



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Efecto de un bioempaquete eco-friendly con características antimicrobianas y antioxidantes a base de fibra de cítricos y extracto de orégano, sobre las características fisicoquímicas y microbiológicas de *Cyprinus carpio*”

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

Baldomero Alexis Valdez Valdez



Director: Dr. Octavio Dublán García

Coasesor: Dr. Daniel Díaz Bandera

Toluca, Estado de México; 24 de Enero de 2018

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biotecnología Alimentaria del Campus Cerrillo UAEM, bajo la dirección del Dr. Octavio Dublán García y la asesoría del Dr. Daniel Díaz Bandera.



“

La función de la educación es enseñarle a uno a pensar intensamente y a pensar críticamente. Inteligencia más carácter - ese es el objetivo de la verdadera educación. ”

•—————•

Dr. Martin Luther King, Jr.



Agradecimientos

A Dios por permitirme elegir este camino y conocer parte de la investigación, y sobre todo por enseñarme que cada día hay algo nuevo que aprender.

A todos los profesores de la Facultad de Química por forjar con disciplina y compartir sus conocimientos y experiencias durante mi formación como profesional, gracias.

A mi director el Dr. Octavio Dublán por permitirme trabajar en este proyecto, mediante su asesoría, su apoyo, confianza y tiempos otorgados, así como su amistad.

Al Dr. Daniel Arizmendi por su tiempo otorgado en la culminación de este proyecto

Al Dr. Juan Orozco por permitirme trabajar en su laboratorio, aclarar dudas, por su amistad, y por supuesto gracias por los días que me dio un aventón.

Al Dr. Leobardo por permitirme trabajar en su laboratorio para la realización de la parte experimental de estrés oxidativo.

A los laboratoristas de Campus Cerrillo: Doña Yes, quien me apoyó en los análisis microbiológicos, y a Saúl en la parte de los análisis fisicoquímicos. A ambos agradezco además su amistad.

A los compañeros; Selene, por su ayuda en la parte experimental y estadístico de películas comestibles. A Sarai por su apoyo en la parte experimental de microbiología. A Paco, por su gran ayuda y sugerencias en la parte microbiológica, antioxidante y de electroforesis. A Héctor, por su ayuda en la determinación del estrés oxidativo

Dedicatorias

A mis padres Santos Valdez F. y María De Lourdes Valdez S., a quienes agradezco infinitamente su apoyo incondicional, paciencia, educación y valores forjados, así como el brindarme palabras de aliento cuando fue necesario, por esto y más gracias.

De igual forma agradezco a mis hermanos Lupita y Ezequiel, por estar presentes y apoyarme en cada paso dado para cumplir mis metas.

A todos los profesores que fueron parte importante en cada etapa de mi formación, y a quienes estoy enormemente agradecido por compartir sus saberes y valores.

A mis amigos de generación; Manuel, Gerardo, Jesús y Sebastián, que hicieron más amena esta corta estadía en la facultad, gracias por los momentos vividos, su amistad y sobre todo por su confianza.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la funcionalidad tecnológica y el potencial conservante de recubrimientos comestibles a base de fibra de cítricos y extracto de orégano (*Origanum vulgare*) en filetes de carpa común (*Cyprinus carpio*). Para ello se procedió a determinar el tiempo óptimo de secado, así como la caracterización fisicoquímica y microbiológica de la fibra de cáscara de naranja, para posteriormente evaluar las propiedades físicas, ópticas y mecánicas de formulaciones obtenidas mediante un diseño estadístico Box-Benheken. Adicionalmente se evaluaron las propiedades antioxidantes y antimicrobianas del extracto acuoso y etanólico del orégano. El extracto seleccionado fue el etanólico debido a que presentó un mayor contenido de compuestos fenólicos totales así como una alta actividad antioxidante evaluada mediante ABTS y DPPH, de igual forma presentó un mayor efecto de inhibición para las bacterias *E. coli*, *Salmonella spp.*, y *S. aureus*. La aplicación del recubrimiento fue durante 9 días de almacenamiento a una temperatura de 4°C para las variables fisicoquímicas como pH, acidez, capacidad de retención de agua, no existieron diferencias significativas para los distintos tratamientos. Las muestras con recubrimiento y recubrimiento con extracto etanólico de orégano disminuyeron los niveles de oxidación lipídica (medidos por índice de lipoperoxidación) y proteínas carboniladas. Asimismo, se observó que la degradación de la miosina, medida por electroforesis, fue en menor grado cuando se combinó con alguno de los recubrimientos y también se observó una reducción en el crecimiento microbiano de *S. aureus*, no siendo así para *Salmonella spp.*, independientemente del recubrimiento utilizado.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Sección A. Subproductos Agroalimentarios.....	3
2.1.1 Sistema agroalimentario de México.....	3
2.1.2 Definición de residuo / subproducto.....	4
2.1.3 Clasificación de residuos.....	5
2.1.3.1 Cáscara de cítricos.....	6
2.1.3.2 Suero de Leche.....	9
2.1.4 Contaminación.....	11
2.1.5 Aprovechamiento y Revalorización.....	13
2.2 Sección B. Bioempaque Comestible Eco-friendly.....	14
2.2.1 Envasado “verde” en alimentos.....	14
2.2.2 Alternativa (recubrimientos, empaques o films comestibles) biodegradable.....	15
2.2.2.1 Definición de los RC y PC.....	16
2.2.2.2 Principales Funciones.....	16
2.2.2.3 Formación de PC y RC.....	18
2.2.2.4 Materiales para la elaboración de películas y RC.....	19
2.2.2.4.1 Hidrocoloides.....	20
2.2.2.4.1.1 Polisacáridos.....	20
2.2.2.4.1.1.1 Fibra de Cítricos.....	21
2.2.2.4.2 Proteínas.....	22
2.2.2.4.2.1 Gelatina.....	23
2.2.2.4.2.2 Suero de leche.....	24
2.2.2.4.3 Lípidos.....	25
2.2.2.4.4 Componentes para formación de RC y PC.....	26
2.2.2.5 Antimicrobianos naturales utilizados en RC y PC.....	27
2.2.2.5.1 Orégano.....	27
2.2.2.6 Aplicaciones de PC y RC a alimentos.....	28
2.2.2.6.1 Aplicación de PC y RC en pescado.....	30

