2), fueron evaluadas con valores entre 6.9 y 7.2 sin diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en los atributos de color, olor, sabor, textura y aceptación general con una escala de “Me gusta moderadamente”. Sin embargo, la muestra de queso crema almacenada sin película (QSP) presentó diferencias significativas en los atributos de color, olor, sabor y aceptación general con una escala de “Me gusta mucho”.

Con relación al color, los consumidores notaron cambios sustanciales en este atributo. Esto se confirma con las mediciones de color a los 7 días, donde se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los parámetros  $b^*$  y  $\Delta E^*$  (Tabla 5), en comparación con QSP. Esto posiblemente pudo haber generado en los evaluadores un efecto halo, donde los demás atributos son influenciados por otro (Hough, 2010; Bschaden *et al.*, 2022). Lo que confirma las similitudes en las calificaciones de las muestras con las películas (QPC, QPA1 y QPA2) en cuanto al olor y el sabor. Aunque, cabe resaltar que las muestras fueron aceptables con una puntuación sensorial superior a 6.

Pluta-Kubica *et al.* (2020), evaluaron películas activas con extractos de yerba mate y té blanco en queso fresco de cuajo blando, los panelistas capacitados evaluaron negativamente la apariencia y el olor de las muestras de queso con la película activa con extracto de yerba mate, debido a que, al retirar la película, esta transfería en la superficie del queso el color verde característico de los pigmentos naturales de la yerba mate.

Un recubrimiento de quitosano con AEO y quitosano con AE de romero fue aplicado en queso de leche de cabra, comparando estos tratamientos con muestras sin recubrimiento. Los panelistas percibieron diferencias sensoriales significativas ( $p < 0.05$ ) en la apreciación del aroma y sabor de las muestras sin recubrimiento y con recubrimiento. Se concluyó que la percepción de AE en matrices de queso produce un efecto negativo en la apreciación sensorial (Cano Embuena *et al.*, 2017)

Así mismo, empleando una escala hedónica de 5 puntos para determinar sensorialmente el efecto del AEO en queso tipo panela durante 15 días de almacenamiento. Se evaluaron el color, olor, sabor, la suavidad y la aceptabilidad general. El color no presentó diferencias entre los tratamientos, aunque, la muestra control (sin aceite) fue la más aceptada en los demás atributos (Sánchez-Zamora *et al.* 2020). En contraste, la evaluación de un recubrimiento con AEO en queso doble crema, encontró que no había una preferencia entre las muestras control y las muestras con recubrimiento (Molina-Hernández *et al.*, 2020).

## **7 Conclusiones**

El aceite esencial de orégano microencapsulado en nanopartículas de sílice mesoporoso (AEO-NSM) presentó actividad bacteriostática contra el microorganismo deteriorador *L. mesenteroides* y patógenos (*L. innocua* como cepa filogenéticamente relacionada con *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *S. Typhimurium*). La incorporación del AEO-NSM influyó en el cambio de color de las películas activas (PA), incrementó su espesor y redujo la permeabilidad al vapor de agua (PVA) y el coeficiente efectivo de difusión de agua (Ce). El análisis de espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) logró identificar interacciones entre todos los componentes de la película, con posible formación de enlaces de hidrógeno entre las moléculas de AEO-NSM, almidón y el alginato de sodio (AS).

Los quesos que contenían películas con AEO-NSM presentaron una menor disminución en el pH, en pérdida de peso, en dureza y menores poblaciones de bacterias aerobias mesófilas, así como de mohos y levaduras en contraste con el queso sin película y con la película control. Por lo cual, se logró mantener una vida útil del queso crema de 15 días durante su almacenamiento.

Finalmente, los panelistas mostraron una preferencia por el queso crema sin película (QSP), el queso con película (con y sin AEO-NSM) fueron aceptables con una puntuación sensorial superior a 6. Por lo tanto, las películas activas de la presente investigación pueden ser un material de envasado prometedor para queso crema.

## 8 Bibliografía

- Aguilar-Sánchez, R., Munguía-Pérez, R., Reyes-Jurado, F., Navarro-Cruz, A. R., Cid-Pérez, T. S., Hernández-Carranza, P., Beristain-Bauza, S., Ochoa-Velasco, C. E., & Avila-Sosa, R. (2019). Structural, physical, and antifungal characterization of starch edible films added with nanocomposites and Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) essential oil. *Molecules*, 24(12), 2340. <https://doi.org/10.3390/molecules24122340>
- Akarca, G., Tomar, O., & Gök, V. (2015). Effect of different packaging methods on the quality of stuffed and sliced mozzarella cheese during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 2912-2918. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12542>
- Ali, A. M. M., Sant'Ana, A. S., & Bavisetty, S. C. B. (2022). Sustainable preservation of cheese: Advanced technologies, physicochemical properties and sensory attributes. *Trends in Food Science & Technology*, 129, 306-326. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.10.006>
- Alias, A. R., Wan, M. K., & Sarbon, N. M. (2022). Emerging materials and technologies of multi-layer film for food packaging application: A review. *Food Control*, 108875. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108875>
- Alizadeh-Sani, M., Khezerlou, A., & Ehsani, A. (2018). Fabrication and characterization of the bionanocomposite film based on whey protein biopolymer loaded with TiO<sub>2</sub> nanoparticles, cellulose nanofibers and rosemary essential oil. *Industrial Crops and Products*, 124, 300-315. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.001>
- Alves, D., Cerqueira, M. A., Pastrana, L. M., & Sillankorva, S. (2020). Entrapment of a phage cocktail and cinnamaldehyde on sodium alginate emulsion-based films to fight food contamination by *Escherichia coli* and *Salmonella* Enteritidis. *Food Research International*, 128, 108791. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108791>
- Amjadi, S., Emaminia, S., Nazari, M., Davudian, S. H., Roufegarinejad, L., & Hamishehkar, H. (2019). Application of reinforced ZnO nanoparticle-incorporated gelatin bionanocomposite film with chitosan nanofiber for packaging of chicken fillet and cheese as food models. *Food and Bioprocess Technology*, 12, 1205-1219. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02286-y>
- Andrade-Mahecha, M. M., Tapia-Blácido, D. R. & Menegalli, F. C. (2012). Development and optimization of biodegradable films based on achira flour. *Carbohydrate Polymers*, 88(2), 449 - 458. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.024>
- Armenteros, M., Quintana, D., Rivera, M., & Álvarez Lamazares, J. (2018). Evaluación de la calidad higiénico-sanitaria en quesos comercializados en una provincia de Cuba. *Revista de Salud Animal*, 40(1), 00-00. versión impresa ISSN 0253-570X versión On-line ISSN 2224-4700



- Artiga-Artigas, M., Acevedo-Fani, A., & Martín-Belloso, O. (2017). Improving the shelf life of low-fat cut cheese using nanoemulsion-based edible coatings containing oregano essential oil and mandarin fiber. *Food Control*, 76, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.01.001>
- ASTM D883-11. American Society for Testing and Materials. (2011). Standard terminology relating to plastics. Philadelphia, PA, EUA.
- ASTM. 2002. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. In Standard Designations D882-01. Annual book of ASTM standards. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.
- Avendaño-Romero, G., López-Malo, A. & Paolu, E. (2013). Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(1), 87-96. Recuperado de: [http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/acym/ALGINATOS\\_I.pdf](http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/acym/ALGINATOS_I.pdf)
- Aziz, S. G. G., & Almasi, H. (2018). Physical characteristics, release properties, and antioxidant and antimicrobial activities of whey protein isolate films incorporated with thyme (*Thymus vulgaris* L.) extract-loaded nanoliposomes. *Food and Bioprocess Technology*. 11, 1552-1565. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2121-6>
- Bajac, J., Nikolovski, B., Lončarević, I., Petrović, J., Bajac, B., Đurović, S., & Petrović, L. (2022). Microencapsulation of juniper berry essential oil (*Juniperus communis* L.) by spray drying: microcapsule characterization and release kinetics of the oil. *Food Hydrocolloids*, 125, 107430. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107430>
- Balaure, C., Boarca, B., Popescu, C., Savu, D., Trusca, R., Vasile, Ș., Grumezescu, A., Holban, A., Bolocan, A., & Andronescu, E. (2017). Bioactive mesoporous silica nanostructures with anti-microbial and anti-biofilm properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 531(1), 35-46. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.062>
- Baschetti, M. G., & Minelli, M. (2020). Test methods for the characterization of gas and vapor permeability in polymers for food packaging application: A review. *Polymer Testing*, 89, 106606. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2020.106606>
- Basiak, E., Lenart, A., & Debeaufort, F. (2018). How glycerol and water contents affect the structural and functional properties of starch-based edible films. *Polymers*, 10(4), 412. <https://doi.org/10.3390/polym10040412>
- Bedoya-Serna, C. M., Dacanal, G. C., Fernandes, A. M., & Pinho, S. C. (2018). Antifungal activity of nanoemulsions encapsulating oregano (*Origanum vulgare*) essential oil: *in vitro* study and application in Minas Padrão cheese. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, 929-935. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.05.004>
- Berti, S., Resa, O., Basanta, F., Gerschenson, N., & Jagus, R. J. (2019). Edible coatings on Gouda cheese as a barrier against external contamination during ripening. *Food Bioscience*, 31, 100447. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100447>
- Bhavaniramy, S., Vishnupriya, S., Al-Aboody, S., Vijayakumar, R., & Baskaran, D. (2019). Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant

