



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA – ALIMENTOS

TESIS

CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO ANTIFÚNGICO DE PELÍCULAS
COMESTIBLES ADICIONADAS CON NANOCOMPUESTOS Y
ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN NATURAL

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

p.Q.F.B. CALVARIO ATLATENCO JOSÉ CARLOS

D.C. RAÚL AVILA SOSA SÁNCHEZ
DIRECTOR DE TESIS

D.C. ROCÍO AGUILAR SÁNCHEZ
ASESOR DE TESIS

Puebla Pue., Febrero 2016

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	3
3. OBJETIVOS.....	4
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
4.1 Deterioro de alimentos.....	5
4.2 Deterioro de alimentos por hongos.....	5
4.2.1 <i>Fusarium</i> spp.....	6
4.2.2 <i>Rhizopus</i> spp.....	7
4.2.3 <i>Aspergillus niger</i>	8
4.3 Conservación de alimentos.....	8
4.4 Conservación química.....	10
4.5 Antimicrobianos de origen natural.....	11
4.5.1 Aceites esenciales.....	12
4.6 Extracto de orégano.....	14
4.7 Extracto de canela.....	16
4.8 Películas comestibles.....	18
4.9 Películas comestibles adicionadas con antimicrobianos de origen natural.....	19
4.10 Nanocompuestos.....	21
4.10.1 Haloisita.....	23

4.10.2 Bentonita.....	23
5. DIAGRAMA DE TRABAJO.....	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
7. METODOLOGÍA.....	27
7.1 Elaboración de películas comestibles.....	27
7.2 Actividad antimicrobiana de películas.....	27
7.3 Caracterización de películas.....	28
7.3.1 Color.....	28
7.3.2 Espesor.....	28
7.4 Análisis estadístico.....	28
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
8.1 Evaluación antifúngica.....	29
8.1.1. <i>Aspergillus niger</i>	29
8.1.2. <i>Fusarium</i> spp.....	33
8.1.3. <i>Rhizopus</i> spp.....	37
8.2. Evaluación de propiedades físicas.....	41
8.2.1. Color.....	41
8.2.2. Espesor.....	45
9. CONCLUSIONES.....	52
10. SUGERENCIAS.....	53
11. BIBLIOGRAFÍA.....	54
12. ANEXOS.....	61
12.1. Análisis antifúngico.....	61
12.1.1. <i>Aspergillus niger</i>	61
12.1.2. <i>Fusarium</i> spp.....	62

12.1.3. *Rhizopus* spp.....62

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Principales compuestos activos de aceites esenciales.....	14
Tabla 2. Principales compuestos en aceites de canela y orégano.....	17
Tabla 3. Métodos y referencias.....	26
Tabla 4. Equipos utilizados.....	26
Tabla 5. Combinaciones de películas comestibles.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura química de carvacrol.....	15
Figura 2. Estructura química de timol.....	16
Figura 3. Estructura química de cinamaldehído.....	17
Figura 4. Representación de acción de películas comestibles.....	18
Figura 5. Microestructura laminar de arcillas.....	22
Figura 6. Tipos de estructuras formadas por polímeros y arcillas.....	22
Figura 7. Cinética de crecimiento para <i>Aspergillus niger</i> , en presencia de películas comestibles elaboradas con almidón y, A) bentonita + aceite de orégano a diferentes concentraciones, B) bentonita + timol a diferentes concentraciones, C) bentonita + carvacrol a diferentes concentraciones, D) bentonita + cinamaldehído a diferentes concentraciones.....	30
Figura 8. Cinética de crecimiento para <i>Aspergillus niger</i> , en presencia de películas comestibles elaboradas con almidón y, A) haloisita + aceite esencial de orégano a diferentes concentraciones, B) haloisita + timol a diferentes concentraciones, C) haloisita + carvacrol a diferentes concentraciones, D) haloisita + cinamaldehído a diferentes concentraciones.....	30
Figura 9. Cinética de crecimiento para <i>Aspergillus niger</i> , en presencia de películas comestibles elaboradas con carboximetilcelulosa y A) bentonita a diferentes concentraciones + aceite esencial de canela a diferentes concentraciones, B) bentonita + aceite esencial de orégano a diferentes concentraciones, C) bentonita + carvacrol a diferentes concentraciones, D) bentonita + cinamaldehído a diferentes concentraciones.....	32

Figura 10. Cinética de crecimiento para *Aspergillus niger*, en presencia de películas comestibles elaboradas con carboximetilcelulosa y, A) haloisita a diferentes concentraciones + aceite esencial de canela a diferentes concentraciones, B) haloisita y aceite esencial de óregano a diferentes concentraciones, C) haloisita + carvacrol a diferentes concentraciones, D) haloisita + cinamaldehído a diferentes concentraciones.....32

Figura 11. Cinética de crecimiento para *Fusarium* spp., en presencia de películas comestibles elaboradas con almidón y, A) haloisita + aceite esencial de óregano a diferentes concentraciones, B) haloisita a diferentes concentraciones + aceite esencial de canela a diferentes concentraciones, C) haloisita + carvacrol a diferentes concentraciones, D) haloisita + timol a diferentes concentraciones.....34

Figura 12. Cinética de crecimiento para *Fusarium* spp., en presencia de películas comestibles elaboradas con almidón y, A) bentonita + aceite esencial de óregano a diferentes concentraciones, B) bentonita a diferentes concentraciones + aceite esencial de canela a diferentes concentraciones, C) bentonita + cinamaldehído a diferentes concentraciones, D) bentonita + carvacrol a diferentes concentraciones.....35

Figura 13. Cinética de crecimiento para *Fusarium* spp., en presencia de películas comestibles elaboradas con carboximetilcelulosa y, A) haloisita + aceite esencial de óregano a diferentes concentraciones, B) haloisita a diferentes concentraciones + aceite esencial de canela a diferentes concentraciones, C) haloisita + cinamaldehído a diferentes concentraciones, D) haloisita + timol a diferentes concentraciones.....36

Figura 14. Cinética de crecimiento para *Fusarium* spp., en presencia de películas comestibles elaboradas con carboximetilcelulosa y, A) bentonita + aceite esencial de óregano a diferentes concentraciones, B) bentonita a diferentes concentraciones + aceite esencial de canela a diferentes concentraciones, C)

bentonita + cinamaldehído a diferentes concentraciones, D) bentonita + timol a diferentes concentraciones.....37

Figura 15. Cinética de crecimiento para *Rhizopus* spp., en presencia de películas comestibles elaboradas con almidón y A) bentonita + aceite esencial de orégano a diferentes concentraciones, B) bentonita + aceite esencial de canela a diferentes concentraciones, C) bentonita + cinamaldehído a diferentes concentraciones, D) bentonita + carvacrol a diferentes concentraciones.....38

Figura 16. Cinética de crecimiento para *Rhizopus* spp., en presencia de películas comestibles elaboradas con almidón y, A) haloisita + cinamaldehído a diferentes concentraciones, B) haloisita + aceite esencial de canela a diferentes concentraciones, C) haloisita + aceite esencial de orégano a diferentes concentraciones, D) haloisita + carvacrol a diferentes concentraciones.....38

Figura 17. Cinética de crecimiento para *Rhizopus* spp., en presencia de películas comestibles elaboradas con carboximetilcelulosa y, A) bentonita + aceite esencial de orégano a diferentes concentraciones, B) bentonita + aceite esencial de canela a diferentes concentraciones, C) bentonita + cinamaldehído a diferentes concentraciones, D) bentonita + carvacrol a diferentes concentraciones.....40

Figura 18. Cinética de crecimiento para *Rhizopus* spp., en presencia de películas comestibles elaboradas con carboximetilcelulosa y, A) haloisita + aceite esencial de orégano a diferentes concentraciones, B) haloisita + aceite esencial de canela a diferentes concentraciones, C) haloisita + cinamaldehído a diferentes concentraciones, D) haloisita + carvacrol a diferentes concentraciones.....40

Figura 19. Valores de A) L*, B) h* (tono) para películas de almidón adicionadas con bentonita y aceites esenciales de canela y orégano.....42

Figura 20. Valores de A) L*, B) h* (tono) para películas de almidón adicionadas con haloisita y aceites esenciales de canela y orégano.....42

Figura 21. Valores de A) L*, B) h* (tono) para películas de carboximetilcelulosa adicionadas con haloisita y aceites esenciales de canela y orégano.....43

Figura 22. Valores de A) L*, B) h* (tono) para películas de carboximetilcelulosa adicionadas con bentonita y aceites esenciales de canela y orégano.....	43
Figura 23. Valores de A) L*, B) h* (tono) para películas de almidón adicionadas con haloisita y compuestos puros (timol, carvacrol y cinamaldehído).....	43
Figura 24. Valores de A) L*, B) h* (tono) para películas de almidón adicionadas con bentonita y compuestos puros (timol, carvacrol y cinamaldehído).....	44
Figura 25. Valores de A) L*, B) h* (tono) para películas de carboximetilcelulosa adicionadas con haloisita y compuestos puros (timol, carvacrol y cinamaldehído).....	44
Figura 26. Valores de A) L*, B) h* (tono) para películas de carboximetilcelulosa adicionadas con bentonita y compuestos puros (timol, carvacrol y cinamaldehído).....	44
Figura 27. Espesor de películas comestibles de A) almidón + bentonita + aceite esencial de canela y B) almidón + haloisita + aceite esencial de canela.....	46
Figura 28. Espesor de películas comestibles de A) carboximetilcelulosa + bentonita + aceite esencial de canela y B) carboximetilcelulosa + haloisita + aceite esencial de canela.....	46
Figura 29. Espesor de películas comestibles de A) carboximetilcelulosa + bentonita + aceite esencial de orégano y B) carboximetilcelulosa + haloisita + aceite esencial de orégano.....	47
Figura 30. Espesor de películas comestibles de A) almidón + bentonita + aceite esencial de orégano y B) almidón + haloisita + aceite esencial de orégano.....	47
Figura 31. Espesor de películas comestibles de A) almidón + bentonita + timol y B) almidón + haloisita + timol.....	48

Figura 32. Espesor de películas comestibles de A) carboximetilcelulosa + bentonita + timol y B) carboximetilcelulosa + haloisita + timol.....	48
Figura 33. Espesor de películas comestibles de A) almidón + bentonita + carvacrol y B) almidón + haloisita + carvacrol.....	49
Figura 34. Espesor de películas comestibles de A) carboximetilcelulosa + bentonita + carvacrol y B) carboximetilcelulosa + haloisita + carvacrol.....	49
Figura 35. Espesor de películas comestibles de A) almidón + bentonita + cinamaldehído y B) almidón + haloisita + cinamaldehído.....	50
Figura 36. Espesor de películas comestibles de A) carboximetilcelulosa + bentonita + cinamaldehído y B) carboximetilcelulosa + haloisita + cinamaldehído.....	50

ÍNDICE DE ANEXOS

- Figura A. Cinética de crecimiento para *Aspergillus niger*, en presencia de películas comestibles elaboradas con almidón y, A) bentonita a diferentes concentraciones + aceite de canela a diferentes concentraciones, B) haloisita a diferentes concentraciones + aceite de canela a diferentes concentraciones.....61
- Figura B. Cinética de crecimiento para *Aspergillus niger*, en presencia de películas comestibles elaboradas con carboximetilcelulosa y, A) haloisita + timol a diferentes concentraciones, B) bentonita + timol a diferentes concentraciones.....61
- Figura C. Cinética de crecimiento para *Fusarium spp.*, en presencia de películas comestibles elaboradas con almidón y, A) bentonita + timol a diferentes concentraciones, B) haloisita + carvacrol a diferentes concentraciones.....62
- Figura D. Cinética de crecimiento para *Fusarium spp.*, en presencia de películas comestibles elaboradas con carboximetilcelulosa y A) haloisita + carvacrol a diferentes concentraciones, B) bentonita + carvacrol a diferentes concentraciones.....62
- Figura E. Cinética de crecimiento para *Rhizopus spp.*, en presencia de películas comestibles elaboradas con almidón y, A) bentonita + timol a diferentes concentraciones, B) haloisita + timol a diferentes concentraciones.....62
- Figura F. Cinética de crecimiento para *Rhizopus spp.*, en presencia de películas comestibles elaboradas con carboximetilcelulosa y, A) haloisita + timol a diferentes concentraciones, B) bentonita + timol a diferentes concentraciones.....63

Agradecimientos

Dedicatorias

RESUMEN

Las películas comestibles han sido desarrolladas con el fin de extender la vida útil de los productos alimenticios o enriquecerlos, ya que pueden usarse como soporte de un amplio número de compuestos como agentes antimicrobianos y/o como portadoras de otros aditivos. El objetivo de este proyecto fue elaborar películas comestibles de almidón y carboximetilcelulosa, adicionadas con nanocompuestos (bentonita y haloisita) y antimicrobianos de origen natural (aceite esencial de orégano y canela, así como compuestos puros tales como timol, carvacrol y cinamaldehído) a diferentes concentraciones. Se estudió el efecto de los nanocompuestos en las características de las películas comestibles a las cuales se incorporaron. La evaluación se realizó mediante la caracterización del efecto antifúngico “in vitro” de las películas elaboradas en contra de *Aspergillus niger*, *Fusarium* spp. y *Rhizopus* spp. mejorando en la mayoría de los casos el efecto antifúngico de las películas. También se evaluaron algunas propiedades físicas como espesor y color de las películas elaboradas. Se observó que los nanocompuestos modificaron las propiedades físicas de las películas, ya que el espesor se incrementó al incorporar los nanocompuestos otorgando mayor resistencia y firmeza a las películas. En cuanto al color también se vio modificado ya que los nanocompuestos presentan color propio, la haloisita presenta un color blanco y la bentonita es de color café. Los aceites esenciales de canela y orégano incorporados a las películas también afectaron estas propiedades físicas, en mayor medida fue debido a la presencia de los nanocompuestos. Se concluye que es recomendable la utilización de nanocompuestos en la elaboración de películas comestibles ya que mejoran las características de las mismas.

1. INTRODUCCIÓN

La calidad de los alimentos disminuye durante el tiempo que media entre la cosecha o sacrificio hasta que son consumidos. La pérdida de calidad puede deberse a cambios físicos, químicos, enzimáticos o microbiológicos. Las consecuencias de la pérdida de calidad por los microorganismos suponen un riesgo para el consumidor debido a la posible presencia de toxinas o microorganismos patógenos y/o pérdidas económicas causada por la alteración (Doyle y Col., 1997). Las alteraciones de origen microbiano constituyen la principal causa de deterioro de los alimentos, y pueden ser debidas a bacterias, hongos y levaduras que ocasionan una intensa proliferación microbiana o una profunda alteración de los constituyentes del alimento (Hernández, 2010).

El Codex Alimentarius establece que todas las personas tienen derecho a esperar que los alimentos que comen sean inocuos y aptos para el consumo. Las enfermedades de transmisión alimentaria y los daños provocados por los alimentos son, en el menor de los casos, desagradables, y en el peor, pueden ser mortales. Además hay otras consecuencias. Los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos pueden perjudicar al comercio y al turismo y provocar pérdidas económicas considerables. Por otra parte el deterioro de los alimentos ocasiona pérdidas importantes, muy costosas en muchos casos, y esto repercute negativamente en el comercio y en la confianza de los consumidores (Hernández, 2010).

Muchas de las tecnologías de conservación de alimentos protegen a los alimentos de los efectos microbianos y de la alteración consiguiente. Los microorganismos pueden ser inhibidos por refrigeración, congelación, reducción de la actividad del agua, limitación de nutrientes, acidificación, modificación de la atmósfera del envase o por fermentación. O bien por adición de compuestos antimicrobianos (Doyle y Col., 1997).

Para la conservación durante un periodo más largo que requieren la mayoría de los alimentos, hace falta inactivar o controlar los microorganismos los cuales son

la causa principal de la descomposición. El alimento o sustrato, determina los microorganismos que pueden desarrollarse, si se conocen las características del alimento se puede predecir la flora microbiana que es posible que crezca en él (Ospina y Cartagena, 2008).

Resulta muy difícil evitar que los microorganismos accedan a los alimentos, los principales esfuerzos en este campo están dirigidos a diseñar nuevos métodos o a mejorar los ya existentes con el fin de destruir o inhibir el crecimiento microbiano. La eficiencia de los métodos de conservación está basada, entre otros aspectos, en la carga microbiana del alimento y en el tipo de microorganismos contaminantes (Hernández, 2010). Entre los recientes agentes antimicrobianos incorporados en películas comestibles se encuentran los aceites esenciales (derivados de hierbas y especias) esta actividad se debe a la presencia de ciertos compuestos presentes como carvacrol, timol, cinamaldehido, eugenol entre otros (Kim y Col., 1995; Skandamis y Nychas 2000).

Una película comestible adicionada con nanocompuestos y antimicrobianos es particularmente deseable debido a su integridad y propiedades de barrera estructurales aceptables impartidas por la matriz de nanocompuesto. Con el fin de aprovechar plenamente estos beneficios, es necesario que las nanopartículas se dispersen uniformemente en la matriz polimérica una vez que esté hecha la solución formadora de película para posteriormente poder añadir a la sustancia antimicrobiana en cuestión (Giannakas y Col., 2014).

2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente el uso de películas comestibles se ha extendido y ganado importancia debido a su funcionalidad y habilidad para incorporar aditivos. La utilización de métodos alternativos y eficientes para la conservación de alimentos mediante el empleo de películas comestibles se dirige principalmente hacia retardar el crecimiento de microorganismos sobre dichos alimentos.

Por lo que en este proyecto, se propuso evaluar la capacidad antimicrobiana de las películas comestibles adicionadas con nanocompuestos y antimicrobianos de origen natural, a través del control sobre el desarrollo de microorganismos y de los cambios físicos de las películas comestibles, con la finalidad de poder utilizarlos para mejorar la calidad y vida útil de los alimentos a los cuales se incorporen.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el efecto antifúngico de películas comestibles adicionadas con nanocompuestos y antimicrobianos de origen natural

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Elaborar películas comestibles de almidón y carboximetilcelulosa adicionadas con nanocompuestos y antimicrobianos de origen natural (aceites esenciales de canela y orégano mexicano, timol, carvacrol, cinamaldheído).
- ❖ Evaluar y comparar la actividad antifúngica de películas comestibles adicionadas con diferentes tipos de nanocompuestos y antimicrobianos de origen natural sobre *Aspergillus niger*, *Fusarium* spp. y *Rhizopus* spp.
- ❖ Caracterizar las propiedades físicas y químicas de las películas elaboradas.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 Deterioro de alimentos

Los alimentos son considerados fuentes de salud y bienestar, ya que proporcionan los requerimientos energéticos y demás nutrientes que son indispensables para la vida. Sin embargo, en algunas ocasiones se convierten en vectores de enfermedades agudas, graves o crónicas, producidas por bacterias, hongos e insectos, entre otros organismos (Enfermedades Transmitidas por los Alimentos, ETA) (González-Aguilar, 2005)

Uno de los mayores retos de la industria de los alimentos es la conservación de los mismos, es decir, evitar que sean atacados por microorganismos que los descompongan acarreado pérdidas económicas y daños graves a la salud de los consumidores. Las tecnologías emergentes en materia de conservación de alimentos, se han convertido en el centro de atención de gran parte de la industria alimentaria (Rodríguez-Sauceda y Col., 2014).

Los factores intrínsecos que definen las poblaciones de deterioro de estos productos incluyen su contenido nutricional, rico en carbohidratos, su actividad de agua (a_w) y su bajo pH. El deterioro de muchos alimentos es originado, principalmente, por mohos, levaduras y bacterias lácticas, incluyendo *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Acetobacter*, los cuales logran resistir la baja a_w de algunos de estos productos, su pH y alto contenido de azúcares (Breyman y Col., 2013).

4.2 Deterioro de alimentos por hongos

La contaminación por hongos es la principal causa de deterioro de alimentos y debido a la creciente demanda de productos alimenticios libres de preservativos químicos, varios métodos se han enfocado en la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos naturales y en el desarrollo de películas antimicrobianas que permitan extender la vida de anaquel de estos productos (Hirano, 1999).

Los hongos constituyen un grupo muy numeroso de organismos que pueden ser unicelulares o pluricelulares. Estos organismos tienen un metabolismo quimioheterótrofo. La mayor parte son saprófitos que se encuentran asociados a la materia orgánica en descomposición y participan en los ciclos biogeoquímicos, algunos son parásitos de animales, plantas e incluso otros hongos, mientras que otros actúan como simbioses (Lliná y Col., 2011).

