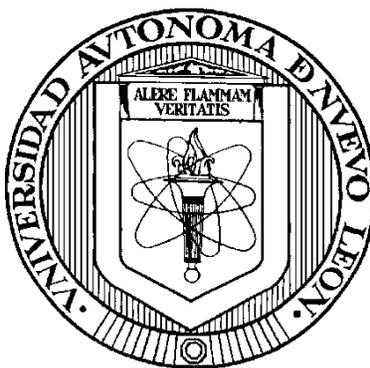


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**EFFECTO CONSERVADOR DE CUBIERTAS  
BIOPOLIMÉRICAS A BASE DE NANOINGREDIENTES CON  
ACEITE ESENCIAL DE *Lippia graveolens* EN LA VIDA DE  
ANAQUEL DE PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS.**

**POR**

**M.C. BARBARA JOHANA GONZÁLEZ MORENO**

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

**SEPTIEMBRE 2024**

**EFFECTO CONSERVADOR DE CUBIERTAS BIOPOLIMÉRICAS A BASE DE  
NANOINGREDIENTES CON ACEITE ESENCIAL DE *Lippia graveolens* EN LA  
VIDA DE ANAQUEL DE 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**

**Comisión de Tesis**



---

**Dra. C. Verónica Mayela Rivas Galindo**

**Comisión de Tesis**



---

**Dra. C. Graciela Granados Guzmán**

**Comisión de Tesis**



---

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

**Subdirector de Estudios de Posgrado**

## **DEDICATORIA**

Para quién me ha acompañado desde mi día uno y quién me ha apoyado en cada paso de este largo camino: mi mamá Leticia Moreno.

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios y a la vida por permitirme llegar hasta aquí, por permitirme seguir aprendiendo y poder seguir haciendo lo que más amo. Gracias, porque a pesar de todas las circunstancias y todos los desafíos, pude seguir adelante y pude cumplir esta meta. Porque a pesar de lo complicado que fue, pude lograr uno de mis más grandes sueños: ser doctora.

A mi familia que tanto amo y que gran parte de lo que soy es gracias a ellos: a mi mamá Leticia Moreno, que me sostuvo y me apoyo durante estos 4 años. Muchas gracias por estar ahí en los momentos más oscuros, cuando no había nadie más. Jamás me cansaré de agradecerle tu amor y paciencia incondicional. Este logro es para y gracias a ti. Jamás lo hubiera logrado sin tu presencia en mi vida.

A mi papá Jose González, por haberme apoyado de alguna u otra manera. A mis hermanos Evelyn y José, quienes también me han ayudado y apoyado a cumplir esta meta... agradezco sus existencias en mi vida, ha sido muy hermoso crecer con ustedes y poder vernos cumplir nuestros sueños y metas individuales. Gracias por también estar ahí cuando nadie más lo esta, por seguir siempre mis chistes y ayúdame a pasar ratos más amenos. A mis chiquitos preciosos, mis hermosos sobrinos Bastian y Thiago (osito), a quienes adoro taaanto, y que gracias a ellos, no hubo ni un solo día malo que ellos, no pudieran mejorar. Porque sin saberlo, me han inspirado siempre a ser mejor persona, a ser una mejor versión de mi. Porque gracias a ellos me mantuve de pie, muchísimas veces. Los ama mucho su tía Lulita.

A mi directora de tesis, la Dra. Rocío Álvarez. Gracias doctora, gracias por haberme permitido tener la gran oportunidad de trabajar con usted, desde becaria en la licenciatura. Gracias por estos 9 años!! No hay palabras que puedan expresar lo agradecida que estoy con usted, por siempre confiar en mí. Gracias por compartir tantos conocimientos y tantas enseñanzas tanto dentro, como afuera del laboratorio. Gracias por siempre extenderme su mano, gracias por no ser sólo mi directora de tesis, sino alguien con quién siempre pude contar, gracias por ser casi mi segunda

mamá. Usted siempre será mi mejor ejemplo profesional, es la mejor! Gracias por siempre guiarme, por sus consejos y por formar parte de este sueño cumplido.

A mi co-director de tesis, el Dr. Sergio Galindo. Muchas gracias doctor, por siempre recibirme en su laboratorio y permitirme formar parte de su equipo de trabajo. Gracias por contribuir a la mejora de mis presentaciones y seminarios, y por contribuir a la ampliación de mis conocimientos. Gracias por todo este tiempo de enseñanzas sobre el mundo de las nanopartículas, y por de igual manera, formar parte de este sueño realizado.

A mi comisión de tesis, el Dr. Alejandro Pérez, la Dra. Verónica Rivas y la Dra. Graciela Granados. Muchas gracias por ser también un gran ejemplo profesional para mí. Porque no sólo me apoyaron en el escrito de este trabajo, si no que a través de los años, también me ayudaron y me compartieron mucho de sus conocimientos y de su valioso tiempo. Gracias por siempre estar dispuestos a ayudar y a enseñar, son los mejores doctores y profesores, gracias!!.

Y por que no... a Barbara del pasado, gracias!!! Gracias por no rendirte nunca, por levantarte todos esos días que no lo querías hacer, gracias porque a pesar de todo siempre elegiste seguir aquí y luchar por este sueño, que ahora después de todo, lo podemos ver cumplido y podemos decir: LO LOGRAMOS... te abrazo y te agradezco, porque ahora finalmente, podemos ver la culminación de esto que empezó hace más de 11 años.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por el apoyo otorgado durante el programa de doctorado, con el no. de becario 725423 y al proyecto UANL/ ProACTI-40-BQ-2023 para el desarrollo de este trabajo.

**EN FIN, GRACIAS INFINITAS A CADA UNA DE LAS PERSONAS QUE ME AYUDARON Y APOYARON DIRECTA O INDIRECTAMENTE DURANTE ESTOS AÑOS. CADA APORTACIÓN FUE FUNDAMENTAL PARA PODER LLEGAR HASTA AQUÍ. GRACIAS.**

**EFFECTO CONSERVADOR DE CUBIERTAS BIOPOLIMÉRICAS A BASE DE  
NANOINGREDIENTES CON ACEITE ESENCIAL DE *Lippia graveolens* EN LA  
VIDA DE ANAQUEL DE PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS.**

Presentado por:

**M.C. Barbara 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.

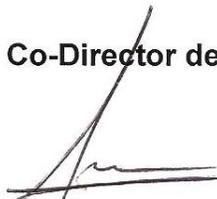
**Directora de Tesis**



---

**Dra. C. Rocío Álvarez Román**

**Co-Director de Tesis**



---

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

## RESUMEN

**M.C. Barbara Johana González Moreno** Fecha de graduación: Septiembre, 2024.

**Universidad Autónoma de Nuevo León**  
**Facultad de Medicina**

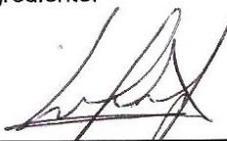
**Título de estudio: EFECTO CONSERVADOR DE CUBIERTAS BIOPOLIMÉRICAS A BASE DE NANOINGREDIENTES CON ACEITE ESENCIAL DE *Lippia graveolens* EN LA VIDA DE ANAQUEL DE PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS.**

**Número de páginas:** **Candidata para el grado de Doctora en Ciencias con orientación en Química Biomédica**

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

**Propósito y método del estudio:** Según la FAO, anualmente cerca de 1,300 millones de toneladas de alimentos producidos para consumo humano se pierde o se desperdicia. Dentro de estas pérdidas, entre el 40-50% corresponden a productos hortofrutícolas. Como solución a esta problemática se plantea el uso de cubiertas biopoliméricas (CB) formadas a partir de un nanoingrediente (NI) con aceite esencial (AE) de *Lippia graveolens* (AE-Lg) el cual ha mostrado actividad antibacteriana frente a diversas bacterias fitopatógenas causales de la pudrición de productos hortofrutícolas. Este trabajo constó de cuatro etapas: i) Obtención y caracterización fisicoquímica del NI con el AE-Lg para establecer su estabilidad y perfil de liberación ii) Evaluación de la CB formada a partir del NI para evaluar sus propiedades físicas: ópticas, de permeabilidad y mecánicas así como de liberación y antibacterianas, iii) Validación del método de microextracción en fase sólida por *headspace* (HS-SPME) para cuantificar los componentes del AE-Lg en las CB-NI por cromatografía de gases (CG-FID) y iv) Evaluación de la funcionalidad de la CB-NI en la calidad poscosecha y la vida útil de fresa y guayaba.

**Conclusiones y contribuciones:** La técnica de nanoprecipitación permitió obtener NC homogéneas y estables, con una eficiencia de encapsulación del AE-Lg mayor al 50%. Las CB obtenidas con el NI fueron transparentes, flexibles con mejores propiedades físicas al disminuir la permeación al vapor de agua, aumentar la resistencia al rompimiento, la adhesión y conservar la actividad antibacteriana contra *P. carotovorum* con 224  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de carvacrol en la CB-NI. El método de HS-SPME por CG-FID desarrollado, permitió cuantificar de forma exacta y precisa los componentes del AE-Lg incorporados en el NI y en la CB. Finalmente, la CB-NI aplicada en fresa y guayaba aumentó la calidad poscosecha y vida útil de fresa y guayaba por 15 y 25 días respectivamente, al presentar: i) menor porcentaje de pérdida de peso y firmeza, ii) mayor %AT y iii) menor cantidad de SST y cambio de color mostrando así su funcionalidad como cubierta biopolimérica a base de un nanoingrediente.



---

**Dra. C. Rocío Álvarez Román**  
**Directora de Tesis**

## TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	Página
	1.1 Pérdidas de los alimentos en México y en el mundo	1
	1.2 Pérdidas poscosecha de los productos hortofrutícolas	2
	1.2.1 Pérdidas poscosecha causada por microorganismos	4
	1.3 Maduración fisiológica de los productos hortofrutícolas	5
	1.3.1 Cambios de color	6
	1.3.2 Cambios de textura	6
	1.4 Actividad respiratoria de los productos hortofrutícolas	7
	1.4.1 Etileno	8
	1.4.1.1 Oxígeno y dióxido de carbono	9
	1.4.2 <i>Psidium guajava</i> L. guayaba	9
	1.4.3 <i>Fragaria ananassa</i> L. fresa	10
	1.5 Cubiertas biopoliméricas	11
	1.5.1 Composición química de las CB	14
	1.5.1.1 Proteínas	14
	1.5.1.2 Lípidos	16
	1.5.1.3 Polisacáridos	17
	1.5.2 Aceites esenciales en las CB	19
	1.5.3 Aceite esencial de <i>Lippia graveolens</i>	20
	1.5.4 Técnicas de obtención de las CB	22

1.6 Aplicación de la nanotecnología en las CB	24
1.6.1 Nanoingredientes	28
1.7 Antecedentes	29
1.8 Justificación	32
1.9 Hipótesis	33
1.10 Objetivo general	34
1.10 Objetivos específicos	34

## **2 MATERIAL Y MÉTODOS**

2.1 Material, equipo y reactivos	35
2.1.1 Material	35
2.1.2 Equipo	35
2.1.3 Reactivos	36
2.1.4 Material biológico	37
2.2 Formulación del NI biopolimérico con AE- <i>Lg</i> por la técnica de nanoprecipitación y realización de su caracterización físicoquímica	38
2.2.1 Obtención del AE de <i>Lippia graveolens</i> y su caracterización físicoquímica	38
2.2.2 Obtención del nanoingrediente	41
2.2.3 Caracterización físicoquímica del NI	41
2.2.4 Perfil de liberación del AE- <i>Lg</i> en el NI	42
2.2.5 Estabilidad del NI	43

2.3 Validación de un método de <i>HS-SPME</i> para cuantificar los componentes del <i>AE-Lg</i> en el NI biopolimérico por cromatografía de gases con detección de ionización de llama (CG-FID)	44
2.3.1 Selección de la fibra	44
2.3.2 Validación del sistema de <i>HS-SPME</i> por CG-FID	45
2.3.3 Validación del método de <i>HS-SPME</i> por CG-FID	49
2.3.4 Aplicabilidad del método <i>HS-SPME</i> por CG-FID en CB-NI	51
2.4 Obtención de la CB a partir del NI por la técnica de casting y evaluar sus propiedades físicas: ópticas, mecánicas y de permeabilidad, de liberación y antimicrobianas	52
2.4.1 Evaluación de las propiedades físicas de la CB	53
2.4.2 Análisis de las propiedades de permeabilidad	53
2.4.3 Análisis de las propiedades mecánicas	54
2.4.4 Perfil de liberación del <i>AE-Lg</i> en la CB	56
2.4.5 Evaluación de las propiedades antibacterianas	57
2.5 Evaluación de la calidad poscosecha y la vida útil de fresa ( <i>Fragaria ananassa</i> ) y guayaba ( <i>Psidium guajava</i> ) con la aplicación de la CB a base de NI	58
2.5.1 Evaluación física, química y de color de los productos hortofrutícolas	58
2.5.2 Perfil de liberación del <i>AE-Lg</i> en los productos hortofrutícolas y en atmosfera controlada	61

<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b>	
	3.1 Obtención y caracterización del NI y del AE- <i>Lg</i>	63
	3.1.1 Obtención y caracterización fisicoquímica del AE- <i>Lg</i>	64
	3.1.2 Obtención y caracterización fisicoquímica del NI	67
	3.1.3 Perfil de liberación del AE- <i>Lg</i> en el NI	70
	3.1.4 Estabilidad del NI	70
	3.2 Validación de un método de <i>HS-SPME</i> para cuantificar los componentes del AE- <i>Lg</i> en el NI biopolimérico por cromatografía de gases con detección de ionización de llama (CG-FID)	72
	3.2.1 Selección de la fibra	72
	3.2.2 Validación del sistema de <i>HS-SPME</i> por CG-FID	75
	3.2.3 Validación del método de <i>HS-SPME</i> por CG-FID	75
	3.2.4 Aplicabilidad del método de <i>HS-SPME</i> por CG-FID en la CB-NI	77
	3.3 Obtención de la CB a partir del NI por la técnica de casting y evaluar sus propiedades físicas: ópticas, mecánicas y de permeabilidad, de liberación y antimicrobianas	78
	3.3.1 Evaluación de las propiedades físicas de la CB	82
	3.3.2 Análisis de las propiedades de permeabilidad	82
	3.3.3 Evaluación de las propiedades mecánicas	83
	3.3.4 Perfil de liberación del AE- <i>Lg</i> en la CB	84
	3.3.5 Evaluación de las propiedades antibacterianas	84
	3.4 Evaluación de la calidad poscosecha y la vida útil de fresa y guayaba con la aplicación de la CB-NI	86
	3.4.1 Evaluación física, química y de color de los productos hortofrutícolas	86

3.4.2	Perfil de liberación del AE-Lg en los productos hortofrutícolas y en atmosfera controlada	94
<b>4</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	
4.1	Formulación del NI biopolimérico con AE-Lg por la técnica de nanoprecipitación y realización de su caracterización físicoquímica	95
4.2	Validación de un método de HS-SPME para cuantificar los componentes del AE-Lg en el NI biopolimérico por cromatografía de gases con detección de ionización de llama (CG-FID)	106
4.3	Obtención la CB a partir del NI por la técnica de <i>casting</i> y evaluar sus propiedades físicas: ópticas, mecánicas y de permeabilidad, antioxidantes y antimicrobianas	110
4.4	Evaluación de la calidad poscosecha y la vida útil de fresa y guayaba con la aplicación de la CB-NI	121
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	132
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	133
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	134
<b>8</b>	<b>ANEXOS</b>	164

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Géneros y/o especies bacterianas encontradas en diferentes productos hortofrutícolas.	5
2	Características ideales de una cubierta biopolimérica.	13
3	Cubiertas biopoliméricas aplicadas a productos hortofrutícolas.	15
4	Condiciones de extracción de los componentes del AE-Lg para la selección de la fibra.	45
5	Caracterización física del anetol y el AE-Lg.	63
6	Composición química del aceite esencial de <i>Lippia graveolens</i> por Cromatografía de gases acoplada a MS y FID.	66
7	Características fisicoquímicas del NI obtenido por la técnica de nanoprecipitación con dos técnicas de purificación.	67
8	Contenido de mirceno, p-cimeno y carvacrol en el NI con AE-Lg purificado por diálisis y evaporación a presión reducida.	69
9	Parámetros de validación del sistema para cuantificar mirceno, p-cimeno y carvacrol del AE-Lg con HS-SPME por CG-FID.	76
10	Parámetros de validación del método para cuantificar mirceno, p-cimeno y carvacrol del AE-Lg con HS-SPME por CG-FID.	76
11	Porcentaje de eficiencia de retención de los componentes huella del AE-Lg en la CB a partir del NI formada por la técnica de <i>casting</i> .	78
12	Opacidad de la CB formada por la técnica de <i>casting</i> con AL al 1% (p/p) con un tiempo de secado de 24 h.	82
13	Valores de WVP y WVTR de las CB evaluadas a una HR del 95% a 25°C.	83
14	Características mecánicas de las CB formadas a partir de AL, NP blanco o NI a temperatura ambiente con tiempo de secado de 24 h.	83
15	Inhibición del crecimiento de la bacteria <i>Pectobacterium carotovorum</i> ATCC 15713 por le método de difusión en disco.	85

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Principales componentes comúnmente encontrados en los AE.	20
2	Apariencia física de <i>Lippia graveolens</i> .	21
3	Principales métodos utilizados para la aplicación de cubiertas biopoliméricas a productos hortofrutícolas.	23
4	Método envolvente para la aplicación de cubiertas comestibles a productos hortofrutícolas.	24
5	Clasificación de NP en base a su morfología y arquitectura.	25
6	Procedimiento general de la formación de NP por la técnica de nanoprecipitación.	27
7	Suaje tipo I utilizado en la determinación del porcentaje de elongación.	56
8	Dispositivo diseñado para la evaluación de la liberación de los componentes huella del AE-Lg nanoencapsulado en una atmósfera controlada.	62
9	Cromatograma del AE-Lg (2 mg/mL) en diclorometano por CG-MS.	64
10	Cromatograma del AE-Lg (2 mg/mL) en diclorometano por CG-FID.	65
11	Curva de distribución del tamaño del NI con aceite esencial de <i>Lippia graveolens</i> obtenido por la técnica de nanoprecipitación (A); Imagen TEM del NI (B).	67
12	Cromatogramas del A) AE-Lg y del NI obtenido con el método de HS-SPME por CG-FID validado. El NI fue purificado por dos técnicas: B) diálisis y C) evaporación a presión reducida.	68
13	Perfil de liberación del carvacrol. Porcentaje de carvacrol liberado del NI en función del tiempo.	70

14	Variación del tamaño de partícula (A) e índice de polidispersión (B) durante el estudio de la estabilidad del NI por un período de 12 meses.	71
15	Cromatogramas de los estándares (concentración total de 1 mg/ mL) con las cuatro fibras de SPME por CG-FID.	72
16	Comparación de las áreas de los tres estándares (concentración total de 1 mg/ mL) obtenidas con las fibras de HS-SPME evaluadas por GC-FID.	73
17	Cromatogramas del AE-Lg (1 mg/ mL) con las cuatro fibras por HS-SPME por CG-FID.	74
18	Comparación de las áreas de los tres componentes de seguimiento del AE-Lg (1 mg/ mL), obtenidas con las fibras de HS-SPME evaluadas por GC-FID.	74
19	Cromatogramas de las CB-NI obtenido con el método de HS-SPME por CG-FID validado. El NI fue purificado por dos técnicas: A) evaporación a presión reducida y B) diálisis.	77
20	Cubierta biopolimérica a base de NI formada por la técnica de <i>casting</i> con AL al 1% (p/p) con un tiempo de secado de 24 h (A); Micrografía de la CB-NI, en la que se observan las NC (B).	79
21	Señales en el espectro de infrarrojo obtenido para A) polímero Eudragit L100-55 y B) NP blanco.	80
22	Señales en el espectro de infrarrojo obtenido para A) NI, B) NI-AL y c) AE-Lg libre.	81
23	Señales en el espectro de infrarrojo obtenido para AL.	81
24	Perfil de liberación del carvacrol. Porcentaje de carvacrol liberado de las NI y CB-NI en función del tiempo.	84
25	Porcentaje de pérdida de peso de frutos recubiertos con AL, NP-blanco, NI y el control (sin CB) durante el almacenamiento a 4°C en fresa (A) y guayaba (B) después de 3, 7 y 10 días de su aplicación.	87
26	Firmeza de frutos recubiertos con AL, NP-blanco, NI y el control (sin CB) durante el almacenamiento a 4°C en fresa (A) y guayaba (B) después de 1 y 10 días de su aplicación.	88

27	Sólidos solubles totales de frutos recubiertos con AL, NP-blanco, NI y el control (sin CB) durante el almacenamiento a 4°C en fresa (A) y guayaba (B).	89
28	Acidez titulable de frutos recubiertos con AL, NP-blanco, NI y el control (sin CB) durante el almacenamiento a 4°C en fresa (A) y guayaba (B).	90
29	pH de frutos recubiertos con AL, NP-blanco, NI y el control (sin CB) durante el almacenamiento a 4°C en fresa (A) y guayaba (B).	91
30	Cambio de color de frutos recubiertos con AL, NP-blanco, NI y el control (sin CB) durante el almacenamiento a 4°C en fresa (A) y guayaba (B) después de 10 días de almacenamiento.	92
31	Daño microbiológico visual de las fresas y guayabas, después de 15 y 25 días de almacenamiento, respectivamente a 4°C: sin CB (control) (A y A2), AL (B y B2), NP-BCO (C y C2) y CB-NI (D y D2).	93
32	Perfil de liberación del carvacrol. Porcentaje de carvacrol liberado en la fresa y guayaba recubierta con la CB-NI en función del tiempo.	94

## LISTA DE FÓRMULAS

<b>Fórmula</b>		<b>Página</b>
1	Porcentaje de rendimiento (% Rendimiento).	38
2	Porcentaje de encapsulación (%E).	42
3	Porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE).	42
4	Porcentaje de desviación estándar relativa (%DER).	47
5	Límite de detección (LD).	48
6	Límite de cuantificación (LQ).	48
7	Porcentaje de recuperación (%R).	51
8	Opacidad (O).	53
9	Tasa de permeabilidad al agua (WVP).	54
10	Tasa de transpiración al agua (WVTR).	54
11	Porcentaje de elongación (%E).	56
12	Porcentaje de pérdida de peso (%PP).	59
13	Cambio de color ( $\Delta E$ ).	61

## ABREVIATURAS

AE	Aceite esencial
AE-Lg	Aceite esencial de <i>Lippia graveolens</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
HS	<i>Headspace</i>
HS-SPME	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**

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, alimentos inicialmente destinados al consumo y que son desechados o en algunos casos, utilizados de forma alternativa, es decir, de forma no alimentaria.

### **1.1 Pérdidas de los alimentos en México y en el mundo**

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).

Sólo en América Latina, la pérdida es de 127 millones de toneladas, dichas pérdidas se les puede clasificar en diferentes grupos como: cereales en un 25%, raíces y tubérculos 40%, legumbres 20%, frutas y hortalizas 55%, lácteos 20% y mariscos 33%, estas pérdidas se ocasionan en toda la cadena de producción que va desde la cosecha hasta su comercialización (FAO, 2016).

En México, se desperdician 20.4 millones de toneladas de alimentos cada año, lo que representa impactos ambientales por el uso inapropiado de agua y energía, además se generan aproximadamente 36 millones de toneladas de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), el equivalente a lo que generan 15.7 millones de vehículos anualmente, por otra parte, en la producción de alimentos que se desperdician, se pierden más de 40 billones de litros de agua, que se puede comparar con la cantidad utilizada por los mexicanos en 2.4 años (Lezama-León, 2021).

Como podemos observar, las pérdidas más altas se dan en los productos hortofrutícolas, es decir, frutas y hortalizas, esto debido a que 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).

Las frutas y hortalizas generalmente son susceptibles al deterioro poscosecha por diversas razones, entre las principales se encuentran cambios fisiológicos, daños mecánicos, y por causas patológicas (INFOAGRO, 2019).

## **1.2 Pérdidas poscosecha de productos hortofrutícolas**

Las pérdidas poscosecha suelen ocurrir debido a que, 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).

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; Adaskaveg y Blanco-Ulate, 2023). 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).

### **1.2.1 Pérdidas poscosecha 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 (Olivas, 2009; Palumbo, *et al.*, 2022).

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).

En la siguiente tabla, podemos observar las diferentes bacterias que han sido encontradas en diversos productos hortofrutícolas.

**Tabla 1.** Géneros y/o especies bacterianas encontrados en diferentes productos hortofrutícolas.

<b>Género y/o especie bacteriano</b>	<b>Producto hortofrutícola</b>	<b>Referencia</b>
<i>Pectobacterium</i> spp.	Papa, Tomate, Manzana, Pimiento, Pepino, Col, Brócoli, Berenjena, Guayaba, Fresa y Kiwi.	Charkowski, <i>et al.</i> 2018; Zhang, <i>et al.</i> 2022; Rossmann, <i>et al.</i> 2018; Golkhandan, <i>et al.</i> 2013.
<i>Pseudomonas</i> spp.	Tinda (melón indio), Tomate, Cereza, Cilantro, Zanahoria, Cebolla y Kiwi.	Mondal, <i>et al.</i> 2012; Sawada, <i>et al.</i> 2021; Gupta, <i>et al.</i> 2013; Popović, <i>et al.</i> 2015.
<i>Xanthomonas fragariae</i>	Fresa	Mirmajlessi-Mahyar, <i>et al.</i> 2015 ; Song, <i>et al.</i> 2022.
<i>Erwinia psidii</i>	Guayaba	Da-Silva, <i>et al.</i> 2019; Hermenegildo, <i>et al.</i> 2019.

### 1.3 Maduración fisiológica de los productos hortofrutícolas

El desarrollo del fruto ocurre en tres etapas: crecimiento y maduración, seguidas por el ablandamiento y la senescencia. Dentro de estas etapas, ocurren varios pasos que se llevan a cabo entre el inicio del desarrollo del producto y su senescencia. La madurez fisiológica ocurre antes del desarrollo completo del producto hortofrutícola que después de cosechado, debe sobrevivir con sus propios sustratos acumulados. Este es un paso intermedio entre el fin del crecimiento y el inicio de la senescencia. Las actividades bioquímicas y fisiológicas involucradas en el ablandamiento, como cambios en la firmeza y en la velocidad de respiración, entre otros; son irreversibles una vez iniciadas (Sharma, *et al.* 2017).

### **1.3.1 Cambios de color**

Los pigmentos son esenciales para que los frutos sean atractivos, se acumulan comúnmente en la cutícula durante el proceso de maduración, aunque muchos frutos climatéricos también acumulan pigmentos en el tejido de la pulpa durante la maduración poscosecha, a diferencia de los frutos no climatéricos (Bouzayen *et al.*, 2010; Promyou, *et al.*, 2023). Los pigmentos más importantes son los carotenoides y las antocianinas. Además de su papel en la pigmentación, son importantes para la salud humana como fuentes de vitamina A y compuestos antioxidantes, respectivamente (Sharma, *et al.* 2017; Gao, *et al.* 2021).

### **1.3.2 Cambios de textura**

Uno de los principales factores asociado con el deterioro poscosecha de los productos hortofrutícolas es la velocidad de ablandamiento, que provoca una vida de anaquel más corta, con un menor tiempo para transporte y distribución, y que como consecuencia, aumenta las pérdidas poscosecha. El ablandamiento de los productos hortofrutícolas es causado por el efecto acumulativo de una serie de modificaciones que ocurren en las redes de polímeros que constituyen la pared celular primaria. El ablandamiento del fruto es un proceso complejo que involucra tres pasos subsecuentes: 1) relajación de la pared celular mediada por expansinas; 2) despolimerización de hemicelulosas; y 3) despolimerización de poliuronidos por la poligalacturonasa u otras enzimas hidrolíticas; lo cual contribuye a una pérdida de firmeza y cambios en calidad de la textura (Sharma, *et al.* 2017; Gao, *et al.* 2021).

#### 1.4 Actividad respiratoria de los productos hortofrutícolas

Los productos hortofrutícolas, son definidos fisiológicamente con base a la presencia (climatéricos) o ausencia (no climatéricos) del aumento en la respiración y en la síntesis de etileno al comienzo de la madurez de consumo.

Los productos hortofrutícolas climatéricos son aquellos que pueden madurar no sólo adheridos a la planta, sino también después de la cosecha, cuando son cortados en la etapa pre-climatérica, como el tomate (*Solanum lycopersicum*), la manzana (*Malus domestica*), el plátano (*Musa spp.*) y la guayaba (*Psidium guajava*); este tipo de productos alcanzan más pronto la senescencia en vista de que la respiración está acompañada por un aumento similar en los niveles de etileno, que coordina y sincroniza el proceso de maduración (Omboki, *et al.* 2015; Shekhawat, *et al.*, 2022).

Por otro lado, los productos hortofrutícolas no climatéricos como la fresa (*Fragaria ananassa*), la uva (*Vitis vinifera L.*) y los cítricos, solo alcanzan la maduración cuando aún están unidos a la planta, ya que no presentan un aumento en la respiración y en la producción de etileno después de la cosecha.

Los productos hortofrutícolas no climatéricos no desarrollan los patrones climatéricos que incluyen el aumento en la respiración, biosíntesis de etileno y respuesta autocatalítica al etileno, pero muestran algunas respuestas típicas al etileno como desverdizado (cambios en la coloración de verde a amarillo o anaranjado y ablandamiento (síntesis de enzimas que degradan la pared celular), entre otros (Dos Santos *et al.*, 2015). Es decir, se llevan a cabo los mismos cambios bioquímicos en el color, textura, sabor y olor del fruto.

### 1.4.1 Etileno

El crecimiento y desarrollo de los productos hortofrutícolas son controlados por la producción de fitohormonas, las cuales son susceptibles a los cambios ambientales. Entre estas fitohormonas se encuentra el etileno, que controla muchos procesos en las plantas superiores, como la senescencia de los órganos, respuesta al estrés, la germinación de la semilla, la cicatrización de heridas, además de las interacciones con otras hormonas y iones metálicos. Asimismo, el etileno es la principal hormona que inicia y controla el proceso de maduración del producto hortofrutícola (Manjunatha, *et al.* 2012; Huang, *et al.*, 2022). La producción de etileno aumenta naturalmente durante la abscisión de la hoja del fruto y la senescencia floral, así como durante la maduración del fruto. Cualquier tipo de herida puede también inducir la biosíntesis de etileno, así como cualquier estrés por encharcamiento, congelación, infección, calor o déficit hídrico.

En los productos hortofrutícolas carnosos, se ha intentado disminuir la biosíntesis del etileno durante la maduración, para retardar el deterioro en poscosecha, puesto que una vez que la maduración ha sido iniciada, el proceso es incontrolable. La mayor parte de los procedimientos utilizados para limitar la biosíntesis de etileno se enfocan en el aumento o disminución de la temperatura y la modificación de la atmósfera en la que se conservan los productos, tales como las cubiertas biopoliméricas (Fabi, *et al.* 2019).

#### **1.4.1.1 Oxígeno y Dióxido de carbono**

Concentraciones de O<sub>2</sub> iguales o superiores a la normal existentes en el aire ambiente (21%) provocan un aumento de la intensidad respiratoria (IR), un aumento en la maduración y una reducción de la vida comercial de los productos vegetales, siendo la respuesta más o menos pronunciada según el producto y variedad de que se trate. Cuando se tienen concentraciones altas de O<sub>2</sub>, se aumenta la síntesis de etileno y de compuestos aromáticos, es por esta razón que se tiene un aumento en la maduración del producto. Por otro lado, en el caso del CO<sub>2</sub>, se ha observado que altas concentraciones de este gas reducen la tasa respiratoria de frutas y hortalizas y niveles superiores de 1%, pueden inhibir la acción del etileno. El modo de acción de este gas es que compite por los sitios activos con el etileno y evita su acción fisiológica en el fruto (Boeckx, *et al.*, 2019).

#### **1.4.2 *Psidium guajava* L. guayaba**

*Psidium guajava* L., conocido popularmente como guayaba, es un pequeño árbol perteneciente a la familia de los mirtos (*Myrtaceae*), que comprende alrededor de 80 géneros y 3000 especies distribuidas en los trópicos y subtrópicos, principalmente en América, Asia y Australia (Pereira, *et al.* 2017). El género *Psidium* tiene alrededor de 150 especies de arbustos, siendo *P. guajava* la más conocida y de mayor distribución en todo el mundo. Nativos de las áreas tropicales desde el sur de México hasta el norte de América del Sur, los árboles de guayaba han sido cultivados por muchos otros países que tienen climas tropicales y subtropicales, lo que permite su producción en todo el mundo (Díaz-de-Cerio, *et*

al. 2017). Los frutos son en forma de bayas, de hasta 8 cm de diámetro, globosas a ovoides, con el cáliz persistente en el ápice, carnosas, de color crema amarillento a rosado, de olor fragante y sabor agridulce. El pericarpio o cáscara exterior, es fino de color amarillo; fruto conteniendo numerosas semillas. La guayaba es reconocida por su alto contenido de vitamina C, también contiene mucha agua y pocas calorías y es rica en vitamina A, E, D12, hierro, cobre, calcio, magnesio, potasio, manganeso y fósforo (Tousif, *et al.* 2022). Por otro lado, es necesario mencionar que la guayaba es un fruto climatérico. Los frutos climatéricos son aquellos que siguen madurando aún después de haber sido recolectados, lo cual se debe a que independientemente de que ya no estén en la planta, aumentan su tasa de respiración (crisis climatérica) y producción endógena de etileno, es decir, por la misma planta. Una práctica que se realiza para madurar este tipo de frutos más rápido, por ejemplo, para sacarlos cuando existe un buen precio de venta, consiste en la aplicación exógena de etileno, lo que implica realizar aplicaciones del mismo para que se acelere la maduración.

#### **1.4.3 *Fragaria ananassa* L. fresa**

La fresa, pertenece a la familia *Rosaceae*, subfamilia *Rosoideas*, tribu *Potentilleae*, género *Fragaria*, que se origina del latín “fragancia”. En la familia *Rosaceae* se reportan más de 2,000 especies, entre herbáceas, arbustos y árboles. Estudios recientes, revelan que la especie de fresa actualmente cultivada, *Fragaria ananassa*, es un híbrido entre *F. virginiana* y *F. chiloensis*, ambas especies de origen americano, distribuidas a otros continentes a partir del siglo XVI. Entre las características de este género, se encuentran que se trata de una planta herbácea

perenne con hojas y flores que salen de coronas basales, tallos y estolones rastreros, flores blancas y pistilos numerosos, que crecen en un receptáculo convexo "fruto tipo baya". La fresa es una infrutescencia (disposición de las flores, sobre las ramas o la extremidad del tallo) cuya parte carnosa corresponde al receptáculo y los verdaderos frutos son, las semillitas que lo recubren y se llaman aquenios. La fresa es excelente fuente de flavonoides, vitamina A y C. El contenido de vitamina C es tres veces mayor que en el tomate y la lechuga, y el doble de la manzana; éstos contenidos pueden variar según el genotipo y condiciones edafoclimáticas (Quispe y Orellana, 2017). En cuanto al metabolismo de este fruto, la fresa es un fruto no climatérico. Los frutos no climatéricos son aquellos que no presentan crisis climática, es decir, se deben recolectar casi en su punto de madurez comercial porque una vez cortados de la planta, solo madurarán un poco más, siendo para muchos cultivos una maduración casi despreciable. Los frutos no climatéricos no presentan variaciones importantes en su tasa de respiración durante la etapa de maduración, ni tampoco de síntesis de etileno. Esto implica que una vez cortados, no mejoran sus características organolépticas (sabor, aroma, color, etc.). Por último, es importante mencionar que para estos frutos, la aplicación exógena de etileno no altera las características de la maduración aunque sí aumenta la respiración.

### **1.5 Cubiertas biopoliméricas**

Una cubierta biopolimérica (CB), se define como una o varias capas finas y continuas de material polimérico natural que se colocan sobre los productos hortofrutícolas (De Ancos *et al*, 2015; Pérez-Vazquez, *et al.*, 2023).

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 de anaquel y c) la reducción del riesgo de crecimiento de patógenos en las superficies de los productos hortofrutícolas (Duan, *et al.* 2019; Pratap, *et al.*, 2022).

El principio del uso de la CB es muy similar al envasado en atmósfera modificada, donde se crea una atmósfera que consiste en una alta concentración de CO<sub>2</sub> y baja de O<sub>2</sub> (Nor y Ding, 2020). Este entorno puede ralentizar efectivamente la tasa de respiración, conservar la energía almacenada, retardar el crecimiento microbiano y, por lo tanto, extender la vida de anaquel de la fruta (Fan *et al.*, 2019; Salas-Méndez *et al.*, 2019).

La vida de anaquel del producto se puede prolongar reduciendo la respiración con la ayuda de CB (Galus, *et al.* 2015; Liu, *et al.*, 2023). La mejora de la vida de anaquel de los productos alimenticios es muy importante, ya que incluso una extensión de unos pocos días, podría representar una ventaja económica significativa. De forma general, las CB deberían cumplir con las características descritas en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Características ideales de una cubierta biopolimérica para ser aplicada en productos hortofrutícolas.

<b>Propiedad</b>	<b>Medida cuantitativa</b>	<b>Referencia</b>
Pérdida de agua	Baja permeabilidad al agua	Xu, <i>et al.</i> 2020
Permeabilidad al O <sub>2</sub>	Baja tasa de permeabilidad al O <sub>2</sub>	Meng, <i>et al.</i> 2021
Producción de etileno	Baja producción de etileno	Santos, <i>et al.</i> 2018
Resistencia mecánica	Óptimas características de elongación, adhesión y fuerza tensil	Kamal, Rahman y Anuar, 2017
Transparencia en la superficie del producto hortofrutícola	Alta transparencia	Kwak, <i>et al.</i> 2021
Color y características sensoriales del producto hortofrutícola	Sin color ni sabor	Cruz, <i>et al.</i> 2010
Seguridad de la composición	Generalmente reconocido como seguro (GRAS)	FDA, 2019

Además, 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). 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).

### **1.5.1 Composición química de las CB**

Las CB tienen la característica de estar elaboradas con materiales naturales como proteínas, lípidos, polisacáridos y materiales de origen microbiano. Dependiendo de su composición, se pueden variar las propiedades funcionales de las cubiertas, por lo que el conocimiento de la forma en que cada componente interactúa física y/o químicamente ofrece la posibilidad de diseñar cubiertas con características específicas para su aplicación en los productos hortofrutícolas (Hassan *et al.* 2018), tal y como se muestra en la Tabla 3.

