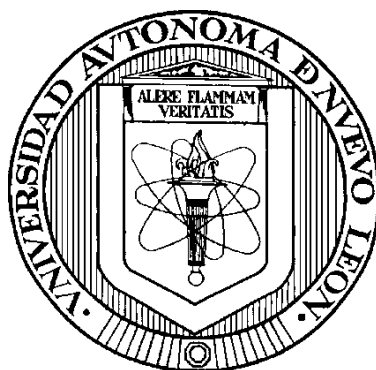


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**CUBIERTA BIOPOLIMÉRICA DE NANOINGREDIENTES A  
BASE DE *Thymus vulgaris* CON POTENCIAL APLICACIÓN EN  
PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS.**

**POR**

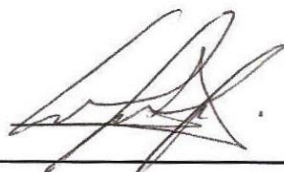
**Q.C.B. BARBARA JOHANA GONZÁLEZ MORENO**

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS con  
Orientación en Química Biomédica.

**JULIO 2020**

**CUBIERTA BIOPOLIMÉRICA DE NANOINGREDIENTES A BASE DE *Thymus vulgaris*  
CON POTENCIAL APLICACIÓN EN PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS.**

**Aprobación de la tesis:**



---

**Dra. C. Rocío Álvarez Román**

**Directora de Tesis**



---

**Dr. C. Sergio Arturo Galindo Rodríguez**

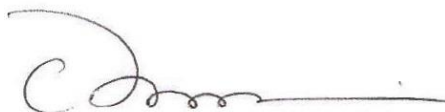
**Co-Director de Tesis**



---

**Dr. C. Luis Alejandro Pérez López**

**Miembro de la Comisión**



---

**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez**

**Subdirector de Estudios de Posgrado**

## DEDICATORIA

Todos mis logros son siempre para ustedes, mis padres:

Leticia y José.

*“Debemos tener constancia y sobre todo confianza en nosotros mismos.*

*Debemos creer que estamos dotados para algo”.*

*-Marie Curie.*

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, a la vida, al universo. Por seguirme bendiciendo con más años de vida, haciendo lo que más me gusta, a lado de las personas que más quiero. Por ponerme exactamente donde debo estar, por guiarme y ayudarme de todas las formas posibles mediante aprendizajes, situaciones y personas a superar todos los obstáculos y así poder cumplir una meta más. Porque a pesar de la pandemia, pude terminar este escrito como estaba planeado.

A mis padres, que desde mi nacimiento se han encargado de guiarme, ayudarme y quererme a su manera tan especial. A mi madre Leticia Moreno, que a pesar de mis días tan difíciles, su paciencia infinita y su amor incondicional han estado presentes desde el 95. Porque siempre estás conmigo, sin importar nada. Mi mejor ejemplo en todos los aspectos, mi guía, mi tesoro, espero que nunca me faltes.

A mi padre José González, que de una u otra forma me ha ayudado siempre, quién me ha enseñado que tipo de persona quiero ser, quien me ayuda a recordar quién soy y hacia dónde voy.

Mis hermanos, Evelyn y José. Mis acompañantes en este lapso de espacio y tiempo, llamado vida. Quienes son tan diferentes a mí pero a la vez tan similares. Son un gran ejemplo para mí, gracias por tolerarme, quererme y seguir siempre mis bromas. Mis preciosos sobrinos, Bastian y Thiago, quienes me inspiran a ser siempre mejor persona y que me alegran el día aun cuando este va mal.

A la Doctora Rocío Álvarez, quién volvió a confiar en mí, siendo mi directora de tesis. Gracias infinitas. Gracias por su apoyo, su valioso tiempo, sus enseñanzas, su paciencia y su amabilidad. Por permitirme estar en su grupo de trabajo y en su laboratorio, por guiarme académicamente y ser un gran ejemplo profesional y de vida para mí. Por formar parte de este logro cumplido.

Al Doctor Sergio Galindo, por también contribuir en la ampliación de mis conocimientos, por recibirme en su grupo de trabajo y por el apoyo brindado en el escrito de este trabajo.

Al Doctor Alejandro Pérez, quien también es para mí un gran ejemplo profesional, muchas gracias por compartir sus conocimientos, su tiempo y su paciencia. Así como también contribuir en el escrito de este trabajo.

A mis compañeros del cubículo Juan, Denisse y Gerardo, quienes se convirtieron en grandes amigos y colegas, quienes estuvieron conmigo en mis risas, llantos, enojos y logros.

A Yaz Solís, a quien puedo llamar amiga, en toda la extensión de la palabra. Muchas gracias por tu tiempo y tu apoyo. Por estar conmigo en los días más difíciles, por bromear conmigo, por alimentarme, por ser tan buena persona. Ya no hacen personas como tú.

A uno de mis mejores amigos, Eduardo Zul, quien también ha estado conmigo apoyándome con su amistad y haciéndome siempre reír, agradezco a la vida por haberme cruzado nuevamente con alguien tan brillante y tan humano como tú.

A mi compañero de generación, mi amigo y mi hermano, Adrián Leyva. Una de las mejores personas que conozco, el mejor médico y mi mejor amigo. Muchas gracias por tu apoyo y tu tiempo, por recordarme el significado de la palabra amistad. Eres el mejor.

A mi mejor amiga Mariana Estrella. Gracias por siempre escucharme, y tener la mayoría del tiempo las palabras correctas y exactas para mí. Porque has estado siempre conmigo y hemos podido compartir esta amistad desde el 2009. Gracias por todas las risas, las anécdotas y todas las historias que tenemos para contar, y que estoy segura vendrán más. Eres muy importante en mi vida.

En fin, a todas las personas que contribuyeron directa o indirectamente durante estos dos años. GRACIAS.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado durante la maestría, con el no. de becario 725423 y al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica por los fondos otorgados para el proyecto PAICyT-Problemas Nacionales 2019/IT1078-19 para el desarrollo de este trabajo.

**CUBIERTA BIOPOLIMÉRICA DE NANOINGREDIENTES A BASE DE *Thymus vulgaris*  
CON POTENCIAL APLICACIÓN EN PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS.**

Presentado por:

**Q.C.B. Bárbara Johana González Moreno**

Este trabajo se realizó en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina en colaboración con el Laboratorio de Nanotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, ambas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la Dirección de la Dra. Rocío Álvarez Román y co-dirección del Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez.

**Directora**



---

**Dra. C. Rocío Álvarez Román**

**Co-Director**



---

**Dr. C. Sergio Arturo Galindo Rodríguez**

## RESUMEN

Q.C.B Bárbara Johana González Moreno

Fecha de graduación: Julio, 2020.

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

**Título de estudio: CUBIERTA BIOPOLIMÉRICA DE NANOINGREDIENTES A BASE DE *Thymus vulgaris* CON POTENCIAL APLICACIÓN EN PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS.**

Número de páginas: 118

Candidata para el grado de Maestra en Ciencias con orientación en Química Biomédica.

**Área de estudio:** Química Analítica/Formulación de Productos Naturales.

**Propósito y método del estudio:** Según la FAO, cerca de 1,300 millones de toneladas de alimentos producidos anualmente para consumo humano se pierde o desperdicia, entre el 40-50%, son productos hortofrutícolas. Una de sus estrategias para reducir la pérdida y el desperdicio de los productos hortofrutícolas, es el uso de nuevas tecnologías e innovación, tal como la aplicación de cubiertas biopoliméricas (CB) formadas a partir de nanoingredientes (NI). Aunado a esto, el aceite esencial de *Thymus vulgaris* (AE-Tv), ha mostrado tener actividad antibacteriana frente a la bacteria *Pectobacterium spp.*, la cual tiene un importante impacto en la pudrición de productos hortofrutícolas.

Este trabajo constó de cuatro etapas: i) Obtención del NI por la técnica de nanoprecipitación, así como la formación de la CB por la técnica de *casting*, ii) Evaluación del porcentaje de elongación, adhesión y rompimiento de las CB formadas a partir del NI (CB-NI) con un texturómetro, iii) Validación del método de microextracción en fase sólida por *headspace* (HS-SPME) para cuantificar los componentes del AE-Tv en las CB-NI por cromatografía de gases (CG-FID) y iv) Evaluación antibacteriana contra la bacteria *Pectobacterium carotovorum* ATCC 15713 de la CB-NI por el método de difusión en disco y microdilución en placa.

**Conclusiones y contribuciones:** La técnica de nanoprecipitación permitió obtener un sistema de NI homogéneo y estable, con tamaño de partícula de  $276 \pm 2.35$  nm, IP de  $0.156 \pm 0.02$  y potencial zeta de  $-54.66 \pm 2.60$  mV, lo cual favoreció la formación de CB transparentes, flexibles y resistentes al doblado con alginato al 1% (p/v) a temperatura ambiente. En relación a las propiedades mecánicas, se demostró que la presencia del NI en las CB, favoreció el porcentaje de elongación, adhesión y resistencia al rompimiento, es decir, la aplicación de la CB-NI sobre los productos hortofrutícolas, los protegería durante las maniobras de manejo y transporte y por ende disminuiría su pérdida poscosecha. El método de HS-SPME por CG-FID desarrollado se aplicó a para cuantificar de forma precisa y exacta los componentes del AE-Tv presente en la CB-NI. Finalmente, se demostró que ni la NP-blanco ni el AL inhibieron el crecimiento de la bacteria *Pectobacterium carotovorum* ATCC 15713 con lo que se establecería la potencial aplicación de la CB-NI en la reducción de pérdida poscosecha de productos hortofrutícolas.



---

Dra. C. Rocío Álvarez Román  
Directora de Tesis

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>Página</b>
	1.1 Pérdidas de los alimentos	1
	1.1.1 Pérdidas poscosecha	2
	1.1.2 Causas de las pérdidas poscosecha de productos hortofrutícolas	3
	1.2 Pérdidas poscosecha de los productos hortofrutícolas causada por microorganismos	5
	1.3 Prevención de la pérdida poscosecha de productos hortofrutícolas	7
	1.4 Cubiertas biopoliméricas	8
	1.4.1 Composición de las CB	9
	1.4.2 Técnica de <i>casting</i> para la obtención de CB	11
	1.5 Aceites esenciales en CB	12
	1.5.1 Aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i>	15
	1.6 Nanopartículas poliméricas	18
	1.6.1 Nanoingredientes	21
	1.7 Evaluación de la actividad antibacteriana de las CB	22
	1.8 Antecedentes	25
	1.9 Justificación	26
	1.10 Objetivo general	27
	1.11 Objetivos específicos	27



## 2 MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material, equipo y reactivos	28
2.1.1 Material	28
2.1.2 Equipo	28
2.1.3 Reactivos	29
2.1.4 Material biológico	29
2.2 Obtención de cubiertas biopoliméricas en base al nanoingrediente por el método de <i>casting</i> y evaluación de sus propiedades mecánicas	30
2.2.1 Obtención del NI	30
2.2.2 Caracterización fisicoquímica del NI	30
2.2.3 Estabilidad del NI	32
2.2.4 Obtención de la CB a partir del NI	32
2.2.5 Caracterización mecánica de las CB	33
2.3 Validación un método de microextracción en fase sólida en la modalidad <i>headspace</i> (HS-SPME) para cuantificar los componentes del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> en cubiertas biopoliméricas por cromatografía de gases con detección de ionización de llama (CG-FID)	35
2.3.1 Caracterización química del AE- <i>Tv</i>	35
2.3.2 Validación del sistema de HS-SPME por CG-FID	37
2.3.3 Validación del método de HS-SPME por CG-FID	40
2.3.4 Aplicabilidad del método HS-SPME por CG-FID en CB-NI	42

2.4 Evaluación de la actividad antibacteriana del NI por el método de difusión en disco y microdilución en placa	43
2.4.1 Técnica de difusión en disco	43
2.4.2 Técnica de microdilución en placa	44
<b>3 RESULTADOS</b>	
3.1 Obtención de cubiertas biopoliméricas a base al nanoingrediente por el método <i>de casting</i> y evaluación de sus propiedades mecánicas	47
3.1.1 Caracterización fisicoquímica del NI	47
3.1.2 Estabilidad del NI	49
3.1.3 Obtención de la CB a partir del NI	50
3.1.4 Caracterización mecánica de las CB	52
3.2 Validación un método de microextracción en fase sólida en la modalidad <i>headspace</i> (HS-SPME) para cuantificar los componentes del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> en cubiertas biopoliméricas por cromatografía de gases con detección de ionización de llama (CG-FID)	53
3.2.1 Caracterización química del AE-Tv	53
3.2.2 Validación del sistema de HS-SPME por CG-FID	57
3.2.3 Validación del método de HS-SPME por CG-FID	58
3.2.4 Aplicabilidad del método HS-SPME por CG-FID en CB-NI	59
3.3 Evaluación de la actividad antibacteriana del NI por el método de difusión en disco y microdilución en placa	61

3.3.1	Técnica de difusión en disco	61
3.3.2	Técnica de microdilución en placa	63
<b>4</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	
4.1	Obtención cubiertas biopoliméricas en base al nanoingrediente por el método <i>de casting</i> y evaluación de sus propiedades mecánicas	65
4.2	Validación un método de microextracción en fase sólida en la modalidad <i>headspace</i> (HS-SPME) para cuantificar los componentes del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> en cubiertas biopoliméricas por cromatografía de gases con detección de ionización de llama (CG-FID)	80
4.3	Evaluación de la actividad antibacteriana del NI por el método de difusión en disco y microdilución en placa	85
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	88
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	89
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	90
<b>8</b>	<b>ANEXOS</b>	111

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Principales causas de pérdidas poscosecha de productos hortofrutícolas.	3
2	Géneros bacterianos encontrados en diferentes productos hortofrutícolas.	6
3	Cubiertas de polímeros y lípidos de origen natural aplicadas a frutas y hortalizas.	10
4	Cubiertas con aceites esenciales aplicado en productos hortofrutícolas.	14
5	Clasificación taxonómica de <i>Thymus vulgaris</i> .	16
6	Condiciones óptimas para la extracción de los componentes huella a partir de la CB-NI con HS- SPME por CG.	37
7	Concentraciones evaluadas de los componentes de la cubierta biopolimérica por el método de microdilución en placa.	45
8	Características fisicoquímicas del nanoingrediente con aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> obtenido por la técnica de nanoprecipitación.	47
9	Porcentajes de encapsulación (%E) y eficiencia de encapsulación (%EE) de los componentes de AE- <i>Tv</i> en el NI purificado por diálisis y evaporación a presión reducida.	49
10	Características físicas de las CB formadas de alginato a tres concentraciones a temperatura ambiente con tiempo de secado de 24 h.	50
11	Características físicas de las CB formadas de NP blanco y alginato a tres concentraciones a temperatura ambiente con tiempo de secado de 24 h.	51
12	Características físicas de las CB formadas de NI y AL a tres concentraciones a temperatura ambiente con tiempo de secado de 24 h.	52

13	Características mecánicas de las CB formadas a partir de AL, NP blanco o NI a temperatura ambiente con tiempo de secado de 24 h.	53
14	Composición química del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> por cromatografía de gases acoplada a MS y FID.	56
15	Parámetros de validación del sistema para cuantificar o-cimeno, $\gamma$ -terpineno y timol del AE- <i>Tv</i> con HS-SPME por CG-FID.	57
16	Parámetros de validación del método para cuantificar o-cimeno, $\gamma$ -terpineno y timol del AE- <i>Tv</i> con HS-SPME por CG-FID.	58
17	Contenido de o-cimeno, $\gamma$ -terpineno y timol en las CB formadas a partir del NI con AE- <i>Tv</i> purificado por diálisis y evaporación a presión reducida.	60
18	Porcentaje de incorporación de los componentes huella del AE- <i>Tv</i> en la CB a partir del NI formada por la técnica de <i>casting</i> a temperatura ambiente con tiempo de secado de 24 h.	61
19	Resultados del método de difusión en disco de la bacteria <i>Pectobacterium carotovorum</i> ATCC 15713.	62
20	Resultados del método de microdilución en placa de la bacteria <i>Pectobacterium carotovorum</i> ATCC 15713.	63

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura química del alginato.	11
2	Componentes presentes en los aceites esenciales.	13
3	Apariencia física de la planta <i>Thymus vulgaris</i> .	15
4	Componentes del AE de <i>Thymus vulgaris</i> .	16
5	Clasificación de NP en base a su morfología y arquitectura.	19
6	Procedimiento general de la formación de NP por la técnica de nanoprecipitación.	20
7	Suaje tipo I utilizado en la determinación del porcentaje de elongación.	34
8	Curva de distribución del tamaño del NI con aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> obtenido por la técnica de nanoprecipitación.	48
9	Cromatogramas obtenidos a partir del NI con AE- <i>Tv</i> purificado por dos técnicas: A) diálisis y B) evaporación a presión reducida por HS-SPME/CG-FID.	48
10	Cromatograma del AE- <i>Tv</i> (2 mg/mL) en diclorometano por CG-MS.	54
11	Cromatograma del AE- <i>Tv</i> (2 mg/mL) en diclorometano por CG-FID.	55
12	Cromatogramas de las CB-NI obtenido con el método de HS-SPME por CG-FID validado.	59
13	Crecimiento bacteriano de <i>Pectobacterium carotovorum</i> en agar MH con A) CB de AL al 1% (p/v), B) CB-NP blanco y C) NI.	62
14	Crecimiento bacteriano de <i>Pectobacterium carotovorum</i> en CMH en los pocillos correspondientes de A) CB de AL al 1% (p/v), B) CB-NP blanco y C) NI.	64

## LISTA DE FÓRMULAS

<b>Fórmula</b>		<b>Página</b>
1	Porcentaje de encapsulación (%E).	31
2	Porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE).	31
3	Porcentaje de elongación (%).	34
4	Porcentaje de desviación estándar relativa (%DER).	39
5	Límite de detección (LD).	40
6	Límite de cuantificación (LQ).	40
7	Porcentaje de recuperación (%R).	42

## ABREVIATURAS

AE	Aceite esencial
AE- <i>Tv</i>	Aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i>
AL	Alginato de sodio
°C	Grados centígrados
CB	Cubierta biopolimérica
CG	Cromatografía de gases
g	Gramos
h	Horas
CG-FID	Cromatografía de gases con detector de ionización en flama
<i>HS</i>	<i>Headspace</i>
<i>HS-SPME</i>	Microextracción en fase sólida en modo de <i>headspace</i>
LD	Límite de detección
LQ	Límite de cuantificación
m	Pendiente de la curva de calibración
mg	Miligramos
nm	Nanómetros
NE	Nanoesferas
NI	Nanoingrediente
NP	Nanopartículas poliméricas
NC	Nanocápsulas
PA	Poliacrilato
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinación



# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Pérdidas de los alimentos**

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) las pérdidas de los alimentos se definen como la disminución de la cantidad o calidad de los alimentos. En concreto, son los productos agrícolas destinados al consumo humano que finalmente no se consumen o que han sufrido una disminución en la calidad. Una parte importante de las pérdidas de alimentos son los desperdicios, es decir, son alimentos inicialmente destinados al consumo y que son desechados o utilizados de forma alternativa (no alimentaria).

A nivel global, entre un cuarto y un tercio de los alimentos producidos anualmente para consumo humano se pierde o desperdicia. Esto equivale a cerca de 1,300 millones de toneladas de alimentos, lo que incluye entre el 40 y el 50% de raíces, frutas, hortalizas y semillas oleaginosas (FAO, 2019). El costo económico de la pérdida y el desperdicio de alimentos es de aproximadamente 940 mil millones de dólares anualmente en el mundo (Lipinski y O'Connor, 2016).

Los alimentos se pierden o se desperdician en toda la cadena de suministros desde la producción agrícola inicial hasta el consumo final de los hogares. Las pérdidas de los alimentos suceden principalmente durante la producción, la poscosecha, el almacenamiento y el transporte. Mientras que el desperdicio de los alimentos ocurre durante la distribución y consumo, en relación directa con el comportamiento de los vendedores mayoristas y minoristas, servicios de venta de comida y consumidores que deciden desechar los alimentos que aún tienen valor (FAO, 2018).

### **1.1.1 Pérdidas poscosecha**

Las pérdidas poscosecha se define como la pérdida de los alimentos que se da desde la salida del campo hasta su preparación culinaria. El sistema poscosecha comprende cierto número de actividades y de funciones secuenciales que se pueden clasificar en dos categorías: a) *actividades técnicas*: cosecha, limpieza, secado, almacenamiento, procesamiento; y b) *actividades económicas*: transporte, comercialización y control de calidad.

La pérdida de los productos hortofrutícolas se observa desde la etapa posterior a la cosecha hasta su distribución ocupando un porcentaje cercano al 25%, seguido de la carne y productos de origen animal con una pérdida cercana al 15%, mientras que los tubérculos, cereales y legumbres representan un 10% (FAO, 2019).

Los productos hortofrutícolas, es decir, frutas y hortalizas son mucho menos resistentes y más perecederas comparadas con semillas, tubérculos o raíces. Un producto perecedero es aquél que al tener un metabolismo muy activo, se deteriora rápidamente y deja de servir para el consumo humano (Torres-Sánchez, *et al.* 2020).

Por otro lado, los productos hortofrutícolas a menudo se envasan de manera deficiente, o no se envasan; además se transportan en camiones abiertos y sin refrigeración, y durante su manipulación y transporte están sujetos a daños mecánicos a causa de la compresión, abrasión o manipulación brusca por lo que son muy vulnerables al deterioro (FAO, 2019).

### 1.1.2 Causas de las pérdidas poscosecha de los productos hortofrutícolas

La mayor parte de las pérdidas poscosecha, se debe al mal manejo del producto hortofrutícola una vez que este ha sido cosechado. Además la ausencia de tecnología para controlar factores biológicos y mecánicos afecta la calidad del producto durante su almacenamiento. En la Tabla I se presentan algunas causas específicas y sus inductores de pérdidas de calidad en productos hortofrutícolas.

**Tabla 1.** Principales causas de pérdidas poscosecha de productos hortofrutícolas.

<b>Tipo</b>	<b>Origen</b>	<b>Inductores</b>
<b>Primarias</b>	Biológicas y microbiológicas	Plagas y enfermedades
	Químicas y bioquímicas	Pesticidas y productos químicos
	Mecánicas	Heridas, abrasiones y rupturas
	Medios ambientales	Temperatura, pH, humedad
	Fisiológicas	Envejecimiento, respiración, transpiración
<b>Secundarias</b>	Métodos de conservación	Secado y curado inadecuados
	Almacenamiento	Infraestructura inadecuada
	Sistemas de distribución	Transporte y distribución inadecuados

Todos estos factores afectan la vida útil de los productos hortofrutícolas. Se considera que la vida útil es un período en el cuál, bajo circunstancias definidas, se produce una tolerable disminución de la calidad del producto (Siroli, 2015). Además este período del producto hortofrutícola es limitado por el carácter perecedero y por los cambios físicos, químicos y microbiológicos que ocurren, tal como lo describen Artes y Allende, (2005):

- Deterioro físico*: se produce inicialmente por pérdida de agua por evaporación observándose arrugamiento o contracción del producto hortofrutícola en su superficie; se presenta también pérdida de peso y de textura. Están comprendidos en este tipo de deterioro, los daños mecánicos y físicos con rotura de tejidos, los cuáles aumentan rápidamente la pérdida de agua y propician las infecciones por los organismos patógenos causantes de la descomposición.

- Deterioro químico*: se debe a las reacciones químicas de oxidación y oscurecimiento no enzimático, los cuales producen una disminución en la calidad nutritiva por la pérdida de ácidos grasos esenciales, proteínas y vitaminas. Por lo tanto, ocurre una pérdida en la calidad organoléptica o sensorial, debido a una variación del aroma, sabor, textura y de la apariencia general.

- Deterioro microbiológico*: este es causado por cambios microbiológicos asociados con bacterias, hongos y levaduras. Una vez que el producto hortofrutícola es cosechado, comienza de inmediato la senescencia, haciéndolo más sensible al deterioro microbiano. El grado y la velocidad del incremento de la población de microorganismos dependen del producto y las condiciones de transporte, almacenamiento y distribución (Fernández, *et al.* 2017).

## **1.2 Pérdidas poscosecha de los productos hortofrutícolas causada por microorganismos**

La pérdida poscosecha, se da como resultado de: a) enfermedades localizadas superficialmente sobre el producto, lo cual lo hace menos atractivo aun cuando no haya destrucción real del tejido aprovechable y b) destrucción rápida y extensiva de tejido en toda la anatomía del producto, causado por hongos y bacterias. Muchas bacterias y hongos pueden causar pudriciones en poscosecha de productos hortofrutícolas, la mayoría de ellos son llamados patógenos débiles, Estos microorganismos solamente pueden infectar al órgano vegetal si éste está dañado por heridas, ya que no producen ni excretan enzimas capaces de hidrolizar las paredes celulares para penetrar la piel intacta del producto (Olivas, 2009).