El deterioro que causan los mohos se conoce como “enmohecimiento”, y se manifiesta con la aparición de manchas contrastantes en la superficie del pan. Los mohos que suelen encontrarse en el pan son por ejemplo varias especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor* y *Eurotium*; de ellos, los géneros más comunes en el enmohecimiento son *Penicillium* y *Aspergillus* (Salgado y Jiménez, 2012).

4.2.1 *Fusarium* sp.

Las características macroscópicas de este hongo son: anverso presenta tamaño ilimitado de color, en un inicio (1 a 3 días) es blanca, para tornarse en tonalidades naranja, café o violeta-lila (dependiendo de la especie), con forma y aspecto vellosa-seca, se adhiere a las paredes del tubo, mientras que por el reverso presenta color naranja o violeta, difusible al medio. El tipo de micelio es macrosifonado de 1-2 μm de diámetro, septado y hialino; en cuanto a la modalidad de micelio, las hifas se organizan en *coremium*. Su reproducción es anamórfica a base de macroconidios fusiformes de 5-8 μm de largo por 1-2 μm de ancho, y micronidios fusiformes de 1-3 μm de largo por 1 μm de ancho éstos pueden variar en tamaño y forma dependiendo de la especie; entre sus estructuras especializadas presenta conidióforos delgados que miden 5-10 μm de largo; la fase teleomórfica se ha reportado en algunas especies. Taxonomía: *Fusarium*. Teleomórfica: *Ascomycotina*, *Euascmycetes*, generos: *Gibberella*; *Nectria*. (Bonifaz, 2010).

Fusarium sp. se ha identificado como agente causal de deterioro de frutas y hortalizas. La presencia de *Fusarium* sp. se manifiesta primero como una pequeña

área acuosa, que luego se hunde manteniendo una forma redondeada y el color natural del tejido de la fruta. La lesión aumenta de tamaño hasta alcanzar unos 2 o 3 cm de diámetro, y en el centro a veces se producen pequeñas rajaduras radiales. Posteriormente esta zona se cubre de un micelio de color blanco, muy profuso y aeroso, que adquiere tonalidades rosadas muy características. El moho rosado se puede considerar como una enfermedad tardía, ya que aparece cuando la fruta está madura o totalmente madura; su presencia como patógeno secundario es más evidente en frutas ya senescentes, 4 o 5 días después de la maduración completa (Durán y Mora, 1987).

4.2.2 *Rhizopus* sp.

Las características macroscópicas de este hongo son: anverso tamaño ilimitado, tienden a llenar tubos y cajas de Petri, de color en un inicio (2 a 3 días) es blanco, tiempo después toma un color gris oscuro, de forma y aspecto vellosa-algodonosa y seca; mientras que por el reverso no presenta pigmentos. El tipo de micelio es macrosifonado, de entre 5-10 μm de diámetro, cenocítico (sin septos) y hialino; en cuanto a la modalidad de micelio, presenta rizoides (raíces) y estolones. Su reproducción es anamórfica a base de esporangiosporas o endosporas redondas que miden de 6-8 μm de diámetro; entre sus estructuras especializadas presenta esporangióforos largos, que nunca se ramifican y tiene una columnela pequeña de forma ovoide, el esporangio llega a medir 100 a 200 μm de diámetro, la fase teleomórfica: zigosporas. Taxonomía: *Glomeromycota* (antes *Zygomycota*), *Mucorales*, *Mucoraceae*, *Rhizopus* (Bonifaz, 2010).

Rhizopus sp. ha sido identificado como el causante de la pudrición suave en muchas frutas y hortalizas. Los síntomas de esta enfermedad inician con una lesión de tamaño variable, de forma idéntica, muy acuosa y suave, que avanza rápidamente manteniendo el color natural de la fruta. En corto tiempo se empieza a producir las fructificaciones del patógeno consistentes en un esporangióforo y un esporangio globoso terminal, que al inicio son de color blanco y luego cambian a negro. Las lesiones son muy extensivas y pueden llegar a abarcar casi todo el fruto (Duran y Mora, 1987).

4.2.3 *Aspergillus niger*

Las características macroscópicas de este hongo son: anverso de tamaño ilimitado, tiende a cubrir el medio de color al inicio (1 a 2 días) forma una colonia blanca-amarillenta y luego se convierte a negra, con forma y aspecto polvoso, en el reverso no presenta pigmentos. Presenta dos tipos de micelio, el micelio nutritivo es macrosifonado (2-4 μm), septado y hialino, mientras que el reproductivo es macrosifonado (4-8 μm), pocas veces septado y hialino. Su reproducción es anamorfica a base de micronidios redondos o elípticos, de 2-5 μm de diámetro, entre sus estructuras especializada presenta la cabeza aspergilar mide 100-200 μm , está compuesta por conidióforos largos (100-250 μm), vesícula redonda (50-100 μm), de donde nacen alrededor en un ángulo de casi 360° dos series de fiálides o esterigmas (biseriado), la primera de gran tamaño, mientras la segunda tiende a ser pequeña. La fase teleomórfica no ha sido reportada. Taxonomía: *Ascomycota*, *Eurotiomycetes*, *Eurotiomycetidae*, *Eurotiales*, *Trichocomaceae*, *Aspergillus niger*. (Bonifaz, 2010).

Los hongos del género *Aspergillus* se multiplican rápidamente sobre materia vegetal almacenada o en descomposición, tal como cereales, frutas, semillas, etc., y en un amplio rango de temperatura, humedad y aerobiosis, contaminando así muchos sustratos (Pointing y Hyde, 2001; Perrone y Col., 2007).

4.3 Conservación de alimentos

La preservación de alimentos puede definirse como el conjunto de tratamiento que prolonga la vida útil de aquellos, manteniendo, en el mayor grado posible, sus atributos de calidad, incluyendo color, textura, sabor y especialmente valor nutritivo. Esta definición involucra una amplia escala de conservación, desde períodos cortos, dados por métodos domésticos de cocción y almacenamiento en frío, hasta períodos muy prolongados, dados por procesos industriales estrictamente controlados como es el caso de la congelación y la deshidratación (Rodríguez-Sauceda, 2011).

Desde el punto de vista microbiológico, la conservación de alimentos consiste en exponer a los microorganismos a un medio hostil (por ejemplo a uno o más factores adversos) para prevenir o retardar su crecimiento, disminuir su supervivencia o causar su muerte. Ejemplos de tales factores son la acidez (por ejemplo bajo pH), la limitación del agua disponible para el crecimiento (por ejemplo reducción de la actividad de agua), la presencia de conservadores, las temperaturas altas o bajas, la limitación de nutrientes, la radiación ultravioleta y las radiaciones ionizantes. Desafortunadamente, los microorganismos han desarrollado distintos mecanismos para resistir los efectos de estos factores ambientales de estrés (Alzamora y Col., 2004).

Las tendencias actuales de los consumidores indican su preferencia por alimentos de fácil preparación, de calidad, seguros, y naturales, que estén poco procesados pero a la vez que tengan una mayor vida útil. Las tecnologías de conservación de alimentos tienen como reto, obtener productos más duraderos sacrificando al mínimo sus características nutricionales y sensoriales iniciales (Rodríguez-Sauceda, 2011).

Las técnicas de conservación se aplican para controlar el deterioro de la calidad de los alimentos. Este deterioro puede ser causado por microorganismos y/o por una variedad de reacciones físico-químicas que ocurren después de la cosecha. Sin embargo, la prioridad de cualquier proceso de conservación es minimizar la probabilidad de ocurrencia y de crecimiento de microorganismos deteriorativos y patógenos (Alzamora y Col., 2004).

La mayor parte de los antimicrobianos alimentarios solamente son bacteriostáticos o fungistáticos en lugar de bactericidas o fungicidas. Puesto que generalmente son bacteriostáticos o fungistáticos, no conservan indefinidamente los alimentos. Dependiendo de las condiciones de almacenamiento, llega un momento en que el alimento se altera o se convierte en peligroso. Los antimicrobianos alimentarios se usan frecuentemente combinados con otros procedimientos de conservación de alimentos (Doyle y Col., 1997).

4.4 Conservación química

La principal causa de deterioro de los alimentos es la actividad de los microorganismos (bacterias, levaduras y mohos). El problema de las alteraciones microbianas de los alimentos tiene implicaciones económicas, tanto para los fabricantes (deterioro de materias primas y productos elaborados, pérdida de la imagen de marca, etc.) como para distribuidores y consumidores (deterioro de productos después de su adquisición y antes de su consumo). A los métodos físicos, como el calentamiento, deshidratación, irradiación o congelación, pueden asociarse métodos químicos que causen la muerte de los microorganismos o que al menos eviten su crecimiento (Ibáñez y Col., 2003).

Los antimicrobianos alimentarios son compuestos químicos añadidos o presentes en los alimentos que retardan el crecimiento o matan microorganismos, con lo que aumentan la resistencia a la alteración de su sanidad o calidad. Los blancos principales de los agentes antimicrobianos son los microorganismos productores de intoxicaciones alimentarias (agentes infecciosos y productores de toxinas) y los microorganismos que alteran los alimentos, cuyos productos metabólicos finales (catabolitos) o enzimas causan malos olores, sabores desagradables, problemas texturales, cambios de coloración o riesgo sanitario. Los antimicrobianos alimentarios a veces se llaman conservadores de los alimentos (Doyle y Col., 1997).

El ácido sórbico, el ácido benzoico y los compuestos sulfitados son los antimicrobianos más comunes utilizados en la formulación de los productos frutícolas de humedad alta y productos frutícolas de humedad intermedia. Se usan principalmente para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras. La acción de estos conservadores depende fuertemente del pH, siendo más activos contra los microorganismos en los alimentos ácidos. En particular, el efecto antimicrobiano de los ácidos débiles se debe parcialmente a su influencia en el pH del alimento y parcialmente al efecto del ácido mismo atribuido a la forma no disociada del ácido. Este permea la membrana celular actuando como transportador de protones (Alzamora y Col., 2004).

Entre los conservadores más polémicos destacan las sales de nitrato y nitrito, ya que en alimentos sometidos al asado se pueden formar unos compuestos cancerígenos denominados “nitrosaminas”. Por otro lado, no se autoriza su uso en la carne picada, ya que mantienen la apariencia de fresca. En muchos alimentos existen de forma natural sustancias con actividad antimicrobiana: el ácido benzoico y el ácido cítrico de ciertas frutas o el ácido láctico liberado en la fabricación de leches fermentadas. Los ajos, cebollas y muchas especias también contienen agentes antimicrobianos, o precursores que se transforman en ellos al triturarlos (Ibáñez y Col., 2003).

Los blancos objetivos de los antimicrobianos alimentarios incluyen la pared, membrana celular, enzimas metabólicas, sistemas de síntesis de proteínas y sistemas genéticos. Puesto que todos son esenciales, la inactivación de uno solo inactiva a las células. Los mecanismos exactos o blancos diana de los antimicrobianos alimentarios frecuentemente no se conocen, o no están bien definidos. Esto se debe a varias razones posibles. Los investigadores frecuentemente se concentran en un blanco único como una enzima o la membrana celular, sin determinar el efecto sobre otras funciones celulares. El uso de antimicrobianos alimentarios está declinando porque los consumidores tienden a consumir preferentemente alimentos naturales, que contienen menos aditivos químicos (Doyle y Col., 1997).

4.5 Antimicrobianos de origen natural

Los consumidores (principalmente de los países desarrollados) ven con preocupación la utilización de conservadores sintetizados químicamente para prevenir la proliferación de microorganismos patógenos y de descomposición, ya que cuestionan la inocuidad de muchos aditivos alimentarios. Los sistemas antimicrobianos naturalmente presentes en plantas, animales o microorganismos, o aquéllos generados por éstos en situaciones de estrés, son extremadamente atractivos para el público en el contexto de «conservadores naturales». En particular, las actividades antimicrobianas de extractos de varios tipos de plantas y

partes de plantas usadas como agentes saborizantes en alimentos ha sido reconocida hace muchos años (Alzamora y Col., 2004).

El uso de antimicrobianos es una práctica común en la industria de los alimentos, por muchos años se han utilizado antimicrobianos sintetizados químicamente (que en algunos casos han causado daño en la salud de los consumidores, si se utilizan a grandes dosis o como en el caso de los sulfitos), redundando en un rechazo por parte de los consumidores de productos procesados, por lo cual ha surgido la necesidad de buscar otras opciones. En esta búsqueda se han encontrado nuevos agentes antimicrobianos de origen natural, como sustitutos de los tradicionalmente utilizados (Nychas, 1995).

Diversas investigaciones han reportado el efecto antifúngico de fuentes naturales como son especias, hierbas, plantas o microorganismos. Entre las especias con sustancias activas destacan el laurel, orégano, canela, clavo y ajo, debido a su amplio espectro contra microorganismos patógenos y deteriorativos. Las sustancias activas de los aceites esenciales son de diversos tipos, compuestos como el timol, eugenol, aldehídos, cetonas, alcoholes y otros hidrocarburos presentan alta actividad antimicrobiana debido a sus grupos funcionales (Salgado y Jimenez, 2012).

La actividad antimicrobiana de hierbas y plantas es generalmente atribuida a los compuestos fenólicos presentes en sus extractos o aceites esenciales, y se ha observado que la grasa, proteína, concentración de sal, pH y temperatura afectan la actividad antimicrobiana de estos compuestos (Nychas, 1995).

4.5.1 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son líquidos aceitosos obtenidos a partir de diferentes partes de las plantas como flores, yemas, semillas, hojas, ramas, corteza, hierbas, madera, frutos y raíces. Son mezclas complejas de ésteres, aldehídos, cetonas y terpenos. Además son compuestos olorosos, muy solubles en alcohol y poco solubles en agua. Para la extracción de estos compuestos se pueden utilizar

distintos solventes (acetato, etanol, y cloruro de etileno). Los aceites esenciales derivados de plantas son conocidos por su actividad antimicrobiana contra un amplio rango de bacterias y hongos (Rodríguez-Sauceda, 2011).

Son relativamente pocos los estudios sobre la actividad antimicrobiana de aceites esenciales en sistemas modelo de alimentos o en alimentos propiamente dichos. Sin embargo, en los estudios realizados se ha logrado ver que la eficacia de los aceites esenciales “in vitro” es frecuentemente mucho mayor que en los alimentos (Rodríguez-Sauceda, 2011).

En la tabla 1 se enlistan los principales compuestos activos identificados por Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) encontrados en el eceite de algunas plantas y especies (Suhr y Nielsen, 2003).

Tabla 1. Principales compuestos activos de ceites esenciales de plantas y especies obtenidas por GC-MS

Aceite esencial	Principales componentes	Contenido (%)
Laurel	α -Pinoeno	8 a 42
	D-Limoneno	2
	Linalol	2 a 33
	Carvicol	23 a 78
	Eugenol	31 a 88
Canela	Cinamaldehído	1 a 88
	Eugenol	71 a 92
	Benzil-benzoato	5 a 53
Clavo	Cariofileno	4 a 65
	Eugenol	52 a 84
Hierba limón	D-Limoneno	3 a 14
	Gerianol	4 a 20
	Geranial (citral a)	31 a 93
	Neral (citral b)	45 a 99
Mostaza	A lil isotiocianato	99 a 100
Naranja	β -Mirceno	2 a 24
	D-Limoneno	68 a 95
	Linalol	0 a 33
Salvia	α -Pireno	11 a 85
	D-Limoneno	10 a 30
	Eucaliptol	24 a 93
	Alcanfor	22 a 53
Tomillo	Timol	52 a 89
	Carvacrol	3 a 54
Romero	α -Pireno	17
	Eucaliptol	18 a 59

Adaptado de Suhr y Nielsen (2003).

4.6 Extracto de orégano

Existen múltiples estudios sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de diferentes tipos de orégano. Se ha encontrado que los aceites esenciales de las especies del género *Origanum* presentan actividad contra bacterias gram negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae*; y las gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis* (Aligiannis, 2001).

Tienen además capacidad antifúngica contra *Cándida albicans*, *C. tropicalis*, *Torulopsis glabrata*, *Aspergillus Níger*, *Geotrichum* y *Rhodotorula*; pero no contra *Pseudomonas aeruginosa*. Se ha evaluado la actividad antimicrobiana de los componentes aislados, así como el del aceite esencial. Los fenoles carvacrol y timol poseen los niveles más altos de actividad contra microorganismos Gram negativos, excepto para *P. aeruginosa*, siendo el timol más activo. Dicha acción antimicrobiana posiblemente se debe al efecto sobre los fosfolípidos de la capa externa de la membrana celular bacteriana, provocando cambios en la composición de los ácidos grasos (Rodríguez-Sauceda, 2011).

Carvacrol

Carvacrol (o 2-metil-5-(1-metiletil)fenol) está presente en los aceites esenciales de orégano (entre 60-70%) y tomillo (en un 45%). Su estructura química está representada por un grupo fenólico (Figura 1), con un alto poder hidrofóbico. De todos los agentes antimicrobianos naturales, el carvacrol es uno de los que más atención ha recibido en su mecanismo de acción; es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, permitiendo la salida de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática, provocando con ello la salida del ATP, inhibición de la actividad de las ATPasas y disminución de la fuerza motriz del protón (García y Palou, 2008).

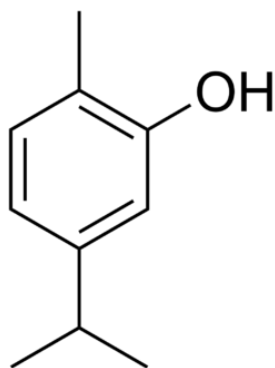


Figura 1. Estructura química de carvacrol (López-Malo, 2000)

Timol

El timol (o isopropilmetacresol, o 2-isopropil-5-metilfenol) ha sido reportado por varios autores como uno de los agentes antimicrobianos más activo de los constituyentes de los aceites esenciales. Se encuentra presente en el aceite esencial del tomillo (arriba del 50%), en el aceite esencial del orégano y en otras fuentes naturales como los aceites naturales de mandarina y tangerina. Su estructura química es similar a la del carvacrol cambiando únicamente la posición del grupo hidroxilo (Figura 2).

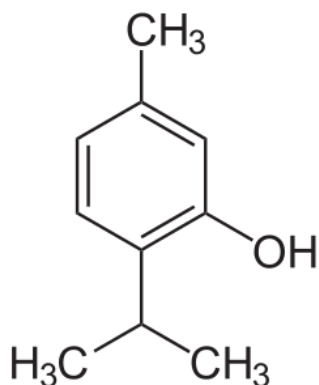


Figura 2. Estructura química del timol (López-Malo, 2000).

El mecanismo de acción de timol es semejante al de carvacrol, ya que su estructura química es similar. El timol es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, permitiendo la salida de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática (García y Palou, 2008).

4.7 Extracto de canela

El aldehído cinámico es un compuesto fenólico de algunas especies, incluyendo la canela, es generalmente admitido como seguro para su uso en alimentos y es usado en muchos alimentos como saborizante. El aldehído cinámico (3- fenil-2 propenal) es el principal componente antimicrobiano en la canela (figura 3), no solo exhibe actividad antibacterial sino que también inhibe el crecimiento de mohos y la producción de micotoxinas (Rodríguez-Sauceda, 2011). También presenta linalool, eugenol y otros compuestos fenólicos (Shan y Col., 2007). Hitokoto y Col., (1980) reportan que la canela tiene un fuerte efecto inhibitorio en mohos, incluyendo *Aspergillus parasiticus*.

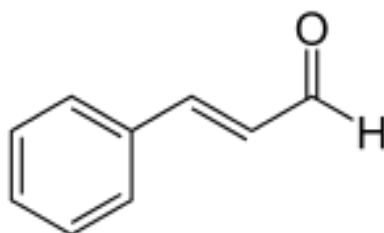


Figura 3. Estructura química de cinamaldehído (imagen obtenida de internet).

A continuación, en la tabla 2, se presentan los principales compuestos en los aceites esenciales de orégano y canela, los cuales exhiben propiedades antimicrobianas.

Tabla 2. Principales compuestos con actividad antimicrobiana en los aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y orégano (*Origanum vulgare*)

Nombre común	Nombre científico	Compuesto	Concentración (%)	Referencia
Canela	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Trans-cinamaldehído	50-80	Belitz <i>et al.</i> , 2004; Burt, 2004
		Eugenol	10	
		Safrol	0-11	
		Linalol	10-15	
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol	0-80	Baratta <i>et al.</i> , 1998; Russo <i>et al.</i> , 1998; Belitz <i>et al.</i> , 2004; Burt, 2004.
		Timol	0-64	
		γ -Terpineno	2-52	
		ϵ -Cimeno	0-52	

(Adaptado por Gómez y López, 2009)

4.8 Películas comestibles

Las películas comestibles en el área de alimentos funcionan como barreras selectivas para la transferencia de gases, humedad y nutrientes; son utilizadas porque ayudan a disminuir el deterioro de productos alimenticios causado por factores ambientales. De igual manera, se busca que eviten o disminuyan la oxidación y pérdida de compuestos volátiles responsables de sabores y propiedades específicas de los alimentos (Domínguez y Jiménez, 2012).