#### **1.5.1.1 Proteínas**

Una proteína, es un heteropolímero de más de cien aminoácidos (monómeros) unidos por enlaces peptídicos. Las propiedades mecánicas de las CB de proteínas son mejores que las de los polisacáridos y lípidos debido a su estructura única (basada en 20 monómeros diferentes) que proporcionan una gama más amplia de propiedades funcionales, una de las cuales es su alto potencial de unión intermolecular que puede formar enlaces en diferentes posiciones (Kaewprachu, *et al.* 2015). Las cubiertas elaboradas con proteínas presentan gran permeabilidad al vapor de agua, 2 o 4 veces más que los empaques plásticos, por lo que son buenas formadoras de cubiertas (Mohamed, *et al.* 2020). Generalmente, los biopolímeros a base de proteínas comprenden más de 100 aminoácidos en sus colas y deben desnaturalizarse con disolvente, calor o en condiciones ácidas o básicas para formar CB (Suput, *et al.* 2015; Enujiugha y Oyinloye, 2019).

**Tabla 3.** Cubiertas biopoliméricas aplicadas a productos hortofrutícolas.

<b>Producto hortofrutícola</b>	<b>Biopolímero (polisacárido, lípido y/o proteína)</b>	<b>Resultado</b>	<b>Referencia</b>
Papaya	Alginato	Vida de anaquel fue extendida	Rangel-Marrón, <i>et al.</i> 2019
	Carragenina	Se retrasó la maduración y se prolongó la vida de anaquel	Hamzah, <i>et al.</i> 2018
Fresa	Quitosano	Se extendió la vida de anaquel	Ventura- Aguilar, <i>et al.</i> 2018
	Quitosano y $\beta$ -caroteno	Crecimiento bacteriano y fúngico fue controlado y se mantuvo la capacidad antioxidante	Hajji, <i>et al.</i> 2018
	Quitosano y ácido ascórbico	Se mantuvo la calidad de la fruta al conservar un mayor contenido de sólidos solubles totales, acidez titulable, contenido de ácido ascórbico, fenoles totales y actividad antioxidante.	Saleem, <i>et al.</i> 2021
Manzana	Alginato, pectina y goma gellan	Se mejoró la calidad poscosecha y se extendió la vida de anaquel	Moreira, <i>et al.</i> 2015
	Alginato y aceite esencial de limón	Retardó la respiración, la pérdida de humedad y la actividad enzimática	Cofelice, <i>et al.</i> 2019
Mango	Hidroxipropil-metilcelulosa y cera de abejas	Se controló la maduración, manteniendo los colores de cáscara y pulpa, firmeza y acidez titulable.	Sousa, <i>et al.</i> 2021
Guayaba	Hidroxipropil-metilcelulosa y aceite de palma	Evito la pérdida de peso y el cambio de color, además mantuvo la firmeza y retrasó las actividades enzimáticas de la peroxidasa y la polifenol oxidasa del producto	Vishwasrao, <i>et al.</i> 2016

El colágeno, la gelatina, las proteínas de leche, de soya, derivadas de los cereales y las oleosas, se encuentran entre las proteínas que se pueden utilizar en las CB (Liu *et al.* 2017; Mohamed *et al.* 2019).

Por ejemplo, las CB a base de suero láctico, son una buena barrera para el CO<sub>2</sub> (Mohamed *et al.* 2019); las CB de colágeno ya se utilizan para reservar la humedad y dar una característica uniforme al producto (Jeevahan, *et al.* 2020); y las CB a base de gelatina, al tener una mayor cantidad de proteínas, tienen un mayor espesor de cubierta y mayores propiedades mecánicas (Liu, *et al.* 2017). Un ejemplo, es el de Socaciu y cols. (2018), que elaboraron CB basadas en aislado de proteína de suero, la cual mostró buenas propiedades físicas (transparente) y mecánicas (resistente a la penetración mecánica).

#### **1.5.1.2 Lípidos**

Las CB a base de lípidos se consideran altamente efectivas para bloquear el suministro de humedad debido a su baja polaridad (Dehghani, Hosseini y Regenstein 2018). Sin embargo, esta hidrofobicidad les confiere a las CB una inadecuada fragilidad y mayor grosor (Rodríguez-García, *et al.* 2016).

Cabe resaltar, que los lípidos, mezclados con proteínas y polisacáridos, producen cubiertas con resistencias mecánicas y de barrera más altas, comparado con las cubiertas formadas a base de lípidos puros, ya que al combinarse con proteínas y / o polisacáridos se forman cubiertas, aumentando las propiedades de barrera al vapor de agua de las cubiertas comestibles (Arnon-Rips, *et al.* 2018).

Los componentes lipídicos que se pueden utilizar en cubiertas son ceras naturales, ceras a base de petróleo, ácidos grasos, aceites minerales, aceites a

base de petróleo y resinas (Galus y Kadzinska 2015). Por ejemplo, Ibrahim y cols. (2014) determinaron que la combinación de cera y sorbitol en una CB mejoró la flexibilidad y retrasó la maduración en la piña. En otra investigación, la cera de carnauba conservó la calidad del mango a bajas temperaturas (Rastegar, Hassanzadeh y Rahimzadeh, 2019) y por otro lado, la cera de parafina conservó la calidad del rambután a temperatura ambiente (Saowakon *et al.* 2017).

### **1.5.1.3 Polisacáridos**

Los polisacáridos, son uno de los materiales que se han utilizado recientemente como material sostenible en la formulación de CB (Mellinas *et al.* 2016). Los polisacáridos, son materiales no tóxicos y están ampliamente disponibles en la naturaleza (Erginkaya *et al.* 2014). Un ejemplo de ellos son, el quitosano, alginato, celulosa, pectina, carragenina, almidón, agar y pululano (Menezes y Athmaselvi, 2018; Parreidt *et al.* 2019; Chakravartula *et al.* 2019; Kamal *et al.* 2020; Krasniewska, *et al.* 2017).

Las CB a base de polisacáridos, suelen ser un bloqueador de oxígeno y dióxido de carbono eficiente, debido a su forma de red de enlaces de hidrógeno bien ordenada (Shah, *et al.* 2016). Estas características permiten que las cubiertas a base de polisacáridos prolonguen la vida de anaquel de los productos hortofrutícolas, ya que permiten controlar su maduración al reducir la oxidación de algunos de sus componentes y al retardar la pérdida de vapores orgánicos (compuestos aromáticos) (Cazón, *et al.* 2017). Por ejemplo, en una investigación realizada por Panahirad y cols. (2020) elaboraron CB a base de

carboximetilcelulosa y pectina, y las aplicaron para mejorar la calidad poscosecha de ciruelas. Las cubiertas aplicadas, conservaron la firmeza y mejoraron el contenido total de fenoles, antocianinas y flavonoides, así mismo retrasó la pérdida de la vitamina C y de la acidez titulable por seis semanas.

Así mismo en el 2018, Martínez y cols. elaboraron CB a base de quitosano con aceite esencial de *Thymus capitatus*, y encontraron un aumento de la vida de anaquel de las fresas hasta por 15 días, ya que retrasaron la pérdida de propiedades fisicoquímicas y antioxidantes de las frutas.

Sin embargo, es conveniente resaltar, que las CB a base de polisacáridos presentan como desventaja, que no se comportan bien como barreras contra la humedad porque son de naturaleza hidrófila, por lo que es común que se combinen con proteínas para la elaboración de una CB (Hassan, *et al.* 2018). Como por ejemplo, la investigación realizada por Muley y cols. (2019), en donde se aplicaron CB a base de quitosano y aislado de proteína de suero, para extender la vida de anaquel de fresas. En este trabajo, se encontró que las cubiertas redujeron las pérdidas de peso, color, ácido ascórbico y fenoles totales, por lo que se extendió su vida de anaquel hasta por 8 días, comparado con las fresas control (sin cubierta) que fue de 3 a 5 días.

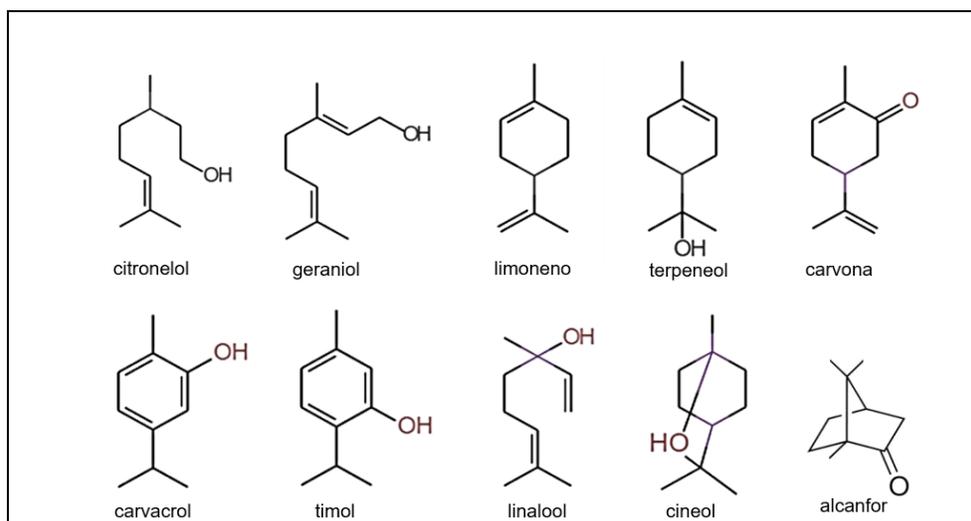
En una investigación realizada por Mohammadi y cols. (2018), se elaboraron CB a base de gelatina y quitosano, y encontraron que con la adición del quitosano, se aumentó significativamente el porcentaje de elongación de la cubierta aproximadamente en un 40%, comparado con las cubiertas formadas únicamente a base de gelatina.

### 1.5.2 Aceites esenciales en las 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; Elsebai and Albalawi, 2022).

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 1 se ilustran ejemplos de componentes encontrados en los AE.



**Figura 1.** Principales componentes comúnmente encontrados en los AE.

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 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, y poseen propiedades tanto antibacterianas 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).

### 1.5.3 Aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens*)

Orégano es el nombre común aplicado a más de 40 especies de las familias *Verbenaceae*, *Lamiaceae*, *Compositae* y *Leguminosae*, de las cuales las más importantes son el orégano mediterráneo o europeo (*Origanum vulgare*) y el orégano mexicano (*Lippia graveolens*).

El orégano que pertenece a la familia *Verbenaceae*, es considerada la de mayor importancia por su distribución y sus características aromáticas; de esta familia destaca el género *Lippia*.



**Figura 2.** Apariencia física de *Lippia graveolens*.

La planta de *Lippia graveolens* tiene una forma arbustiva caducifolia (que tira sus hojas al no haber humedad en el suelo) perenne, que llega a alcanzar hasta 2 metros de altura y 1 metro de diámetro de cobertura foliar, muy ramificado, con un crecimiento relativamente rápido y un ciclo de vida corto (de entre cinco y diez años). Se distribuye extensamente en los climas semiáridos de México y de América Central y es resistente a la sequía.

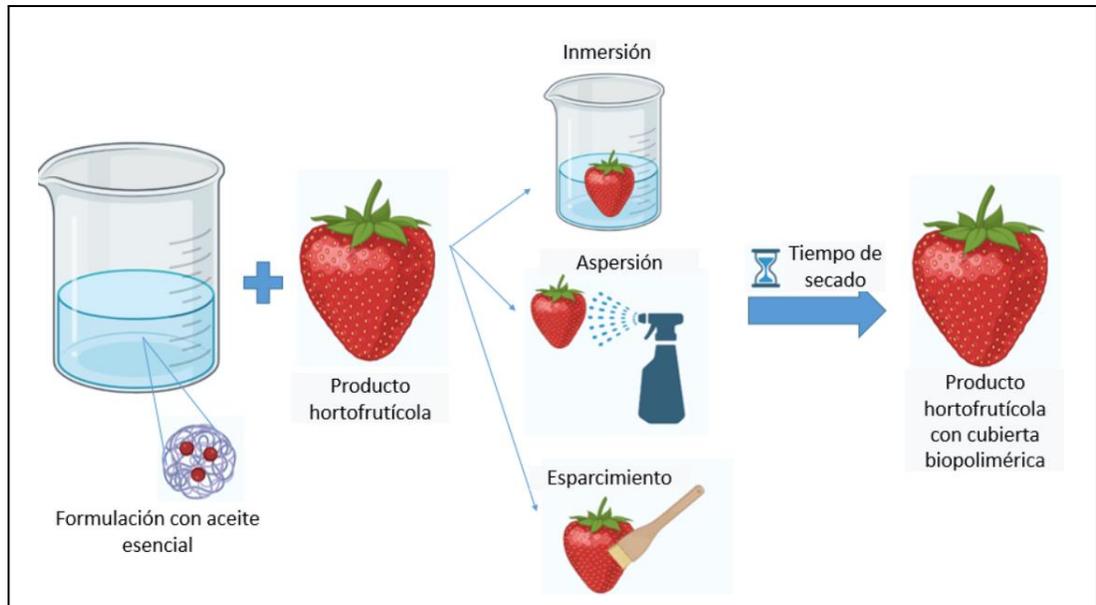
Los usos que se ha dado a las hojas del orégano en la medicina tradicional y que han sido reportados por algunos autores son como antiasmático, antiespasmódico, carminativo, antitusígeno, antioxidante, antihelmítico, antiinfeccioso y como fungicida.

Las propiedades antioxidantes y antimicrobianas del aceite esencial de orégano, lo convierten en un fuerte candidato como un conservante natural de

alimentos, como los productos hortofrutícolas. Su propiedad antimicrobiana es atribuida, a dos de sus componentes principales: el timol y el carvacrol, los cuales tienen la capacidad de romper la membrana celular, lo cual provoca una mayor permeabilidad. El daño se refleja en la disipación de los dos componentes de la fuerza motriz del protón, el gradiente de pH y el potencial eléctrico (Veenstra y Johnson, 2019; Leyva-López, *et al.* 2017).

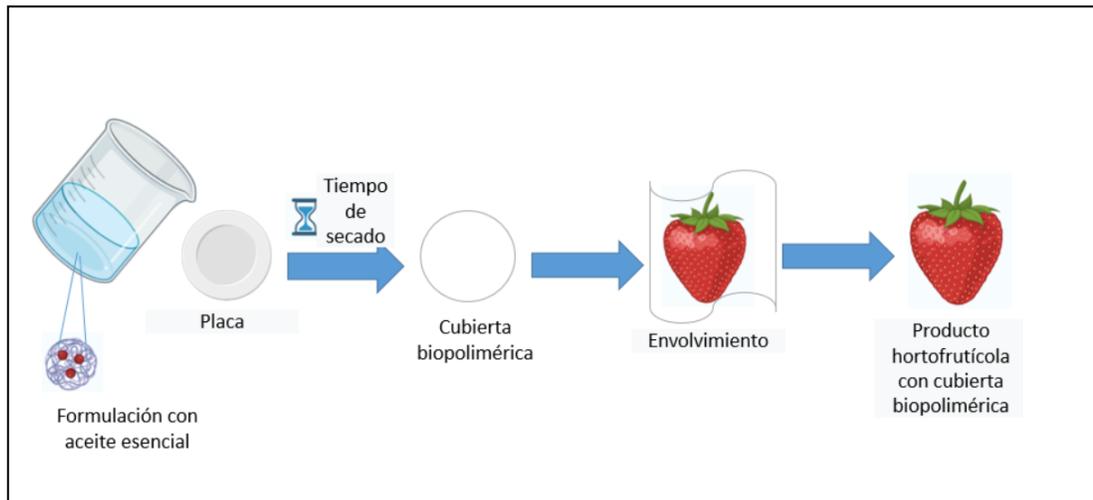
#### **1.5.4 Técnicas de obtención de CB**

En la formulación de cubiertas biopoliméricas, se prefieren utilizar soluciones formadoras de cubiertas con mayor carácter hidrofóbico que hidrofílico, ya que estos sistemas son termodinámicamente más estables y pueden disolver componentes antimicrobianos lipófilos como los AE y componentes bioactivos, como por ejemplo antioxidantes (Salvia-Trujillo, *et al.* 2017). Los sistemas formadores de cubiertas biopoliméricas deben incorporarse / recubrirse en el producto para que seque y posteriormente generar una matriz rígida que actuará como una cubierta biopolimérica.



**Figura 3.** Principales métodos utilizados para la aplicación de cubiertas biopoliméricas a productos hortofrutícolas.

Los métodos para aplicar la cubierta biopolimérica con aceites esenciales incluyen principalmente el método de inmersión, el método de rociado o *spraying*, el método de esparcimiento y el método envoltivo, tal y como se muestra en la Figura 3. Las formulaciones de CB se añaden y secan directamente sobre la superficie del alimento, mientras que para el método envoltivo, las formulaciones de CB se vierten en un molde y se secan para luego incorporarlas al producto (Figura 4).



**Figura 4.** Método envolvente para la aplicación de cubiertas biopoliméricas a productos hortofrutícolas.

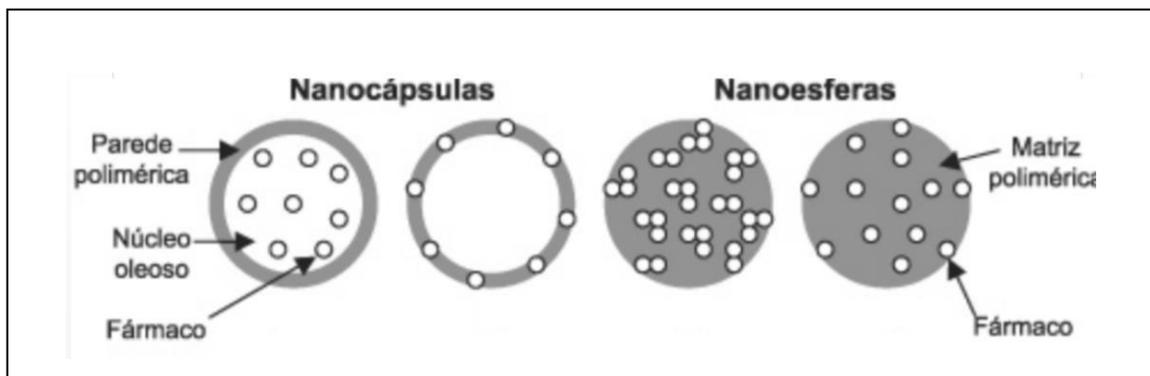
### 1.6 Aplicación de la nanotecnología en las CB

Hoy en día, la nanotecnología representa un área de oportunidad para el desarrollo de vehículos que transporten ciertos AE, vitaminas y otros extractos de plantas, como los polifenoles, con propiedades antimicrobianas y antioxidantes.

La nanotecnología incluye todos los sistemas de tamaño submicrónico (<1000 nm), preferiblemente los que miden 100-500 nm. Su mayor superficie por masa en comparación con partículas más grandes de la misma composición química hacen que los nanosistemas sean más estables y biológicamente activos, al tiempo que permiten la incorporación de sustancias hidrófobas y / o activas que no modifican mucho su apariencia o transparencia, pero mantienen las características visuales, además de ayudar a aumentar la vida de anaquel de los alimentos (Dan, 2016). Además, su tamaño submicrónico ofrece una nueva forma de modificar las propiedades de transporte de gas y la liberación de productos

naturales, al tiempo que mejora la resistencia mecánica, transparencia, funcionalidad y actividad antioxidante y antimicrobiana. Entre los nanosistemas más utilizados, se encuentran las nanopartículas. 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: nanoesferas (NE) y 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).



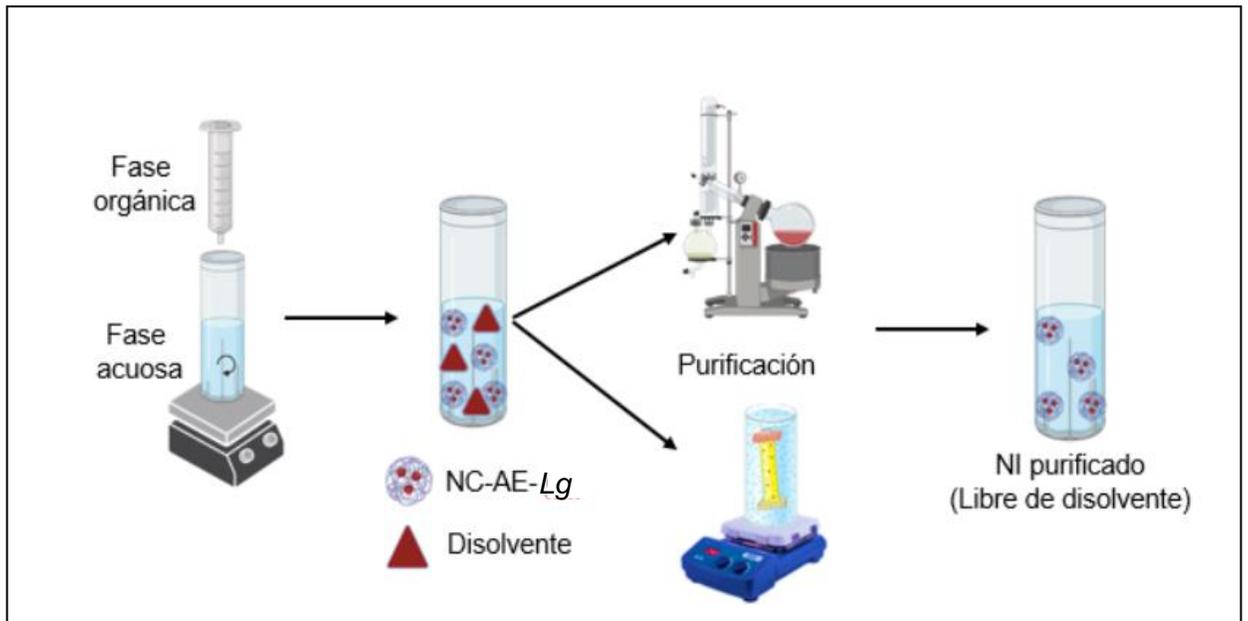
**Figura 5.** Clasificación de NP en base a su morfología y arquitectura (Salas-Cedillo, 2016).

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 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 (Bovone, *et al.*, 2022).

Después de la formación de las NP, el solvente orgánico debe ser eliminado para evitar desestabilizar el sistema y la formación 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 de anaquel 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; Su, *et al.*, 2022).

En la actualidad, se llevan a cabo diversas 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 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; Alshallash, *et al.*, 2022).

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 *Lippia berlandieri* sobre jitomate y fresa (Galindo-Rodríguez, Álvarez-Román, *et al.* 2014).

## 1.7 Antecedentes

Con base a que, los nanoingredientes pueden actuar como sistemas de distribución temporal, su aplicación en productos hortofrutícolas ha adquirido una gran relevancia, ya que estos son capaces de liberar sustancias activas de una cubierta biopolimérica a un producto hortofrutícola, para de esta forma mejorar su conservación y extender su vida de anaquel.

En particular, en el grupo de trabajo se cuenta con dos patentes 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 *Lippia berlandieri* (Galindo- Rodríguez y Álvarez-Román, 2014).

De igual forma, se evaluó un multisistema de NC con el AE de *Thymus vulgaris* como potencial nanoingrediente conservador para prolongar la vida de anaquel de la uva (*Vitis vinífera*) y la papaya (*Carica papaya*). Se estableció que la aplicación del multisistema en la uva redujo la tasa de respiración del producto, evitó la pérdida de agua y disminuyó la actividad enzimática del producto teniendo así una maduración más lenta de la uva. De igual forma, el multisistema de NC con el AE de *Thymus vulgaris*, conservó las características de color y firmeza de los productos hortofrutícolas y permitió la ausencia de daño macroscópico causado por microorganismos en uva y papaya. Todos estos cambios fueron atribuidos a que el multisistema actuó como una barrera física para i) reducir el metabolismo de las frutas, ii) evitar el crecimiento de microorganismos y iii) conservar la actividad antioxidante del AE de *Thymus vulgaris* (Piña-Barrera, *et al.* 2019).

En otro estudio, también realizado en el grupo de trabajo, se elaboró un recubrimiento comestible a base de alginato en combinación con NC con eugenol (componente del AE del clavo) para favorecer la vida de anaquel del jitomate (*Solanum lycopersicum*). Se estableció que el recubrimiento con NC-eugenol, favorecía la firmeza del fruto e inhibía el crecimiento del fitopatógeno *Colletotrichum gloesporoides*. Se constató que el recubrimiento a base de alginato con NC-eugenol, fue efectivo para retrasar la maduración del jitomate al disminuir su tasa de respiración (metabolismo) además de, protegerlos de fitopatógenos (Piña-Barrera, *et al.* 2021).

Finalmente, otro estudio del grupo de trabajo, se enfocó en la caracterización mecánica y de una cubierta biopolimérica a base de alginato enriquecida con el nanoingrediente de aceite esencial de *Thymus vulgaris* para su aplicación en productos hortofrutícolas. Se demostró que, la adición del nanoingrediente en la cubierta biopolimérica, aumenta su flexibilidad, favorece su resistencia y adhesión a la superficie aplicada; parámetros mecánicos idóneos que permitirían proteger a los productos hortofrutícolas durante las maniobras de manejo y transporte y por ende disminuir su pérdida poscosecha (González-Moreno, *et al.* 2020).

## **1.8 Justificación**

Actualmente, México es de los principales exportadores mundiales de fresa y guayaba, ocupando el tercer y cuarto lugar respectivamente. Es por esto, que el ofrecer productos con todas sus cualidades organolépticas por un tiempo más prolongado, representa una ventaja competitiva frente a otras economías mundiales.

Sin embargo, es importante mencionar que se ha reportado una pérdida poscosecha de hasta el 57% de guayaba, lo cual se traduce como un desperdicio de 63,719.37 toneladas al año, siendo una pérdida significativa de este producto hortofrutícola. Mientras que, la fresa tiene una pérdida poscosecha de hasta el 27%. En los últimos años, el uso de nanoingredientes en los productos hortofrutícolas han representado una propuesta innovadora, ya que permiten la reducción de su pérdida poscosecha, al actuar como sistemas de distribución temporal, para liberar el activo de la cubierta biopolimérica al producto. Es por esto que el empleo de cubiertas biopoliméricas con nanoingredientes, representa una estrategia innovadora para el futuro control y reducción de pérdidas y desperdicios de productos hortofrutícolas.

## 1.9 Hipótesis

La aplicación de cubiertas biopoliméricas a base del nanoingrediente de *Lippia spp.*, permite conservar y aumentar la vida de anaquel de productos hortofrutícolas como la fresa (*Fragaria ananassa*) y la guayaba (*Psidium guajava*) al modificar sus propiedades físicas: mecánicas y de permeabilidad, de liberación y favorecer la actividad antibacteriana.

### 1.10 Objetivo General

Desarrollar cubiertas biopoliméricas a base de nanoingrediente con aceite esencial de *Lippia graveolens*, que aumenten la vida de anaquel de productos hortofrutícolas como la fresa (*Fragaria ananassa*) y la guayaba (*Psidium guajava*) al modificar sus propiedades físicas: mecánicas y de permeabilidad, de liberación y favorecer la actividad antibacteriana.

### 1.11 Objetivos específicos

1. Formular el nanoingrediente biopolimérico con aceite esencial de *Lippia graveolens* por la técnica de nanoprecipitación y realizar su caracterización físicoquímica.
2. Validar un método de microextracción en fase sólida en la modalidad *headspace* (HS-SPME) para cuantificar los componentes del aceite esencial de *Lippia graveolens* en el nanoingrediente biopolimérico por cromatografía de gases con detección de ionización de llama (CG-FID).
3. Obtener la cubierta biopolimérica a partir del nanoingrediente por la técnica de *casting* y evaluar sus propiedades físicas: ópticas, mecánicas y de permeabilidad, de liberación y antibacterianas.
4. Evaluar la calidad poscosecha y la vida útil de fresa (*Fragaria ananassa*) y guayaba (*Psidium guajava*) con la aplicación de la cubierta biopolimérica a base de nanoingrediente.

## CAPITULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 Material y equipo

##### 2.1.1 Material

- Fibra de SPME: Poliacrilato, Polidimetilsiloxano, Carboxen/ Polidimetilsiloxano y Divinilbenceno/ Carboxen/ Polidimetilsiloxano 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), Perkin Elmer, modelo Claurus 480
- Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, Perkin Elmer, 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
- Espectrofotómetro IR-FT (Perkin Elmer, modelo Frontier Óptica)
- Densímetro (AntonPaar, modelo DMA35)
- Polarímetro (Perkin Elmer, modelo 341)
- Refractómetro (AntonPaar, modelo Abbermat 300)

### 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
- Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)
- Ácido linoleico >99%, marca Sigma

#### 2.1.4 Material biológico

- Aceite esencial extraído de la planta *Lippia graveolens* (orégano) de Cuatro Ciénegas, Coahuila de Zaragoza (26° 59' N 102° 03' 59" OE)
- *Pectobacterium carotovorum* ATCC15713

## 2.2 Formulación del nanoingrediente biopolimérico con aceite esencial de *Lippia graveolens* por la técnica de nanoprecipitación y caracterización físicoquímica

### 2.2.1 Obtención del aceite esencial de *Lippia graveolens*

Antes de formular el nanoingrediente biopolimérico, es necesario obtener el aceite esencial de *Lippia graveolens* y realizar su caracterización química y física. Para esto, se siguieron los siguientes procedimientos.

#### a) Obtención del AE por hidrodestilación

Las hojas y tallos de la planta fresca de *Lippia graveolens* fueron cortados y pesados. En un matraz bola se colocaron 100 g del material vegetal fresco y se sometieron al proceso de hidrodestilación durante 4 h a partir del punto de ebullición del agua, en un equipo Clevenger modificado. El AE-*Lg* fue colectado, pesado y almacenado en un vial de vidrio ámbar a -4 °C.

Posteriormente, se calculó el porcentaje de rendimiento de la extracción por triplicado, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso del aceite esencial}}{\text{Peso de la planta}} \times 100 \quad \text{Fórmula 1}$$

*b) Caracterización física del AE*

- Índice de refracción

Se determinó el índice de refracción de acuerdo al método general de análisis 0741 de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). Se utilizó un refractómetro, el cual se calibró con agua destilada a 25°C. Posteriormente se depositó una gota del AE-Lg en el área de muestra y se obtuvo el resultado, se realizó por triplicado de manera independiente. Se utilizó anetol como control.

- Rotación óptica

Se utilizó un polarímetro y se realizó en base al método 0771 de la FEUM. El equipo fue calibrado con una solución de sacarosa de 260 mg/ mL a 25°C. Posteriormente, se llenó la celda de 1 mL con el AE-Lg y se obtuvo el resultado por quintuplicado de manera independiente. Se utilizó anetol como control.

- Densidad relativa

Se determinó la densidad relativa en base al método 0251 de la FEUM. Se usó un densímetro, el cual se llenará con 1 mL del AE-Lg y se determinó la densidad relativa del mismo a 25°C, por triplicado de manera independiente y se utilizó anetol como control.

### c) Caracterización química del AE

Con el fin de identificar los componentes del AE-Lg, 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 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm. La temperatura de la fuente de ionización fue de 230°C, la temperatura del cuádruplo de 150 °C y a temperatura del inyector 220°C. Para cada corrida, el programa de temperatura del horno del CG fue de 35°C por 9 minutos, incrementando 3 °C/ min hasta 150°C por 10 min, después se incrementó 10°C/ min hasta 250°C y finalmente, se incrementó 3°C/ min hasta 270°C por 10 min. El flujo del gas acarreador (helio, 99.999% de pureza) fue de 2 mL/ min. La energía de ionización fue de 70 eV. Las muestras fueron inyectadas en modo *splitless*. Se inyectaron 2 µL de una dilución de una solución de AE-Lg a una concentración de 2mg/ 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-Lg, 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 µm con el mismo programa de calentamiento del horno del GC-MS. Se calculó el porcentaje de abundancia (%A) de los componentes, relativo al área total de todos los componentes. Posteriormente, se seleccionaron tres componentes

"huella" con mayor %A, para ser los componentes de seguimiento en la obtención de las NC y en la formación de la CB. Finalmente se estableció la proporción de los tres componentes huella en base a la normalización de áreas.

### **2.2.2 Obtención del NI**

Para la obtención de las nanocápsulas poliméricas cargadas con el AE-Lg: nanoingrediente (NI), se empleó la técnica de nanoprecipitación (Fessi, *et al.* 1989). Esta técnica consiste 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-Lg. Por otro lado, para la obtención de las nanopartículas blanco (NP-blanco), se siguió el mismo procedimiento, sin adición del AE-Lg.

Para eliminar los disolventes orgánicos, se utilizó la técnica de purificación de evaporación a presión reducida y la técnica de diálisis. Para esto, el NI se colocó en un matraz bola en un rotavapor a 75 rpm a 37°C, y para la técnica de diálisis, el NI fue colocado en una membrana de celulosa regenerada, en agitación constante a 350 rpm durante dos horas a 25°C.

### **2.2.3 Caracterización fisicoquímica del NI**

Como parte de la caracterización fisicoquímica del NI, se determinó el tamaño de partícula y el índice de polidispersión 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. Además, la morfología del NI se determinó utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM), marca JEOL

JSM-7401F, con una pistola de emisión de campo (FEG) y un voltaje de aceleración de 4.0 kV. Para esto, las muestras del NI fueron previamente recubiertas con oro-paladio durante 15 segundos mediante la técnica de *sputtering* con un equipo de vacío Denton modelo Desk II.

Por otro lado, para calcular el porcentaje de encapsulación (%E) y el porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE) se utilizó la técnica de microextracción en fase sólida modalidad *headspace* (HS-SPME) con un método por cromatografía de gases con detector de ionización de flama (CG-FID) validado (Capítulo 2.3). Se calcularon los %E y %EE con las siguientes fórmulas:

$$\%E = \frac{(\text{mg componente del AE encapsulado})}{(\text{mg polímero} + \text{mg componente en AE})} * 100 \quad \text{Fórmula 2}$$

$$\%EE = \frac{(\text{mg componente del AE encapsulado})}{(\text{mg componente en AE})} * 100 \quad \text{Fórmula 3}$$

El cálculo de los %E y %EE se realizaron para los tres componentes huella o mayoritarios en el AE-Lg incorporado en el NI purificado por evaporación a presión reducida y por la técnica de diálisis.

#### **2.2.4 Perfil de liberación del aceite esencial de *Lippia graveolens* en el NI**

Para determinar el perfil de liberación de los tres componentes huella del AE-Lg en el NI, se colocaron muestras del NI en viales independientes, los cuáles contenían un medio de liberación compuesto por agua y Tween al 0.01% (p/p) (condiciones sink) con agitación constante (75 rpm), a 25°C y humedad relativa de

65%. Posteriormente, se realizaron muestreos a 1, 2, 4, 24 y 48 h. Las muestras obtenidas fueron centrifugadas (13,000 rpm por 40 min) y los sobrenadantes fueron analizados por el método de *HS-SPME* por *CG-FID* validado (Capítulo 2.3). Se realizó por triplicado, y se obtuvo la media ( $\bar{x}$ ) de las mediciones así como su desviación estándar ( $\sigma$ ).

### **2.2.5 Estabilidad del NI**

Para evaluar la estabilidad, el NI fue colocado en viales ámbar, protegido de la luz y almacenado durante 12 meses a 25°C. Durante este período de tiempo, se determinó el tamaño de partícula y el índice de polidispersión. Además, se evaluó visualmente la apariencia física del NI verificando la ausencia de agregados y sedimentos.

### **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 *Lippia graveolens* en el nanoingrediente biopolimérico por cromatografía de gases con detección de ionización de llama (CG-FID).**

Para cuantificar los tres componentes del aceite esencial de *Lippia graveolens* seleccionados para su seguimiento en el NI, se desarrolló un método analítico de CG-FID con HS-SPME. Esta etapa consta de tres pasos: 1) selección de la fibra, 2) validación del sistema y 3) validación del método.

#### **2.3.1 Selección de la fibra**

Con el fin de seleccionar la fibra que permitiera una mejor extracción de los tres componentes del AE-*Lg* de manera reproducible, se probaron cuatro fibras de diferentes características de polaridad (Poliacrilato, Polidimetilsiloxano, Carboxen/ Polidimetilsiloxano y Divinilbenceno/ Carboxen/ Polidimetilsiloxano). Para los experimentos de HS-SPME se utilizó una solución de estándares de los 3 componentes seleccionados (mirceno, p-cimeno y carvacrol) a una concentración de 96 µg/ mL y las condiciones experimentales de HS-SPME establecidas previamente por González-Moreno (2018), mostradas en la Tabla 4. Además, este mismo experimento se llevó a cabo utilizando una solución del AE-*Lg* en metanol (1 mg/ mL). Los criterios de selección fueron el área de los picos cromatográficos y la reproducibilidad de las áreas.

**Tabla 4.** Condiciones de extracción (*HS-SPME*) de los componentes del *AE-Lg* para la selección de la fibra.

Parámetro	Condición óptima
Volumen de <i>HS</i>	3.5 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

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

Para llevar a cabo la validación del sistema, se utilizaron las siguientes condiciones cromatográficas previamente establecidas por Velázquez-Dávila y cols. (2017). Para esto, se inició el programa del horno a 50°C y se incrementó 6°C/min hasta 117°C por 3 min y después se incrementó 45°C/min hasta 289°C por 1 min. La temperatura del inyector y detector fue de 250°C. El flujo del gas acarreador (helio 99.999% de pureza) fue de 1.5 mL/min y la proporción de *Split* 1:05.

Para la técnica de *HS-SPME*, se utilizaron las condiciones de extracción mostradas en la Tabla 4.

Para la validación del sistema, se utilizaron disoluciones de la mezcla de estándares de los tres componentes huella, previamente establecidos: mirceno, p-cimeno y carvacrol. 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 Físicoquímicos 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 µg/mL) por triplicado. Los estándares se sometieron al proceso de *HS-SPME* (Tabla 4) 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 por mínimos cuadrados, para obtener la ecuación de la recta. Se confirmó la relación lineal por medio de la inspección visual y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el coeficiente de correlación ( $r$ ).

-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 la precisión del sistema en términos de repetibilidad y precisión intermedia.

#### *Repetibilidad*

Para determinar la repetibilidad del sistema se analizaron sextuplicados de tres niveles de concentración total de la mezcla de los tres estándares (6, 24 y 96 µg/mL) de manera independiente, el mismo día y por el mismo analista. Los estándares se sometieron al proceso de *HS-SPME* (Tabla 4) y análisis por CG-FID. Posteriormente, se calculó 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).

$$\%DER = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$$

*Fórmula 4*

%DER = Desviación estándar relativa en porcentaje

S = desviación estándar

$\bar{x}$  = media

#### *Precisión intermedia*

Para determinar la precisión intermedia se analizaron tres niveles de concentración total de la mezcla de los tres estándares (6, 24 y 96 µg/mL) por sextuplicado y de manera independiente, por el mismo analista en tres días no consecutivos. Los estándares se sometieron al proceso de *HS-SPME* (Tabla 4) y

análisis por CG-FID. Posteriormente, se calculó el porcentaje de desviación estándar relativa (%DER), tal y como se indicó en el análisis de la repetibilidad.