Las infecciones bacterianas ocurren en el campo, tránsito, empaque y/o durante el almacenamiento. Las pérdidas cuantitativas causadas por la podredumbre blanda, la cual es una descomposición progresiva caracterizada por la maceración de los tejidos, es la afectación de mayor área que cualquier otra enfermedad bacteriana (Ahmed, 2017).

Las bacterias luego de penetrar en la superficie del tejido se multiplican en los espacios intercelulares, donde producen enzimas pectolíticas como las pectinasas. Estas tienen la función de degradar a la pectina en la lámina media y las paredes celulares primarias de los productos hortofrutícolas, lo que conduce al ablandamiento del tejido infectado (Hossain, 2019).

Entre las bacterias, que comúnmente pueden provocar invasión y/o contaminación a los productos hortofrutícolas, se encuentran *Pseudomonas spp.*, *Erwinia spp.*, *Flavobacterium spp.*, *Xanthomona spp.* y *Eterobacter agglomerans* (Olivas, 2008; Oluwadara, *et al.* 2018). El género *Erwinia spp.* se colocó en la familia de las *Enterobacteriaceae*, sin embargo en los últimos 20 años, la *Erwinia* se ha reclasificado a nuevos géneros: *Dickeya* y *Pectobacterium*, que son los dos géneros patógenos bacterianos de podredumbre en productos hortofrutícolas más estudiados (Charkowski, *et al.* 2018). En la siguiente tabla, podemos observar las diferentes bacterias que han sido reportadas en los productos hortofrutícolas.

**Tabla 2.** Géneros bacterianos encontrados en diferentes productos hortofrutícolas.

<b>Género bacteriano</b>	<b>Producto hortofrutícola</b>	<b>Referencia</b>
<i>Pectobacterium spp.</i>	Papa, Tomate, Manzana, Pimiento, Pepino, Col, Brócoli, Berenjena y Fresa.	Charkowski, <i>et al.</i> 2018; Alippi, <i>et al.</i> 2007; Rossmann, <i>et al.</i> 2018; Golkhandan, <i>et al.</i> 2013.
<i>Pseudomonas spp.</i>	Tinda (melón indio), Tomate, Cereza, Cilantro, Zanahoria y Kiwi.	Mondal, <i>et al.</i> 2012; Cruz, <i>et al.</i> 2010; Mmbaga y Sheng, 2000; Gupta, <i>et al.</i> 2013; Popović, <i>et al.</i> 2015.
<i>Dickeya chrysanthemi</i>	Cebolla, Maíz, Papa, Pimiento, Piña y Zanahoria.	Toth, <i>et al.</i> 2011; Chen, <i>et al.</i> 2020.
<i>Xanthomonas spp.</i>	Durazno, Tomate, Papaya, Fresa y Naranjas.	Zhang, <i>et al.</i> 2019 ; Suárez-Estrella, <i>et al.</i> 2019.
<i>Agrobacterium spp.</i>	Papaya, Tomate, Durazno y Coliflor.	Shaghef, <i>et al.</i> 2020.

### 1.3 Prevención de la pérdida poscosecha de productos hortofrutícolas

Con el objetivo de prolongar la vida poscosecha de los productos hortofrutícolas se han implementado diferentes tecnologías, entre ellas se pueden mencionar, a) métodos físicos: como el almacenamiento a bajas temperaturas (refrigeración y congelación) que podrían provocar daños por enfriamiento y b) métodos químicos: como la adición de conservantes y antisépticos, que han mostrado ser eficientes contra hongos y bacterias, sin embargo, su efecto antimicrobiano conlleva a una disminución de la calidad sensorial en el fruto, parámetro de gran importancia en productos frescos (Marchese, 2016; Nielsen *et al*, 2018). No obstante en los últimos años, ha crecido el interés de utilizar productos que sean amigables con el medio ambiente, autosostenibles y de origen natural u orgánico.

En el marco de la Comunidad de Estados Latinoamericanos y Caribeños (CELAC) se aprobó el plan de acción: Seguridad Alimentaria, Nutrición y Erradicación del Hambre 2025, cuya elaboración fue solicitada por la Comunidad a la FAO. En este plan, una de las líneas de acción es la reducción de Pérdidas y Desperdicios de Alimentos (PDA), que está relacionada directamente con el Derecho a la Alimentación. Para la implementación de esta línea de acción, se plantean cuatro estrategias, dentro de las que destaca la siguiente: “Promover el desarrollo y facilitar el acceso al equipamiento y nuevas tecnologías/innovación que contribuyan a reducir las pérdidas de alimentos en todas las etapas de la cadena” (FAO, 2015). Dentro de las nuevas tecnologías e innovación se han incluido el uso de cubiertas biopoliméricas (Xing, *et al*. 2019).

## 1.4 Cubiertas biopoliméricas

Una cubierta biopolimérica (CB) se define como una o varias capas finas y continuas de material polimérico natural y comestible que se colocan sobre los productos hortofrutícolas (De Ancos *et al*, 2015).

El uso de las CB, es un método innovador de conservación de alimentos, cuya aplicación permitiría: a) la generación de una barrera física para proteger la superficie del producto, b) el control de la migración en solutos y humedad, de intercambio de gases y de reacciones de oxidación para prolongar su vida útil y c) la reducción del riesgo de crecimiento de patógenos en las superficies de los productos hortofrutícolas (Duan, *et al*. 2019).

Se han desarrollado distintas formulaciones para la formación de las CB que resaltan ciertas características de algunos frutos. Plotto y cols. (2010) evaluaron el efecto antienvjecimiento con recubrimientos de carboximetilcelulosa (CMC) en la calidad de los mangos recién cortados. Estas cubiertas mantuvieron la calidad visual y disminuyó la pérdida de la firmeza durante el almacenamiento. Por otro lado, Barboza de Lima y cols. (2012) aplicaron cubiertas de almidón de yuca a mangos y mostraron un retraso en el desarrollo del color, así como una disminución en la pérdida de masa.

Este tipo de materiales puede reducir la pérdida de peso, retardar el proceso de maduración y dar brillo a los frutos mejorando de esta forma su apariencia (Cissé *et al*, 2015; Onias *et al*, 2016). Las CB se producen exclusivamente a partir de ingredientes naturales y comestibles para anticipar su degradación (Duan, *et al*. 2019).



### 1.4.1 Composición de las CB

Las CB pueden ser elaboradas a partir de una gran variedad de lípidos, polisacáridos y proteínas de origen natural, solos o en combinaciones que logren aprovechar las ventajas de cada grupo.

Los lípidos se caracterizan por ser hidrofóbicos y no poliméricos, presentando excelentes propiedades de barrera frente a la humedad, reducen la transpiración, la deshidratación, la abrasión en la manipulación posterior y pueden mejorar el brillo y la apariencia de muchos productos hortofrutícolas. Como desventaja, estos presentan una falta de cohesividad e integridad estructural, lo que hace que presenten malas propiedades mecánicas formando recubrimientos quebradizos (Fernández-Valdés, *et al.* 2015).

Los polisacáridos y las proteínas son los polímeros hidrocoloides más utilizados en la industria alimenticia. Estos forman redes moleculares cohesionadas por una alta interacción entre sus moléculas. Sus usos les confiere buenas propiedades mecánicas y de barrera a gases ( $O_2$  y  $CO_2$ ), por lo cual retardan la respiración y el envejecimiento de muchas frutas y hortalizas (Dickinson, 2009).

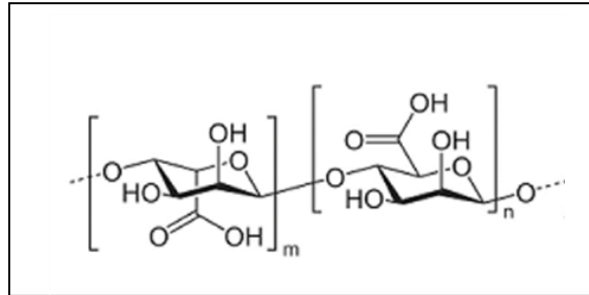
Dentro del grupo de los polisacáridos aniónicos, el alginato es ampliamente utilizado debido a que es biodegradable, biocompatible, de bajo precio y no tóxico. Este polisacárido está constituido por los monosacáridos D-manurónico y L-gulurónico (Figura 1) y se encuentra presente en las paredes celulares de las algas marinas pardas.

En la Tabla 3, se muestran ejemplos de cubiertas de polímeros y lípidos de origen natural aplicadas a productos hortofrutícolas.

**Tabla 3.** Cubiertas de polímeros y lípidos de origen natural aplicadas a frutas y hortalizas.

<b>Producto hortofrutícola</b>	<b>Composición de la CB</b>	<b>Contribución</b>	<b>Referencia</b>
Tomate y manzana	Goma de xantano con óxido de zinc (ZnO).	Reducción en la pérdida de agua y peso del producto, e inhibición del crecimiento de microorganismos.	Joshu, <i>et al.</i> 2020.
Arándano	Goma arábica con extracto de fruta de baobab africano.	Retraso significativo en pérdida de firmeza, pérdida de peso y cambio de color. Retraso de descomposición microbiana.	Tahir, <i>et al.</i> 2019.
Tomate	Cera de laurel, aceite de oliva, glicerol, tween 80.	Reducción de pérdida de peso, mayor firmeza y buena apariencia.	Andrade, <i>et al.</i> 2014.
Mango	Alginato, pectina y glicerol.	Aumento del período de almacenamiento a largo plazo del producto durante 16 días.	Silva, <i>et al.</i> 2018.
Manzana	Goma gellan, pectina, alginato, cloruro de calcio y ácido ascórbico.	Conservación de firmeza y color del producto, mejora de propiedades sensoriales y reducción de los recuentos bacterianos.	Moreira, <i>et al.</i> 2015.

En base a su estructura lineal, el alginato puede formar películas fuertes y estructuras fibrosas adecuadas en estado sólido, por lo tanto, se considera un buen material filmogénico (Tavassoli-Kafrani, *et al.* 2015).



**Figura 1.** Estructura química del alginato.

#### 1.4.2. Técnica de *casting* para la obtención de CB

Generalmente, las CB son formadas por tres componentes: polímero, disolvente y plastificante. Entre las técnicas comúnmente utilizadas para la elaboración de las CB se encuentran: a) eliminación del disolvente, b) gelación térmica, c) solidificación, d) por “*electrospraying*” y e) por *el método de casting* (Solano-Doblado, *et al.* 2018; Ávila-Sosa *et al.* 2012).

Esta última, ha sido la más utilizada debido a que es una técnica sencilla que permite la obtención de CB con buenas propiedades mecánicas a partir de polímeros biodegradables y comestibles. En la técnica de *casting*, una vez hecha la mezcla de los componentes de la CB, esta se vierte sobre placas de acrílico o teflón, y se lleva a cabo la evaporación del disolvente a temperatura y humedad controladas, hasta la formación de la CB. Esta técnica, además, permite la obtención de CB de un grosor variable, al modificar el peso o el volumen de la suspensión de

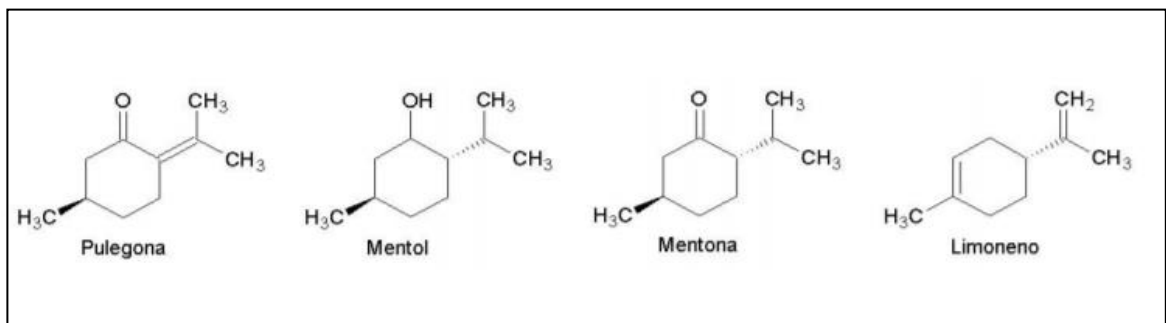
la CB aplicada y el área de la placa sobre la que se vierte la suspensión de polímeros. Una ventaja importante de este método con respecto a otros procesos similares es la posibilidad de trabajar a temperaturas elevadas o a temperatura ambiente, dependiendo de las necesidades de la CB, teniendo buenos resultados en la productividad, espesor y propiedades ópticas (Solano-Doblado, *et al.* 2018).

### **1.5 Aceites esenciales en CB**

Velázquez Moreira y cols. (2014) expresa que las CB pueden contener otros ingredientes como agentes antioxidantes, nutrimentos adicionales, saborizantes, conservadores y compuestos antimicrobianos de origen natural, como los aceites esenciales (AE) que poseen propiedades antioxidantes, antibacterianas y antifúngicas (Yin, *et al.* 2019).

Los AE son líquidos aceitosos aromáticos producidos en determinadas partes de las plantas como flores, tallos, raíces, hojas, frutos y semillas (Reyes-Jurado, *et al.* 2016; Argote, *et al.* 2017). Son una mezcla de componentes volátiles producto del metabolismo secundario de las plantas en cuya composición se encuentran los terpenos, sesquiterpenos y posiblemente diterpenos, los cuales a su vez contienen diferentes grupos de hidrocarburos, ácidos, alcoholes, aldehídos, ésteres, éteres y cetonas. La Food and Drug Administration (FDA) considera a los agentes antimicrobianos de origen natural, incluyendo los AE, como sustancias del tipo Generalmente Reconocido Como Seguro (GRAS, por sus siglas en inglés).

Algunos de los ingredientes activos clave en los AE, por ejemplo el cinamaldehído, el citral, el eugenol, el limoneno y el timol, son seguros para el consumo humano. Entre las ventajas que presentan los componentes de AE como agentes antimicrobianos se pueden mencionar que son de origen natural (Palou, *et al.* 2018; Yin, *et al.* 2019). En la Figura 2 se ilustran ejemplos de componentes encontrados en los AE.



**Figura 2.** Componentes presentes en los aceites esenciales.

En los últimos años la incorporación de los AE en CB, se considera un método eficaz e innovador para mantener la calidad de los productos hortofrutícolas, ya que no evitan el intercambio de oxígeno, agua y dióxido de carbono con el medio ambiente e inhiben el crecimiento de microorganismos. Además disminuyen la velocidad de oxidación en la superficie de los alimentos, debido a sus propiedades tanto antibacteriana como antioxidantes. Cabe mencionar que estas CB, se pueden consumir junto con el producto, pero también se puede lavar antes de ser consumido (Ju, *et al.* 2018; Lekjing, 2016). En la Tabla 4 se muestran diferentes cubiertas con AE que han sido aplicadas en productos hortofrutícolas.

**Tabla 4.** Cubiertas con aceites esenciales aplicado en productos hortofrutícolas.

<b>Aceite esencial</b>	<b>Composición de la CB</b>	<b>Producto hortofrutícola</b>	<b>Efecto</b>	<b>Referencia</b>
<i>Canela</i>	Quitosano y alginato	Mango	Disminución de la pérdida de peso y de agua en el fruto. Preservación de la firmeza del fruto.	Yin, <i>et al.</i> 2019.
<i>Orégano</i>	Goma de semilla de albahaca	Chabacano	Disminución de la permeabilidad del vapor de agua y en el número de poblaciones bacterianas.	Mohamed, <i>et al.</i> 2020.
	Proteína de corvina	Papaya	Descenso de la pérdida de masa y en el crecimiento microbiano. Disminución de la firmeza y el pH.	Cortez-Vega, <i>et al.</i> 2013.
	Carboximetil-celulosa	Papaya	Retraso de la aparición de podredumbre y marchitez en la fruta durante el almacenamiento.	Zillo, <i>et al.</i> 2018.
<i>Tomillo</i>	Quitosano	Fresa	Incremento en la vida útil de las fresas. Descenso en la pérdida de humedad y tasa de respiración.	Martínez, <i>et al.</i> 2018.
	Alginato	Manzana	Inhibición del crecimiento microbiano, respiración, pérdida de peso, firmeza y color de las manzanas recién cortadas.	Sarengaowa <i>et al.</i> 2018.
<i>Limón</i>	Quitosano	Fresa	Prevención de la descomposición por hongos y bacterias.	Perdones, <i>et al.</i> 2016.
<i>Menta</i>	Quitosano	Papaya	Disminución del desarrollo de lesiones de antracnosis.	Dos-Passos, <i>et al.</i> 2019.

### 1.5.1 Aceite esencial de *Thymus vulgaris*

El AE de *Thymus vulgaris* (AE-Tv) posee importantes propiedades antioxidantes y antibacterianas, las cuáles pueden ser utilizadas por la industria alimentaria como posible aditivo natural para reducir el uso de productos químicos (Martínez, *et al.* 2018; Mohammad, *et al.* 2019).

El *Thymus vulgaris* (conocido comúnmente como tomillo) es una planta subarborescente y perenne, aromática de 10 a 30 cm de altura, con tallos leñosos algo retorcidos, hojas de color verde grisáceo, opuestas, pequeñas enteras, lineales o elípticas, pecioladas o sésiles, de 15 mm de largo, tal como se muestra en la Figura 3 (Salehi, *et al.* 2019). En la Tabla 5, se muestra su clasificación taxonómica (Torrente, 1985).

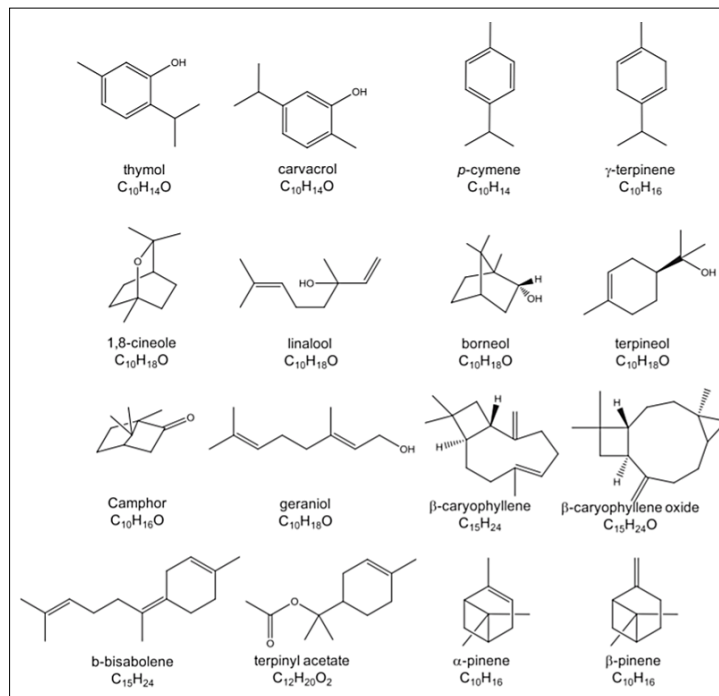


**Figura 3.** Apariencia física de *Thymus vulgaris*.

**Tabla 5.** Clasificación taxonómica de *Thymus vulgaris*.

Reino	Plantas
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Sub-clase	<i>Asteriadae</i>
Orden	<i>Lamiales</i>
Familia	<i>Lamiaceae</i>
Género	<i>Thymus</i>
Nombre científico	<i>Thymus vulgaris</i>
Nombre común	Tomillo

Entre los compuestos mayoritarios del AE-*Tv* se encuentra el timol, un monoterpeno oxigenado que posee propiedades antibacterianas y antioxidantes (Salehi, *et al.* 2019). En la Figura 4 se muestran los componentes reportados en el AE-*Tv*.



**Figura 4.** Componentes del AE de *Thymus vulgaris*.



El AE-*Tv* ha mostrado tener actividad antibacteriana frente a las bacterias Grampositivas y Gramnegativas, tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Pectobacterium spp.* y *Dickeya spp.* las cuales son de importante impacto en los productos hortofrutícolas (Boruga, *et al.* 2014; Nikolić, *et al.* 2014; Karami-Osboo, *et al.* 2010).

Esta actividad antibacteriana, se le atribuye a uno de sus componentes mayoritarios: el timol. Una característica importante de este componente, es que debido a su hidrofobicidad, se favorece su interacción con los lípidos de la membrana bacteriana posteriormente se desestabiliza su estructura y aumenta su permeabilidad, generando la salida de iones, metabolitos y demás moléculas que son necesarios para la sobrevivencia de la bacteria (Boruga, *et al.* 2014).

Otra propiedad del AE-*Tv* es su capacidad antioxidante, es decir, tiene en su composición química, moléculas que inhiben la oxidación. Las reacciones de oxidación producen radicales libres que activan reacciones en cadena, que causan daño o muerte a las células de un producto. Los antioxidantes detienen estas reacciones en cadena al eliminar los intermedios de radicales libres e inhiben diferentes reacciones de oxidación.

La actividad antioxidante que muestra el AE-*Tv* es atribuida a su composición química y estabilidad de sus componentes, tales como el timol. Este componente al ser capaz de interactuar con los radicales libres, garantiza el sabor y color de los alimentos por lo que prolonga su tiempo de consumo (Salehi, *et al.* 2019; Quezada, *et al.* 2009).

Boroujeni y Hojjatoleslami (2018), reportaron que la aplicación del AE-*Tv* en papas, mejoró sus propiedades fisicoquímicas ligadas a la oxidación de los lípidos. Se observó una disminución en el valor del peróxido y del ácido de las papas, además, las papas sin tratar con AE-*Tv*, presentaban un mayor enranciamiento, debido a la oxidación de los lípidos. Por lo tanto, se demostró que el AE-*Tv* protege a los lípidos de la oxidación.

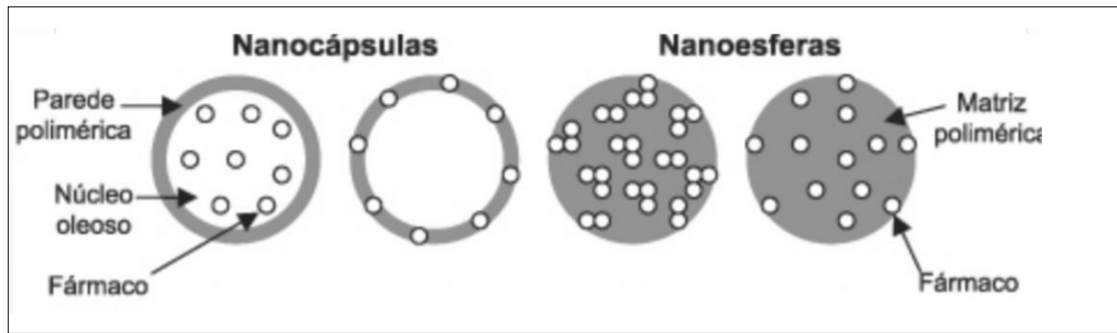
Los AE presentan escasa solubilidad en medios acuosos, elevada volatilidad y fácil oxidación, lo que restringe su incorporación directa en cubiertas.

La nanoencapsulación de aceites esenciales surge como una alternativa para: (i) aumentar su solubilidad en medios acuosos, (ii) disminuir la volatilidad de los AE, (iii) promover la liberación controlada y (iv) disminuir de la oxidación. Además de favorecer la preservación de las propiedades antimicrobianas y antioxidantes (Finos, 2016).

## **1.6 Nanopartículas poliméricas**

Las nanopartículas poliméricas (NP) son sistemas coloidales sólidos con un tamaño de partícula en el rango de 10 a 600 nm. Básicamente, las NP están formadas por el polímero y el principio activo disuelto, atrapado o encapsulado en la matriz polimérica. En base a su morfología y arquitectura, existen dos tipos de NP: las nanoesferas (NE) y las nanocápsulas (NC).

Como se observa en la Figura 5, las NE son un sistema monolítico matricial donde el principio activo sólido es adsorbido o incorporado. Por otro lado, las NC son un sistema vesicular donde el principio activo líquido está disuelto o disperso en el núcleo o en la pared polimérica (Fessi, *et al.* 1989).