- applications. *Grain & oil Science and Technology*, 2(2), 49-55. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2019.03.001>
- Bonilla, J., Poloni, T., Lourenço, R. V., & Sobral, P. J. (2018). Antioxidant potential of eugenol and ginger essential oils with gelatin/chitosan films. *Food Bioscience*, 23, 107-114. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.03.007>
- Bschaden, A., Schulz, J., & Stroebele-Benschop, N. (2022). The sustainability halo effect: Does the provision of sustainability information of a snack affect sensory and health perception, and willingness to pay?. *Future Foods*, 5, 100143. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100143>
- Calo, R., Crandall, G., O'Bryan, A., & Ricke, C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. *Food Control*, 54, 111-119. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>
- Campos-Requena, H., Rivas, L., Pérez, A., Garrido-Miranda, A., & Pereira, D. (2018). Release of essential oil constituent from thermoplastic starch/layered silicate bionanocomposite film as a potential active packaging material. *European Polymer Journal*, 109, 64-71. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.08.055>
- CANILEC. Estadísticas del sector lácteo 2010 – 2020. (2021). Recuperado de: <https://www.canilec.org.mx/wp-content/uploads/2021/04/Compendio-del-Sector-Lacteo-2021.pdf>
- Cano Embuena, A. I., Cháfer Nácher, M., Chiralt Boix, A., Molina Pons, M. P., Borrás Llopis, M., Beltran Martínez, M. C., & González Martínez, C. (2017). Quality of goat's milk cheese as affected by coating with edible chitosan-essential oil films. *International Journal of Dairy Technology*, 70(1), 68-76. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12306>
- Carhuallanqui-Pérez, A., Salazar-Salvatierra, M. E., & Ramos-Delgado, D. (2020). Efecto antimicrobiano del aceite esencial de orégano frente a *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 22(1), 25-33. <http://dx.doi.org/10.18271/ria.2020.530>
- Castro, P., Vera, C., & Morocho, M. (2020). Inhibición del crecimiento de *Salmonella* spp y *Staphylococcus aureus* por efecto del aceite esencial de orégano en una película biodegradable activa de ácido poliláctico. *Revista Bases de la Ciencia*. 5(1), 41-50. [https://doi.org/10.33936/rev\\_bas\\_de\\_la\\_ciencia.v5i1.2035](https://doi.org/10.33936/rev_bas_de_la_ciencia.v5i1.2035)
- Castro-Aguirre, E., Auras, R., Selke, S., Rubino, M., & Marsh, T. (2017). Insights on the aerobic biodegradation of polymers by analysis of evolved carbon dioxide in simulated composting conditions. *Polymer Degradation and Stability*, 137, 251-271. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2017.01.017>
- Chen, K., Zhang, M., Adhikari, B., & Wang, M. (2022). Microencapsulation of Sichuan pepper essential oil in soybean protein isolate-Sichuan pepper seed soluble dietary fiber complex coacervates. *Food Hydrocolloids*, 125, 107421. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107421>

- Chen, S., Wu, M., Wang, C., Yan, S., Lu, P., & Wang, S. (2020). Developed chitosan/oregano essential oil biocomposite packaging film enhanced by cellulose nanofibril. *Polymers*, *12*(8), 1780. <https://doi.org/10.3390/polym12081780>
- Cheng, F., Ai, Y., & Ghosh, S. (2021). Utilization of octenyl succinic anhydride-modified pea and corn starches for stabilizing oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, *118*, 106773. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106773>
- CIE. 1976. International commission on illumination, colorimetry: official recommendation of the international commission on illumination publication CIE No (E 1.31). París, Francia; Bureau Central de la CIE.
- CODEX STAN 275-1973. (2010). Norma del codex para el queso crema (queso de nata, "cream cheese"). Leche y Productos Lácteos, 1–8. Recuperado de: [https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-Proxy/zh/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B275-1973%252FCXS\\_275s.pdf](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-Proxy/zh/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B275-1973%252FCXS_275s.pdf)
- Colina-Márquez, J. Á., Contreras, E., Ruiz, J., & Monroy, L. (2022). Comparación de dos métodos de extracción para el aceite esencial de la cáscara de pomelo (*Citrus maxima*). *Revista Ing-Nova*, *1*(1), 85-98. <https://doi.org/10.32997/rin-2022-3729>
- Corrêa-Filho, C., Moldão-Martins, M., & Alves, D. (2019). Advances in the application of microcapsules as carriers of functional compounds for food products. *Applied Sciences*, *9*(3), 571. <https://doi.org/10.3390/app9030571>
- Costa, J., Maciel, C., Teixeira, A., Vicente, A., & Cerqueira, A. (2018). Use of edible films and coatings in cheese preservation: Opportunities and challenges. *Food Research International*, *107*, 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.013>
- Cruz-Tirado, J. P., Ferreira, R. S. B., Lizarraga, E., Tapia-Blacido, D. R., Silva, N. C. C., Angelats-Silva, L., & Siche, R. (2020). Bioactive Andean sweet potato starch-based foam incorporated with oregano or thyme essential oil. *Food Packaging and Shelf Life*, *23*, 100457. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100457>
- D'agostino, M., Tesse, N., Frippiat, J. P., Machouart, M., & Debourgogne, A. (2019). Essential oils and their natural active compounds presenting antifungal properties. *Molecules*, *24*(20), 3713. doi: 10.3390/molecules24203713
- da Silva, D., Bernardes, C., Pinheiro, F., Fantuzzi, E., & Roberto, D. (2021). Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products. *Meat Science*, *176*, 108463. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108463>
- Dang, K. M., & Yoksan, R. (2015). Development of thermoplastic starch blown film by incorporating plasticized chitosan. *Carbohydrate Polymers*, *115*, 575-581. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.005>
- de Almeida, J. M., Crippa, B. L., de Souza, V. V. M. A., Alonso, V. P. P., Júnior, E. D. M. S., Picone, C. S. F., Prata, S. A., & Silva, N. C. C. (2022). Antimicrobial action of oregano, thyme, clove, cinnamon and black pepper essential oils free and

- encapsulated against foodborne pathogens. *Food Control*, 109356. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109356>
- De Souza, V. V. M. A., Crippa, B. L., De Almeida, J. M., Iacuzio, R., Setzer, W. N., Sharifi-Rad, J., & Silva, N. C. C. (2020). Synergistic antimicrobial action and effect of active chitosan-gelatin biopolymeric films containing *Thymus vulgaris*, *Ocimum basilicum* and *Origanum majorana* essential oils against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Cellular and Molecular Biology*, 66(4), 214-223. <http://dx.doi.org/10.14715/cmb/2020.66.4.26>
- dos Santos Caetano, K., Lopes, A., Costa, H., Brandelli, A., Rodrigues, E., Flôres, H., & Cladera-Olivera, F. (2018). Characterization of active biodegradable films based on cassava starch and natural compounds. *Food Packaging and Shelf Life*, 16, 138-147. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.03.006>
- dos Santos Paglione, I., Galindo, M. V., de Medeiros, J. A. S., Yamashita, F., Alvim, I. D., Grosso, C. R. F., Sakanaka, L. S., & Shirai, M. A. (2019). Comparative study of the properties of soy protein concentrate films containing free and encapsulated oregano essential oil. *Food Packaging and Shelf Life*, 22, 100419. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100419>
- El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Aït Addi, H., Casabianca, H., El Mousadik, A., Hartmann, D. Jilale, A., Renaud, F.N.R., Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483, 220-243. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>.
- Elkot, F., & Khalil, F. (2018). Impact of type of filling on the quality of cream cheese. *Journal of Food and Dairy Sciences*, 9(6), 215-219. DOI: 10.21608/JFDS.2018.35884
- El-Sayed, H. S., El-Sayed, S. M., Mabrouk, A. M., Nawwar, G. A., & Youssef, A. M. (2021). Development of eco-friendly probiotic edible coatings based on chitosan, alginate and carboxymethyl cellulose for improving the shelf life of UF soft cheese. *Journal of Polymers and the Environment*, 29, 1941-1953. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-02003-3>
- Emadian, S. M., Onay, T. T., & Demirel, B. (2017). Biodegradation of bioplastics in natural environments. *Waste Management*, 59, 526-536. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.10.006>
- European Bio-plastics. Bioplastics market data. (2020). Obtenido de <https://www.european-bioplastics.org/market/>. (Consultado el 10 de marzo de 2022).
- Fabra, M. J., Falcó, I., Randazzo, W., Sánchez, G., & López-Rubio, A. (2018). Antiviral and antioxidant properties of active alginate edible films containing phenolic extracts. *Food Hydrocolloids*, 81, 96-103. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.026>