2.3 Sección C. Productos Acuícolas y/o Marinos.....	31
2.3.1 Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>).....	33
2.3.1.1 Composición química y valor nutrimental.....	35
2.3.2 Cambios post-mortem en el pescado.....	35
2.3.3 Métodos de preservación del pescado.....	38
OBJETIVOS.....	40
HIPÓTESIS.....	40
JUSTIFICACIÓN.....	41
3. METODOLOGÍA.....	42
3.1 Caracterización De Residuos Fibrosos (RF) De Cáscara De Naranja.....	43
3.1.1 Obtención de Residuos Fibrosos (RF).....	43
3.1.2 Determinación de la curva de pérdida de humedad.....	44
3.1.3 Composición proximal de residuos fibrosos (RF).....	45
3.1.4 Caracterización microbiológica.....	45
3.2 Caracterización De Las Películas y/o Bioempaques Comestibles “Eco-Friendly Packaging”.....	46
3.2.1 Elaboración de películas aplicando un diseño experimental Box-Behnken.....	46
3.2.2 Caracterización de la disolución formadora de película (DFP).....	48
3.2.3 Caracterización de bioempaque comestible.....	49
3.2.3.1 Propiedades físicas.....	49
3.2.3.1.1 Espesor.....	49
3.2.3.1.2 Humedad.....	49
3.2.3.1.3 Capacidad de retención de agua (CRA).....	49
3.2.3.1.4 Solubilidad.....	50
3.2.3.2 Color.....	50
3.2.3.3 Propiedades mecánicas.....	51
3.3 Evaluación Antimicrobiana Y Antioxidante In Vitro De Extracto De Orégano (<i>Origanum vulgare</i>).....	53
3.3.1 Obtención de extractos de orégano.....	53
3.3.2 Determinación de Compuestos Fenólicos Totales.....	54

3.3.3 Determinación antioxidante en los extractos de orégano.....	54
3.3.3.1 Método ABTS•+.....	54
3.3.3.2 Método DPPH•.....	55
3.3.4 Técnica de difusión en disco para prueba antimicrobiana en extracto acuoso y etanólico de orégano.....	56
3.3.4.1 Preparación del antimicrobiano acuoso y etanólico.....	56
3.3.4.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	57
3.4 Evaluación De La Vida De Anaquel En Filetes De Carpa Común Con Un Recubrimiento Comestible Incorporado Con Fibra De Cítricos Y Extracto Etanólico De Orégano (<i>Origanum vulgare</i>).....	58
3.4.1 Tratamiento del filete de carpa.....	58
3.4.2 Elaboración del recubrimiento.....	58
3.4.3 Aplicación del recubrimiento.....	60
3.4.4 Evaluación de las propiedades físicas en filetes de carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>).....	60
3.4.4.1 pH.....	61
3.4.4.2 Acidez.....	61
3.4.4.3 Capacidad de retención de agua (CRA).....	61
3.4.4.4 Color.....	62
3.4.5 Determinación microbiológica en los filetes de carpa común.....	62
3.4.6 Electroforesis desnaturalizante.....	63
3.4.7 Evaluación del estrés oxidativo en filetes de carpa común.....	64
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67
4.1 Caracterización De Residuos Fibrosos (RF) De Cáscara De Naranja.....	67
4.1.1 Contenido de humedad en la cáscara de naranja.....	67
4.1.3 Caracterización microbiológica.....	70
4.2 Caracterización De Las Películas y/o Bioempaques Comestibles “Eco-Friendly Packaging”.....	71
4.2.1 Caracterización de la disolución formadora de película (DFP).....	72
4.2.2 Caracterización de películas comestibles.....	74
4.2.2.1 Propiedades físicas.....	74
4.2.2.2 Propiedades ópticas.....	78

4.2.2.3 Propiedades mecánicas.....	81
4.3 Evaluación Antimicrobiana Y Antioxidante In Vitro De Extracto De Orégano (<i>Origanum vulgare</i>).....	85
4.3.1 Compuestos fenólicos totales.....	85
4.3.2 Determinación antioxidante en los extractos de orégano.....	87
4.3.3 Actividad antimicrobiana del extracto acuoso y etanólico de orégano.....	89
4.4 Evaluación De La Vida De Anaquel En Filetes De Carpa Común Con Un Recubrimiento Comestible Incorporado Con Fibra De Cítricos Y Extracto Etanólico De Orégano (<i>Origanum vulgare L.</i>).....	93
4.4.1 Evaluación de variables fisicoquímicas en filetes de carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>).....	93
4.4.1.1 Evaluación de las propiedades ópticas.....	95
4.4.3 Determinación microbiológica en los filetes de carpa común.....	97
4.4.2 Electroforesis desnaturalizante.....	99
4.4.4 Evaluación del estrés oxidativo en filetes de carpa común.....	100
CONCLUSIONES.....	103
RECOMENDACIONES.....	104
REFERENCIAS.....	105
ANEXOS.....	133

Lista de figuras

Figura 1. Porcentaje de participación por categoría en la producción 2014.....	3
Figura 2. Diferencia de formación de a) recubrimiento comestible y b) película comestible	16
Figura 3. Función de barrera de los recubrimientos y películas comestibles	17
Figura 4. Clasificación de películas y recubrimientos comestibles aplicados en los alimentos según sus componentes	19
Figura 5. Estructuras de carvacrol y timol.	28
Figura 6. Carpa común (Cyprinus carpio) variedades con escamas a) normal; b) espejo.....	33
Figura 7. Serie histórica de la producción de carpa (peso vivo en toneladas por año)	34
Figura 8. Esquema general del proyecto.....	42
Figura 9. A) Separación de la pulpa. B) Piel cortada en forma de cuadro.....	43
Figura 10. Diagrama general de proceso para obtener los RF de cáscara de naranja	44
Figura 11. a) Bases para la determinación de elongación de la PC, con base en el Teorema de Pitágoras. b) Representación gráfica del comportamiento mecánico de una película comestible	52
Figura 12. a) Filete de carpa común posterior al tratamiento. b) Filetes de carpa rebanados en trozos pequeños.	58
Figura 13. Filetes de carpa de muestra C; P; P+E envasados.....	60
Figura 14. Curva de pérdida de peso y humedad de RF secados a 60°C	67
Figura 15. PC a base de suero de leche, grenetina, fibra y glicerol	74
Figura 16. Esfera de color	79
Figura 17. PC a base de suero de leche, gelatina y fibra	80
Figura 18. Técnica de difusión de disco en extracto acuoso y etanólico	91
Figura 19. Filetes de carpa común. a) Control, b) Recubrimiento y c) R+E. Día cero (izquierda) y día 9 (derecha).	97