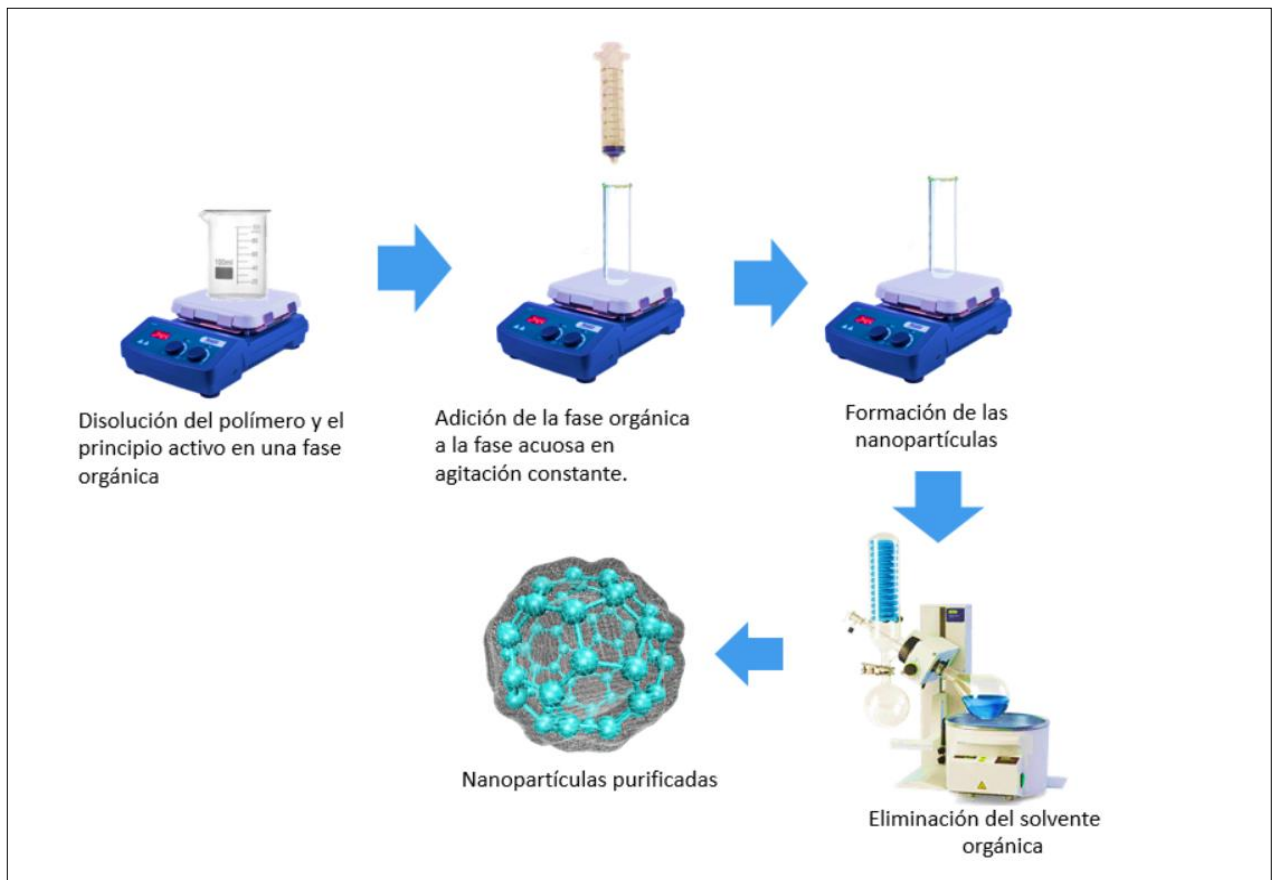
**Figura 5.** Clasificación de NP en base a su morfología y arquitectura.

Actualmente, existen diferentes técnicas para la obtención de NP a partir de polímeros preformados tales como, emulsión-evaporación, desplazamiento de solventes, “*salting-out*” (desplazamiento por sales), emulsificación-difusión y nanoprecipitación. Todas estas técnicas difieren en la metodología de preparación, el tamaño en las NP obtenidas y la eficiencia de encapsulación del compuesto de interés.

La técnica de la nanoprecipitación es una de las más utilizadas ya que permite una alta eficiencia de encapsulación de compuestos no polares (Salamanca, 2017; Irache, 2011). De forma general, consiste en una fase orgánica compuesta por un polímero y el principio activo disueltos en un solvente orgánico parcialmente miscible en agua. Esta fase se incorpora en una fase acuosa con agitación constante. Al estar en contacto las dos fases, las cadenas poliméricas se agregan con las moléculas del principio activo formando las NP, mientras que el solvente orgánico difunde hacia la fase acuosa.

Después de la formación de las NP, el solvente orgánico debe ser eliminado para evitar desestabilizar el sistema y la formación de agregados y por ende el

incremento del tamaño de partícula y en el índice de polidispersidad. Comúnmente el solvente orgánico es eliminado por medio de evaporación a presión reducida permitiendo una purificación rápida y controlada. En la Figura 6 se ilustra el procedimiento general de la formación de las NP.



**Figura 6.** Procedimiento general de la formación de NP por la técnica de nanoprecipitación.

Es importante, resaltar que el tipo de polímero utilizado tiene un papel clave en las características más significativas de las NP. Es decir, el tipo de polímero modifica la eficiencia de encapsulación del compuesto activo, la velocidad de liberación, la velocidad de degradación y la capacidad protectora.

Entre los polímeros biodegradables preformados más utilizados para preparar NP para aplicaciones alimentarias se encuentran poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL), ácido poliláctico (PLA), derivados del ácido metacrílico (Eudragit®), ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) y acetato ftalato de celulosa (Zambrano, *et al.* 2018).

Aunque el desarrollo de NP se informó por primera vez en el campo farmacéutico para los sistemas de administración de medicamentos, hace menos de dos décadas, estos sistemas captaron el interés del sector alimentario. Es posible producir CB cuando los antioxidantes o los antimicrobianos se encapsulan en NP. En las cubiertas, el compuesto puede administrarse, prolongarse o controlarse, para crear un microambiente específico para mejorar la vida útil de los productos hortofrutícolas (Zambrano, *et al.* 2018).

### **1.6.1 Nanoingredientes**

En general, un nanoingrediente (NI) se define como la combinación de dos o más materiales, para formar una mezcla que mejora las propiedades de un componente en el que al menos uno de ellos tiene escala nanométrica (como las NP) (Sanjib, 2020).

En la actualidad, se llevan a cabo varias investigaciones para mejorar las propiedades de las CB mediante la introducción de agentes funcionales y activos que incluyen la aplicación de los NI. El desarrollo de NI ha permitido utilizar CB como "*sistemas de distribución temporal*" que liberan sustancias activas de una CB a los productos hortofrutícolas, para mejorar su conservación (Sanjib, 2020; Zambrano, *et al.* 2018, Piña-Barrera, *et al.* 2019).

El uso de un NI en CB permitiría: a) mejorar la resistencia mecánica y transparencia de la CB, b) diseñar conservadores más eficaces y no dañinos para el producto, c) controlar la recepción de luz en el producto, d) regular la absorción de oxígeno y e) controlar la liberación de agentes antioxidantes y antimicrobianos (Zambrano, *et al.* 2018).

Estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación reportaron el uso de dos NI para su aplicación en productos hortofrutícolas. En el primero, se demostró que la presencia del NI de AE-*Tv* incorporado en una CB y aplicado sobre papaya favorecía su conservación (Galindo-Rodríguez, Álvarez-Román, *et al.* 2014). Además, se demostró que la aplicación del NI de AE-*Tv* en uva, permitió conservar su color y firmeza y retrasó la presencia de daño microbiológico por un tiempo prolongado de almacenamiento (Piña-Barrera, *et al.* 2019). En otro estudio, se valoró el efecto protector de NI con AE de *Limpia berlandieri* sobre jitomate y fresa (Galindo-Rodríguez, Álvarez-Román, *et al.* 2014).

### **1.7 Evaluación de la actividad antibacteriana de las CB**

Existen diferentes métodos para establecer la actividad antibacteriana, sin embargo la más utilizada en las CB con AE es la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). La CMI se define como la menor concentración requerida del AE para inhibir el crecimiento de la bacteria (propiedad bacteriostática) (Smith-Palmer, *et al.* 1998) o la concentración mínima letal que asegure la reducción de un 99.9% de la población de la bacteria (propiedades bactericidas) (Burt, 2004).

La determinación de la CMI en CB con AE frecuentemente se realiza por medio de los métodos de difusión en disco (Yemenicioğlu, 2018; Sarengaowa, *et al.* 2018). El método de difusión en disco, es un procedimiento cualitativo, que nos permite clasificar directamente a una bacteria como sensible o resistente. Este método consiste en depositar la CB en la superficie de una placa de agar Mueller Hinton previamente inoculada con microorganismo. Tan pronto la CB se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, la CB absorbe agua y el componente activo difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, las CB pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano. Este método ha sido ampliamente utilizado por diferentes autores.

Song y cols. en el 2018, evaluaron la actividad antibacteriana de cubiertas formadas a partir de alginato y AE de limón, por el método de difusión en disco contra las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. En esta investigación, se encontró que todas las bacterias mostraron una zona de inhibición comparada con la cubierta que no contenía AE de limón. La zona de inhibición fue más pronunciada para *S. aureus* porque, según los autores, las bacterias Grampositivas son más sensibles que las bacterias Gramnegativas, ya que estas poseen una membrana externa relativamente más impermeable.

Por otro lado, Do Evangelho y cols. en el 2019, determinaron la capacidad antibacteriana de cubiertas de almidón y AE de naranja contra las bacterias *S. aureus* y *Listeria monocytogenes*. Se llegó al hallazgo de que las baterías fueron

sensibles a las cubiertas con AE de naranja puesto que se presentó una zona de inhibición. Se disminuyó el crecimiento de *L. monocytogenes* en 68, 80 y 83%, y el crecimiento de *S. aureus* en 40, 51 y 66% cuando se utilizaba el AE de naranja a 0.3, 0.5 y 0.7  $\mu\text{L/g}$ , respectivamente. Se estableció que la reducción de la viabilidad de ambos patógenos, fue directamente proporcional a la concentración del AE de naranja.

Jouki y cols. (2014), evaluaron con el método de difusión en disco, la actividad antibacteriana de cubiertas de mucílago con AE de orégano contra las bacterias: *L. monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* y *E. coli*.

En esta investigación se reportó que los AE son ligeramente más activos contra las bacterias Grampositivas (*S. aureus* y *L. monocytogenes*) que Gramnegativas (*E. coli*), y se encontró que las cubiertas no fueron capaces de inhibir el crecimiento de las bacterias *S. typhimurium* y *P. aeruginosa*.

Ballester-Costa y cols. en el 2016, evaluaron cubiertas de quitosano con AE de tomillo (1 y 2%), por el método de difusión en disco contra las bacterias: *Listeria innocua*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter amnigenus* y *Alcaligenes faecali*. En este trabajo se encontró que todas las cubiertas formadas únicamente con quitosano, no mostraban actividad antibacteriana, mientras que las cubiertas de quitosano con el AE de tomillo, mostraron efectos inhibitorios dependientes de la concentración.



## 1.8 Antecedentes

En relación a las cubiertas poliméricas, en el grupo de trabajo se cuenta con dos patentes, en las cuales se llevó a cabo la formación de recubrimientos comestibles para la preservación de la calidad y vida de anaquel de frutas y hortalizas, a partir de formulados de nanoingredientes poliméricos cargados con dos diferentes aceites esenciales (Galindo- Rodríguez y Álvarez-Román, 2014).

Además, se demostró que el multisistema de NC con el AE de *Thymus vulgaris* mantuvo las características de color y firmeza de las uvas por más tiempo. Estos cambios fueron atribuidos a que el multisistema actuó como una barrera física para reducir el metabolismo de las frutas, evitar el crecimiento de microorganismos y conservar la actividad antioxidante durante el estudio de vida de anaquel de uvas (Piña-Barrera, *et al.* 2019).

Por otra parte, se determinó que el tratamiento con NC de eugenol (componente del AE del clavo) favorecía significativamente la firmeza del jitomate. Aunado a un estudio de patogenicidad, con el cual se constató la actividad antimicrobiana de las NC de eugenol contra el fitopatógeno *Colletotrichum gloesporoides* (Ramírez, 2019).

Con la finalidad de cuantificar los componentes del AE incorporados en el NI y en las cubiertas, se desarrolló y validó un método de microextracción en fase sólida modalidad *headspace* (HS-SPME) por cromatografía de gases (CG-FID). Se determinó que el timol (componente activo del AE- *Tv*) se incorporaba en las NC, sin embargo había una pérdida del 95% durante el proceso de formación de la CB a 65°C (González-Moreno, 2018).

## 1.9 Justificación

Según la FAO, a nivel global, entre un cuarto y un tercio de los alimentos producidos anualmente para consumo humano se pierde o desperdicia. Esto equivale a cerca de 1,300 millones de toneladas de alimentos, lo que incluye entre el 40 y el 50% de las raíces, frutas, hortalizas y semillas oleaginosas (FAO, 2019). En México, se estima que las pérdidas poscosecha de frutas y hortalizas frescas oscilan entre 10 y 40%. Estas pérdidas son provocadas por el inadecuado manejo poscosecha, ocasionado por daños físicos, microbiológicos y de almacenamiento. Es importante resaltar que el deterioro físico y sensorial de productos hortofrutícolas es dado principalmente por contaminación bacteriana.

Por otro lado, el aceite esencial de *Thymus vulgaris* ha presentado propiedades antibacterianas y antioxidantes, sin embargo, su elevada volatilidad y susceptibilidad a degradación química, causa la pérdida de sus componentes activos volátiles. De esta forma, sistemas acarreadores como los nanoingredientes poliméricos permiten la encapsulación de sus componentes para favorecer su protección y estabilidad.

Así, la formación de cubiertas biopoliméricas con nanoingredientes, representa una estrategia innovadora para el futuro control y reducción de pérdidas y desperdicios de productos hortofrutícolas.

### **1.10 Objetivo general**

- Desarrollar y evaluar cubiertas biopoliméricas de nanoingredientes a base de *Thymus vulgaris* con potencial aplicación en productos hortofrutícolas.

### **1.11 Objetivos específicos**

1. Obtener cubiertas biopoliméricas a base de nanoingredientes por el método de *casting* y evaluar sus propiedades mecánicas.
2. Validar un método de microextracción en fase sólida en la modalidad *headspace* (HS-SPME) para cuantificar los componentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris* en cubiertas biopoliméricas por cromatografía de gases con detección de ionización de llama (CG-FID).
3. Evaluar la actividad antibacteriana de las cubiertas biopoliméricas a base de nanoingredientes por el método de difusión en disco y microdilución en placa.

## **CAPITULO II**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.1 Material y equipo**

##### 2.1.1 Material

- Fibra de SPME: Poliacrilato (PA) de 85  $\mu\text{m}$ , Supelco
- Portafibras, Supelco
- Viales para cromatografía de gases, Supelco
- Columna capilar de cromatografía de gases HP-5MS[(5% Fenil)-metilpolisiloxano] 30m x 0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies

##### 2.1.2 Equipo

- Cromatógrafo de gases con inyector Split/splitless acoplado a detector de ionización en llama (FID), PerkinElmer, modelo Claurus480
- Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, PerkinElmer, modelo Autosystem 6890N
- Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, modelo Nano-Zs90
- Texturómetro, Texture Analyzer Brookfield CT3
- Estufa de laboratorio Shel Lab Sheldon Manufacturin

- Baño recirculador de agua, LabTech, modelo LCB-6D
- Balanza analítica, Scientech, modelo SM50
- Espectrofotómetro UV-Vis, Thermo Scientific, modelo Genesys 10s
- Rotavapor, Heidolph, modelo Laborota 400
- Calibrador micrométrico 25 mm PA-77
- Incubadora Quincy Lab, modelo 10140

### 2.1.3 Reactivos

- Acetona grado HPLC, Baker
- Eudragit L100-55, Evonik Industries
- Isopropanol grado HPLC, Tedia
- $\gamma$ -terpineno, Sigma-Aldrich
- o-cimeno, Sigma-Aldrich
- Timol, Fluka
- Alginato de sodio, Sigma-Aldrich
- Solución estándar de n-alcanos C8-C20, Sigma-Aldrich
- Agar y caldo Mueller Hinton (AMH) BD
- Dimetil sulfóxido (DMSO) Fermont
- Bromuro metil tiazol tetrazolio (MTT) Sigma Aldrich

### 2.1.4 Material biológico

- Aceite esencial extraído de la planta *Thymus vulgaris* (tomillo)
- *Pectobacterium carotovorum* ATCC15713

## **2.2 Obtención de cubiertas biopoliméricas a base de nanoingredientes por el método de *casting* y evaluación de sus propiedades mecánicas**

### **2.2.1 Obtención del NI**

Para la obtención del nanoingrediente (nanocápsulas poliméricas cargadas con el aceite esencial de *Thymus vulgaris* (AE-*Tv*)) se empleó la técnica de nanoprecipitación (Fessi, *et al.* 1989). Esta técnica consistió en inyectar una fase acuosa a la fase orgánica en agitación constante (700 rpm). La fase orgánica contenía el polímero Eudragit L100-55 disuelto en una mezcla de acetona-isopropanol y el AE-*Tv* (Salas-Cedillo, 2016).

Para eliminar los solventes orgánicos, se utilizaron dos técnicas de purificación: evaporación a presión reducida y diálisis. En la purificación por evaporación a presión reducida, las NC-AE-*Tv* se colocaron en un matraz bola en un rotavapor a 75 rpm a 37°C. Para el proceso de diálisis, las NC-AE-*Tv* se colocaron en una membrana de celulosa regenerada, en agitación constante a 350 rpm durante dos horas a 25°C.

Una vez purificado el NI, se incorporó el agente formador de cubiertas: el alginato de sodio (AL) con agitación magnética (350 rpm).

### **2.2.2 Caracterización fisicoquímica del NI**

- Tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta

Se determinó el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad del NI con

AL por espectroscopia de correlación fotónica en un ángulo de 90°. El potencial zeta se determinó por microelectroforesis con láser Doppler con el equipo Nanosizer, Malvern de la Facultad de Ciencias Biológicas (UANL). Se obtuvo la media ( $\bar{x}$ ) de las mediciones así como su desviación estándar ( $\sigma$ ).

- Contenido de los componentes del AE- *Tv* en el NI

Se utilizó la técnica de microextracción en fase sólida modalidad *headspace* (HS-SPME) previamente establecida por González-Moreno (2018) con un método por cromatografía de gases con detector de ionización de flama (CG-FID), (Lugo-Estrada, *et al*, 2019). Se calcularon los porcentajes de encapsulación (%E) y el porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE) con las Fórmulas 1 y 2, respectivamente.

$$\%E = \frac{(\text{mg componente del AE encapsulado})}{(\text{mg polímero} + \text{mg componente en AE})} * 100$$

*Fórmula 1*

$$\%EE = \frac{(\text{mg componente del AE encapsulado})}{(\text{mg componente en AE})} * 100$$

*Fórmula 2*

El cálculo de los %E y %EE se realizó para los tres componentes huella o mayoritarios en el AE- *Tv* incorporado en el NI purificado por diálisis y evaporación a

presión reducida. Se obtuvo la media ( $\bar{x}$ ) de las mediciones así como su desviación estándar ( $\sigma$ ). Además, se utilizó el método de normalización de áreas en base al AE-*Tv* comparadas con el NI.

### **2.2.3 Estabilidad del NI**

Para evaluar la estabilidad, el NI se colocó en viales ámbar, protegidos de la luz y almacenados durante cinco meses a 25°C. Durante este período de tiempo, se evaluó visualmente la apariencia física del NI, verificando la ausencia de agregados y sedimentos.

### **2.2.4 Obtención de la CB a partir del NI**

Para la obtención de la cubierta biopolimérica (CB) se utilizó la técnica de vaciado directo en placas de teflón o método de *casting* (González-Moreno, 2018). Se utilizó un volumen determinado de cada sistema: i) AL, ii) NP blanco (sin AE-*Tv*) con AL y iii) NI con AL. Para establecer las mejores condiciones de formación de la CB se evaluaron dos variables: el tiempo de secado (6, 12 y 24 h) y la concentración de AL (0.75, 1 y 2% p/v).

Los criterios de selección para establecer las mejores condiciones de formación de la CB fueron: formación completa, espesor, transparencia, resistencia al doblado, fácil remoción de la placa de teflón y homogeneidad.



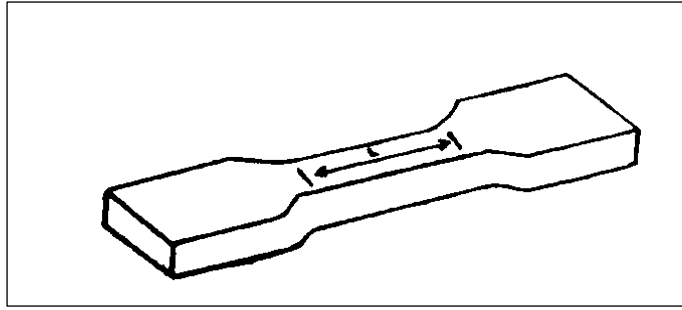
El espesor se midió con un calibrador micrométrico, por quintuplicado. Para la evaluación de la transparencia, la CB se colocó en la celda espectrofotométrica y se midió la absorbancia a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 600 nm de acuerdo a la norma ASTM D1746. La lectura se realizó por quintuplicado (Mohammadi, *et al.* 2018; Sothornvit, *et al.* 2009).

### **2.2.5 Caracterización mecánica de las CB**

Las CB que cumplieron con los criterios de selección, fueron sometidas a la evaluación mecánica con el texturómetro Texture Analyzer Brookfield. En este análisis se evaluó el porcentaje de elongación, la adhesión y el rompimiento de las CB, por triplicado. Se obtuvo la media ( $\bar{x}$ ) de las mediciones así como su desviación estándar ( $\sigma$ ).

#### **a) Evaluación del porcentaje de elongación**

Para la evaluación del porcentaje de elongación, se obtuvieron CB rectangulares de 10.5 cm<sup>2</sup> con ayuda de un suaje modificado de acuerdo a la norma ASTM DIN-412 presentado en la Figura 7. Estas CB fueron conservadas a una humedad relativa (HR) de 90% durante tres días. Posteriormente, para llevar a cabo la evaluación, las CB se colocaron en el texturómetro con los aditamentos específicos. La velocidad de estiramiento fue de 2 mm/seg a 25°C (Ver Anexo A).



**Figura 7.** Suaje tipo I utilizado en la determinación del porcentaje de elongación.

Los valores de porcentaje de elongación (% elongación) se obtuvieron utilizando la fórmula siguiente:

$$\% \text{ elongación} = \frac{L}{L_0} \times 100$$

*Fórmula 3*

Donde:

L = largo de la CB después del estiramiento

L<sub>0</sub> = largo original de la CB

#### b) Evaluación de la adhesión

Para esta evaluación, se obtuvieron CB de 18 cm<sup>2</sup>. Estas CB fueron conservadas a una HR de 90% durante tres días. Posteriormente se colocaron en el texturómetro sobre los aditamentos específicos. Se permitió la adhesión de la CB durante 20 segundos y la velocidad de despegue fue de 2 mm/seg.

c) Evaluación del rompimiento

Para la evaluación del rompimiento, se obtuvieron CB circulares con un área de 2.54 cm<sup>2</sup>. Estas CB fueron conservadas a HR de 90% durante tres días. Posteriormente fueron colocadas en el texturómetro sobre los aditamentos específicos y se evaluaron a una velocidad de rompimiento de 2 mm/ seg.

**2.3 Validación de un método de microextracción en fase sólida en la modalidad *headspace* (HS-SPME) para cuantificar los componentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris* en cubiertas biopoliméricas por cromatografía de gases con detección de ionización de llama (CG-FID)**

Para cuantificar los componentes del AE-*Tv* en la CB formadas a partir del NI, se realizaron las siguientes etapas: 1) caracterización química del AE-*Tv* por GC-MS, 2) validación del sistema y 3) validación del método.

**2.3.1. Caracterización química del AE-*Tv***

Se adquirió la planta de *Thymus vulgaris* (tomillo) en el Mercado Juárez de Monterrey, Nuevo León, México en junio del 2019. Las hojas y los tallos fueron cortados y sometidos a hidrodestilación en un equipo Clevenger modificado durante 4 h a partir de la ebullición del agua. Con el fin de identificar los componentes del aceite esencial del *Thymus vulgaris*, se realizó un análisis cualitativo por Cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS por sus siglas en inglés).

Las condiciones cromatográficas se establecieron en base a la elución de los alcanos (C8 al C20, C22 y C24) con una columna capilar HP-5MS [(5% Fenil)-metilpolisiloxano] de 30m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m. El programa del horno inició a 35°C, se mantuvo durante 9 min, después se calentó hasta 150°C (a 3°C/min) y se mantuvo por 10 min, posteriormente se elevó a 250°C (a 10°C/min) y finalmente se calentó hasta 270°C (a 3°C/min). La temperatura del inyector fue de 220°C y del detector de 150°C. Se usó el helio como gas acarreador, con un flujo de 0.5 mL/min, con pureza del 99.9% (Guerra-Boone, *et al.* 2015). Se inyectaron 2  $\mu$ L de aceite esencial de *Thymus vulgaris* a una concentración de 2 mg/mL en cloruro de metileno. Sus componentes se identificaron en base a la comparación con la biblioteca NIST (National Institute of Standards and Technology), al índice aritmético y al índice de Kovats (Adams, 2007).

Para establecer el área de los componentes del AE-Tv, se empleó un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de ionización de llama (CG-FID) con una columna capilar HP-5MS [(5% Fenil)-metilpolisiloxano] de 30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m con el mismo programa de calentamiento del horno del GC-MS. Se calculó el porcentaje de abundancia (%A) de los componentes del AE-Tv relativo al área de la señal obtenida. Posteriormente, se seleccionaron tres componentes "huella" con mayor %A para ser los componentes de seguimiento en la obtención del NI y en la formación de la CB. Finalmente se estableció la proporción de los tres componentes huella en base a la normalización de áreas.