*-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:

$$LD = \frac{3.3 * sb_0}{m} \qquad \text{Fórmula 5}$$

$sb_0$  = 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:

$$LQ = \frac{10 * sb_0}{m} \qquad \text{Fórmula 6}$$

$sb_o$  = 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-Lg) adicionadas con estándares de los componentes huella previamente establecidos: mirceno, p-cimeno y carvacrol.

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  $\mu\text{g/mL}$ ) por triplicado. Las CB-NI y los estándares se sometieron al proceso de *HS-SPME* mostrado en la Tabla 4 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 por el método de mínimos cuadrados, para obtener la ecuación de la recta. Se confirmó la relación lineal por medio de la inspección visual y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el coeficiente de correlación ( $r$ ).

-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 la precisión del método en términos de repetibilidad y precisión intermedia.

#### *Repetibilidad*

Para determinar la repetibilidad del método se analizaron sextuplicados de tres niveles de concentración total de la mezcla de los tres estándares (6, 24 y 96 µg/mL) de manera independiente, el mismo día y por el mismo analista. Los estándares se sometieron al proceso de *HS-SPME* (Tabla 4) y análisis por CG-FID. Posteriormente, se calculó 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).

#### *Precisión intermedia*

Para determinar la precisión intermedia se analizaron tres niveles de concentración total de la mezcla de los tres estándares (6, 24 y 96 µg/mL) por sextuplicado y de manera independiente, por el mismo analista en tres días no consecutivos. Los estándares se sometieron al proceso de *HS-SPME* (Tabla 4) y análisis por CG-FID.

Posteriormente, se calculó el %DER, tal y como se indicó en el análisis de la repetibilidad (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).

$$\% \text{Recuperación} = \frac{\text{Concentración encontrada}}{\text{Concentración adicionada}} \times 100 \quad \text{Fórmula 7}$$

#### **2.3.4. Aplicabilidad del método HS-SPME por CG-FID en cubiertas biopoliméricas formadas con el NI**

Con el propósito de establecer la cantidad de los componentes huella en la cubierta biopolimérica (CB) formada por la técnica de *casting* (González-Moreno, 2020) a partir del NI purificado por dos técnicas de purificación: evaporación a presión reducida y diálisis. Diferentes CB-NI fueron sometidas a las condiciones de HS-SPME mostradas en la Tabla 4. Se utilizó el método de CG-FID validado para su análisis y se estableció la eficiencia de retención de los componentes huella en la cubierta en base al NI (Capítulo 2.3).

## **2.4 Obtención la cubierta biopolimérica a partir del nanoingrediente por la técnica de *casting* y evaluar sus propiedades físicas, de permeabilidad, mecánicas, de liberación y antimicrobianas**

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). Para esto, una vez purificado el NI, se le incorporó el agente formador de cubiertas: el alginato de sodio (AL) bajo agitación magnética (350 rpm). Posteriormente, se utilizó un volumen determinado de cada sistema: i) AL, ii) NC blanco (sin AE) con AL y iii) NI con AL. Se utilizó un tiempo de secado de 24 h y una concentración de AL de 1 % (p/v). Además, la morfología de la CB, se determinó con un microscopio electrónico de barrido (SEM), marca JEOL JSM-7401F, con una pistola de emisión de campo (FEG) y un voltaje de aceleración de 2,0 kV. Para esto, las muestras de CB fueron previamente recubiertas con oro-paladio durante 25 segundos mediante la técnica de *sputtering* con un equipo de vacío Denton modelo Desk II.

### *-Análisis por espectroscopia IR-FT*

Se realizó el análisis del i) polímero, ii) NP-blanco, iii) NI, iv) NI-AL, v) AE-Lg libre y del vi) AL por IR-FT. Se realizaron 30 barridos en un intervalo de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  con un espectrofotómetro IR-FT Frontier Óptica, marca Perkin Elmer® del laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias Biológicas.

### 2.4.1 Evaluación de las propiedades físicas de la CB

#### - *Análisis de la opacidad*

Se determinó la opacidad de las CB: a) AL, b) NP-Blanco y c) NI en base a la relación entre la absorbancia (A) (en nm) y el espesor de la cubierta (en  $\mu\text{m}$ ) utilizando un espectrofotómetro UV-VIS. Se colocaron las CB por sextuplicado directamente en celdas espectrofotométricas de cuarzo y se midió la absorbancia a 600 nm. Se utilizó una celda vacía como blanco. La opacidad de la cubierta se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Opacidad} = A_{600 \text{ nm}} / \delta$$

*Fórmula 8*

donde O = opacidad;

A 600 nm = absorbancia de la muestra a 600 nm;

$\delta$  = Espesor de la película en mm

### 2.4.2 Análisis de las propiedades de permeabilidad

Posteriormente, se llevó a cabo la determinación de la tasa de transpiración de agua y permeabilidad al vapor de agua por análisis gravimétrico. En un desecador a 25 °C, se colocaron las CB en la parte superior de un vial que contenía una solución saturada con una humedad relativa (HR) del 95%. Posteriormente, el vial fue pesado cada 2 horas durante las primeras 8 horas y luego a las 24 horas, por quintuplicado. La permeabilidad al vapor de agua (WVP) y la tasa de transpiración de agua (WVTR), se determinó con las fórmulas 9 y 10,

respectivamente (Chakravartula *et al.* 2019; Siracusa, *et al.* 2018). Se obtuvo la media ( $\bar{x}$ ) de las mediciones así como su desviación estándar ( $\sigma$ ).

$$WVP = \frac{(WVTR)\delta}{P_w(RH1-RH2)} \quad \text{Fórmula 9}$$

$$WVTR = \frac{S}{AT} \quad \text{Fórmula 10}$$

Donde

WVP: permeabilidad al vapor de agua ( $\text{g}/\text{m}^2\text{sPa}$ );

WVTR: tasa de transpiración de agua ( $\text{gm}^2/\text{s}$ );

S: pérdida de masa del vial a lo largo del tiempo;

$A_t$  es el área ( $\text{m}^2$ ) de permeación;

$\delta$  es el espesor de la película (m);

(RH1-RH2) es la diferencia de humedades relativas;

$P_w$  es la presión parcial de vapor de agua a la temperatura de ensayo.

### 2.4.3 Evaluación de las propiedades mecánicas

Las CB de a) AL, b) NP-blanco y c) NI, 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 rompimiento, la adhesión y el porcentaje de elongación de las CB, por quintuplicado. Se obtuvo la media ( $\bar{x}$ ) de las mediciones así como su desviación estándar ( $\sigma$ ).

a) Evaluación del rompimiento

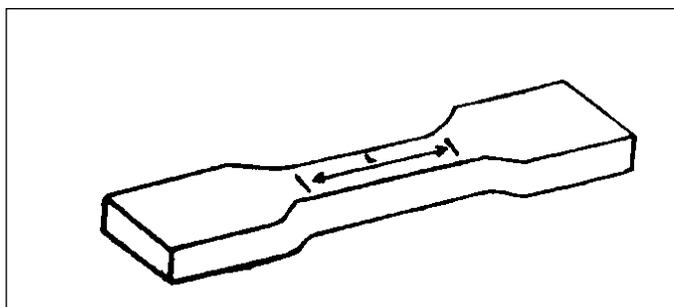
Para la evaluación del rompimiento, se obtuvieron CB circulares con un área de 2.54 cm<sup>2</sup>. Estas CB fueron conservadas a HR de 90% a 25 °C durante tres días. Posteriormente fueron colocadas en el texturómetro sobre los aditamentos específicos y se evaluaron a una velocidad de rompimiento de 2 mm/ seg.

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% a 25 °C 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 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 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.



**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 11*

Donde:

L = largo de la CB después del estiramiento

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

#### **2.4.4 Perfil de liberación del aceite esencial de *Lippia graveolens* en la CB**

Para determinar el perfil de liberación de los tres componentes huella del AE-Lg a partir de la CB-NI, se siguió la misma metodología establecida en el apartado 2.2.4 con cinco CB-NI en viales independientes.

#### 2.4.5 Evaluación de las propiedades antibacterianas

Se evaluó la actividad antibacteriana de las CB por la técnica de difusión en disco en el agar Mueller- Hinton (CMH) contra la bacteria *Pectobacterium carotovorum* ATCC15713.

##### a) Técnica de difusión en disco

Para la preparación de los controles, se utilizó la eritromicina como control positivo. Se elaboraron cubiertas de AL 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 1% (p/v) y NP-blanco (sin AE-Lg) con 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 1% (p/v) y la cubierta de NP blanco (sin AE-Lg) con 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, esto por triplicado (CLSI, 2010).

## **2.5 Evaluación la calidad poscosecha y la vida útil de fresa (*Fragaria ananassa*) y guayaba (*Psidium guajava*) con la aplicación de la cubierta biopolimérica a base de NI.**

### **2.5.1 Evaluación de la calidad poscosecha y la vida útil de fresa y guayaba**

La fresa (*Fragaria ananassa*) y la guayaba (*Psidium guajava*) fueron obtenidos en su etapa comercialmente madura y se transfirieron inmediatamente al laboratorio. Se eligieron frutos sanos y uniformes en función de su tamaño, forma, color y grado de maduración y se dividieron al azar en seis grupos. Después de lavar con agua y secar, se midieron sus principales propiedades visuales, como color, peso y firmeza. Posteriormente para la aplicación de la CB, se utilizó el método de aspersión, el cual consiste en rociar las muestras del producto hortofrutícola con el NI durante 1 min y dejar secar a temperatura ambiente (Piña-Barrera, *et al.* 2019). Una vez transcurrido este tiempo, se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente, y los frutos fueron rociados por segunda vez. Después de la aplicación de la CB, los productos hortofrutícolas se dividieron en dos grupos, el primer grupo se almacenó a 4°C (de 7- 10 días) y el segundo grupo a 25°C (de 3 - 5 días). Trascurrido el tiempo de almacenamiento, se evaluó a cada producto hortofrutícola, los cambios de peso y firmeza, los sólidos solubles totales, el pH y la acidez titulable, así como también el cambio de color.

a) *Medición de peso y firmeza*

Para medir, el peso y la firmeza, los frutos hortofrutícolas se pesaron mediante una balanza analítica con un grado de precisión de 0.01 g, antes de cada experimento y también en ciertos intervalos durante el almacenamiento, según la NMX–FF–061–SCFI–2003. El porcentaje de pérdida de peso se calculó con la fórmula 12. Se obtuvo la media ( $\bar{x}$ ) de las mediciones así como su desviación estándar ( $\sigma$ ).

$$\text{Porcentaje de pérdida} = \frac{(\text{peso inicial}) - (\text{peso secundario})}{(\text{peso inicial})} \times 100 \quad \text{Fórmula 12}$$

La evaluación de la firmeza del fruto se realizó con un texturómetro equipado con una sonda cilíndrica de 4 mm de diámetro. Una vez colocado el aditamento, se realizó el análisis a una velocidad de 2 mm/ seg. La firmeza es evaluada como la fuerza que es necesaria aplicar para perforar el epicarpio del producto hortofrutícola. La evaluación se realizó en dos sitios de la parte ecuatorial del producto hortofrutícola por triplicado y las lecturas se expresaron en Newtons (N). Se obtuvo la media ( $\bar{x}$ ) de las mediciones así como su desviación estándar ( $\sigma$ ).

b) *Sólidos solubles totales*

Para determinar los sólidos solubles totales, de forma independiente, las fresas (*Fragaria ananassa*) y las guayabas (*Psidium guajava*), se homogenizaron mecánicamente y una alícuota, se colocó sobre la lente de un refractómetro. Se determinó con base en la NMX–FF–015–1982. El resultado obtenido se realizó por

triplicado y se expresó en °Brix a 25°C. Se obtuvo la media ( $\bar{x}$ ) de las mediciones así como su desviación estándar ( $\sigma$ ).

*c) Acidez titulable y pH*

La acidez titulable se determinó según la NMX-F-102-S-1978 y la determinación de pH con base en la NMX-F-317-S-1978. Se tomó una alícuota del homogenizado de cada producto hortofrutícola, se realizó las diluciones necesarias con agua destilada y se calentó a 45°C, durante 2 h. Posteriormente, la muestra se filtró, se diluyó y una alícuota se tomó para medición directa de pH con el potenciómetro.

Después se tomó otra alícuota y se tituló con hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N, el cual fue estandarizado previamente con patrón primario. El resultado se expresó en porcentaje de ácido orgánico mayoritario presente en el producto hortofrutícola. Se obtuvo la media ( $\bar{x}$ ) de las mediciones así como su desviación estándar ( $\sigma$ ).

*d) Análisis del color*

Para el análisis de color se utilizó el método descrito por Rettig & Hen (2014), con un colorímetro. Para esto, a los productos hortofrutícolas recubiertos con cada uno de los tratamientos, se les cortó el epicarpio (parte más superficial del fruto) y éste se colocó en el lente del equipo y se obtuvieron 3 coordenadas (L, a, b), las cuales se utilizaron para medir el cambio de color ( $\Delta E$ ) por medio del sistema *CIE L\*A\*B\** (CIE1976) con la fórmula 13.

$$\Delta E^* = ((L^*1-L^*2)^2 + (a^*1-a^*2)^2 + (b^*1-b^*2)^2)^{1/2}$$

Fórmula 13

Donde:

$\Delta E^*$  = Cambio de color

$L^*1/ L^*2$  = luminosidad inicial/luminosidad obtenida

$a^*1/ a^*2$  = color rojo-verde inicial/color rojo-verde obtenido

$b^*1/ b^*2$  = color amarillo-azul inicial/color amarillo-azul obtenido

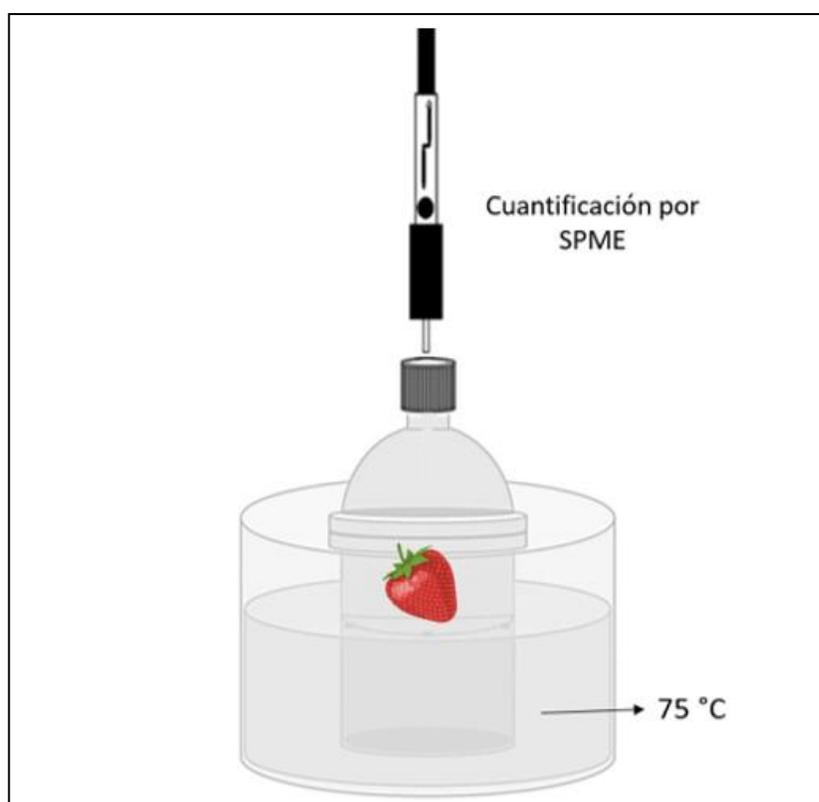
#### e) *Daño microbiológico visual*

Por otro lado, se monitoreó la presencia de daño microbiológico en el grupo control, así como en las fresas y guayabas, durante 15 y 25 días de almacenamiento respectivamente, a 4 °C.

### **2.5.2 Perfil de liberación del aceite esencial de *Lippia graveolens* en los productos hortofrutícolas y en atmosfera controlada**

Para determinar el perfil de liberación de los componentes huella del AE-*Lg* a partir de la CB-NI formada sobre los productos hortofrutícolas (fresa y guayaba) a la atmósfera, se realizó lo siguiente: inicialmente, a los productos hortofrutícolas se les colocó la CB según la metodología descrita (Capítulo 2.5.3) con un tiempo de secado de 4 h a 25°C. Después, los productos hortofrutícolas recubiertos con la CB-NI, fueron colocados en un dispositivo cerrado con un volumen de *headspace* de 37 mL (Figura 8). Este dispositivo cerrado, se mantuvo bajo diferentes tiempos de liberación (1, 2, 4, 24 y 48 h) a una temperatura de 25°C y una humedad relativa

del 50%, para posteriormente ser colocados en un baño circulator bajo las condiciones de SPME ya descritas anteriormente. Finalmente, fueron analizados por el mismo método de *HS-SPME* por CG-FID previamente validado (Capítulo 2.3). Cabe resaltar que se analizaron muestras de los productos hortofrutícolas sin CB-NI, para asegurar que las señales cromatográficas obtenidas correspondieran a los componentes de seguimiento del AE-Lg.



**Figura 8.** Dispositivo diseñado para evaluar el perfil de liberación de los componentes huella del AE-Lg en los productos hortofrutícolas recubiertos con CB-NI, en una atmósfera controlada.

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS

#### 3.1 Obtención del aceite esencial de *Lippia graveolens*

Inicialmente, se obtuvo el AE de *Lippia graveolens* por el método de hidrodestilación en un equipo Clevenger modificado. Se calculó el porcentaje de rendimiento con la fórmula 1, y se obtuvo un resultado de 5.32%. En cuanto a la caracterización física, se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Caracterización física del anetol y el AE-Lg.

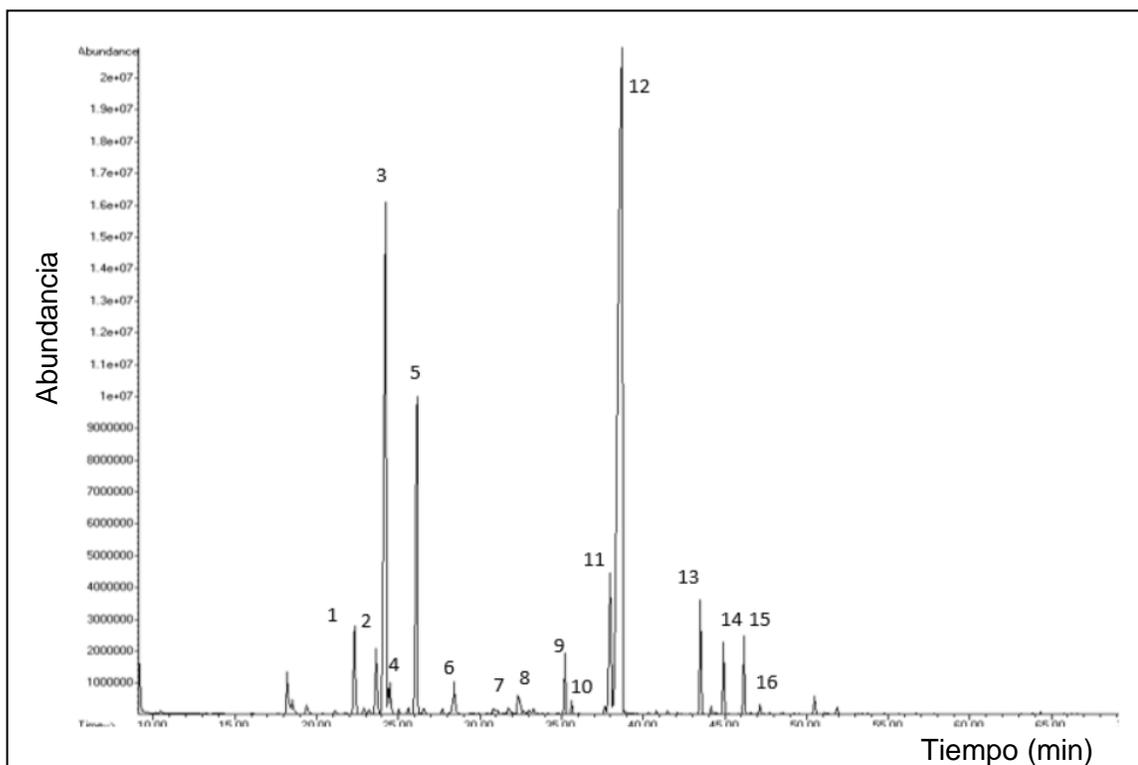
Parámetro	Anetol	Anetol (FEUM)	AE-Lg
Índice de refracción*	1.559 ± 0.000	1.557 - 1.561	1.503 ± 0.000
Rotación óptica (°) **	0.050 ± 0.000	-0.150 - 0.150	-0.200 ± 0.000
Densidad relativa (g/ mL)*	0.987 ± 0.000	0.983 - 0.988	0.987 ± 0.000

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

\*\*( $\bar{x} \pm \sigma$ , n=6)

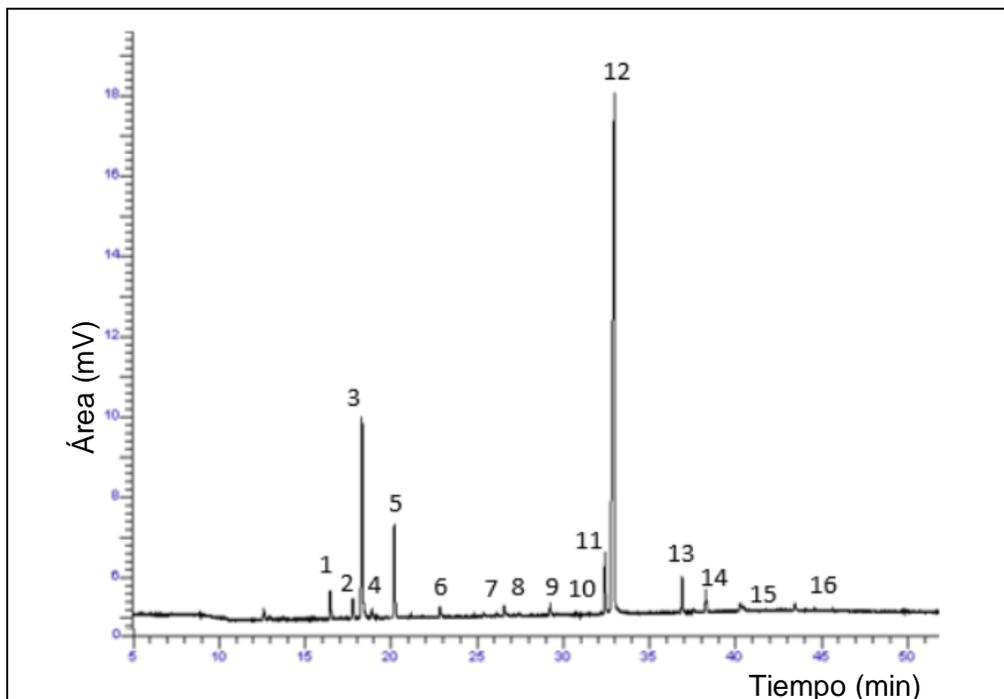
### 3.1.1 Caracterización química del AE-Lg

La caracterización química del AE-Lg fue realizada por CG-MS y CG-FID. En la Figura 9 se muestra el cromatograma del AE-Lg obtenido por CG-MS. Se identificaron un total de 16 componentes en el AE-Lg 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). Enseguida, se determinó el porcentaje de abundancia (%A) de los 16 componentes en función a su área relativa.



**Figura 9.** Cromatograma del AE-Lg (2 mg/mL) en diclorometano por CG-MS. Los componentes son:  $\alpha$ -tujeno (1),  $\alpha$ -pineno (2), mirceno (3),  $\alpha$ -terpineno (4),  $p$ -cimeno (5), 1,8 cineol (6),  $\gamma$ -terpineno (7), linalool (8), terpinen-4-ol (9), timol metil éter (10), timol (11), carvacrol (12), z-cariofileno (13),  $\alpha$ -humuleno (14), butilhidroxianisol (15), óxido de cariofileno (16).

En la Figura 10 se muestra el cromatograma del AE-Lg obtenido por CG-FID. Enseguida, se determinó el porcentaje de abundancia (%A) de los 17 componentes en función a su área relativa.



**Figura 10.** Cromatograma del AE-Lg (2 mg/mL) en diclorometano por CG-FID. Los componentes son:  $\alpha$ -tujeno (1),  $\alpha$ -pineno (2), mirceno (3),  $\alpha$ -terpineno (4),  $p$ -cimeno (5), 1,8 cineol (6),  $\gamma$ -terpineno (7), linalool (8), terpinen-4-ol (9), timol metil éter (10), timol (11), carvacrol (12),  $z$ -cariofileno (13),  $\alpha$ -humuleno (14), butilhidroxianisol (15), óxido de cariofileno (16).

En la Tabla 6, se muestra la composición química del AE-Lg, el tiempo de retención así como el porcentaje de abundancia de los 16 componentes identificados. Los componentes mayoritarios en el AE fueron: mirceno,  $p$ -cimeno y carvacrol, 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 mirceno,  $p$ -cimeno y carvacrol, se estableció que su proporción es de 19:8:73, respectivamente. Cabe

mencionar que ésta proporción fue considerada durante la etapa de validación del método cromatográfico de *HS-SPME* por *CG-FID*.

**Tabla 6.** Composición química del aceite esencial de *Lippia graveolens* por Cromatografía de gases acoplada a MS y FID.

#	Composición	tR (min)	Abundancia (%A)	Tipo de componente
1	$\alpha$ -tujeno	16.51	0.19	Monoterpeno alifático
2	$\alpha$ -pineno	17.83	0.08	Monoterpeno alifático
3	mirceno	18.37	16.93	Monoterpeno alifático
4	$\alpha$ -terpineno	18.92	0.08	Monoterpeno alifático
5	p-cimeno	20.25	7.56	Monoterpeno alifático
6	1,8 cineol	22.88	0.04	Monoterpeno alifático
7	$\gamma$ -terpineno	26.18	0.08	Monoterpeno alifático
8	linalool	26.63	0.12	Monoterpeno oxigenado
9	terpinen-4-ol	29.29	0.10	Monoterpeno oxigenado
10	Timol metil éter	30.94	0.06	Monoterpeno oxigenado
11	timol	32.49	4.91	Monoterpeno oxigenado
12	carvacrol	33.02	66.58	Monoterpeno oxigenado
13	z-cariofileno	36.96	2.99	Sesquiterpeno alifático
14	$\alpha$ -humuleno	38.33	0.11	Sesquiterpeno alifático
15	butilhidroxianisol	41.49	0.07	Sesquiterpeno oxigenado
16	Óxido de cariofileno	43.52	0.03	Sesquiterpeno oxigenado
	TOTAL		100	

### 3.1.2 Obtención y caracterización del NI

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

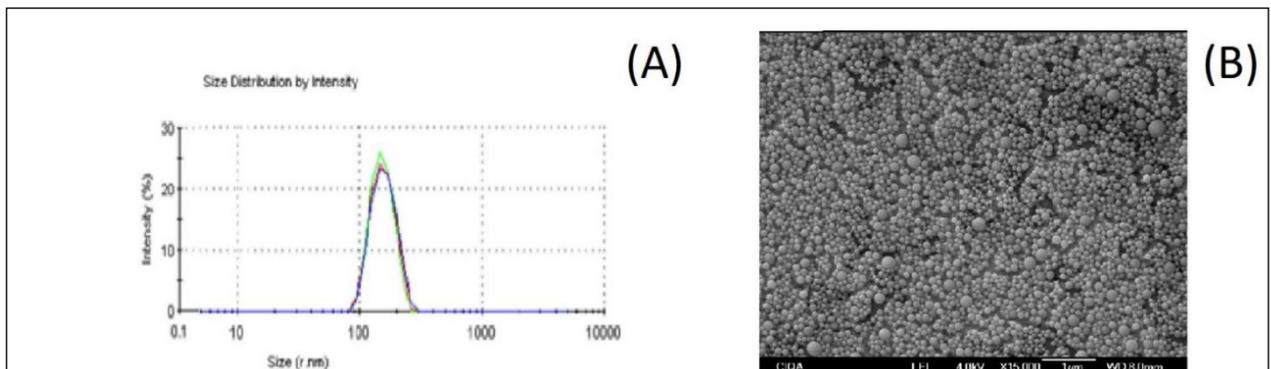
**Tabla 7.** Características fisicoquímicas del NI obtenido por la técnica de nanoprecipitación con dos técnicas de purificación.

Lote de NI	Tamaño (nm)	Índice de polidispersidad <sup>1</sup>	Potencial zeta (mV)
NI purificado por evaporación a presión reducida	287 ± 5.11	0.10 ± 0.03	-50.90 ± 1.44
NI purificado por diálisis	273 ± 4.62	0.11 ± 0.02	-46.26 ± 2.02

<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)

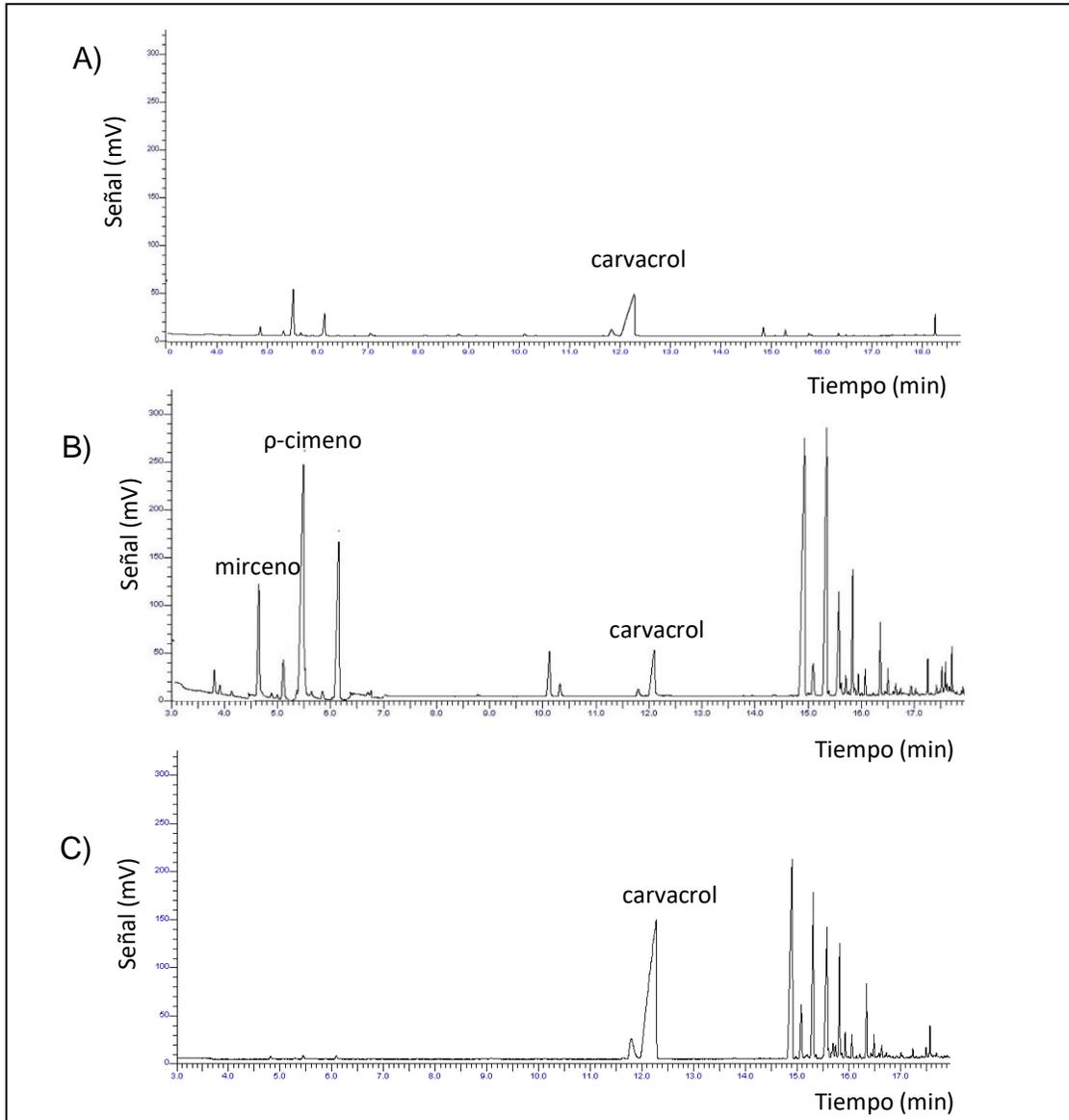
La Figura 11A muestra la curva de distribución de tamaño de partícula del NI, mientras que la Figura 11B, muestra la micrografía, obtenida a partir del microscopio electrónico del NI.



**Figura 11.** Curva de distribución de tamaño del NI purificado por evaporación a presión reducida obtenida mediante la técnica de nanoprecipitación (A); Imagen TEM del NI (B).

- Contenido de los componentes del AE-Lg en el NI

El NI fue sometido a la técnica de *HS-SPME* (Tabla 4) y analizado por el método de *CG-FID* validado. En la Figura 12 se muestran los cromatogramas obtenidos a partir del AE-Lg (Figura 12A) y del NI con AE-Lg purificado por dos técnicas: diálisis (Figura 12B) y evaporación a presión reducida (Figura 12C).



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

En base a las señales cromatográficas (Figura 12), se calculó la cantidad de mirceno, p-cimeno y carvacrol presente en el NI. En la Tabla 8, se muestra la cantidad de cada componente huella presente en el NI purificado por diálisis y evaporación a presión reducida.

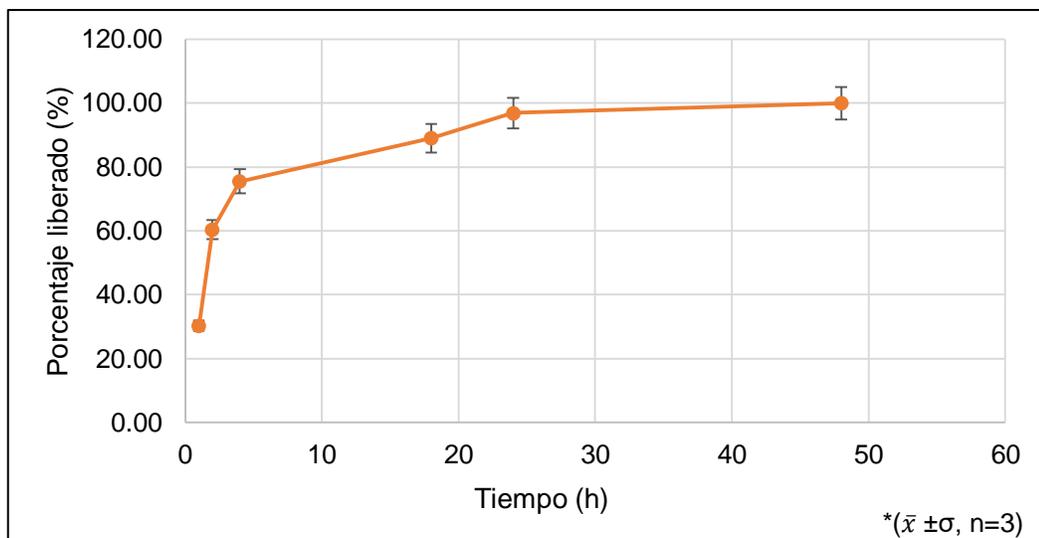
**Tabla 8.** Contenido de mirceno, p-cimeno y cavacrol en el NI con AE-Lg purificado por diálisis y evaporación a presión reducida.

Técnica de purificación	Porcentaje (%)	Componente del AE-Lg		
		mirceno	p-cimeno	carvacrol
Evaporación a presión reducida	%EE	0.24 ± 0.02	0.32 ± 0.01	63.80 ± 1.47
	%E	0.10 ± 0.04	0.17 ± 0.07	27.91 ± 0.59
Diálisis	%EE	12.94 ± 0.51	42.15 ± 0.90	9.47 ± 0.06
	%E	4.00 ± 0.30	11.61 ± 0.26	3.88 ± 0.02

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

### 3.1.3 Perfil de liberación del aceite esencial de *Lippia graveolens* en el NI

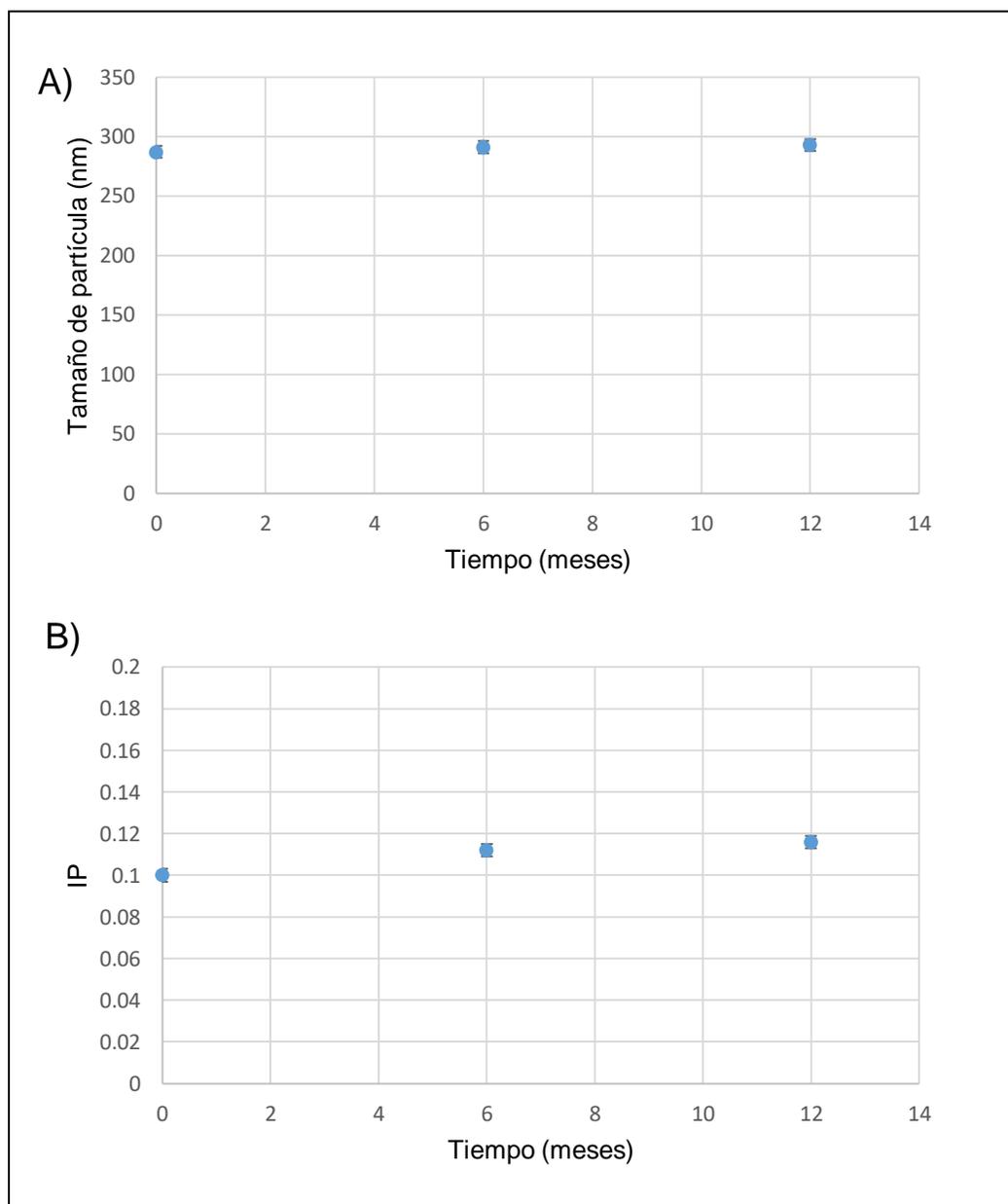
Se llevó a cabo la determinación del perfil de liberación del AE-Lg, y se observó que dos de los componentes de seguimiento (mirceno y p-cimeno) no fueron detectados en ningún muestreo realizado. Solamente, se pudo determinar el perfil de liberación del componente mayoritario del AE-Lg, el carvacrol, encapsulado en el NI, tal y como se observa en la Figura 13.