Figura 20. Efecto de inhibición de los recubrimientos sobre <i>S. aureus</i>	99
Figura 21. SDS-PAGE de filetes de carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>) almacenados a 4°C	100
Figura 22. Lipoperoxidación (LPX) en filetes de <i>Cyprinus carpio</i>	101
Figura 23. Contenido de proteínas carboniladas (PCC) en filetes de <i>Cyprinus carpio</i>	102
Figura 24. Curva de calibración de ácido gálico para determinación de compuestos fenólicos	134
Figura 25. Curva de calibración de Trolox para el ensayo de radical ABTS•+	135
Figura 26. Curva de calibración de Trolox para el ensayo de radical DPPH.....	136
Figura 27. Curva de calibración Mc Farland.....	137
Figura 28. Curva de calibración para la determinación de proteínas totales.....	142

Lista de tablas

Tabla 1. Subproductos generados en diferentes sectores de la industria alimentaria	6
Tabla 2. Efectos ambientales de la actividad de la industria alimentaria.....	12
Tabla 3. Aplicaciones de películas y recubrimientos comestibles en alimentos. ...	29
Tabla 4. Región V de especies cultivadas de acuerdo a su estado	32
Tabla 5. Componentes de la matriz de película comestible	46
Tabla 6. Formulación de las Películas comestibles mediante un diseño de superficie de respuesta Box-Behnken	47
Tabla 7. Curva para la determinación de proteínas totales	66
Tabla 8. Composición proximal de RF de cáscara de naranja	69
Tabla 9. Cuenta de microorganismos en RF de cáscara de naranja (UFC/g de muestra).	70
Tabla 10. Variables fisicoquímicas medidas en la DFP.....	72
Tabla 11. Valores promedio de las variables físicas de las diferentes formulaciones de películas comestibles.	75
Tabla 12. Propiedades ópticas de las diferentes formulaciones de PC a base de SL-Gre-fibra.	78
Tabla 13. Propiedades mecánicas de las películas comestibles.....	81
Tabla 14. Formulación seleccionada para aplicación.....	84
Tabla 15. Contenido de compuestos fenólicos del extracto de orégano.	85
Tabla 16. Actividad antioxidante del extracto de orégano por el método ABTS	87
Tabla 17. Actividad antioxidante del extracto de orégano por el método DPPH ...	88
Tabla 18. Concentraciones de bacterias en los inóculos estandarizados.	89
Tabla 19. Radio de inhibición de los antimicrobianos mediante el método de difusión de disco.....	90
Tabla 20. Propiedades físicas de los filetes evaluadas en los diferentes tratamientos.	94
Tabla 21. Propiedades de color en los filetes evaluados en los diferentes	

tratamientos..... 96

Tabla 22. Análisis microbiológico de los filetes de carpa común..... 98

Tabla 23. Valores de concentración para la determinación de compuestos fenólicos.
..... 133

Tabla 24. Valores de concentración para la determinación de compuestos fenólicos
en muestra. 134

Tabla 25. Valores de concentración para la determinación de capacidad
antioxidante por ABTS. 135

Tabla 26. Valores de concentración para la determinación de capacidad
antioxidante por DPPH..... 136

Tabla 27. Estándares de turbidez Mc Farland..... 137

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha aumentado el interés por el uso de productos naturales como materias primas para la elaboración de recubrimientos comestibles, debido a que este tipo de recubrimientos presenta ventajas que incluyen el uso de ingredientes de envasado comestibles en comparación con los materiales de envasado tradicionales. De tal forma que éstos en un futuro puedan llegar a sustituir parte de los materiales generados a base de polímeros sintéticos, lo cual podría contribuir a reducir la contaminación ambiental (Wittaya, 2008).

Parte de este impacto ambiental es debido también a los residuos generados por la agroindustria, especialmente el de las frutas y vegetales que son las que más residuos generan, donde un grupo importante está conformado por los cítricos, y los cuales son una fuente desaprovechada como compuestos bioactivos. El sureste de México, es una de las principales regiones productoras de cítricos del país, donde se genera un gran volumen de desechos sólidos de cítricos (cáscara y bagazo). Uno de los componentes que presenta estos residuos es la fibra dietética compuesta por lignina y polisacáridos no almidónicos (Cummings, 1981; Anguera Vilà et al., 2007). Las fibras obtenidas a partir de frutas resultan de mayor calidad debido a que tienen una composición más equilibrada, menor contenido catiónico y de ácido fítico, mayor capacidad de retención de agua y aceites, así como una mayor fermentabilidad colónica (Saura Calixto & Jiménez Escrig, 2003). Por lo que este tipo de subproductos permite su inclusión en matrices poliméricas biodegradables.

Es así que debido al comportamiento que presenta el mercado actual de alimentos, el cual tiene preferencias por el uso de antimicrobianos y antioxidantes naturales como extractos de plantas que cumplan con el propósito de lograr una conservación de alimentos reemplazando el uso de conservantes sintéticos, los recubrimientos de diferentes orígenes naturales sirven como sustitutos entre los cuales se puede contemplar una gran variedad de extractos para la creación de envases activos, debido a sus propiedades antimicrobianas, bajo costo y su uso como fuentes

renovables. El extracto de orégano en particular, es una excelente opción ya que además de poseer actividades antisépticas y antimicrobianas, debido a su contenido de gama terpenos, carvacrol y timol se caracteriza por tener efecto altamente antioxidante debido a su contenido de ácidos fenólicos y flavonoides (García Luján, Martínez, Ortega, & Castro, 2010). Lo cual permite desarrollar recubrimientos/películas que incorporen este tipo de aditivos naturales en una dosificación adecuada sin perder su capacidad antioxidante y fungicida.