### 2.3.2. Validación del sistema de *HS-SPME* por *CG-FID*

El método analítico de *HS-SPME* por *CG-FID* para cuantificar los componentes huella del *AE-Tv* en el *NI*, se desarrolló a partir de las condiciones cromatográficas previamente establecidas por Lugo-Estada y cols. (2017). El programa del horno inició a 50°C, después se calentó hasta 120°C (a 6°C/min) y se mantuvo durante 1 min, posteriormente se elevó a 280°C (a 25°C/min) y se mantuvo por 1 min. La temperatura del inyector fue de 270°C en modo Split (1:20). La temperatura del detector *FID* fue de 250°C. Se usó el helio como gas acarreador, con un flujo de 1.5 mL/min, con una pureza del 99.9%.

Para la técnica de *HS-SPME*, se utilizaron las condiciones de extracción establecidas previamente por González-Moreno (2018) las cuáles se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Condiciones óptimas para la extracción de los componentes huella a partir de la *CB-NI* con *HS-SPME* por *CG*.

Parámetro	Condición óptima
Volumen de <i>HS</i>	4 mL
Velocidad de agitación	250 rpm
Distancia fibra-muestra	6 mm
Tiempo de equilibrio	10 min
Temperatura de extracción	75°C
Tiempo de extracción	10 min

Para la validación del sistema se utilizaron CB blanco (formadas a partir de NP sin AE-Tv) y disoluciones de la mezcla de estándares de los tres componentes huella previamente establecidos: o-cimeno,  $\gamma$ -terpineno y timol. Los parámetros evaluados fueron: linealidad, precisión, límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ) en base a lo establecido por la IUPAC (2006) y por la Guía de Métodos Fisicoquímicos de la Comisión de Control Analítico y Ampliación de la Cobertura de la Secretaría de Salud (CCAYAC-P-058, 2011).

#### *-Linealidad*

La linealidad se determinó por la construcción de una curva de calibración con cinco niveles de concentración total (6, 12, 24, 48 y 96  $\mu\text{g/mL}$ ) por triplicado. Los estándares se sometieron al proceso de HS-SPME (Tabla 6) y análisis por CG-FID. Con los datos obtenidos se graficó la respuesta cromatográfica (áreas) en función de la concentración de los estándares y se realizó un análisis de regresión lineal. Los criterios de linealidad determinados para la curva de calibración fueron los siguientes:

-Coeficiente de determinación ( $r^2$ ): es el cuadrado del coeficiente de correlación y nos indica la variación de la respuesta cromatográfica respecto a la variación de la concentración. El coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.99 (SSA, 2011).

-Coeficiente de correlación (r): Este parámetro indica que tanto se ajustan los datos obtenidos de los estándares a una línea recta y nos dice que entre más cercano sea este coeficiente a 1, mayor será el grado de correlación lineal de la respuesta cromatográfica obtenida con las concentraciones analizadas. El coeficiente de correlación debe ser mayor a 0.99 (SSA, 2011).

#### *-Precisión*

Se evaluó con el porcentaje de desviación estándar relativa (%DER) de los factores de respuesta de los estándares de calibración, de acuerdo a la Fórmula 4. El valor debe ser  $DER < 20\%$  (SSA, 2011).

$$\%DER = \frac{S}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Fórmula 4}$$

%DER = Desviación estándar relativa en porcentaje

S = desviación estándar

$\bar{x}$  = media

#### *-Límite de detección*

Para establecer el límite de detección del sistema, se procesaron los valores obtenidos a partir de la curva de calibración y se utilizaron los valores de la ordenada al origen y la pendiente que se obtuvieron del análisis de regresión. El LD, se calculó con la siguiente fórmula:

$$LD = \frac{3.3 * sb_0}{m}$$

Fórmula 5

$sb_0$  = Desviación estándar de la ordenada al origen

$m$  = Pendiente de la curva de calibración

#### *-Límite de cuantificación*

Para establecer el límite de cuantificación del sistema, se procesaron los valores obtenidos a partir de la curva de calibración y se utilizaron los valores de la ordenada al origen y la pendiente que se obtuvieron del análisis de regresión. El LQ, se calculó con la siguiente fórmula:

$$LQ = \frac{10 * sb_0}{m}$$

Fórmula 6

$sb_0$  = Desviación estándar de la ordenada al origen

$m$  = Pendiente de la curva de calibración

### **2.3.3. Validación del método de HS-SPME por CG-FID**

Para la validación del método con HS-SPME, se usaron CB formadas a partir del NI (NC-AE-Tv) adicionadas con estándares de los componentes huella previamente establecidos: o-cimeno,  $\gamma$ -terpineno y timol.

Se evaluó linealidad, precisión y exactitud en base a lo establecido por la IUPAC (2006) y por la SSA (2011).



### *- Linealidad*

La linealidad se determinó por la construcción de una curva de calibración con cinco niveles de concentración total (6, 12, 24, 48 y 96 µg/mL) por triplicado. Las CB-NI y los estándares se sometieron al proceso de *HS-SPME* mostrado en la Tabla 6 y se analizaron por CG-FID. Con los datos obtenidos se graficó la respuesta cromatográfica (áreas) en función de la concentración de los estándares y se realizó un análisis de regresión lineal. Los criterios de linealidad determinados para la curva de calibración fueron los siguientes:

-Coeficiente de determinación ( $r^2$ ): es el cuadrado del coeficiente de correlación y nos indica la variación de la respuesta cromatográfica respecto a la variación de la concentración. El coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.99 (SSA, 2011).

-Coeficiente de correlación ( $r$ ): Este parámetro indica que tanto se ajustan los datos obtenidos de los estándares a una línea recta y nos dice que entre más cercano sea este coeficiente a 1, mayor será el grado de correlación lineal de la respuesta cromatográfica obtenida con las concentraciones analizadas. El coeficiente de correlación debe ser mayor a 0.99 (SSA, 2011).

### *-Precisión*

Se evaluó con el porcentaje de desviación estándar relativa (%DER) de los factores de respuesta de las CB-NI más los estándares de calibración, de acuerdo a la Fórmula 4. El valor debe ser  $DER < 20\%$  (SSA, 2011).

### *-Exactitud*

La exactitud del método se evaluó determinando el porcentaje de recuperación (%R) de los componentes huella, con la fórmula 7. El criterio de aceptación del %R es de 70-110% (SSA, 2011).

$$\text{Recuperación} = \frac{\text{Concentración encontrada}}{\text{Concentración adicionada}} \times 100$$

*Fórmula 7*

#### **2.3.4. Aplicabilidad del método *HS-SPME* por *CG-FID* en *CB-NI***

Las *CB-NI* muestra fueron sometidas a las condiciones de *HS-SPME* mostradas en la Tabla 6 y se cuantificó con el método de *CG-FID* validado. Las *CB-NI* muestra evaluadas fueron obtenidas a partir del *NI* purificado por evaporación a presión reducida y por diálisis.

## **2.4 Evaluación de la actividad antibacteriana del NI por el método de difusión en disco y microdilución en placa**

Se evaluó la actividad antibacteriana de las CB por las técnicas de difusión en disco y microdilución en placa con caldo Mueller- Hinton (CMH) contra la bacteria *Pectobacterium carotovorum* ATCC15713.

### **2.4.1 Técnica de difusión en disco**

Para la preparación de los controles, se utilizó la eritromicina como control positivo. Se elaboraron cubiertas de 0.28 cm<sup>2</sup> con 15 µg de eritromicina, según lo establecido por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), por sus siglas en inglés (CLSI documento M44-A2, 2010).

Como control negativo se utilizaron cubiertas de 0.28 cm<sup>2</sup> formadas a partir de: i) AL al 1% (p/v) y NP-blanco (sin AE-Tv) con AL al 1% (p/v).

Los inóculos bacterianos se prepararon a partir de un cultivo de *P. carotovorum* en agar Mueller Hinton de 24 - 48 h de crecimiento a 37°C. Se tomaron de 3 a 4 colonias y se depositaron en CMH y se incubaron a 37°C durante 24 - 37 h. Posteriormente 100 µL de suspensión se transfirieron a 3 mL de CMH y se incubaron a 37°C hasta alcanzar una turbidez de 0.5 del estándar de Mc Farland (0.085 a 0.100 de absorbancia a  $\lambda = 625$  nm).

Para la aplicación de la técnica de difusión en disco se sembró la bacteria *P. carotovorum* en una placa de agar Muller-Hinton (con tensoactivo al 0.01% p/p). La placa se dividió en cuatro secciones para colocar los tres controles: cubierta de eritromicina, cubierta de AL al 1% (p/v) y la cubierta de NP blanco (sin AE-Tv) con

AL al 1% (p/v), y en la cuarta sección, la CB-NI. Se incubaron a 37°C por 48 h, y posteriormente se midió el halo de inhibición en mm (CLSI, 2010).

#### **2.4.2 Técnica de microdilución en placa**

Para la preparación de los controles, se utilizó eritromicina como control positivo. Se preparó una solución acuosa a una concentración de 250 µg/mL (CLSI, 2010). Se depositaron 100 µL del control positivo en la placa y se realizó una dilución seriada.

El control del medio de cultivo se preparó utilizando CMH con tensoactivo al 0.01% (p/p). Se depositaron 200 µL de CMH con tensoactivo en cuatro pocillos de la microplaca. El control de disolvente se preparó tomando 20 µL de DMSO y disolviéndolos en 980 µL de CMH. Posteriormente se tomaron 100 µL, se colocaron en la placa y se realizaron diluciones seriadas. El control negativo o control de crecimiento se preparó depositando 100 µL de inóculo bacteriano, más 100 µL de CMH con tensoactivo en ocho pocillos de la microplaca.

Los inóculos bacterianos se prepararon a partir de un cultivo de *P. carotovorum* en agar Mueller Hinton de 24 - 48 h de crecimiento a 37°C. Se tomaron de 3 a 4 colonias y se depositaron en CMH y se incubaron a 37°C durante 24- 37 h.

Posteriormente 100 µL de suspensión se transfirieron a 3 mL de CMH y se incubaron a 37°C hasta alcanzar una turbidez de 0.5 del estándar de McFarland (0.085 a 0.100 de absorbancia a  $\lambda = 625$  nm). Finalmente, se realizó una dilución a una proporción 1: 50 con CMH para obtener la solución de trabajo.

Para la evaluación de las cubiertas muestra, se colocó una CB de 2.54 cm<sup>2</sup> en un tubo eppendorf de cada uno de los grupos a evaluar: i) AL al 1% (p/v), ii) CB-NP blanco (sin AE-*Tv*) con AL al 1% (p/v) y iii) CB-NI. Se les añadió 900 µL de agua y 100 µL de DMSO para disolver la CB, y a partir de esta solución, se tomaron 100 µL de cada muestra y se colocó en un pocillo para realizar las diluciones seriadas.

El ensayo de microdilución en placa se realizó en microplacas de 96 pocillos, a todos los pocillos de la periferia se les agregaron 200 µL de agua bidestilada estéril. En los pocillos correspondientes al control del medio de cultivo se les agregaron 200 µL de CMH con tensoactivo, mientras que a los restantes se les agregaron 100 µL de CMH con tensoactivo. En cada pocillo por triplicado, se colocaron 100 µL de las muestras a evaluar y del control positivo. A continuación, en la Tabla 7, se muestran las concentraciones finales que se obtuvieron del control positivo y las muestras.

**Tabla 7.** Concentraciones evaluadas de los componentes de la cubierta biopolimérica por el método de microdilución en placa.

<b>CB</b>	<b>Componente de la CB</b>	<b>Concentración (µg/mL)</b>
CB-eritromicina	Eritromicina	83.33, 41.66, 20.83, 10.41 y 5.20
CB-AL	AL	3000, 1500, 750, 375 y 178.50
CB- NP blanco (sin AE- <i>Tv</i> )	Polímero	5250, 2625, 1325.50, 656.25 y 328.12
CB-NI	AE- <i>Tv</i> (timol)	30.30, 15.15, 7.57, 3.78 y 1.89

Posteriormente, se adicionaron 100  $\mu$ L del inóculo bacteriano a los pocillos de muestras, de control positivo, de control negativo y control de disolvente. La microplaca se incubó a 37°C durante 24 horas.

Para establecer la CMI, se utilizó la sal de MTT. Las células metabólicamente activas transformaron el MTT en formazán produciendo un color púrpura directamente proporcional a la viabilidad celular. Una vez incubada la microplaca se les añadió a los pocillos interiores 10  $\mu$ L de una solución de MTT (5 mg/mL). La CMI se estableció como la concentración en la que ya no se observa un cambio en la coloración.

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS

#### 3.1 Obtención de cubiertas biopoliméricas a base del nanoingrediente por el método de *casting* y evaluación de sus propiedades mecánicas

##### 3.1.1 Caracterización fisicoquímica del NI

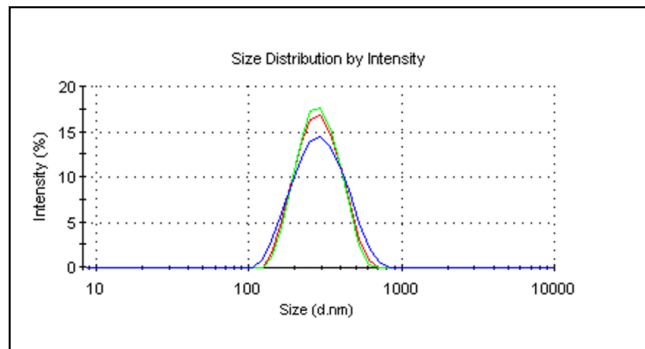
La medición del tamaño de partícula, índice de polidispersidad y el potencial zeta, se presentan en la siguiente tabla:

**Tabla 8.** Características fisicoquímicas del nanoingrediente con aceite esencial de *Thymus vulgaris* obtenido por la técnica de nanoprecipitación.

Lote de NI	Tamaño (nm)	Índice de polidispersidad <sup>1</sup>	Potencial zeta (mV)
NC-AE- <i>Tv</i>	276 ± 2.35	0.156 ± 0.02	-54.66 ± 2.60

<sup>1</sup> Varía de 0 a 1, un valor más cercano a 1 corresponde a una distribución de tamaño del NI menos homogénea. ( $\bar{x} \pm \sigma$ , n=3)

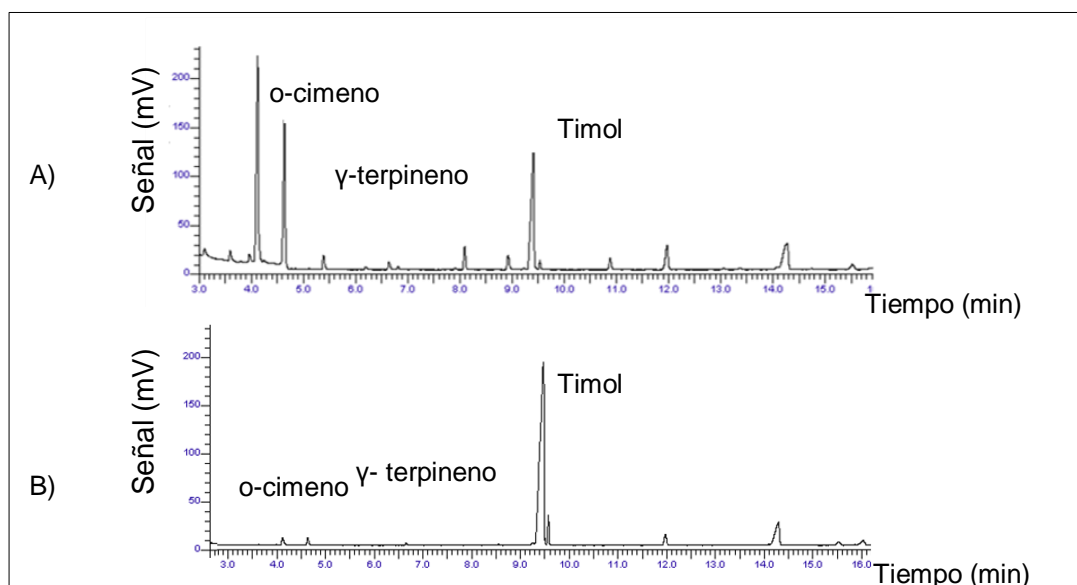
La Figura 8 muestra la curva de distribución de tamaño de partícula del nanoingrediente.



**Figura 8.** Curva de distribución del tamaño del NI con aceite esencial de *Thymus vulgaris* obtenido por la técnica de nanoprecipitación.

- Contenido de los componentes del AE-*Tv* en el NI

El NI fue sometido a la técnica de *HS-SPME* (Tabla 6) y analizado por el método de CG-FID validado (Capítulo 2.3). En la Figura 9 se muestran los cromatogramas obtenidos a partir del NI con AE-*Tv* purificado por dos técnicas: A) diálisis y B) evaporación a presión reducida.



**Figura 9.** Cromatogramas obtenidos a partir del NI con AE-*Tv* purificado por dos técnicas: A) diálisis y B) evaporación a presión reducida por *HS-SPME*/ CG-FID.



Se calcularon directamente los porcentajes de encapsulación (%E) y eficiencia de encapsulación (%EE) con las fórmulas 1 y 2, respectivamente. En la Tabla 9 se muestran los %E y %EE de los tres componentes huella del AE-Tv a partir del NI purificado por diálisis y evaporación a presión reducida.

**Tabla 9.** Porcentajes de encapsulación (%E) y eficiencia de encapsulación (%EE) de los componentes de AE-Tv en el NI purificado por diálisis y evaporación a presión reducida.

Técnica de purificación	Componente del AE-Tv			
	Porcentaje (%)	o-cimeno	γ-terpineno	timol
Diálisis	%E	8.64 ± 1.89	6.90 ± 1.21	17.13 ± 0.98
	%EE	18.11 ± 1.34	15.43 ± 0.53	34.86 ± 0.10
Evaporación a presión reducida	%E	0.370 ± 0.11	0.33 ± 0.11	30.61 ± 0.50
	%EE	0.80 ± 0.10	0.83 ± 0.13	53.91 ± 1.47

( $\bar{x} \pm \sigma$ , n=3)

### 3.1.2 Estabilidad del NI

Se llevó a cabo la evaluación visual de la estabilidad del NI por cinco meses, donde no se observaron agregados ni sedimentos, ni presencia de una capa oleosa.

### 3.1.3 Obtención de la CB a partir del NI

Las CB se formaron por la técnica de vaciado directo en placas de teflón o *casting* a temperatura ambiente. Para establecer las mejores condiciones de formación de la CB se evaluaron dos variables: el tiempo de secado (6, 12 y 24 h) y la concentración de AL (0.75, 1 y 2% p/v). Cabe mencionar que las CB no se formaron con un tiempo de secado de 6 y 12 h a temperatura ambiente, únicamente se formaron CB con un tiempo de secado de 24 h (Anexo B). En la Tabla 10, se muestran las características físicas de las CB formadas con alginato a tres concentraciones a temperatura ambiente.

**Tabla 10.** Características físicas de las CB formadas de alginato a tres concentraciones a temperatura ambiente con tiempo de secado de 24 h.

Concentración de AL (%) p/v	Espesor ( $\mu\text{m}$ )	Transparencia <sup>a</sup>	Resistencia al dobléz <sup>b</sup>	Remoción de la placa de teflón <sup>c</sup>	Homogeneidad (CB completa) <sup>d</sup>
0.75	70 $\pm$ 0.02	++++	+++	++++	++++
1.00	70 $\pm$ 0.01	++++	++++	++++	++++
2.00	90 $\pm$ 0.02	++++	++	++++	++

( $\bar{x} \pm \sigma$ , n=5)

a (++++) Muy transparente

(+++)  
Transparente

(++) Moderadamente  
transparente

(+) Opaca/blanquecina

b (++++) Muy resistente

(+++)  
Resistente

(++) Moderadamente resistente

(+) Quebradiza

c (++++) Fácil remoción

(+++)  
Removible sin  
deformación

(++) Difícil remoción

(+) Difícil con deformación

d (++++) Muy Homogénea

(+++)  
Homogénea

(++) Moderadamente  
homogénea

(+) Poco homogénea

En la Tabla 11 se muestran las características físicas de las CB formadas a partir de NP blanco (sin AE-  $T_V$ ) y AL a tres concentraciones a temperatura ambiente con un tiempo de secado de 24 h.

**Tabla 11.** Características físicas de las CB formadas de NP blanco y alginato a tres concentraciones a temperatura ambiente con tiempo de secado de 24 h.

Concentración de AL (%) p/v	Espesor ( $\mu\text{m}$ )	Transparencia <sup>a</sup>	Resistencia al dobléz <sup>b</sup>	Remoción de la placa de teflón <sup>c</sup>	Homogeneidad (CB completa) <sup>d</sup>
0.75	110 $\pm$ 0.02	+++	++	++++	+++
1.00	200 $\pm$ 0.01	+++	++	++++	+++
2.00	250 $\pm$ 0.02	++	+	++++	++

( $\bar{x} \pm \sigma$ , n=5)

a (++++) Muy transparente

(+++) Transparente

(++) Moderadamente transparente

(+) Opaca/blanquecina

b (++++) Muy resistente

(+++) Resistente

(++) Moderadamente resistente

(+) Quebradiza

c (++++) Fácil remoción

(+++) Removible sin deformación

(++) Difícil remoción

(+) Difícil con deformación

d(++++) Muy Homogénea

(+++) Homogénea

(++) Moderadamente homogénea

(+) Poco homogénea

En la Tabla 12 se muestran las características físicas de las CB formadas a partir de NI y AL a tres concentraciones a temperatura ambiente con un tiempo de secado de 24 h.

**Tabla 12.** Características físicas de las CB formadas de NI y AL a tres concentraciones a temperatura ambiente con tiempo de secado de 24 h.

Concentración de AL (%) p/v	Espesor ( $\mu\text{m}$ )	Transparencia <sup>a</sup>	Resistencia al dobléz <sup>b</sup>	Remoción de la placa de teflón <sup>c</sup>	Homogeneidad (CB completa) <sup>d</sup>
0.75	110 $\pm$ 0.01	++++	+++	++++	++++
1.00	180 $\pm$ 0.01	++++	++++	++++	++++
2.00	210 $\pm$ 0.02	+++	+++	++++	++++

$(\bar{x} \pm \sigma, n=5)$	a (++++) Muy transparente	b (++++) Muy resistente	c (++++) Fácil remoción	d (++++) Muy Homogénea
	(+++) Transparente	(+++) Resistente	(+++) Removible sin deformación	(+++) Homogénea
	(++) Moderadamente transparente	(++) Moderadamente resistente	(++) Difícil remoción	(++) Moderadamente homogénea
	(+) Opaca/blanquecina	(+) Quebradiza	(+) Difícil con deformación	(+) Poco homogénea

En base a las características físicas de las CB, se eligieron aquellas CB formadas con AL al 1% (p/v) para su caracterización mecánica, determinación del contenido de componentes del AE-*Tv* y evaluación antibacteriana.

### 3.1.4 Caracterización mecánica de las CB

Para la caracterización mecánica, se evaluó el porcentaje de elongación, la adhesión y el rompimiento de las CB formadas a partir de: i) AL al 1% (p/v), ii) NP blanco (sin AE-*Tv*) con AL al 1% (p/v) y iii) NI con AL al 1% (p/v). En la Tabla 13 se muestran los resultados obtenidos en la evaluación mecánica de las CB.

**Tabla 13.** Características mecánicas de las CB formadas a partir de AL, NP blanco o NI a temperatura ambiente con tiempo de secado de 24 h.