**Figura 13.** Perfil de liberación del carvacrol. Porcentaje de carvacrol liberado del NI en función del tiempo.

### 3.1.4 Estabilidad del NI

Se llevó a cabo la evaluación visual de la estabilidad del NI por doce meses, donde no se observaron agregados ni sedimentos, ni la presencia de una capa oleosa. Además, se midió el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad durante este mismo periodo de tiempo. En la Figura 14A se observan los valores obtenidos del tamaño de partícula y en la Figura 14B los valores obtenidos del índice de polidispersidad de las muestras analizadas.

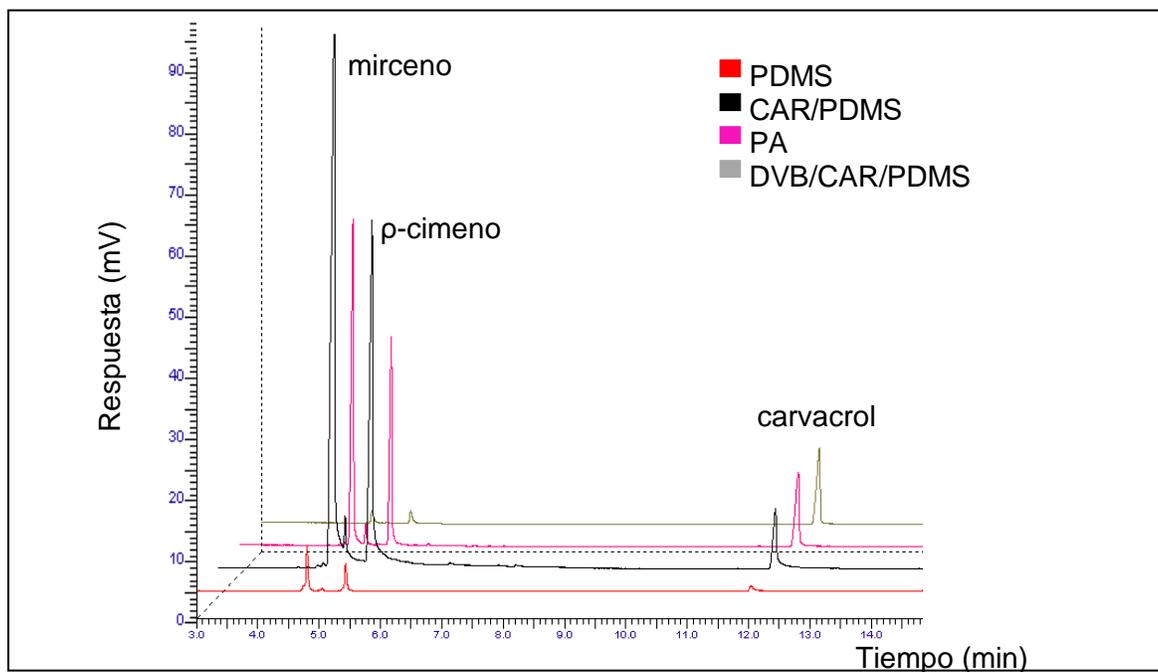


**Figura 14.** Variación del tamaño de partícula (A) e índice de polidispersión (B) durante el estudio de la estabilidad del NI por un período de 12 meses.

### 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 *Lippia graveolens* en el nanoingrediente biopolimérico por cromatografía de gases con detección de ionización de llama (CG-FID).

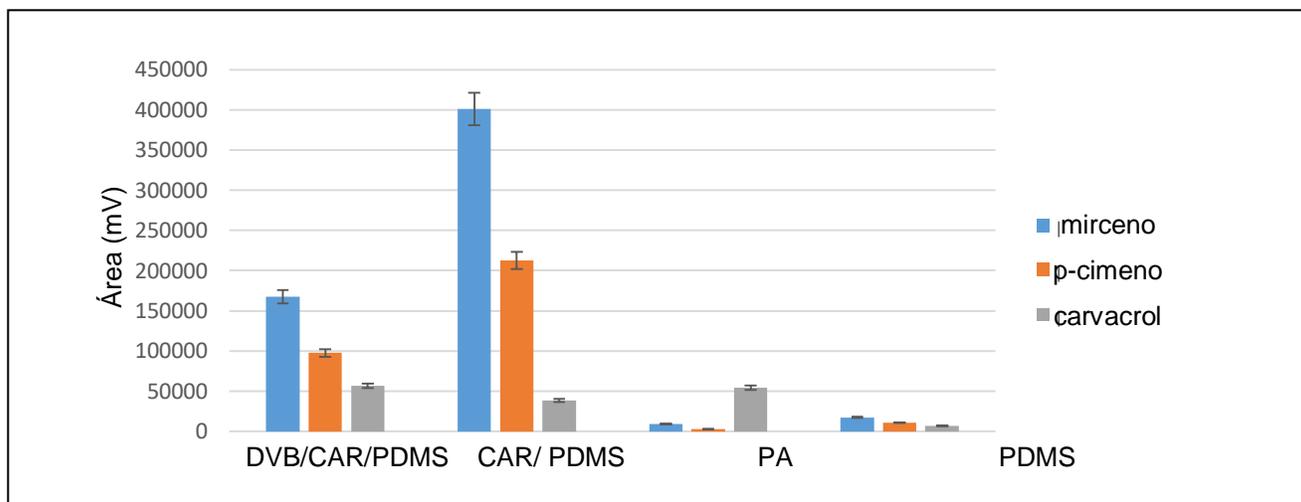
#### 3.2.1 Selección de la fibra

Para cuantificar el mirceno, el p-cimeno y el carvacrol en las formulaciones de NC cargadas con el AE-Lg, se desarrolló un método analítico de GC con HS-SPME. Para esto, se evaluaron cuatro fibras con características de polaridad diferentes. En la Figura 15 se muestran los cromatogramas obtenidos de los tres estándares de seguimiento (mirceno, p-cimeno y carvacrol) a una concentración total de 1 mg/ mL, con las cuatro fibras con las condiciones de HS-SPME mostradas en la Tabla 4 y el método cromatográfico establecido por Velázquez-Dávila y cols. (2017).



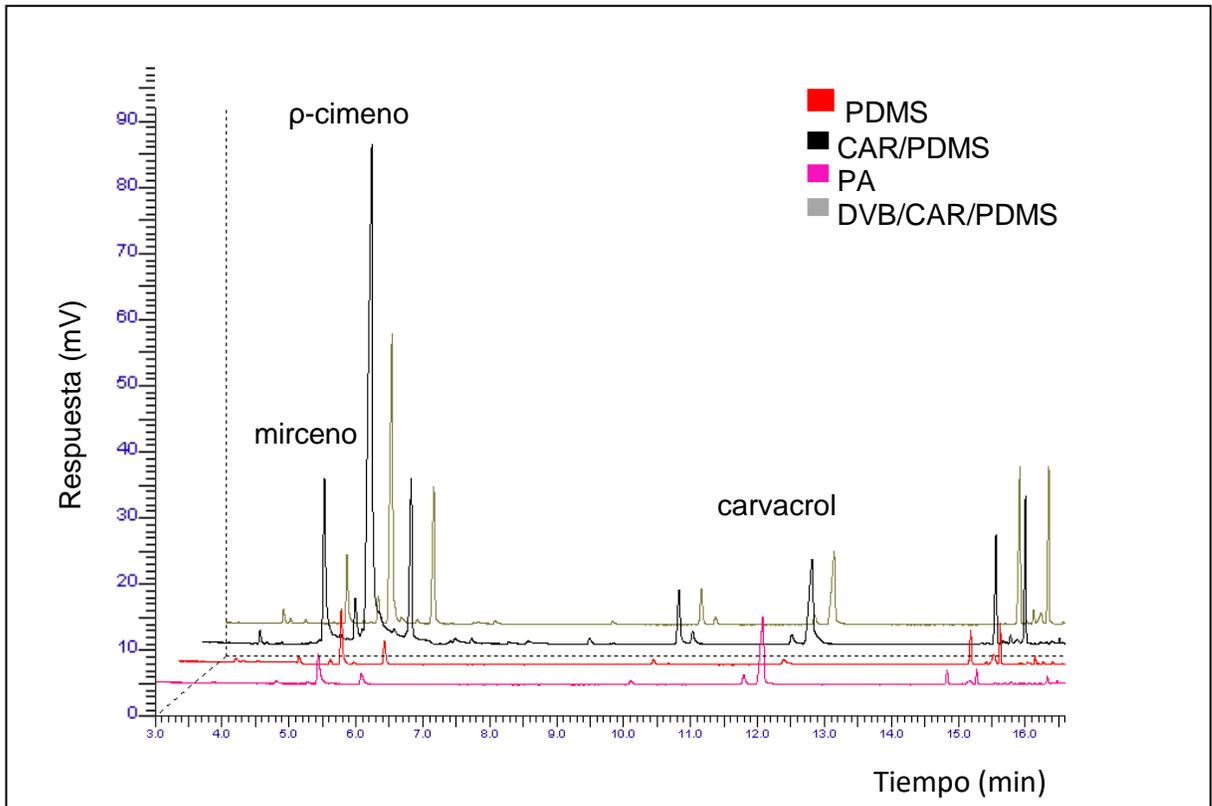
**Figura 15.** Cromatogramas de los estándares (concentración total de 1 mg/ mL) con las cuatro fibras de HS-SPME por CG-FID.

En la Figura 16 se muestran las áreas de los estándares: mirceno, p-cimeno y carvacrol obtenidas con las cuatro fibras con *HS-SPME* por GC-FID.

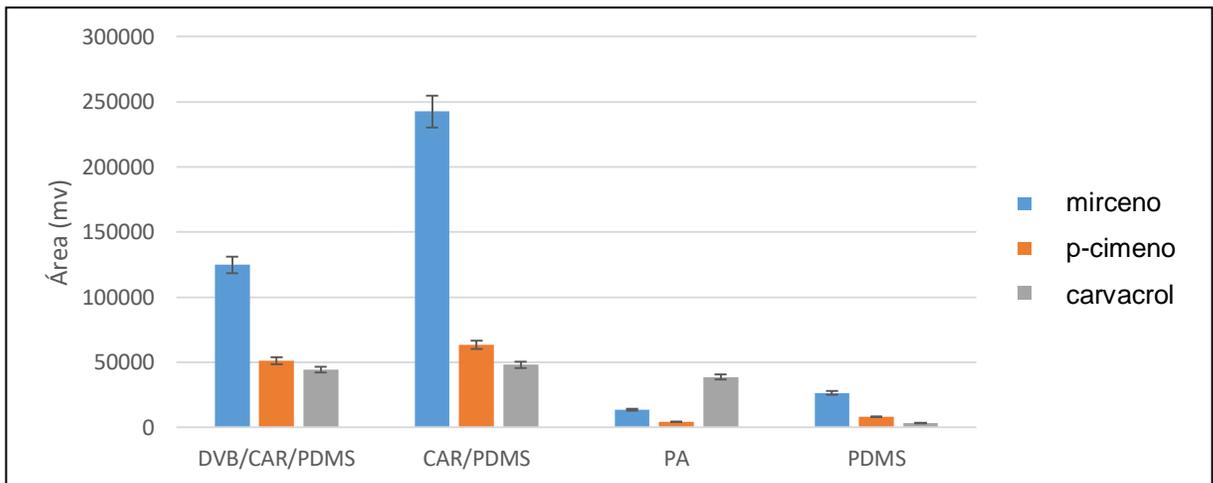


**Figura 16.** Comparación de las áreas de los tres estándares (concentración total de 1 mg/ mL) obtenidas con las fibras de *HS-SPME* evaluadas por GC-FID ( $\bar{x} \pm \sigma$ ,  $n=3$ ).

Posteriormente, se evaluó el desempeño de las cuatro fibras con una solución metanólica del AE-*Lg* (1 mg/ mL) por *HS-SPME* por GC-FID. En la Figura 17 se muestran los cromatogramas obtenidos del AE-*Lg*, con las cuatro fibras utilizando las condiciones de *HS-SPME* mostradas en la Tabla 4 y con el método cromatográfico establecido previamente. Mientras que en la Figura 18, se muestran las áreas del mirceno, p-cimeno y carvacrol obtenidas con las cuatro fibras con *HS-SPME* por GC-FID.



**Figura 17.** Cromatogramas del AE-Lg (1mg /mL) con las cuatro fibras por HS-SPME por GC-FID.



**Figura 18.** Comparación de las áreas de los tres componentes de seguimiento del AE-Lg (1 mg/ mL) obtenidas con las fibras de HS-SPME evaluadas por GC-FID. ( $\bar{x} \pm \sigma$ , n=3).

En base a los resultados obtenidos, se seleccionó la fibra de CAR/PDMS para las siguientes etapas del estudio.

### **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 de seguimiento: mirceno, p-cimeno y carvacrol. Se sometieron al proceso de *HS-SPME* con la fibra CAR/PDMS y con las condiciones óptimas mostradas en la Tabla 4. 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 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 9.

### **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 (NI) adicionadas con la mezcla de estándares de mirceno, p-cimeno y carvacrol. Se sometieron al proceso de *HS-SPME* bajo las condiciones descritas en la Tabla 4. Se evaluó linealidad, precisión y exactitud 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 10.

**Tabla 9.** Parámetros de validación del sistema para cuantificar mirceno, p-cimeno y carvacrol del AE-Lg con HS-SPME por CG-FID.

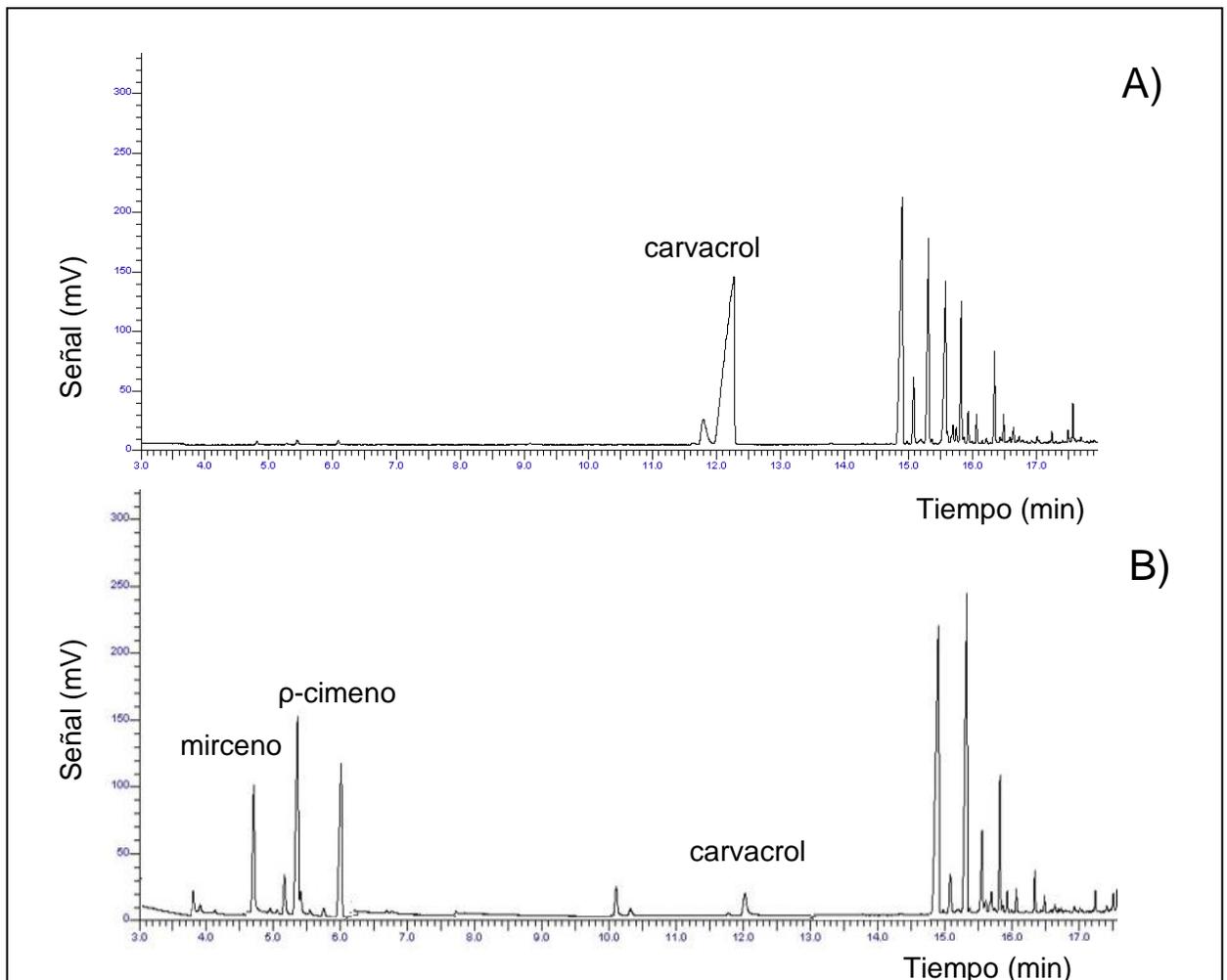
Parámetro	mirceno	p-cimeno	carvacrol	Referencia
Linealidad ( $R^2$ )	0.997	0.998	0.999	> 0.99
Repetibilidad (%DER)	5.29	3.72	2.18	<20%
Precisión Intermedia (%DER)	5.91	3.97	2.87	<20%
LD ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.76	0.35	0.83	< Concentración más baja del intervalo de trabajo
LQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	2.32	1.06	2.51	< Concentración más baja del intervalo de trabajo

**Tabla 10.** Parámetros de validación del método para cuantificar mirceno, p-cimeno y carvacrol del AE-Lg con HS-SPME por CG-FID.

Parámetro	mirceno	p-cimeno	carvacrol	Referencia
Linealidad ( $R^2$ )	0.997	0.999	0.999	>0.99
Precisión Intermedia (%DER)	6.37	5.89	3.25	<20%
Repetibilidad (%DER)	7.41	6.21	3.21	>20%
Exactitud (%Recuperación)	98.75	99.72	100.15	70-110%

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

En la Figura 19, se observan los cromatogramas, de la *CB* formada con en 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 purificadas por dos técnicas A) evaporación a presión reducida y B) diálisis.



**Figura 19.** Cromatogramas de las *CB-NI* obtenido con el método de *HS-SPME* por *CG-FID* validado. El *NI* fue purificado por dos técnicas: A) evaporación a presión reducida y B) diálisis.

Posteriormente, se determinó el porcentaje de eficiencia de retención de los tres componentes huella en la CB en la formación del NI por la técnica de *casting*. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

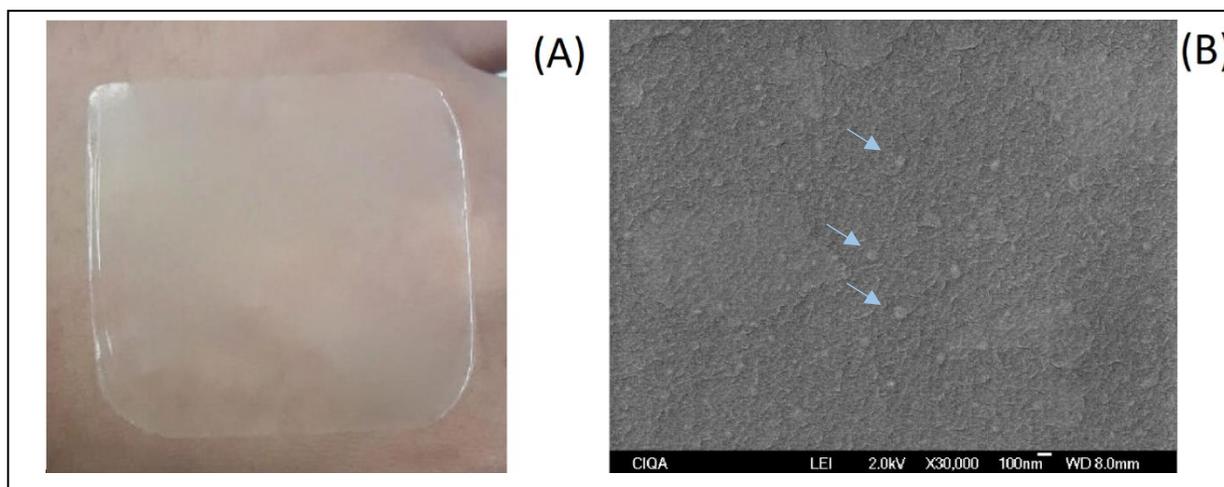
**Tabla 11.** Porcentaje de eficiencia de retención de los componentes huella del AE-Lg en la CB a partir del NI formada por la técnica de *casting*.

Técnica de purificación del NI	Porcentaje de eficiencia de retención del componente del AE-Lg en la CB (%)		
	mirreno	p-cimeno	carvacrol
Evaporación A presión reducida	0.17 ± 0.05	0.38 ± 0.03	28.55 ± 0.95
Diálisis	14.28 ± 1.03	29.40 ± 1.36	4.10 ± 0.85

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

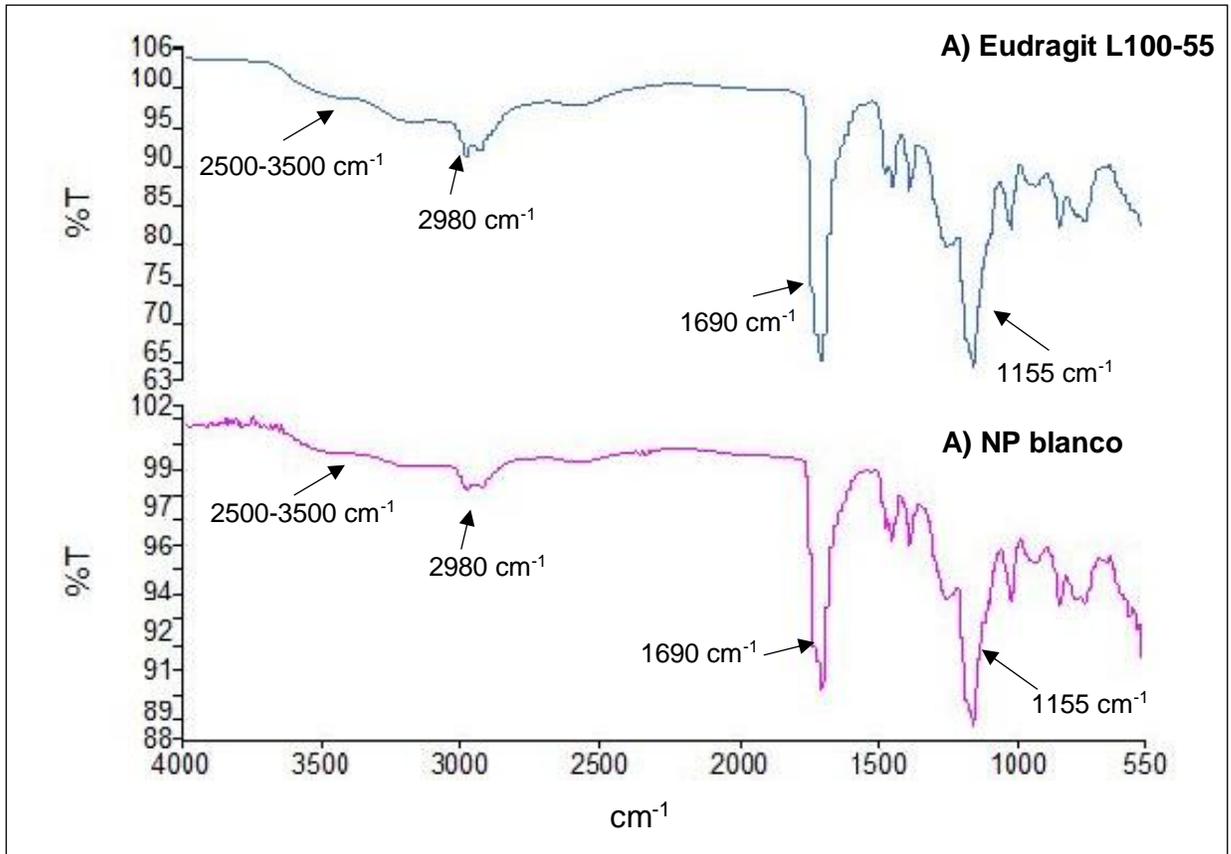
### 3.3 Obtención la cubierta biopolimérica a partir del nanoingrediente por la técnica de *casting* y evaluación de sus propiedades físicas: ópticas, de permeabilidad y mecánicas, de liberación y antimicrobianas

Para llevar a cabo la formación de la CB, a partir del NI, se utilizó la técnica de vaciado directo en placas de teflón o método de *casting*, con un tiempo de secado de 24 h y una concentración de AL de 1 % (p/v). En la Figura 20A, podemos observar la CB obtenida, mientras que en la Figura 20B, se observa la micrografía de la CB-NI obtenida con el microscopio electrónico de barrido.



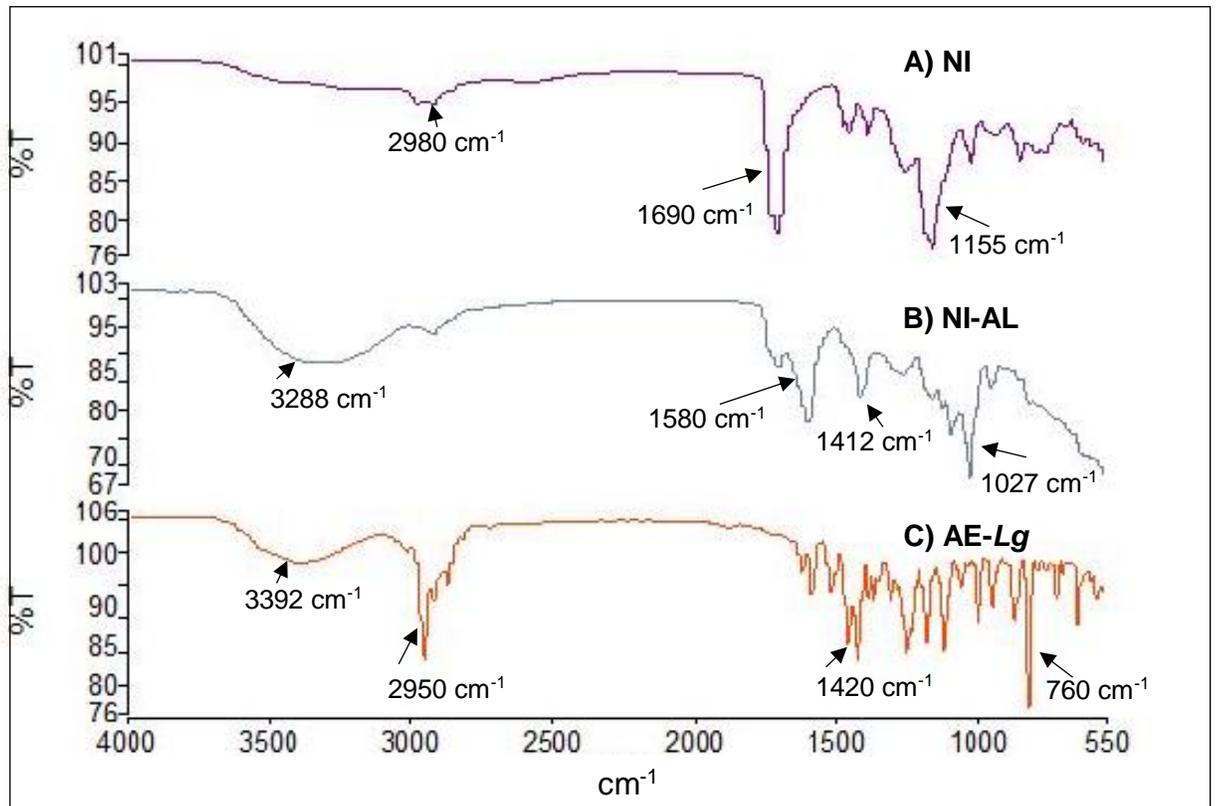
**Figura 20.** Cubierta biopolimérica a base de NI formada por la técnica de *casting* con AL al 1% (p/p) con tiempo de secado de 24 h (A); Micrografía de la CB-NI, en la que se observan las NC (flechas azules) (B).

Se realizó un análisis por espectroscopía de infrarrojo, con el fin de establecer las interacciones entre los componentes de la CB. Se analizó cada uno de los componentes por separado: i) polímero Eudragit L100-55, ii) NP-blanco, iii) NI, iv) NI-AL, v) AE-Lg libre y del vi) AL. A continuación se muestran los espectros de infrarrojo obtenidos para el polímero i) Eudragit L100-55 y ii) las NP blanco, tal y como se observa en la Figura 21.

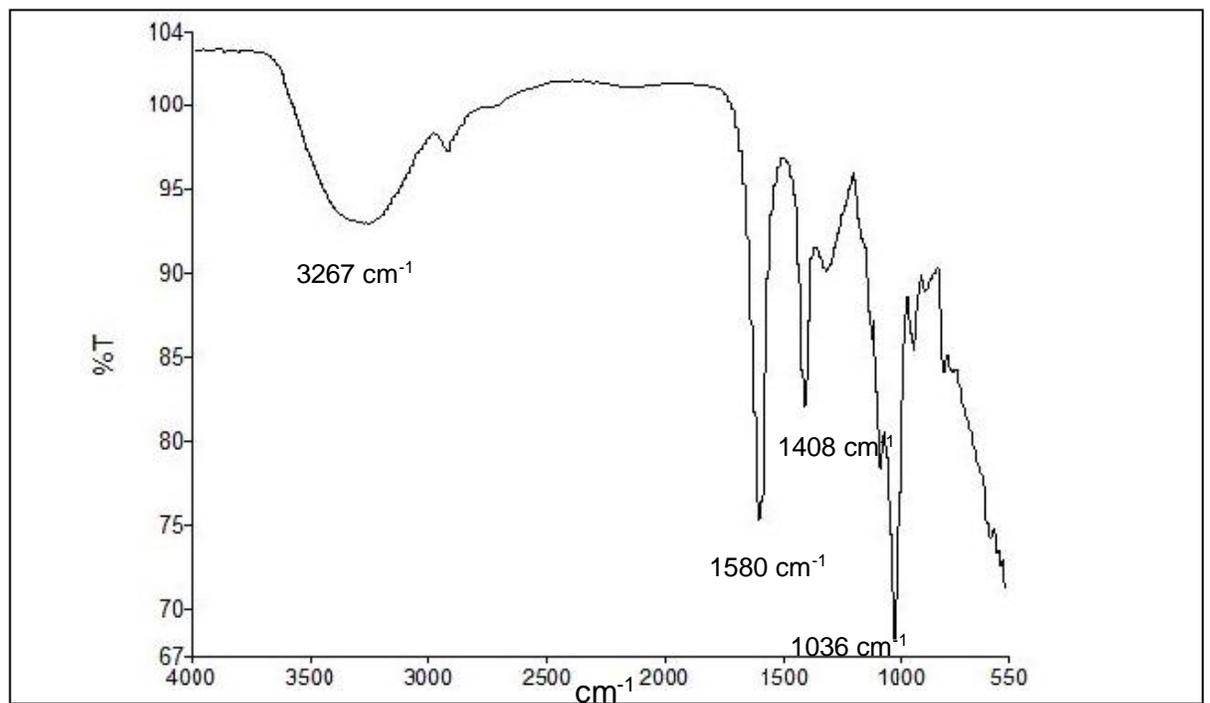


**Figura 21.** Señales en el espectro de infrarrojo obtenido para A) polímero Eudragit L100-55 y B) NP blanco.

En la Figura 22, se presentan los espectros obtenidos para A) NI, B) NI-AL y C) AE-Lg libre. Por otro lado, como se puede observar en la Figura 23, se presenta el espectro obtenido para el AL.



**Figura 22.** Señales en el espectro de infrarrojo obtenido para A) NI, B) NI-AL y C) AE-Lg libre.



**Figura 23.** Señales en el espectro de infrarrojo obtenido para AL.

### 3.3.1 Evaluación de las propiedades físicas de la CB

Posteriormente, se llevó a cabo el análisis de opacidad de las CB formadas a partir de AL, de NP blanco y del NI. Los resultados obtenidos los podemos observar en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Opacidad de la CB formada por la técnica de *casting* con AL al 1% (p/p) con un tiempo de secado de 24 h.

CB	Opacidad (UA/mm)
CB-AL	0.706 ± 0.100
CB-NP blanco	0.956 ± 0.260
CB-NI	0.600 ± 0.100

\*( $\bar{x} \pm \sigma$ , n=6)

### 3.3.2 Análisis de las propiedades de permeabilidad

Después, se llevó a cabo el análisis de las propiedades de permeabilidad, esto calculando el WVP y WVTR. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 13.

**Tabla 13.** Valores de WVP y WVTR de las CB evaluadas a una HR del 95% a 25°C.

CB	WVP ( $10^{-7}$ g mm cm <sup>-2</sup> Pa <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	WVTR ( $10^{-3}$ g cm <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )
CB-AL	2.79 ± 0.04	4.68 ± 0.09
CB-NP blanco- AL	1.97 ± 0.03	3.72 ± 0.08
CB-NI-AL	1.01 ± 0.03	2.03 ± 0.06

\*( $\bar{x} \pm \sigma$ , n=6)

### 3.3.3 Evaluación de las propiedades mecánicas

Para la caracterización mecánica, se evaluó el rompimiento, la adhesión y el porcentaje de elongación (%) de las CB formadas a partir de: i) AL al 1% (p/v), ii) NP blanco (sin AE-Lg) con AL al 1% (p/v) y iii) NI con AL al 1% (p/v). En la Tabla 14 se muestran los resultados obtenidos en la evaluación mecánica de las CB.

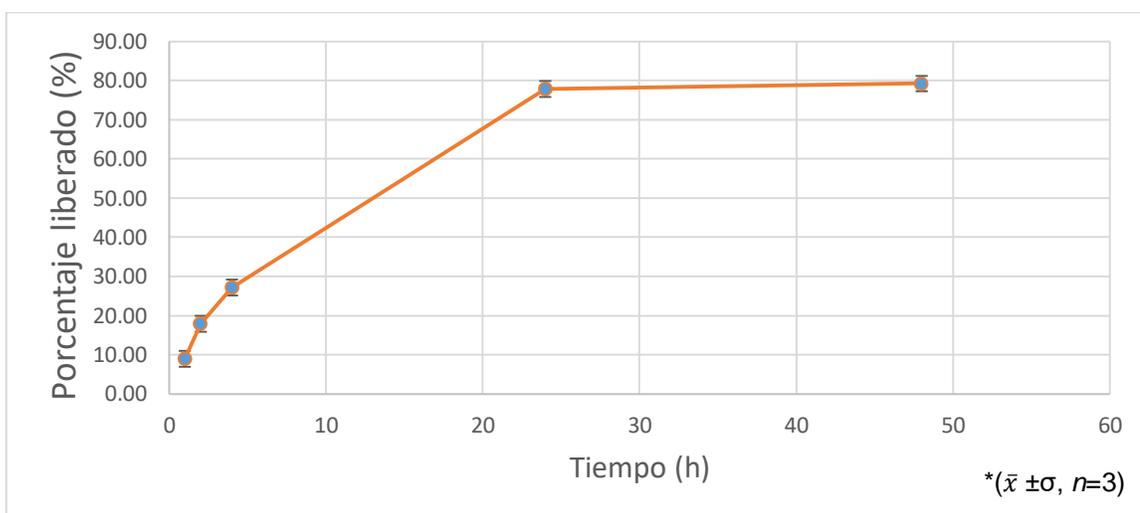
**Tabla 14.** Características mecánicas de las CB formadas a partir de AL, NP blanco o NI a temperatura ambiente con tiempo de secado de 24 h.

CB	Rompimiento (g/cm <sup>2</sup> )	Adhesión (dinas/cm <sup>2</sup> )	Porcentaje de elongación (%)
CB-AL	977.56 ± 3.94	4,690.86 ± 2.00	90.76 ± 0.71
CB- NP blanco	575.54 ± 5.27	4,989.22 ± 1.03	78.28 ± 0.76
CB-NI	1,555.26 ± 4.31	5,802.36 ± 2.15	182.27 ± 2.14

\*( $\bar{x} \pm \sigma$ , n=6)

### 3.3.4 Perfil de liberación del aceite esencial de *Lippia graveolens* en la CB

Se llevó a cabo la determinación del perfil de liberación del AE-Lg procedente de la CB-NI, y se observó al igual que en el NI, dos de los componentes de seguimiento (mirceno y p-cimeno) no fueron detectados en ningún muestreo realizado. Solamente, se pudo determinar el perfil de liberación del componente mayoritario del AE-Lg, el carvacrol, que se encontraba en la CB-NI, tal y como se observa en la Figura 24.



**Figura 24.** Perfil de liberación del carvacrol. Porcentaje de carvacrol liberado de la CB-NI en función del tiempo.

### 3.3.5 Evaluación de las propiedades antibacterianas

Se evaluó la actividad antibacteriana de las CB por la técnica de difusión en disco en el agar Mueller- Hinton (CMH) contra la bacteria *Pectobacterium carotovorum* ATCC15713. En la Tabla 15 se muestran el crecimiento o la inhibición de la bacteria *P. carotovorum* después de la aplicación de las CB formada a partir de AL, NP blanco (sin AE-Lg) o NI.

**Tabla 15.** Inhibición del crecimiento de la bacteria *Pectobacterium carotovorum* ATCC 15713 por el método de difusión en disco.