- FAO. Standard for cream cheese. Codex Alimentarius International Food Standards, CODEX STAN 275-1973, ammendment 2016. (2016). Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.
- FDA. Code of federal regulations. Title 21: Food and drugs. Part 133: Cheese and related cheese products. Subpart B: Requirements for specific standardized cheese and related products: 133.133. Cream cheese. (2016) US Food and Drug Administration, Washington, DC, USA.
- Feng, M., Yu, L., Zhu, P., Zhou, X., Liu, H., Yang, Y., Zhou, J., Gao, C., Bao, X., & Chen, P. (2018). Development and preparation of active starch films carrying tea polyphenol. *Carbohydrate Polymers*, 196, 162–167. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.043>
- Gao, W., Wu, W., Liu, P., Hou, H., Li, X., & Cui, B. (2020). Preparation and evaluation of hydrophobic biodegradable films made from corn/octenylsuccinated starch incorporated with different concentrations of soybean oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 142, 376-383. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.108>
- Giammanco, M., Pepe, A., Aleo, A., D'Agostino, V., Milone, S., & Mammina, C. (2011). Microbiological quality of Pecorino Siciliano" primosale" cheese on retail sale in the street markets of Palermo, Italy. *New Microbiologica*, 34(2), 179-185. Recuperado de: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.1068.1934&rep=rep1&type=pdf>
- González-Cervantes, N., Salazar-Hernández, M., Cano-Lara, M., & Salazar-Hernández, C. (2019). Sílice mesoporosa como encapsulador de materiales de cambio de fase (PCM). Mesoporous silica as a phase change material encapsulator (PCM). *Revista de Ingeniería*, 3(9), 14-19. DOI: 10.35429/JTEN.2019.9.3.14.19
- Granata, G., Stracquadiano, S., Leonardi, M., Napoli, E., Consoli, G. M. L., Cafiso, V., Stefani, S., & Geraci, C. (2018). Essential oils encapsulated in polymer-based nanocapsules as potential candidates for application in food preservation. *Food Chemistry*, 269, 286-292. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.140>
- Grela, E., Kozłowska, J., & Grabowiecka, A. (2018). Current methodology of MTT assay in bacteria – review. *Acta Histochemica*, 120(4), 303-311. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.03.007>
- Gutiérrez, T. J., Toro-Márquez, L. A., Merino, D., & Mendieta, J. R. (2019). Hydrogen-bonding interactions and compostability of bionanocomposite films prepared from corn starch and nano-fillers with and without added Jamaica flower extract. *Food Hydrocolloids*, 89, 283-293. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.058>
- Hahladakis, J. N., Iacovidou, E., & Gerassimidou, S. (2020). Plastic waste in a circular economy. In *Plastic waste and recycling*. Academic Press. 481-512. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817880-5.00019-0>

- He, X., Li, M., Gong, X., Niu, B., & Li, W. (2021). Biodegradable and antimicrobial CSC films containing cinnamon essential oil for preservation applications. *Food Packaging and Shelf Life*, 29, 100697. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100697>
- Hejna, A., Lenža, J., Formela, K., & Korol, J. (2019). Studies on the combined impact of starch source and multiple processing on selected properties of thermoplastic starch/ethylene-vinyl acetate blends. *Journal of Polymers and the Environment*, 27, 1112-1126. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01406-1>
- Helanto, K. E., Matikainen, L., Talja, R., & Rojas, O. J. (2019). Bio-based polymers for sustainable packaging and biobarriers: A critical review. *BioResources*, 14(2), 4902-4951. DOI: 10.15376/biores.14.2.Helanto
- Hernández-Hernández, E., Castillo-Hernández, G., González-Gutiérrez, J., Silva-Dávila, J., Gracida-Rodríguez, N., García-Almendárez, E., Di Pierro, P., Vázquez-Landaverde, P., Regalado-González, C. (2019). Microbiological and physicochemical properties of meat coated with microencapsulated Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth) and Basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oils mixture. *Coatings*. 9, 414. <https://doi.org/10.3390/coatings9070414>
- Hernández-Hernández, E., Regalado-González, C., Vázquez-Landaverde, P., Guerrero-Legarreta, I., & García-Almendárez, B. E. (2014). Microencapsulation, chemical characterization, and antimicrobial activity of Mexican (*Lippia graveolens* HBK) and European (*Origanum vulgare* L.) oregano essential oils. *The Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/641814>
- Hincapie, F., Hernández, R., González, C., Castaño, P., & Torres, G. (2020). Obtención, funcionalización y aplicaciones biomédicas de las Nanopartículas de Sílice Mesoporosa: una revisión. *Dyna*, 87(215), 239-253. <https://doi.org/10.15446/dyna.v87n215.88586>
- Hou, X., Xue, Z., Xia, Y., Qin, Y., Zhang, G., Liu, H., & Li, K. (2019). Effect of SiO<sub>2</sub> nanoparticle on the physical and chemical properties of eco-friendly agar/sodium alginate nanocomposite film. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 1289-1298. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.109>
- HUNTER ASSOCIATES LABORATORY (1997). Versiones de software universal 3.2 y superiores: Manual del usuario: versión manual 1.5. Reston, Estados Unidos.
- International Organization for Standardization - ISO. (2013). ISO 4833-1:2013 - Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: colony count at 30 °C by the pour plate technique Geneva: International Organization for Standardization Publications.
- Jafarzadeh, S., Rhim, J. W., Alias, A. K., Ariffin, F., & Mahmud, S. (2019). Application of antimicrobial active packaging film made of semolina flour, nano zinc oxide and nano-kaolin to maintain the quality of low-moisture mozzarella cheese during low-

- temperature storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(6), 2716-2725. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9439>
- Jafarzadeh, S., Salehabadi, A., Nafchi, A. M., Oladzadabbasabadi, N., & Jafari, S. M. (2021). Cheese packaging by edible coatings and biodegradable nanocomposites; improvement in shelf life, physicochemical and sensory properties. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 218-231. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.021>
- Jeon, S., Lee, J., Ganesan, P., & Kwak, S. (2012). Comparative study of flavor, texture, and sensory in cream cheese and cholesterol-removed cream cheese. *Food Science and Biotechnology*, 21(1), 159-165. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0020-6>
- Jouki, M., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., & Koocheki, A. (2014). Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. *Food Hydrocolloids*, 36, 9-19. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.08.030>
- Júnior, L. M., da Silva, R. G., Anjos, C. A. R., Vieira, R. P., & Alves, R. M. V. (2021). Effect of low concentrations of SiO<sub>2</sub> nanoparticles on the physical and chemical properties of sodium alginate-based films. *Carbohydrate Polymers*. 269, 118286. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118286>
- Kaur, K., Jindal, R., Maiti, M., & Mahajan, S. (2019). Studies on the properties and biodegradability of PVA/Trapa natans starch (N-st) composite films and PVA/N-st-g-poly (EMA) composite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 826-836. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.134>
- Kavas, N., Kavas, G., & Saygili, D. (2016). Use of ginger essential oil-fortified edible coatings in Kashar cheese and its effects on *Escherichia coli* O157: H7 and *Staphylococcus aureus*. *CyTA-Journal of Food*, 14(2), 317-323. <https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1109001>
- Knapp, A., dos Santos, F., Pilatti-Riccio, D., Deon, G., dos Santos, F., & Pinto, Z. (2019). Yerba mate extract in active starch films: Mechanical and antioxidant properties. *Journal of Food Processing Preservation*, 43(3), e13897. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13897>
- Knezevic, P., Aleksic, V., Simin, N., Svircev, E., Petrovic, A., & Mimica-Dukic, N. (2016). Antimicrobial activity of Eucalyptus camaldulensis essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of ethnopharmacology*, 178, 125-136. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.12.008>
- Kochkina, N. E., & Lukin, N. D. (2020). Structure and properties of biodegradable maize starch/chitosan composite films as affected by PVA additions. *International Journal of Biological Macromolecules*. 157, 377-384. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.154>