<b>CB*</b>	<b>Elongación (%)</b>	<b>Adhesión (dinas/ cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Rompimiento (g/cm<sup>2</sup>)</b>
CB-AL	90.76 ± 0.71	4,690.86 ± 2.00	947.73 ± 2.26
CB- NP blanco- AL	78.28 ± 0.75	4,989.22 ± 1.03	590.54 ± 2.09
CB-NI-AL	176.66 ± 0.82	5,768.27 ± 2.63	1,445.26 ± 6.41

\* Todas las cubiertas biopoliméricas contienen alginato (AL) al 1% (p/v)

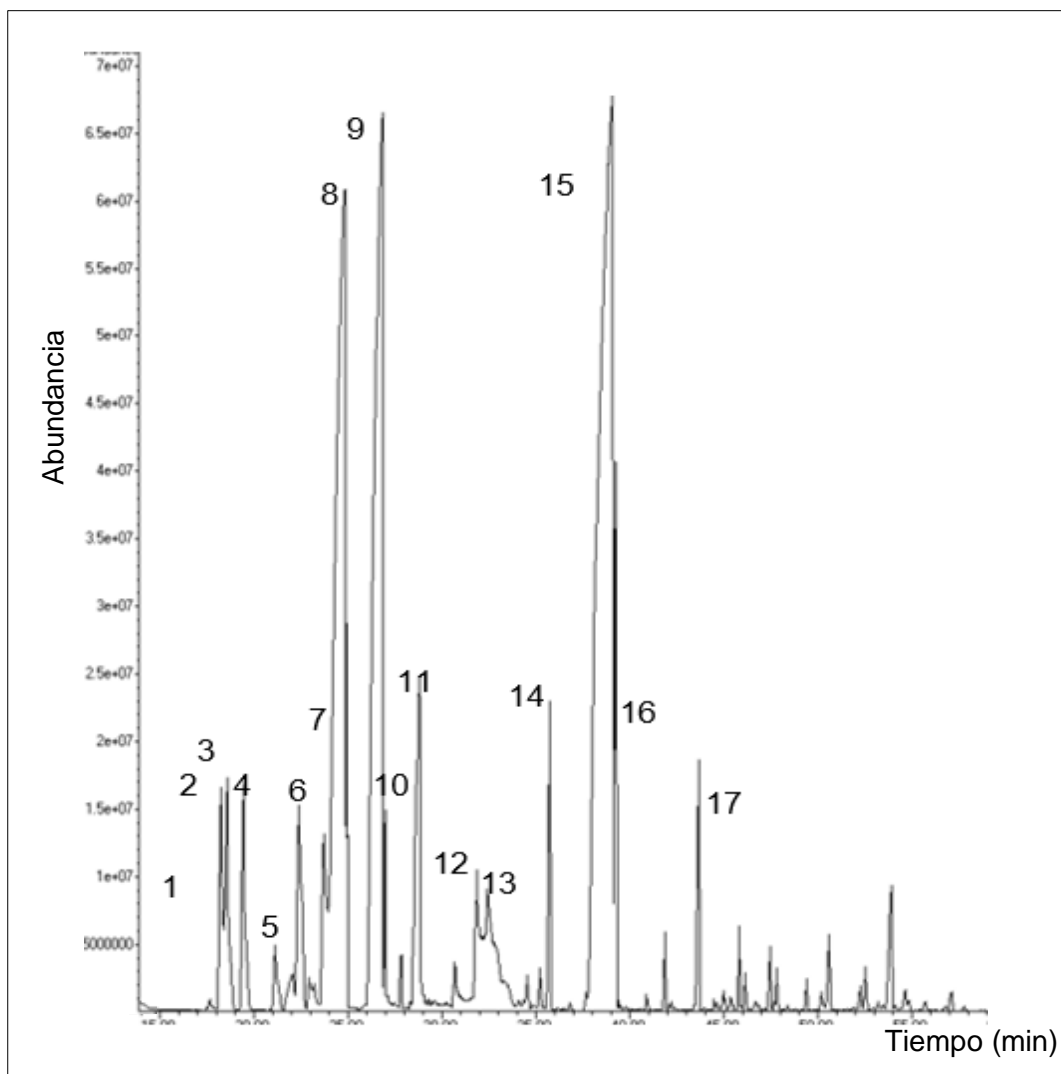
( $\bar{x} \pm \sigma$ , n=3)

### **3.2 Validación de un método de microextracción en fase sólida en la modalidad *headspace* (HS-SPME) para cuantificar los componentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris* en cubiertas biopoliméricas por cromatografía de gases con detección de ionización de llama (CG-FID)**

Para cuantificar los componentes del AE-*Tv* en la CB formadas a partir del NI, se realizaron las siguientes etapas: 1) caracterización química del AE-*Tv* por GC-MS, 2) validación del sistema y 3) validación del método.

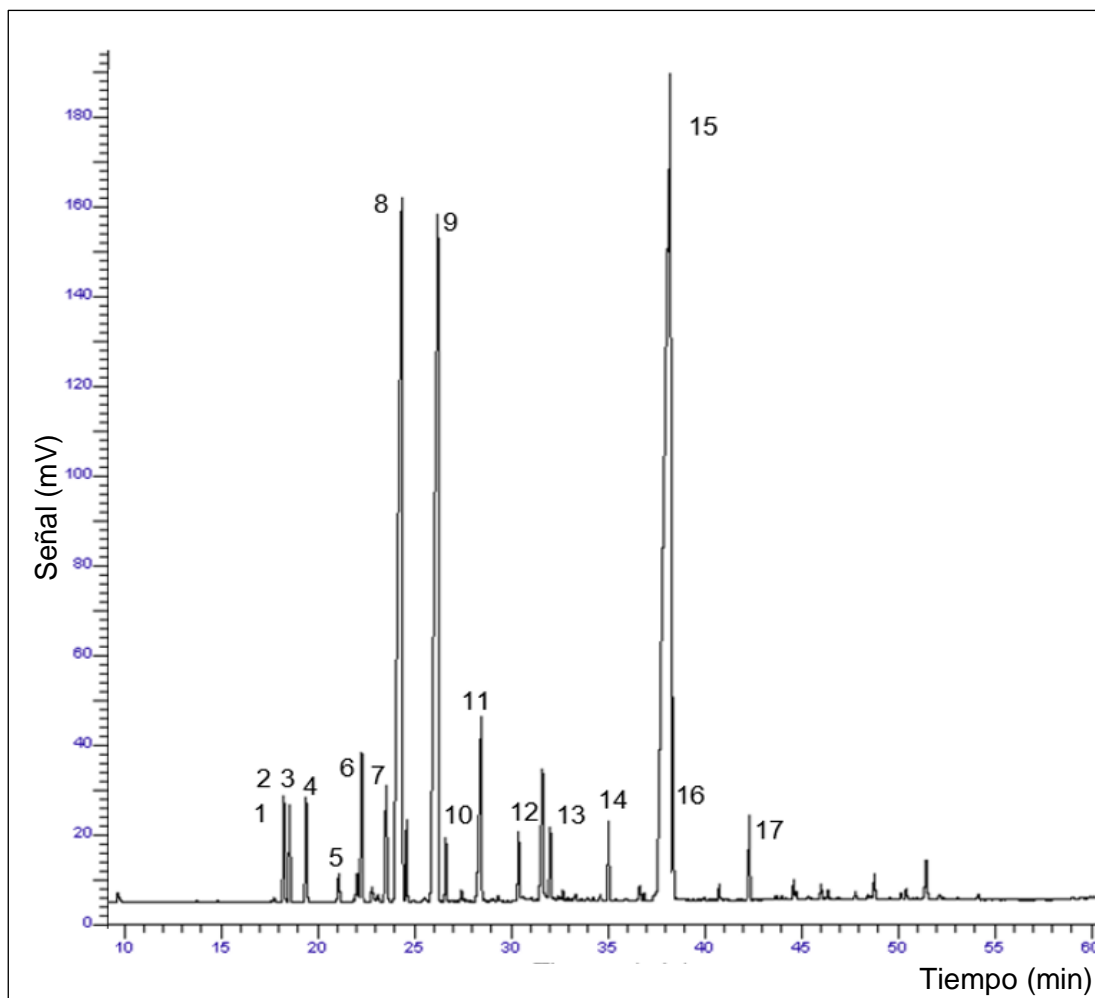
#### **3.2.1 Caracterización química del AE-*Tv***

La caracterización química del AE-*Tv* fue realizada por CG-MS y CG-FID. En la Figura 10 se muestra el cromatograma del AE-*Tv* obtenido por CG-MS. Se identificaron 17 componentes en el AE-*Tv* en base a la comparación con la biblioteca NIST (National Institute of Standards and Technology), al índice aritmético y al índice de Kovats (Adams, 2007).



**Figura 10.** Cromatograma del AE- *Tv* (2 mg/mL) en diclorometano por CG-MS. Los componentes son:  $\alpha$ -tujeno (1),  $\alpha$ -pineno (2), canfeno (3), sabineno (4), 3- octenol (5), mirceno (6),  $\alpha$ -terpineno (7), *o*-cimeno (8),  $\gamma$ -terpineno (9), linalool (10), camfor (11), borneol (12), 4-terpinenol (13), carvacrol metil éter (14), timol (15), carvacrol (16),  $\epsilon$ -cariofileno (17).

En la Figura 11 se muestra el cromatograma del AE- *Tv* obtenido por CG-FID. Enseguida, se determinó el porcentaje de abundancia (%A) de los 17 componentes en función a su área relativa.



**Figura 11.** Cromatograma del AE-*Tv* (2 mg/mL) en diclorometano por CG-FID. Los componentes son:  $\alpha$ -tujeno (1),  $\alpha$ -pineno (2), canfeno (3), sabineno (4), 3- octenol (5), mirceno (6),  $\alpha$ -terpineno (7), o-cimeno (8),  $\gamma$ -terpineno (9), linalool (10), camfor (11), borneol (12), 4-terpinenol (13), carvacrol metil éter (14), timol (15), carvacrol (16),  $\epsilon$ -cariofileno (17).

En la Tabla 14 se muestra la composición química del AE-*Tv*, el tiempo de retención así como el porcentaje de abundancia de los 17 componentes identificados. Los componentes mayoritarios en el AE fueron: timol, o-cimeno y  $\gamma$ -terpineno, y se establecieron como los componentes de seguimiento durante la

obtención del NI y la formación de la CB. Posteriormente, en base a la normalización de áreas de las señales cromatográficas del o-cimeno,  $\gamma$ -terpineno, y timol, se estableció que su proporción es de 20:18:62, respectivamente. Cabe mencionar que ésta proporción fue considerada durante la etapa de validación del método cromatográfico de *HS-SPME* por *CG-FID* (3.2.2).

**Tabla 14.** Composición química del aceite esencial de *Thymus vulgaris* por Cromatografía de gases acoplada a MS y FID.

#	Composición	tR (min)	Abundancia (%A)	Tipo de componente
1	$\alpha$ - tujeno	18.79	2.13	Monoterpeno alifático
2	$\alpha$ - pineno	18.93	1.83	Monoterpeno alifático
3	canfeno	19.75	2.05	Monoterpeno alifático
4	sabineno	19.86	0.64	Monoterpeno alifático
5	3- octenol	21.81	3.20	Alcohol
6	mircenol	22.13	3.09	Monoterpeno alifático
7	$\alpha$ - terpineno	23.35	5.87	Monoterpeno alifático
8	o-cimeno	24.26	17.76	Monoterpeno alifático
9	$\gamma$ - terpineno	26.35	13.25	Monoterpeno alifático
10	linalool	26.88	1.24	Monoterpeno oxigenado
11	camfor	28.78	3.54	Monoterpeno oxígeno
12	borneol	30.26	1.37	Monoterpeno oxígeno
13	4- terpinenol	32.14	1.39	Monoterpeno oxígeno
14	carvacrolmetil éter	35.16	9.15	Monoterpeno oxígeno
15	timol	38.14	30.91	Monoterpeno oxígeno
16	carvacrol	38.98	1.58	Monoterpeno oxígeno
17	$\epsilon$ - cariofileno	42.44	1.00	Sesquiterpeno alifático
	TOTAL		100	



### 3.2.2 Validación del sistema de *HS-SPME* por *CG-FID*

Para la validación del sistema, se utilizaron disoluciones de la mezcla de estándares de los tres componentes huella: o-cimeno,  $\gamma$ -terpineno y timol y CB blanco (sin NC-AE-*Tv*). Se sometieron al proceso de *HS-SPME* con las condiciones óptimas mostradas en la Tabla 6.

Se evaluó linealidad, precisión, límite de detección y límite de cuantificación en base a lo establecido por la IUPAC (2006) y por la Guía de Métodos Físicoquímicos de la Comisión de Control Analítico y Ampliación de la Cobertura de la Secretaría de Salud (CCAYAC-P-058, 2011). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 15.

**Tabla 15.** Parámetros de validación del sistema para cuantificar o-cimeno,  $\gamma$ -terpineno y timol del AE-*Tv* con *HS-SPME* por *CG-FID*.

Parámetro	o-cimeno	$\gamma$ -terpineno	Timol	Referencia
Linealidad ( $R^2$ )	0.999	0.998	0.999	> 0.99
LD ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.42	0.35	1.01	< Concentración más baja del intervalo de trabajo
LQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	1.28	1.06	3.06	< Concentración más baja del intervalo de trabajo
Precisión (%DER)	10.29	3.68	2.73	<20%

### 3.2.3 Validación del método de *HS-SPME* por *CG-FID*

Para la validación del método se utilizaron CB formadas a partir del nanoingrediente adicionadas con la mezcla de estándares de o-cimeno,  $\gamma$ -terpineno y timol. Se sometieron al proceso de *HS-SPME* bajo las condiciones descritas en la Tabla 6.

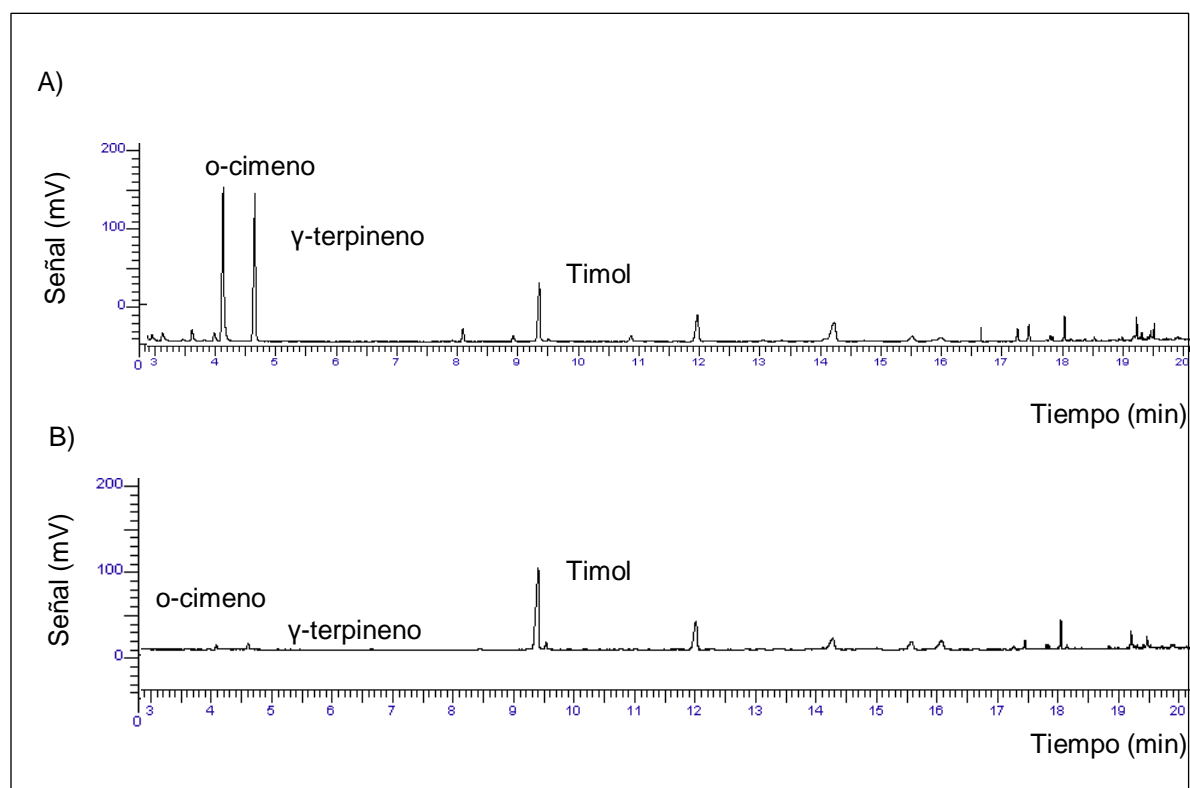
Se evaluó linealidad, exactitud y precisión en base a lo establecido por la IUPAC (2006) y por la Guía de Métodos Fisicoquímicos de la Comisión de Control Analítico y Ampliación de la Cobertura de la Secretaría de Salud (CCAYAC-P-058, 2011). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 16.

**Tabla 16.** Parámetros de validación del método para cuantificar o-cimeno,  $\gamma$ -terpineno y timol del AE-*Tv* con *HS-SPME* por *CG-FID*.

Parámetro	o-cimeno	$\gamma$ -terpineno	Timol	Referencia
Linealidad ( $R^2$ )	0.994	0.998	0.999	>0.99
Precisión (%DER)	7.30	3.45	2.79	<20%
Exactitud (%Recuperación)	102.32	101.72	105.71	70-110%

### 3.2.4. Aplicabilidad del método de *HS-SPME* por *CG-FID* en la *CB-NI*

En la Figura 12, se muestran los cromatogramas de la *CB* formada con el *NI*, obtenidos con el método de *HS-SPME* por *CG-FID* previamente validado. Cabe mencionar que el *NI* utilizado para formar las *CB*, fueron purificados por dos técnicas: A) diálisis y B) evaporación a presión reducida.



**Figura 12.** Cromatogramas de las *CB-NI* obtenido con el método de *HS-SPME* por *CG-FID* validado. El *NI* fue purificado por dos técnicas: A) diálisis y B) evaporación a presión reducida.

En base a las señales cromatográficas (Figura 12), se calculó la cantidad de o-cimeno,  $\gamma$ -terpineno y timol presente en las CB. En la Tabla 17, se muestra la cantidad de cada componente huella presente en la CB formada a partir del NI purificado por diálisis y evaporación a presión reducida.

**Tabla 17.** Contenido de o-cimeno,  $\gamma$ -terpineno y timol en las CB formadas a partir del NI con AE-*Tv* purificado por diálisis y evaporación a presión reducida.

Técnica de purificación de NI	Componente del AE- <i>Tv</i> en la CB- NI ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )		
	o- cimeno	$\gamma$ -terpineno	Timol
Diálisis	47.24 $\pm$ 1.01	59.05 $\pm$ 1.52	17.17 $\pm$ 0.85
Evaporación a presión reducida	9.37 $\pm$ 1.28	10.87 $\pm$ 1.03	35.78 $\pm$ 1.23

( $\bar{x} \pm \sigma$ , n=3)

Con la finalidad de determinar el porcentaje de incorporación de los tres componentes huella en la CB a partir del NI después de la técnica de *casting* a temperatura ambiente con un tiempo de secado de 24 h, se compararon las señales cromatográficas del o-cimeno,  $\gamma$ -terpineno y timol en la CB-NI (Figura 12) con las señales cromatográficas del NI (Figura 9). Los resultados se muestran en la Tabla 18.

**Tabla 18.** Porcentaje de incorporación de los componentes huella del AE-*Tv* en la CB a partir del NI formada por la técnica de *casting* a temperatura ambiente con tiempo de secado de 24 h.

Técnica de purificación del NI	Porcentaje de incorporación del componente del AE- <i>Tv</i> en la CB (%)		
	o-cimeno	γ-terpineno	Timol
Diálisis	42.62± 1.92	56.91± 1.99	29.41± 0.95
Evaporación a presión reducida	37.57 ± 1.45	41.96 ± 1.90	61.64± 1.03

( $\bar{x} \pm \sigma$ , n=3)

### 3.3 Evaluación de la actividad antibacteriana del NI por el método de difusión en disco y microdilución en placa

Se evaluó la actividad antibacteriana de las CB por las técnicas de difusión en disco y microdilución en placa con caldo Mueller- Hinton (CMH) contra la bacteria *Pectobacterium carotovorum* ATCC15713.

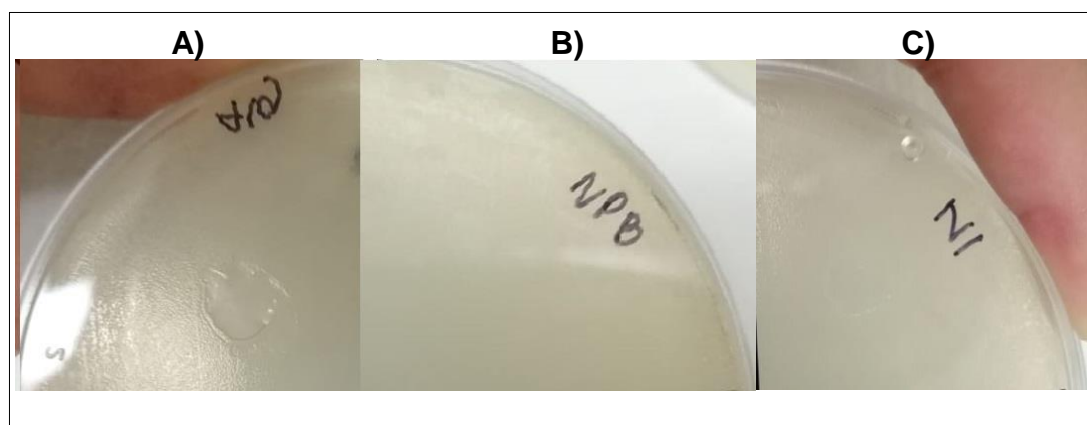
#### 3.3.1 Técnica de difusión en disco

En la Tabla 19 se muestran la inhibición de la bacteria *Pectobacterium carotovorum* ATCC15713 después de la aplicación de las CB formada a partir de AL, NP blanco (sin AE-*Tv*) o NI.

**Tabla 19.** Resultados del método de difusión en disco de la bacteria *Pectobacterium carotovorum* ATCC 15713.

Sistema	Crecimiento <i>P. carotovorum</i> ATCC 15713
CB-AL	(+)
CB- NP blanco (sin AE- Tv)	(+)
CB-NI	(+)

En la Figura 13 se observa el crecimiento bacteriano *Pectobacterium carotovorum* ATCC15713 con las CB.



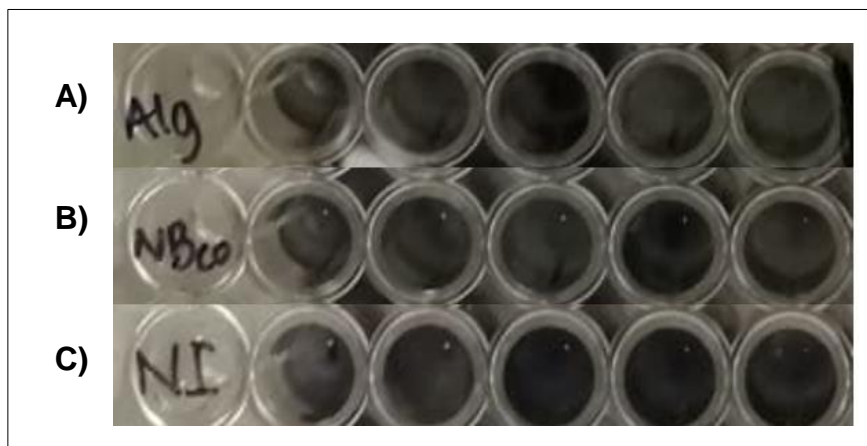
**Figura 13.** Crecimiento bacteriano de *Pectobacterium carotovorum* en agar MH con A) CB de AL al 1% (p/v), B) CB-NP blanco y C) NI.

### 3.3.2 Técnica de microdilución en placa

Por otro lado, en la técnica de microdilución en placa, se observó un cambio en la coloración de amarillo pálido a púrpura en todas las concentraciones evaluadas, lo que indica crecimiento bacteriano, tal y como se observa en la Tabla 20 y en la Figura 14.

**Tabla 20.** Resultados del método de microdilución en placa de la bacteria *Pectobacterium carotovorum* ATCC 15713.

CB	Componente de la CB	Concentración (µg/mL)	Crecimiento <i>P. carotovorum</i> ATCC 15713
CB-AL	AL	3000	(+)
		1500	
		750	
		375	
		187.5	
CB- NP blanco (sin AE- Tv)	Polímero	5250	(+)
		2625	
		1325.5	
		656.25	
		328.12	
CB-NI	AE- Tv (Timol)	30.3	(+)
		15.15	
		7.57	
		3.78	
		1.89	



**Figura 14.** Crecimiento bacteriano de *Pectobacterium carotovorum* en CMH en los pocillos correspondientes de A) CB de AL al 1% (p/v), B) CB-NP blanco y C) NI.



## CAPITULO IV

### DISCUSIÓN

#### **4.1 Obtención de cubiertas biopoliméricas a base del nanoingrediente por el método de *casting* y evaluación de sus propiedades mecánicas**

La técnica de nanoprecipitación o también llamada técnica de *desplazamiento de solventes* fue descrita por primera vez por Fessi y cols. (1987), como un procedimiento novedoso y simple para la preparación de nanocápsulas a partir de polímeros preformados, tanto biodegradables como no biodegradables.

La formación de NC por la técnica de nanoprecipitación está basada en el mecanismo de turbulencia interfacial, fenómeno producido durante el desplazamiento de un solvente orgánico en una de las fases. Como ambas fases presentan miscibilidad entre ellas, se presenta una difusión de la fase orgánica en la acuosa con la subsecuente formación de gotas de tamaño nanométrico de solvente con el polímero. Debido al desplazamiento de estas cadenas poliméricas hacia un medio en el que son insolubles, están se agregan y forman las NC (Fessi, *et al.* 1989; Tao, *et al.* 2019).