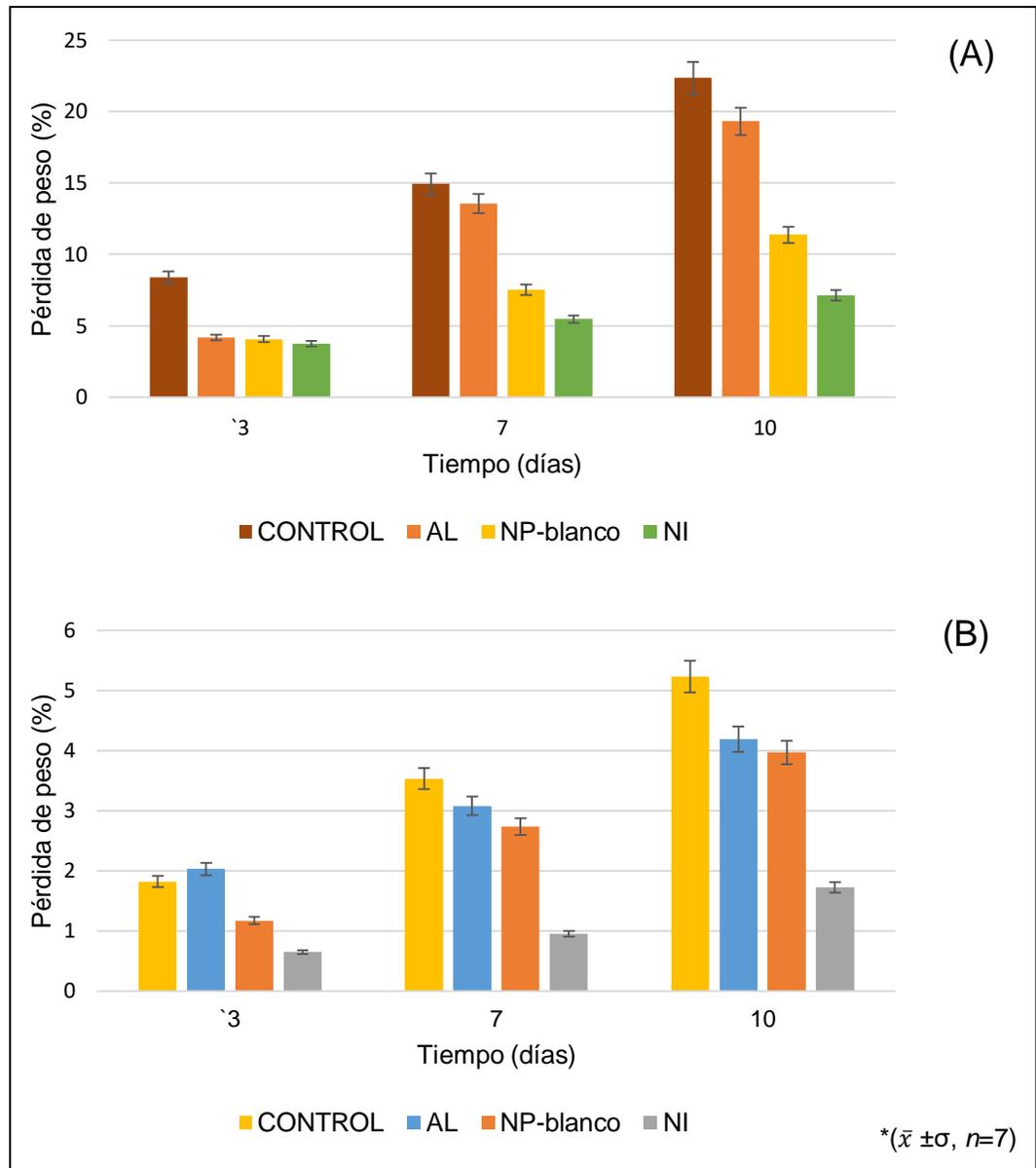
<b>Sistema</b>	<b>Inhibición <i>P. carotovorum</i> ATCC15713</b>
CB-AL	(-)
CB-NP blanco (sin AE-Lg)	(-)
CB-NI	(+) 20 mm
Eritromicina	(+) 22 mm

### **3.4 Evaluación la calidad poscosecha y la vida útil de fresa (*Fragaria ananassa*) y guayaba (*Psidium guajava*) con la aplicación de la cubierta biopolimérica a base de NI.**

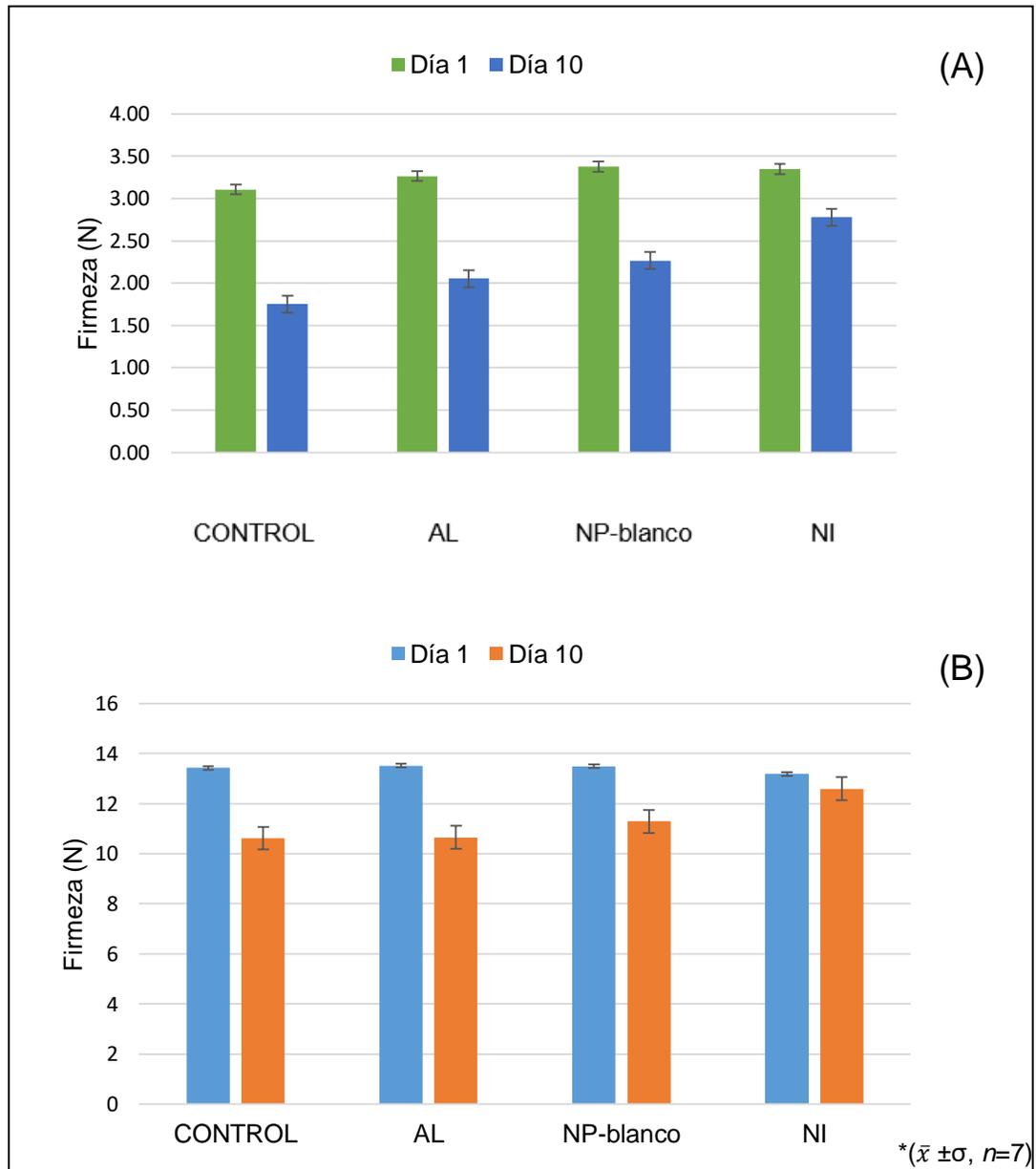
#### **3.4.1 Evaluación de la calidad poscosecha y la vida útil de fresa y guayaba**

##### *a) Medición de peso y firmeza*

Tanto la fresa (*Fragaria ananassa*) como la guayaba (*Psidium guajava*) fueron obtenidas en su etapa comercialmente madura y se transfirieron inmediatamente al laboratorio. En la Figura 25 se muestran los valores obtenidos en los porcentajes de pérdida de peso para la fresa (Figura 25A) y la guayaba (Figura 25B), respectivamente. Con respecto al análisis de firmeza, en la Figura 26, se muestran los resultados obtenidos para la fresa (Figura 26A) y la guayaba (Figura 26B), respectivamente. Cabe resaltar, que el segundo grupo de productos hortofrutícolas que fueron almacenados a 25°C (de 3 - 5 días) se encuentran en el Anexo A.



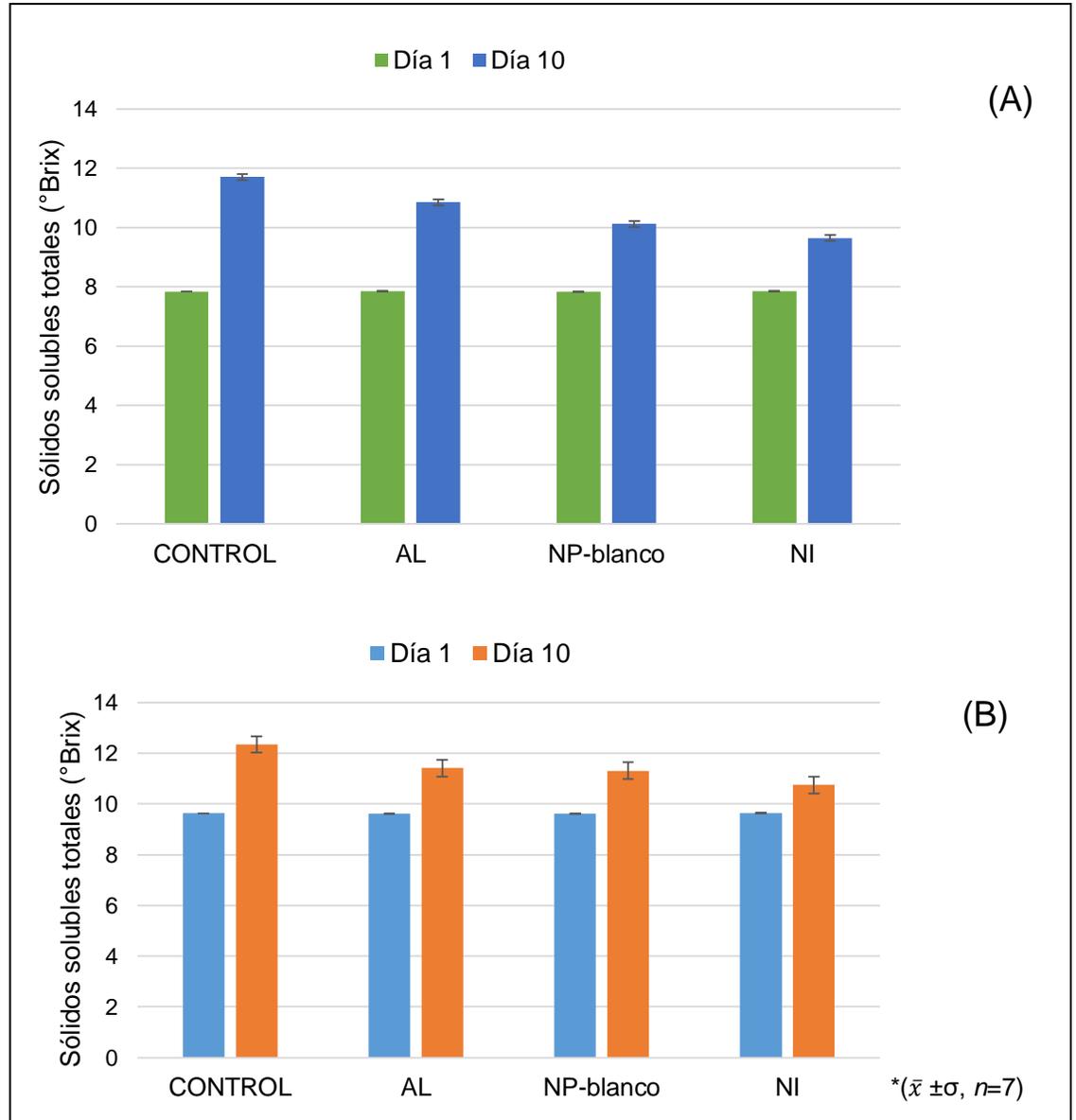
**Figura 25.** Porcentaje de pérdida de peso de frutos recubiertos con AL, NP-blanco, NI y el control (sin CB) durante el almacenamiento a 4°C en fresa (A) y guayaba (B) después de 3, 7 y 10 días de su aplicación.



**Figura 26.** Firmeza de frutos recubiertos con AL, NP-blanco, NI y el control (sin CB) durante el almacenamiento a 4°C en fresa (A) y guayaba (B) después de 1 y 10 días de su aplicación.

b) Evaluación de los sólidos solubles totales

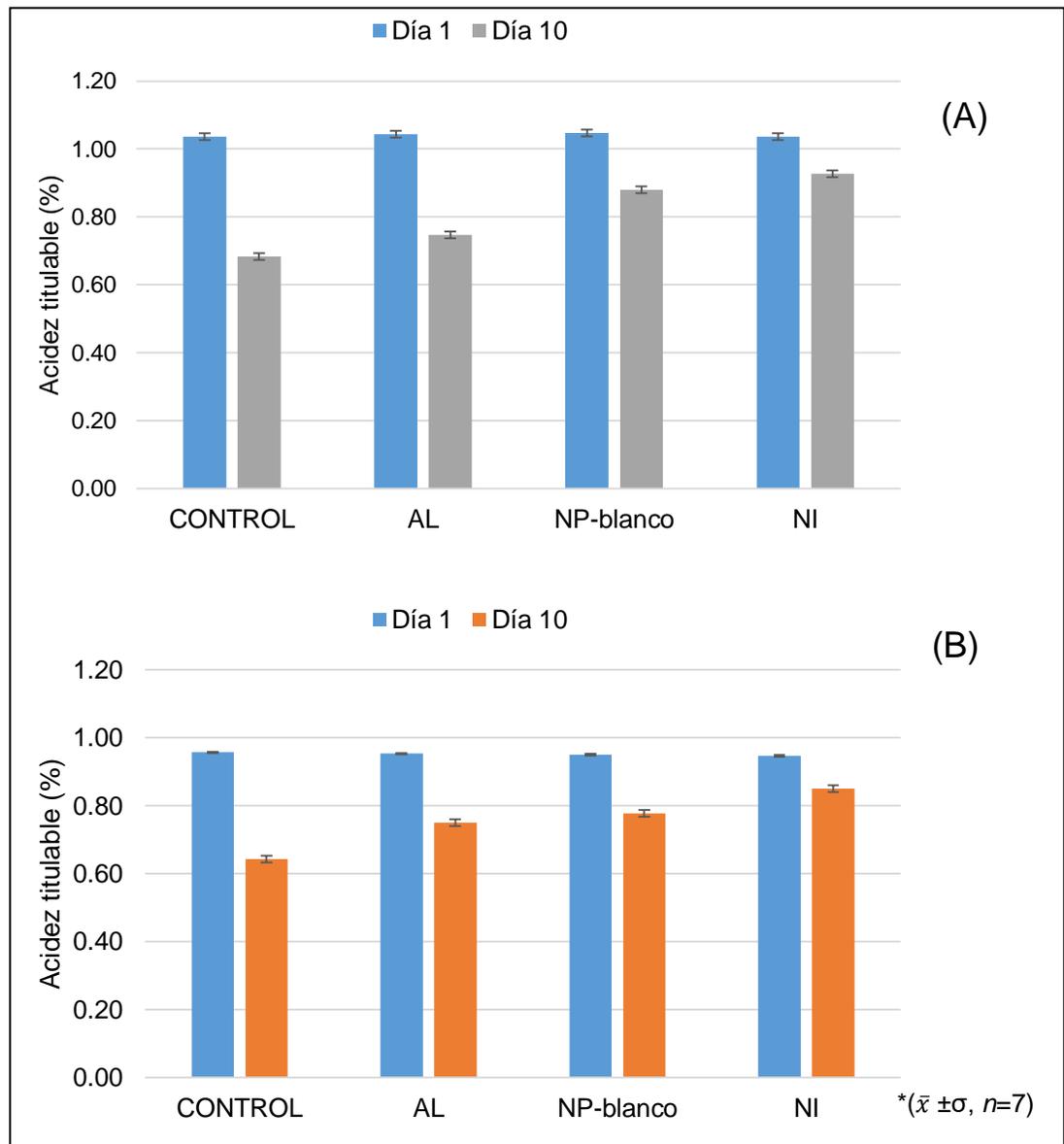
Posteriormente, se llevó a cabo la evaluación de los sólidos solubles totales. En la Figura 27 se muestran los resultados de SST ( $^{\circ}$ Brix) de la fresa (Figura 27A) y la guayaba (Figura 27B) respectivamente, obtenidos con las tres CB (AL, NP-BCO y NI).



**Figura 27.** Sólidos solubles totales de frutos recubiertos con AL, NP-blanco, NI y el control (sin CB) durante el almacenamiento a  $4^{\circ}\text{C}$  en fresa (A) y guayaba (B).

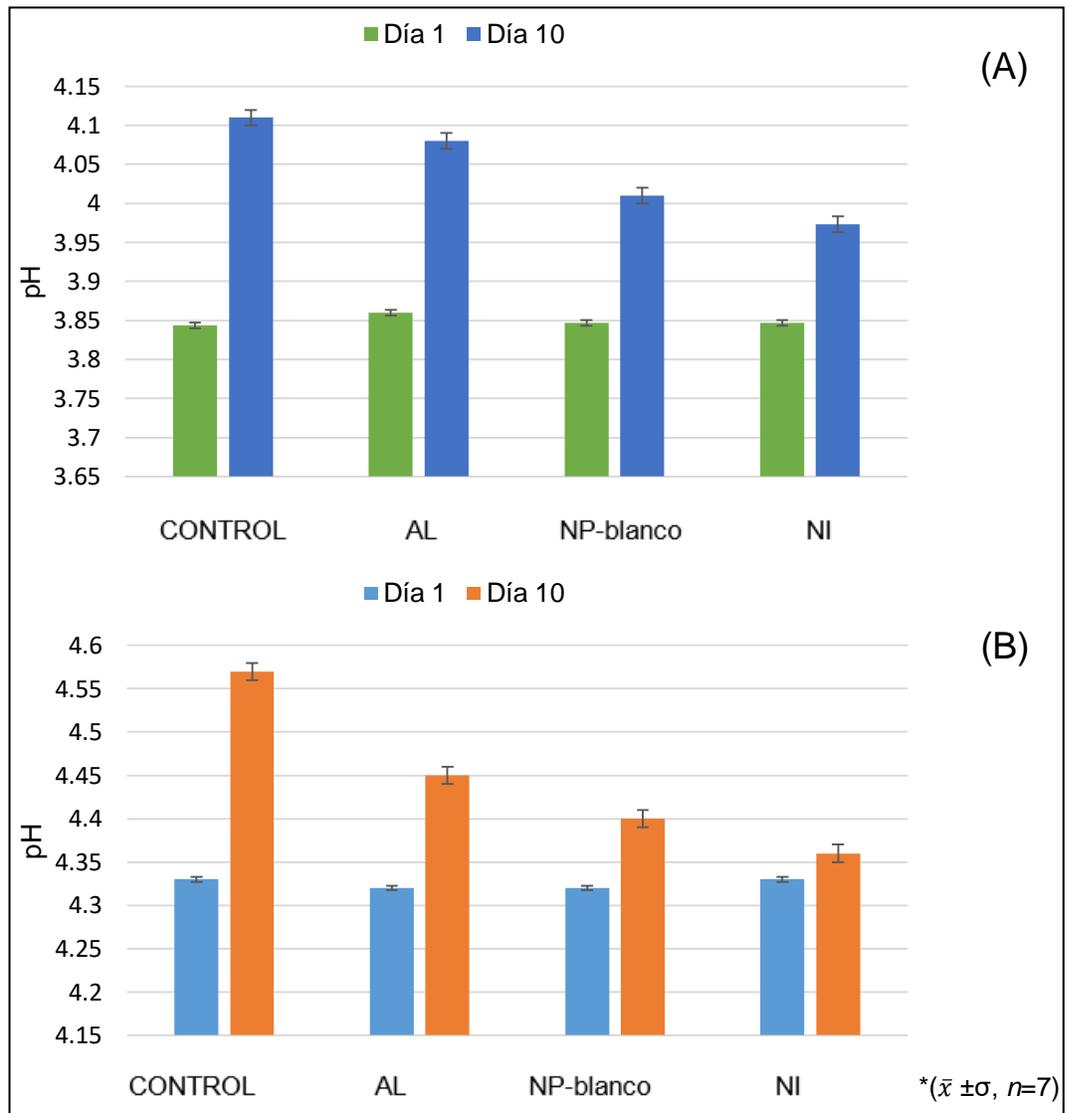
c) Acidez titulable y pH

La acidez de un fruto representa el contenido de ácidos en él y en la mayoría de los productos hortofrutícolas cambia durante el proceso de maduración. El %AT para la fresa y la guayaba, se muestra en la Figura 28A y 28B respectivamente.



**Figura 28.** Acidez titulable de frutos recubiertos con AL, NP-blanco, NI y el control (sin CB) durante el almacenamiento a 4°C en fresa (A) y guayaba (B).

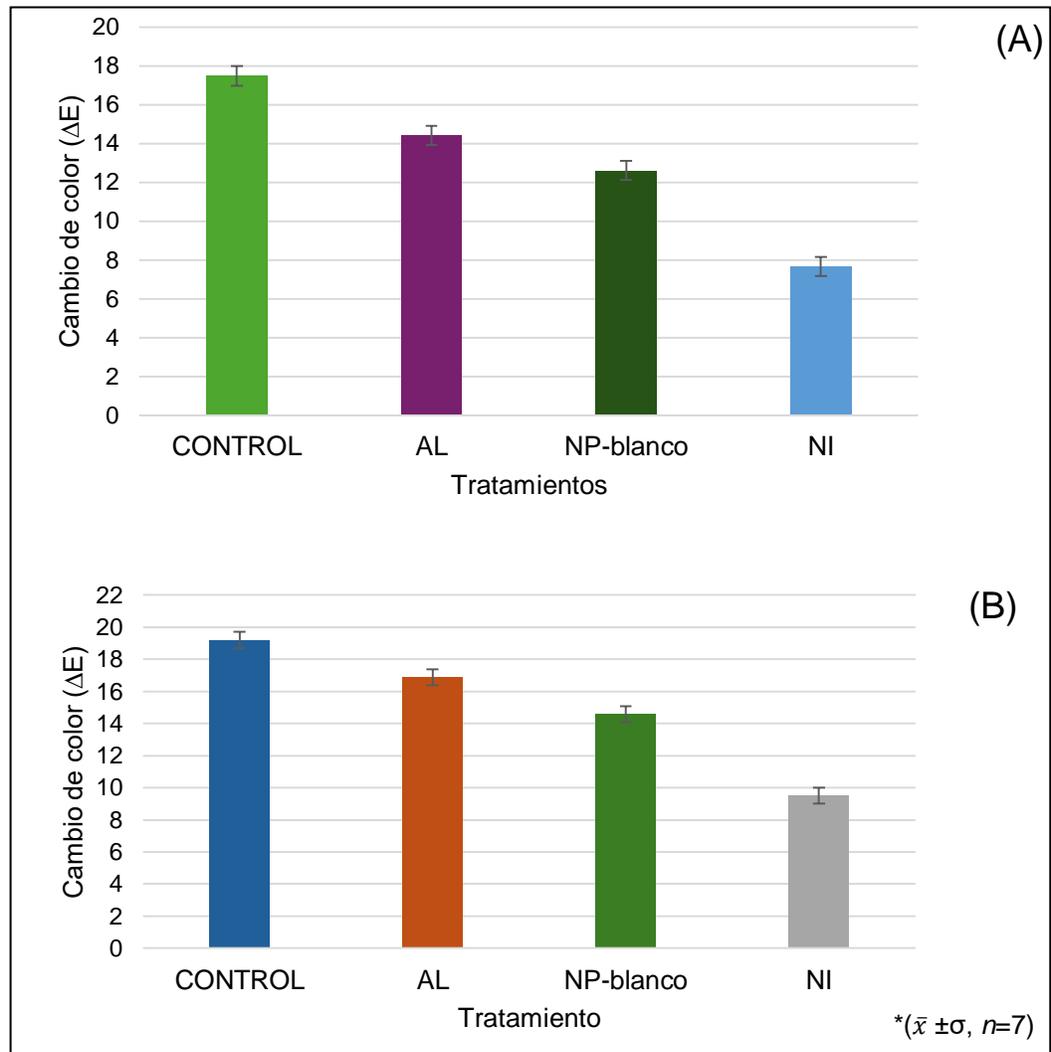
En cuanto al pH, se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 29, para la fresa (A) y la guayaba (B).



**Figura 29.** pH de frutos recubiertos con AL, NP-blanco, NI y el control (sin CB) durante el almacenamiento a 4°C en fresa (A) y guayaba (B).

d) *Análisis del color*

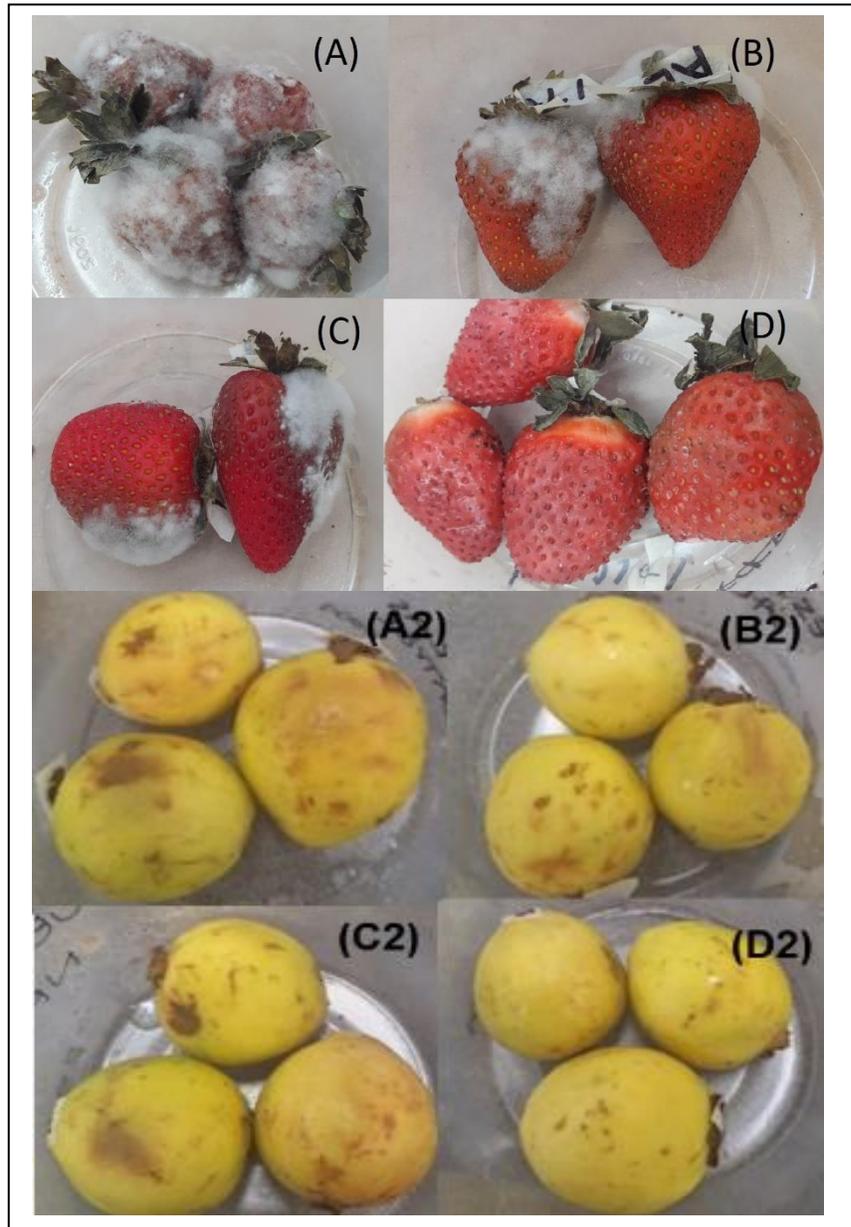
En la Figura 30 se muestra el análisis de los 3 valores de las coordenadas obtenidas, interpretado como el cambio de color ( $\Delta E$ ) producido en cada uno de los grupos tratados durante el tiempo de almacenamiento, de la fresa (Figura 30A) y la guayaba (Figura 30B) respectivamente.



**Figura 30.** Cambio de color de frutos recubiertos con AL, NP-blanco, NI y el control (sin CB) durante el almacenamiento a 4°C en fresa (A) y guayaba (B) después de 10 días de almacenamiento.

e) *Daño microbiológico visual*

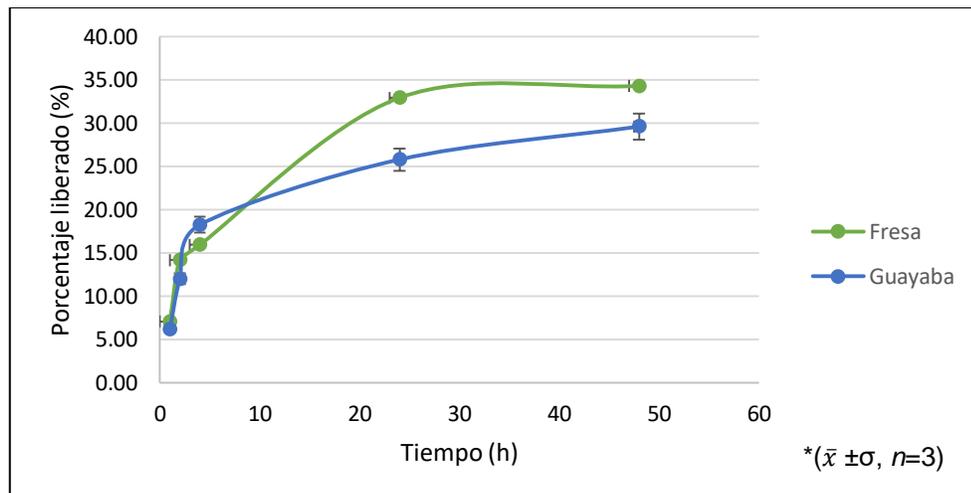
Así mismo, podemos observar en la Figura 31, el daño microbiológico, que se fue presentando en la superficie de las fresas (31A) y las guayabas (31B), después de 15 y 25 días de almacenamiento respectivamente a 4°C.



**Figura 31.** Daño microbiológico visual de las fresas y guayabas, después de 15 y 25 días de almacenamiento, respectivamente a 4°C: sin CB (control) (A y A2), AL (B y B2), NP-BCO (C y C2) y CB-NI (D y D2).

### 3.4.2 Perfil de liberación del aceite esencial de *Lippia graveolens* en los productos hortofrutícolas y en atmosfera controlada

En la Figura 32 se puede observar el comportamiento de liberación del AE-*Lg* de la CB-NI que recubría el fruto, en un ambiente controlado y a una temperatura de 25°C. Cabe resaltar que el análisis por *HS-SPME-CG-FID* de los productos hortofrutícolas sin CB-NI, se presentan en el Anexo B.



**Figura 32.** Perfil de liberación del carvacrol. Porcentaje de carvacrol liberado en la fresa y guayaba recubierta con la CB-NI en función del tiempo.

## CAPÍTULO IV

### DISCUSIÓN

#### **4.1 Formulación del nanoingrediente biopolimérico con aceite esencial de *Lippia graveolens* por la técnica de nanoprecipitación y caracterización físicoquímica**

Antes de la obtención del nanoingrediente (NI), fue necesario realizar la extracción del aceite esencial de *Lippia graveolens* (AE-Lg) para posteriormente, realizar su caracterización tanto física como química. Cabe mencionar que AE-Lg se obtuvo por hidrodestilación con aparato de Clevenger modificado a partir de la planta de orégano 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. El porcentaje de rendimiento de extracción del AE-Lg fue de 5.32%. Esto coincide por lo reportado por Dilworth y cols. (2017) quienes obtuvieron un resultado similar, el cual fue de 4.29%. Es necesario mencionar, que este porcentaje de 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).

Por otro lado, en la industria de los AE se ha establecido la importancia de evaluar las características físicas de los AE para garantizar su control de calidad de forma rutinaria, ya que las variaciones en los parámetros físicos permiten detectar posibles adulteraciones o degradación de sus componentes, y, por ende, asegurar su actividad biológica. Para la caracterización física del AE-*Lg*, se evaluaron los parámetros físicos de densidad, índice de refracción y rotación óptica en base a la FEUM. Para toda evaluación física es necesario establecer un compuesto control con características físicoquímicas similares al compuesto(s) a evaluar. Se seleccionó el estándar de anetol, como control de las evaluaciones físicas debido a su similitud físicoquímica (i.e.: peso molecular, polaridad y presión de vapor) con algunos de los componentes del AE-*Lg*. Además, la caracterización física del anetol ya ha sido reportada en la FEUM. En la Tabla 5, se presentan los valores obtenidos de la caracterización física del anetol y del AE-*Lg*. En el caso del anetol, se observa que los valores obtenidos se encuentran dentro de los intervalos reportados en la FEUM, lo cual confirma la repetibilidad y reproducibilidad de las evaluaciones físicas realizadas. En el caso del AE-*Lg*, los valores obtenidos coinciden por los reportados por Torrenegra-Alarcón y cols. (2015), los cuales presentan solo pequeñas diferencias, las cuales podrían ser atribuidas al origen geográfico y a la especie de la planta. Además, Domínguez (1985) reportó que un índice de refracción mayor a 1.47 y una densidad relativa mayor a 0.9 indica que el AE contiene compuestos alifáticos y/o aromáticos oxigenados.

La caracterización química realizada por CG-MS y CG-FID permitió identificar los componentes presentes en el AE-*Lg*, así como su porcentaje de abundancia. La CG-FID representa una técnica analítica que ofrece: i) alta

selectividad para el análisis de compuestos volátiles y semivolátiles, ii) alta sensibilidad, iii) gran estabilidad y iv) rango dinámico lineal excepcionalmente alto que permite el análisis de AE a concentraciones muy bajas o en niveles de trazas. Inicialmente, se obtuvo el cromatograma del AE (Figura 9 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 10) y se calculó el porcentaje de abundancia (%A) en base a las áreas relativas. En la Tabla 6, se muestra la composición química, el tiempo de retención y el %A de los componentes identificados. En el AE-Lg, se identificaron 16 componentes, el 71.77% del porcentaje total del AE corresponde a monoterpenos oxigenados, el 24.96% a monoterpenos hidrocarbonados o alifáticos, el 3.10% a sesquiterpenos alifáticos y el 0.1% a sesquiterpenos oxigenados. Los componentes con mayor %A fueron mirceno (16.93%), el p-cimeno (7.56%) ambos monoterpenos alifáticos, y el carvacrol (66.58%) un monoterpeno oxigenado. Esto coincide, con lo reportado por Hou y cols. (2020) quienes reportaron al carvacrol como componente mayoritario (89.98%) en el AE de orégano de China. De igual manera, los resultados de la caracterización química del AE-Lg en el presente trabajo fueron similares a los mencionados por Enayatifard y cols. (2021), quienes reportaron como componente mayoritario el carvacrol con un porcentaje de abundancia del 78% en el AE de oregano de Irán.

Sin embargo, diversos autores han reportado, otros componentes mayoritarios del AE de orégano. Tal es el caso de Capatina y cols. (2021), quienes

reportaron como componentes mayoritarios al timol (38,82%), p-cimeno (20.28%) y  $\gamma$ -terpineno (19.58%) en el AE de orégano de Italia. En otro estudio llevado a cabo por Sharififard y cols. (2018), se reportaron como componentes mayoritarios el terpineol (22.85%) y  $\alpha$ -terpineno (20.60%) en el AE de orégano de Irán.

La diferencia en la abundancia de los componentes del AE de orégano reportada en los estudios anteriormente mencionados, probablemente 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, *et al.* 2021). Cabe resaltar que se seleccionaron como componentes de seguimiento en el resto del proyecto, el mirceno, p-cimeno y carvacrol, por ser los componentes mayoritarios del AE-Lg en base a su abundancia y actividad biológica.

Por otro lado, es necesario mencionar que el uso de AE, debido a sus propiedades fisicoquímicas, tiene ciertas limitantes, por ejemplo, presentan escasa solubilidad en medios acuosos, elevada volatilidad y fácil oxidación, lo que restringe su incorporación directa en cubiertas. Como solución a esta problemática, se planteó la formación de NC, por la técnica de nanoprecipitación. Esta técnica, también llamada por desplazamiento de solventes, fue descrita por primera vez por Fessi y cols. (1987), como un procedimiento 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 se debe al fenómeno producido durante el desplazamiento de un solvente orgánico en una de las fases hacia la otra fase. Como ambas fases presentan miscibilidad entre ellas, se presenta una difusión de la fase orgánica que contiene el polímero y el activo

hacia la acuosa. Debido al desplazamiento de estas cadenas poliméricas hacia un medio en el que son insolubles, éstas se agregan y forman las NC cargadas con el activo (Fessi, *et al.* 1989; Tao, *et al.* 2019). Cabe resaltar, que, para la formación de las NC, en este trabajo se utilizó el polímero el Eudragit L100-55, el cuál 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).

Las ventajas de la técnica de nanoprecipitación sobre otras técnicas de nanoencapsulación son: 1) buena reproducibilidad, 2) obtención de tamaños de nanopartículas con distribución estrecha, 3) simplicidad, 4) facilidad de escalamiento y 5) compatibilidad con el medio ambiente ya que se limita el uso de grandes cantidades de solventes tóxicos. Por lo anterior, la técnica de nanoprecipitación se ha convertido en una estrategia importante en la aplicación en el sector farmacéutico (Solís-Cruz, *et al.* 2023), agrícola (Miladi, *et al.* 2016), alimentaria (Piña-Barrera, *et al.* 2019) y cosmética (Silva-Flores, *et al.* 2023).

Una vez obtenidas las NC, se llevó a cabo su caracterización fisicoquímica. Se evaluó su tamaño, índice de polidispersidad (IP) y potencial zeta. Como se muestra en la Tabla 7, se obtuvo un tamaño de partícula de  $287 \pm 5.11$  nm, el cual es cercano al tamaño deseado de 200 nm. Este tamaño nanométrico de NC, 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 de contacto entre la NC y el epicarpio (capa más superficial) de la fresa y guayaba, a partir de la cual se daría la posterior liberación de los componentes activos del AE-Lg.