La figura 4 es una representación esquemática de la conservación de alimentos mediante el uso de películas comestibles, que pueden tener actividad, evitando el deterioro en un alimento provocado por la respiración, deshidratación, ganancia de humedad, desarrollo superficial de microorganismos u oxidación (Guilbert y Col., 2002).

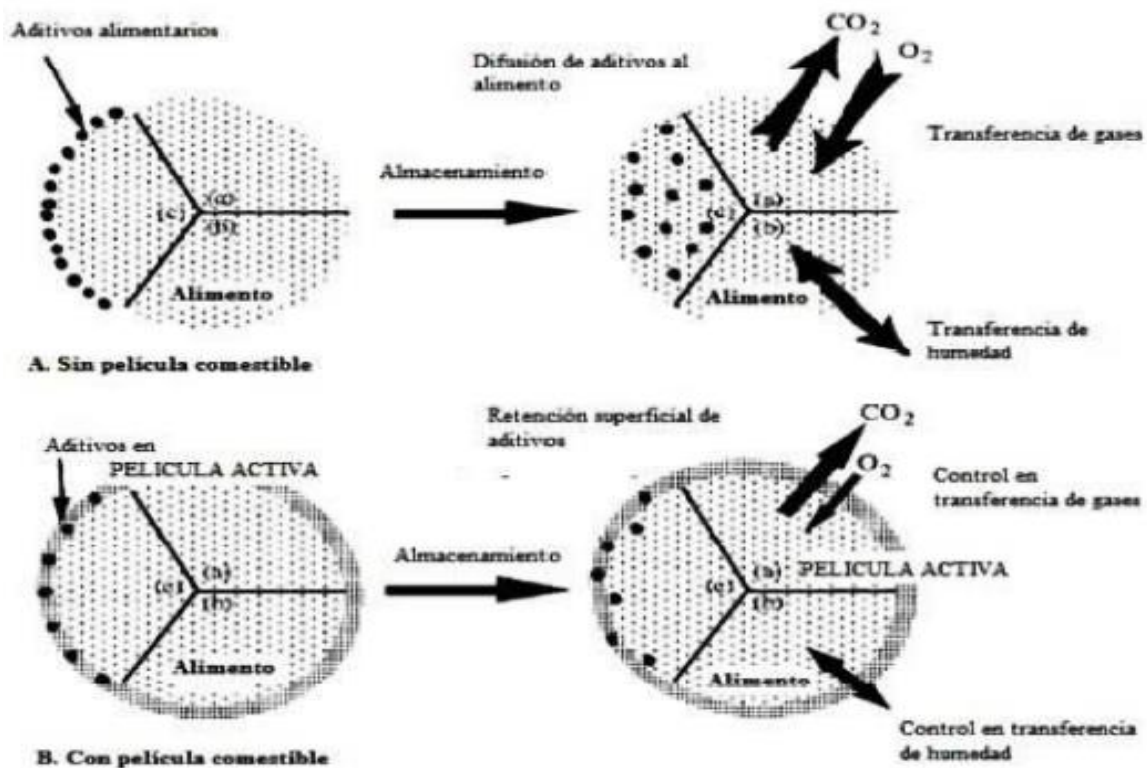


Figura 4. Representación esquemática de la conservación de alimentos con y sin películas comestibles adicionadas con diversos tipos de aditivos (Rooney, 2002).

Debido a la preocupación de sustituir empaques plásticos por empaques biodegradables, existen diversos estudios de películas comestibles, que además de las características otorgadas, pueden ser ingeridas con el alimento. Se busca que la materia prima provenga de una fuente renovable, abundante y económica, para que el uso industrial sea factible. Por tal motivo, se han realizado diversos estudios utilizando polisacáridos como materiales para la formulación de películas comestibles. Los polisacáridos se obtienen de fuentes naturales, principalmente de origen vegetal. Los más utilizados para la formación de películas comestibles incluyen celulosa y sus derivados, almidón de diversas fuentes, gomas, carrageninas y alginato (Domínguez y Jiménez, 2012).

Para la formación de películas comestibles muchas veces es necesario agregar un plastificante para mejorar las propiedades mecánicas de las mismas. Los plastificantes usados incluyen glicerol, polietilenglicol, sorbitol y algunos azúcares, entre otros. Debido a que el plastificante reduce los enlaces intermoleculares entre las cadenas de polímeros, los plastificantes modifican las propiedades mecánicas y producen películas más flexibles (Campos y Col., 2011).

Una funcionalidad importante de los recubrimientos y películas comestibles es su habilidad para incorporar ingredientes activos, ya que pueden servir como soporte de aditivos capaces de conservar y mejorar la calidad del producto. Es posible utilizarlos, por ejemplo, en frutas frescas cortadas para mejorar su calidad y vida útil con la incorporación de antioxidantes, antimicrobianos y mejoradores de textura. Asimismo, se pueden utilizar como alternativa a la aplicación de antimicrobianos por el método de inmersión, técnica que provocaba difusión de los agentes antimicrobianos hacia el interior del producto causando pérdida de efectividad de dichos agentes por no alcanzarse la concentración mínima necesaria para la inhibición del desarrollo de microorganismos (Parzanese, 2013).

4.9 Películas comestibles adicionadas con antimicrobianos de origen natural

Las películas y recubrimientos antimicrobianos han innovado el concepto de empaque activo y se han desarrollado para reducir, inhibir o detener el crecimiento

de microorganismos sobre la superficie de los alimentos. En la mayoría de productos frescos o procesados, la contaminación microbiana se lleva a cabo y con una alta intensidad sobre la superficie del alimento, por lo tanto se requiere un efectivo sistema de control de crecimiento de dicha biota. Tradicionalmente, los agentes antimicrobianos son adicionados directamente a los alimentos, pero su actividad puede ser inhibida por diferentes sustancias que forman parte del alimento, de manera que se puede disminuir su eficiencia. En tales casos, la implementación de películas o recubrimientos antimicrobianos puede ser más eficiente que los aditivos que se utilizan en el producto alimenticio, ya que desde éstos se puede migrar selectiva y gradualmente compuestos desde el empaque a la superficie del alimento (Quintero y Col., 2010).

La aplicación de películas o recubrimientos comestibles es una tecnología que está ganando importancia para prolongar la conservación de la calidad en fresco de frutas y hortalizas. No sólo constituyen barreras que reducen la permeabilidad e intercambio de moléculas con el ambiente, sino que además son un excelente vehículo para la incorporación de agentes antimicrobianos naturales que garantizan la seguridad alimenticia sin contribuir a la contaminación ambiental (Salgado-Garciglia, 2015).

Las películas comestibles tienen la capacidad de incorporar agentes antimicrobianos para proveer estabilidad microbiológica a los alimentos; ya que sirven como acarreadoras de un amplio número de compuestos (Lin y Zhao, 2007; Ozdemir y Floros, 2008).

Las películas comestibles formadas como recubrimientos o preformadas entre los componentes de un alimento, amplían las posibilidades de mejorar la calidad de los alimentos heterogéneos mediante el control de la migración de humedad, grasas, aromas, sabores y colores entre los componentes de un alimento o hacia el exterior del mismo, teniendo el potencial de mantener la calidad de un alimento después de abierto el empaque. Tomando en cuenta que en algunos alimentos el crecimiento microbiano se desarrolla en las superficies y que dicho crecimiento es la causa principal de su deterioro, la elaboración de las películas comestibles con

antimicrobianos se convierte en un área de investigación prometedora. Lo anterior se debe a que la aplicación directa de antimicrobianos en alimentos mediante aspersión, en polvo u otros métodos tiene beneficios limitados, debido a que las sustancias activas son neutralizadas al contacto o se difunden rápidamente de la superficie al interior del producto. La adición de antimicrobianos a películas comestibles muestra ventajas como el uso de menores concentraciones de antimicrobianos y una velocidad de difusión menor (Avila-Sosa y López-Malo, 2008).

Una de las principales desventajas que poseen las películas comestibles es que los diferentes polímeros tienen una naturaleza hidrofílica, los que como consecuencia, cuando están expuestos a ciertos niveles de humedad, tienden a solubilizarse. Para resolver esto se pueden añadir compuestos hidrofóbicos, sin embargo pueden afectar las propiedades mecánicas y funcionales de las películas ya que es necesario añadirlos en cantidades considerables (Akbari y Col., 2007).

Recientemente una de las formas más novedosas para resolver este problema es mediante la incorporación de nanocompuestos a la estructura de películas comestibles. Este tipo de aplicaciones se ha empezado a utilizar con mayor frecuencia ya que tienen como ventaja el de mejorar las propiedades físicas y de barrera de las películas comestibles con pequeñas concentraciones en comparación de otros compuestos que se utilizan de manera tradicional (George y Col., 2014).

4.10. Nanocompuestos

Se define a los nanocompuestos como sistemas que contienen partículas inorgánicas con al menos una dimensión en el rango nanométrico. Los más comunes son aquellos derivados de la arcilla como la montmorillonita, la hectrita y la saponita. Químicamente son láminas apiladas de silicio en forma tetrahédrica que se intercalan a una capa octahédrica de borde compartido con magnesio o hidróxido de aluminio, con una alta relación de aspecto y morfología de tipo placa

la cual juega un papel muy importante para reforzar las estructuras que se forman en las diferentes capas del polímero (Lagaly, 1999; Giannelis, 1996).

Las arcillas minerales empleadas en la elaboración de nanocompuestos pertenecen a la familia estructural conocida como filosilicatos. En su aspecto primario, las partículas de arcilla se componen de la asociación de varias láminas apiladas, las cuales forman agregados irregulares, tal como se presenta en la figura 5. A gran escala, cada lamina posee una elevada relación de aspecto, de 100 a 200 nm de longitud y 1 nm de espesor con lo cual se pueden alcanzar altos rendimientos en comparación con los polímeros no reforzados (Franco y Maspoch, 2009).

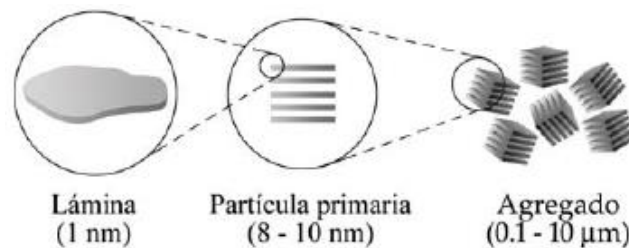
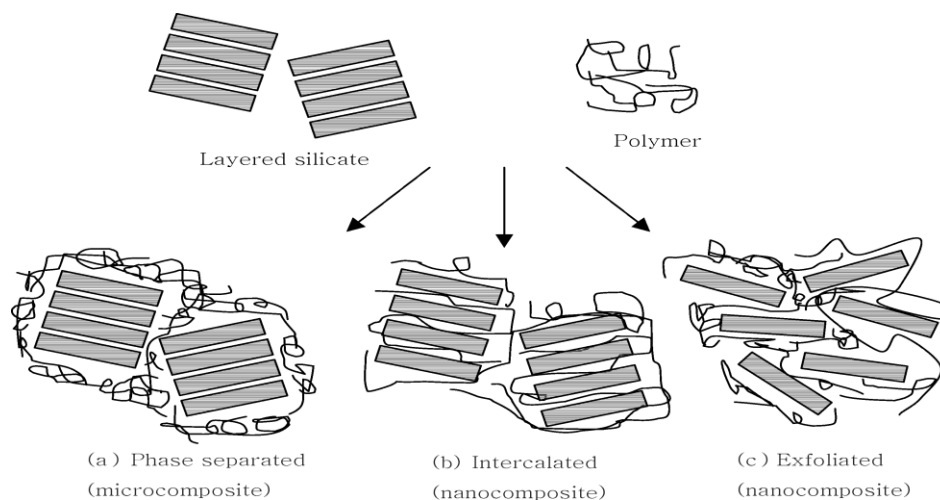


Figura 5. Microestructura laminar de las arcillas (Franco y Maspoch, 2009).

Cuando estas arcillas se mezclan con un polímero, tres tipos de compuestos se obtienen comúnmente: tactoide, intercalado y estructuras exfoliadas (Figura 6).

Figura 6. Tipos de estructura compuesta de capas de polímeros de materiales de arcilla de silicato.



(Adaptado de McGlashan y Halley, 2003)

En las estructuras tactoides, las partículas completas de arcilla se dispersan dentro de la matriz de arcilla y las capas no se separan. La mezcla de polímero y arcillas son compuestos microescala, y la arcilla sólo sirve como un relleno convencional. La intercalación y exfoliación producen dos compuestos ideales a nanoescala. En un nanocompuesto intercalado será impulsado a menudo una sola cadena de polímero entre las capas de silicato de arcilla, pero el sistema sigue siendo bastante bien ordenado en un tipo de disposición apilada. En un nanocompuesto exfoliado las capas de silicato están completamente deslaminadas unas de otras y están bien dispersadas. Es esta segunda del tipo nanocompuesto exfoliado, que se ha demostrado que presentan las mejoras más significativas en las propiedades físicas. La formación de la intercalación o exfoliación depende del tipo de arcilla orgánica y sobre las condiciones de procesamiento (Jong-Whan y Perry, 2007).

4.10.1 Haloisita

La haloisita es un mineral de arcilla dioctaédrico con una amplia distribución en suelos tropicales muy húmedos y regiones subtropicales, y está formada por la meteorización de varios tipos de rocas ígneas y no ígneas (Joussein y col., 2007).

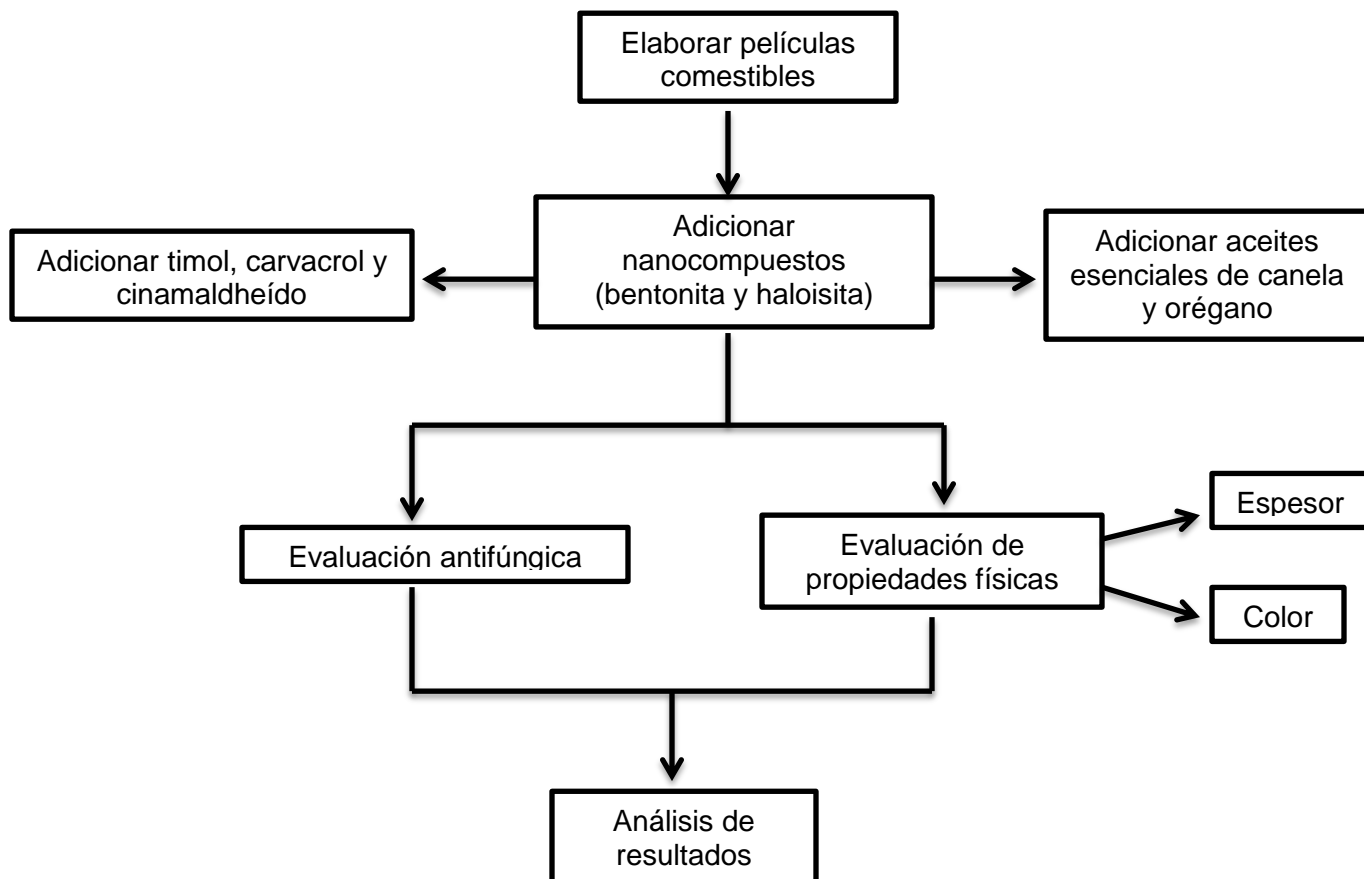
La haloisita puede ser considerada como un polimorfo hidratado de la caolinita con láminas curvadas que es capaz de ubicar moléculas de agua en el espaciado interlaminar, dando una fórmula general de $\text{Si}_2\text{Al}_2\text{O}_5(\text{OH})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Las partículas de haloisita pueden adoptar diferentes morfologías como esferas, tubos, placas o listones. La forma tubular alargada está relativamente mejor cristalizada, por lo que es la morfología más comúnmente encontrada generando una estructura con cavidad nanotubular en el alcance submicroscópico (Carrillo y Col., 2014).

4.10.2 Bentonita

Las bentonitas constituyen una roca de especial interés por cuanto sus características físico-químicas las convierten en material plenamente adecuado para una gran variedad de aplicaciones (Vega y Col., 1993).

Es una arcilla formada esencialmente por minerales del grupo de la esmectita, independientemente de su ocurrencia u origen. Es clasificada en sódica y cálcica, en base al catión predominante entre las capas y a la habilidad para dilatarse. La bentonita sódica (Na^+) exhibe una alta capacidad de dilatación en agua, mientras que la bentonita cálcica (Ca^+) tiene mucho menos capacidad de dilatación. Las propiedades de la bentonita no dependen sólo del mineral esmectítico predominante sino también de su grado de cristalinidad y del tamaño de los cristales, entre otros aspectos, por lo tanto las propiedades pueden variar enormemente. Por lo anterior, las aplicaciones son amplias y las especificaciones para cada caso son muy particulares (Coordinación General de Minería; 2013).

5. Diagrama de trabajo



6. MATERIALES Y MÉTODOS

- Material de vidrio: el necesario para cada determinación.
- Reactivos: los necesarios para cada determinación en grado analítico.
- Material biológico: cepas de *Aspergillus niger*, *Fusarium spp.* y *Rhizopus spp.* obtenidas del cepario de la facultad de ciencias químicas, BUAP.

Tabla 3. Métodos y referencias

Determinación	Técnica	Referencia
Elaboración de películas comestibles	Vaciado en placa	Bertuzzi <i>et al.</i> 2007
Actividad antimicrobiana de las películas	Crecimiento radial	Avila- Sosa <i>et al.</i> 2010
Color de las películas	Parámetros de la escala de Hunter	Sánchez-González <i>et al.</i> , 2011
Espesor	Instrumental	López-Quezada, 2007

Tabla 4. Equipos utilizados

Equipo	Marca	Modelo
Cámara Fotográfica	SAMSUNG	PL50
Software: Medidor de Color Digital	Apple MacBook (IOS)	5.10
Estufa de vacío	LMIM	
Micrómetro milimétrico	METROMEX	111-B
Agitador	IKA	RW11
Campana de flujo laminar vertical	ESEVE	FLV-102
Vernier de plástico de 0-15 cm	Surtek	

7. METODOLOGÍA

7.1 Elaboración de las películas comestibles

Se utilizaron polímeros de almidón y carboximetilcelulosa. Se elaboraron películas comestibles variando las concentraciones de nanocompuestos en 1%, 2% y 3% (bentonita y haloisita) y se adicionaron los diferentes tipos de antimicrobianos naturales a diferentes concentraciones 0, 0.5%, 1%, 2% y 4% para aceites esenciales (orégano mexicano y canela) y compuestos puros (timol, carvacrol y cinamaldehído) en concentraciones de 0%, 0.05%, 0.1% y 0.2%. Todas las películas se realizaron con el método de vaciado en placa, la cual consiste en la homogenización de la solución formadora de película con el plastificante, la inclusión del nanocompuesto y el antimicrobiano en cuestión. Posteriormente un volumen conocido de dicha solución se vertió en placas Petri y se secaron a 32°C en condiciones de vacío, para aquellas películas que fueron sometidas a la prueba de efectividad antimicrobiana se realizó el mismo procedimiento en condiciones de esterilidad (Bertuzzi *et al.* 2007).