Con base al fundamento, se ha establecido que la formación de NC se ve influenciada por diversos factores, los cuáles fueron tomados en cuenta para llevar a cabo la formación del NI (nanocápsula cargada con aceite esencial de *Thymus vulgaris*). Entre estos factores, destacan el tipo de polímero y disolvente así como la concentración de polímero en la fase orgánica (Ehprem, *et al.* 2014). La familia de polímeros Eudragit son polímeros biocompatibles, versátiles y no tóxicos, que se utilizan en la industria farmacéutica debido a sus propiedades de disolución y a que proporcionan total flexibilidad a las formas farmacéuticas sólidas orales. Específicamente, el polímero Eudragit L100-55, es un copolímero aniónico de ácido metacrílico y etil acrilato. Este copolímero presenta una relación de grupos carboxilo libres y grupos éster de aproximadamente 1:1, además los monómeros están distribuidos de manera aleatoria a lo largo de la cadena polimérica (Evonik, 2015). Este polímero ha sido ampliamente utilizado para mejorar la solubilidad de los activos no polares y en la formación de cubiertas y/o películas (Tang, *et al.* 2011).

El disolvente utilizado en la formación del NI por la técnica de nanoprecipitación, debía ser miscible en agua para favorecer la difusión de la fase orgánica hacia la fase acuosa. Martínez-Rivas y cols. (2017) establecen que los disolventes más polares presentan una alta afinidad solvente-agua, promoviéndola difusión del disolvente y la partición de las cadenas poliméricas en la fase acuosa, conduciendo a la formación de NP con menor tamaño.

Así mismo, la formación de NC se ve influenciada por la concentración del polímero en la fase acuosa. Gómez-Gaete y cols. (2018) reportaron que una concentración mayor de polímero produce una interacción polímero-polímero mayor, por tanto, más cadenas de polímero permanecen asociadas durante la difusión del

disolvente en el medio acuoso. Esto aumenta la viscosidad de la solución orgánica, lo que a su vez provoca una difusión más lenta del disolvente orgánico a la fase acuosa, por lo que lleva a una formación de gotas más grandes, que lleva como consecuencia la formación de NC de mayor tamaño.

Las ventajas de la nanoprecipitación sobre otras técnicas de encapsulación son: 1) buena reproducibilidad, 2) obtención de tamaños de nanopartículas con distribución estrecha, 3) simplicidad, 4) facilidad de escalamiento y 4) compatible con el medio ambiente ya que se limita el uso de grandes cantidades de solventes tóxicos. Por lo anterior, la nanoprecipitación se ha convertido en una estrategia importante en industria farmacéutica, agrícola, alimentaria y cosmética (Miladi, *et al.* 2016).

Una vez obtenido el NI, se llevó a cabo su caracterización fisicoquímica. Se midió su tamaño, índice de polidispersidad (IP) y potencial zeta. Como se muestra en la Tabla 8, se obtuvo un tamaño de partícula de  $276 \pm 2.35\text{nm}$ , el cual es cercano al tamaño deseado de 200 nm. Álvarez-Román, *et al.* (2004) observaron que nanopartículas con este tamaño, presentan una distribución homogénea cuando son aplicadas sobre superficies rugosas, como sería el caso de la superficie de frutas y hortalizas. Además, este tamaño nanométrico de NI, permite aumentar la relación entre área superficial y su área de contacto (Sotelo-Boyás, *et al.* 2017). Es decir, su tamaño nanométrico, permitiría tener una mayor superficie del NI directamente en contacto con la superficie del producto hortofrutícola a partir de la cual se daría la posterior liberación de los componentes activos del AE-*Tv*.

Liakos y cols. (2016) formaron NC de tamaño de 220 nm, a partir de acetato de celulosa y AE de limón con la técnica de nanoprecipitación y en su estudio demostraron que la presencia de NC mejoraba significativamente la actividad antimicrobiana comparada con el AE libre. Por otro lado Froiio y cols. (2019) obtuvieron NC con un tamaño de 208 nm a partir del polímero Eudragit RS 100 y AE de naranja. En este estudio se demostró que las NC tienen una buena actividad antibacteriana contra *E. coli*. En otro estudio, Granata y cols. (2018) obtuvieron NC con AE de *Thymus capitatus* con un tamaño promedio de  $171 \pm 2.0$  nm. En esta investigación, se reportó una mejora en la actividad antimicrobiana de las NP cargadas con AE, mostrando una mayor actividad contra patógenos encontrados en los alimentos en comparación con el AE no nanoencapsulado.

Con relación al IP, este parámetro se asocia con la medición del grado de variabilidad del tamaño de las NC. Los valores de IP varían de 0 a 1, el valor más alto indica una distribución de tamaño menos homogénea, mientras que los valores cercanos a cero, indican que la muestra es monodispersa, es decir, presenta una variabilidad mínima del tamaño de población (Galindo-Rodríguez y cols. 2004). Se obtuvo un IP de  $0.156 \pm 0.02$ , lo que indica una homogeneidad de las NC, esto se observa en la curva de distribución de tamaño en la Figura 8. La homogeneidad en el tamaño del NI, es una característica que garantizaría que las interacciones individuales de las NC con la superficie de los productos hortofrutícolas (i.e.: adhesión o liberación de los componentes activos del AE), también sean homogéneas.

Otra característica fisicoquímica evaluada fue el potencial zeta (Tabla 8). Este valor es la medición del potencial electrostático en la doble capa eléctrica que rodea

la NC en suspensión acuosa. Las NC con un potencial zeta mayor a +30 mV o menor a -30 mV se consideran fuertemente catiónicas o aniónicas, respectivamente y suelen tener altos grados de estabilidad (Clogston y Patri, 2011).

Así mismo la medición del potencial zeta asegura mayores fuerzas de repulsión electrostática entre las NC y esto conduce a mayores distancias de separación entre las NC en la suspensión, reduciendo la agregación ocasional causada por las interacciones de Van der Waals. El potencial zeta también se puede usar para determinar si un material activo cargado está encapsulado dentro del centro de la NP o en la superficie (Fraj, *et al.* 2019). El potencial zeta del NI fue de  $-54.66 \pm 2.60$  este valor negativo indica que las cargas negativas son dominantes en la superficie del NI y esto se le puede atribuir al Eudragit L 100-55, el cual es un copolímero aniónico. Por lo tanto, durante la formación del NI, las cadenas de polímero rodearon el núcleo oleoso de AE-*Tv* para formar la pared de polímero y sus grupos funcionales quedaron expuestos al medio acuoso externo (Tao, *et al.* 2019). Este potencial negativo facilitaría la interacción del NI con la membrana de las bacterias patógenas presentes en los productos hortofrutícolas. Posteriormente, se favorecería la interacción directa de los componentes activos del AE-*Tv* con la bacteria aumentando de esta forma su efectividad antimicrobiana (Wang, Hu y Shao, 2017).

Por otro lado, también como parte de la caracterización fisicoquímica del NI se determinó el porcentaje de encapsulación (%E) y el porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE) de los tres componentes huella: o-cimeno,  $\gamma$ -terpineno y timol. Estos parámetros permiten establecer el contenido de los componentes del AE en

las NC para su correcta dosificación en el producto hortofrutícola. Para cuantificar los tres componentes huella del AE-*Tv* en el NI, se utilizó el método de *HS-SPME* por *CG-FID* validado (Capítulo 2.3.2 y 2.3.3). En la Tabla 9 se muestran los %E y los %EE de los tres componentes del AE-*Tv* en el NI purificado por diálisis y evaporación a presión reducida.

Cuando el NI fue purificado por diálisis, se obtuvo un %E de 8.64 para el *o*-cimeno, de 6.90 para  $\gamma$ -terpineno y de 17.13% para el timol, lo anterior representa un %E total de 32.67%. Esto significa que aproximadamente el 33% de la NC está formada por los tres componentes huella del AE-*Tv* y el resto corresponde al polímero Eudragit L 100-55. El %E total obtenidos en este trabajo fue dos veces más pequeño que el obtenido por Lugo-Estrada (2019), donde también se llevó a cabo la encapsulación del AE-*Tv* por nanoprecipitación y la purificación, por la técnica de diálisis. Esta diferencia podría deberse a que Lugo-Estrada utilizó la  $\epsilon$ -policaprolactona como polímero formador de las NC y se favoreció la interacción polímero-AE.

Por otro lado, Salas-Cedillo utilizó el mismo polímero que en este trabajo (Eudragit L 100-55) para encapsular el AE de *Schinus molle* por nanoprecipitación con diálisis como técnica de purificación de las NC y obtuvo un %E total de 7.84% para los tres componentes huella (mirceno,  $\alpha$ -felandreno y limoneno). Este valor es cuatro veces más pequeño que el obtenido en este trabajo. Esto podría deberse a que la eficiencia de encapsulación también depende de las propiedades fisicoquímicas de los componentes (*i.e.*: polaridad, volatilidad) así como del % de abundancia en el AE.

En relación al %EE obtenido del NI purificado por diálisis, fue de 18.11, 15.43 y 34.86% para o-cimeno,  $\gamma$ -terpineno y timol respectivamente, por lo que se obtuvo un %EE total de 70.4%. Lo anterior indica que los tres componentes fueron encapsulados en un 70% con respecto a su abundancia en el AE inicial. Este valor coincide con el obtenido por Cakir y cols. (2020), con NP de quitosano con el AE-Tv con %EE del 64.1%. En otras publicaciones también mencionan que los porcentajes de eficiencia de encapsulación de activos no polares, se encuentra alrededor del 80% cuando se utiliza la técnica de nanoprecipitación (Cartaxo, *et al.* 2019; Mora-Huertas, *et al.* 2010). Esto podría ser debido a que los componentes polares presentan una mayor tendencia a difundir de la fase orgánica a la fase acuosa, lo cual podría favorecer la encapsulación de los compuestos no polares (Wu, Luo y Wang, 2012).

Por otro lado, en la Tabla 9, se muestra que, cuando el NI es purificado por evaporación a presión reducida, los valores del %E y %EE obtenidos para el o-cimeno y  $\gamma$ -terpineno, son menores que cuando es purificado por diálisis. Así mismo en la Figura 9, se muestran los cromatogramas obtenidos a partir de NI purificado por diálisis y por evaporación a presión reducida. En el cromatograma A, se observan tres señales principales atribuidas al o-cimeno,  $\gamma$ -terpineno y timol (capítulo 2.3.1) y en el cromatograma B se observa una sola señal atribuida al timol, componente al que se le atribuye la actividad antimicrobiana y antioxidante del AE-Tv.

Estos resultados, indican que por sus propiedades fisicoquímicas, los componentes con una mayor presión de vapor (o-cimeno y  $\gamma$ -terpineno) se ven afectados bajo las condiciones utilizadas en la técnica de evaporación a presión

reducida, mientras que el timol, se ve afectado en la técnica de diálisis probablemente debido a su polaridad.

Estos mismos hallazgos, fueron reportados por Silva-Flores y cols. (2019), con NC de AE de *Lavandula dentata*, donde se observó que los componentes con mayor presión de vapor (1,8-cineol y  $\beta$ -pineno) se encontraban en mayor porcentaje cuando se utilizaba la diálisis como técnica de purificación que con evaporación a presión reducida.

En cuanto a la estabilidad del NI, se realizó una evaluación visual por cinco meses de las formulaciones y no se observó la presencia de AE libre en la superficie de las formulaciones, ni agregados de polímero u algún cambio macroscópico importante. Cabe resaltar que es necesario revisar por un tiempo determinado si no hay cambios en la estabilidad de las NC. Investigaciones como la de Chow y cols. (2014) con NP de curcumina, reportaron que incluso después de la obtención adecuada de estas NP, fueron inestables después de 2 a 3 días, debido a la agregación de NP y la recristalización de la curcumina.

Una vez obtenido y caracterizado el NI, se llevó a cabo la formación de las CB por la técnica de vaciado convencional o método *casting*. Esta técnica involucra desde la obtención de la dispersión de los componentes de la CB (NI y AL), hasta la evaporación del solvente o del agua a temperatura y humedad controlada para formar la CB (Solano, *et al.* 2018). La formación de una cubierta a partir del NI, involucra una serie de etapas, entre las que se encuentran:



-Etapa 1: el polímero del NI que se encuentra disperso está separado y suspendido en la fase acuosa por las fuerzas de repulsión electrostáticas que existen entre las partículas.

-Etapa 2: Durante el proceso de evaporación del agua, en el NI se ponen en contacto las NC, unas con otras, lo que provoca que la tensión interfacial entre el agua y el polímero aumente, de manera que estas forman un paquete de NC separadas por una fina película del agua.

-Etapa 3: La elevada tensión interfacial existente entre las NC origina un fenómeno de capilaridad, que a su vez les proporciona la energía necesaria para vencer la fuerza de repulsión entre ellas y comenzar así su deformación y colapso.

-Etapa 4: Las NC se van a fusionar unas con otras, ocurriendo una coalescencia completa, por consiguiente se produce una difusión del material particular para dar origen a la cubierta (Aulton, *et al.* 1995).

Para la formación de las CB, se evaluó el tiempo de secado (6, 12 y 24 h) así como la concentración de AL (0.75, 1 y 2% p/v). Se llevó a cabo la evaluación visual macroscópica de las cubiertas, así como la medición de su espesor y transparencia. Estas propiedades físicas de las cubiertas son fundamentales, ya que influyen en la apariencia del producto hortofrutícola, una vez aplicada la cubierta. Las características físicas de las CB de los tres grupos evaluados (AL, NP-blanco (sin AE-Tv) y NI) se muestran en las Tablas 10, 11 y 12. Cabe destacar que solo se obtuvieron CB con tiempo de secado de 24 h a temperatura ambiente. El tiempo de secado de 6 y 12 horas, no fue suficiente para la completa

evaporación del agua y por consecuente, la formación de la cubierta. La evaporación del agua a temperatura ambiente es muy lenta, por lo que se requiere al menos de 24 horas, para que el proceso de evaporación sea homogéneo, lo cual provoca la coalición de las partículas poliméricas y por ende la formación de la cubierta. Cabe mencionar que la formación de la CB a partir del NI, se debe de realizar a temperatura ambiente para asegura la permanencia de los componentes huella del AE-*T<sub>v</sub>*.

En la Tabla 10, se presentan las características físicas de las cubiertas formadas a partir de AL, a una concentración de 0.75, 1 y 2% (p/v). De forma general, en las tres concentraciones evaluadas se obtienen cubiertas muy transparentes con buenas características macroscópicas, sin embargo, a una concentración de 1% (p/v), se obtuvieron las cubiertas con mayor resistencia al dobléz y más homogéneas.

Posteriormente en la Tabla 11, se presentan las características físicas de las cubiertas formadas a partir de NP blanco (sin AE-*T<sub>v</sub>*) más AL de 0.75, 1 y 2% (p/v). Estas CB son moderadamente transparentes, además se observó que a mayores concentraciones de AL, se obtuvieron CB con mayor espesor, lo que provoca resistencia al dobléz.

Así mismo, en la Tabla 12, se presentan las características físicas de las cubiertas formadas a partir del NI, a una concentración de AL de 0.75, 1 y 2% (p/v). Las CB obtenidas tuvieron muy buenas propiedades macroscópicas, sin embargo a la concentración de 1% (p/v), las CB eran muy resistentes al dobléz y muy transparentes.

En los tres grupos evaluados, se observó que las cubiertas con las mejores características macroscópicas, eran las que tenían una concentración de AL 1% (p/v). Esto podría atribuirse a que el AL 1% (p/v), le imparte la fluidez adecuada a las cadenas poliméricas que forman el NI. Estos cambios son causados por un decremento de las fuerzas intermoleculares a lo largo de la cadena polimérica (reducción en la fuerza de cohesión polímero- polímero). Esto se atribuye a que las moléculas del plastificante (i.e.: AL) se oponen a las ramificaciones del polímero, suavizando las partículas poliméricas adyacentes y por ende se favorecen las interacciones polímero-plastificante debido a que estos enlaces son más fuertes que los del polímero- polímero. De esta manera las fuerzas capilares creadas durante el fenómeno de evaporación del agua, son suficientes para la formación de una cubierta homogénea. Estos resultados coinciden con aquellos obtenidos por Siracusa y cols. (2018) donde elaboraron cubiertas comestibles de AL (1% p/p) y AE de citral con excelentes propiedades físicas. Además, se observó que a altas concentraciones de AL, las cubiertas presentaban un mayor espesor y por ende una menor resistencia y flexibilidad.

En base a las características físicas de las CB, se eligieron aquellas cubiertas formadas con AL 1% (p/v) con tiempo de secado de 24 horas a temperatura ambiente para la caracterización mecánica, determinación del contenido de componentes del AE- *Tv* y evaluación antibacteriana.

En relación a la caracterización mecánica, se evaluaron tres parámetros: porcentaje de elongación, adhesión y rompimiento. Estos parámetros mecánicos nos indican las características que presentan las CB, ya que durante su

elaboración y aplicación, las CB deben presentar: i) buen porcentaje de elongación con la finalidad de evitar un rompimiento en el momento de empaquetamiento o manipulación, ii) adecuada adhesión en la superficie del producto hortofrutícola donde será aplicada, iii) buena resistencia al rompimiento para asegurar su integridad y iv) textura suave, lisa y transparente para no comprometer su apariencia física (González-Moreno, *et al.* 2018). Las características mecánicas de las CB formadas a partir del AL, NP blanco y NI se muestran en la Tabla 13. El porcentaje de elongación (%) nos indica el porcentaje de cambio máximo en la longitud de la cubierta antes de romperse (Rangel-Marron, *et al.* 2018). Se observó que la CB-NI se pudo estirar o elongar en un  $176.66 \pm 0.82\%$  de su tamaño inicial. Este valor es aproximadamente dos veces mayor que el obtenido para las cubiertas formadas por AL y por NP blanco. Esta característica de aumentar su estiramiento, es atribuida a la presencia del NI en la cubierta.

El efecto de la adición de NI sobre las propiedades mecánicas de las cubiertas comestibles es bastante complejo y se ha reportado en la literatura, la mejora de las características de estiramiento o elongación.

Tal es el caso de la investigación realizada por Liang y cols. (2017) donde desarrollaron películas comestibles basadas en quitosano y un NI (nanocápsulas cargadas de galato de epigallocatequina). La adición del NI a las cubiertas de quitosano aumentó el porcentaje de elongación con respecto a la cubierta formada únicamente con quitosano. Así mismo, estos hallazgos fueron reportados por Noronha y cols. (2014) donde se obtuvieron cubiertas a partir de

metilcelulosa con un NI, conformado por nanocápsulas de  $\alpha$ -tocoferol. Se reportaron cambios significativos en el porcentaje de elongación con la incorporación de NI en cubiertas en comparación con la cubierta control. El aumento en los valores del porcentaje de elongación indicó que la incorporación de NI proporciona una mayor flexibilidad en las cubiertas.

Así mismo, se comparó con el trabajo realizado por González-Moreno (2018), en el cuál se llevó a cabo la evaluación del porcentaje de elongación de CB sin NI, formadas a partir de quitosano al 2% (p/v) con carvacrol al 1%(v/v), componente del AE de orégano. Se observó que la CB se elongaba un  $49.4 \pm 7.02\%$ , valor que es tres veces menor que el obtenido en este trabajo con las CB con NI y AL.

Esto podría indicar que la adición de NI modificaría también las interacciones con los agentes formadores de cubierta como el AL. Se ha propuesto que una dispersión homogénea de NC hidrófoba en una red polimérica de AL, aumenta el espacio entre las cadenas de macromoléculas, lo que reduce la unión iónica y de puente de hidrógeno entre las cadenas poliméricas e induce el desarrollo de discontinuidades estructurales en las cubiertas, lo cual aumentaría el porcentaje de elongación (Sánchez-González, *et al.* 2009).

Por otro lado, la evaluación de la adhesión nos indica la magnitud de la fuerza que tiene que aplicarse sobre la CB para ser despegada de la superficie donde fue colocada.

En la Tabla 13, podemos observar que la fuerza que debe ser aplicado sobre la CB formada a partir de NI para ser despegada, fue de  $5,768.27 \pm 2.63$  dinas/cm<sup>2</sup>.

Este valor es mayor que el de las CB formadas a partir de las NP-blanco y de AL. Es decir, el NI favorece la adhesión de la CB sobre la superficie aplicada.

Así mismo, este efecto se observó en el estudio realizado en nuestro grupo de trabajo (González-Moreno, *et al.* 2017) en donde se evaluó la adhesión de cubiertas a base de quitosano al 2% (p/v) con carvacrol al 1%(v/v) sin NI y se obtuvo un valor de  $2,710 \pm 1.03$  dinas/cm<sup>2</sup>. Este valor es dos veces más pequeño que el obtenido en este trabajo con cubiertas formadas con NI.

El parámetro de adhesión es indicativo de la permanencia de la CB sobre el producto hortofrutícola. Las propiedades de adhesión de las cubiertas, están determinadas por las propiedades intrínsecas del polímero formador del NI y por el ambiente en el cual es colocada. Entre las propiedades intrínsecas, se encuentra el peso molecular, la concentración del polímero, la flexibilidad de las cadenas poliméricas y los grupos químicos que puedan formar uniones electrostáticas o secundarias como son los puentes de hidrógeno y las fuerzas de Van der Waals.

La tercera evaluación mecánica evaluada fue el rompimiento de las CB, este parámetro indica el peso que puede resistir la cubierta antes de romperse. En la Tabla 13, se observa que la CB formada a partir del NI resiste  $1,445.26 \pm 6.41$  g/cm<sup>2</sup> antes de romperse. Este valor es mayor que el de las CB formadas a partir de las NP-blanco y de AL. Es decir, el NI favorece la resistencia de la CB cuando una fuerza es aplicada favoreciendo así su resistencia.

El aumento de la resistencia al rompimiento por el NI, también fue observado en el trabajo desarrollado por Jancy y cols. (2020), donde se elaboraron cubiertas a partir de un NI, formado por NP y AE de semilla de hinojo. Se encontró que la presencia del NI, aumentaba hasta siete veces la resistencia al rompimiento.

Esta aseveración también se observó en el estudio realizado en nuestro grupo de trabajo (González-Moreno, *et al.* 2017) en donde se evaluó el rompimiento de cubiertas a base de quitosano al 2% (p/v) con carvacrol al 1%(v/v) sin NI y se obtuvo un valor de  $236.19 \pm 8.10 \text{ g/cm}^2$ , valor seis veces menor que el obtenido en este trabajo con CB formadas con el NI.

Del mismo modo, se comparó con el trabajo realizado por González-Moreno (2018), en el cuál se llevó a cabo la evaluación del rompimiento de CB formadas a partir de NC-AE-*Tv* y pululano al 1% (p/v). Se observó que la CB resistía hasta un peso de  $70.13 + 8.82 \text{ g/cm}^2$  antes de romperse, valor que es menor que el obtenido con la CB formada con AL 1% (p/v). Por lo que la presencia del NI y del AL, favoreció el aumento de la resistencia al rompimiento.

Esto podría deberse a que existe una mayor interacción entre el NI y el AL, comparado con el NI y pululano. El AL interacciona fuertemente con el NI lo que produce un efecto de reticulación. El NI se comporta como un centro de ajuste, que disminuye la movilidad de la cadena polimérica y mejoran la resistencia a la tracción o rompimiento (Nissar, *et al.* 2018).

La evaluación mecánica de la cubierta dependerá del tipo de material utilizado en la formulación de la solución para elaborar la cubierta, las condiciones de formación de la cubierta, el tipo de plastificante, de la naturaleza del disolvente, de la evaporación del solvente y de su espesor. Es conveniente destacar que dependiendo del uso y aplicación, serán las propiedades físicas y mecánicas deseadas para que las cubiertas puedan cumplir con el objetivo por el cual fueron elaboradas.

#### **4.2 Validación de un método de microextracción en fase sólida en la modalidad *headspace* (HS-SPME) para cuantificar los componentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris* en cubiertas biopoliméricas por cromatografía de gases con detección de ionización de llama (CG-FID)**

El aceite esencial de *Thymus vulgaris* se obtuvo por hidrodestilación modificada de Clevenger a partir de la planta de tomillo fresco. Esta técnica ha sido comúnmente utilizada para la extracción de AE ya que evita la degradación del material vegetal. El AE es extraído a partir de la planta junto con el vapor de agua y es separado después de la condensación. La extracción del AE por hidrodestilación es variable y depende de parámetros, como la temporada de colecta, tipo de suelo, lugar de cosecha y variedad de la planta (Dilworth, *et al.* 2017).

La caracterización química realizada por CG-MS y CG-FID permitió identificar los componentes presentes en el AE-*Tv*, así como su porcentaje de abundancia. La CG-FID representa una técnica que ofrece una alta selectividad para el análisis de compuestos volátiles y semivolátiles, una alta sensibilidad, gran estabilidad y un rango dinámico lineal excepcionalmente alto que permite el análisis de AE a concentraciones muy bajas o en niveles de trazas.