- Kuete, V., Karaosmanoğlu, O., & Sivas, H. (2017). Chapter 10-Anticancer activities of african medicinal spices and vegetables. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*, 271–297. (VBT-MS and V. from A. Kuete ed.) <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00010-8>
- Kumar, P., Tanwar, R., Gupta, V., Upadhyay, A., Kumar, A., & Gaikwad, K. K. (2021). Pineapple peel extract incorporated poly (vinyl alcohol)-corn starch film for active food packaging: Preparation, characterization and antioxidant activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 187, 223-231. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.136>
- Lammari N, Louaer O, Meniai AH, Elaissari A. (2020) Encapsulation of essential oils via nanoprecipitation process: overview, progress, challenges and prospects. *Pharmaceutics*. May 7;12(5):431. doi: 10.3390/pharmaceutics12050431.
- Lee, J. Y., Garcia, C. V., Shin, G. H., & Kim, J. T. (2019). Antibacterial and antioxidant properties of hydroxypropyl methylcellulose-based active composite films incorporating oregano essential oil nanoemulsions. *LWT-Food Science & Technology*, 106, 164-171. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.061>
- Lemes, C., Pavón, Y., Lazzaroni, S., Rozycki, S., Brandelli, A., & Kalil, J. (2016). A new milk-clotting enzyme produced by *Bacillus* sp. P45 applied in cream cheese development. *LWT-Food Science & Technology*, 66, 217-224. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.038>
- Leon-Bejarano, M., Durmus, Y., Ovando-Martínez, M., & Simsek, S. (2020). Physical, barrier, mechanical, and biodegradability properties of modified starch films with nut by-products extracts. *Foods*, 9(2), 226. <https://doi.org/10.3390/foods9020226>
- Lepe, J. A., & Martínez-Martínez, L. (2022). Resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. *Medicina Intensiva*, 46(7), 392-402. ISSN 2173-5727. <https://doi.org/10.1016/j.medine.2022.05.004>.
- Li, J., Ye, F., Lei, L. & Zhao, G. (2018). Combined effects of octenylsuccination and oregano essential oil on sweet potato starch films with an emphasis on water resistance. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 547-553. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.093>
- Li, J., Ye, F., Liu, J., Zhao, G. (2015). Effects of octenylsuccination on physical, mechanical and moisture-proof properties of stretchable sweet potato starch film. *Food Hydrocolloids*. 46, 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.12.017>
- Lin, J., Lin, L., Huang, B., Lin, T., Li, K., Lu, J., Lin, C., Tsui C & Lin, V. (2022). Solid- and vapour-phase antifungal activities of six essential oils and their applications in postharvest fungal control of peach (*Prunus persica* L. Batsch). *LWT- Food Science & Technology*, 156, 113031. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.113031>
- Llanos, J. H., Avezum, L., Dacanal, G. C., & Tadini, C. C. (2021). Increase in the physical performance of nanostructured starch/chitosan blends with montmorillonite.



- Colloid and Polymer Science*, 299, 1901-1915. <https://doi.org/10.1007/s00396-021-04907-5>
- Long, H., Bi, Y., Pu, L., Xu, W., Xue, H., Fu, G., & Prusky, D. (2022). Preparation of chitosan/fennel seed essential oil/starch sodium octenyl succinate composite films for apple fruit preservation. *LWT*, 167, 113826. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113826>
- López-Mendoza, J., Adriano-Anaya, L., Gálvez-López, D., & Vázquez-Ovando, A. (2023). Compuestos bioactivos en quesos: biosíntesis, actividad biológica y contribución de las bacterias ácido lácticas. *Agronomía Mesoamericana*, 51432-51432. <https://doi.org/10.15517/am.v34i2.51432>
- Lu, W., Chen, M., Cheng, M., Yan, X., Zhang, R., Kong, R., Wang J & Wang, X. (2021). Development of antioxidant and antimicrobial bioactive films based on Oregano essential oil/mesoporous nano-silica/sodium alginate. *Food Packaging and Shelf Life*, 29, 100691. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100691>
- Lu, Z., Zhang, T., Yang, J., Wang, J., Shen, J., Wang, X., Xiao, Z., Niu, Y., Liu, G & Zhang, X. (2020). Effect of mesoporous silica nanoparticles-based nano-fragrance on the central nervous system. *Engineering in Life Sciences*, 20(11), 535-540. <https://doi.org/10.1002/elsc.202000015>
- Lucera, A., Mastromatteo, M., Conte, A., Zambrini, V., Faccia, L., & Del Nobile, A. (2014). Effect of active coating on microbiological and sensory properties of fresh mozzarella cheese. *Food Packaging and Shelf Life*, (1), 25-29. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2013.10.002>
- Luo, M., Cao, Y., Wang, W., Chen, X., Cai, J., Wang, L., & Xiao, J. (2019). Sustained-release antimicrobial gelatin film: Effect of chia mucilage on physicochemical and antimicrobial properties. *Food Hydrocolloids*, 87, 783-791. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.09.010>
- Ma, K., Zhe, T., Li, F., Zhang, Y., Yu, M., Li, R., & Wang, L. (2022). Sustainable films containing AIE-active berberine-based nanoparticles: A promising antibacterial food packaging. *Food Hydrocolloids*, 123, 107147. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107147>
- Mahajan, N., & Gupta, P. (2015). New insights into the microbial degradation of polyurethanes. *RSC Advances*, 5(52), 41839-41854. DOI: 10.1039/C5RA04589D
- Malekzadeh, E., Tatari, A., & Firouzabadi, M. D. (2023). Preparation, characteristics, and soil-biodegradable analysis of corn starch/nanofibrillated cellulose (CS/NFC) and corn starch/nanofibrillated lignocellulose (CS/NFLC) films. *Carbohydrate Polymers*, 309, 120699. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120699>
- Maran, J. P., Sivakumar, V., Thirugnanasambandham, K., & Sridhar, R. (2014). Degradation behavior of biocomposites based on cassava starch buried under indoor soil conditions. *Carbohydrate Polymers*, 101, 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.080>

- Martău, A., Mihai, M., & Vodnar, C. (2019). The use of chitosan, alginate, and pectin in the biomedical and food sector—biocompatibility, bioadhesiveness, and biodegradability *Polymers*, 11(11), 1837. <https://doi.org/10.3390/polym11111837>
- Martinez-Munoz, P. E., Martinez-Hernandez, H. D., Rojas-Beltran, C. F., Perez-Ospina, J. L., & Rodriguez-Garcia, M. E. (2022). Development of a differential photoacoustic system for the determination of the effective water diffusion and water vapor permeability coefficients in thin films. *Journal of Applied Physics*, 132(11), 115111. <https://doi.org/10.1063/5.0088319>
- Marvdashti, M., Yavarmanesh, M., & Koocheki, A. (2019). Controlled release of nisin from polyvinyl alcohol-Alyssum homolocarpum seed gum composite films: Nisin kinetics. *Food Bioscience*, 28, 133-139. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.01.010>
- Mastromatteo, M., Conte, A., Faccia, M., Del Nobile, A., & Zambrini, V. (2014). Combined effect of active coating and modified atmosphere packaging on prolonging the shelf life of low-moisture Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 97(1), 36-45. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6999>
- Matos, M., Laca, A., Rea, F., Iglesias, O., Rayner, M., & Gutiérrez, G. (2018). O/W emulsions stabilized by OSA-modified starch granules versus non-ionic surfactant: Stability, rheological behaviour and resveratrol encapsulation. *Journal of Food Engineering*, 222, 207-217. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.11.009>
- Maurya, A., Prasad, J., Das, S., & Dwivedy, A. K. (2021). Essential oils and their application in food safety. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 653420. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.653420>
- Meena, S., Tripathi, A. D., & Ts, R. L. (2020). Optimization and characterization of Alginic acid synthesized from a novel strain of *Pseudomonas stutzeri*. *Biotechnology Reports*, 27, e00517. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00517>
- Merchán, N., Pineda, L., Cárdenas, A., González, N., Otálora, M., & Sánchez, Y. (2019). Microorganismos comúnmente reportados como causantes de enfermedades transmitidas por el queso fresco en las Américas, 2007-2016. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 56(1). Recuperado de <http://www.revepidemiologia.sld.cu/index.php/hie/article/view/171>
- Miles, A. A., Misra, S. S., & Irwin, J. O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Epidemiology & Infection*, 38(6), 732-749. DOI: <https://doi.org/10.1017/S002217240001158X>
- Mittal, A., Garg, S., & Bajpai, S. (2020). Fabrication and characteristics of poly (vinyl alcohol)-starch-cellulosic material based biodegradable composite film for packaging application. *Materials today: proceedings*, 21, 1577-1582. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.11.210>
- Mohamed, S. A., El-Sakhawy, M., & El-Sakhawy, M. A. M. (2020). Polysaccharides, protein and lipid-based natural edible films in food packaging: A review.