7.2 Actividad antimicrobiana de las películas

Se evaluó la actividad antimicrobiana de las películas elaboradas contra *Fusarium*, *Rhizopus* y *Aspergillus* evaluando el crecimiento radial. A partir de una placa en agar papa dextrosa (PDA) con crecimiento masivo de los diferentes microorganismos se obtuvo una solución de esporas mediante el vertido de 5ml de agua estéril y un posterior raspado suave del hongo con un asa bacteriológica, el número de esporas presentes en la solución inicial se determinó con ayuda de una cámara de Neubauer y un microscopio, a partir de esta solución de esporas se hicieron diluciones seriadas hasta llegar a una dilución aproximada de 10^5 esporas/mL, esta dilución se usó para hacer el estudio *in vitro* de la efectividad antimicrobiana de las películas elaboradas, un disco de la película se colocó en el centro de una placa con PDA para después sobre el disco inocular 10µL de la solución de esporas. Las placas se incubaron a 25°C. El crecimiento radial se midió cada 24hrs durante 9 días (Avila- Sosa *et al.* 2010).

7.3 Caracterización de las películas

A las películas seleccionadas se les determinaron sus propiedades físicas tales como color y espesor.

Tabla 5. Combinaciones de películas comestibles

	Nanocompuesto	Antimicrobiano		Nanompuesto	Antimicrobiano	
	Almidón	Bentonita		A.E. de canela	Carboximetilcelulosa	Bentonita
A.E. de orégano			A.E. de orégano			
Carvacrol			Carvacrol			
Cinamaldehído			Cinamaldehído			
Timol			Timol			
Haloisita		A.E. de canela	A.E. de canela	Haloisita		A.E. de canela
		A.E. de orégano	A.E. de orégano			A.E. de orégano
		Carvacrol	Carvacrol			Carvacrol
		Cinamaldehído	Cinamaldehído			Cinamaldehído
		Timol	Timol			Timol

7.3.1 Color

Para la determinación de los parámetros de luminosidad y tono se utilizó un colorímetro donde se midieron en 5 puntos diferentes de la película y se obtuvieron los parámetros de la escala de Hunter de L* (luminosidad), a* (verde-rojo) y b* (azul- amarillo). A partir de estos parámetros se determinó el tono (h*) (Sánchez-González y Col., 2011).

Para calcular el tono (h*) se utilizó la siguiente formula:

$$h = \tan^{-1}[b/a]$$

Dónde: a= croma (propiedad del color) y b= matriz o tono (López-Mendoza, 2010).

7.3.2 Espesor

Para determinar el espesor de las películas se utilizó un micrómetro milimétrico donde se midieron 5 puntos diferentes de las películas. En cada medición, las películas se pusieron entre el tope y la espiga del micrómetro ajustando el tambor móvil hasta determinar el espesor. A partir de estas mediciones se obtuvieron los promedios para determinar el espesor para cada película.

7.4 Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado de las cuales se reportó el promedio y las desviaciones estándar. Para determinar si había diferencias significativas entre los grupos analizados, se realizó la comparación por un análisis de varianza (ANOVA) con un análisis de medidas por el método de Tukey con intervalo de confianza del 95%. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Minitab 16.1.0.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Evaluación antifúngica

8.1.1 *Aspergillus niger*

En las figuras 7 y 8, se puede observar que las películas que contienen aceite esencial (AE) de orégano, timol, carvacrol y cinamaldehído respectivamente, ejercen un efecto antifúngico en contra de *Aspergillus niger* inhibiendo su crecimiento. Los nanocompuestos (haloisita y bentonita) adicionados favorecen la capacidad antifúngica de las películas comestibles, puesto que las películas adicionadas con AE de orégano + nanocompuestos, presentan una CMI de 1%. El efecto deseado no fue obtenido para el caso de películas comestibles adicionadas con los nanocompuestos + AE de canela (anexo, figura A). A comparación con los valores reportados por Ortiz López (2013), la concentración mínima inhibitoria (CMI) de películas comestibles elaboradas a base de almidón + AE de orégano y canela en contra de *Aspergillus niger* fue de 2%.

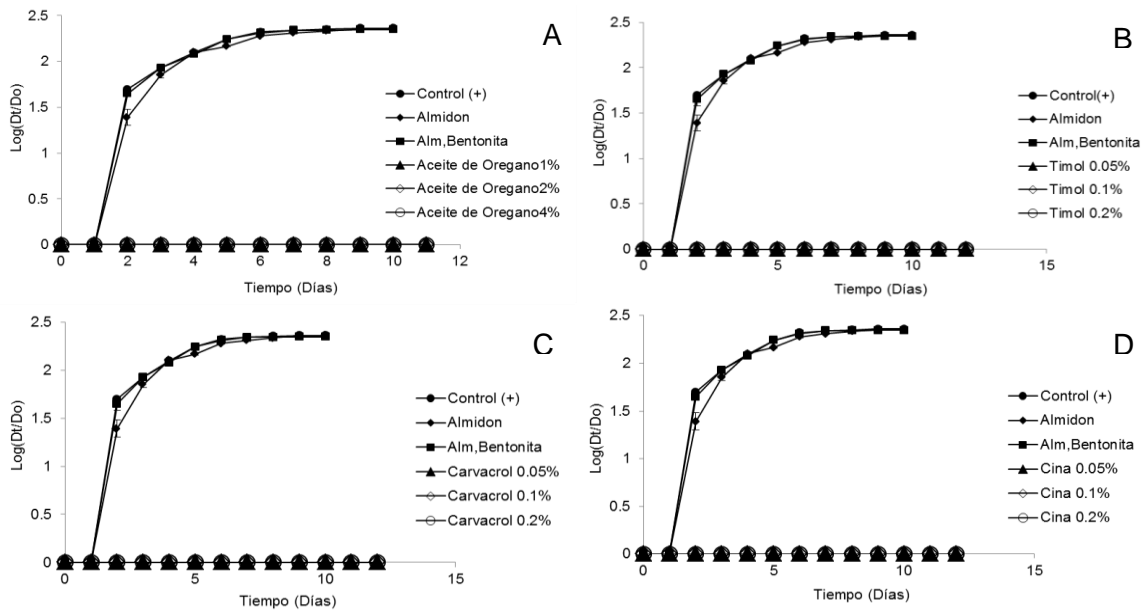


Figura 7. Cinética de crecimiento para *Aspergillus niger*, en presencia de películas comestibles elaboradas con almidón y, A) bentonita + aceite de orégano a diferentes concentraciones, B) bentonita + timol a diferentes concentraciones, C) bentonita + carvacrol a diferentes concentraciones, D) bentonita + cinamaldehído a diferentes concentraciones.

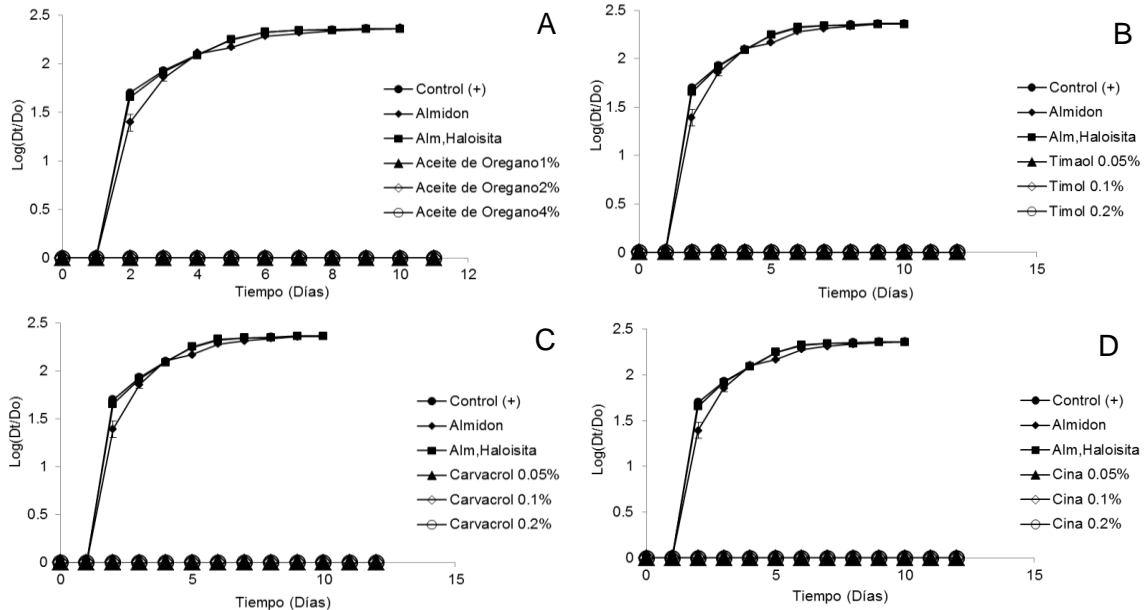


Figura 8. Cinética de crecimiento para *Aspergillus niger*, en presencia de películas comestibles elaboradas con almidón y, A) haloisita + aceite esencial de orégano a diferentes concentraciones, B) haloisita + timol a diferentes concentraciones, C) haloisita + carvacrol a diferentes concentraciones, D) haloisita + cinamaldehído a diferentes concentraciones.

Para el caso de las películas adicionadas con bentonita y AE de canela se presentó inhibición únicamente al incrementar la cantidad del nanocompuesto en un 3%, y en las adicionadas con haloisita (anexo, figura A), su CMI es de 4% perdiendo su efecto al incrementar la cantidad del nanocompuesto. En este caso los nanocompuestos afectaron la acción del AE de canela. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) encontradas en este trabajo, fueron de 1% para el AE de orégano, y de 0.05% para timol, carvacrol y cinamadehído.

En las películas comestibles elaboradas a base de carboximetilcelulosa figuras 9 y 10, se observa que éstas inhiben el crecimiento del hongo, encontrando diferencias para las diversas películas dependiendo del nanocompuesto y antimicrobiano. Para el caso de AE de canela, se incrementó la concentración de los nanocompuestos (bentonita y haloisita) en 2 y 3 por ciento, pudiéndose observar que las películas mantuvieron su efecto antifúngico.

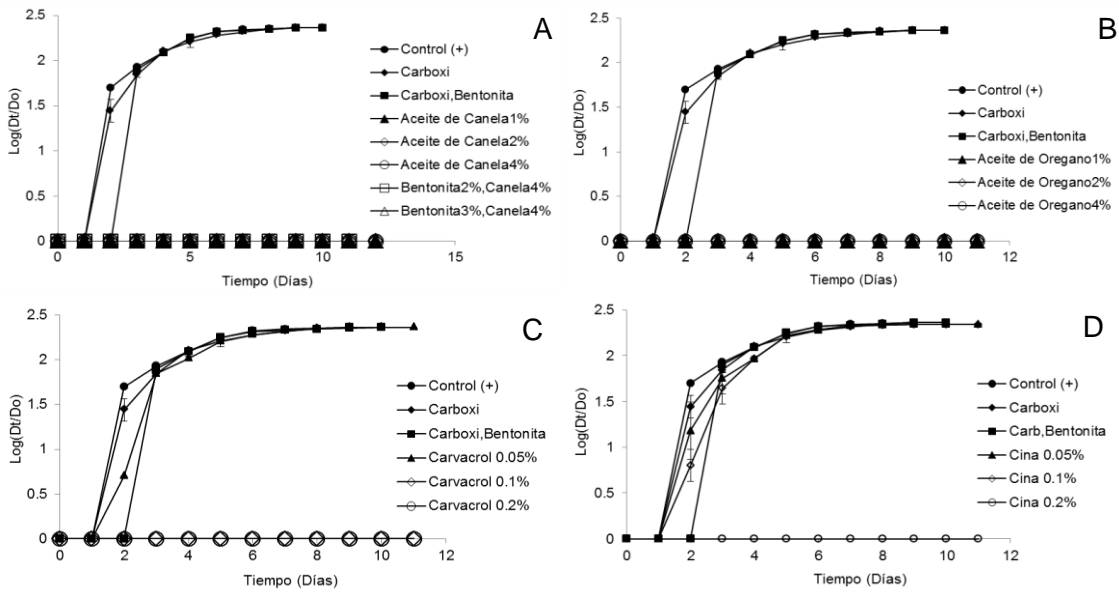


Figura 9. Cinética de crecimiento para *Aspergillus niger*, en presencia de películas comestibles elaboradas con carboximetilcelulosa y A) bentonita a diferentes concentraciones + aceite esencial de canela a diferentes concentraciones, B) bentonita + aceite esencial de orégano a diferentes concentraciones, C) bentonita + carvacrol a diferentes concentraciones, D) bentonita + cinamaldehído a diferentes concentraciones.

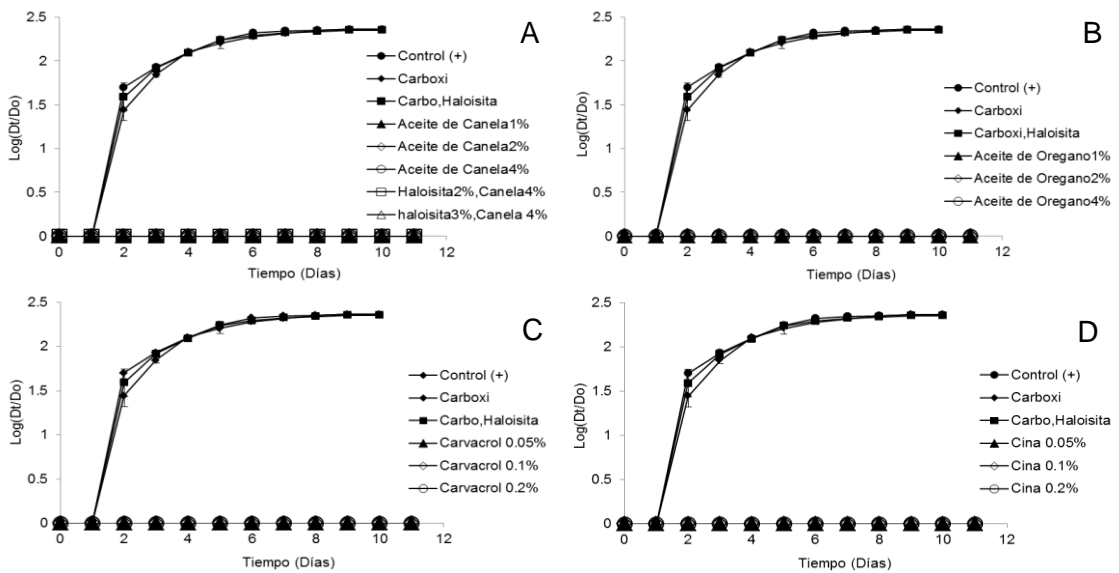


Figura 10. Cinética de crecimiento para *Aspergillus niger*, en presencia de películas comestibles elaboradas con carboximetilcelulosa y A) haloisita a diferentes concentraciones + aceite esencial de canela a diferentes concentraciones, B) haloisita y aceite esencial de orégano a diferentes concentraciones, C) haloisita + carvacrol a diferentes concentraciones, D) haloisita + cinamaldehído a diferentes concentraciones.

Estas películas presentaron un mejor efecto antifúngico en cuanto a los AE de orégano y canela, confirmándose lo reportado por Ramírez Penagos (2013), quien reportó que las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de películas comestibles elaboradas a base de carboximetilcelulosa + AE de orégano y canela en contra de *Aspergillus niger*, era de 4%. Se puede observar que los nanocompuestos (haloisita y bentonita) modificaron la efectividad de las películas al incrementar la capacidad antifúngica de los AE de canela y orégano al exponerlos de una forma más efectiva puesto que la CMI fue de 1%. Esto demuestra que los nanocompuestos mejoran la capacidad antifúngica de películas comestibles.

La CMI de las películas adicionadas con bentonita y carvacrol fue de 0.1%. Para las películas adicionadas con bentonita y cinamaldehído fue de 0.2%. Las películas adicionadas con haloisita + carvacrol y cinamaldehído (figura 10) presentaron un CMI de 0.05% en ambos casos.

8.1.2. *Fusarium* spp.

Fusarium spp. demostró ser más resistente a la presencia de las películas comestibles adicionadas con nanocompuestos y antimicrobianos de origen natural. En la figura 11 las películas de almidón adicionadas con haloisita y AE de orégano no inhibieron el crecimiento de *Fusarium* spp., retardan su crecimiento hasta el tercer y cuarto día, siendo la concentración de aceite esencial de orégano al 4% quien ejerció un mayor efecto. Para el AE de canela se pudo observar que a mayor concentración el efecto sobre el hongo es mayor hasta la concentración al 4% donde se inhibe el crecimiento del hongo.

También se probó incrementando la concentración del nanocompuesto (haloisita) en 2 y 3 por ciento, con una concentración de 2% de AE de canela (figura 11 B) en las películas con un 2%, la capacidad antifúngica mejoró al inhibir el crecimiento del hongo. En caso de las películas que se incrementaron en un 3% del nanocompuesto la efectividad antifúngica disminuyó. Las películas adicionadas

con AE de orégano, cinamaldehído y timol respectivamente no ejercieron un efecto inhibitorio sobre *Fusarium* spp.

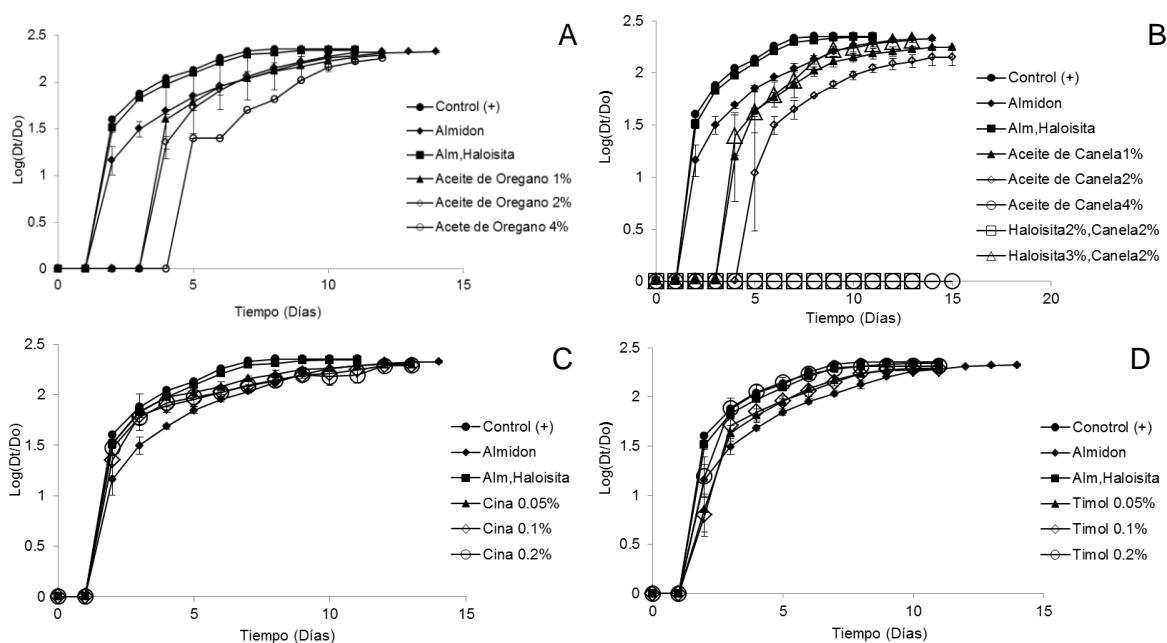


Figura 11. Cinética de crecimiento para *Fusarium* spp., en presencia de películas comestibles elaboradas con almidón y, A) haloisita + aceite esencial de orégano a diferentes concentraciones, B) haloisita a diferentes concentraciones + aceite esencial de canela a diferentes concentraciones, C) haloisita + cinamaldehído a diferentes concentraciones, D) haloisita + timol a diferentes concentraciones.