Por tal motivo se pretende contribuir con la extensión de la vida útil de productos en fresco mediante el uso de recubrimientos comestibles como lo son filetes de pescado, la cual es una materia prima que posee una alta susceptibilidad a presentar una elevada tasa de crecimiento microbiano que están correlacionadas con la aparición temprana de procesos de deterioro de las características organolépticas, olores y sabores rancios (Ghaly, Dave, Budge, & Brooks, 2010). Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de un bioempaque “eco-friendly” con la incorporación de fibra de cítricos, funcionalizado con extracto de orégano como agente protector sobre la vida de anaquel de la especie *Cyprinus carpio* a través del monitoreo de variables de respuesta fisicoquímicas y microbiológicas, y su comparación con el mismo producto cárnico sin adición del recubrimiento.

2. ANTECEDENTES

2.1 SECCIÓN A. SUBPRODUCTOS AGROALIMENTARIOS

2.1.1 Sistema agroalimentario de México

La Comisión Federal de Competencia Económica (COFECE, 2015) define al sector agroalimentario en referencia a los bienes o servicios relacionados con los productos del campo que, directamente o luego de su elaboración en procesos de diversos tipos en la industria alimentaria, se utilizan para la alimentación humana. El sector agroalimentario del país se compone, por las actividades del sector primario (agricultura, ganadería, pesca, forestal y caza) y el agroindustrial (industria de alimentos, bebidas y tabaco). De acuerdo con datos de ProMéxico (2015a, 2016), en México la industria de alimentos representa el 18.5% de la industria manufacturera (figura 1), con un total de 186,439 unidades económicas de la industria registradas a fecha de 2015, concentradas principalmente en Edo. De México, Puebla, Oaxaca, Veracruz, y el Distrito Federal. En 2015 el PIB agroindustrial generó más de 863 mil millones de pesos, siendo la industria alimentaria la que aportó el 81.5 % de este, teniendo el sector agroalimentario un crecimiento del 1.6 % en términos reales (ProMéxico, 2015b).

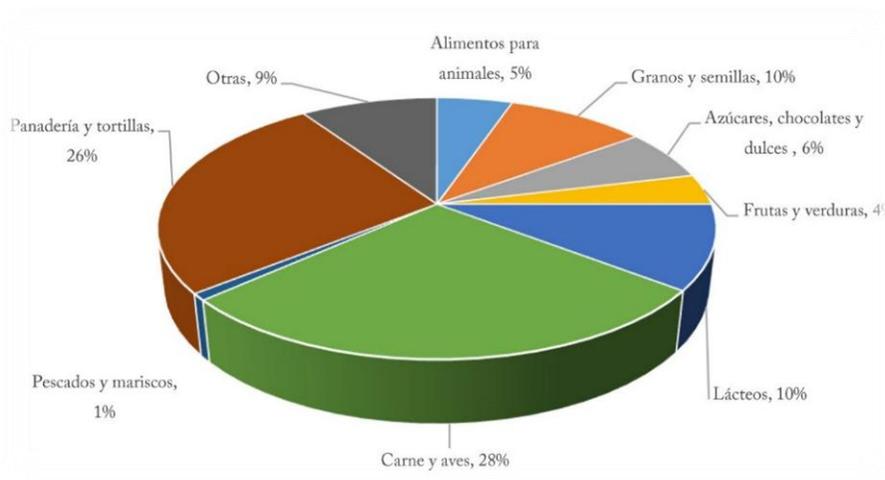


Figura 1. Porcentaje de participación por categoría en la producción 2014. INEGI

Considerando que prácticamente todos los productos para su elaboración tanto especializados como los procesados obtienen sus insumos del mercado nacional con el 87.8 %, de los cuales se puede mencionar frutas, hortalizas, carne de bovino, cartón, plástico, vidrio, etc., el sector agroalimentario juega un papel social y económicamente importante en materia de producción (ProMéxico, 2015a).

A partir de la información anterior podemos darnos una idea de la importancia que representa este sector en la economía de México siendo una de las que mayores divisas que genera en el país. Sin embargo, es también de gran importancia resaltar que de la producción y procesamiento de los mismos se generan grandes cantidades de residuos, lo cual visto desde un enfoque sustentable, presenta un serio problema para nuestro ambiente.

2.1.2 Definición de residuo / subproducto

De modo frecuente al conversar acerca del tema se utiliza de manera indistinta los términos: subproductos, residuos y desechos, sin importar que existe una diferencia de acepciones entre ellos. Por lo tanto, a partir del concepto de residuo, se puede definir y clasificar estos materiales en dos grupos: desechos y subproductos.

a) Definición de residuo: Se considera como residuo a todo aquel producto no principal que resulte de un proceso de transformación, el cual puede tener o no un valor comercial, porque son poco comunes o porque se generan en bajas cantidades, sin embargo, algunos de sus constituyentes aún en baja proporción, le pueden conferir algún interés para su utilización. Desde este punto de vista, los términos “subproducto” y “residuo” podrían utilizarse como sinónimos (Saval, 2012).

b) Definición de desecho: Son materiales generados en actividades de producción y consumo que, en el contexto en el que se producen no poseen atributos de interés, y por tanto no alcanzan ningún valor económico, ya que no existe una tecnología adecuada para su aprovechamiento o la existencia de un mercado para los productos recuperados (Morales, 2015).

c) Definición de subproducto: Producto secundario, generalmente útil, comercializable y por tanto con valor agregado, resultado de un proceso industrial (Saval, 2012).

Por otra parte, Almarcha Agulló (2016) lo describe en base en el artículo 4 correspondiente a la Ley 22/2011, del 28 de Julio, de Residuos y Suelos Contaminantes, el cual define como subproducto a una sustancia u objeto, resultante de un proceso de producción, cuya finalidad primaria no sea la producción de esa sustancia u objeto. Por lo que será considerado como subproducto y no como residuo siempre que se cumplan las siguientes condiciones:

- a) Que se tenga la seguridad de que la sustancia u objeto va a ser utilizado posteriormente.
- b) Que la sustancia u objeto se pueda utilizar directamente sin tener que someterse a una transformación posterior distinta de la práctica industrial habitual.
- c) Que la sustancia u objeto se produzca como parte integrante de un proceso de producción.
- d) Que el uso posterior cumpla todos los requisitos pertinentes relativos a los productos así como a la protección de la salud humana y del medio ambiente, sin que produzca impactos generales adversos para la salud humana o el medio ambiente.

Las definiciones anteriores sirven como punto de partida en la identificación de los residuos y subproductos.