Inicialmente, se obtuvo el cromatogramas del AE (Figura 10) utilizando el método de CG-MS, previamente desarrollado (Guerra-Boone, *et al.* 2015). Posteriormente se realizó la correcta identificación de los componentes presentes en el AE en base a la biblioteca NIST, al índice de Kovats y al índice aritmético. Después, el cromatograma CG-MS fue comparado con el cromatograma obtenido por CG-FID (Figura 11) y se calculó el porcentaje de abundancia (%A) en base a las



áreas relativas. En la Tabla 14, se muestra la composición química, el tiempo de retención y el %A de los componentes identificados. En el AE-*Tv*, se identificaron 17 componentes, el 49.18% del porcentaje total del AE corresponde a monoterpenos oxigenados, el 46.62% a monoterpenos hidrocarbonados o alifáticos, el 3.02% a alcoholes y el 1% a sesquiterpenos alifáticos. Los componentes con mayor %A fueron el o-cimeno (17.76%), el  $\gamma$ -terpineno (13.25%) ambos monoterpenos alifáticos, y el timol (30.91%) un monoterpeno oxigenado. Este resultado coincide con lo reportado por Piña-Barrera y cols. (2019), donde reportaron como componentes mayoritarios el o-cimeno (32.68%), timol (31.90%) y  $\gamma$ -terpineno (15.69%). Por otro lado, Pellegrini y cols. (2018) mencionan que el compuesto mayoritario del AE-*Tv* fue el timol con un porcentaje de 44%. Esto también coincide con la investigación de Satyal y cols. (2016) donde reportaron como componente mayoritario del AE-*Tv* el timol con un porcentaje de 47.06%.

De igual manera, los resultados de la caracterización química del AE-*Tv* en el presente trabajo fueron similares a los mencionados por Satyal y cols. (2016), quienes reportaron que los componentes principales para el AE-*Tv* eran el timol (23-60%),  $\gamma$ -terpineno (18-50%) y o-cimeno (8-44%).

Sin embargo, diversos autores han reportado, otros componentes mayoritarios del AE-*Tv*. Tal es el caso de Mansouri y cols. (2018) donde reportaron que el compuesto principal fue carvacrol (73.03%), el p-cimeno (9.99%),  $\beta$ -cariofileno (3.63%) y  $\gamma$ -terpineno (3.02%). En este estudio el timol si estaba presente en el AE-*Tv* pero en una pequeña cantidad (1.14%). Así mismo Imelouane y cols. (2019), reportaron como componente mayoritario el camfor (38.54%), canfeno (7.19%),  $\alpha$ -pineno (9.35%), borneol (4.91%) y  $\beta$ -pineno (3.90%).

Las diferentes abundancias de los componentes reportadas en los estudios anteriores se deben a las variaciones en la temporada de recolección, año de colecta, región y/o clima donde crece la planta, así como la localización de la especie analizada y los métodos de obtención el AE (Amiri, 2012).

Con el objetivo de realizar el seguimiento de los componentes del AE-*Tv* en las CB, se seleccionaron los componentes mayoritarios del AE en base a su abundancia y actividad antibacteriana. Se eligió al o-cimeno,  $\gamma$ -terpineno y timol. Cabe resaltar que el timol, ha sido reportado en numerosas publicaciones como el responsable de la actividad antibacteriana del AE-*Tv*. La actividad antibacteriana del AE-*Tv* está relacionada con los grupos funcionales de sus componentes (por ejemplo, el grupo fenólico del timol). En general, el timol tiene la capacidad para atravesar la pared celular bacteriana y penetrar entre las cadenas de ácidos grasos de la bicapa lipídica, haciendo que la membrana celular sea mucho más permeable y, como resultado, ocasionan la muerte de la bacteria (Diao, Hu, Zhang, & Xu, 2014; Grande-Tovar, *et al.* 2018).

Posteriormente, con el propósito de cuantificar los componentes huella del AE-*Tv* en las CB-NI, se llevó a cabo la validación del método de *HS-SPME* por CG-FID (González, *et al.* 2018). Este método se validó bajo los criterios para la validación de métodos fisicoquímicos expedidos por la comisión de control analítico y ampliación de cobertura de la Secretaría de Salud (CCAYAC-P058, 2011). Para la validación del sistema se evaluaron los parámetros de linealidad, precisión, límite de detección y límite de cuantificación, según la IUPAC (2006). En la Tabla 15, se muestran los parámetros evaluados en la validación del sistema. En relación a la

linealidad, para los tres componentes seleccionados se obtuvo un coeficiente de determinación mayor a 0.99 como lo establece la SSA (2011). De esta forma, se estableció que, dentro del rango de concentración de 6-96 µg/mL, la respuesta analítica tendrá un comportamiento lineal a la concentración. Con respecto a los LD y LQ para el o-cimeno, γ-terpineno y timol fueron menores al nivel inferior de la curva de calibración, lo cual es aceptable según la SSA (2011). Para la precisión del sistema, se calculó el %DER de los factores de respuesta y se estableció que el sistema fue preciso para los tres componentes debido a que presentó un %DER menor al 20% (SSA, 2011).

En la Tabla 16 se muestran los valores de los parámetros evaluados en la validación del método. En cuanto a la linealidad, para los tres componentes se obtuvo un coeficiente de determinación mayor a 0.99, lo que indica que los tres son lineales. Para la precisión, se calculó el %DER a partir de los factores de respuesta obtenidos con las CB formadas a partir del NI y adicionadas con la mezcla de estándares. Los valores obtenidos para los tres componentes fueron menores al 20% y fueron aceptados de acuerdo al valor reportado por la SSA (2011), por lo cual se establece que es un método preciso para la cuantificación de los tres componentes. En cuanto a la exactitud se evaluaron los porcentajes de recuperación, en donde se obtuvo que para los tres componentes el método era exacto, ya que están dentro del rango de aceptación (70- 110%) (SSA, 2011), para el o-cimeno se obtuvo un 102.32%, para γ-terpineno un valor de 101.72% y para el timol 105.71% Estos datos concuerdan con lo reportado por Lugo-Estrada (2019), donde se obtienen porcentajes de recuperación entre el 98 y 109% de tres de los

componentes de AE-*Tv* a partir de NP aplicando un método de *HS-SPME* por FID-GC.

Una vez validado el método, se llevó a cabo la cuantificación de los componentes huella del NI en CB por *HS-SPME* / CG-FID. En la Figura 12a, se muestra el cromatograma obtenido de la CB formada a partir del NI purificado por diálisis. Los tres componentes huella del AE-*Tv* fueron detectados y cuantificados con el método desarrollado y se determinó una cantidad de 47.24, 59.05 y 17.17  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de CB para el o-cimeno,  $\gamma$ -terpineno y timol respectivamente (Tabla 17). Por otro lado, en la Figura 12b, se observa el cromatograma obtenido de la CB formada a partir del NI purificado por evaporación a presión reducida. Los tres componentes fueron detectados y cuantificados como se muestra en la Tabla 17. Para el o-cimeno se obtuvo una cantidad de 9.37  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de CB, mientras que para el  $\gamma$ -terpineno y timol, se obtuvieron 10.87 y 35.78  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

En diferencia de la mayoría de los polisacáridos, el AL forma cubiertas prácticamente independientes de la temperatura, aspecto que lo ha hecho atractivo en la formación de CB. El empleo del AL como agente formador de cubierta, resultó adecuado para la formación de CB a temperatura ambiente ya que evitó la pérdida de los componentes del AE-*Tv* del NI. La disminución de las pérdidas de los componentes en el NI, podrían deberse a que al no utilizar una temperatura elevada durante la formación de la CB se vio favorecida la permanencia de los componentes más volátiles. Así mismo, esto podría deberse a que el AL tiene la capacidad de formar retículos poliméricos tridimensionales, que contribuyen a la conservación de los componentes en la CB.

En la Tabla 18, se muestran los porcentajes de incorporación de los componentes huella del AE-Tv en la CB a partir del NI formada por la técnica de *casting*. Se puede observar que aunque la técnica de formación de CB fue la misma, hay una diferencia en el porcentaje de incorporación en la CB con respecto al NI y sus técnicas de purificación. Existe una relación con la cantidad inicial que existe de cada componente en el NI y su porcentaje incorporado en la CB. A mayor cantidad de componente en el NI, el porcentaje incorporado en la CB aumenta. Esto podría deberse, a que las cantidades iniciales de cada componente es diferente en el NI, por lo que al llevar a cabo la formación de la CB, se da la incorporación de los componentes que se encuentran en mayor cantidad.

Es decir, en el caso del timol, al llevar a cabo la formación de la CB a partir del NI purificado por evaporación a presión reducida, se observa una disminución en la incorporación de los componentes, o-cimeno y  $\gamma$ -terpineno de 42.62 a 37.57% y 56.91 a 41.96% respectivamente, comparado con la purificación del NI por diálisis.

#### **4.3 Evaluación de la actividad antibacteriana del NI por el método de difusión en disco y microdilución en placa**

Posteriormente, se llevó a cabo la evaluación de la actividad antibacteriana de las CB por las técnicas de difusión en disco y microdilución en placa con caldo Mueller- Hinton (CMH) contra la bacteria *Pectobacterium carotovorum* ATCC15713. Ambas metodologías han sido reportadas, ampliamente en la bibliografía para evaluar la actividad antibacteriana de CB. Con respecto a la evaluación con la

técnica de difusión en disco, se observó crecimiento bacteriano, en los sectores de la placa de agar correspondientes a las CB de AL, NP blanco (sin AE-*Tv*) y NI (Tabla 19).

Esto coincide con lo reportado por Arroyo y cols. (2020) en donde se llevó a cabo la aplicación de cubiertas formadas a partir de AL en guayabas. En este estudio se reportó que el uso de cubiertas de AL, no inhibía el crecimiento bacteriano en la fruta. Esto mismo, fue reportado por Sarengaowa y cols. (2019). Los resultados mostraron que la cubierta formada a partir de AL, no inhibió el crecimiento de bacterias Grampositivas y Gramnegativas en melón recién cortado.

El crecimiento bacteriano, correspondiente a las CB de AL y NP-blanco (sin AE-*Tv*) observado en la Figura 13, es un hallazgo muy importante, ya que nos permite establecer que los componentes del NI, como el AL y el polímero utilizado en la obtención de las NP (Eudragit L100-55) no inhiben el desarrollo de la bacteria *Pectobacterium carotovorum* ATCC15713. Por otro lado, la CB formada a partir del NI, no inhibió el crecimiento bacteriano, debido posiblemente a que la cantidad de timol, se encontraba por debajo de la CMI.

Diversos autores, como Jafarpour y cols. (2013), han reportado que la concentración necesaria para inhibir el crecimiento de la bacteria *Pectobacterium carotovorum*, por el método de difusión en disco, es de al menos 300 µg/mL de AE-*Tv*, lo cual equivale a 92.73 µg de timol por cm<sup>2</sup> de cubierta. Por otro lado, Karami-Osboo y cols. (2010) reportaron que la concentración del AE-*Tv* para inhibir el crecimiento bacteriano, era de 1600 µg/mL. Estas discrepancias, en la concentración del AE-*Tv*, podría deberse a la diferente composición del AE, encontrándose presentes menores cantidades de timol.

Los resultados obtenidos en la técnica de difusión en disco, coincidieron con los obtenidos para la técnica de microdilución en placa. Para establecer la concentración mínima inhibitoria, se utilizó la sal de MTT. Las células metabólicamente activas transformaron el MTT en formazán produciendo un color púrpura directamente proporcional a la viabilidad celular, lo cual se observa en la Figura 14. Tal y como se presenta en la Tabla 20, el AL no inhibe el crecimiento bacteriano en un rango de concentración de 3000 a 187.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Mientras que el polímero y el timol, también presentan crecimiento bacteriano, en un rango de concentración de 5250 a 328.12 y 30.3 a 1.89  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES

- La técnica de nanoprecipitación permitió obtener un Nanoingrediente (NI) a base de nanocápsulas con aceite esencial de *Thymus vulgaris* homogéneo, estable y con una eficiencia de encapsulación mayor al 50%. Características adecuadas para la formación de cubiertas biopoliméricas (CB) transparentes y flexibles por la técnica de *casting* a temperatura ambiente.
- El NI con aceite esencial de *Thymus vulgaris* (AE-Tv) favoreció las propiedades mecánicas de la CB formada con alginato. Este comportamiento sugiere que la CB a base de NI protegerá a los productos hortofrutícolas durante las maniobras de manejo y transporte disminuyendo así su pérdida poscosecha.
- El método de microextracción en fase sólida en la modalidad *headspace* (HS-SPME) por CG-FID desarrollado se aplicó a CB formadas a partir de NI para cuantificar de forma precisa y exacta los componentes del AE-Tv presentes.
- Si bien, se observó que la CB a base de NI, a una sola concentración, no inhibió el crecimiento de la bacteria *Pectobacterium carotovorum*, se estableció que ni la CB ni las nanopartículas blanco inhibieron su crecimiento.



## **CAPITULO VI**

### **PERSPECTIVAS**

- Evaluar la actividad antibacteriana de las CB-NI a diferentes concentraciones para establecer la CMI por el método de difusión en disco y/o microdilución en placa.
- Evaluar el porcentaje de permeabilidad de gases ( $O_2$  y  $CO_2$ ) de la CB por un método manométrico en un dispositivo de prueba de permeación.
- Aplicar las CB-NI en frutas y/o hortalizas para evaluar sus propiedades mecánicas y antibacterianas.

## CAPITULO VII

### REFERENCIAS

- Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. *Allured Publishing Corporation*, 2007; 1-804.
- Ahmed FA, Arif M and Alvarez AM. Antibacterial Effect of Potassium Tetraborate Tetrahydrate against Soft Rot Disease Agent *Pectobacterium carotovorum* in Tomato. *Frontiers in Microbiology*. 2017; 8:1728.
- Alippi AM, Dal Bó E, Ronco LB, Casanova PE and Aguilar OM. Tomato as a New Host of *Erwinia carotovora subsp. carotovora* in Argentina. *The American Phytopathological Society*, 2007; 81(2): 230.
- Álvarez-Román R, Naik A, Kalia Y, Guy R, Fessi H. Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles. *Pharmacy Research*, 2004; 21(10): 1818- 1825.
- Amiri, H. Essential oils composition and antioxidant properties of three thymus species. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012; 8: 1-8.

- Andrade J, Acosta D, Bucheli M, Luna GC. Elaboración y evaluación de un recubrimiento comestible para la conservación postcosecha del tomate de árbol *Cyphomandra betacea* Cav. Sendt. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 2014; 30(2).
- Argote-Vega FE, Suarez-Montenegro ZJ, Tobar-Delgado ME, Pérez-Álvarez JA, Hurtado-Benavides AM, Delgado-Ospina J. Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 2017; (2).
- Arroyo BJ, Bezerra AC, Oliveira LL, Arroyo SJ, Melo EA, Santos AMP. Antimicrobial active edible coating of alginate and chitosan add ZnO nanoparticles applied in guavas (*Psidium guajava* L.). *Food Chemistry*, 2020; 309: 1255- 1266.
- Artes F and Allende A. Minimal fresh processing of vegetables, fruits and juices. *In Emerging technologies for food processing*. 2005; 677-716.
- Aulton ME. Mechanical properties of films coats. *Pharmaceutical Coating Technology*, 1995; (1): 289—331.
- Ávila-Sosa R, Palou E, Munguía M, Nevárez-Moorillón G, Cruz A and López-Malo A. Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. *International Journal of Food Microbiology*, 2012; 153(1-2); 66-72.
- Ballester-Costa, C, Sendra E, Fernández-López J and Viuda-Martos M. Evaluation of the antibacterial and antioxidant activities of chitosan edible films

incorporated with organic essential oils obtained from four *Thymus* species. *Journal of Food Science and Technology*, 2016; 53(8): 3374–3379.

- Barboza-de-Lima A, de-Melo-Silva S, Rocha A, Cordeiro-do-Nascimento L and de- Souza-Ramalho F. Conservação pós-colheita de manga ‘Tommy Atkins’ orgânica sob recobrimentos bio-orgânicos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 2012; 34(3): 704-710.
- Boroujeni LS and Hojjatoleslami M. Using *Thymus carmanicus* and *Myrtus communis* essential oils to enhance the physicochemical properties of potato chips. *Food Science and Nutrition*, 2018; 6: 1006–1014.
- Borugă O, Jianu C, Mișcă C, Goleț I, Gruia AT and Horhat FG. *Thymus vulgaris* essential oil: Chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of Medicine and Life*, 2014; 7(3): 56–60.
- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food a review. *International Journal Food Microbiology*, 2004; (94): 223—253.
- Çakır MA, İcyer NC and Tornuk F. Optimization of production parameters for fabrication of thymol-loaded chitosan nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020; 151: 230- 238.
- Cartaxo AL, Costa-Pinto AR, Martins A, Faria S, Gonçalves VMF, Tiritan ME, Neves NM. Influence of PDLA nanoparticles size on drug release and interaction with cells. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2019; 107(3):482-493.

- Charkowski AO. The changing face of bacterial soft-rot diseases. *The American Phytopathological Society*, 2018; 56:269–288.
- Chen B, Tian Y, Zhao Y, Wang J, XU Z, Li X and Hu B. Bleeding canker of pears caused by *Dickeya fangzhongdai*: Symptoms, etiology and biology. *Journal of Integrative Agriculture*; 2020, 19(4): 889–897.
- Chow SF, Sun CC and Chow AHL. Assessment of the relative performance of a confined impinging jets mixer and a multi-inlet vortex mixer for curcumin nanoparticle production. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2014; 88(2): 462–471.
- Cissé M, Polidori J, Montet D, Loiseau G and Ducamp-Collin MN. Preservation of mango quality by using functional chitosan-lactoperoxidase systems coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 2015; (101): 10-14.
- Clogston J, Patri A. Zeta potential Measurement. In Characterization of nanoparticles. *Drug Delivery*, 2011; 63-70.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI, document M44-A2, 2010.
- Cortez-Vega WR, Piotrowicz IBB, Prentice-Hernández C and Borges CD. Conservation of papaya minimally processed with the use edible coating base on xanthan gum. *Semina: Ciências Agrarias*. 2013; 36(4): 1753-1764.
- Cruz L, Cruz J, Eloy M, Oliveira H, Vaz H and Tenreiro R. First Report of Bacterial Speck of Tomato Caused by *Pseudomonas syringae* pv. tomato Race in Portugal. *The American Phytopathological Society*, 2010: 1504.

- De-Ancos B, González D, Colina C, Sánchez M. Uso de películas/recubrimientos comestibles en los productos de IV y V gama. *Revista Iberoamericana Tecnología Poscosecha*, 2015; 16(1): 8–17.
- Diao WR, Hu QP, Zhang H and Xu JG. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare Mill.*). *Food Control*, 2014; 35(1), 109–116.
- Dickinson E. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Technology*, 2009; 23(6): 1473- 1482.
- Dilworth L, Riley CK, Stennett D. Plant Constituents: carbohydrates, oils, resins, balsams, and plant hormones. In *Pharmacognosy Fundamentals, Applications and Strategies*. *Academic Press*, 2017; 61-80.
- Do-Evangelho JA, da-Silva G, Biduski B, Halal SLM, Kringel DH, Gularte MA, Rosa- Zavareze E. Antibacterial activity, optical, mechanical, and barrier properties of corn starch films containing orange essential oil. *Carbohydrate Polymers*, 2019; (222): 114981.
- Dos-Passos B, Lundgren GA, Macedo SA, Tavares JF, Santos V, Câmara MPS and Souza EL. Application of coatings formed by chitosan and Mentha essential oils to control anthracnose caused by *Colletotrichum gloesporioides* and *C. brevisporum* in papaya (*Carica papaya L.*) fruit. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019; 15(139):631-639.
- Duan C, Meng X, Meng J, Khan A, An X, Zhang J, Huq T, Ni Y. Chitosan as A Preservative for Fruits and Vegetables: A Review on Chemistry and

Antimicrobial Properties. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 2019; 4(1): 11-21.

- Ehpem E, Greige-Gerges H, Fessi H, Charcosset C. Optimisation of Rosemary oil encapsulation in polycaprolactone and scale-up of the process. *Journal Microencapsulation*, 2014; 31(8): 746-753.
- Evonik Industries. (2015). Eudragit ® L100-55, 1–6.
- FAO. 2015. The FTT-Thiaroye processing technique, an innovation for post-harvest loss reduction in fisheries and aquaculture. Documento presentado en el Primer Congreso Internacional sobre Prevención de la Pérdida de Alimentos.
- FAO. 2018. Despilfarro de alimentos: datos y cifras clave. Food wastage footprint, 1-5.
- FAO. 2019. El estado de la alimentación y la agricultura. Avanzar en la reducción de la pérdida y el desperdicio de alimentos.
- Fernández M, Echeverría D, Mosquera S and Paz S. Estado Actual del uso de Recubrimientos Comestibles en Frutas y Hortalizas. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 2017; 15(2): 134-141.
- Fernández-Valdés D, Bautista-Baños S, Fernández-Valdés D, Ocampo-Ramírez A, García Pereira A, Falcón-Rodríguez A. Películas y recubrimientos comestibles: una alternativa favorable en la conservación poscosecha de frutas y hortalizas. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 2015; 24(3): 52-57.

- Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 1989; (55): R1-R4.
- Finos M. Nanoencapsulacion de cinamaldehído en matrices de ovoalbúmina para su vehiculización en recubrimientos. Instituto de Tecnología de Alimentos ITA-FIQ-UNL; 2016.
- Fraj A, Jaâfar F, Marti M, Coderch L and Ladhari N. A comparative study of oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil-based polycaprolactone nanocapsules/ microspheres: Preparation, physicochemical characterization, and storage stability. *Industrial Crops and Products*, 2019; 140: 111669.
- Froiio F, GinotL, Paolino D, Lebaz N, Bentaher A, Fessi H and Elaissari A. Essential oils loaded polymer particles: Preparation, characterization and antimicrobial property. *Polymers*, 2019; 11(6), 1–15.
- Galindo-Rodríguez SA, Allemann E, Fessi H, Doelker E. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-difussion, and nanoprecipitation methods. *Pharmaceutical Research*, 2004; (21): 1428—1439.
- Galindo-Rodríguez SA, Álvarez-Román R, *et al.* Formulados a base de polimetacrilato cargada con nanopartículas de aceite esencial de *Thymus vulgaris* y su uso como recubrimientos comestibles en productos hortofrutícolas. MX/E/2014/080197.
- Galindo-Rodríguez SA, Álvarez-Román R, *et al.* Formulados a base de quitosán y nanocápsulas de aceite esencial de *Lippia Berlandieri* y su uso



como recubrimientos orgánicos comestibles para la preservación de la calidad y vida de anaquel de frutas y hortalizas. MX/E/2014/078004.

- Golkhandan E, Kamaruzaman S, Sariah M, Zainal Abidin MZ, Nasehi A and Nazerian E. First Report of Soft Rot Caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* on Pepper Fruits (*Capsicum annuum*) in Malaysia. *The American Phytopathological Society*, 2013: 1109.
- Gómez-Gaete C, Ferreira F, Bustos P, Mennickent S, Castillo D, Chávez C, Novoa P, Godoy R. Optimization of rhein-loaded polymeric nanoparticles using a factorial design and evaluation of the cytotoxic and anti-inflammatory effects. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2018; (44): 1285- 1294.
- González-Moreno B. Optimización de una técnica de microextracción en fase sólida para cuantificar aceite esencial de *Thymus vulgaris* en cubiertas biopoliméricas. México: Universidad Autónoma de Nuevo León. Tesis de Licenciatura, 2018.
- González-Moreno BJ, Salas-Cedillo HI, Galindo-Rodríguez SA, Paniagua-Vega D, Waksman-Minsky N, Álvarez-Román R. Obtención y caracterización de películas biopoliméricas para su potencial aplicación biológica. XXIX Congreso Nacional de Investigación en Medicina, 2017.
- Granata G, Stracquadanio S, Leonardi M, et al. Essential oils encapsulated in polymer-based nanocapsules as potential candidates for application in food preservation. *Food Chemistry*, 2018; 269: 286-292.
- Grande-Tovar CD, Chaves-Lopez C, Serio A, Rossi C and Paparella A. Chitosan coatings enriched with essential oils: Effects on fungi involve in fruit

decay and mechanisms of action. *Trends in Food Science and Technology*, 2018; 78: 61–71.

- Guerra-Boone L, Álvarez-Román R, Salazar-Aranda R, Torres-Cirio A, Rivas-Galindo VM, Waksman-de-Torres N, Pérez-López LA. Antimicrobial and antioxidant activities and chemical characterization of essential oils of *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, and *Origanum majorana* from northeastern México. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015; 28(1): 363–369.
- Gupta M, Bharat N, Chauhan A, Vikram A. First Report of Bacterial Leaf Spot of Coriander Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *coriandricola* in India. *Plant Disease*, 2013; 97(3): 418.
- Hossain A, Abdallah Y, Ali MA, Masum MMI, Li B, Sun G, Meng Y, Wang Y, An Q. Lemon-Fruit-Based Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles and Titanium Dioxide Nanoparticles against Soft Rot Bacterial Pathogen *Dickeya dadantii*. *Biomolecules*, 2019; 9(12).
- Imelouane, B, Amhamdi H, Wathelet JP, Ankit M, Khedid K and Bachiri A. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. *International Journal of Agriculture and Biology*, 2019; 11(2): 205–208.
- IUPAC. Validation of Quantitative and Semi-Quantitative Methods by Collaborative Trial. *Chem. Int.* 2006, 29.
- Irache J. Micro y nanoencapsulación de aditivos y otros compuestos de interés alimentario. 1er Congreso Nacional de Agroalimentación. España: Universidad de Navarra. 2011; 22–27.