Al utilizar el mismo polímero (almidón) y cambiar el nanocompuesto ahora utilizando bentonita (figura 12), en las películas que contienen AE de orégano y canela respectivamente se pudo observar que a mayor concentración del AE, el efecto sobre el hongo era mayor, hasta inhibir el crecimiento de *Fusarium* spp con una concentración de 4% de los aceites. Se incrementó la concentración del nanocompuesto (bentonita) en 2 y 3 por ciento, con una concentración de 2% AE de canela (figura 12 B), observándose que para el caso de 3% de bentonita la capacidad antifúngica de las películas mejoró al inhibir el crecimiento del hongo. Las películas que se incrementaron en un 2% del nanocompuesto, la efectividad antifúngica disminuyó. Cinamaldehído y carvacrol respectivamente no ejercieron un efecto inhibitorio sobre *Fusarium* spp.

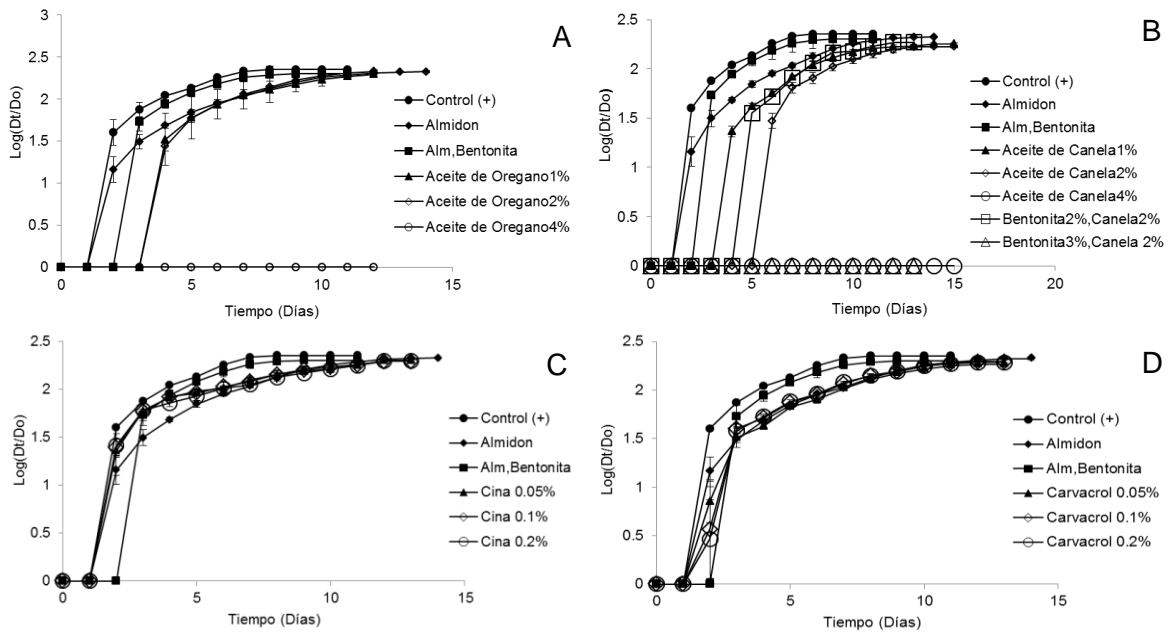


Figura 12. Cinética de crecimiento para *Fusarium* spp., en presencia de películas comestibles elaboradas con almidón y, A) bentonita + aceite esencial de orégano a diferentes concentraciones, B) bentonita a diferentes concentraciones + aceite esencial de canela a diferentes concentraciones, C) bentonita + cinamaldehído a diferentes concentraciones, D) bentonita + carvacrol a diferentes concentraciones.

Al cambiar el polímero por carboximetilcelulosa para la elaboración de las películas y añadidas con haloisita y aceite esencial de orégano, estas no inhibieron el crecimiento de *Fusarium* spp. resultados similares a las elaboradas a base de almidón y haloisita, obteniendo los mismos resultados para cinamaldehído y timol (figura 13), para este caso el aceite esencial de canela no inhibe el crecimiento del hongo pero retarda su crecimiento hasta el quinto día, y solo logra inhibir el crecimiento de *Fusarium* spp. al incrementar la concentración del nanocompuesto (haloisita) en 2 y 3 por ciento, con una concentración de 4% de aceite esencial de canela (figura 13 B).

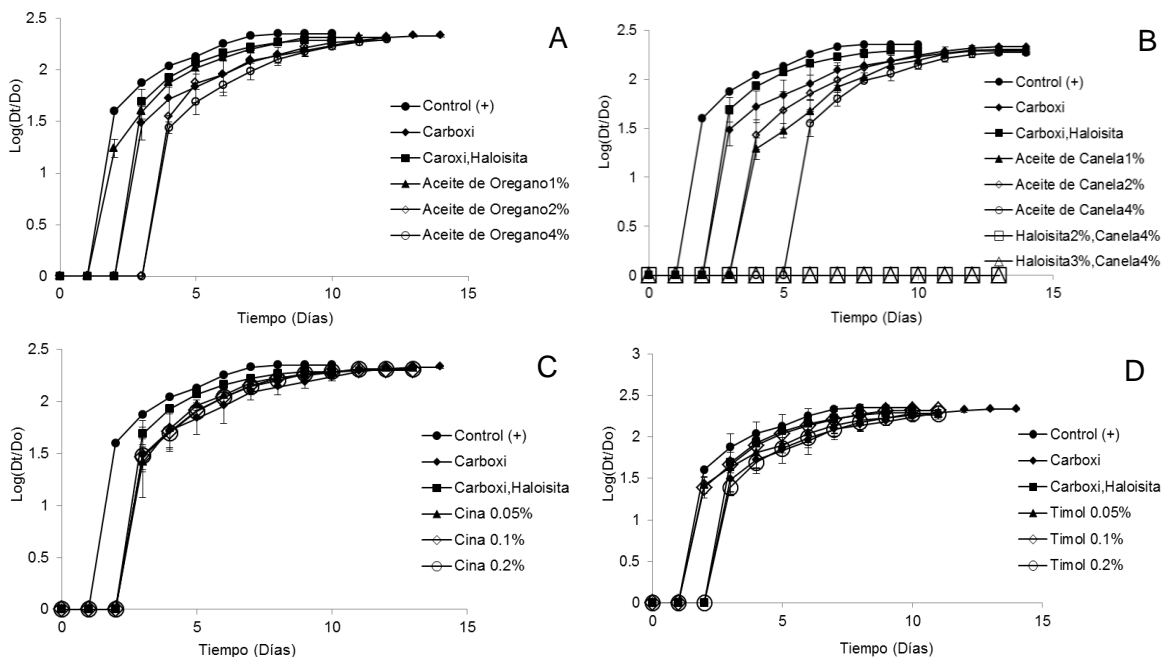


Figura 13. Cinética de crecimiento para *Fusarium* spp., en presencia de películas comestibles elaboradas con carboximetilcelulosa y, A) haloisita + aceite esencial de orégano a diferentes concentraciones, B) haloisita a diferentes concentraciones + aceite esencial de canela a diferentes concentraciones, C) haloisita + cinamalehído a diferentes concentraciones, D) haloisita + timol a diferentes concentraciones.

Siendo de igual manera los resultados obtenidos con películas a base de carboximetilcelulosa (figura 14) a las películas elaboradas a base de almidón adicionadas con bentonita, ya que las que contienen AE de orégano y canela retardan el crecimiento de *Fusarium* spp., siendo las concentraciones de AE al 4% quien ejerce un mayor efecto al inhibir el crecimiento del hongo. En el caso de cinamaldehído y timol, puede observarse que no ejercen un efecto antifúngico en contra de *Fusarium* spp. Probándose el incremento de la concentración de bentonita en 2 y 3 por ciento, con una concentración de 4% de AE de canela (figura 14 B), observándose que para ambos casos se mantuvo la capacidad antifúngica de las películas al inhibir el crecimiento del hongo.

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) fueron de 4% para el AE de canela + 2% y 3% de nanocompuesto. Puede observarse que las CMI fueron de 4% para los AE de orégano y canela respectivamente. Para las películas

adicionadas con cinamaldehído y carvacrol respectivamente no ejercieron un efecto inhibitorio sobre *Fusarium* spp.

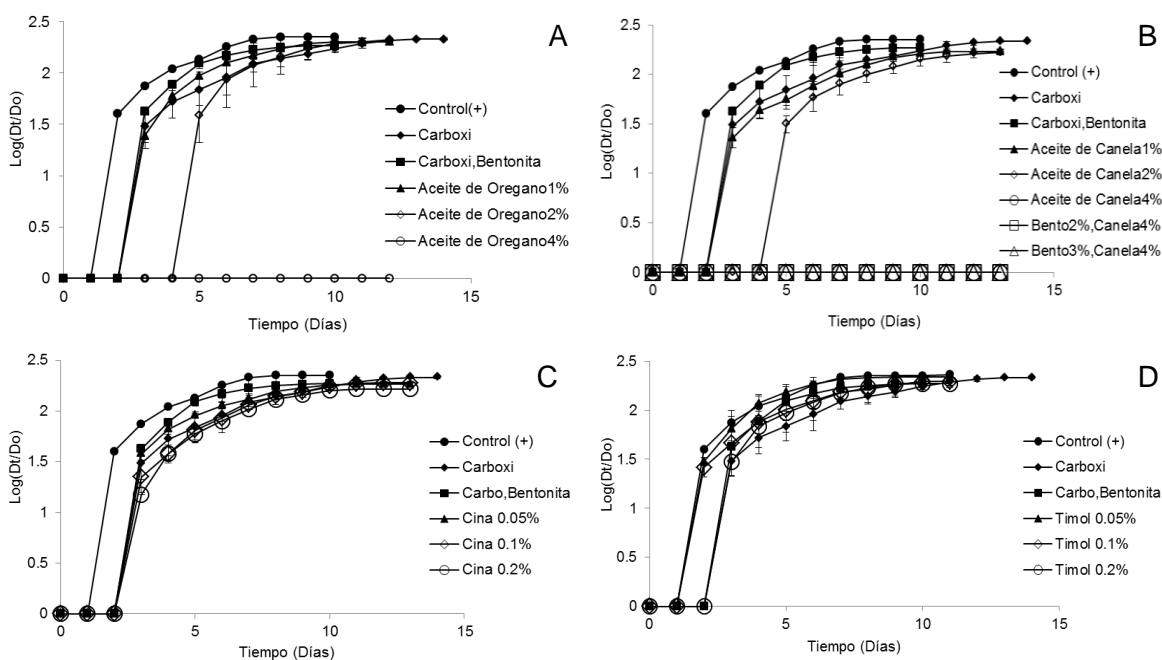


Figura 14. Cinética de crecimiento para *Fusarium* spp., en presencia de películas comestibles elaboradas con carboximetilcelulosa y, A) bentonita + aceite esencial de orégano a diferentes concentraciones, B) bentonita a diferentes concentraciones + aceite esencial de canela a diferentes concentraciones, C) bentonita + cinamaldehído a diferentes concentraciones, D) bentonita + timol a diferentes concentraciones.

8.1.3. *Rhizopus* spp.

Las películas comestibles probadas en contra de *Rhizopus* spp. tuvieron un mejor efecto, esto se puede observar para el caso del AE de orégano + bentonita quien presenta una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0.5% y para aceite esencial de orégano + haloisita presenta una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 2% (figuras 15 y 16) así también cinamaldehído y carvacrol respectivamente, ejercen un efecto antifúngico en contra de *Rhizopus* spp. inhibiendo su crecimiento, se pueden observar diferencias en cuanto al tipo de nanocompuesto aplicado y antimicrobiano en cuestión.

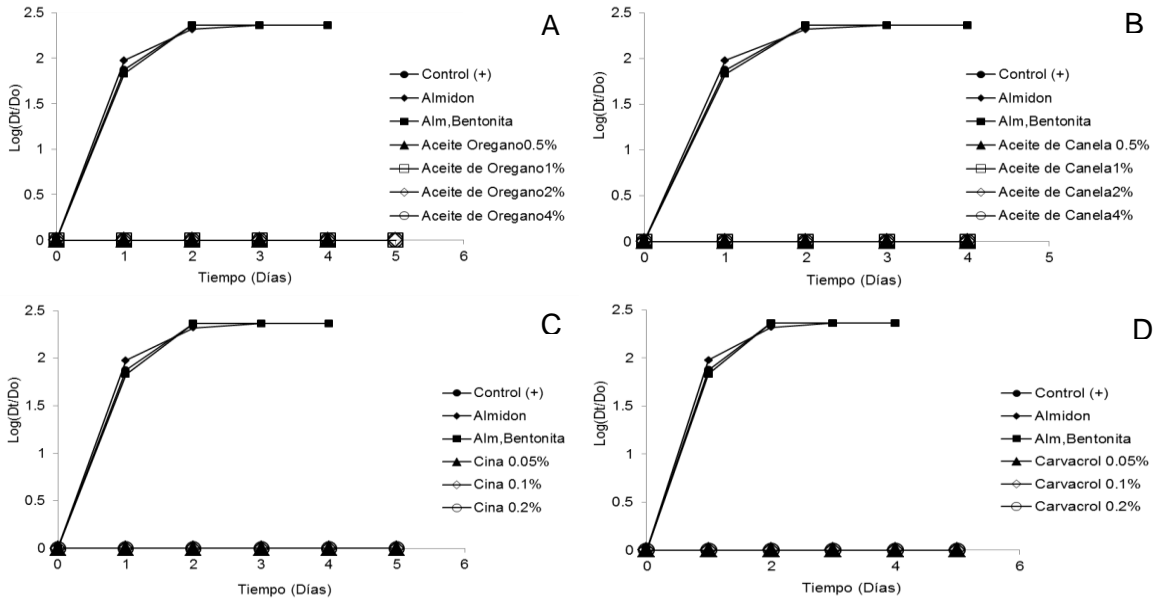


Figura 15. Cinética de crecimiento para *Rhizopus* spp., en presencia de películas comestibles elaboradas con almidón y A) bentonita + aceite esencial de orégano a diferentes concentraciones, B) bentonita + aceite esencial de canela a diferentes concentraciones, C) bentonita + cinamaldehído a diferentes concentraciones, D) bentonita + carvacrol a diferentes concentraciones.

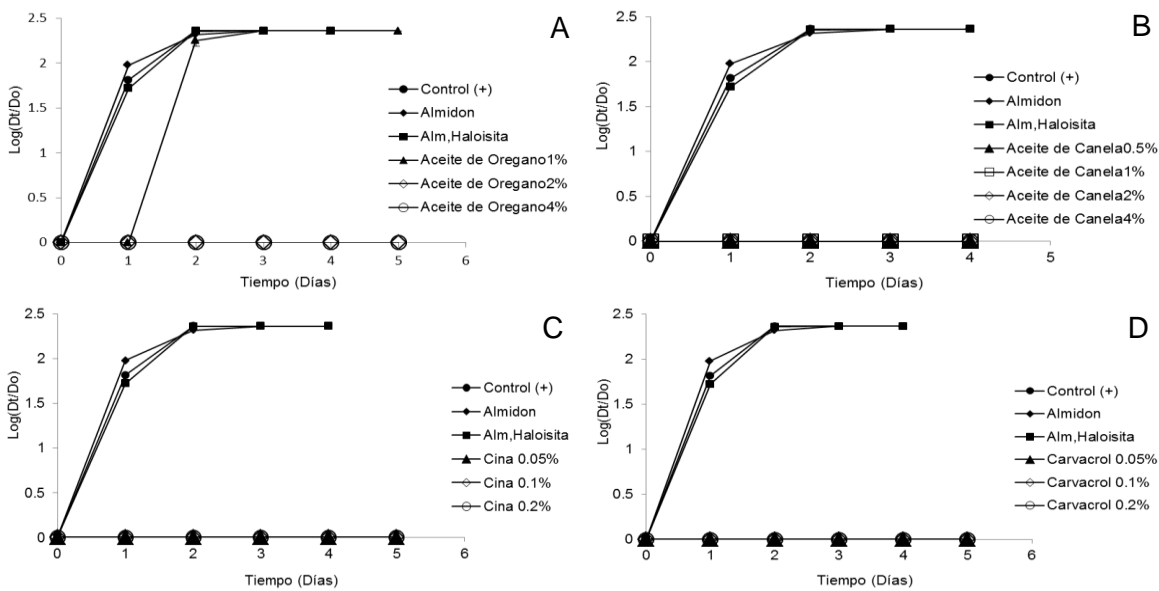


Figura 16. Cinética de crecimiento para *Rhizopus* spp., en presencia de películas comestibles elaboradas con almidón y A) haloisita + aceite esencial de orégano a diferentes concentraciones, B) Haloisita + Aceite esencial de canela a diferentes concentraciones, C) haloisita + cinamaldehído a diferentes concentraciones, D) haloisita + carvacrol a diferentes concentraciones.

Tal como lo reportado por Ortiz López (2013) quien afirma que los aceites esenciales de orégano y canela tienen efecto inhibitorio en contra de *Rhizopus* spp. en su trabajo las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de películas comestibles elaboradas a base de almidón + AE de orégano fue de 0.25%, mientras que para las películas comestibles elaboradas a base de almidón + AE de canela fue de 4%. En este trabajo las películas comestibles adicionadas con AE de orégano + bentonita la CMI fue de 0.5% (no se probó con una concentración menor). Para el caso de las películas comestibles adicionadas con AE de orégano + haloisita la CMI fue de 2%. Y para las películas comestibles adicionadas con los nanocompuestos + AE de canela, la capacidad antifúngica se vio incrementada puesto que la CMI fue de 0.5%. Esto demuestra que los nanocompuestos modifican la capacidad antifúngica de películas comestibles al exponer, liberar o retener a los antimicrobianos.

De igual forma las películas comestibles elaboradas con carboximetilcelulosa adicionadas con nanocompuestos y antimicrobianos de origen natural demostraron tener un buen efecto antifúngico en contra de *Rhizopus* spp. En las figuras 17 y 18 se observó que las películas que contienen aceite esencial de orégano y canela, cinamaldehído y carvacrol respectivamente, se observó que ejercen un efecto antifúngico en contra de *Rhizopus* spp. inhibiendo su crecimiento, no se observan diferencias en cuanto al tipo de nanocompuesto aplicado y antimicrobiano en cuestión.

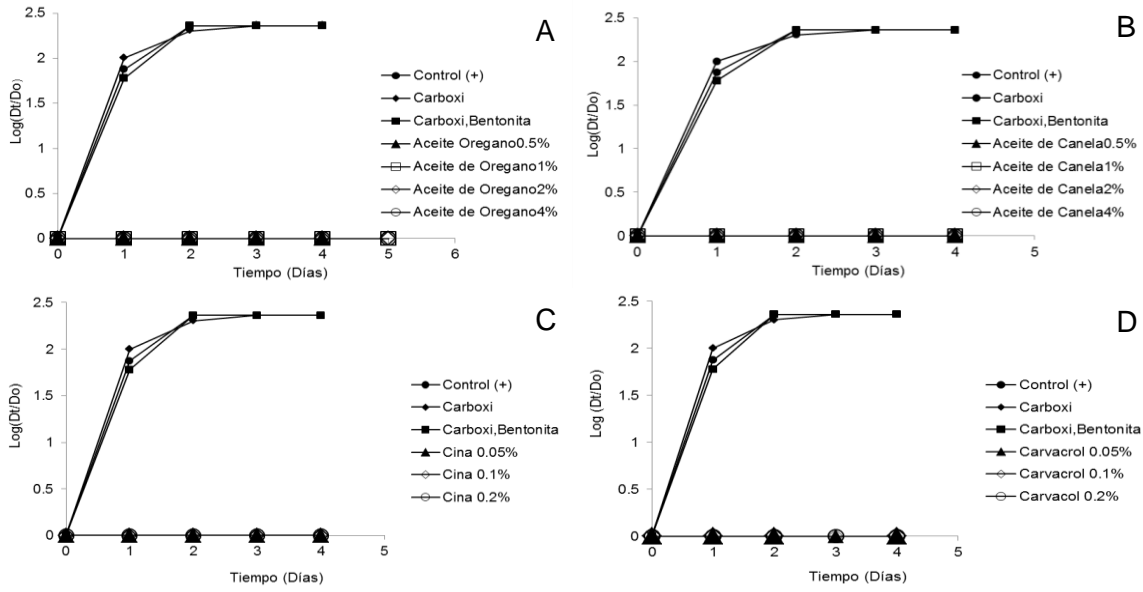


Figura 17. Cinética de crecimiento para *Rhizopus* spp., en presencia de películas comestibles elaboradas con carboximetilcelulosa y, A) bentonita + aceite esencial de orégano a diferentes concentraciones, B) bentonita + aceite esencial de canela a diferentes concentraciones, C) bentonita + cinamaldehído a diferentes concentraciones, D) bentonita + carvacrol a diferentes concentraciones.