2.1.3 Clasificación de residuos

Considerando la información anterior, la mayoría de los residuos de la industria alimentaria son subproductos, y por tanto pueden considerarse como tal, ya que en numerosas ocasiones son valorizables mediante la aplicación de diversas tecnologías (Morales, 2015).

En general, las características de los residuos agroindustriales son muy variadas, dependen tanto de la materia prima como del proceso que los generó. Sin embargo, comparten como característica principal; un contenido alto de materia orgánica, constituida por diferentes porcentajes de celulosa, lignina, hemicelulosa y pectina (Saval, 2012). De tal forma que a partir de la composición y características que presente cada residuo, éste pueda ser empleado en un proceso donde tenga una mayor eficiencia. En la tabla 1, se muestra la clasificación de la industria alimentaria en base al tipo de residuos que se obtienen durante su proceso.

Tabla 1. Subproductos generados en diferentes sectores de la industria alimentaria

Industria	Subproductos
Azucarera	bagazo, melazas y levaduras
Cárnica (mataderos)	Sangre, vísceras, huesos, intestinos, piel, grasas, pelo y plumas
Lácteos	Lactosuero
Oleaginosa	Hojas, orujo, goma y jabones
Pesquera	Cabezas, vísceras, colas, piel, espinas y conchas
Vegetales y frutas	Cáscara, hojas, tallos, semillas, y pulpa

Fuente (Gallego, 2006)

A continuación, se describen algunos residuos agroindustriales de importancia económica y que guardan relación con el objeto del presente estudio de investigación debido a la presencia de compuestos que pueden ser aprovechables.

2.1.3.1 Cáscara de cítricos

La naranja es un fruto sincárpico procedente de un ovario pluricarpelar del naranjo, árbol de la familia de las rutáceas, perteneciente al género *Citrus* y a la especie *sinensis*. Desde el punto de vista nutricional, las naranjas son frutas cítricas ricas en vitamina C y β -caroteno con pequeñas cantidades de vitaminas del grupo B y E. También son fuente de minerales tales como el calcio, magnesio, fósforo, potasio y de aminoácidos, además de contener estiridina y pectinas (Rosselló, 2007).

En el año 2015 México ocupó el quinto lugar a nivel mundial como productor de naranja, produciendo 4, 409,968 toneladas por año, siendo el sureste de México la principal región productora de cítricos, de la cual destaca Veracruz (2, 336, 427 ton) como líder en volumen aportando aproximadamente la mitad de la producción nacional de naranja, seguido de Tamaulipas (668, 935 ton) y San Luis Potosí (337, 717 ton) (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación [SAGARPA], 2016). En México, la comercialización de la naranja está enfocada al mercado nacional a granel y para el mercado internacional en jugos concentrados. Considerando que el cítrico tiene una participación nacional en la producción de frutos del 22.5% (SAGARPA, 2016), su mayor parte se destina a la extracción de jugo fresco en hogares, restaurantes, puestos ambulantes, etc., mientras que un porcentaje mínimo se consume como fruta de mesa (Martínez, 2009). De estas actividades se genera un gran volumen de residuos sólidos de cítricos (cáscara y bagazo), pues algunas frutas llegan a alcanzar rendimientos de tan solo el 50% o menos en pulpas o jugos (Batista et al., 1993; Guato Guato, 2006), subproductos agroindustriales que podrían provocar una degradación progresiva del entorno (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 1998) .

Estos subproductos, entre ellos la cáscara de cítricos, generalmente son destinados para la alimentación animal, aunque el sabor amargo ha limitado su nivel de incorporación, y cuando no son utilizados podrían representar un problema de contaminación ambiental (Lajolo et al., 2001, citado en Alvarez & Chamorro, 2009). De manera que es debido considerar su aprovechamiento para el desarrollo de productos de valor agregado, como lo es la fibra dietética (FD), la cual es la suma de lignina y polisacáridos no almidónicos (celulosa, hemicelulosa, pectinas, gomas y mucilagos) de las plantas (Anguera Vilà et al., 2007). Se ha reportado que los residuos agroindustriales de la naranja, específicamente los de la cáscara y el remanente de sáculos, podrían ser utilizados como fuente de FD debido a que son ricos en pectina y puede estar disponible en grandes cantidades (Grigelmo-Miguel y Martín-Belloso, 1998 y Nassar *et al.*, 2008; Santiago Castro, 2014).

Cerca del 75% de la fibra dietética en los alimentos está presente en la forma de fibra insoluble, sin embargo, la mayoría de las fuentes de fibra en la actualidad son mezclas de ambas fibras, insolubles y soluble (Dreher; Cordoba, 2005, citado en Chamorro & Mamani, 2015). La fibra soluble contiene mayoritariamente polisacáridos no-celulósicos tales como pectinas, gomas, algunas hemicelulosas (arabinoxilanos y arabinogalactanos) y mucilagos, lo cual le confiere la característica de tener un alto grado de solubilidad en agua y formar disoluciones altamente viscosas (Cordoba, 2005; Chamorro & Mamani, 2015). En cambio, la fibra insoluble no viscosa y escasamente soluble, está compuesta por celulosa y lignina, y proviene principalmente de las plantas y cáscara de frutas (Anguera Vilà et al., 2007). En un estudio realizado por Tamayo y Bermudez (1998) empleando cáscara y sáculos de naranja se reportó que los residuos presentaron un 79% de FDT, con una relación FDS/FDI de 43/57 (citado en Priego Mendoza, 2007), mientras que estudios posteriores Nassar et al. (2008) utilizó por separado la cáscara y pulpa de naranja, reportando 74.87% de FDT, con una relación FDS/FDI de 26/74 para el caso de la cáscara de naranja (citado en Santiago Castro, 2014). Como se describe anteriormente, la cantidad mayoritaria de fibra corresponde a la porción insoluble.

Desde el punto de vista nutricional, la fibra insoluble posee propiedades beneficiosas para el organismo por sus efectos en la salud, como la prevención del cáncer y enfermedades cardiovasculares entre otras (Trejo Márquez, Lira-Vargas, & Pascual-Bustamante, 2017). Las fibras obtenidas a partir de frutas resultan de mayor calidad debido a que tienen una composición más equilibrada, menor contenido catiónico y de ácido fítico, mayor capacidad de retención de agua y aceites, así como una mayor fermentabilidad colónica (Saura y Larrauri, 1999). Las fibras de la fruta se utilizan especialmente como aditivos funcionales del alimento debido a sus características prebióticas (Moreira, Cassani, Martín-Belloso, & Soliva-Fortuny, 2015), simultáneamente atributos tales como la gelificación y la construcción de la estructura permiten que este tipo de fibras lignocelulósicas puedan tener una amplia diversificación como ingredientes dentro de la industria alimentaria (de Moraes Crizel, Jablonski, de Oliveira Rios, Rech, & Flôres, 2013a).