Cai y cols. (2022), elaboraron nanopartículas de quitosano con AE de *Ocimum basilicum*, con un intervalo de tamaño de partícula de 198.7 - 373.47 nm, y observaron, que éstas presentaban una mayor actividad antibacteriana y anti-biopelícula contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* comparadas con el AE libre. Así mismo, Amiri y cols. (2021) formaron NP de quitosano con AE de *Satureja hortensis*, las cuales presentaban un intervalo de tamaño de partícula de 142.2 - 267.7 nm. Estas NP, permitieron mantener la calidad bioquímica y sensorial de granadas, posterior a su aplicación. Por otro lado, Froiio y cols. (2019) obtuvieron NC con un tamaño de 208 nm a partir del polímero Eudragit RS 100 y el AE de naranja. En este estudio se demostró que las NC tienen una buena actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* comparadas con la actividad biológica del AE libre, por lo que se resalta las ventajas de la encapsulación de los AE.

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, *et al.* 2004; Sultana, *et al.* 2020). En este trabajo, las NC cargadas con el AE-Lg (NI), presentaron un IP de  $0.10 \pm 0.03$ , lo que indica una homogeneidad en el tamaño de las NC, esto se observa en la curva de distribución de tamaño en la Figura 11A. La homogeneidad en el tamaño del NI, es una característica que favorecería la

interacción individual de las NC con la superficie de los productos hortofrutícolas (i.e.: adhesión o liberación de los componentes activos del AE), asegurando su actividad antimicrobiana.

Otra característica fisicoquímica evaluada fue el potencial zeta (Tabla 7). Este valor es la medición del potencial electrostático en la doble capa eléctrica que rodea a 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). Es decir, el valor del potencial zeta ( $>+30$  ó  $<-30$  mV) 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 asegurando su estabilidad. El potencial zeta del NI con el AE-Lg fue de  $-50.90 \pm 1.44$  mV, este valor negativo indica que las cargas negativas son dominantes en la superficie del NI y esto se le puede atribuir al Eudragit L100-55, el cual es un copolímero aniónico. Por lo tanto, durante la formación del NI, las cadenas de polímero rodearon el mayor número de núcleos oleosos del AE-Lg 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 y atracción electrostática del NI con la membrana de las bacterias patógenas presentes en los productos hortofrutícolas (i.e.: *Pectobacterium carotovorum*, *Xanthomonas fragariae*, *Erwinia psidii*) debido a la presencia de una carga en la membrana externa bacteriana. Esto, representa una gran ventaja, debido a que el NI, favorecería la interacción directa de los componentes activos del AE-Lg con la bacteria aumentando de esta forma

su efectividad antimicrobiana (Wang, Hu y Shao, 2017). Cabe resaltar, que tal y como se observa, en la Tabla 7, el índice de polidispersidad y el potencial zeta, no se vieron influenciados por la técnica de purificación utilizada, sin embargo, el tamaño fue ligeramente menor cuando el NI fue purificado por la técnica de diálisis que por evaporación a presión reducida. Esto coincide con lo reportado por Yasuno y cols. (2021), quienes elaboraron NP de N-isopropilacrilamida y melitina, y observaron que cuando estas NP eran purificadas por diálisis, su tamaño disminuía.

Así mismo, se determinó la morfología de las NC-AE-Lg purificadas por evaporación a presión reducida con un microscopio electrónico de barrido (SEM). Los datos de SEM presentados en la Figura 11B muestran la presencia de NC con forma esférica. Esto coincide con un estudio previo, en el que se observó que NC de quitosano (polímero de origen natural) con goma de anacardo cargados con AE de *Lippia* presentaban forma esférica (Abreu, *et al.*, 2012). También, en otro estudio, NC de policaprolactona cargadas con AE de *Lippia* y purificadas por la técnica de evaporación a presión reducida, tenían una morfología esférica, similar a este trabajo (Pinto, *et al.*, 2016).

Para seleccionar la técnica de purificación de las NC más adecuado, es necesario establecer el contenido de los tres componentes de seguimiento: mirceno, p-cimeno y carvacrol. En una primera etapa, se comparó el cromatograma del AE-Lg libre (Figura 12A), con el cromatograma del NI purificado por la técnica de diálisis (Figura 12B) y por evaporación a presión reducida (Figura 12C). Se puede observar que en la Figura 12B las señales de mirceno, p-cimeno y principalmente del carvacrol son menos prominentes que en 12A. Esta disminución en las señales cromatográficas, se deben posiblemente a que el proceso de

purificación por diálisis es afectado principalmente por la polaridad de los componentes. Por otro lado, cuando el NI es purificado por evaporación a presión reducida (Figura 12C), se observa una sola señal cromatográfica correspondiente al carvacrol. Estos resultados, indican que, por sus propiedades fisicoquímicas, los componentes con mayor presión de vapor (mirceno: 0.27 kPA a 20°C y p-cimeno: 0.20 kPA a 20°C) se ven afectados bajo las condiciones utilizadas en la técnica de evaporación a presión reducida, mientras que el carvacrol, se ve afectado en la técnica de diálisis probablemente debido a su polaridad (Log P: 3.49).

En la segunda etapa, se determinó el porcentaje de encapsulación (%E) y el porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE) de los tres componentes huella del AE-*Lg* en el NI: mirceno, p-cimeno y carvacrol en el NI purificado por ambas técnicas (Tabla 8). Para cuantificar los tres componentes huella del AE-*Lg* en el NI, se utilizó el método de *HS-SPME* por CG-FID validado.

Cuando el NI fue purificado por la técnica de diálisis, se obtuvo un %E de 4.00, 11.61 y 3.88% para el mirceno, p-cimeno y carvacrol, respectivamente. Es decir, que aproximadamente el 20% de la NC está formada por los tres componentes huella del AE-*Lg* y el resto corresponde al polímero Eudragit L 100-55. Este parámetro es indispensable para la correcta dosificación de los tres componentes huella del AE-*Lg* en el producto hortofrutícola. Cabe destacar, que Salas-Cedillo (2016) 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), valor tres veces más pequeño que el obtenido en este trabajo. así como del % de abundancia en el AE.

En relación al %EE obtenido del NI purificado por diálisis, fue de 12.94, 42.15 y 9.47% para mirceno, p-cimeno y carvacrol respectivamente, por lo que se obtuvo un %EE total de 64.56%. Lo anterior indica que los tres componentes fueron encapsulados aproximadamente en un 65% con respecto a su abundancia en el AE inicial. En comparación, cuando el NI fue purificado por evaporación a presión reducida, los valores del %E y %EE del mirceno y p-cimeno, fueron menores que por diálisis. Estos mismos hallazgos, fueron reportados por González-Moreno y cols. (2020), con NC de AE de *Thymus vulgaris*, donde se observó que componentes con mayor presión de vapor (o-cimeno y y-terpineno) tenían un menor %E y %EE con la purificación por evaporación a presión reducida. En el caso del carvacrol, tanto el %E y %EE, fueron mayores, cuando el NI era purificado por evaporación a presión reducida que por diálisis. Al ser el carvacrol, el componente al que se le atribuye la actividad antimicrobiana del AE-Lg, el NI empleado fue purificado por evaporación a presión reducida.

Por otro lado, con el objetivo de establecer el perfil de liberación del AE-Lg en el NI, se realizó la cinética de liberación durante 48 h. En la Figura 13, se puede observar el perfil de liberación del componente activo principal, el carvacrol. Cabe resaltar, que los otros dos componentes de seguimiento (mirceno y p-cimeno) no fueron detectados bajo ningún tiempo de liberación. Se puede observar que después de la primera hora, el % de liberación del carvacrol fue del 30.34%, y que conforme el tiempo transcurre (4 horas) el porcentaje de liberación del carvacrol aumentó hasta un 75%. Mientras que a partir de las 18 h, la liberación del componente se llevó a cabo de una manera más lenta, alcanzando un porcentaje de liberación del 89%,

mientras que transcurridas las 48 horas, el porcentaje de liberación fue superior al 99%. Este comportamiento concuerda con lo reportado en la bibliografía, donde se menciona que sistemas de nanocápsulas obtenidos por la técnica de nanoprecipitación se comportan como sistemas bifásicos de liberación con una fase inicial rápida, seguida por una segunda fase más lenta (Cauchetier, *et al.* 2003). Esto mismo, fue reportado por Yuan-Ma y cols. (2022), en donde se elaboraron nanopartículas de quitosano con aceite esencial de oregano, y se observó que los componentes del AE, pueden liberarse continuamente durante varios días, con un patrón de liberación bifásico que consiste en una liberación en ráfaga y una liberación lenta posterior. En estos sistemas bifásicos de liberación, la fase inicial es llamada efecto *Burst* (liberación inmediata) y es dado por la desorción de los activos de la superficie de las NC (Cruz, *et al.* 2006). La segunda fase descrita, corresponde a la difusión de los activos (i.e. carvacrol) desde el núcleo de la NC al medio. Esta segunda fase está influenciada por el coeficiente de partición de los activos entre el núcleo oleoso de las partículas y el medio acuoso externo, además de otros factores como las interacciones entre los activos y las cadenas poliméricas (Zili, *et al.* 2005).

Según la bibliografía, la degradación de polímeros es el mecanismo principal por el cual las NC liberan aceites esenciales en el ambiente externo. La fase de liberación más lenta es causada por la difusión de moléculas del AE encapsuladas desde el núcleo de las NC al medio de disolución, a través de poros y canales interconectados en la matriz polimérica. Cuando se combinan con el comportamiento hidrofóbico de los AE, exhiben una tasa de absorción de agua más

lenta, lo que disminuye la tasa de degradación del polímero, que es similar a otros resultados relacionados con materiales hidrofóbicos (Dupuis, *et al.* 2022).

En cuanto a la estabilidad del NI, como se observa en las Figuras 14A y 14B, el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad del NI no presentaron cambios significativos transcurridos doce meses. De forma paralela, se realizó una inspección visual de las formulaciones del NI para identificar la ausencia o presencia de AE en la superficie. Durante los doce meses, no se observó sedimentación ni formación de agregados en los sistemas de NI, ni presencia de aceite en la superficie. Se estableció que la formulación es estable al menos por un año.

#### **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 *Lippia graveolens* en el nanoingrediente biopolimérico por cromatografía de gases con detección de ionización de llama (CG-FID).**

Con el propósito de cuantificar el mirceno, p-cimeno y el carvacrol del aceite esencial de *Lippia graveolens* encapsulado en el NI y en la CB, se validó un método de HS-SPME por GC. Para esto, se dividió el objetivo en dos etapas: la primera consistió en la selección de la fibra para la mayor extracción de los tres componentes huella y la segunda etapa, que consistió en la validación del sistema y método.

Una adecuada elección de la fibra o fase de extracción es fundamental en un método de SPME. Con el fin de seleccionar la fibra que permitiera la mejor extracción de los tres componentes huella de manera selectiva y reproducible, se evaluaron cuatro fibras, las cuales se mencionan en orden de polaridad decreciente: PA, PDMS, CAR/PDMS y DVB/CAR/PDMS. En la Figura 15, se presentan los cromatogramas obtenidos a partir de la mezcla de los tres estándares y se observan las tres señales cromatográficas correspondientes del mirceno, p-cimeno y del carvacrol obtenidas con cada una de las fibras de SPME evaluadas. Se puede observar que las cuatro fibras de SPME extraen a los componentes huella. Sin embargo, cada componente del AE-*Lg* muestra un comportamiento diferente con cada una de las fibras. La selectividad de la fibra depende principalmente de la volatilidad, la polaridad y el peso molecular del compuesto (Pawliszyn, 1997). Además, también se puede observar que la fibra que permitió una mayor extracción de los tres componentes huella con una menor variabilidad, fue la fibra CAR/PDMS (Figura 16). Esta fibra es semipolar, y permite la extracción de componentes volátiles, y con bajo peso molecular (30- 225 g/ mol), características que presentan los componentes de seguimiento. Cabe resaltar, que este mismo experimento se realizó con el AE-*Lg*, con el objetivo de determinar si las fibras presentaban el mismo comportamiento, ya que el AE es una mezcla de 16 componentes diferentes. Tal y como podemos observar, en la Figura 17 y 18, de igual forma, la fibra CAR/PDMS es la fibra que permitió una mayor extracción de los tres componentes de seguimiento con una menor variabilidad.

Posteriormente, con el propósito de cuantificar los componentes huella del

AE-Lg en las CB-NI, se llevó a cabo la validación del método de HS-SPME por CG-FID. Para la validación del método, se consideraron 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) y la IUPAC (2006). Para la validación del sistema se evaluaron los parámetros de linealidad, precisión, límite de detección y límite de cuantificación. En la Tabla 9, 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 intervalo de concentración de 6-96  $\mu\text{g/mL}$ , la respuesta analítica tendrá un comportamiento lineal a la concentración. Con respecto a los LD y LQ para el o-cimeno,  $\gamma$ -terpineno y timol fueron menores al nivel inferior de la curva de calibración, lo cual es aceptable según la SSA (2011). Para la precisión intermedia del sistema y repetibilidad, 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 10 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 intermedia y repetibilidad, 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 mirceno se obtuvo un 98.75%, para p-cimeno un valor de 99.72% y para el carvacrol 100.15%. Estos datos concuerdan con lo reportado por Lugo-Estrada y cols. (2019) donde se obtuvieron porcentajes de recuperación entre 98 y 109% para tres de los componentes del AE de tomillo encapsulados en NP. Así mismo, Miao y cols, (2015) establecieron un método analítico para el análisis cuantitativo de un AE derivado de *Alpinia oxyphylla*. También establecieron que el método GC-FID validado mostró un porcentaje de recuperación cercano al 100%. De igual forma, los resultados obtenidos en este trabajo, coinciden por lo reportado con Hernández-Hernández y cols. (2014), quienes utilizaron la técnica de *HS-SPME-CG* para cuantificar AE de orégano microencapsulado y demostraron que esta técnica es adecuada para la cuantificación de compuestos volátiles, tales como los AE. Una vez validado el método, se llevó a cabo su aplicabilidad con el propósito de cuantificar los componentes huella del NI en CB por *HS-SPME / CG-FID* y para calcular el porcentaje de retención de los componentes huella, una vez obtenida la CB. Como podemos observar en la Figura 19 se observa la señal cromatográfica correspondiente al carvacrol en la CB, por lo que se puede aseverar que el método analítico utilizado, fue preciso y exacto para la cuantificación de los componentes de seguimiento en la CB y establecer el porcentaje de retención. En Tabla 11, se muestran los porcentajes de eficiencia de retención de los componentes huella del AE-Lg en la CB formada a partir del NI. El cuál indica la cantidad de cada componente que permaneció en la CB, posterior a su formación.

#### **4.3 Obtención la cubierta biopolimérica a partir del nanoingrediente por la técnica de *casting* y evaluar sus propiedades físicas: ópticas, de permeabilidad y mecánicas, de liberación y antimicrobianas**

Una vez obtenido y caracterizado el NI, se llevó a cabo la formación de las CB por la técnica de vaciado convencional o método de *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 de las NC 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, 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, mientras que el AL comienza con la formación del entramado polimérico.
- 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 a distribuirse homogéneamente sobre el entramado polimérico del AL.
- Etapa 4: Las NC se terminan de distribuir homogéneamente sobre el entramado polimérico y ocurre 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 empleó un tiempo de secado de 24 h, y una concentración de AL al 1% (p/v) y se llevó a cabo su evaluación visual macroscópica. Las propiedades físicas de las cubiertas son fundamentales, ya que influyen en la apariencia del producto hortofrutícola, una vez aplicada la cubierta. En la Figura 20A, se observa que la CB obtenida fue homogénea y de formación completa. Además, la CB fue analizada por SEM, la cual es una técnica que se utiliza comúnmente para la descripción de la superficie de cubiertas y materiales de embalaje para describir la homogeneidad, la integridad, y la presencia o ausencia de grietas, características que influyen las propiedades mecánicas de las CB. En la Figura 20B, se observa que la CB-NI, exhibió una superficie lisa, uniforme y continua, lo que indica homogeneidad e integridad estructural. Esto podría deberse a que los componentes fenólicos del AE-Lg presentes en el NI, actúan como agentes reticulantes, es decir promueven la interacción entre moléculas o diversos materiales generando una CB más uniforme (Bhatia, *et al.*, 2023). Cabe mencionar que, en la CB se observan partículas con un tamaño aproximado de 200 nm, distribuidas también de forma homogénea (algunas señaladas con flechas azules). Esto podría atribuirse a la presencia del NI en la CB, ya que diversas investigaciones han reportado la influencia de las NP en la homogeneidad de la CB. En un estudio realizado por Ma y cols. (2023) se prepararon recubrimientos de gelatina comestible con NP de quitosano cargadas con AE de orégano. En este estudio se observó que a medida que se aumentaba la adición de NP, el

recubrimiento se volvía más homogéneo.

Posteriormente, con el propósito de determinar las posibles interacciones entre los componentes de la formulación de la CB, se realizó un análisis por espectroscopia de FT-IR, de cada uno de los componentes: i) polímero Eudragit L100-55, ii) NP-blanco, iii) NI, iv) NI-AL, v) AE-Lg libre y del vi) AL. La espectroscopia FT-IR se emplea para identificar grupos funcionales e interacciones químicas entre los componentes de la formulación. La región media del espectro infrarrojo ( $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ) es muy utilizada para estudiar las vibraciones fundamentales y la estructura rotacional-vibratoria asociada a los diferentes enlaces químicos. En la Figura 21A, se observa el espectro del polímero Eudragit L100-55, en el cual se identificaron cuatro señales importantes de los principales grupos químicos presentes en la unidad polimérica de este copolímero. En la región entre  $2500$  y  $3500\text{ cm}^{-1}$  se observa el estiramiento del grupo hidroxilo (O-H) perteneciente al ácido carboxílico presente en la cadena lateral de la unidad polimérica, en la región de  $2980\text{ cm}^{-1}$ , se observan las señales C-H. En la región de  $1690\text{ cm}^{-1}$  se observa el estiramiento correspondiente a los grupos carbonilo (C=O) presentes en las cadenas laterales del ácido carboxílico y de del éster. Y por último, en la región de  $1155\text{ cm}^{-1}$  se observa el estiramiento correspondiente al grupo C-O-C presente en la cadena lateral del éster. Las señales antes mencionadas coinciden con lo reportado en la ficha técnica del polímero Eudragit L100-55 (Evonik, 2015). Por otro lado, en la Figura 22C podemos observar el espectro IR obtenido del AE-Lg, donde se puede ver presente una banda de  $3392\text{ cm}^{-1}$  que pertenece a las vibraciones de enlaces O-H características de los componentes fenólicos presentes en el AE, como lo son el carvacrol y el timol. Se observó otra

banda a  $2950\text{ cm}^{-1}$ , la cual corresponde a la presencia de enlaces  $\text{CH}_3$  o  $\text{CH}_2$  de los grupos metilos y metilenos que se encuentran de manera frecuente en las estructuras de compuestos orgánicos. Dentro de la región de  $1101\text{--}1209\text{ cm}^{-1}$  se presentan bandas características de los enlaces  $\text{C--OH}$  de los alcoholes primarios y secundarios, presentes en moléculas como la del terpinen-4-ol y 1,8- cineol. En la región de  $850\text{--}1080\text{ cm}^{-1}$  se presentan bandas pertenecientes a los grupos  $\text{C--O}$ . Así mismo, en la Figura 21B y 22A, se observan los espectros IR obtenidos de las NP-blancos y del NI, respectivamente. En ambos espectros, las señales obtenidas coinciden principalmente con las señales obtenidas en el espectro del polímero (Figura 21A) y no al espectro del AE-Lg (Figura 22C) en el NI, por lo que se infiere que los componentes del AE-Lg están encapsulados en el entramado polimérico de las NC. Es importante destacar, que las señales con mayor intensidad corresponden a los componentes mayoritarios del AE-Lg, tales como el mirceno, p-cimeno y carvacrol. Por otro lado, en la Figura 23, se presenta el espectro IR obtenido para el AL, en el cual se observa una banda asociada a la vibración de tensión  $\text{O--H}$  ( $3267\text{ cm}^{-1}$ ), la vibración de tensión asimétrica del  $\text{COO}^-$  ( $1580\text{ cm}^{-1}$ ), la vibración simétrica del  $\text{COO}^-$  ( $1408\text{ cm}^{-1}$ ) y a la banda de tensión  $\text{C--O--C}$  y al plegamiento  $\text{O--H}$  ( $960\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ ). Estas señales coinciden con la presencia de estos grupos funcionales en la estructura del AL. Por último, en la Figura 22B, se presenta el espectro obtenido para el NI-AL, en el cual se aprecian señales que coinciden con el espectro del AL (Figura 23), probablemente debido a que durante la adición del AL a la dispersión del NI, las cadenas de este polisacárido se organizan sobre la pared polimérica de las NC provocando una superposición de las señales del NI-AL.

En el contexto de la evaluación de la calidad de los alimentos como los productos hortofrutícolas, la inspección visual es un aspecto crítico, y las CB con buenas propiedades de transparencia son muy deseables (Gautam, *et al.*, 2023). Se llevó a cabo la evaluación de la opacidad de las CB. Es necesario, resaltar que la opacidad de una CB se presenta cuando esta, no deja pasar la luz en proporción apreciable habiendo una ausencia de transparencia (Ruíz-Martínez, *et al.*, 2020). Si bien, las CB-NI fueron visualmente transparentes, presentaron un valor de opacidad ( $0.600 \pm 0.100$ ). Esto es debido a que según Cai y cols. (2020) la opacidad de las cubiertas que contienen AE, es el resultado de la dispersión de la luz provocada por las gotas de AE uniformemente distribuidas dentro de la matriz de la cubierta. En la Tabla 12, se observa un valor menor de opacidad para la CB formada a partir del NI ( $0.600 \pm 0.100$ ) comparado con la cubierta formada a partir únicamente de AL ( $0.706 \pm 0.100$ ) y con NP blanco ( $0.956 \pm 0.260$ ). Cabe mencionar que, los valores más altos de opacidad indican menos transparencia. Este comportamiento coincide con los resultados obtenidos por Siracusa y cols. (2018) con CB de AL (1% p/p) con AE de citral con buenas propiedades de transparencia (baja opacidad).

El agua juega un papel importante en el deterioro de los alimentos; por lo tanto, una propiedad importante de las CB es su capacidad para evitar el intercambio de humedad entre el medio y la matriz del alimento. Se realizó la evaluación de la permeabilidad de las CB mediante el cálculo de los valores de WVP y WVTR. Donde WVTR es la medida de la humedad que atraviesa una unidad de espacio de material por unidad de tiempo (González-Sandoval, *et al.*, 2019) y WVP es una propiedad vital para evaluar la capacidad de barrera contra la

humedad de las CB. Los valores de WVTR y WVP deben ser preferentemente bajos para reducir la pérdida de humedad de los productos alimenticios envueltos (Li, *et al.*, 2022). Los resultados obtenidos para WVTR y WVP se presentan en la Tabla 13. Las CB-NI con AL, tuvieron valores de WVTR y WVP menores, es decir presentaron un mejor rendimiento de barrera de la humedad en comparación con la CB de AL y NP-BCO, lo cual es atribuido a la presencia del NI (NC con AE-Lg). Diversos estudios coinciden con estos resultados, ya que la presencia de NP en las CB provoca una disminución significativa de los valores de WVTR y WVP (Hasheminya, *et al.*, 2018; Shankar, *et al.*, 2018). Esto podría deberse a la naturaleza hidrofóbica y baja permeabilidad de las NP que ocupan los espacios vacíos entre las cadenas del entramado polimérico de AL (Hasheminya, *et al.*, 2018). Además, la presencia del AE-Lg en la CB-NI, podría modificar la relación hidrófila-hidrofoba de la CB y por lo tanto afectar la difusión de agua a través de la parte hidrófila de la CB (Monteiro, *et al.*, 2018). Esto coincide con lo reportado por Al-Harrasi y cols. (2022) donde se obtuvieron CB de gelatina-alginato de sodio cargadas con AE de jengibre y se observó que la adición del AE de jengibre provocó una disminución en el valor de WVTR y WVP. Así mismo, diversos autores han reportado que los AE son sustancias bioactivas hidrofóbicas que aumentan la hidrofobicidad de las CB, y como consecuencia reducen la difusión del vapor de agua a través de la cubierta (Sánchez-González, *et al.*, 2011; Chen, *et al.*, 2021).

Por otro lado, la evaluación de parámetros mecánicos como el rompimiento, la adhesión y el porcentaje de elongación, permiten establecer las características de las CB relacionadas desde la etapa de preparación hasta su

aplicación. Una CB “ideal” debe poseer las siguientes características: (i) un buen porcentaje de elongación para evitar su rompimiento durante el envasado o la manipulación; (ii) una adecuada adherencia a las superficies de los productos hortofrutícolas sobre los que se aplicará; (iii) una buena resistencia al rompimiento para asegurar su integridad; y (iv) una textura suave, lisa y transparente para no comprometer la apariencia física.

Como podemos observar en la Tabla 14, se muestran los valores obtenidos en el análisis de rompimiento de las CB formadas a partir del AL, NP blanco y NI. Cabe resaltar, que el rompimiento de las CB, indica el peso que puede resistir la cubierta antes de romperse. En la Tabla 14, se observa que la CB formada a partir del NI resiste  $1,555.26 \pm 4.31$  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, lo cual indica que el NI favorecería la resistencia de la CB cuando una fuerza es aplicada sobre ella. El aumento en el valor 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 con AE de semilla de hinojo. Se encontró que la presencia del NI, aumentaba hasta siete veces la resistencia al rompimiento. Del mismo modo, González-Moreno (2018), evaluó el rompimiento de CB formadas a partir de NC de AE de tomillo y pululano al 1% (p/v) y observó que esta CB resistía un peso mayor antes del rompimiento en comparación con la cubierta formada únicamente con pululano al 1% (p/v). Además, la presencia del NI con AE-Lg y AL favorecería el aumento de la resistencia al rompimiento de la CB en comparación con el AE-tomillo y pululano. Probablemente, el AL interactúa fuertemente con el NI y genera un efecto de reticulación junto con el AE-Lg, es decir, 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 (Nisar, *et al.* 2018).

Con la relación a la adhesión, es una magnitud de fuerza que se debe aplicar a la CB para desprenderse de la superficie donde fue colocada. En la Tabla 14, podemos observar que la fuerza que se debe aplicar para despegar la CB-NI fue de  $5,802.36 \pm 2.15$  dinas/cm<sup>2</sup>. Este valor es mayor que para la CB formada a partir de NP-BCO y AL. Es decir, la presencia del NI favorece la adhesión de la CB sobre la superficie aplicada. Así mismo, este efecto se observó en el estudio realizado por González-Moreno (2018), donde se evaluó la adhesión de las cubiertas a base de NC cargadas con AE de tomillo. Cabe mencionar que la adhesión es indicativo de la permanencia de la CB sobre los productos hortofrutícolas ya que está determinada por las propiedades intrínsecas del polímero formador de NC y el entorno en el que se coloca. Entre las propiedades intrínsecas se encuentran el peso molecular, la concentración del polímero, la flexibilidad de las cadenas poliméricas y los grupos químicos capaces de formar enlaces electrostáticos o secundarios como los enlaces de hidrógeno y las fuerzas de van der Waals (Ying, *et al.*, 2019).

Otra característica mecánica importante es el porcentaje de elongación (%), el cual indica el cambio porcentual máximo en la longitud de la CB antes de romperse (Rangel-Marron, *et al.*, 2019). La Tabla 14 muestra que la CB-NI puede estirarse o alargarse un  $182.27 \pm 2.14\%$  de su tamaño inicial. Este valor es aproximadamente dos veces mayor que el obtenido para la CB formada por AL o NP-BCO. Este efecto, en el aumento del porcentaje de elongación se atribuye, de igual forma a la presencia del NI en la CB. El efecto de la adición del NI sobre las

propiedades mecánicas de las CB es complejo, sin embargo, una gran cantidad de investigaciones se han enfocado en mejorar las características de estiramiento o elongación de cubiertas. Tal es el caso de la investigación realizada por Liang y cols. (2017) donde desarrollaron CB a base de quitosano y NC cargadas con galato de epigallocatequina. La adición de NC a las CB de quitosano incrementó el porcentaje de elongación con respecto a las CB formadas únicamente con quitosano. Así mismo, estos hallazgos fueron reportados por Noronha y cols. (2014) donde se obtuvieron cubiertas a partir de metilcelulosa con NC cargadas con  $\alpha$ -tocoferol. Se reportaron cambios significativos en el porcentaje de elongación con la incorporación de NC en las CB ( $30.03 \pm 1.94\%$ ) en comparación con la cubierta control ( $13.13 \pm 3.58\%$ ). El aumento en los valores del porcentaje de elongación indicó que la incorporación de NC proporciona mayor flexibilidad en las cubiertas. Esto podría indicar que la adición de NC también modifica las interacciones con agentes formadores de cubierta como AL. Una posible explicación, es que una dispersión homogénea de NC (de carácter hidrofóbico) que está sobre un entramado polimérico como el AL, reduce las interacciones entre las cadenas poliméricas en las NC e induce el desarrollo de discontinuidades estructurales en las cadenas de las CB, lo que aumenta el porcentaje de elongación (Sánchez-González, *et al.*, 2009). Cabe señalar que las propiedades mecánicas de las CB dependerán del tipo de material utilizado en la formulación de la solución (AL) o dispersión (NC) para realizar la cubierta, las condiciones de formación, el tipo de plastificante, la naturaleza del disolvente, la evaporación del disolvente y su espesor. Además las propiedades físicas y mecánicas de la CB, dependerán del uso y la aplicación para el cual fueron elaboradas.

Posteriormente, con el propósito de establecer el perfil de liberación del AE-Lg a partir de la CB-NI, se realizó la cinética de liberación durante 48 h. En la Figura 24, se puede observar el perfil de liberación del componente activo principal, el carvacrol. Cabe resaltar, que los otros dos componentes de seguimiento (mirceno y p-cimeno) no fueron detectados en ningún tiempo de liberación. Se puede observar que después de la primera hora, el % de liberación del carvacrol fue del 10%, y que conforme el tiempo transcurre (24 horas) el porcentaje de liberación del carvacrol aumentó rápidamente a un 77%. Mientras que a las 48 h, la liberación del componente se llevó a cabo de una manera lenta y sostenida, alcanzando un porcentaje de liberación del 80% aproximadamente. Esto coincide con lo reportado por Bustos y cols. (2016) quienes elaboraron CB a base de micropartículas y AE de limón, y observaron que el perfil de liberación en la cubierta tenía el mismo comportamiento que en las micropartículas solas, las cuáles también presentaban un comportamiento de liberación bifásico.

Por otro lado, se llevó a cabo la evaluación de la actividad antibacteriana de las CB por las técnicas de difusión en disco en agar Mueller- Hinton (CMH) contra la bacteria *Pectobacterium carotovorum* ATCC15713. La técnica de difusión en disco es una metodología que ha sido reportada ampliamente en la bibliografía para evaluar la actividad antibacteriana de las CB. Como se observa en la Tabla 15, la CB-NI inhibió el crecimiento de la bacteria *P. carotovorum* y presentó una zona de inhibición de 20 mm. Esto coincide, con lo reportado por diversos autores, en donde se ha demostrado que el AE del género de *Lippia spp.*, posee actividad antibacteriana frente a diversas bacterias Gram negativas. Tal es el caso del trabajo realizado por Marin-Tinoco y cols. (2023), quienes evaluaron la actividad

antibacteriana del AE de *Lippia graveolens* el cuál en su composición presentaba como componente mayoritario el carvacrol, al igual que en el presente trabajo. El AE-Lg exhibió actividad antibacteriana frente a las bacterias *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Lysteria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. Esta actividad antibacteriana, se le atribuyó al carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol), compuesto fenólico monoterpenoide, cuyo mecanismo de acción se basa, en que este componente es capaz de penetrar las membranas celulares bacterianas, lo que resulta en la pérdida de la integridad de la membrana y la posterior liberación de componentes celulares bacterianos. Específicamente, causa la interrupción del gradiente de protones, altera posteriormente la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP), inhibe las bombas de eflujo, produce especies reactivas de oxígeno y suprime dos factores de virulencia esenciales, a saber, la enterotoxina y la coagulasa (Mir, *et al.*, 2019).

#### **4.4 Evaluación de la calidad poscosecha y la vida útil de fresa (*Fragaria ananassa*) y guayaba (*Psidium guajava*) con la aplicación de la cubierta biopolimérica a base de NI.**

Posteriormente, se llevó a cabo la evaluación de la calidad poscosecha y la vida útil de fresa y guayaba. Para esto se evaluó la pérdida de peso y firmeza, así como el contenido de sólidos solubles totales, acidez titulable, pH y el análisis de color.

En cuanto a la determinación del porcentaje de pérdida de peso de la fresa y la guayaba se muestra en la Figura 25A y 25B, respectivamente. Los resultados fueron obtenidos en las frutas recubiertas con la CB-NI, después del tiempo de almacenamiento de 3, 7 y 10 días. Como se puede observar, el porcentaje de pérdida de peso de fresa y de guayaba, fue directamente proporcional al tiempo de almacenamiento con todas las CB. Específicamente en el caso de la fresa, cabe resaltar que después de 10 días, la pérdida de peso en las muestras control (sin CB) fue mucho mayor (22.35%) que en las muestras recubiertas con la CB-NI (7.12%). Estos resultados coinciden con lo reportado por Martínez y cols. (2018), quienes desarrollaron y aplicaron un recubrimiento a base de quitosano con AE de *Thymus capitatus* a fresas. Se observó una menor pérdida de peso en las fresas con el recubrimiento de quitosano-AE que en las fresas sin recubrimiento y en las fresas con recubrimiento de quitosano sin AE. En el caso de la guayaba, el comportamiento fue el mismo, ya que después del tiempo de almacenamiento de 10 días, la pérdida de peso fue mayor (5.23%) en las frutas control (sin CB) que en las fruta recubiertas con AL (4.19%), NP-blanco (3.97%) y las que se encontraban

recubiertas con la CB-NI (1.72%). Esto coincide por lo reportado con Grande-Tovar y cols. (2019) quienes colocaron diferentes recubrimientos comestibles a la guayaba y se observó que las guayabas sin recubrir presentaron una pérdida de peso mayor que las guayabas recubiertas con quitosano y AE de *Ruta graveolens*. En general, se ha mencionado que la pérdida de peso de la fruta está relacionada con la barrera a la pérdida de agua, la cual está ligeramente influenciada por la presencia de AE debido a su carácter hidrofóbico (Martínez, *et al.*, 2018).

Cabe resaltar, que si bien la pérdida de peso de la fruta se atribuye enteramente a la pérdida de agua. Esta pérdida de agua está asociada con varios otros cambios que ocurren en las frutas y pueden actuar como un desencadenante para iniciar estos cambios (Heristika, *et al.*, 2023; Yousuf, *et al.*, 2021). Tanto la fresa como las guayabas, son productos hortofrutícolas que son fácilmente susceptibles a la pérdida de agua, lo que provoca contracción y debilitamiento del tejido del fruto debido a su piel tan fina. Esto tiene efectos negativos en la apariencia del fruto, provoca cambios en la textura (ablandamiento), color y aroma y acelera la senescencia, el desarrollo de patógenos, el arrugamiento y los daños por frío, provocando en consecuencia, importantes pérdidas económicas.

Cabe mencionar que los resultados obtenidos en este trabajo respaldan las ventajas de colocar CB sobre la fresa y guayaba para establecer una barrera polimérica que previene la pérdida de agua en productos hortofrutícolas (Trajkovska-Petkoska, *et al.*, 2021). Además, las CB proporcionan una función barrera que protege al fruto de la atmósfera externa y también limita la transpiración al retrasar la deshidratación para finalmente proporcionar una mejora cualitativa en la pérdida de peso (Shiek, *et al.*, 2022; Agapito-Ocampo, *et al.*, 2021).

Posteriormente se llevó a cabo la evaluación de la firmeza de los productos hortofrutícolas, ya que este representa uno de los parámetros esenciales para determinar la calidad del fruto con cubiertas. La fresa y la guayaba son productos muy perecederos, que están sujetos a daños mecánicos, ataques de patógenos y pérdidas de calidad durante el almacenamiento. La disminución de la firmeza se debe a una importante migración de vapor de agua sobre la superficie del fruto, lo que favorecería el crecimiento de hongos y bacterias. Estos microorganismos causan un daño estructural a los tejidos de las frutas provocando que se ablanden. Además, la disminución de la firmeza está relacionada con el aumento de la pérdida de humedad. Cabe señalar que la disminución de la firmeza también podría estar relacionada con la degradación del parénquima cortical que forma la pared celular del fruto debido a procesos de degradación enzimática y a la pérdida de humedad durante el almacenamiento. Como se puede observar en la Figura 26A y 26B, se presentan los resultados obtenidos para el análisis de la firmeza para fresa y guayaba, respectivamente. En el caso específico de la fresa, la firmeza inicial fue de 3.108 N, mientras que después de diez días de almacenamiento se observó una disminución de este parámetro, tanto en las fresas sin recubrir (1.752 N) como en las recubiertas con AL (2.052 N), NP-blanco (2.267 N) y con el NI (2.779 N). En términos porcentuales, después de 10 días de almacenamiento en frío, la firmeza de las fresas control disminuyó en un 43.64%, mientras que las fresas con el tratamiento con la CB a base de AL y NP-BCO presentaron una pérdida del 37.16 y 32.8% respectivamente. Por otro lado, los valores más altos de firmeza, después de 10 días, se registraron en fresas con CB-NI (2.779 N) lo que representa una disminución del 17.02% en comparación con la firmeza inicial. Los resultados de

este estudio coinciden con los reportados por De-Bruno y cols. (2023), quienes aplicaron una CB enriquecido con AE de bergamota a fresas, y obtuvieron una menor pérdida de firmeza en comparación con el grupo control (fresas sin recubrimiento). Cabe mencionar que, en base a los resultados obtenidos con la CB-NI, esta actuaría como una barrera que modifica el intercambio gaseoso, lo que conduce a una reducción en la tasa de respiración del fruto y por ende evita la pérdida de agua y de firmeza. Además, es posible que la actividad antioxidante de los componentes del AE-Lg, favorezca la disminución de la actividad enzimática en la fruta, lo que resultaría en una maduración más lenta de la fresa y como consecuencia una menor pérdida de la firmeza.