*Carbohydrate Polymers*, 238, 116178.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116178>

Molina-Hernández, B., Echeverri-Castro, A., Martínez-Correa, A., & Andrade-Mahecha, M. (2020). Edible coating based on achira starch containing garlic/oregano oils to extend the shelf life of double cream cheese. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 73(1), 9099-9108.

Nga, N. T. H., Ngoc, T. T. B., Trinh, N. T. M., Thuoc, T. L., & Thao, D. T. P. (2020). Optimization and application of MTT assay in determining density of suspension cells. *Analytical Biochemistry*, 610, 113937.  
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113937>

Nguyen, D. M., Do, T. V. V., Grillet, A. C., Thuc, H. H., & Thuc, C. N. H. (2016). Biodegradability of polymer film based on low density polyethylene and cassava starch. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 115, 257-265.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.09.004>

Norma Mexicana NMX-AA-042-SCFI-2015 - Enumeración de organismos coliformes totales, organismos coliformes fecales (termotolerantes) y *Escherichia coli* – método del número más probable en tubos múltiples.

Norma Mexicana NMX-F-754-COFOCALEC-2015. Sistema producto leche-alimentos-lácteos-queso crema y queso doble crema-denominación, especificaciones y métodos de prueba.

NORMA Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

NORMA Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la determinación de Salmonella en alimentos.

Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1995. Método de prueba microbiológico para alimentos, determinación de *Listeria monocytogenes*.

Norma Oficial Mexicana NOM-223-SCFI/SAGARPA-2018, Queso-Denominación, especificaciones, información comercial y métodos de prueba.

Ocampo-Ibáñez, D., González, C., Moreno, L., Calderón, C., Flórez-Elvira, J., Olaya, B., Rivera-Sánchez, P. & Lesmes, C. (2019). Presencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos artesanales comercializados en Cali-Colombia. *Acta Agronómica*, 68(2), 108-114. <https://doi.org/10.15446/acag.v68n2.77185>

Olivo, M., Da Silva Scapim, R., Miazaki, J., Madrona, S., Maia, F., Rodríguez, B. M., & Dos Santos Pozza, S. (2020). Sodium alginate with turmeric coating for ripened cheeses. *Journal of Food Science & Technology*, 57(6), 2364-2369.  
<https://doi.org/10.1007/s13197-020-04438-x>

- Olmedo, H., Nepote, V., & Grosso, R. (2013). Preservation of sensory and chemical properties in flavoured cheese prepared with cream cheese base using oregano and rosemary essential oils. *LWT-Food Science & Technology*, 53(2), 409-417. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.04.007>
- Omar-Aziz, M., Khodaiyan, F., Yarmand, S., Mousavi, M., Gharaghani, M., Kennedy, F., & Hosseini, S. (2021). Combined effects of octenylsuccination and beeswax on pullulan films: Water-resistant and mechanical properties. *Carbohydrate Polymers*. 255, 117471. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117471>
- Ordoñez, R., Contreras, C., González-Martínez, C., & Chiralt, A. (2021). Edible coatings controlling mass loss and *Penicillium roqueforti* growth during cheese ripening. *Journal of Food Engineering*, 290, 110174. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110174>
- Ore Y., Pichilingue R., & Valderrama Negrón, C. (2020). Extracción y caracterización del alginato de sodio de la macroalga *Macrocystis pyrifera*. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 86(3), 276-287. <http://dx.doi.org/10.37761/rsqp.v86i3.300>
- Pandia-Estrada, S., Romero-Santivañez, R., Céspedes-Chombo, R., & Solari-Godiño, A. (2021). Películas comestibles a base de gelatina obtenida de piel de mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) y extracto de orégano: Características fisicoquímicas, antimicrobianas, estructurales y de superficie. *Scientia Agropecuaria*, 12(2), 229-237. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.026>
- Pantelic, B., Ponjavic, M., Jankovic, V., Aleksic, I., Stevanovic, S., Murray, J., Fournet, M.B. & Nikodinovic-Runic, J. (2021). Upcycling biodegradable PVA/starch film to a bacterial biopigment and biopolymer. *Polymers*, 13(21), 3692. <https://doi.org/10.3390/polym13213692>
- Pereda, M., Amica, G., Rácz, I., & Marcovich, N. E. (2011). Structure and properties of nanocomposite films based on sodium caseinate and nanocellulose fibers. *Journal of Food Engineering*, 103(1), 76-83. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.10.001>
- Pereira, L., & Cotas, J. (2020). Introductory chapter: Alginates-A general overview. *Alginates-Recent Uses of This Natural Polymer*
- Perveen, K., Alabdulkarim, B., & Arzoo, S. (2011). Effect of temperature on shelf life, chemical and microbial properties of cream cheese. *African Journal of Biotechnology*, 10(74), 16924-16928. DOI: 10.5897/AJB11.1695
- Pirsa, S., Karimi Sani, I., Pirouzifard, K., & Erfani, A. (2020). Smart film based on chitosan/*Melissa officinalis* essences/pomegranate peel extract to detect cream cheeses spoilage. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 37(4), 634-648. <https://doi.org/10.1080/19440049.2020.1716079>
- Pluta-Kubica, A., Jamróz, E., Kawecka, A., Juszczak, L., & Krzyściak, P. (2020). Active edible furcellaran/whey protein films with yerba mate and white tea extracts: Preparation, characterization and its application to fresh soft rennet-curd cheese.

- International Journal of Biological Macromolecules*, 155, 1307-1316.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.102>
- Pombo, A. F. W. (2021). Cream cheese: Historical, manufacturing, and physico-chemical aspects. *International Dairy Journal*, 117, 104948.  
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104948>
- Priyadarshi, R., Roy, S., Ghosh, T., Biswas, D. & Rhim, J. W. (2021). Antimicrobial nanofillers reinforced biopolymer composite films for active food packaging applications-a review. *Sustainable Materials and Technologies* e00353.  
<https://doi.org/10.1016/j.susmat.2021.e00353>
- Rathod, N. B., Kulawik, P., Ozogul, F., Regenstein, J. M., & Ozogul, Y. (2021). Biological activity of plant-based carvacrol and thymol and their impact on human health and food quality. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 733-748.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.08.023>
- Rawdkuen, S. (2019). Edible films incorporated with active compounds: Their properties and application. *Active Antimicrobial Food Packaging; Isl, V., Uzunlu, S., Eds*, 71-85.
- Remedio, N., dos Santos, S., Maciel, V., Yoshida, P., & de Carvalho, A. (2019). Characterization of active chitosan films as a vehicle of potassium sorbate or nisin antimicrobial agents. *Food Hydrocolloids*, 87, 830-838.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.09.012>
- Requena, R., Vargas, M., & Chiralt, A. (2019). Study of the potential synergistic antibacterial activity of essential oil components using the thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay. *LWT-Food Science & Technology*, 101, 183-190.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.093>
- Reyes-Jurado, F., Navarro-Cruz, A. R., Ochoa-Velasco, C. E., Palou, E., López-Malo, A., & Ávila-Sosa, R. (2020). Essential oils in vapor phase as alternative antimicrobials: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(10), 1641-1650. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1586641>
- Ríos-de-Benito, F., Escamilla-García, M., García-Almendárez, B., Amaro-Reyes, A., Di Pierro, P., & Regalado-González, C. (2021). Design of an Active Edible Coating Based on Sodium Caseinate, Chitosan and Oregano Essential Oil Reinforced with Silica Particles and Its Application on Panela Cheese. *Coatings*, 11(10), 1212.  
<https://doi.org/10.3390/coatings11101212>
- Rodríguez-Auad, J. P. (2018). Panorama de la infección por *Listeria monocytogenes*. *Revista Chilena de Infectología*, 35(6), 649-657. Recuperado de: [scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v35n6/0716-1018-rci-35-06-0649.pdf](https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v35n6/0716-1018-rci-35-06-0649.pdf)
- Rodríguez-Jerez, J. J. (2022). La vulnerabilidad del queso fresco. Consumer-Erosky. Disponible en: <https://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/la-vulnerabilidad-del-queso-fresco.html>. Accedido el 9 de julio de 2023.