2.1.3.2 Suero de Leche

El suero lácteo es, principalmente, un subproducto de la industria quesera que representa del 80% a 90% del volumen total de leche procesada. Esto significa que, para producir de 1 kg de queso, se requieren 10 litros de leche y se generan como subproducto 9 litros de lactosuero. Cuando este subproducto no tiene un aprovechamiento se convierte en uno de los efluentes que más contaminan en la industria láctea. Indistintamente los vertidos procedentes de restos de leche y lactosuero (contiene el 50% de nutrientes del producto inicial) aumentan considerablemente la carga contaminante del vertido final (Valencia & Ramírez, 2009). En general el vertido continuo de suero afecta en dos formas a nuestro ecosistema, pues por un lado afecta física y químicamente la estructura del suelo, resultando en una disminución en el rendimiento de cultivos agrícolas y por otro lado al ser desechado en el agua provoca un enorme incremento de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), reduciendo la vida acuática al agotar el oxígeno disuelto (Parra Huertas, 2009; Villena, 1995). De lo anterior, Londoño *et al.* (2008) ha reportado que debido la acción microbiana que transforma la materia orgánica en compuestos el pH del agua disminuye, trayendo como consecuencia la producción de malos olores y la muerte de los organismos acuáticos que allí se encuentren (como se cita en Guerra, Castro, & Tovar, 2013).

Según datos de Carrillo (2002), la producción mundial anual estimada de suero lácteo es de aproximadamente 145 millones de toneladas. En este contexto la industria láctea para el país en el año 2016 representó ser la tercera actividad agropecuaria más importante, lo cual colocó a México en la novena posición en la producción mundial de leche con 11 mil 607 millones 493 mil litros de leche de bovino de acuerdo con datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), es decir, 1.9% más respecto al periodo de 2015. Por su parte, la industria de quesos produjo 342 mil toneladas (SIAP & SAGARPA, 2016). Al ser una actividad con alto potencial de crecimiento, se estima que el porcentaje de lactosuero también vaya en aumento. La FAO (2005) ha reportado que en el año 2000 la producción de lactosuero en México fue de 709 mil toneladas, mientras que

datos más recientes han reportado que el suero producido en México es aproximadamente de 1 millón de toneladas y contiene 50 mil toneladas de lactosa y 5 mil toneladas de proteína. De este valor, el 47% de lactosuero es descargado al drenaje llegando a ríos y suelos, lo que además de representar un problema serio de contaminación, representa una pérdida significativa de nutrientes (Valencia & Ramírez, 2009).

El suero de leche o lactosuero se define como el líquido obtenido de la coagulación de la caseína de la leche durante la elaboración del queso mediante la acción de enzimas coagulantes de origen animal (renina) o por la adición de ácidos orgánicos de grado alimentario hasta alcanzar el punto isoeléctrico de la caseína (Cámara Nacional de Industriales de la Leche, [CANILEC], 2011). De acuerdo a su acidez, el suero se divide en dulce (pH mayor de 8), medio ácido (pH 5-5.8) y ácido (pH menor a 5). En México, el suero que se produce es dulce y medio ácido (Valencia & Ramírez, 2009). Éste subproducto contiene el 50% de nutrientes del producto inicial y la mayor parte de los compuestos hidrosolubles; 95% de lactosa (azúcar de la leche), 25% de las proteínas y 8% de la materia grasa. La composición nutricional del lactosuero puede variar considerablemente dependiendo del origen de la leche y del tipo de queso elaborado, pero en general el contenido aproximado es de 93.1% de agua, 4.9% de lactosa, 0.9% de proteína cruda, 0.6% de cenizas (minerales), 0.3% de grasa, 0.2% de ácido láctico y vitaminas hidrosolubles. Cerca del 70% de la proteína cruda que se encuentra en el suero corresponde a un valor nutritivo superior al de la caseína siendo su principal componente la β -lactoglobulina con cerca de 10%, y la α -lactoalbúmina con 4% de toda la proteína láctea (Hinrichs et al., 2004), además de inmunoglobulinas, proteasa-peptonas y enzimas nativas (Hannibal et al., 2015). Esta fracción proteica de las proteínas del suero contribuye a las propiedades funcionales de los ingredientes de proteínas y en la formulación de alimentos. Estas propiedades son; gelificación, retención de agua, solubilidad, emulsificación, textura, formación de espuma, retención de lípidos, y ciertos aromas y sabores. Es así que a partir de la innovación y nuevas tecnologías por tratar de maximizar su uso reduciendo así la contaminación, se ha convertido en un importante sustrato en la elaboración de diversos productos como bebidas

fermentadas, y alcohólicas, proteína unicelular, biopelículas, producción de ácidos orgánicos, concentrados de proteínas, derivados de lactosa entre otros (Guerra, Castro, & Tovar, 2013).

2.1.4 Contaminación

La inmensa producción de residuos es uno de los principales problemas con los que nos encontramos en la actualidad. El no manejo/ aprovechamiento de los residuos/subproductos generados durante las etapas de producción en la industria alimentaria, así como del consumo de bienes y servicios no involucra sólo los efectos ambientales, sino también está implícito, desde otro ángulo, el uso de los recursos naturales.