- Jafarpour M, Golparvar A, Lotfi A. Actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Thymus vulgaris*, *Trachyspermum ammi* y *Mentha aquatica* contra *Erwinia carotovora* in vitro. *International Journal on Medicinal Herbs*, 2013; 4 (3): 115-118.
- Jancy S, Shruthy R, Preetha R. Fabrication of packaging film reinforced with cellulose nanoparticles synthesised from jack fruit non-edible part using response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020; 142: 63-72.
- Joshy KS, Jose J, Li T, Thomas M, Shankregowda AM, Sreekumaran S, Kalarikkal N, Thomas S. Application of novel zinc oxide reinforced xanthan gum hybrid system for edible coatings. *International Journal Biology Macromolecules*, 2020; 18(151): 806-813.
- Jouki M, Mortazavi SA, Yazdi FT and Koocheki A. Characterization of antioxidant–antibacterial quince seed mucilage films containing thyme essential oil. *Carbohydrate Polymers*, 2014; (99): 537–546.
- Ju J, Xie Y, Guo Y, Cheng Y, Qian H and Yao W. Application of edible coating with essential oil in food preservation, critical reviews. *Food Science and Nutrition*, 2018; 1–62.
- Karami-Osboo R, Khodaverdi M and Ali-Akbari F. Antibacterial Effect of Effective Compounds of *Satureja hortensis* and *Thymus vulgaris* Essential Oils against *Erwinia amylovora*. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2010; 12: 35-45.

- Lekjing S. A chitosan-based coating with or without clove oil extends the shelf life of cooked pork sausages in refrigerated storage. *Meat Science*, 2016; 111: 192–197.
- Liakos I, Grumezescu A, Holban A, Florinl, D-Autilia F, Carzino R, Athanassiou A. Polylactic acid—lemongrass essential oil nanocapsules with antimicrobial properties. *Pharmaceuticals*, 2016; 9(3): 42.
- Liang J, Yan H, Zhang J. Preparation and characterization of antioxidant edible chitosan films incorporated with epigallocatechin gallate nanocapsules. *Carbohydrate Polymers*, 2017; 171: 300-306.
- Lipinski B and O'Connor C. 2016. Food loss and waste: 2016 progress report. Disponible en: [https://champs123blog.files.wordpress.com/2016/09/sdg-target-12-3-progress-report\\_2016.pdf](https://champs123blog.files.wordpress.com/2016/09/sdg-target-12-3-progress-report_2016.pdf)
- Lugo-Estrada L, Galindo-Rodríguez SA, Pérez-López LA, Waksman-de-Torres N and Álvarez-Román R. Headspace–solid-phase microextraction gas chromatography method to quantify *Thymus vulgaris* essential oil in polymeric nanoparticles. *Pharmacognosy Magazine*, 2019; 15(1): 473–478.
- Mansouri N, Aoun L, Dalichaouche N and Hadri D. Yields, chemical composition, and antimicrobial activity of two Algerian essential oils against 40 avian multidrug-resistant *Escherichia coli* strains. *Veterinary World*, 2018; 11(11): 1539–1550.
- Marchese A, Orhanl E, Daglia M, Barbieri R, Di-Lorenzo A, Nabavi SF, Nabavi SM. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chemistry*, 2016;(210): 402–414.

- Martínez K, Ortiz M, Albis A, Gutiérrez-Castañeda C, Valencia ME, Grande Tovar CD. The Effect of Edible Chitosan Coatings Incorporated with *Thymus capitatus* Essential Oil on the Shelf-Life of Strawberry (*Fragaria x ananassa*) during Cold Storage. *Biomolecules*, 2018; 8(4).
- Martínez Rivas CJ, Tarhini M, Badri W, Miladi K, Greige-Gerges H, Nazari QA, Elaissari A. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2017; 532(1): 66–81.
- Miladi K, Sfar S, Fessi H, Elaissari A. Nanoprecipitation Process: From Particle Preparation to In Vivo Applications. *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines*, 2016; 17–53.
- Mmbaga MT and Sheng H. First Report of Leaf Blight Caused by *Pseudomonas syringae* on Cornus mas. *The American Phytopathological Society*, 2000; 200.
- Mohamed A, Mohamed E and Mohamed AM. Polysaccharides, protein and lipid -based natural edible films in food packaging: a review. *Carbohydrate Polymers*, 2020; 238(15): 116-178.
- Mohammad S, Abu-Darwishb AH, Tarawnehc C, Cabral AV, Gadetskayag L, Salgueiroh T, Hosseinabadii SR and Warren C. *Thymus spp.* plants - Food applications and phytopharmacy properties. *Trends in Food Science & Technology*, 2019; 85: 287-306.
- Mohammadi M, Azizi MH, Zoghi A. Antimicrobial activity of carboxymethyl cellulose-gelatin film containing *Dianthus barbatus* essential oil against aflatoxin-producing molds. *Food Science and Nutrition*, 2018; 8(2): 1244-

1253.

- Mondal KK, Mani C, Singh J, Dave SR, Tipre DR, Kumar A, Trivedi BM. Fruit Rot of Tinda Caused by *Pseudomonas aeruginosa*, A New Report from India. *The American Phytopathological Society*, 2012.
- Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissairi A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010; 385 (1-2): 113-142.
- Moreira MR, Cassani L, Martín-Belloso O, Soliva-Fortuny R. Effects of polysaccharide-based edible coatings enriched with dietary fiber on quality attributes of fresh-cut apples. *Journal Food Science Technology*, 2015; 52(12):7795-805.
- Nielsen C, Subbiahdoss G, Zeng G, Salmi Z, Kjems J, Mygnid T, Snabe T, Meyer R. Antibacterial isoeugenol coating on stainless steel and polyethylene surfaces prevents biofilm growth. *Journal Applied Microbiology*, 2018; 124(1): 179–187.
- Nikolić M, Glamočlija J, Ferreira IC, Calhelha RC, Fernandes Â, Marković T. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 2014; 52: 183–190.
- Nisar T, Wang ZC, Yang X, Tian Y, Iqbal M and Guo Y. Characterization of citrus pectin films integrated with clove bud essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018; 106: 670–680.

- Noronha CM, de-Carvalho SM, Lino RC and Barreto PL. Characterization of antioxidant methylcellulose film incorporated with  $\alpha$ -tocopherol nanocapsules. *Food Chemistry*, 2014; (159): 529-535.
- Olivas G, Rodríguez J, Barbosa G. Edible coatings composed of methylcellulose, stearic acid, and additives to preserve quality of pear wedges. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2009; (27): 299-320.
- Olivas GI and Barbosa-Cánovas GV. Alginate–calcium films: water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity. *Food Science and Technology*, 2008; 41(2): 359-366.
- Oluwadara O, Alegbeleye I, Singleton AS. Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. *Food Microbiology*, 2018; (73): 177 – 220.
- Onias EA, Rocha RHC, Lima JF, Onias EA and Furtunato TC. Organic ‘Tommy Atkins’ mango postharvest quality when treated with biofilms enriched by *Spirulina platensis*. *Journal of Controlled Release*, 2016; 44(3): 286-293.
- Palou E, Mani-López E, López-Malo A. Effect of different sanitizers on the microbial load and selected quality parameters of “chile de árbol” pepper (*Capsicum frutescens* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 2018; 119: 94-100.
- Pellegrini M, Ricci A, Serio A, Chaves-López C, Mazzarrino G, D’Amato S, Lo-Sterzo C and Paparella A. Characterization of Essential Oils Obtained from Abruzzo Autochthonous Plants: Antioxidant and Antimicrobial Activities Assessment for Food Application. *Foods*, 2018; 7(2): 19.

- Perdones Á, Escriche I, Chiralt A and Vargas M. Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on volatile profile of strawberries during storage. *Food Chemistry*, 2016; 197: 979–986.
- Piña-Barrera AM, Álvarez-Román R, Báez-González JG, Amaya-Guerra CA, Rivas-Morales C, Gallardo-Rivera CT and Galindo-Rodríguez SA. Application of a multisystem coating based on polymeric nanocapsules containing essential oil of *Thymus vulgaris* L. to increase the shelf life of table grapes (*Vitis vinifera* L.). *IEEE Transactions on NanoBioscience*, 2019; 18(4): 549–557.
- Plotto A, Narciso JA, Rattanapanone N and Baldwin E. Surface treatments and coatings to maintain freshcut mango quality in storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010; 90: 2333-2341.
- Popović T, Ivanović Ž, Ignjatov M, Milošević D. First Report of *Pseudomonas syringae*pv. *coriandricola* Causing Bacterial Leaf Spot on Carrot, Parsley, and Parsnip in Serbia. *Plant Disease*, 2015; 99(3): 416.
- Quezada J, Díaz M, Gutiérrez M and Debeaufort F. Application of edible coatings to improve shelf–life of mexican guava. *Acta Horticulturae*, 2009;(599):589–594.
- Ramírez-Pérez M. Efecto conservador de eugenol nanoencapsulado en la vida de anaquel de jitomate (*Solanum lycopersicum*). Monterrey, México: Universidad Autónoma de Nuevo León; Tesis de licenciatura, 2019.
- Rangel-Marrón M, Mani-López E, Palou E and López-Malo A. Effects of alginate-glycerol-citric acid concentrations on selected physical, mechanical, and barrier properties of papaya puree-based edible films and coatings, as



evaluated by response surface methodology. *Food Science and Technology*, 2018; 101: 83-91.

- Reyes-Jurado F, López-Malo A and Palou E. Antimicrobial activity of individual and combined essential oils against foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Food Protection*, 2016; 79(2): 309–315.
- Rossmann S, Dees MW, Perminow J, Meadow R, and Brurberg MB. Soft rot *Enterobacteriaceae* are carried by a large range of insect species in potato fields. *Applied and Environmental Microbiology*. 2018; 84(12): 1-18.
- Salamanca C. Estudio del proceso de nanoencapsulación de quercetina por medio de nanoprecipitación. Colombia: Universidad de ICESI. Tesis de Doctorado, 2017.
- Salas Cedillo, H.I. Desarrollo de un potencial insecticida nanoparticulado de *Schinus molle* para el control de *Aedes aegypti*. [Tesis de Maestría]. Monterrey Nuevo León: Universidad Autónoma de Nuevo León; 2016.
- Salehi B, Mohammad SA, Amer HT, Cabral C, Gadetskaya AV and Salgueiro L. *Thymus spp.* plants - Food applications and phytopharmacy properties. *Trends in Food Science & Technology*, 2019; 85: 287-306.
- Sánchez-González L, Vargas M, González-Martínez C, Chiralt A, Cháfer M. Characterization of edible films based on hydroxypropylmethylcellulose and tea tree essential oil. *Food Hydrocolloids*, 2009; 23: 2102-2109.
- Sanjib KP. Edible Films and Coatings for Fruits and Vegetables. *Encyclopedia of Renewable and Sustainable Materials*, 2020; (5): 363-376.

- Sarengaowa A, Hu W, Jiang A, Xiu Z, Feng K. Effect of thyme oil–alginate based coating on quality and microbial safety of fresh–cut apples. *Journal Sciene Food Agriculture*, 2018; 98(6): 2302–2311.
- Sarengaowa, Hu W, Jiang A, Xiu Z, Feng K. Thyme oil alginate-based edible coatings inhibit growth of pathogenic microorganisms spoiling fresh-cut cantaloupe. *Food Bioscience*, 2019; (32) 1467.
- Satyal P, Murray B, McFeeters R and Setzer W. Essential Oil Characterization of *Thymus vulgaris* from Various Geographical Locations. *Foods*, 2016; 5(4): 70.
- Secretaría de Salud. Comisión de control analítico y ampliación de cobertura criterios para la validación de métodos fisicoquímicos de la secretaria de salud. 2011, CLAVE CCAYAC-P-058.
- Shaghef E, Saneya B, Muhammad AA, Safina N, Muhammad FQ, Tahir N, Kausar H and Sajid A. Effects of inoculation of root-associative *Azospirillum* and *Agrobacterium* strains on growth, yield and quality of pea (*Pisum sativum* L.) grown under different nitrogen and phosphorus regimes. *Scientia Horticulturae*, 2020 (270): 1094-1101.
- Silva FA, Finkler L, Finkler CLL. Effect of edible coatings based on alginate/pectin on quality preservation of minimally processed 'Espada' mangoes. *Journal Food Science Technology*, 2018; 55(12):5055-5063.
- Silva-Flores PG, Pérez-López LA, Rivas-Galindo VM, Paniagua-Vega D, Galindo-Rodríguez SA, Álvarez-Román R. Simultaneous GC-FID quantification of main components of *Rosmarinus officinalis* L. and *Lavandula*

*dentata* essential oils in polymeric nanocapsules for antioxidant application. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2019; 1–9.

- Siracusa V, Romani S, Gigli M, Mannozi C, Cecchini JP, Tylewicz U and Lotti N. Characterization of Active Edible Films based on Citral Essential Oil, Alginate and Pectin. *Materials (Basel)*, 2018; 11(10): 1980.
- Siroli L, Patrignani F, Serrazanetti DI, Tabanelli G, Montanari C, Gardini F y Lanciotti. Lactic acid bacteria and natural antimicrobials to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples and lamb's lettuce. *Journal Food Microbiology*, 2015; (47), 74-84.
- Smith–Palmer A, Stewartb J and Fyfe L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food–borne. *Letters in Applied Microbiology*, 1998;(26):118–122.
- Solano-Doblado LG, Alamilla-Beltrán L, Jiménez-Martínez C. Películas y recubrimientos comestibles funcionalizados. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 2018; 21(2): 30-42.
- Song Y, Liu L, Shen H, You J, Luo Y. Effect of sodium alginate-based edible coating containing different anti-oxidants on quality and shelf life of refrigerated bream (*Megalobrama amblycephala*). *Food Control*, 2018; (22):608–615.
- Sotelo-Boyás ME, Correa-Pacheco ZN, Bautista-Baños S and Corona-Rangel ML. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens. *Food Science and Technology*, 2017; 77, 15–20.

- Sothornvit R, Rhim JW and Hong SI. Effect of nano-clay type on the physical and antimicrobial properties of whey protein isolate/clay composite films. *Journal of Food Engineering*, 2009; 91: 468–473.
- Suárez-Estrella F, Jurado MM, López MJ, López-González JA and Moreno J. Role of bacteria isolated from a plant waste-based compost producing bioactive substances in the control of bacterial spot syndrome caused by *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2019; (20): 101-198.
- Tahir HE, Zhihua L, Mahunu GK, Xiaobo Z, Arslan M, Xiaowei H, Yang Z, Mariod AA . Effect of gum arabic edible coating incorporated with African baobab pulp extract on postharvest quality of cold stored blueberries. *Food Science Biotechnology*, 2019; 29(2):217-226.
- Tang J, Na X, Ji H, Liu H, Wang Z, Linhua W. Eudragit nanoparticles containing genistein: formulation, development and bioavailability assessment. *International Journal Nanomedicine*, 2011; 6: 2429- 2435.
- Tao J, Chow SF and Zheng Y. Application of flash nanoprecipitation to fabricate poorly water-soluble drug nanoparticles. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2019; 9(1): 4-18.
- Tavassoli-Kafrani E, Shekarchizadeh H and Masoudpour-Behabadi M. Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. *Carbohydrate Polymers*, 2015; 137: 360-374.
- Torrente F. El tomillo aprovechamiento y cultivo. *Publicaciones de Extensión Agraria*, 1985; 15 – 17.

- Torres-Sánchez R, Martínez-Zafra MT, Castillejo N, Guillamón-Frutos A and Artés-Hernández F. Real-Time Monitoring System for Shelf Life Estimation of Fruit and Vegetables. *Sensors*, 2020; 20(7): 1860.
- Toth IK, van der Wolf JM, Saddler G, Lojkowska E, Helias V, Pirhonen M, Tsrer L, Elphinstone JG. *Dickeya* species: An emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology*, 2011; (60); 385-399.
- Velázquez-Moreira A, Guerrero J. Algunas investigaciones recientes en recubrimientos comestibles aplicados en alimentos. *Temas Selectos Ingeniería de Alimentos*, 2014; 8(2):5- 12.
- Wang L, Hu C and Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*, 2017; (12): 1227–1249.
- Wu Y, Luo Y and Wang Q. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method. *Food Science and Technology*, 2012; 48(2), 283–290.
- Xing Y, Li W, Wang Q, Li X, Xu Q, Guo X, Bi X, Liu X, Shui Y, Lin H and Yang H. Antimicrobial Nanoparticles Incorporated in Edible Coatings and Films for the Preservation of Fruits and Vegetables. *Molecules*, 2019; 24(9): 1695.
- Yemenicioğlu A. Basic Strategies and Testing Methods to Develop Effective Edible Antimicrobial and Antioxidant Coating. *Handbook of Antimicrobial Coatings*, 2018; 63–88.
- Yin C, Huang C, Wang J, Liu Y, Lu P and Huang L. Effect of Chitosan- and Alginate-Based Coatings Enriched with Cinnamon Essential Oil

Microcapsules to Improve the Postharvest Quality of Mangoes. *Materials*, 2019; 12(13): 2039.

- Zambrano M, González R, Mendoza N, Miranda V, Bernal T, Mendoza S, Quintanar D. Nanosystems in edible coatings: a novel strategy for food preservation. *International Journal Molecular Sciences*, 2018; 19(3): 705.
- Zhang K, Xu Z, Dong S, Cen C and Wu Q. Identification of peach leaf disease infected by *Xanthomonas campestris* with deep learning. *Engineering in Agriculture, Environment and Food*, 2019; (12) 4: 388-396.

Zillo RR, Porrelli P, Moreira S, Micotti E and Fillet-Spoto MH. Carboxymethylcellulose coating associated with essential oil can increase papaya shelf life. *Scientia Horticulturae*, 2018; 239(15): 70-77.

## **CAPITULO VIII**

### **ANEXOS**

## ANEXO A

### A) EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS

Para evaluar el porcentaje de elongación, las CB se colocaron en el texturómetro con los aditamentos específicos. La velocidad de estiramiento fue de 2 mm/seg a 25°C. Posteriormente el texturómetro mostró los siguientes resultados para cada una de las CB evaluadas.

- Peak Load: Carga máxima en gramos alcanzada durante la prueba realizada.
- Deform Peak: Distancia en milímetros a la cual se alcanzó la carga máxima.
- Work: Fuerza en miliJoules ejercida por el instrumento.
- Final Load: Carga en gramos obtenida al final de la prueba, es decir, la carga obtenida cuando el instrumento quedo en reposo.



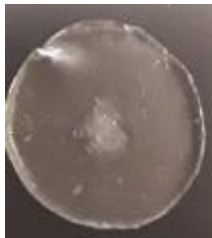


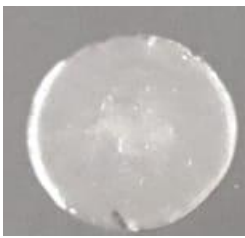



Para llevar a cabo el cálculo del porcentaje de elongación, se utilizaron los valores obtenidos en el parámetro Deform Peak; estos mm se relacionaron con los mm iniciales de la CB, y se calculó con la Fórmula 3. Se obtuvo la media ( $\bar{x}$ ) de las mediciones así como su desviación estándar ( $\sigma$ ).



## ANEXO B

### A) CUBIERTAS BIOPOLIMÉRICAS OBTENIDAS CON LAS CONDICIONES MOSTRADAS EN LAS TABLAS 8, 9 y 10.

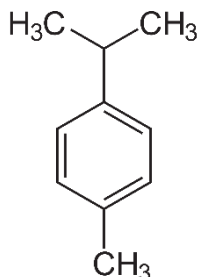
**Tabla B1. Cubiertas biopoliméricas obtenidas con diferentes sistemas a temperatura ambiente.**

Concentración de AL (% p/v)	CB-AL	CB- NP blanco (sin AE- Tv) con AL	CB- NI con AL
0.75			
1			
2			

## ANEXO C. ESTRUCTURAS QUÍMICAS Y GENERALIDADES DE LAS MOLÉCULAS UTILIZADAS.

### C.1 o-cimeno

Estructura:



Nombre químico: 3,7-dimetil-1,3,7-octatrieno

Nombre común: o-cimeno

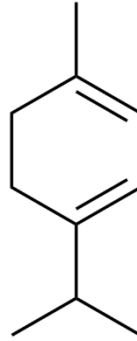
Propiedades físicas y químicas:

Propiedad	Descripción o valor
Fórmula Molecular	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
Peso Molecular	136.24 g/mol
Estado	Líquido
Densidad relativa	0.0008 g/cm <sup>3</sup>
Punto de ebullición	173°C
Solubilidad	Medios orgánicos

Aplicaciones: Se utilizan en perfumería y se cree que actúan como defensa para las plantas gracias en parte a su actividad antifúngica.

## C.2 $\gamma$ -terpineno

### Estructura



Nombre químico: 4-Metil-1-(1-metiletil)-1,4-ciclohexadieno

Nombre común:  $\gamma$ -terpineno

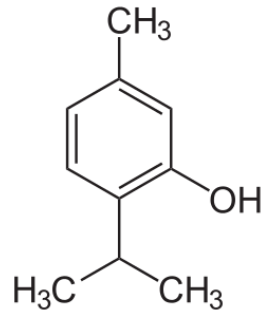
Propiedades físicas y químicas:

Propiedad	Descripción o valor
Fórmula Molecular	$C_{10}H_{16}$
Peso Molecular	136.24 g/mol
Estado	Líquido
Densidad relativa	0.841 g/cm <sup>3</sup>
Punto de ebullición	181°C
Solubilidad	Solventes orgánicos

Aplicaciones: Uso en productos naturales para el cuidado y cicatrización de la piel.

### C.3 Timol

#### Estructura



Nombre químico: 2-Isopropil-5-metilfenol

Nombre común: timol

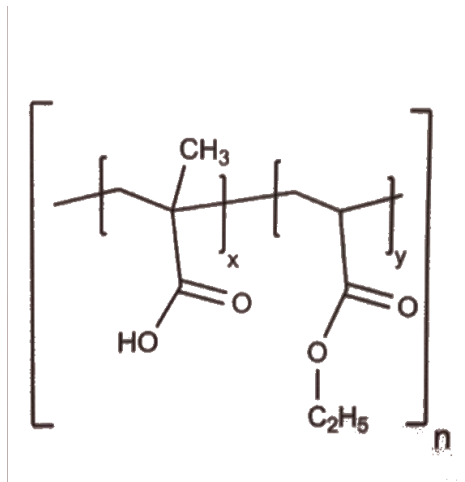
Propiedades físicas y químicas:

Propiedad	Descripción o valor
Fórmula Molecular	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
Peso Molecular	150.22 g/mol
Estado	Líquido
Densidad relativa	0.97 g/cm <sup>3</sup>
Punto de ebullición	232°C
Solubilidad	Solventes orgánicos

Aplicaciones: Área farmacéutica, cosmética y veterinaria.

## C.4 Eudragit L100-55

Estructura:



Nombre químico: copolímero ácido metacrílico-etil acrilato (1:1)

Nombre común: Eudragit L 100-55

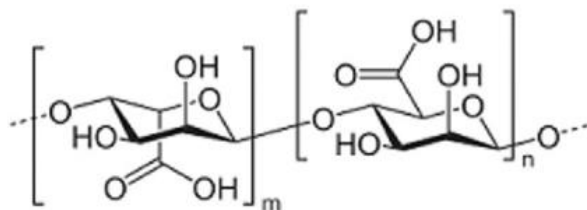
Propiedades físicas y químicas:

Propiedad	Descripción o valor
Fórmula Molecular	-----
Peso Molecular	320,000 g/mol
Estado	Polvo
Densidad relativa	0.821- 0.841 g/cm <sup>3</sup>
Punto de ebullición	-----
Solubilidad	Solventes orgánicos

Aplicaciones: Excipiente en la industria farmacéutica.

## C.5 Alginato de sodio

Estructura:



Nombre químico: 3,4,5,6-tetrahidroxioxano-2-carboxilato de sodio

Nombre común: alginato de sodio

Propiedades físicas y químicas:

Propiedad	Descripción o valor
Fórmula Molecular	$(C_6H_7NaO_6)_n$
Peso Molecular	216.12 g/mol
Estado	Polvo blanco a amarillento
Densidad relativa	1.49 g/cm <sup>3</sup>
Punto de ebullición	-----
Solubilidad	Medio acuoso

Aplicaciones: Área farmacéutica y alimentaria como agente estabilizante, gelificante, espesante y formador de cubiertas.