- Roy, V. C., Ho, T. C., Lee, H. J., Park, J. S., Nam, S. Y., Lee, H., Getachew, A. T., & Chun, B. S. (2021). Extraction of astaxanthin using ultrasound-assisted natural deep eutectic solvents from shrimp wastes and its application in bioactive films. *Journal of Cleaner Production*, 284, 125417. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.125417>
- Ruamcharoen, J., Munlee, R., & Ruamcharoen, P. (2020). Improvement of water vapor barrier and mechanical properties of sago starch-kaolinite nanocomposites. *Polymer Composites*, 41(1), 201-209. <https://doi.org/10.1002/pc.25360>
- Sánchez-Zamora, N., Cepeda-Rizo, M. D., Tamez-Garza, K. L., Rodríguez-Romero, B. A., Sinagawa-García, S. R., Luna Maldonado, A. I., Flores-Girón & Méndez-Zamora, G. (2022). Oregano essential oil in panela-type cheese: its effects on physicochemical, texture and sensory parameters. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 13(1), 258-271. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v13i1.5567>
- Sánchez-Valdés, J. J., Colín-Navarro, V., López-González, F., Avilés-Nova, F., Castelán-Ortega, O. A., & Estrada-Flores, J. G. (2016). Diagnóstico de la calidad sanitaria en las queserías artesanales del municipio de Zacazonapan, Estado de México. *Salud Pública de México*, 58(4), 461-467. <https://doi.org/10.21149/spm.v58i4.8027>
- Sarikurkcü, C., Zengin, G., Oskay, M., Uysal, S., Ceylan, R., & Aktumsek, A. (2015). Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *origanum vulgare* subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils. *Industrial Crops and Products*, 70, 178-184. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.030>
- Sauceda, E. N. R. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai: Revista Científica de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sostenible*, 7(1), 153-170. ISSN: 1665-0441
- Seydim, A. C., Sarikus-Tutal, G. & Sogut, E. (2020). Effect of whey protein edible films containing plant essential oils on microbial inactivation of sliced Kasar cheese. *Food Packaging Shelf Life*, 26, 100567. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100567>
- Shahrampour, D., Khomeiri, M., Razavi, A., & Kashiri, M. (2020). Development and characterization of alginate/pectin edible films containing *Lactobacillus plantarum* KMC 45. *LWT-Food Science & Technology*, 118, 108758. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108758>
- Sid, S., Mor, S., Kishore, A., & Sharanagat, S. (2021). Bio-sourced polymers as alternatives to conventional food packaging materials: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 115, 87-104. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.026>
- Silva, P., Ribeiro, C., Teixeira, A., & Silva, C. (2022). Application of an alginate-based edible coating with bacteriocin-producing *Lactococcus* strains in fresh cheese preservation. *LWT-Food Science & Technology*, 153, 112486. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112486>

- Singh, P., Kaur, G., Singh, A., & Kaur, P. (2023). Starch based bio-nanocomposite films reinforced with montmorillonite and lemongrass oil nanoemulsion: development, characterization and biodegradability. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17(1), 527-545. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01635-4>
- Slavutsky, A. M., & Bertuzzi, M. A. (2014). Water barrier properties of starch films reinforced with cellulose nanocrystals obtained from sugarcane bagasse. *Carbohydrate polymers*, 110, 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.049>
- Solano-Doblado, L., Alamilla-Beltrán, L., & Jiménez-Martínez, C. (2018). Películas y recubrimientos comestibles funcionalizados. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 21. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.153>
- Sousa, V. I., Parente, J. F., Marques, J. F., Forte, M. A., & Tavares, C. J. (2022). Microencapsulation of essential oils: A review. *Polymers*, 14(9), 1730. <https://doi.org/10.3390/polym14091730>
- Sreekumar, K., & Bindhu, B. (2020). Alginic acid: A potential biopolymer from brown algae. *Materials International*, 2, 433-438. <https://doi.org/10.33263/Materials23.433438>
- Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A (2018). Tetrazolium salts and formazan products in cell biology: viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica*, 120(3):159-167. doi: 10.1016/j.acthis.2018.02.005.
- Sun, Y., Zhang, M., Bhandari, B., & Bai, B. (2021). Fennel essential oil loaded porous starch-based microencapsulation as an efficient delivery system for the quality improvement of ground pork. *International Journal of Biological Macromolecules*, 172, 464-474. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.090>
- Surber, G., Spiegel, T., Dang, B. P., Pombo, A. W., Rohm, H., & Jaros, D. (2021). Cream cheese made with exopolysaccharide-producing *Lactococcus lactis*: Impact of strain and curd homogenization pressure on texture and syneresis. *Journal of Food Engineering*, 308, 110664. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110664>
- Tai, N. L., Adhikari, R., Shanks, R., & Adhikari, B. (2019). Aerobic biodegradation of starch–polyurethane flexible films under soil burial condition: Changes in physical structure and chemical composition. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 145, 104793. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104793>
- Talón, E., Vargas, M., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2019). Antioxidant starch-based films with encapsulated eugenol. Application to sunflower oil preservation. *LWT-Food Science & Technology*, 113, 108290. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108290>
- Tessaro, L., Luciano, C. G., Bittante, A. M. Q. B., Lourenço, R. V., Martelli-Tosi, M., & do Amaral Sobral, P. J. (2021). Gelatin and/or chitosan-based films activated with “Pitanga” (*Eugenia uniflora* L.) leaf hydroethanolic extract encapsulated in double

- emulsion. *Food Hydrocolloids*, 113, 106523.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106523>
- Thakur, R., Pristijono, P., Scarlett, J., Bowyer, M., Singh, P., & Vuong, V. (2019). Starch-based films: Major factors affecting their properties. *International Journal Biological Macromolecules*, 132, 1079-1089.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.190>
- Tohidi, B., Rahimmalek, M., & Trindade, H. (2019). Review on essential oil, extracts composition, molecular and phytochemical properties of Thymus species in Iran. *Industrial Crops and Products*, 134, 89-99.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.038>
- Torres, O., Galeano, Y., & Lema, M. (2021). Effect of incorporating extracts from natural pigments in alginate/starch films. *Journal of Materials Research and Technology*, 13, 2239-2250. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.05.091>
- Trujillo-Hernández, C. A., Juárez-López, A. L., Solorza-Feria, J., Toribio-Jiménez, J., García-Ibáñez, S., Lorenzo-Santiago, M. A., & Rendón-Villalobos, J. R. (2021). Preparation and biodegradation analysis of starch films reinforced with coconut bagasse cellulose (*Cocos nucifera* L.). *International Journal of Applied Environmental Sciences*, 16(1), 1-12.
- Umaraw, P., Munekata, P. E., Verma, A. K., Barba, F. J., Singh, V. P., Kumar, P., & Lorenzo, J. M. (2020). Edible films/coating with tailored properties for active packaging of meat, fish and derived products. *Trends in Food Science & Technology*, 98, 10-24. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.032>
- UNE. 1984. Norma Española 40-080: Determinación de coordenadas cromáticas CIE. Madrid, IRANOR.
- Ventura, M., Millones, E., Auquiñivin, A., Vásquez, R. & Tafur, R. (2011). Evaluación del rendimiento y la acción conservante en carne de cerdo del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) cultivado en seis zonas altoandinas de Amazonas. *Aporte Santiaguino*, 4(2), 185-194. <https://doi.org/10.32911/as.2011.v4.n2.544>
- Wang, Q., Yu, H., Tian, B., Jiang, B., Xu, J., Li, D., Feng, Z., & Liu, C. (2019). Novel edible coating with antioxidant and antimicrobial activities based on whey protein isolate nanofibrils and carvacrol and its application on fresh-cut cheese. *Coatings*, 9(9), 583. <https://doi.org/10.3390/coatings9090583>
- Xiao, Z., Bao, H., Jia, S., Bao, Y., Niu, Y., & Kou, X. (2021). Organic Hollow Mesoporous Silica as a Promising Sandalwood Essential Oil Carrier. *Molecules*, 26(9), 2744. <https://doi.org/10.3390/molecules26092744>
- Yabur., Bashan Y. & Hernández-Carmona G. (2007). Alginate from the macroalgae *Sargassum Sinicola* as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth Promotion. *Journal of Applied Phycology*. 19(1), 43- 53. Doi:10.1007/s10811-006-9109-8