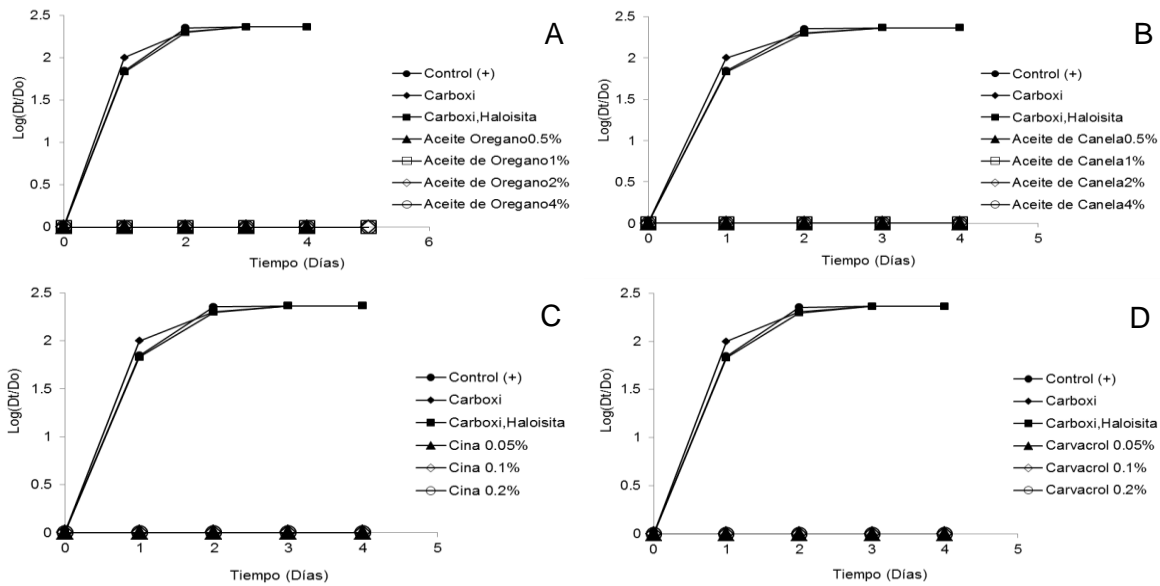


Figura 18. Cinética de crecimiento para *Rhizopus* spp., en presencia de películas comestibles elaboradas con carboximetilcelulosa y, A) haloisita + aceite esencial de orégano a diferentes concentraciones, B) haloisita + aceite esencial de canela a diferentes concentraciones, C) haloisita + cinamaldehído a diferentes concentraciones, D) haloisita + carvacrol a diferentes concentraciones.

Estos resultados son menores en comparación con los reportados por Ramírez Penagos (2013) quien describe las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de películas comestibles elaboradas a base de carboximetilcelulosa + AE de orégano en contra de *Rhizopus spp.* fue de 2%, mientras que para las películas comestibles elaboradas a base de carboximetilcelulosa + AE de canela fue de 1%. Se pudo observar que los nanocompuestos (haloisita y bentonita) adicionados a las películas incrementan la capacidad antifúngica de los AE de canela y orégano, al liberar o exponer a los AE de una forma más efectiva puesto que la CMI fue de 0.5%.

Para todas las evaluaciones antifúngicas se utilizaron controles que consistieron en películas de almidón y carboximetilcelulosa respectivamente sin nanocompuestos ni antimicrobianos, y películas de almidón y carboximetilcelulosa adicionadas con nanocompuestos sin antimicrobianos. De lo anterior se concluye que el almidón, la carboximetilcelulosa, la bentonita y la haloisita no tienen un efecto antifúngico, ya que permiten el crecimiento normal de los hongos con relación al control positivo.

8.2. Evaluación de propiedades físicas

8.2.1 Color

En las figuras 19 a 26 se observan los diferentes análisis de color realizadas a las diferentes películas elaboradas, empleando para su determinación los parámetros de la escala de Hunter de L* (luminosidad), a* (verde-rojo) y b* (azul- amarillo), y a partir de estos parámetros se determinó el tono (h*). Debido a que en la determinación de tono solo se contempla los parámetros a* y b* sin tomar en cuenta L*, las gráficas se realizaron para L* (luminosidad) y h* (tono). En éstas se pueden observar diferencias de color en cada una de las películas analizadas, estas diferencias se atribuyen al tipo y cantidad de antimicrobiano utilizado para cada película, así también a la cantidad y tipo de nanocompuesto empleado y a la distribución de la solución formadora de película en las cajas Petri para su posterior secado. Realizando una comparación entre las películas se encontraron

diferencias significativas ($p < 0.05$), lo cual indica que todas las películas son diferentes ópticamente en relación al color.

En general, la mayoría de las películas se mantienen en el mismo rango de luminosidad (L^*), con excepción de las películas de carboximetilcelulosa adicionadas con bentonita y AE de orégano y canela (figura 22) en la cual se observa un rango más elevado de luminosidad en las películas con incremento de la cantidad de nanocompuesto. Para este caso la cantidad elevada de AE fue quien mantuvo el rango de L^* elevado ya que las películas con aceite esencial de orégano al 4% y una cantidad de 1% de nanocompuesto comparten este mismo rango. En la figura 25 las cantidades de 0.05% de timol hicieron más opacas a las películas.

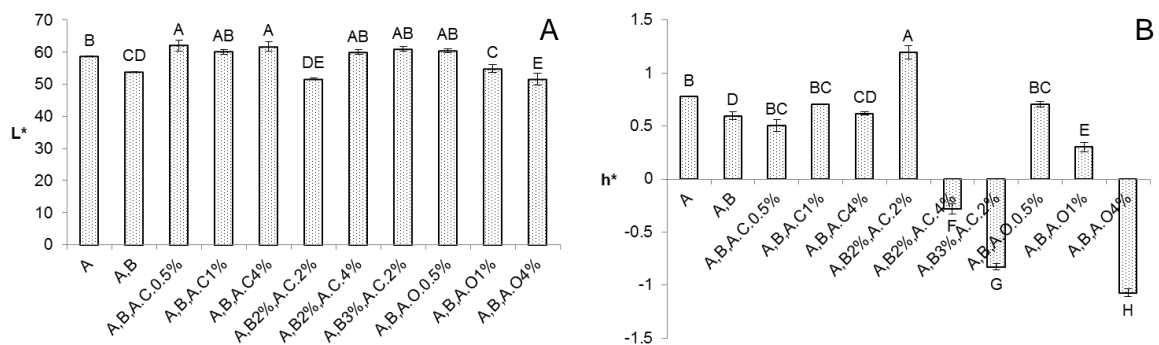


Figura 19. Valores de A) L^* , B) h^* (tono) para películas de almidón adicionadas con bentonita y aceites esenciales de canela y orégano.

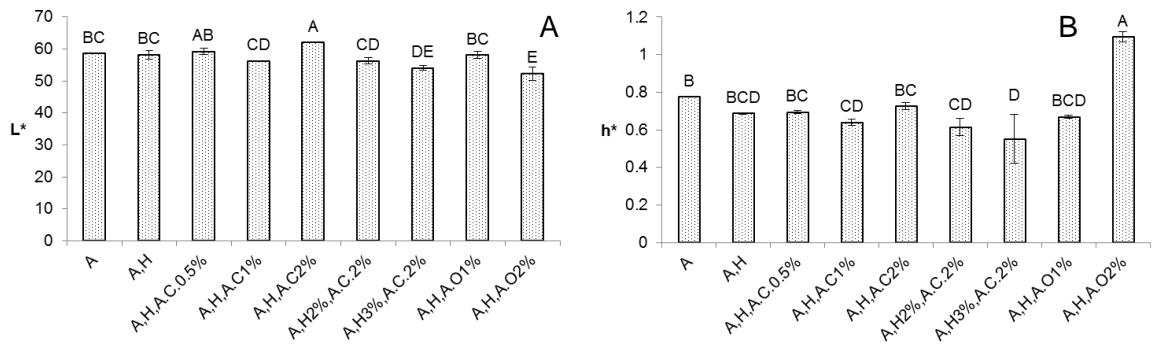


Figura 20. Valores de A) L^* , B) h^* (tono) para películas de almidón adicionadas con haloisita y aceites esenciales de canela y orégano.

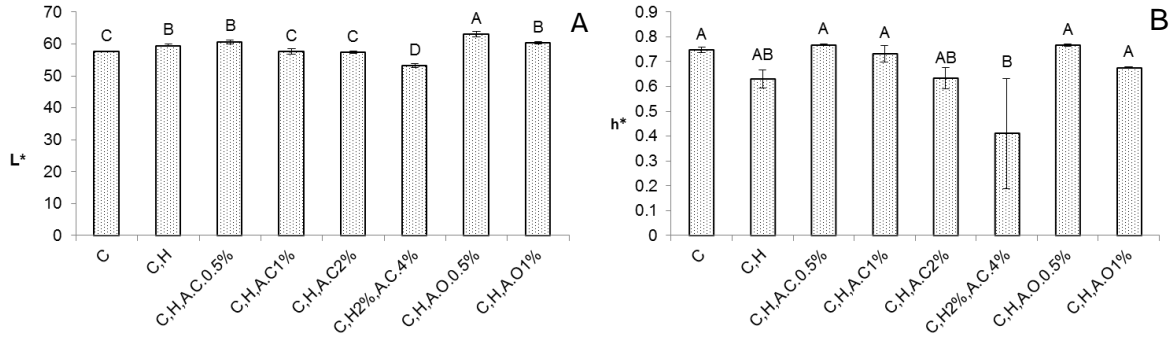


Figura 21. Valores de A) L*, B) h* para películas de carboximetilcelulosa adicionadas con haloisita y aceites esenciales de canela y orégano.

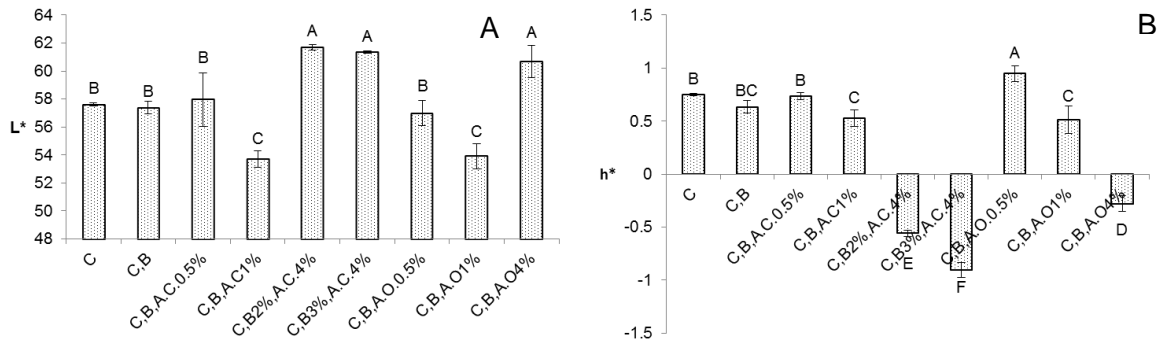


Figura 22. Valores de A) L*, B) h* (tono) para películas de carboximetilcelulosa adicionadas con bentonita y aceites esenciales de canela y orégano.

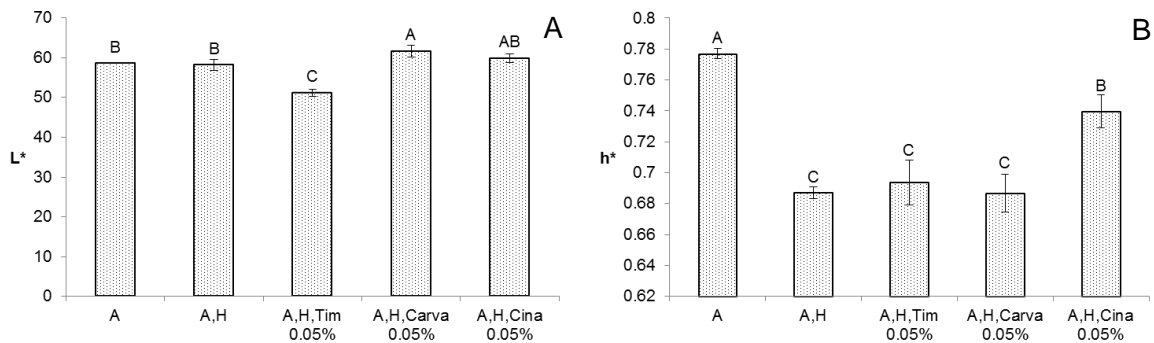


Figura 23. Valores de A) L*, B) h* (tono) para películas de almidón adicionadas con haloisita y compuestos puros (timol, carvacrol y cinamaldehído).

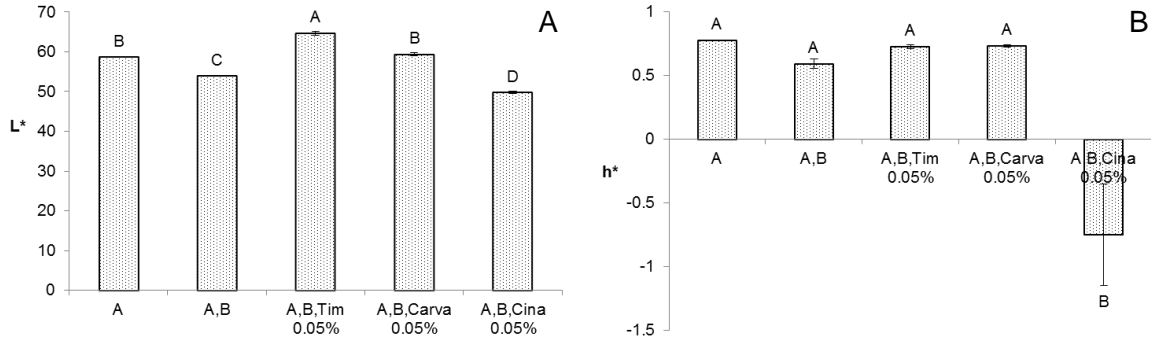


Figura 24. Valores de A) L*, B) h* (tono) para películas de almidón adicionadas con bentonita y compuestos puros (timol, carvacrol y cinamaldehído).

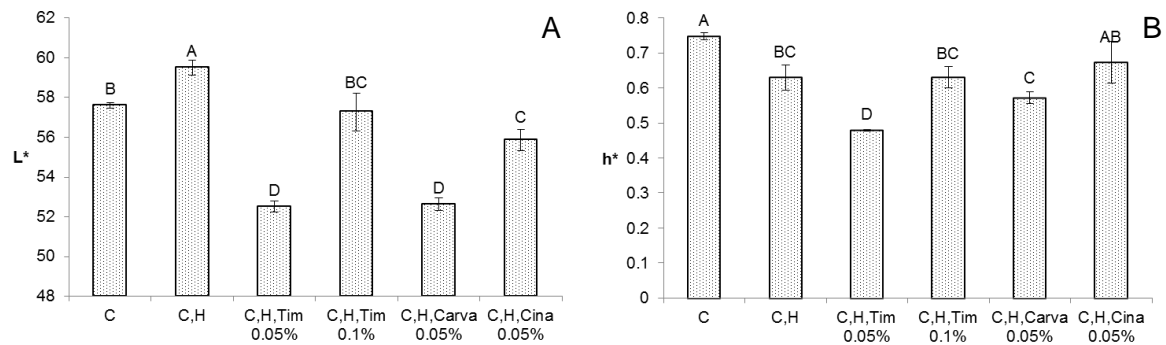


Figura 25. Valores de A) L*, B) h* (tono) para películas de carboximetilcelulosa adicionadas con haloisita y compuestos puros (timol, carvacrol y cinamaldehído).

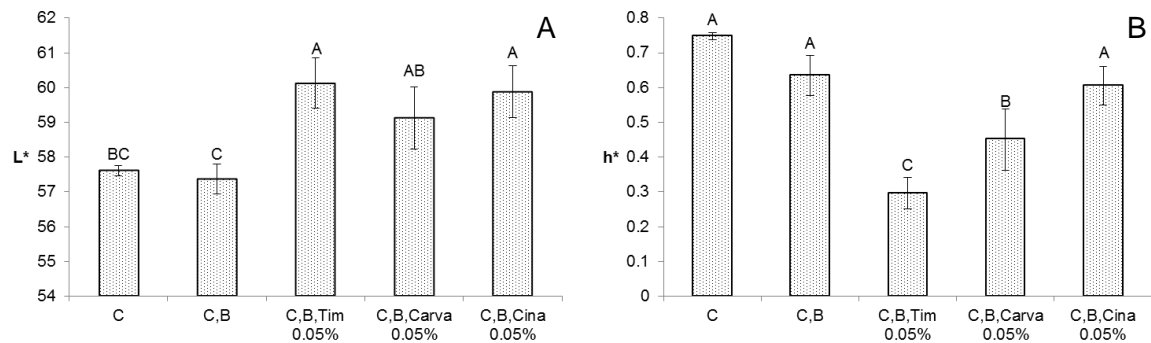


Figura 26. Valores de A) L*, B) h* (tono) para películas de carboximetilcelulosa adicionadas con bentonita y compuestos puros (timol, carvacrol y cinamaldehído).

En cuanto al parámetro de h* (tono) las películas fueron adquiriendo el color del antimicrobiano empleado en particular de los aceites esenciales pudiéndose observar que también interviene el tipo de nanocompuesto que se esté utilizando,

ya que se observa que otorgan características diferentes en particular en las películas adicionadas con bentonita y AE de canela se obtuvieron valores negativos en comparación con las adicionadas con haloisita que se obtuvieron valores positivos en cuanto al rango del espectro de luz. García y col. (2000), indican que la importancia del color radica en el aspecto físico que puede adoptar en conjunto con el alimento en que se aplica, influyendo en la aceptación del consumidor.

8.2.2 Espesor

De la figura 27 a la 36 se observan los diferentes espesores de las películas preparadas a base de almidón y carboximetilcelulosa adicionadas con nanocompuestos a diferentes concentraciones y antimicrobianos de origen natural como AE de canela y orégano así también compuestos puros (timol, carvacrol y cinamaldehído) a diferentes concentraciones. Las películas control son quienes presentan menor espesor y este incrementa por la adición de los diferentes componentes añadidos (nanocompuestos y antimicrobianos). De las diferentes películas preparadas en las cuales las adicionadas con bentonita son quienes presentan mayor espesor, otorgando un mayor volumen a las películas comestibles al intercalarse en las capas de las películas.

Como se puede observar en la figura 27 A, el espesor de las películas incrementa conforme se incrementa la cantidad de AE de canela. También el incremento es notorio en las películas con mayor cantidad de nanocompuesto (bentonita) ya que otorga mayor volumen a la película por las estructuras que estas forman. En la figura 27 B, el espesor de las películas es dispar, esto puede deberse a que no hubo una buena distribución en el vertido de la solución formadora de película en placas Petri, pero puede observarse que en las películas con mayor cantidad de nanocompuestos el espesor se incrementó.

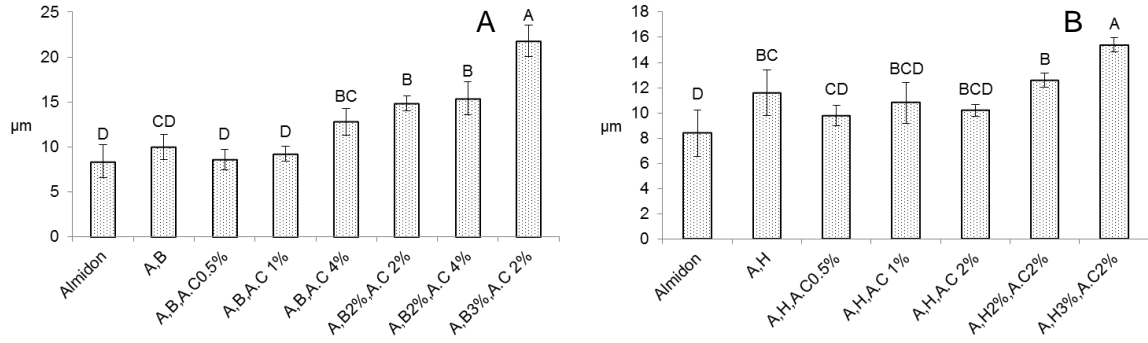


Figura 27. Espesor de películas comestibles de A) almidón + bentonita + aceite esencial de canela y B) almidón + haloisita + aceite esencial de canela.