En el caso de la guayaba, se observó la misma tendencia que en la fresa; una mayor pérdida de firmeza en guayabas sin recubrimiento (10.620 N) comparada con las guayabas recubiertas con AL (10.650 N), NP-blanco (11.289 N) y con el NI (12.589 N) en comparación con el valor inicial de 13.425 N. Es decir, al término de 10 días de almacenamiento en frío, la firmeza de las guayabas control disminuyó en un 20.90%, mientras que las guayabas con el tratamiento con la CB a base del NI, AL y NP-BCO presentaron una pérdida del 6.22, 20.86 y 15.91% respectivamente. Esto coincide por lo reportado por Nur y cols. (2023), quienes elaboraron cubiertas de quitosano y AE de canela para su aplicación en guayabas para prolongar su vida útil y observaron una menor pérdida de la firmeza con la aplicación de la cubierta, comparada con la firmeza de la guayaba sin recubrir. En bibliografía, se ha descrito que el ablandamiento de la guayaba se ve afectado por la concentración de etileno (hormona de la maduración presente en frutos climatéricos), ya que puede intensificar la actividad enzimática de los componentes

de la pared celular causando flacidez del tejido. Dado que el nivel de producción de etileno está fuertemente relacionado con la tasa de respiración, disminuir la tasa de respiración es clave para preservar la firmeza de la guayaba recién cortada (Forato, *et al.*, 2015).

Otro parámetro que fue evaluado en los frutos hortofrutícolas, fue la determinación de los sólidos solubles totales (SST), los cuáles se reportan como °Brix. Este valor indica la cantidad de azúcar (sacarosa) presente en la fruta y su importancia radica en que la normativa de algunos productos hortofrutícolas, (incluyendo a la fresa y guayaba cuyos valores reportados son de 7- 10 °Brix y de 8- 12 °Brix a 25 °C, respectivamente) exige que se mantenga un contenido de sólidos de azúcar determinado para su comercialización (Gómez, 2012). Es importante mencionar que, durante el proceso de maduración, la acumulación de azúcar depende de la degradación del almidón, principal compuesto de almacenamiento energético tanto de la fresa, como de la guayaba. Posterior a su cosecha, la degradación del almidón en los productos hortofrutícolas se ve afectada por factores exógenos, llegando hasta la completa descomposición del polisacárido, lo que influye en la calidad nutricional de los frutos (Albornoz, *et al.*, 2019). Como se puede observar en la Figura 27A y 27B, se muestran los resultados obtenidos en la determinación de los SST en fresa y guayaba, respectivamente. En el caso específico de la fresa, se puede observar que los frutos después de 10 días de almacenamiento que presentaban la menor cantidad de SST, fueron aquellos recubiertos con el NI (valor de 9.643 °Brix) comparados con el control (11.703 °Brix) y los recubiertos con AL (10.853 °Brix) y NP-blanco (10.120 °Brix). Lo cual indica, que el proceso de maduración de la fresa fue más lento con la CB-NI, prolongando

así su calidad nutricional por más tiempo. Este efecto observado, es el deseado ya que lo que se pretende, es que la CB sea capaz de disminuir el metabolismo de las fresas y por ende, reducir la síntesis de los SST, ya que durante la maduración, el contenido de almidón decrece y el de los SST aumenta. Estos mismos resultados, fueron reportados por Petriccione y cols. (2015) quienes aplicaron a fresas recubrimientos de quitosano y observaron una menor cantidad de SST comparada con las fresas sin recubrir. También, Shirzad y cols. (2021), elaboraron cubiertas con AE de *Aloysia citrodora*, y observaron que su aplicación en fresas, favorecía la disminución de la cantidad de SST, comparadas con las fresas no tratadas.

En el caso particular de la guayaba, se observó también que los frutos recubiertos con el NI presentaban una menor cantidad de SST (valor de 10.753 °Brix), comparadas con las control (12.350 °Brix), las recubiertas con AL (11.413 °Brix) y con NP-blanco (11.306 °Brix). Esto coincide con lo reportado por Nur y cols. (2023) quienes aplicaron un recubrimiento de quitosano con AE de canela a guayabas, y observaron que estos frutos recubiertos, presentaban una menor cantidad de SST. Esto podría deberse a que la incorporación de AE en las cubiertas puede potencializar la resistencia de la cubierta a la difusión de gases debido a la naturaleza lipofílica de los AE (Sánchez-González, *et al.*, 2011). Por lo tanto, la presencia del AE-Lg en la CB, podría ralentizar eficazmente la maduración, y por ende una menor síntesis de SST.

Otro parámetro, que está muy relacionado con los SST, es el porcentaje de acidez titulable (%AT). Cabe resaltar, que la acidez de un fruto representa el contenido de ácidos en él y en la mayoría de los productos hortofrutícolas disminuye durante el proceso de maduración. El %AT fue expresado en g del ácido

mayoritario, el cual para la fresa y la guayaba es el ácido cítrico. En la Figura 28A se muestran los resultados obtenidos en la medición del %AT en fresas. Como se puede observar, en el día 0 los frutos presentaron un %AT de 1.036%. Una vez transcurrido el tiempo de almacenamiento de 10 días a 4 °C, las fresas recubiertas con el NI, presentaron un mayor %AT (0.926%), comparados con las fresas sin recubrimiento (0.683%), con recubrimiento de AL (0.746%) y de NP-blanco (0.880%). Esto coincide con lo reportado por Petriccione y cols. (2015) quienes elaboraron cubiertas de quitosano y se demostró que las fresas con las cubiertas presentaban un valor mayor de %AT comparadas con las fresas sin recubrir. Así mismo, estudios previos han sugerido que la mayor pérdida de acidez en frutas sin recubrimiento se debe a que los ácidos orgánicos son utilizados como sustratos en el metabolismo respiratorio durante el almacenamiento del fruto. Es por esto, que la aplicación de la CB-NI tendría un papel importante en retrasar la maduración de las fresas durante su almacenamiento al disminuir la pérdida de acidez.

En la Figura 28B, se puede observar los resultados obtenidos en la determinación del %AT en guayabas y coinciden con los observados en la fresa. La guayaba presentó un valor %AT inicial de 0.956%. Después de 10 días, las guayabas control presentaban un valor menor de %AT (0.643%) comparadas con las guayabas recubiertas con AL (0.750%), con NP-blanco (0.776%) y con el NI (0.85%). Esto coincide con lo reportado por Nur y cols. (2023) quienes aplicaron a guayabas una cubierta de quitosano y AE de canela, y establecieron que su aplicación mantenía durante más tiempo el %AT. Esto mismo, coincide con lo reportado por Sharma y Singh (2021) quienes elaboraron cubiertas a base de proteína de linaza para su aplicación en guayabas recién cortadas. En este estudio, se determinó que la

presencia de la cubierta en el fruto mantenía el %AT por más días con respecto a las guayabas sin cubiertas.

Así mismo, otro parámetro que está directamente relacionado con el %AT es la determinación del pH, el cual constituye, en un vegetal, una medida de los protones cedidos al agua por parte de las especies con actividad ácida en el fruto. Este parámetro está determinado por la fuerza de los ácidos presentes en el fruto y su valor depende más del tipo de ácido que de la concentración (Hernández, 2013). En la Figura 29A, se observan los resultados obtenidos durante la medición del pH en las fresas, en donde se muestra que el pH inicial fue de 3.843 y después del tiempo de almacenamiento de 10 días a 4 °C, aumento a 4.11. A diferencia de las fresas recubiertas con el NI que el aumento del pH fue ligeramente menor (3.97), comparados con las fresas sin recubrir (4.11), con las recubiertas con AL (4.08) y con NP-blanco (4.01). Esto coincide con los resultados obtenidos anteriormente, en la determinación del %AT, ya que entre mayor sea el %AT, menor será el valor de pH del fruto. Así mismo, estos resultados coinciden con lo reportado por Chiabrando y cols. (2018) quienes aplicaron cubiertas con un envasado activo a fresas y encontraron que estas mantenían el nivel de pH inicial por más tiempo, comparadas con las no recubiertas.

En el caso específico de las guayabas, en la Figura 29B se observa que el valor inicial de pH era de 4.33 y transcurridos los 10 días de almacenamiento a 4 °C, aumento a 4.57. A diferencia de las guayabas recubiertas con el NI que se mantuvo casi con el mismo valor inicial de pH (4.36), comparados con las guayabas sin recubrir (4.57), con las recubiertas con AL (4.45) y con NP-blanco (4.40). Estos resultados coinciden por Grande-Tovar y cols. (2019), quienes aplicaron cubiertas

de quitosano con AE de *Ruta graveolens* a guayabas, y se estableció que su aplicación mantenía el pH de las guayabas por un tiempo más prolongado comparado con las guayabas sin recubrir. Es bien sabido que un aumento en el pH se traduce como una reducción en la acidez, la cual está relacionada con la maduración del fruto, durante el cual la degradación del almidón provoca la acumulación de azúcar, y al mismo tiempo, los ácidos orgánicos disminuyen al ser utilizados como sustratos en la respiración del fruto (Beauvoit, *et al.*, 2018).

Posteriormente, se realizó un análisis del cambio de color, cuyo parámetro es el cambio más notorio que experimentan los productos hortofrutícolas durante la maduración (Gómez, 2012). En la industria alimentaria, para medir el cambio de color de los productos hortofrutícolas, se han establecido coordenadas expresadas en valores numéricos, que permiten correlacionar el color con la madurez. La Commission Internationale de l'Eclairage (CIE), ha definido espacios de color,  $L^*a^*b^*$ , para comunicar y expresar el color objetivamente. El espacio de color  $L^*a^*b^*$ , también referido como CIELAB, es una teoría de color oponente que establece que dos colores no pueden ser rojo y verde al mismo tiempo, o amarillo y azul al mismo tiempo.  $L^*$  indica la luminosidad y  $a^*$  y  $b^*$  son las coordenadas cromáticas ( $+a^*$  indica rojo,  $-a^*$  indica verde,  $+b^*$  indica amarillo y  $-b^*$  indica azul). En la Figura 30A se muestran los resultados obtenidos en la determinación de cambio de color de la fresa. Se puede observar que las fresas recubiertas con el NI, después de 10 días de almacenamiento a 4 °C, presentaban un menor cambio de color (7.66) comparadas con las fresas sin recubrir (17.48), con las recubiertas con AL (14.42) y con NP-blanco (12.61). Esto coincide por Petriccione y cols.

(2015), quienes aplicaron recubrimientos de quitosano a fresas, y encontraron que estas cubiertas mantenían por un tiempo más prolongado el color de las fresas, comparadas con las fresas sin recubrimiento. En cuanto a la Figura 30B se muestran los resultados en el cambio de color de las guayabas y se observa un comportamiento similar, después del tiempo de almacenamiento de 10 días a 4 °C. También, las guayabas recubiertas con el NI presentaban un menor cambio de color (9.52), comparadas con las guayabas sin recubrir (19.20), con las recubiertas con AL (16.87) y con NP-blanco (14.58). Esto coincide por reportado por Grande-Tovar y cols. (2019), quienes aplicaron cubiertas de quitosano con AE de *Ruta graveolens* a guayabas, y se estableció que su aplicación mantenía el color de las guayabas por un tiempo más prolongado, comparado con las guayabas sin recubrir.

Para validar la funcionalidad de la CB-NI, se aplicó en fresas y guayabas y se llevó a cabo un control del daño microbiológico visual. El crecimiento fúngico en la superficie de la fresa comenzó a observarse rápidamente en las muestras control, posterior a los 7 días de almacenamiento a 4°C. Después de 15 días, las fresas presentaban daños microbiológicos considerables (Figura 31A). Cabe mencionar que, tanto las fresas como las guayabas recubiertas con AL (Figura 31B) y con NP-BCO (Figura 31C) también mostraron daño microbiológico y una disminución de la calidad física del fruto después del tiempo de almacenamiento. Por otro lado, las fresas y guayabas recubiertas con la CB-NI no presentaron daño microbiológico (Figura 31D). Es decir la CB-NI fue la más eficiente para reducir la descomposición fúngica y bacteriana con actividad antimicrobiana eficaz la cual reduce el deterioro de las fresas y guayabas en refrigeración. Con lo anterior, se puso en evidencia la

función de la CB-NI de actuar como barrera entre el fruto y el medio ambiente, lo que frenaría el crecimiento microbiano externo al menos por 15 días para la fresa y 25 días para la guayaba. Cabe resaltar que la vida de anaquel reportada es de 7 a 10 días para la fresa y de 15 días para la guayaba, por lo que se cumplió con el objetivo de aumentar la vida de anaquel de estos productos hortofrutícolas.

Una vez validada la funcionalidad de la CB-NI, se evaluó el perfil de liberación del AE-*Lg* en la CB-NI sobre fresa y guayaba. Cabe mencionar que, de los tres compuestos de seguimiento, únicamente el carvacrol fue detectado por el método analítico validado. En la Figura 32, se presenta el perfil de liberación y se observa que si bien la CB-NI en los frutos presenta el mismo perfil de liberación que el NI y la CB-NI, el porcentaje de carvacrol liberado presentó una disminución significativa. Después de 48 horas, se obtuvo un porcentaje liberación del carvacrol de solo el 35% cuando recubría la fresa y del 30% en la guayaba. Esta diferencia podría deberse a la volatilidad del carvacrol o también a la posible difusión del carvacrol hacia el parénquima de los frutos. Tampucci y cols. (2021), elaboraron CB de quitosano con tirosol para aplicarlos en tomates y establecieron que después de 1 h, se detectó 0.22 mg de tirosol en el tomate. Cabe resaltar que, aunque se ha investigado ampliamente la aplicación de cubiertas activas enriquecidas con moléculas antimicrobianas y antioxidantes para la conservación de los alimentos, la mayoría de los estudios no mencionan la posible liberación y permanencia del activo sobre el fruto.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES

- La técnica de nanoprecipitación permitió obtener un Nanoingrediente (NI) a base de nanocápsulas con aceite esencial de *Lippia graveolens* homogéneo, estable y con una eficiencia de encapsulación mayor al 50%.
- Se obtuvieron cubiertas biopoliméricas (CB) transparentes y flexibles por la técnica de *casting* con excelentes propiedades físicas al disminuir la permeación al vapor de agua, aumentar la resistencia al rompimiento, la adhesión y presentar actividad antibacteriana.
- El NI con aceite esencial de *Lippia graveolens* 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-*Lg* presentes.
- La CB-NI aplicada en fresa y guayaba aumentó la calidad poscosecha y la vida útil por 15 y 25 días respectivamente al presentar menor porcentaje de pérdida de peso y firmeza, mayor %AT y menor cantidad de SST y cambio de color mostrando así su funcionalidad como CB a base de un NI.

## **CAPITULO VI**

### **PERSPECTIVAS**

- 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.
- Evaluar la actividad antifúngica de la CB-NI frente a diversos hongos fitopatógenos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abreu FO, Oliveira EF, Paula HC, de-Paula RC. Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. *Carbohydrate Polymers*, 2012; 1; 89(4): 1277-82.
- Adams, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry; *Allured Publishing Corporation: Carol Stream, IL, USA, 2007; pp. 1–804.*
- Adaskaveg JA, Blanco-Ulate B. Targeting ripening regulators to develop fruit with high quality and extended shelf life. *Current Opinion Biotechnology*, 2023; 79: 102872.
- Agapito-Ocampo AR, Amaro-Guadarrama B, Díaz-Godínez G, Acosta-Urdapilleta MDL, Aguilar-Marcelino L, García-Hernández E, Téllez-Téllez M. Edible coatings for strawberry based on extracellular compounds of *Humphreya coffeata*. *Bioresources*, 2021; 16, 5556–5573.
- Ahmed FA, Arif M y Alvarez AM. Antibacterial effect of potassium tetraborate tetrahydrate against soft rot disease agent *Pectobacterium carotovorum* in Tomato. *Frontiers in Microbiology*, 2017; 8: 1728.
- Albornoz K, Cantwell M, Zhang L, Beckles D. Integrative analysis of postharvest chilling injury in cherry tomato fruit reveals contrapuntal spatio-temporal responses to ripening and cold stress. *Journal Scientific Reports*, 2019; 9(1): 2795.

- Al-Harrasi A, Bhatia S, Al-Azri MS, Ullah S, Najmi A, Albratty M, Meraya AM, Mohan S, Aldawsari MF. Effect of drying temperature on physical, chemical, and antioxidant properties of ginger oil loaded gelatin-sodium alginate edible films. *Membranes*, 2022; 6, 862.
- Alshallash KS, Sharaf M, Abdel-Aziz HF, Arif M, Hamdy AE, Khalifa SM, Hassan MF, Abou Ghazala MM, Bondok A, Ibrahim MTS, Alharbi K, Elkelish A. Postharvest physiology and biochemistry of Valencia orange after coatings with chitosan nanoparticles as edible for green mold protection under room storage conditions. *Frontiers in Plant Science*, 2022; 17;13: 1034535.
- Amiri A, Ramezani A, Mortazavi SMH, Hosseini SMH, Yahia E. Shelf-life extension of pomegranate arils using chitosan nanoparticles loaded with *Satureja hortensis* essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2021; 101(9): 3778-3786.
- 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*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 2017; (2).
- Arnon-Rips H, Poverenov E. Improving food products' quality and storability by using layer by layer edible coatings. *Trends in Food Science & Technology*, 2018; S0924224416301753
- 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.
- Beauvoit B, Belouah I, Bertin N, Cakpo CB, Colombié S, Dai Z, Gautier H, Génard M, Moing A, Roch L. Putting primary metabolism into perspective to obtain better fruits. *Annals of Botany*, 2018; 122: 1–21.
- Bhatia S, Al-Harrasi A, Shah YA, Jawad M, Al-Azri MS, Ullah S, Anwer MK, Aldawsari MF, Koca E, Aydemir LY. Physicochemical characterization and antioxidant properties of chitosan and sodium alginate based films incorporated with ficus extract. *Polymers (Basel)*; 2023, 28; 15(5): 1215.
- Boeckx J, Pols S, Hertog MLATM, Nicolai BM. Regulation of the central carbon metabolism in apple fruit exposed to postharvest low-oxygen stress. *Frontiers in Plant Science*, 2019; 30;10: 1384.
- Bouzayen M, Latché A, Nath P, Pech JC. Mechanism of fruit ripening. In: plant developmental biology-biotechnological perspectives. Pua, E. C. y Davey, M. R. (Eds.). Springer-Verlag. 2010; Berlin, Germany. Vol. 1. 319-339.
- Bovone G, Cousin L, Steiner F, Tibbitt MW. Solvent controls nanoparticle size during nanoprecipitation by limiting block copolymer assembly. *Macromolecules*, 2022; 27; 55(18): 8040-8048.
- Bustos CRO, Alberti RFV, Matiacevich SB. Edible antimicrobial films based on microencapsulated lemongrass oil. *Journal of Food Science and Technology*, 2016; 53(1): 832-9.

- Cai C, Ma R, Duan M, Deng Y, Liu T, Lu D. Effect of starch film containing thyme essential oil microcapsules on physicochemical activity of mango. *LWT*, 2020; 10970
- Cai M, Wang Y, Wang R, Li M, Zhang W, Yu J, Hua R. Antibacterial and antibiofilm activities of chitosan nanoparticles loaded with *Ocimum basilicum* L. essential oil. *International Journal Biological Macromolecules*, 2022; 31; 202: 122-129.
- Capatina L, Napoli EM, Ruberto G, Hritcu L. Lippia spp. hirtum (*Lamiaceae*) Essential oil prevents behavioral and oxidative stress changes in the scopolamine zebrafish model. *Molecules*, 2022; 23; 26(23): 7085.
- Cauchetier E, Deniau M, Fessi H, Astier A, Paul M. Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature of the polymer on their in vitro characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, 2003; 250, 273–281.
- Cazón P, Gonzalo-Velazquez JA, Ramírez MV. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. *Food Hydrocolloids*, 2017; 136-148.
- Chakravartula SSN, Soccio M, Lotti N, Balestra F, Dalla Rosa M, Siracusa V. Characterization of composite edible films based on pectin/alginate/whey protein concentrate. *Materials (Basel)*. 2019; 1;12(15): 2454.
- Charkowski AO. The changing face of bacterial soft-rot diseases. *The American Phytopathological Society*, 2018; 56:269–288.

- Chen H, Alee M, Chen Y, Zhou Y, Yang M, Ali A, Liu H, Chen L, Yu L. Developing edible starch film used for packaging seasonings in instant noodles. *Foods*, 2021; 14; 10(12): 3105.
- Chiabrando V, Garavaglia L, Giacalone G. The postharvest quality of fresh sweet cherries and strawberries with an active packaging system. *Foods*, 2019; 9 ;8(8): 335.
- Clogston J, Patri A. Zeta potential measurement in characterization of nanoparticles. *Drug Delivery*, 2011; 63-70.
- CLSI. Performance standars for antimicrobial susceptibility testing. CLSI, document M44-A2, 2010.
- Cofelice M, Lopez F, Cuomo F. Quality control of fresh-cut apples after coating application. *Foods*, 2019; 1; 8(6): 189.
- 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.
- Cruz L, Soares LU, Dalla T, Mezzalira G, Nadya P, Guterres S, Pohlmann A. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutics*, 2006; 313, 198–205.
- 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.
- Dehghani S, Hosseini SV, Regenstein JM. Edible films and coatings in seafood preservation: A review. *Food chemistry*, 2018, 240, 505–513.

- Díaz-de-Cerio E, Verardo V, Gómez-Caravaca AM, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A. Health effects of *Psidium guajava* L. leaves: an overview of the last decade. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017; 24; 18(4): 897.
- Dilworth L, Riley CK, Stennett D. Plant constituents: carbohydrates, oils, resins, balsams, and plant hormones. In *Pharmacognosy Fundamentals, Applications and Strategie*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2017; pp. 61–80.
- Dos-Santos RS, Arge L, Costa S, Costa-de-Oliveira. Genetic regulation and the impact of omics in fruit ripening. *Plant Omics*, 2015; 8(2): 78-88.
- 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.
- Dupuis R, Valdenaire PL, Pellenq RJ, Ioannidou K. How chemical defects influence the charging of nanoporous carbon supercapacitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022; 26; 119(17): 119.
- Elsebai MF, Albalawi MA. Essential oils and COVID-19. *Molecules*, 2022; 15; 27(22): 7893.
- Enayatifard R, Akbari J, Babaei A, Rostamkalaei SS, Hashemi SMH, Habibi E. Anti-Microbial potential of nano-emulsion form of essential oil obtained

from aerial parts of *Lippia* spp. as food additive. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2021; 11(2): 327-334.

- Enujiugha VN, Oyinloye AM. Protein-lipid interactions and the formation of edible films and coatings. *Encyclopedia of Food Chemistry*, 2019; 2, 478 – 482.
- Erginkaya Z, Kalkan S, Unal E. Use of antimicrobial edible films and coatings as packaging materials for food safety. Food processing: strategies for quality assessment. *Food Engineering Series*, 2014, New York.
- Evonik Industries. (2015). Eudragit® L100-55, 1–6.
- Fabi JP, do Prado SBR. Fast and furious: ethylene-triggered changes in the metabolism of papaya fruit during ripening. *Frontiers in Plant Science*, 2019; 26; 10: 535.
- Fakhouri FM, Martelli SM, Caon T, Velasco JI, Mei LHI. Edible films and coatings based on starch/gelatin: Film properties and effect of coatings on quality of refrigerated Red Crimson grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 2015; (109): 57–64.
- Fan X, Zhang B, Zhang X, Ma Z, Feng X. Incorporating *Portulaca oleracea* extract endows the chitosan-starch film with antioxidant capacity for chilled meat preservation. *Food Chemistry*, 2023 ; 27; 18: 100662.
- FAO. 2016. 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. 2019. El estado de la alimentación y la agricultura. Avanzar en la reducción de la pérdida y el desperdicio de alimentos.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 10th ed.; Secretaría de Salud: Mexico City, Mexico, 2011.
- FDA, Guidance for Industry: Use of Recycled Plastics in Food Packaging (Chemistry Considerations) 2019.
- Fernández M, Echeverría D, Mosquera S, Paz S. Estado actual del uso de recubrimientos comestibles en frutas y hortalizas. *Revista Biotecnología Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 2017; 15 (2): 154–147.
- 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.
- Forato LA, Britto DD, Rizzo JSD, Gastaldi TA, Assis OBG. Effect of cashew gum-carboxymethylcellulose edible coatings in extending the shelf-life of fresh and cut guavas. *Food Packaging and Shelf Life*, 2015; 5: 68–74.
- Froiio F, Ginot L, 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.

- 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.
- Galus S, Kadzińska J. Food applications of emulsion-based edible films and coatings. *Trends in Food Science & Technology*, 2015; S0924224415001788.
- Gao Y, Xu J, Liu G, Nie R, Duan J, Xu D, Wang C. Preparation and characterization of water-insoluble gardenia blue pigment. *Materials* (Basel). 2021; 2; 14(21): 6594.
- Gautam S, Lapcik L, Lapcikova B, Repka D, Szyk-Warszyńska L. Physicochemical characterization of polysaccharide films with embedded bioactive substances. *Foods*, 2023; 12; 12(24): 4454.
- 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 M. Calidad de fruto en 12 poblaciones silvestres de jitomate *Solanum lycopersicum* L var. cerasiforme (Dunal) del occidente de México. México: Universidad de Guadalajara. Tesis de Licenciatura, 2012.

- 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, B.J. Cubierta biopolimérica de nanoingredientes a base de *Thymus vulgaris* con potencial aplicación en productos hortofrutícolas. México: Universidad Autónoma de Nuevo León. Tesis de maestría: 2020.
- González-Sandoval DC, Luna-Sosa B, Martínez-Ávila GCG, Rodríguez-Fuentes H, Avendaño-Abarca VH, Rojas R. Formulation and characterization of edible films based on organic mucilage from mexican opuntia ficus-indica. *Coatings*, 2019; 9(8), 506.
- Grande-Tovar CD, Delgado-Ospina J, Navia-Porras DP, Peralta-Ruiz Y, Cordero AP, Castro JI, Chaur-Valencia MN, Mina JH, Chaves-López C. *Colletotrichum gloesporioides* inhibition in situ by chitosan-ruta graveolens essential oil coatings: effect on microbiological, physicochemical, and organoleptic properties of guava (*Psidium guajava* L.) during room temperature storage. *Biomolecules*, 2019; 22; 9(9): 399.
- 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.
- Hajji H, Gliguem S, Bellagha K. Impact of initial moisture content levels, freezing rate and instant controlled pressure drop treatment (DIC) on dehydrofreezing process and quality attributes of quince fruits. *Drying Technology*, 2018; 37,1028–1043.
- Hamzah H, Osman A, Tan CP, Mohamad Ghazali F. Carrageenan as an alternative coating for papaya (*Carica papaya* L. cv. Eksotika) *Postharvest Biology and Technology*, 2018; 75: 142–146.
- Hasheminya SM, Mokarram RR, Ghanbarzadeh B, Hamishekar H, Kafil HS. Physicochemical, mechanical, optical, microstructural and antimicrobial properties of novel kefiran-carboxymethyl cellulose biocomposite films as influenced by copper oxide nanoparticles (CuONPs). *Food Packaging and Shelf Life*. 2018; 17: 196–204.
- Hassan-Barzegar H, Alizadeh Behbahani B, Mehrnia MA. Quality retention and shelf life extension of fresh beef using *Lepidium sativum* seed mucilage-based edible coating containing *Heracleum lasiopetalum* essential oil: an experimental and modeling study. *Food Science and Biotechnology*, 2018; 23; 29(5): 717-728.
- Heristika W, Ningrum A, Supriyadi, Munawaroh HSH, Show PL. Development of composite edible coating from gelatin-pectin incorporated

garlic essential oil on physicochemical characteristics of red chili (*Capsicum annum* L.). *Gels*, 2023; 6; 9(1): 49.

- Hermenegildo PDS, Santos SA, Guimarães LMS, Pereira IC, Vidigal PMP, Badel JL, Alfenas-Zerbini P, Mafia RG, Ferreira MASV, Alfenas AC. Draft genome sequence of *Erwinia psidii*, causal agent of bacterial blight of guava (*Psidium guava*) and dieback of eucalypt (*Eucalyptus* spp.). *Microbiology Resource Announcements*, 2019; 31;8 (5): e01598-18.
- Hernández, J. Caracterización físicoquímica y microbiológica del tomate margariteño (*Lycopersicon esculentum* var. España) y evaluación de la efectividad de tratamientos de pre-ensado para el incremento de su vida comercial a temperatura ambiente. España: Universidad de Córdoba. Tesis de Doctorado, 2013.
- Hernández-Hernández E, Regalado-González C, Vázquez-Landaverde P, Guerrero-Legarreta I, García-Almendárez BE. Microencapsulation, chemical characterization, and antimicrobial activity of mexican *Lippia graveolens* and european *Origanum vulgare* L. Oregano Essential Oils. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–12.
- 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; 11; 9(12): 863.

- Hou H, Zhang X, Zhao T, Zhou L. Effects of *Lippia* spp. essential oil and its two main components, carvacrol and thymol, on the plant pathogen *Botrytis cinerea*. *PeerJ Hubs*, 2020; 14; 8: 9626.
- Huang W, Hu N, Xiao Z, Qiu Y, Yang Y, Yang J, Mao X, Wang Y, Li Z, Guo H. A molecular framework of ethylene-mediated fruit growth and ripening processes in tomato. *Plant Cell*, 2022; 25; 34(9): 3280-3300.
- Irache J. Micro y nanoencapsulación de aditivos y otros compuestos de interés alimentario. 1er Congreso Nacional de Agroalimentación. España: Universidad de Navarra. 2011.
- IUPAC. Validation of Quantitative and Semi-Quantitative Methods by Collaborative Trial. *Chem. Int.* 2006, 29.
- 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.
- Jeevahan J, Chandrasekaran M, Venkatesan SP, Sriram V, Britto-Joseph G, Mageshwaran G, Durairaj RB. Scaling up difficulties and commercial aspects of edible films for food packaging: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 2020; 100, 210–222.
- 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.
- Kaewprachu P, Osako K, Benjakul S, Rawdkuen S. Quality attributes of

minced pork wrapped with catechin–lysozyme incorporated gelatin film. *Food Packaging and Shelf Life*, 2015; 3, 88–96.

- Kamal MRM, Ali MR, Hossain A, and Shishir MRI. Optimization of microwave-assisted extraction of pectin from *Dillenia indica* fruit and its preliminary characterization. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2020; 44 (6).
- Kamal MRM, Rahman ARA, Anuar NFB. Effect of coating thickness on the microstructure and mechanical properties of AL-SI (LM6) alloy lost wax casting. *Journal of Mechanical Engineering*, 2017; 3(1), 97–106.
- Kraśniewska K, Ścibisz I, Gniewosz M, Mitek M, Pobiega K, Cendrowski A. Effect of pullulan coating on postharvest quality and shelf-life of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Materials (Basel)*. 2017; 18; 10(8): 965.
- Kwak H, Sungchul S, Jaehwan K, Joonggon K, Donghan L, Hwarueon L, Jin L, Jinho H. Protective coating of strawberries with cellulose nanofibers. *Carbohydrate Polymers*, 2021; 258, 117688.
- 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.
- Leyva-López N, Gutiérrez-Grijalva EP, Vázquez-Olivo G, Heredia JB. Essential oils of oregano: biological activity beyond their antimicrobial properties. *Molecules*, 2017; 14; 22(6): 989.
- Lezama-León E, Lezama-León MH, Solis-Galindo AE, Figueroa-Urrea H.

Análisis de la logística inversa de productos perecederos en México. Boletín Científico INVESTIGIUM de la Escuela Superior de Tizayuca, 2021; 6(12): 1-7.

- Li Y, Yao M, Liang C, Zhao H, Liu Y, Zong Y. Hemicellulose and nano/microfibrils improving the pliability and hydrophobic properties of cellulose film by interstitial filling and forming micro/nanostructure. *Polymers (Basel)*, 2022; 23; 14(7): 1297.
- Liang J, Yan H, Wang X, Zhou Y, Gao X, Puligundla P, Wan X. Encapsulation of epigallocatechin gallate in zein/chitosan nanoparticles for controlled applications in food systems. *Food Chemistry*, 2017; 231: 19–24.
- Liu C, Ding J, Huang P, Li H, Liu Y, Zhang Y, Hu X, Deng S, Liu Y, Qin W. Use of heat-shock and edible coating to improve the postharvest preservation of blueberries. *Foods*, 2023; 13; 12(4): 789.
- Liu R, Liu D, Liu Y, Song Y, Wu T, Zhang M. Using soy protein SiO<sub>x</sub> nanocomposite film coating to extend the shelf life of apple fruit. *The Journal of Food Science and Technology*. 2017; 52: 2018–2030.
- 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.
- Ma Y, Chen S, Liu P, He Y, Chen F, Cai Y, Yang X. Gelatin improves the performance of oregano essential oil nanoparticle composite films-application to the preservation of mullet. *Foods*, 2023; 29; 12(13): 2542.

- Manjunatha G, Gupta KJ, Lokesh V, Mur LA, Neelwarne B. Nitric oxide counters ethylene effects on ripening fruits. *Plant Signaling Behavior*, 2012; 7(4): 476-83.
- Marin-Tinoco RI, Ortega-Ramírez AT, Esteban-Mendez M, Silva-Marrufo O, Barragan-Ledesma LE, Valenzuela-Núñez LM, Briceño-Contreras EA, Sariñana-Navarrete MA, Camacho-Luis A, Navarrete-Molina C. Antioxidant and antibacterial activity of mexican oregano essential oil, extracted from plants occurring naturally in semiarid areas and cultivated in the field and greenhouse in northern mexico. *Molecules*, 2023; 9; 28(18): 6547.
- Martínez K, Ortiz M, Albis A, Gilma 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; 21; 8(4): 155.
- Mellinas AC, Valdés A, Ramos M, Burgos N, Garrigós MC, Jiménez A. Active edible films: current state and future trends. *Journal of Applied Polymer Science*, 2016; 133: 42631.
- Menezes J, Athmaselv KA. Food Packaging and Preservation || *Report on Edible Films and Coatings*, 2018; 177–212.
- Meng-Jiang M, Song Y, Kanwar MK, Ahammed GJ, Shao S, Zhou J. Phytonanotechnology applications in modern agriculture. *Journal of Nanobiotechnology*, 2021; 20; 19(1): 430.
- Miao Q, Kong W, Zhao X, Yang S, Yang M. GC-FID coupled with chemometrics for quantitative and chemical fingerprinting analysis of *Alpinia*

*oxyphylla* oil. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2015; 102, 436–442.

- Miladi K, Sfar S, Fessi H, Elaissari A. Nanoprecipitation process: from particle preparation to in vivo applications. *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines*, 2016; 17–53.
- Mir M, Ahmed N, Permana AD, Rodgers AM, Donnelly RF, Rehman AU. Enhancement in site-specific delivery of carvacrol against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* induced skin infections using enzyme responsive nanoparticles: a proof of concept study. *Pharmaceutics*, 2019; 13; 11(11): 606.
- Mirmajlessi-Mayhar S, Destefanis M, Gottsberger RA, Mänd M, Loit E. PCR-based specific techniques used for detecting the most important pathogens on strawberry: a systematic review. *Systematic Reviews*, 2015; 4(1):9.
- 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.
- Monteiro MLG. Combined effect of high hydrostatic pressure and ultraviolet radiation on quality parameters of refrigerated vacuum-packed tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets. *Scientific Reports*, 2018; 8, 9524.
- 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 of Food Science and Technology*, 2015; 52: 7795–7805.
- Muley AB, Ladole MR, Suprasanna P, Dalvi SG. Intensification in biological properties of chitosan after  $\gamma$ -irradiation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019; 131, 435–444 .
- 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.
- Nor S, Ding P. Trends and advances in edible biopolymer coating for tropical fruit: A review. *Food Research International*, 2020; 134, 109208.
- Norma ASTM E-96-95; Standard Test Method for Water Vapor Transmission of Materials. ASTM International: West, Conshohocken, PA, USA, 1995.

- Norma Oficial Mexicana. 1978. NMX-F-102-S-1978. Determinación de la acidez titulable en productos elaborados a partir de frutas y hortalizas.
- Norma Oficial Mexicana. 1978. NMX-F-317-S-1978. Determinación de pH en alimentos.
- Norma Oficial Mexicana. 1982. NMX-FF-015-1982. Productos alimenticios no industrializados, para uso humano. Fruta fresca. Determinación de sólidos solubles totales.
- Noronha CM, de-Carvalho SM, Lino RC, Barreto PLM. Characterization of antioxidant methylcellulose film incorporated with  $\alpha$ -tocopherol nanocapsules. *Food Chemistry*, 2014; 159, 529–535.
- Nur-Hanani ZA, Soo KL, Zunairah WIW, Radhiah S. Prolonging the shelf life of fresh-cut guava (*Psidium guajava* L.) by coating with chitosan and cinnamon essential oil. *Heliyon*, 2023; 22; 9(12): e22419.
- 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.
- Omboki RB, Wu W, Xie X, Mamadou G. Ripening genetics of the tomato fruit. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 2015; 8(4): 567- 572.
- 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.

- Palumbo M, Attolico G, Capozzi V, Cozzolino R, Corvino A, de-Chiara MLV, Pace B, Pelosi S, Ricci I, Romaniello R, Cefola M. Emerging postharvest technologies to enhance the shelf-life of fruit and vegetables: an overview. *Foods*, 2022; 5;11(23): 3925.
- Panahirad S, Naghshiband-Hassani R, Mahna N. Pectin-based edible coating preserves antioxidative capacity of plum fruit during shelf life. *Food science and technology international*, 2020; 26(7), 583–592.
- Parreidt T, Lindner M, Rothkopf I, Schmid M, Müller K. The development of a uniform alginate-based coating for cantaloupe and strawberries and the characterization of water barrier properties. *Foods*, 2019; 11; 8(6): 203.
- Pawliszyn J, Grote C. Solid-phase microextraction for the analysis of human breath. *Analytical chemistry*, 1997; 69(4), 587–596.
- Pereira FM, Usman M, Mayer NA, Nachtigal JC, Maphanga ORM, Willemse S. Advances in guava propagation. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 2017; 39,4, 358.
- Pérez-Vazquez A, Barciela P, Carpena M, Prieto MA. Edible coatings as a natural packaging system to improve fruit and vegetable shelf life and quality. *Foods*, 2023; 26; 12(19): 3570.
- Petriccione M, Mastrobuoni F, Pasquariello MS, Zampella L, Nobis E, Capriolo G, Scortichini M. Effect of chitosan coating on the postharvest quality and antioxidant enzyme system response of strawberry fruit during cold storage. *Foods*, 2015; 29; 4(4): 501-523.

- Pinto N, Rodrigues THS, Pereira R, Silva LMA, Cáceres CA, Azeredo HMC, De-Canuto KM. Production and physico-chemical characterization of nanocapsules of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Industrial Crops and Products*, 2016; 86, 279–288.
- 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.
- Piña-Barrera AM. Desarrollo de nanoingredientes funcionales a base de productos naturales para preservar productos hortofrutícolas. Tesis de doctorado: Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey Nuevo León, Mexico, 2019.
- 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.
- Pratap Singh D, Packirisamy G. Biopolymer based edible coating for enhancing the shelf life of horticulture products. *Food Chemistry*, 2022; 7; 4: 100085.
- Promyou S, Raruang Y, Chen ZY. Melatonin treatment of strawberry fruit during storage extends its post-harvest quality and reduces infection caused by *Botrytis cinerea*. *Foods*, 2023; 29; 12(7): 1445.