- Yan, X., Cheng, M., Zhao, P., Wang, Y., Chen, M., Wang, X., & Wang, J. (2022). Fabrication and characterization of oxidized esterified tapioca starch films encapsulating oregano essential oil with mesoporous nanosilica. *Industrial Crops and Products*, 184, 115033. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115033>
- Yang, M., Shi, J., & Xia, Y. (2018). Effect of SiO<sub>2</sub>, PVA and glycerol concentrations on chemical and mechanical properties of alginate-based films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 2686-2694. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.162>
- Youssef, A. M., El-Sayed, S. M., El-Sayed, H. S., Salama, H. H., & Dufresne, A. (2016). Enhancement of Egyptian soft white cheese shelf life using a novel chitosan/carboxymethyl cellulose/zinc oxide bionanocomposite film. *Carbohydrate Polymers*, 151, 9-19. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.023>
- Youssef, A. M., El-Sayed, S. M., El-Sayed, H. S., Salama, H. H., Assem, F. M., & Abd El-Salam, M. H. (2018). Novel bionanocomposite materials used for packaging skimmed milk acid coagulated cheese (Karish). *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 1002-1011. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.165>
- Zhang, R., Cheng, M., Wang, X., & Wang, J. (2019). Bioactive mesoporous nanosilica/potato starch films against molds commonly found in post-harvest white mushrooms. *Food Hydrocolloids*, 95, 517-525. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.060>
- Zhang, L., Zhang, Z., Chen, Y., Ma, X., & Xia, M. (2021). Chitosan and procyanidin composite films with high antioxidant activity and pH responsivity for cheese packaging. *Food Chemistry*, 338, 128013. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128013>
- Zheng, X., Shi, X., & Wang, B. (2021). A review on the general cheese processing technology, flavor biochemical pathways and the influence of yeasts in cheese. *Frontiers in Microbiology*, 12, 703284. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.703284>
- Zhong, Y., Cavender, G. & Zhao, Y. (2014). Investigation of different coating application methods on the performance of edible coatings on Mozzarella cheese. *LWT Food Science & Technology*, 56(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.11.006>
- Zhu, F. (2017). Encapsulation and delivery of food ingredients using starch-based systems. *Food Chemistry* 229, 542–552. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.101>

## Anexo 1 Carta de consentimiento informado

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
Posgrado de Alimentos, Facultad de Química  
Carta Consentimiento

Fecha de aplicación: \_\_\_\_\_

Boleta No. \_\_\_\_\_

Nombre: \_\_\_\_\_

**Título del proyecto:** “Desarrollo de una película activa basada en almidón modificado y alginato de sodio con aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) aplicada en queso crema”.

**Sede donde se realizará el estudio:** Laboratorio de análisis sensorial. Parque biotecnológico, Facultad de Química.

**Tiempo de duración del estudio:** 30 minutos

**Investigador responsable:** Dr. Carlos Regalado González

**Nombre del evaluador:** Yessica Viviana Galeano Loaiza

### Invitación

La invitación a los voluntarios de realizar la evaluación del queso crema se hará por medio de posters y redes sociales.

Los siguientes apartados muestran información importante acerca del proyecto de investigación, con el fin de dar a conocer y comprender el alcance del mismo. A los participantes se les invitará a que aclaren sus dudas para que una vez que se haya comprendido el objetivo y el alcance del estudio, y si desea participar, entonces se le proceda a firmar el consentimiento informado, del cual se le entregará una copia firmada.

## **I. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

En la actualidad, el queso crema es un tipo de queso fresco, el cuál cada año representa un crecimiento económico, debido a su aumento en la demanda. Sin embargo, presenta una vida de anaquel corta y es susceptible a la contaminación por bacterias y hongos, a causa de su contenido en grasa y alta humedad. Por lo cual, es un producto que requiere de alternativas para mejorar sus condiciones de vida útil. Por consiguiente, el uso de películas activas surge como una alternativa para mitigar esta problemática.

## **II. OBJETIVOS DEL ESTUDIO**

Este trabajo de investigación propone desarrollar una película activa con aceite esencial de orégano en partículas de sílice mesoporoso aplicado en queso crema, para evaluar sensorialmente la aceptabilidad del producto.

## **III. BENEFICIOS DEL ESTUDIO**

Con este estudio se obtendrá información relevante sobre la aceptabilidad y preferencia del queso crema con la aplicación de la película desarrollada.

## **IV. CRITERIOS DE RECLUTAMIENTO**

En el estudio se incluirán 70 panelistas entre 20 - 40 años, hombres y mujeres de la comunidad estudiantil de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro que sean consumidores de queso crema. Se excluirán a aquellas personas que presenten alguna alergia al queso o al aceite esencial de orégano o que tengan alguna enfermedad que modifique su percepción del sabor, presenten alergias o se encuentren bajo algún tratamiento médico.

## **V. PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO**

En contenedores blancos debidamente etiquetados se colocarán aproximadamente 2.0 – 2.5 g de cada muestra de queso fresco en rebanadas; estas muestras se presentarán a los evaluadores de manera aleatoria junto con trozos de galleta

neutra; además se les proporcionará un vaso con agua potable para poder limpiar su paladar entre cada evaluación. Las muestras serán evaluadas y clasificadas en una escala hedónica de 9 puntos en donde 9 será me agrada muchísimo, 8 Me agrada mucho, 7 Me agrada, 6 Me agrada levemente, 5 no me gusta ni me disgusta, 4 me disgusta levemente, 3 me disgusta, 2 me disgusta mucho y 1 me disgusta muchísimo. Se pedirá que registren su nivel de aceptabilidad para cada una de las muestras. El tiempo de la prueba no excederá 30 minutos. Una vez realizada esa prueba se les solicitará indiquen cual muestra prefieren.

### **Tratamiento de los datos**

Los datos proporcionados por los panelistas serán recolectados en un formato proporcionado por el investigador, serán enumeradas por el número de participante para mantener un control de los datos y serán evaluados mediante una configuración de consenso para elegir la muestra de mayor preferencia.

## **VI. RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO**

Alergias al producto o a los componentes de la formulación de la película.

Atoramiento de las muestras al momento de degustarlas.

Se garantizará que las muestras de queso crema tengan características de calidad fisicoquímica y microbiológica necesarias para no generar ningún riesgo a la salud. Sin embargo, si al momento del análisis algún participante presenta algún malestar será excluido de la evaluación y se prestará ayuda médica en el módulo de atención médica de la Universidad Autónoma de Querétaro FarmaUAQ.

## **VII. ACLARACIONES**

La decisión de participar es completamente voluntaria.

No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted en caso de no aceptar la invitación. Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, pudiendo informar o no las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.

No recibirá beneficio económico por su participación en el estudio.

En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo al investigador responsable.

La información obtenida en este estudio será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigación. Así mismo, los datos de identificación del participante serán confidenciales.

En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario no previsto, se le proporcionará el cuidado médico apropiado por el módulo de atención médica de la UAQ FarmaUAQ, siempre que estos efectos sean consecuencia de la participación en el estudio.

En caso de que usted presente un comportamiento indebido hacia los participantes del estudio y aplicadores del mismo, así como falta de acatamiento a las reglas en el procedimiento de la evaluación sensorial, se le retirará del estudio.

## **VIII. INFORMACIÓN DEL CONTACTO**

Si tiene alguna pregunta acerca de su participación en el estudio, llame al número (+52) 771 139 4083 perteneciente a la estudiante de maestría en Ciencia y Tecnología de alimentos Yessica Viviana Galeano Loaiza.

## **IX. CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Yo, \_\_\_\_\_, he sido invitado a participar en la evaluación sensorial de UN PRODUCTO QUESO CREMA. Con un tiempo de duración de aproximadamente de 30 minutos. Entiendo que participaré en una prueba sensorial hedónica para evaluar el grado de aceptación del producto y medir la preferencia. He sido informado de la naturaleza del producto. Sé que puede que no haya beneficios para mi persona y que no se me recompensará económicamente. Se me ha proporcionado el nombre del investigador y los datos para que fácilmente lo pueda contactar y se me garantiza que mis datos de identificación serán confidenciales. En caso de presentar algún efecto adverso, se me proporcionará el cuidado médico apropiado FarmaUAQ. Así mismo, he leído la información proporcionada y he tenido la oportunidad de preguntar acerca de ella, a lo cual se me ha contestado a entera satisfacción. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos.

Consiento voluntariamente participar en esta investigación como participante y entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento sin que me afecte en ninguna manera mi persona.

**Nombre del Participante:** \_\_\_\_\_

**Firma del Participante:** \_\_\_\_\_

**Fecha (Día/mes/año):** \_\_\_\_\_

He explicado al Sr (a) \_\_\_\_\_ la naturaleza y los propósitos de la investigación, describiendo los riesgos y beneficios que implican su participación. He contestado todas las preguntas y he preguntado si tiene alguna duda sobre el estudio. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar la investigación con seres humanos y me apego a ella. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas se procedió a firmar el presente documento.