Así también se puede ver un claro incremento del espesor de las películas a las cuales se les agrego mayor cantidad de nanocompuesto obteniendo mayor firmeza (figura 28), en la figura 28 B el espesor de las películas incrementa conforme se incrementa la cantidad de AE de canela.

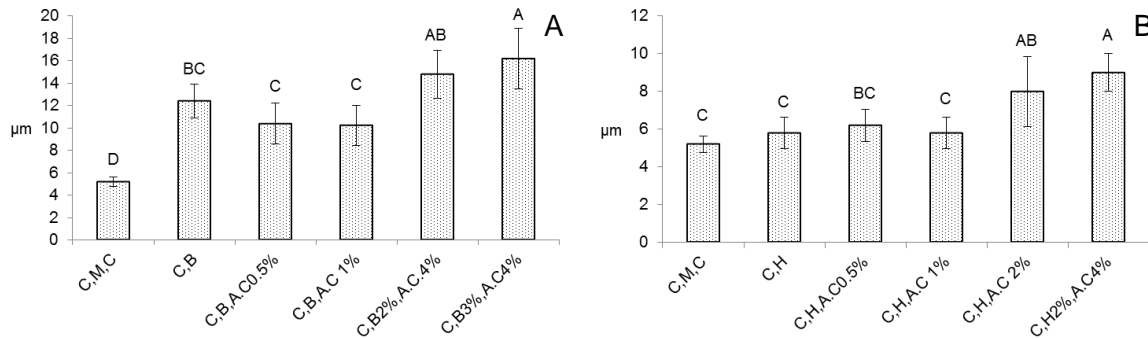


Figura 28. Espesor de películas comestibles de A) carboximetilcelulosa + bentonita + aceite esencial de canela y B) carboximetilcelulosa + haloisita + aceite esencial de canela.

En las películas adicionadas con nanocompuestos y AE de orégano (figura 29 A), se puede ver un incremento del espesor conforme se incrementa la cantidad de AE, sin embargo se observa que la película que contiene el nanocompuesto sin antimicrobiano tiene un mayor espesor. Esto puede deberse a una distribución no uniforme de la solución formadora de la película. En la figura 29 B, el espesor de las películas incrementa conforme se incrementa la cantidad de AE de orégano.

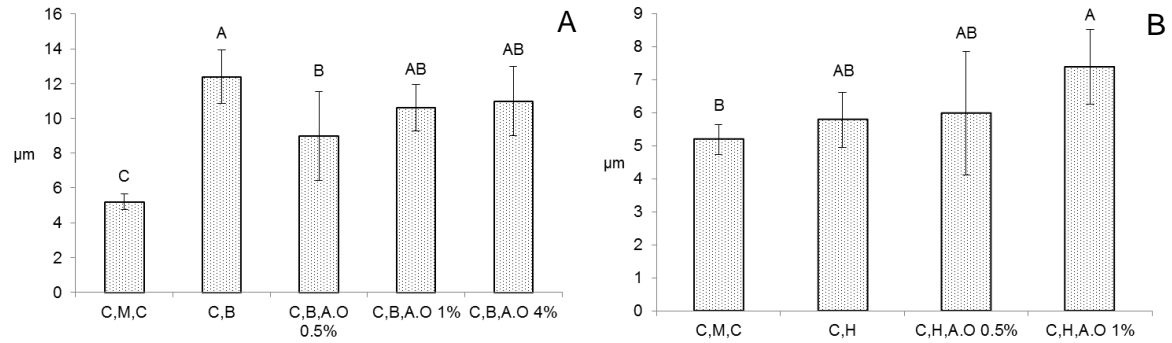


Figura 29. Espesor de películas comestibles de A) carboximetilcelulosa + bentonita + aceite esencial de orégano y B) carboximetilcelulosa + haloisita + aceite esencial de orégano.

En la figura 30, se observa que el espesor de las películas incrementa conforme se incrementa la cantidad de AE de orégano. Realizando una comparación entre las películas que contienen bentonita y haloisita respectivamente, se puede ver que para este caso los espesores son similares.

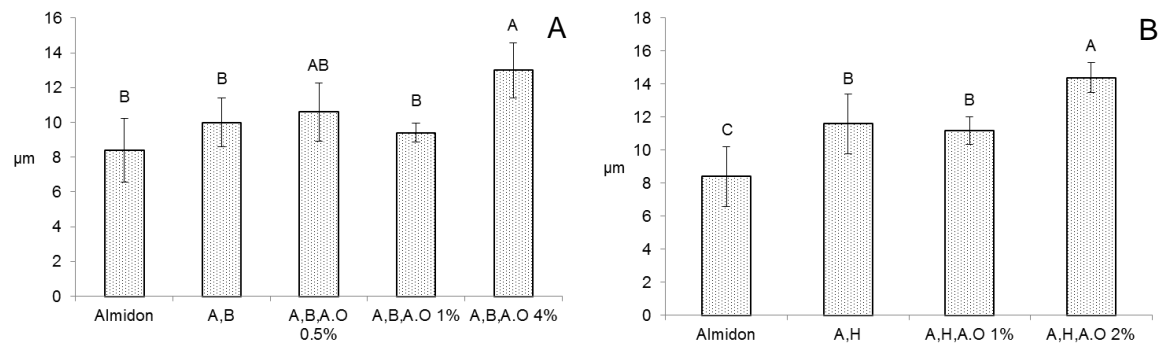


Figura 30. Espesor de películas comestibles de A) almidón + bentonita + aceite esencial de orégano y B) almidón + haloisita + aceite esencial de orégano.

En el caso de las películas adicionadas con compuestos puros (figura 31 A), se puede ver un incremento del espesor de las películas conforme se agregaron el nanocompuesto y el antimicrobiano (timol). En la figura 31 B, el espesor de las películas que contienen timol no incremento.

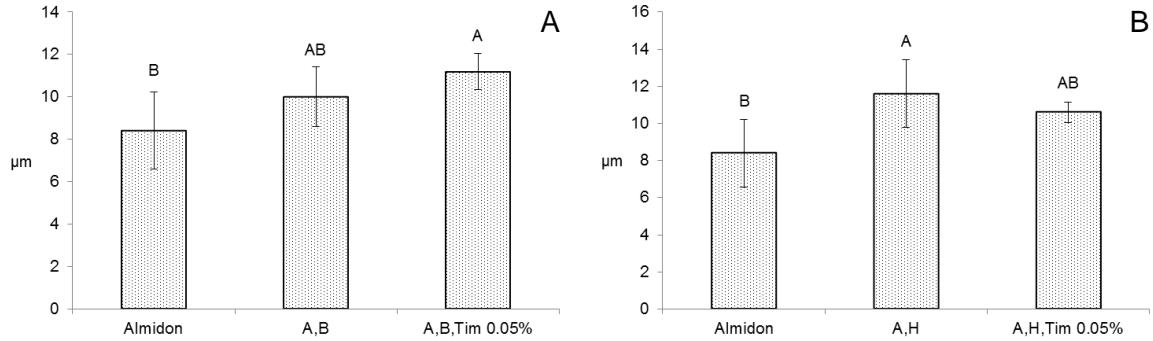


Figura 31. Espesor de películas comestibles de A) almidón + bentonita + timol y B) almidón + haloisita + timol.

En las películas preparadas a base de carboximetilcelulosa (figura 32 A), no se observa un incremento del espesor por la adición timol como en la figura 32 B, en la cual se observa un incremento del espesor al agregar el antimicrobiano en 0.05%. El el espesor disminuyó en las películas que contienen timol en 0.1%, esto puede deberse a una distribución no uniforme de la solución formadora de la película en el momento del vertido en placas Petri.

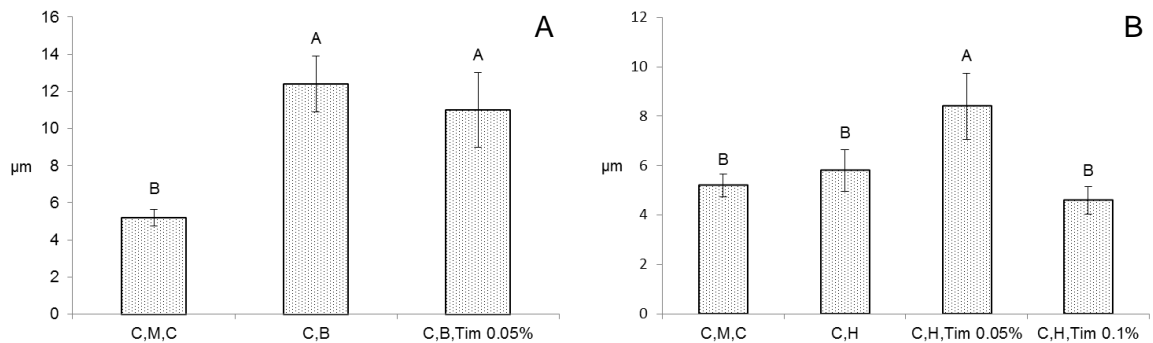


Figura 32. Espesor de películas comestibles de A) carboximetilcelulosa + bentonita + timol y B) carboximetilcelulosa + haloisita + timol.

En cuanto a las películas adicionadas con nanocompuestos y carvacrol (figura 33), se observa un incremento paulatino del espesor por la presencia del nanocompuesto y del antimicrobiano para el caso de la figura A. En la figura B no se observa un incremento del espesor al agregar el antimicrobiano en 0.05%, en comparación con la gráfica A esto puede deberse a que el antimicrobiano no interacciona de la misma forma con los dos tipos de nanocompuestos

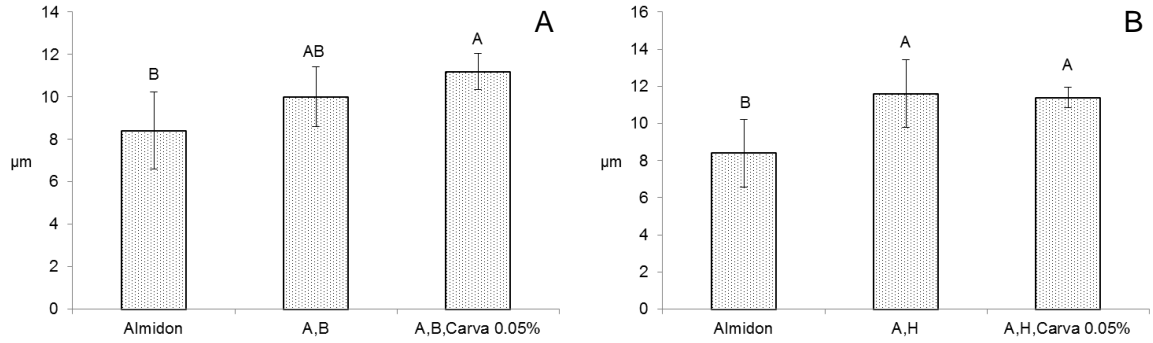


Figura 33. Espesor de películas comestibles de A) almidón + bentonita + carvacrol y B) almidón + haloisita + carvacrol.

En las figuras 34 y 35 A, puede observarse un incremento del espesor de las películas que contienen el antimicrobiano (carvacrol y cinamaldehído). En las figuras 34 y 35 B, el espesor disminuyó al agregar el antimicrobiano en 0.05%.

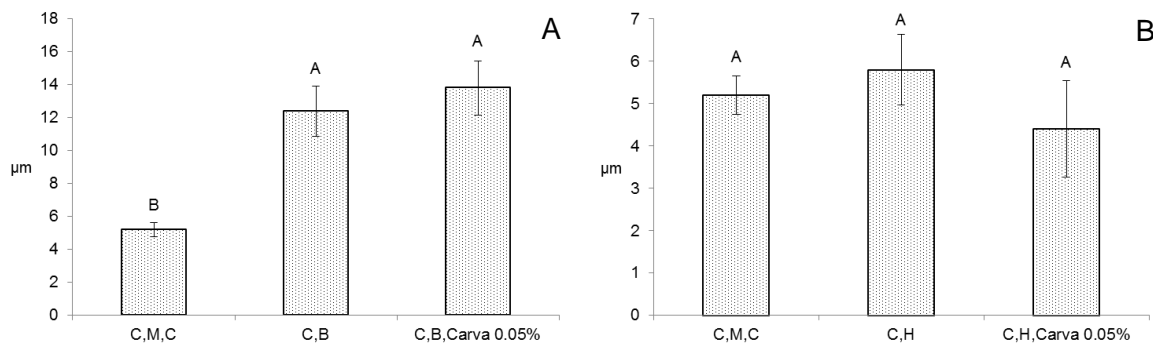


Figura 34. Espesor de películas comestibles de A) carboximetilcelulosa + bentonita + carvacrol y B) carboximetilcelulosa + haloisita + carvacrol.

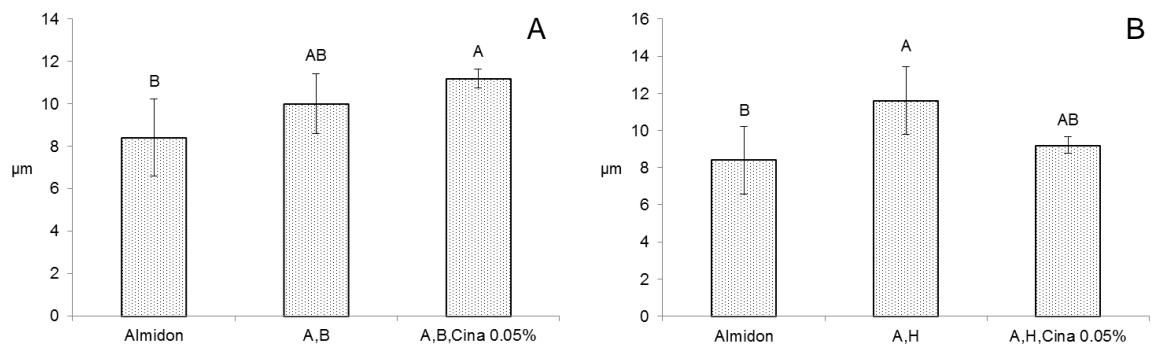


Figura 35. Espesor de películas comestibles de A) almidón + bentonita + cinamaldehído y B) almidón + haloisita + cinamaldehído.

En las películas preparadas a base de carboximetilcelulosa y adicionadas con los nanocompuestos (bentonita y haloisita) y cinamaldehído (figura 36), no se observan incrementos del espesor de las películas por la adición del antimicrobiano, el espesor disminuyó.

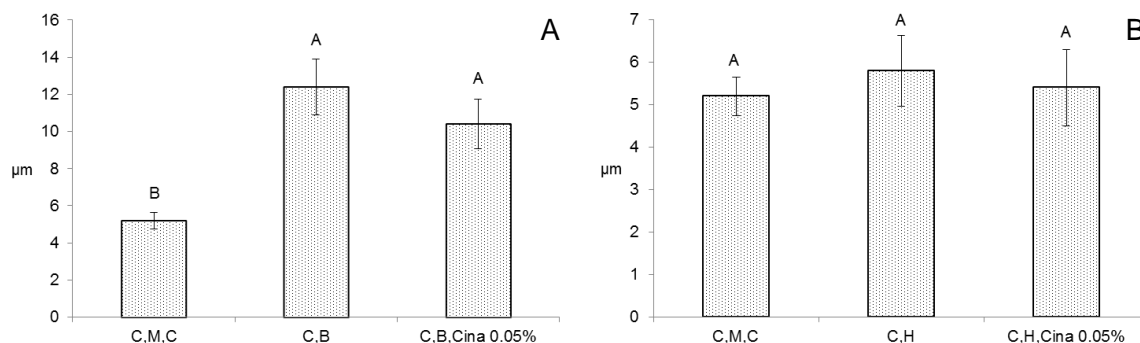


Figura 36. Espesor de películas comestibles de A) carboximetilcelulosa + bentonita + cinamaldehído y B) carboximetilcelulosa + haloisita + cinamaldehído.

La variabilidad de las películas en relación del espesor pudo deberse y verse afectada por alguna serie de factores en la preparación de las películas, como el tiempo de secado, la distribución de la solución formadora de película al momento del vaciado en placa, de igual forma por la consistencia que adquirirían las películas por la presencia de los nanocompuestos y por los antimicrobianos empleados, la dificultad de medición con el micrómetro. Cisneros-Zevallos y Krochta (2003), mencionan que el espesor de las películas varía con el contenido en sólidos de las formulaciones, la densidad, viscosidad, tensión superficial y velocidad de secado. Se ha reportado que el espesor de las películas influye significativamente sobre las propiedades de las mismas (Gontard y col., 1996). Sin embargo aún deben hacerse más estudios, en específico tomar imágenes de las películas utilizando un microscopio electrónico de barrido para observar cómo es que los diferentes componentes empleados (nanocompuestos y antimicrobianos naturales) interactúan entre sí y las posibles estructuras que forman, de esta forma poder establecer cómo es que estas estructuras modifican la liberación de los antimicrobianos.

9. CONCLUSIONES

Los nanocompuestos (bentonita y haloisita) modificaron las características y capacidad antifúngica de las películas comestibles adicionadas con antimicrobianos de origen natural, en las cuales para algunos casos mejoró e incremento la efectividad de las mismas, debiéndose a que los nanocompuestos afectan la disposición y liberación de los antimicrobianos utilizados.

En general las películas comestibles adicionadas con nanocompuestos y antimicrobianos de origen natural mostraron un buen efecto antifúngico en contra de los hongos con los cuales se probaron, a excepción de *Fusarium* spp. quien mostro ser más resistente ante la presencia de las películas.

Los nanocompuestos modifican las características físicas de las películas comestibles. El color se vio afectado por la incorporación de los aceites esenciales, pero en general por la presencia de los nanocompuestos ya que estos presentan un color propio, blanco para el caso de haloisita y café para el caso de bentonita. El espesor aumentó conforme se incrementó la cantidad de los aceites esenciales pero en mayor cantidad por la presencia de los nanocompuestos.

10. SUGERENCIAS

- Evaluar el efecto antimicrobiano de películas comestibles a base de almidón y carboximetilcelulosa respectivamente + nanocompuestos con una concentración menor de los aceites esenciales de orégano y canela en contra de *Rhizopus spp.*
- Analizar las estructuras de las películas comestibles adicionadas con los nanocompuestos, y sin ellos + antimicrobianos mediante la utilización de un microscopio electrónico de barrido para observar cómo es que los nanocompuestos se estructuran con los polímeros de las películas y como es que estas estructuras afectan la disponibilidad de los antimicrobianos.
- Hacer pruebas sobre las películas exponiéndolas a diferentes concentraciones de humedad y así evaluar la estabilidad de las mismas.
- Realizar pruebas “in vivo” utilizando las películas comestibles + nanocompuestos + antimicrobianos en frutos.
- Buscar un método más hacer que la solución formadora de películas + nanocompuestos + antimicrobianos, sea más maleable y de esta forma permita una mejor distribución en el momento de vertido en placa para su posterior secado.
- Evaluar las características físicas de películas comestibles adicionadas con nanocompuestos bentonita y haloisita, y determinar cuál nanocompuesto es mejor para la elaboración de las películas.

11. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Avila–Sosa R., López–Malo A.; 2008; Aplicación de sustancias antimicrobianas a películas y recubrimientos comestibles; Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos (2) (2) (4–13).
- 2) Avila-Sosa R., Hernández-Zamorán E., López-Mendoza I., Palou E., Jiménez Munguía M.T., Nevaréz-Moorillón G.V., y López-Malo A.; (2010); Fungal inactivation by Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) essential oil added to amaranth, chitosan, or starch edible films; Journal of Food Science. (75) (127-133).
- 3) Akbari Z., Ghomashchi T., Moghadam S.; 2007; Improvement in food packaging industry with biobased nanocomposites; International Journal of Food Engineering (3) (1-24)
- 4) Alzamora S., Guerrero A., Nieto A., Vidales S.; 2004; Manual de capacitación, Conservación de frutas y hortalizas mediante tecnologías combinadas; FAO; disponible en: <http://www.fao.org/3/a-y5771s.pdf>
- 5) Aligiannis N., Kalpoutzakis E., Mitaku S., y Chinou I.B.; 2001; Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two Origanum Species; J. Agric. Food Chem., (49) (4168–4170).
- 6) Bertuzzi M.A., Castro-Vidaurre E.F., Armada M. y Gottifredi J.C.; 2007; Water vapor permeability of edible starch based films; Journal of Food Engeneering. (80) (972–8).
- 7) Bonifaz Trujillo J. A.; 2010; Micología médica básica; Cuarta edición; México D.F.; McGraw-Hill (63-71)
- 8) Breymann J., Chaves C., Arias M.; 2013; Análisis de la calidad microbiológica y potencial presencia de *Listeria monocytogenes* en pulpas de guanábana (*Annona muricata*), mango (*Mangifera indica*) y maracuyá (*Passiflora edulis*) costarricenses; Archivos Latinoamericanos de Nutrición (63) (1) (53-54).