Desde el punto de vista del impacto ambiental potencial, las industrias alimentarias se caracterizan porque la mayor parte de sus emisiones son de naturaleza orgánica biodegradable y no peligrosa, generadas durante la transformación de la materia prima (vegetales, carne, leche, pescado, etc.) (Federación de las Industrias de la Alimentación y Bebidas [FIAB], 2008). Sin embargo, todas las operaciones de procesado de la industria alimentaria generan en mayor o menor medida varios tipos de residuos/subproductos, principalmente en forma líquida o sólida, aunque también generan emisiones gaseosas (Morales, 2015). Se conoce que las emisiones y los residuos originados de la agroindustria han dado lugar a medidas de control cada vez más estrictas, debido a que las emisiones de aguas residuales han recibido una mayor atención por su potencial contaminante (Arvanitoyannis, 2008, citado en Hernández-Cázares, Real-Luna, Delgado-Blancas, Bautista-Hernández, & Velasco-Velasco, 2016), sin dejar de lado los residuos sólidos. Estas se caracterizan por tener alta carga orgánica, tanto en Demanda Química de Oxígeno (DQO), como en Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), elevado contenido de sólidos en suspensión y pH variable (Morales, 2015). En la mayoría de los países desarrollados tratan las aguas residuales en un porcentaje elevado. Desafortunadamente en México sólo el 20% del agua recibe tratamiento, por tanto una inmensa cantidad de agua contaminada se vierte a nuestros lagos o lagunas y zonas costeras sin ningún

tratamiento previo (Valencia & Ramírez, 2009). Por otra parte, cuando los residuos agroindustriales son dispuestos sobre el suelo sin tratamiento previo y permanecen a la intemperie, su descomposición los puede convertir en residuos peligrosos principalmente por la presencia de agentes infecciosos ocasionando una dispersión de contaminantes. El daño que pudieran ocasionar dichos residuos está en función de sus características fisicoquímicas y biológicas, además al ser residuos, en su mayoría biodegradables, estos pueden generar durante su descomposición lixiviados, los cuales migrarían en forma vertical hacia el subsuelo y podrían alcanzar los mantos acuíferos, provocando su deterioro y riesgo para la salud humana y demás organismos vivos (Saval, 2012). Aunque existen grandes diferencias entre los sectores que conforman la industria alimentaria, los aspectos ambientales más relevantes que la caracterizan se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Efectos ambientales de la actividad de la industria alimentaria

Entorno	Efecto
Atmósfera	Emisiones ácidas
	Gases peligrosos
	Humo
	Finos
Agua	DBO
	DQO
	Eutrofización
	Sustancias peligrosas
	Espumas
	Turbidez
Suelo	Color
	Residuos peligrosos
	Residuos no peligrosos
Molestias	Visual
	Polvo
	Olor
	Vibraciones acústicas
Recursos Naturales	Energía
	Agua
	Combustibles

Fuente: Gallego, 2006

Según la FAO (2015) en México se desperdician, en promedio 37.26 % de los alimentos anualmente. Esta cantidad representa más de 10 millones de toneladas/año y refleja no sólo los residuos de procesamiento de alimentos, sino

también las "pérdidas de alimentos". Por lo anterior resulta importante identificar los distintos focos de producción de residuos/ subproductos, catalogándolos en base a sus características, aspectos que determinará su adecuación al actual marco legislativo, propiciando su correcta gestión, de modo que se pueda valorizar aquello que pueda resultar útil y dar un destino final adecuado a lo que pueda tener efectos nocivos al medio ambiente (Morales, 2015).

2.1.5 Aprovechamiento y Revalorización

En particular, la industria alimentaria genera una gran cantidad de residuos con elevado potencial de aprovechamiento, sin embargo, cuando no es aprovechable, su tratamiento supone un gasto y problemas ambientales como los mencionados anteriormente. Generalmente métodos, como la incineración, la fermentación anaeróbica, el compostaje, el relleno sanitario o el uso de residuos alimentarios para aplicaciones agrícolas, como la alimentación animal o el abono, son las principales estrategias para la minimización y valorización de los desechos (Galanakis, 2015). No obstante, en los últimos años los nuevos métodos asociados con la utilización y/o aprovechamiento de residuos agroindustriales como materia prima de bajo costo, para la obtención de componentes valiosos está ganando interés. Éstos materiales son fuentes especialmente atractivas por su contenido en compuestos de diferente naturaleza (como azúcares, pigmentos, fibra alimentaria, proteína, polifenoles y lignina), los cuales pueden ser potencialmente útiles cuando se les transforma mediante las reacciones apropiadas en productos de elevado valor añadido (Sreenath et al., 2001; Moldes et al., 2002), convirtiéndose en compuestos útiles en el campo alimentario, médico, o en el sector químico (Vazquez & Velazquez, 2012).

Es por ello que persiguiendo un desarrollo sostenible en la industria alimentaria, se tendrá como temática primordial fomentar el desarrollo de más medidas para aprovechar y valorizar los subproductos generados, cuya finalidad sea la obtención de una solución ambiental, la optimización de recursos (Fernández et al., 2008), y el compromiso con la disminución de pérdidas y desperdicios.

2.2 SECCIÓN B. BIOEMPAQUE COMESTIBLE ECO-FRIENDLY

El término verde es alternativamente conocido como "sostenible", "eco-friendly" o "environmentally friendly" (Kim et al., 2013). La traducción del término significa, ser respetuoso o amigable con el ambiente. Este concepto se ha instaurado como una palabra de moda en una amplia gama de bienes y servicios, por lo que en los últimos años ha ido ganando interés hasta lograr establecerse como una tendencia en una gran mayoría de los consumidores, y en general por la misma sociedad en su concientización por coadyuvar a minimizar el impacto ambiental, mediante la adopción de productos respetuosos con el medio ambiente (Leonidou et al., 2013, Prakash & Pathak, 2017).

2.2.1 Envasado "verde" en alimentos

En el consumo de los hogares, los alimentos representan una parte sustancial y hasta un tercio del impacto ambiental se debe principalmente a los materiales de envasado (Koenig-Lewis et al., 2014). Por ello, en distintos países para ayudar a mantener el equilibrio ecológico, han adoptado la práctica del "empaque verde". De acuerdo con Arvanitoyannis & Kasaveti (2008) actualmente existen tres tipos de envases "verdes":

- Envases reutilizables, como botellas de vidrio, que pueden limpiarse y reutilizarse.
- Envases reciclables, que están hechos de materiales que se pueden volver a usar, generalmente después del procesamiento - como vidrio, metal, cartón y papel.
- Envases biodegradables, que se descomponen fácilmente y desaparecen en el suelo o en la atmósfera, sin causar daños.

En este sentido, la biodegradabilidad no es sólo un requisito funcional sino también un atributo ambiental importante. Por lo que una contribución para la protección del medio ambiente es el diseño conceptual de productos ecológicos con el fin de reducir el consumo de plástico, especialmente en el envasado. Dentro de este

enfoque, las películas comestibles se consideran como un producto de embalaje biodegradable (Wei & Yazdanifard, 2013).