- Rangel-Marrón M, Mani-López E, Palou E, 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. *LWT*, 2019; (18): 309.
- Rastegar S, Hassanzadeh-Khankahdani H, Rahimzadeh M. Effectiveness of alginate coating on antioxidant enzymes and biochemical changes during storage of mango fruit. *Journal of food biochemistry*, 2019; 43(11), e12990.
- Raybaudi-Massilia RM, Rojas-Graü MA, Mosqueda-Melgar J, Martín-Belloso O. Comparative study on essential oils incorporated into an alginate-based edible coating to assure the safety and quality of fresh-cut Fuji apples. *Journal of Food Protection*, 2008; 71(6): 1150-61.
- 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.
- Rodriguez-Garcia I, Cruz-Valenzuela MR, Silva-Espinoza BA, Gonzalez-Aguilar GA, Moctezuma E, Gutierrez-Pacheco MM, Tapia-Rodriguez MR, Ortega-Ramirez LA, Ayala-Zavala JF. Oregano (*Lippia graveolens*) essential oil added with pectin edible coatings prevents fungal decay and increases the antioxidant capacity of treated tomatoes. *The Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2016; 96: 3772–3778.
- 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.

- Ruiz-Martínez J, Aguirre-Joya JA, Rojas R, Vicente A, Aguilar-González MA, Rodríguez-Herrera R, Alvarez-Perez OB, Torres-León C, Aguilar CN. Candelilla wax edible coating with flourensia cernua bioactives to prolong the quality of tomato fruits. *Foods*, 2020; 16; 9(9): 1303.
- Salamanca C. Estudio del proceso de nanoencapsulación de quercetina por medio de nanoprecipitación. Colombia: Universidad de ICESI. Tesis de Doctorado, 2017.
- Salas-Cedillo, HI. 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.
- Salas-Méndez EDJ, Vicente A, Pinheiro AC, Ballesteros LF, Silva P, Rodríguez-García R, Hernández-Castillo FD, Díaz-Jiménez MLV, Flores-López ML, Villarreal-Quintanilla JA. Application of edible nanolaminate coatings with antimicrobial extract of *Flourensia cernua* to extend the shelf life of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 2019; 150: 19–27.
- Saleem MS, Anjum MA, Naz S, Ali S, Hussain S, Azam M, Sardar H, Khaliq G, Canan İ, Ejaz S. Incorporation of ascorbic acid in chitosan-based edible coating improves postharvest quality and storability of strawberry fruits. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021; 189, 160–169.

- Salvia-Trujillo L, Martín-Belloso O, McClements DJ. Excipient nanoemulsions for improving oral bioavailability of bioactives. *Nanomaterials* (Basel). 2017; 14; 6(1): 17.
- Sánchez-González L, Pastor C, Vargas M, Chiralt A, González-Martínez C, Cháfer M. Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 2011; 60(1), 57–63.
- 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.
- Santos TM, Souza F, Men-de-Sá M, Silva-Ebenézer O, Silveira-Márcia RS, Mônica MA, Azeredo-Henriette MC. Enhancing storage stability of guava with tannic acid-crosslinked zein coatings. *Food Chemistry*, 2018; (257): 252–258.
- Saowakon K, Rujira D, Lampan K. Effect of carboxymethyl cellulose as edible coating on postharvest quality of rambutan fruit under ambient temperature. *International Journal of Agricultural Technology*, 2017; 13(7.1): 1449-1457.
- 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.
- Sawada H, Fujikawa T, Tsuji M, Satou, M. *Pseudomonas allii* sp. nov., a

pathogen causing soft rot of onion in Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2021; 71(1), 10.1099.

- 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.
- Shah U, Naqash F, Gani A, Masoodi FA. Art and science behind modified starch edible films and coatings: a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2016; 15(3), 568–580.
- Shankar S, Teng X, Li G, Rhim JW. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of gelatin/ZnO nanocomposite films. *Food Hydrocolloids*, 2015; 45: 264–271.
- Sharififard M, Alizadeh I, Jahanifard E, Wang C, Azemi ME. Chemical composition and repellency of *Lippia* spp. essential oil against cimex lectularius under laboratory conditions. *Journal of Arthropod Borne Diseases*, 2018; 25; 12(4): 387-397.
- Sharma M, Singh C. Postharvest shelf-life extension of fresh-cut guavas (*Psidium guajava*) using flaxseed protein-based composite coatings. *Food Hydrocolloids for Health*, 2021; (1): 100005.
- Sharma S, Pareek S, Sagar NA, Valero D, Serrano M. Modulatory effects of exogenously applied polyamines on postharvest physiology, antioxidant system and shelf life of fruits: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017; 17; 18 (8): 1789.

- Shekhawat K, Fröhlich K, García-Ramírez GX, Trapp MA, Hirt H. Ethylene: a master regulator of plant-microbe interactions under abiotic stresses. *Cells*, 2022; 12(1): 31.
- Shiekh KA, Ngiwngam K, Tongdeesoontorn W. Polysaccharide-based active coatings incorporated with bioactive compounds for reducing postharvest losses of fresh fruits. *Coatings*, 2022; 12, 8.
- Shirzad H, Alirezalu A, Alirezalu K, Yaghoubi M, Ghorbani B, Pateiro M, Lorenzo JM. Effect of *Aloysia citrodora* essential oil on biochemicals, antioxidant characteristics, and shelf life of strawberry fruit during storage. *Metabolites*, 2021; 21; 11(5): 256.
- Silva-Flores PG, Galindo-Rodríguez SA, Pérez-López LA, Álvarez-Román R. Development of essential oil-loaded polymeric nanocapsules as skin delivery systems: biophysical parameters and dermatokinetics *ex vivo* evaluation. *Molecules*, 2023; 18; 28(20): 7142.
- 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.

- Socaciu MI, Semeniuc CVD. Edible films and coatings for fresh fish packaging: focus on quality changes and shelf-life extension. *Coatings*, 2018; 8(10), 366.
- Solano-Doblado LG, Alamilla-Beltrán L, Jiménez-Martínez C. Películas y recubrimientos comestibles funcionalizados. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 2018; 21: 30–42.
- Solís-Cruz GY, Álvarez-Román R, Rivas-Galindo VM, Galindo-Rodríguez SA, Silva-Mares DA, Marino-Martínez IA, Escobar-Saucedo M, Pérez-López LA. Formulation and optimization of polymeric nanoparticles loaded with riolozatrione: a promising nanoformulation with potential antiherpetic activity. *Acta pharmaceutica*, 2023; 73(3), 457–473.
- Song K, Chen B, Cui Y, Zhou L, Chan KG, Zhang HY, He YW. The plant defense signal salicylic acid activates the rpfB-dependent quorum sensing signal turnover via altering the culture and cytoplasmic pH in the phytopathogen *Xanthomonas campestris*. *American Society for Microbiology*, 2022; 26; 13(2): e0364421.
- Sotelo-Boyás ME, Correa-Pacheco ZN, Bautista-Baños S, Corona-Rangel ML. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens. *Journal of Food Science and Technology*, 2017; 77: 15–20.
- Sousa AS, Alves-da-Silva M, Pereira-Lima R, Raniere B, Tribuzy A, Silva-Santos E, Amaro AL, Estevez-Pintado MM, Silva S. Phenolic compounds

and antioxidant activity as discriminating markers and adding value of mango varieties. *Scientia Horticulturae*, 2021; (287): 110259.

- Su Q, Zhao X, Zhang X, Wang Y, Zeng Z, Cui H, Wang C. Nano functional food: opportunities, development, and future perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022; 23; 24(1): 234.
- Suput D. Edible films and coatings sources, properties and application. *Food and Feed Research*, 2015; 42 (1), 11-22.
- Tampucci S, Castagna A, Monti D, Manera C, Saccomanni G, Chetoni P, Zucchetti E, Barbagallo M, Fazio L, Santin M, Ranieri A. Tyrosol-enriched tomatoes by diffusion across the fruit peel from a chitosan coating: a proposal of functional food. *Foods*; 2021, 4; 10(2): 335.
- 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.
- Torrenegra-Alarcón ME, Matiz-Melo GE, González JG, León-Méndez G. *In vitro* antibacterial activity of the essential oil against microorganisms involved in acne. *Revista Cubana de Farmacia*, 2015; 49: 512–523.
- Tousif MI, Nazir M, Saleem M, Tauseef S, Shafiq N, Hassan L, Hussian H, Montesano D, Naviglio D, Zengin G, Ahmad I. *Psidium guajava* L. an incalculable but underexplored food crop: its phytochemistry,

ethnopharmacology, and industrial applications. *Molecules*, 2022; 27(20), 7016.

- Trajkovska-Petkoska A, Daniloski D, D'Cunha NM, Naumovski N, Broach AT. Edible packaging: sustainable solutions and novel trends in food packaging. *Food Research International*, 2021; 140: 109981.
- Veenstra JP, Johnson JJ. Oregano (*Origanum vulgare*) extract for food preservation and improvement in gastrointestinal health. *International Journal of Nutrition*, 2019; 3(4), 43–52.
- Ventura-Aguilar RI, Bautista-Baños S, Flores-García G, Zavaleta-Avejar L. Impact of chitosan based edible coatings functionalized with natural compounds on *Colletotrichum fragariae* development and the quality of strawberries. *Food Chemistry*, 2018; 262: 142–149.
- Vishwasrao C, Ananthanarayan L. Postharvest shelf-life extension of pink guavas (*Psidium guajava* L.) using HPMC-based edible surface coatings. *Journal of Food Science and Technology*, 2016; 53 (4): 1966-74.
- Wang L, Hu C, Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*, 2017; (12): 1227–1249.
- 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.
- Xu J, Manepalli P, Zhu L, Narayan-Sarathy S, Alavi S. Morphological and performance characteristics of nanocomposite films based on poly (lactic

acid) compounded with nanocrystalline cellulose and chitin whiskers using melt extrusion. *Cellulose*, 2020; 27, 7523–7534.

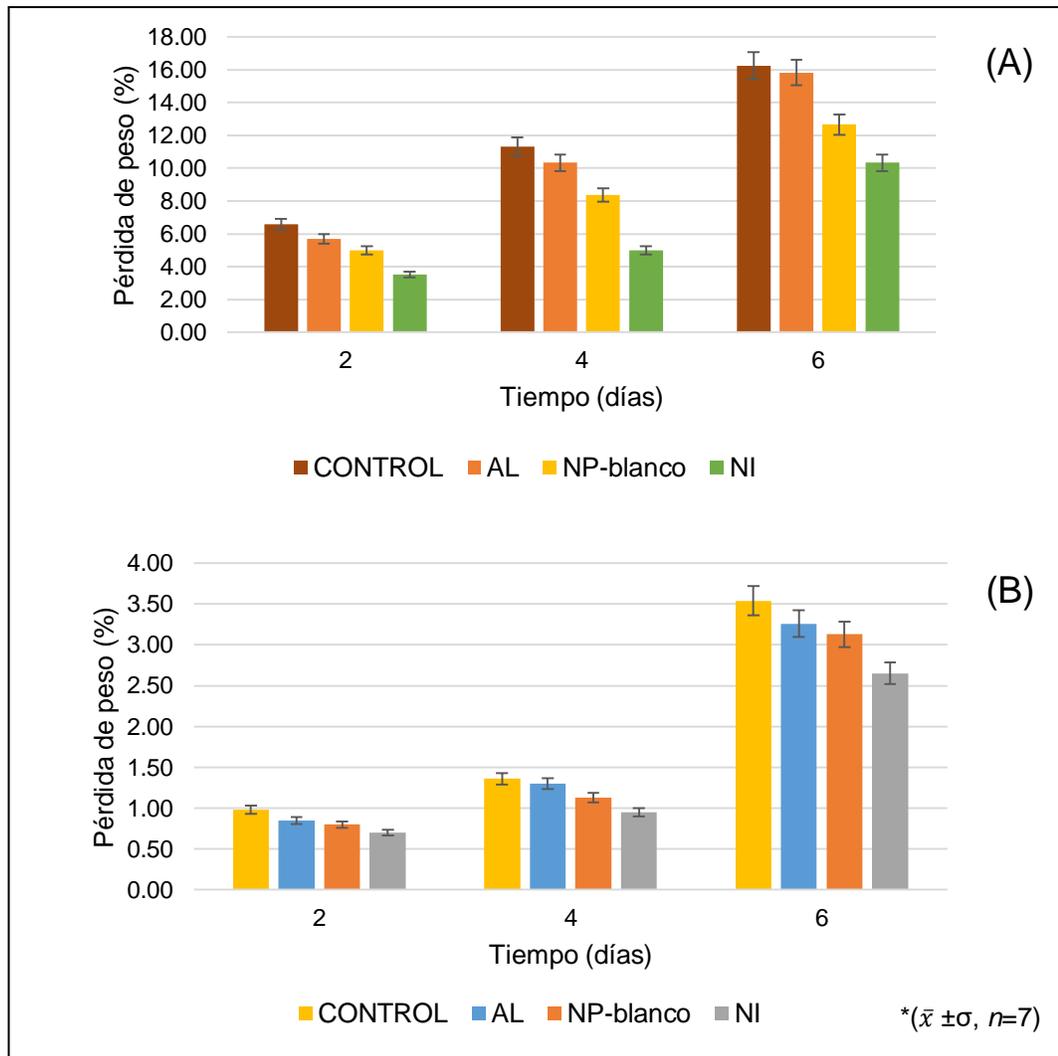
- Yasuno G, Koide H, Oku N, Asai T. Influence of purification process on the function of synthetic polymer nanoparticles. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2021; 69(8), 773–780.
- Yin C, Huang C, Wang J, Liu Y, Lu P and Huang L. Effect of chitosan and alginate-based coatings enriched with cinnamon essential oil microcapsules to improve the postharvest quality of mangoes. *Materials*, 2019; 12(13): 2039.
- Yousuf B, Sun Y, Wu S. Lipid and lipid-containing composite edible coatings and films. *Food Reviews International*, 2021; 1–24.
- Yuan-Ma Y, Xu D, Wang A. Surface coating of zein nanoparticles to improve the application of bioactive compounds: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 2022; 1-15.
- 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.
- Zili Z, Sfar S, Fessi H. Preparation and characterization of poly- $\epsilon$ -caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. *International Journal of Pharmaceutics*, 2005; 294, 261–267.

## **CAPÍTULO VIII**

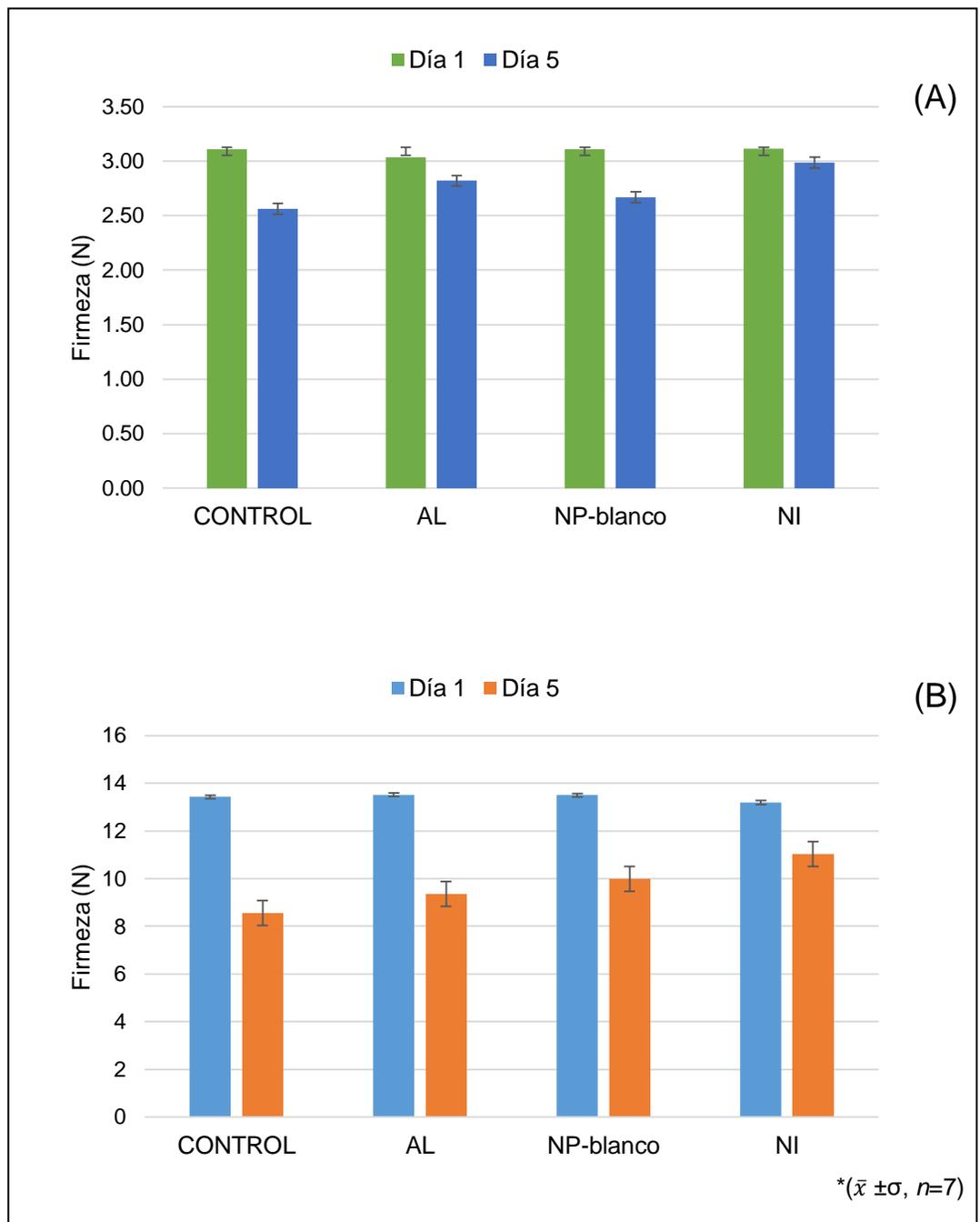
### **ANEXOS**

**ANEXO A**  
**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD POSCOSECHA Y LA VIDA ÚTIL DE**  
**FRESA Y GUAYABA**

**A) Cambios de peso y firmeza**

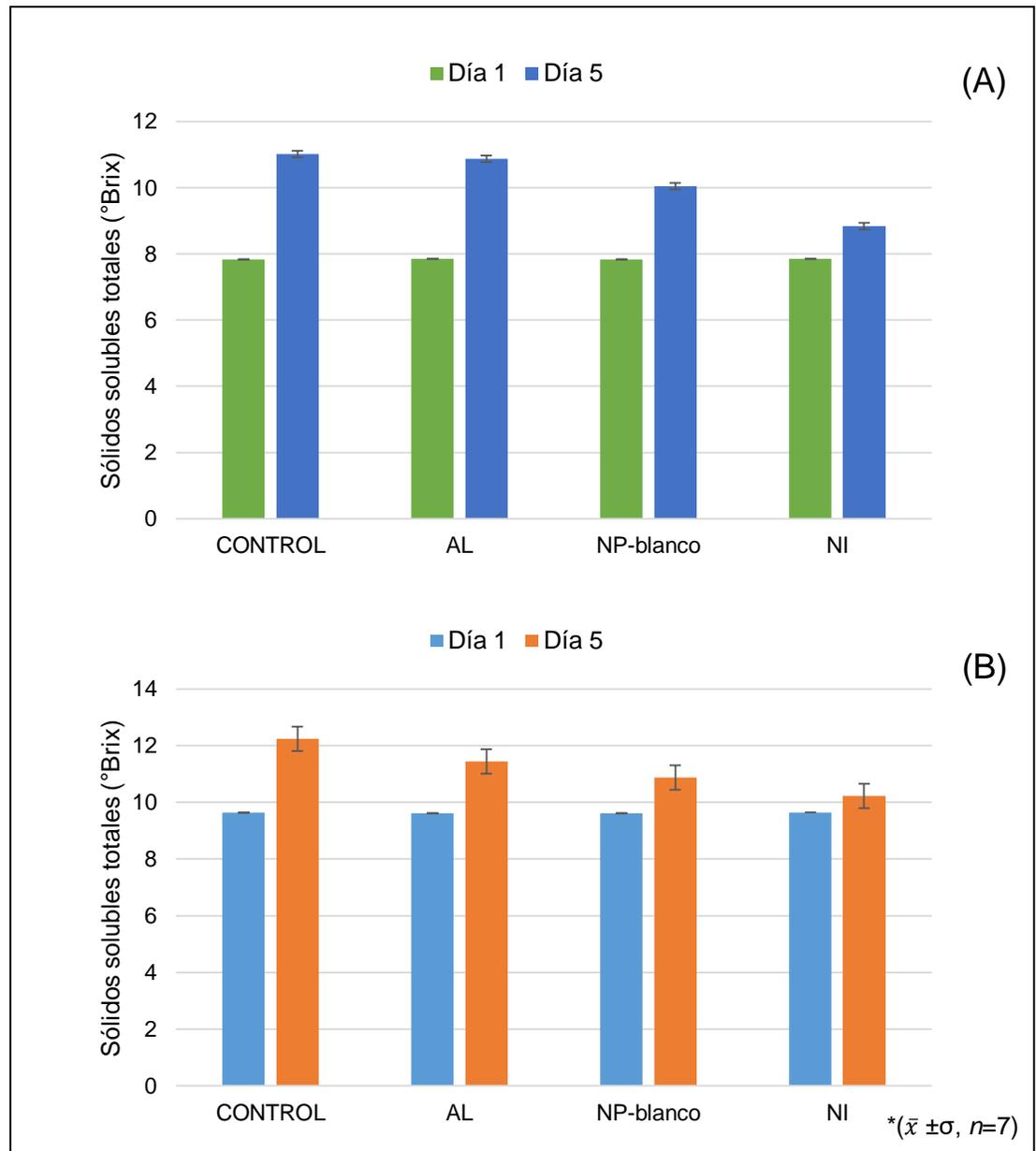


**Figura A1.** Porcentaje de pérdida de peso de frutos recubiertos con AL, NP-blanco, NI y el control (sin CB) durante el almacenamiento a 25°C en fresa (A) y guayaba (B) después de 2, 4 y 6 días de su aplicación.



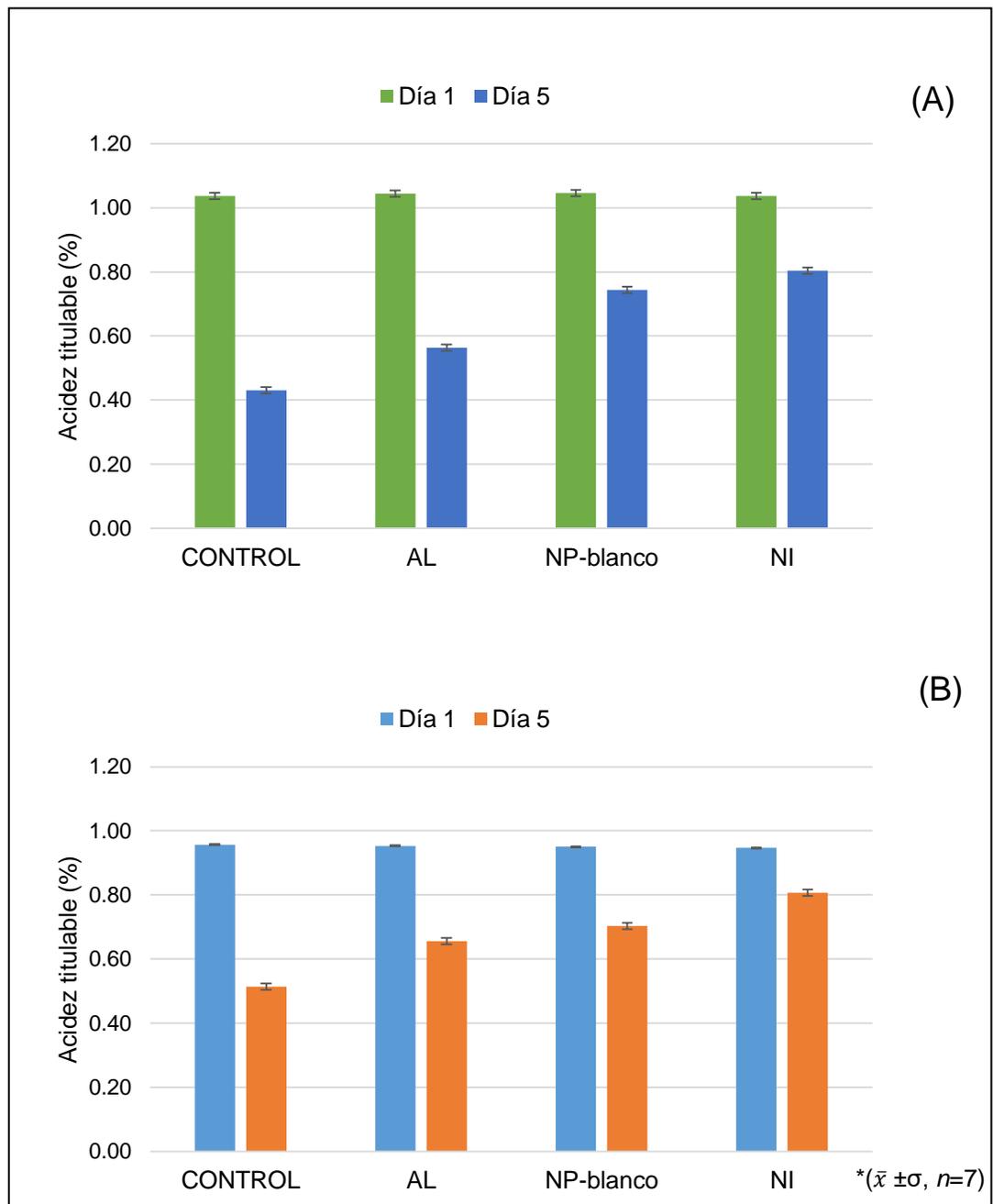
**Figura A2.** Firmeza de frutos recubiertos con AL, NP-blanco, NI y el control (sin CB) durante el almacenamiento a 25°C en fresa (A) y guayaba (B) después de 1 y 5 días de su aplicación.

## B) Evaluación de los sólidos solubles totales

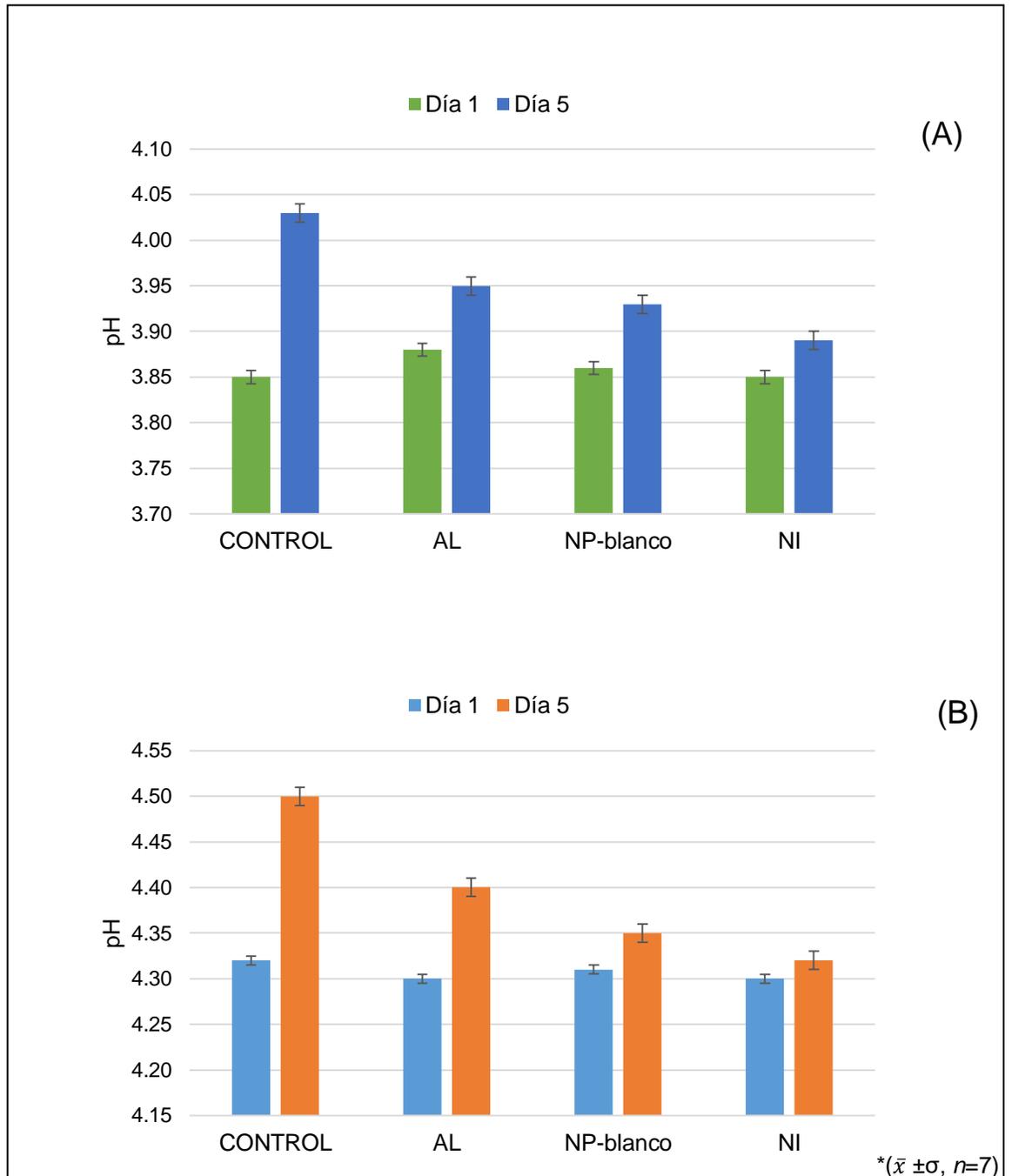


**Figura A3.** Sólidos solubles totales de frutos recubiertos con AL, NP-blanco, NI y el control (sin CB) durante el almacenamiento a 25°C en fresa (A) y guayaba (B).

### C) Acidez titulable y pH

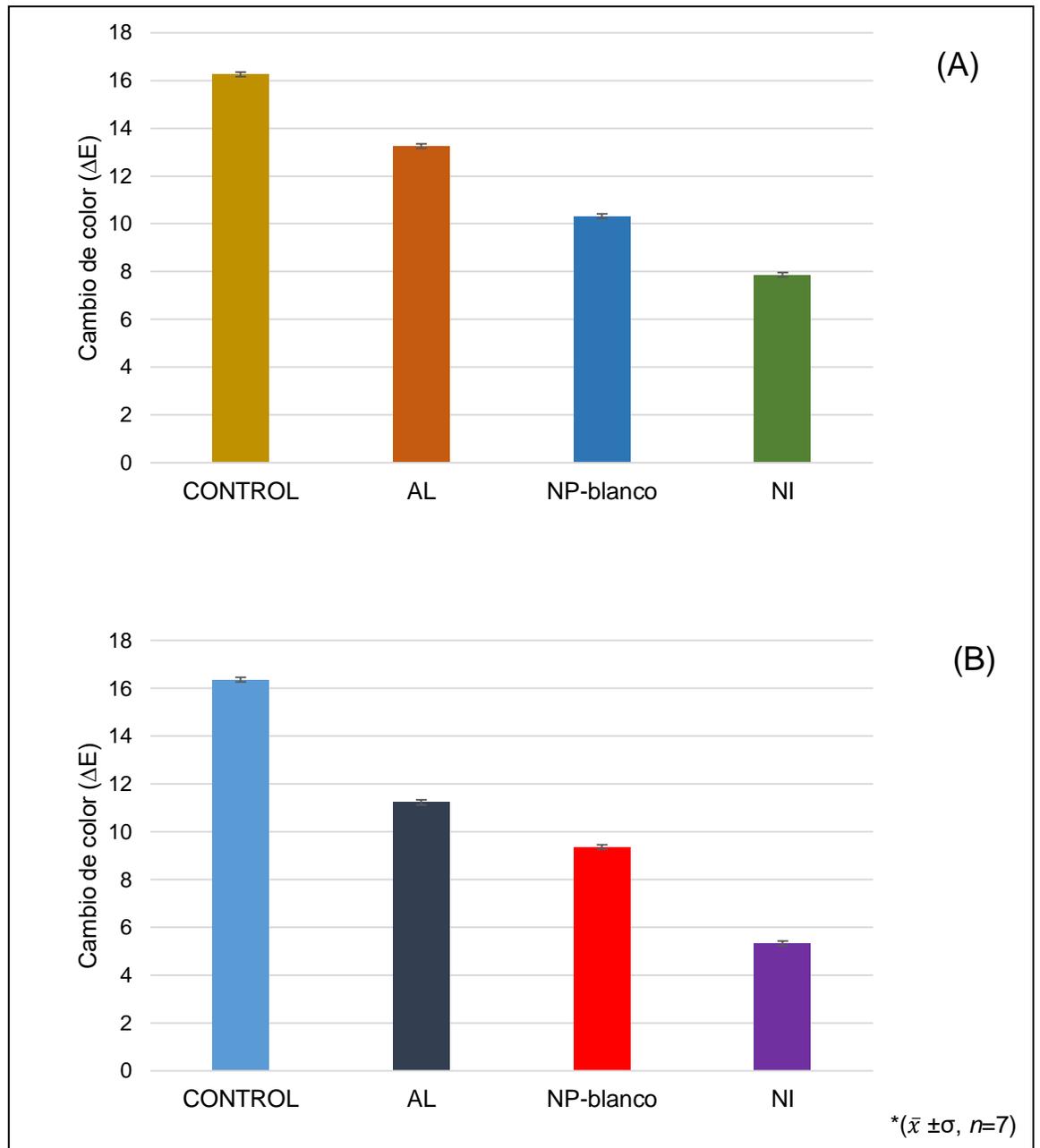


**Figura A4.** Acidez titulable de frutos recubiertos con AL, NP-blanco, NI y el control (sin CB) durante el almacenamiento a 25°C en fresa (A) y guayaba (B).



**Figura A5.** pH de frutos recubiertos con AL, NP-blanco, NI y el control (sin CB) durante el almacenamiento a 25°C en fresa (A) y guayaba (B).

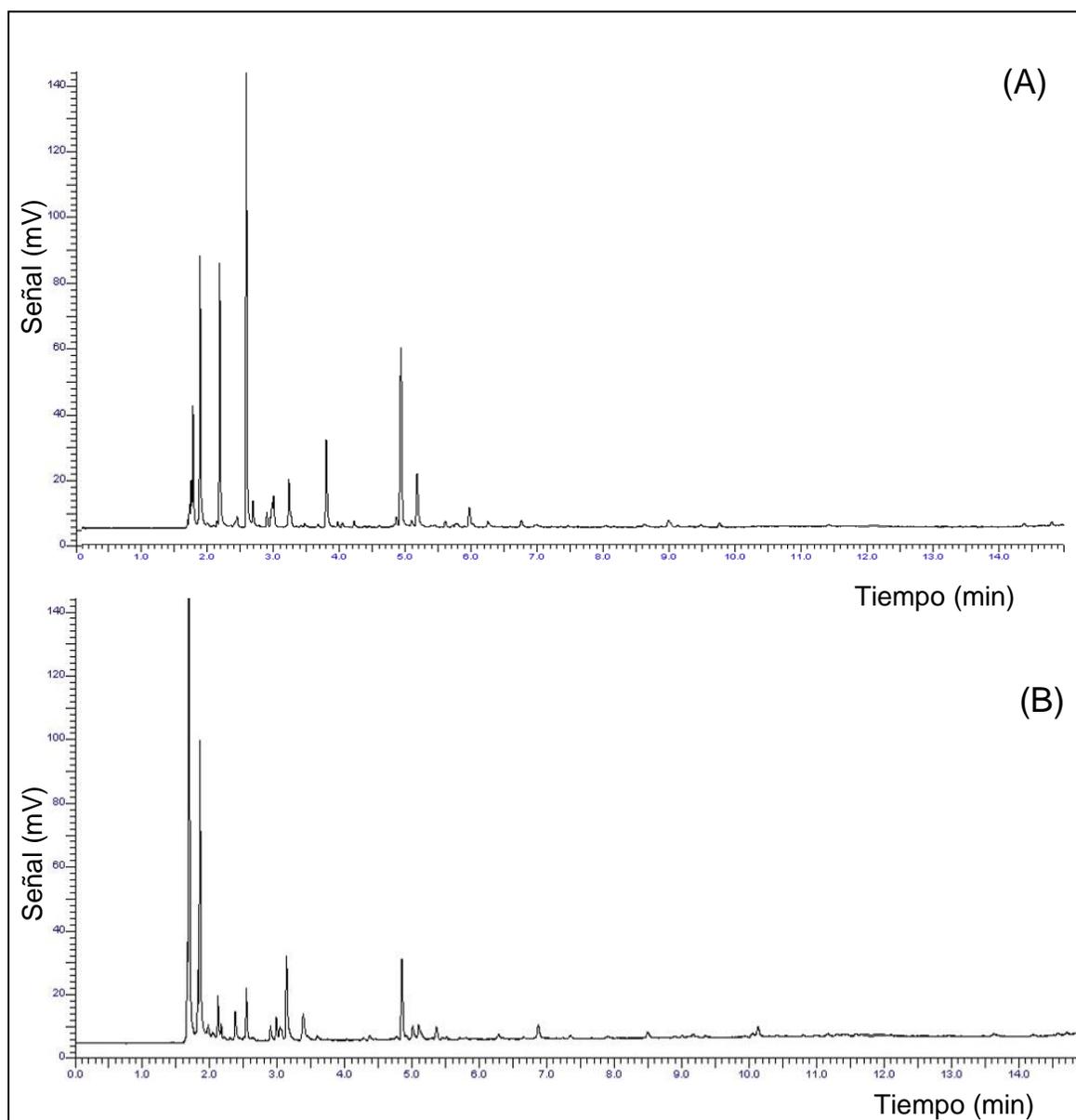
## D) Cambio de color



**Figura A6.** Cambio de color de frutos recubiertos con AL, NP-blanco, NI y el control (sin CB) durante el almacenamiento a 25°C en fresa (A) y guayaba (B) después de 5 días de almacenamiento.

## ANEXO B

A) Análisis por *HS*-SPME-CG-FID de los productos hortofrutícolas control sin CB-NI.



**Figura B1.** Cromatogramas de los productos hortofrutícolas control de la A) fresa y B) guayaba sin recubrimiento obtenidos con el método de *HS*-SPME por CG-FID validado.