\_\_\_\_\_

**Firma del investigador Fecha de la firma.**

## REVOCACIÓN CONSENTIMIENTO INFORMADO

Mediante el presente documento declaro la revocación del consentimiento informado firmado el día \_\_\_\_\_ en el que consentí mi participación en el proyecto titulado: \_\_\_\_\_

---

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma

## Anexo 2 Formato de evaluación sensorial

Nombre: \_\_\_\_\_ Género: \_\_\_\_\_

Frente a usted se presentan cuatro muestras de queso crema en rebanadas. Por favor, observe y pruebe cada una de ellas. Indique el grado en el que le gusta o le disgusta cada atributo de cada muestra, de acuerdo con la clasificación/categoría, escribiendo el número correspondiente en la línea del código de la muestra

<b>CALIFICACIÓN</b>	<b>CATEGORIA</b>
9	Me gusta muchísimo
8	Me gusta mucho
7	Me gusta moderadamente
6	Me gusta levemente
5	Me es indiferente
4	Me disgusta levemente
3	Me disgusta moderadamente
2	Me disgusta mucho
1	Me disgusta extremadamente

<b>ATRIBUTO/ MUESTRA</b>	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
Color				
Olor				
Textura				
Sabor				
Aceptación general				

Observaciones:

---

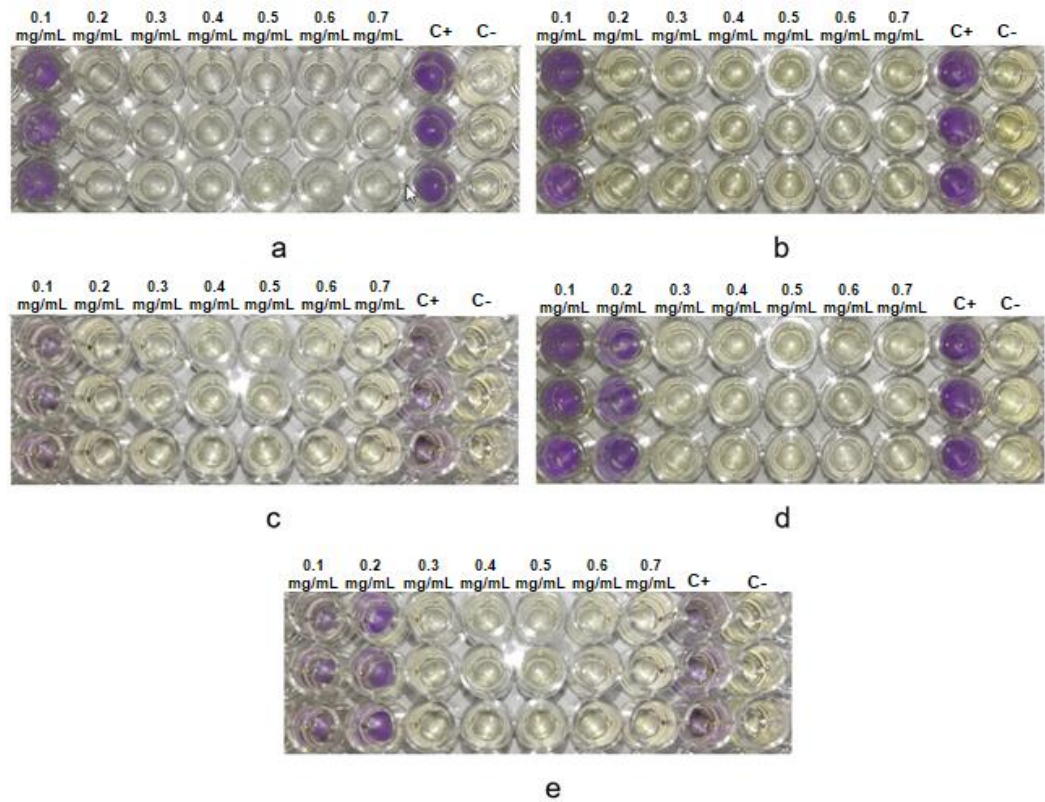
---

---

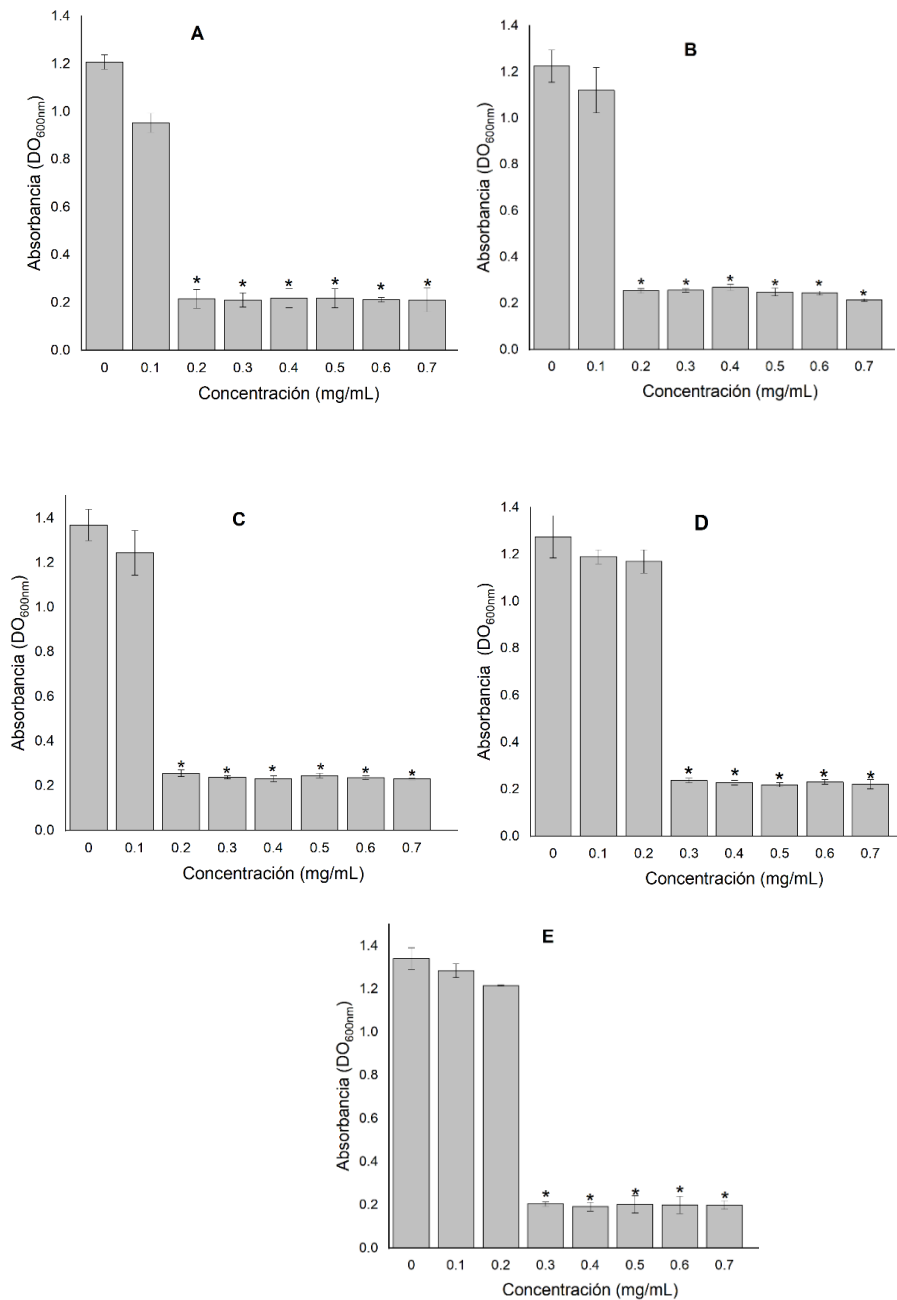
MUCHAS GRACIAS



**Anexo 3. Figuras del ensayo MTT y efecto de las concentraciones de AEO-NSM frente a bacterias deterioradoras y patógenas**



**Figura A1.** Ensayo MTT de las diferentes concentraciones de AEO-NSM evaluadas frente a las cepas bacterianas: a) *S. stipitis*, b) *L. mesenteroides*, c) *L. innocua*, d) *S. aureus* y e) *S. Typhimurium*. C+ (control positivo) C- (control negativo)



**Figura A2.** Efecto de las concentraciones de AEO-NSM evaluadas frente a la levadura *S. stipitis* y las cepas bacterianas: *L. mesenteroides*, *L. innocua*, *S. aureus* y *S. Typhimurium*. Nota: El asterisco (\*) indica diferencias significativas (valor de  $p < 0.05$ ) de los tratamientos en comparación con el control *positivo* (bacterias con caldo nutritivo). A) *S. stipitis*, B) *L. mesenteroides*, C) *L. innocua*, D) *S. aureus* y E) *S. Typhimurium*.