- 9) Carrillo A.M., Urruchurto C.M., Carriazo J.G., Moreno S., Molina R.A.; 2014; Caracterización estructural y textural de una haloisita colombiana; Revista Mexicana de Ingeniería Química (13) (2) (563-571).
- 10) Campos C.A., Gerschenson L.N., Flores S.K.; 2011; Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity; Food Bioprocess Technology (4) (6) (849-875).
- 11) Cisneros-Zevallos L., Krochta J.M.; 2003; Dependence of coating thickness on viscosity of coating solution applied to fruits and vegetables by dipping method; J. Food Sci; (68) (2) (503-510).
- 12) Coordinación General de Minería; 2013; Perfil de Mercado de la Bentonita; disponible en: http://economia.gob.mx/files/comunidad_negocios/industria_comercio/informacion_Sectorial/minero/pm_bentonita_1013.pdf
- 13) Domínguez-Courtney M.F., Jiménez-Munguía M.T.; 2012; Películas comestibles formuladas con polisacáridos: propiedades y aplicaciones; Temas selectos de ingeniería de alimentos (6) (2) (110-117)
- 14) Doyle M. P., Beuchat L.R., Montville T.J.; 1997; Microbiología de los Alimentos, Fundamentos y Fronteras; Zaragoza (España); Acribia, S.A. (543-566)
- 15) Durán J. A., Mora D.; 1987; Diagnostico de la enfermedad postcosecha de la papaya en Costa rica .Pruebas de patogenicidad; Agronomía Costarricense; (3-4)
- 16) Franco-Urquiza E.A., Maspoch-Rulduá M.LI.; 2009; Estructura general de las arcillas utilizadas en la preparación de nanocompuestos poliméricos; Centre Català del Plàstic, Universitat Politècnica de Catalunya (12) (44) (35-40).
- 17) García M.A., Martino M.N., Zaritzky N.E.; 2000; Lipid addition to improve barrier properties of edible starch-based films and coatings; Journal of Food Science (65) (6) (941-947).

- 18) García-García R.M., Palou-García E.; 2008; Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos; *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* (2) (2) (41-51).
- 19) González Aguilar G.; 2005; Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados; México. Logiprint Digital; CIAD-CYTED-CONACYT-COFUPRO; *Temas selectos de Ingeniería* (217-235).
- 20) Gonzáles-Miguel M.E., López-Malo A.; 2010; Frutas conservadas por métodos combinados; *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* (4) (2) (58-67).
- 21) Gómez-Sánchez A.I., López-Malo A.; 2009; Potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*); *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* (3) (1) (33-45)
- 22) Gontard N., Thibault R., Cuq B. y Guilbert S.; 1996; Influence of Relative Humidity and Film Composition of Oxygen and Carbon Dioxide Permeabilities os Edible Films; *J. Agri. Food Chem.*, (44) (1064-1069).
- 23) George J., Kuma R., Sajeevkumar V.A., Ramana K.V., Rajamanickam R., Abhishek V., Nadasabapathy S., Siddaramaiah S; 2014; Hybrid HPCM nanocomposites containing bacterial cellulose nanocrystals and silver nanoparticles; *Carbohydrate Polymers*. (105) (285-292).
- 24) Giannakas A., Grigoriadi K., Leontiou A., Barkoula N.M., Ladavos A.; 2014; Preparation, characterization, mechanical and barrier properties investigation of chitosan-clay nanocomposites; *Carbohydrate Polymers*. (108) (103-111).
- 25) Giannelis, E. P; 1996; Polymer layered silicate nanocomposites; *Adv. Mater.*, (8) (29–35).
- 26) Guilbert S., Redl A., Gontard N.; 2002; Mass transport within edible and biodegradable protein-based material: Application to the design of active biopackaging. En: J.S. Welti-Chanes, G. Barbosa-Cánovas, y J.M. Aguilera (Eds). *Engineering and Food for the 21st Century*. (567-577).

- 27) Hernández A.G.; 2010; Tratado de nutrición, Composición y calidad nutritiva de los alimentos; 2ª edición; Madrid, Medica Panamericana; (658-673)
- 28) Hirano S.; 1999; Chitin and Chitosan as novel biotechnological materials; Polym Int.; (48) (732-734)
- 29) Hitokoto H., Morozumi S., Wauke T., Sarcai S., Kurata H.; 1980; Inhibitory effects of apices on growth and toxin production of toxigenic fungi; Appl Environ Microbiol (39) (818-822).
- 30) Ibáñez F.C., Torre P., Irigoyen A.; 2003; ADITIVOS ALIMENTARIOS; Universidad Pública de Navarra; Disponible en: http://www.nutricion.org/publicaciones/revista_agosto_03/funcionales/aditivos.pdf
- 31) Joussein E., Petit S., Delvaux B.; 2007; Behavior of halloysite clay under formamide treatment; Applied Clay Science (35) (17-24).
- 32) Jong-Whan R., Perry K.W.; 2007; Natural Biopolymer-Based Nanocomposite Films for Packaging Applications; Critical Reviews in Food Science and Nutrition, (47) (411–433).
- 33) Kim J.M., Marshall M.R., Cornell J.A., Preston III J.F. y Wei C.I.; 1995; Antibacterial activity of carvacrol, citral and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes; Journal of Food Science; (60) (1364–8).
- 34) Lagaly, G.; 1999; Introduction: from clay mineral-polymer interactions to clay mineral-polymer nanocomposites; Appl. Clay Sci., (15) (1–9).
- 35) Lliná A., Nava Reyna E., Martínez Hernández J.L., Garza García Y.; 2011; Siringomicinas para el biocontrol de hongos fitopatógenos; Ciencia cierta, Universidad Autónoma de Coahuila (24) (2011)

- 36) Lin D., Zhao Y.; 2007; Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables; *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (6) (60-74)
- 37) López-Malo A.; 2000; La preservación multiobjetivo de alimentos: Efectos de factores tradicionales y emergentes en la presencia de *Aspergillus Flavus*; Tesis de Doctorado. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- 38) López Mendoza I.; 2010; Determinación de las propiedades antimicrobianas y físicas de una película comestible elaborada a base de almidón de maíz (*Zea mays*) adicionada con aceites esenciales; Tesis de licenciatura, BUAP (p20).
- 39) López-Quezada M. Y.; 2007; Efecto de películas de quitosano hidrofóbicas en la vida de anaquel de fresas (*Fragaria ananassa*) deshidratadas osmóticamente; Tesis de Maestría. UDLAP.
- 40) McGlashan S. A., and Halley P. J.; 2003; Preparation and characterization of biodegradable starch-based nanocomposite materials. *Polym. Int.*, (52) (1767–1773)
- 41) Nychas, G.J.E.; 1995; Natural Antimicrobials from plants; En: *New Methods of food preservation*; G.W. Gould (Ed.); Blakie Academia y Professional. Glasgow; (1-21)
- 42) Ortiz López J.L.; 2013; Evaluación del efecto del pH sobre la actividad antifúngica de los aceites esenciales de orégano mexicano (*Lippia berlandieri Schauer*) y canela (*Cinnamomum verum*) adicionados a películas comestibles de almidón; Tesis de licenciatura, BUAP (36-62)
- 43) Ospina Meneses S.M., Cartagena Valenzuela J.R.; 2008; La atmósfera modificada: una alternativa para la conservación de los alimentos; *Revista Lasallista de Investigación* (5) (2) (112-123).
- 44) Ozdemir M., Floros J.D.; 2008; Optimization of edible whey protein films containing preservatives for mechanical and optical properties; *Journal of Food Engineering* (84) (116-123)

45) Parzanese M.; 2013; Tecnologías para la Industria Alimentaria; No 7; películas y recubrimientos comestibles; disponible en: http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha_07_PeliculaComestible.pdf

46) Perrone G., Susca A., Cozzi G., Ehrlich K., Varga J., Frisvad J.C., Meijer M., Noonim P., Mahakarnchanakul W., y Samson R.A.; 2007; Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products; *Studies in Mycology* (59) (53-66).

47) Pointing, S.B. y Hyde, K.D.; 2001; Bio-exploitation of Filamentous Fungi; Fungal Diversity Press, Hong Kong (223-251). Disponible en <http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=123283&fileId=S0953756202216652>

48) Quintero C.J., Falguera V., Muñoz H.A.; 2010; Películas y recubrimientos comestibles: importancia y tendencias recientes en la cadena hortofrutícola; *Revista Tumbaga* (2010) (5) (93-118)

49) Ramírez Penagos V.Y.; 2013; Estudio de la actividad antifúngica y propiedades físicas de películas comestibles de carboximetilcelulosa adicionadas con aceites esenciales de canela (*Cinnamomum verum*) y orégano mexicano (*Lippia berlandieri Schauer*); Tesis de licenciatura, BUAP (39-66).

50) Rodríguez-Sauceda R., Piña-Ruiz H., Ramírez-Valverde B., Vaquera-Huerta H., Cong-Hermida M.; 2014; Envases inteligentes para la conservación de alimentos; *Revista Ra Ximhai*; Universidad Autónoma Indígena de México (10) (6) (151-152)

51) Rodríguez-Sauceda E.N.; 2011; Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas; *Revista Ra Ximhai*; (7) (1) (153-170)

- 52) Rooney M.L.; 2002; Active Packaging: Science and Application. En: J. S. Welti-Chanes, G. Barbosa-Cánovas, y J. M. Aguilera. Engineering and Food for the 21st Century. CRC Press, Boca Ratón EE.UU. (539-547)
- 53) Salgado-Nava A., Jimenez-Munguía M.T.; 2012; Metodos de control de crecimiento microbiano en el pan; Temas selectos de ingeniería de alimentos (2) (2) (4-13)
- 54) Salgado-Garciglia R.; 2015; ¿Biopelículas Comestibles?; Revista de divulgación Saber más, Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo; disponible en: <http://www.sabermas.umich.mx/archivo/secciones-antteriores/articulos/47-numero-6/93-ibiopeliculas-comestibles.html>
- 55) Sánchez-González, L., Chiralt, A., González-Martínez, C., y Cháfer, M.; 2011; Effect of essenntial oils on properties of film forming emulsions and films based on hydroxypropylmethylcellulose and chitosan; Journal of Food Engineering. (105) (246-253).
- 56) Shan B., Cali Y., Brooks J.D., Corke, H.; 2007; Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick: activity against foodborne pathogenic bacteria; Journal of Agricultural and Food Chemistry (55) (14) (5484–5490).
- 57) Skandamis P.N. y Nychas G.; 2000; Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs, and oregano essential oil concentrations; Applied and Environmental Microbiology. (66) (1646–53).
- 58) Suhr K.I., Nielsen P.V.; 2003; Atinfungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi; Journal of Applied Microbiology (4) (665-674).

59) Vega Farfan J.L., Verdeja Gonzalez L., Sancho Martinez J., Garcia Iglesias J.; 1993; Caraterización y propiedades de las bentonitas de Amotape (Región Grau-Perú); Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidr. (32) (6) (377-383).

12. ANEXOS

12.1. Análisis antifúngico

12.1.1. *Aspergillus niger*

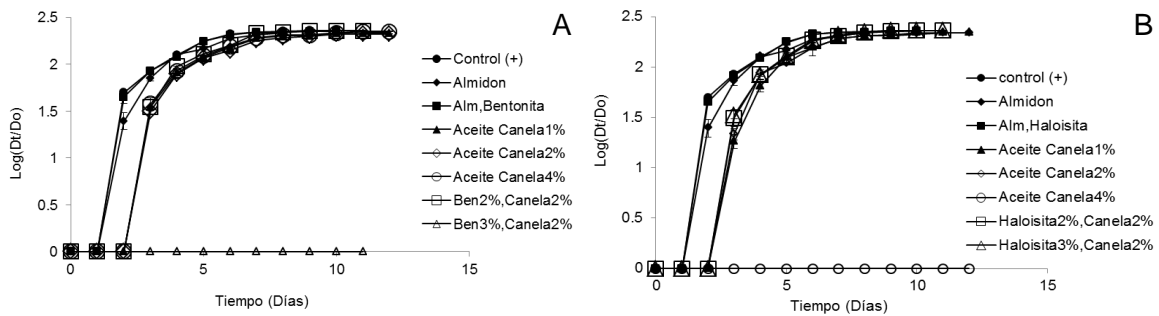


Figura A. Cinética de crecimiento para *Aspergillus niger*, en presencia de películas comestibles elaboradas con almidón y, A) Bentonita a diferentes concentraciones + Aceite de canela a diferentes concentraciones, B) Haloisita a diferentes concentraciones + Aceite de canela a diferentes concentraciones.

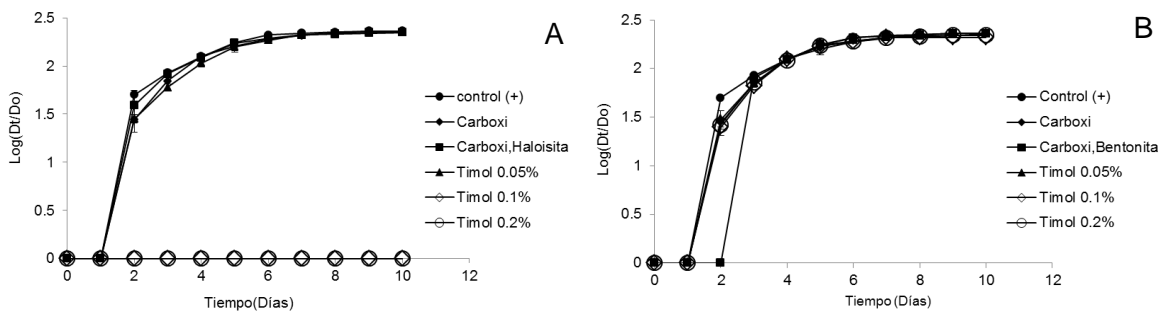


Figura B. Cinética de crecimiento para *Aspergillus niger*, en presencia de películas comestibles elaboradas con carboximetilcelulosa y, A) Haloisita + Timol a diferentes concentraciones, B) Bentonita + Timol a diferentes concentraciones.

12.1.2. *Fusarium* spp.

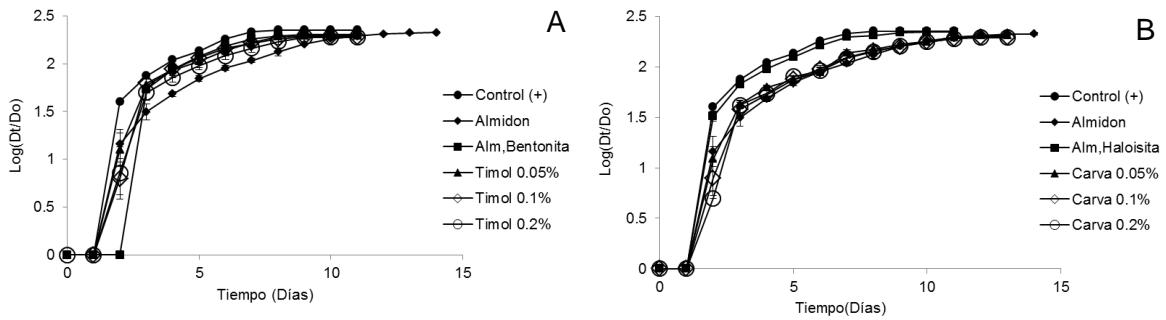


Figura C. Cinética de crecimiento para *Fusarium* spp., en presencia de películas comestibles elaboradas con almidón y, A) Bentonita + Timol a diferentes concentraciones, B) Haloisita + Carvacrol a diferentes concentraciones.

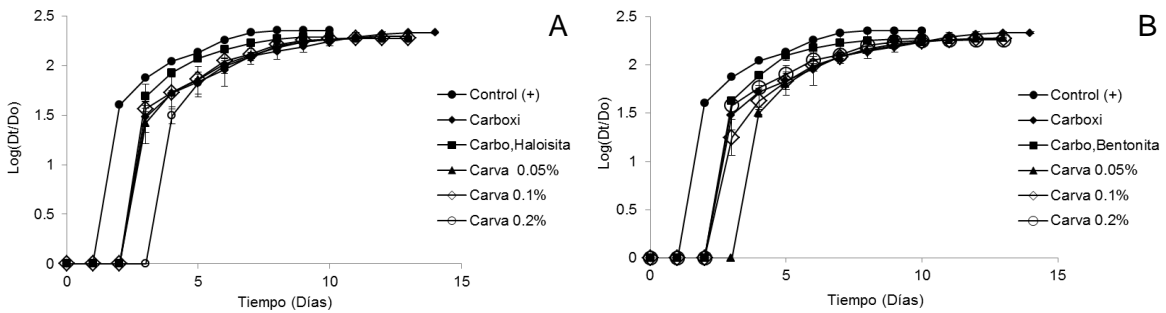


Figura D. Cinética de crecimiento para *Fusarium* spp., en presencia de películas comestibles elaboradas con carboximetilcelulosa y A) Haloisita + Carvacrol a diferentes concentraciones, B) Bentonita + Carvacrol a diferentes concentraciones.

12.1.3. *Rhizopus* spp.

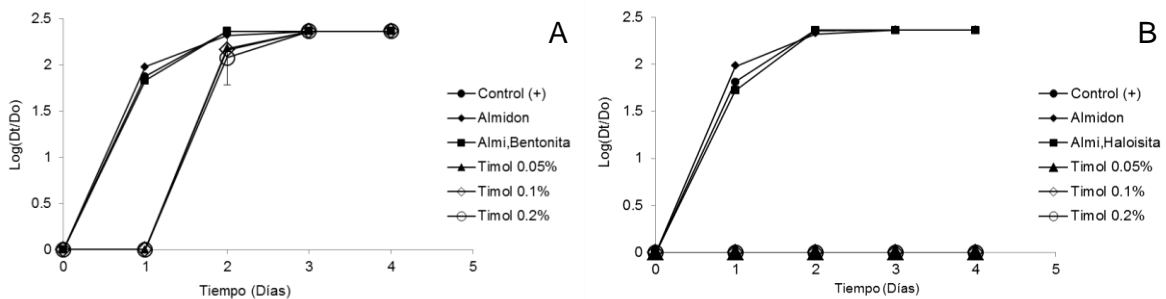


Figura E. Cinética de crecimiento para *Rhizopus* spp., en presencia de películas comestibles elaboradas con almidón y, A) Bentonita + Timol a diferentes concentraciones, B) Haloisita + Timol a diferentes concentraciones.

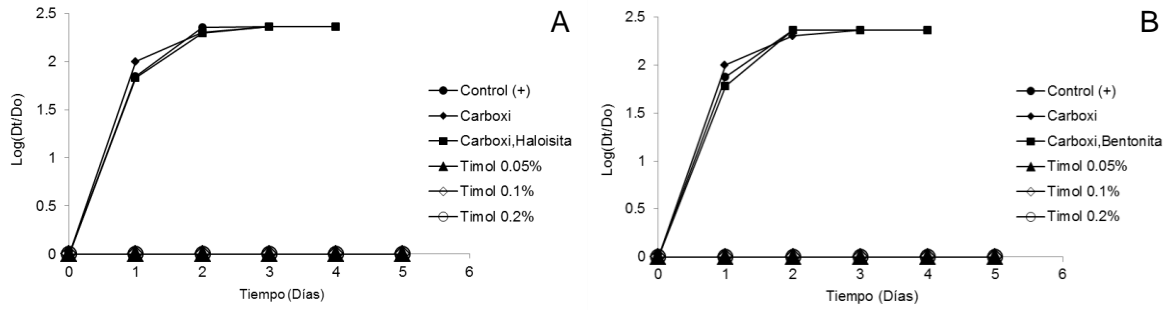


Figura F. Cinética de crecimiento para *Rhizopus* spp., en presencia de películas comestibles elaboradas con carboximetilcelulosa y, A) Halosita + Timol a diferentes concentraciones, B) Bentonita + Timol a diferentes concentraciones.