2.2.2 Alternativa (recubrimientos, empaques o films comestibles) biodegradable

Los empaques comestibles surgen como una alternativa a los materiales de base petroquímica tales como poliolefinas, poliésteres y poliamidas que se han utilizado cada vez más como materiales de embalaje, debido a su disponibilidad en grandes cantidades a bajo costo y características funcionales satisfactorias. Sin embargo, a pesar de sus ventajas, estos materiales no son totalmente biodegradables y causan problemas en la eliminación de los residuos (Tharanathan, 2003). Por otra parte, la creciente capacidad de respuesta ecológica, junto con las nuevas leyes ambientales, están empujando a las industrias a buscar más materiales respetuosos con el medio ambiente, específicamente para envasado de alimentos, donde el material tiene una vida muy corta (Ohtake et al., 1998; Scott, 2000; Goncalves et al., 2016).

Al mismo tiempo, la gran cantidad de agro-desechos generados por la industria ha sido una preocupación creciente, lo que se convierte en una cuestión ambiental y financiera (Bayer et al., 2014). Entre estos desechos destacan, los tallos de verduras / frutas, granos y semillas, los cuales junto a otras materia primas agrícolas tales como almidones y proteínas (Swain, Biswal, Nanda, & Nayak, 2004) pueden ser utilizados como materiales biodegradables eco-friendly y biológicos, obtenidos de recursos renovables.

Así, las películas comestibles (PC) y recubrimientos comestibles (RC) basados en ingredientes naturales atraen mucho el interés hoy en día como un enfoque eficiente, seguro y ecológico para la calidad de los productos alimenticios y el mejoramiento de la vida útil (Bourtoom, 2008). Por tanto el uso de estos materiales capitaliza la conservación de los recursos naturales con base en productos ecológicos y una atmósfera segura (Tharanathan, 2003).

2.2.2.1 Definición de los RC y PC

Una película y recubrimiento comestible (RC) se definen como una delgada capa de material que puede consumirse, cuya finalidad es proporcionar una barrera para la transferencia de masa (humedad, oxígeno y movimiento del soluto) sobre o entre, el alimento, los componentes del alimento o el medio (Bourtoom, 2008; Garcia et al., 2016) y extender su vida útil.

La principal diferencia entre RC y PC, se debe a la forma en cómo se aplican sobre la superficie del alimento, pues los RC son aplicados en forma líquida por inmersión formándose la película sobre el alimento (figura 2a), mientras que las PC son primero preformadas como láminas sólidas y después se aplican como envoltura sobre el alimento (figura 2b) (Falguera et al., 2011).



Figura 2. Diferencia de formación de a) recubrimiento comestible y b) película comestible (Herrera-Vázquez, 2016)

2.2.2.2 Principales Funciones

Los envases comestibles actualmente se están aplicando a alimentos de diversa naturaleza (frutas, verduras, carnes, dulces, cereales, pescados, etc.), normalmente en combinación con otras tecnologías de conservación (ej. refrigeración, atmósferas modificadas o controladas, tratamientos térmicos, etc.), con la finalidad principal de alargar la vida útil y mejorar la calidad del alimento al cual recubren, mediante diferentes funciones como son la de actuar de barrera, mejora de las propiedades, soporte de aditivos, adherir diferentes partes de un alimento o proteger pequeñas

porciones, entre otras (Debeaufort, Quezada-Gallo, & Voilley, 1998; Kester & Fennema, 1986, Pavlath & Orts, 2009, citado en López de Lacey, 2012).

Un RC o PC al actuar de barrera crea una atmosfera modificada (AM) que permite el intercambio controlado de gases (O_2 , CO_2), se convierte en una barrera para la transferencia de compuestos aromáticos (Miller & Krochta, 1997), crecimiento microbiano y evita la absorción / pérdida de humedad en el alimento (Kester & Fennema, 1986) (Figura 3). Al tener la capacidad de trabajar sinérgicamente con otros materiales de embalaje sirve como medio de soporte de aditivos, por un lado mejorando las propiedades organolépticas de los alimentos envasados al tener diversos componentes (aromas, colorantes, edulcorantes) (Bourtoom, 2008), o bien ser envases activos al incorporar en su matriz polimérica aditivos naturales (por ejemplo, antimicrobianos y antioxidantes) (Ancos, González-Peña, Colina Coca, & Sánchez-Moreno, 2015; Guilbert, Gontard, & Cuq, 1995), que protejan de la oxidación o inhiban el crecimiento microbiano tanto de patógenos como de responsables del deterioro (López de Lacey, 2012).

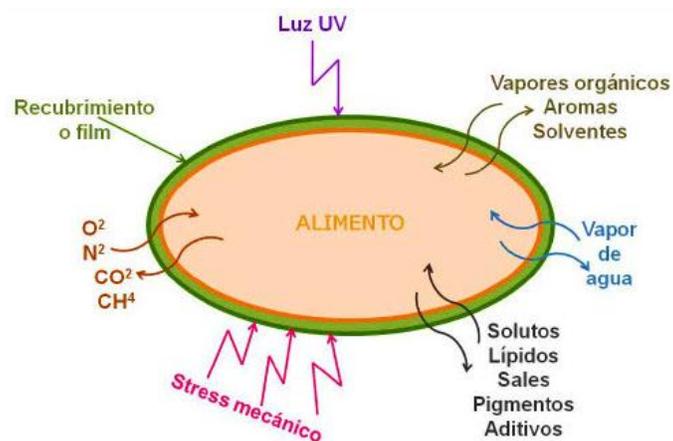


Figura 3. Función de barrera de los recubrimientos y películas comestibles (Adaptada de Debeaufort, Quezada-Gallo y Voilley, 1998)

De igual forma pueden utilizarse para proteger pequeñas porciones de alimento, en particular productos que actualmente no están envasados individualmente por razones prácticas tales como peras, frijoles, nueces y fresas (Bourtoom, 2008), y/o mejorar la integridad mecánica o manipulación del producto alimenticio. Además de

ofrecer una alternativa a los materiales comerciales de envasado usado para producto alimenticios (Dutta et al., 2009; Greener-Donhowe & Fennema, 1994).

2.2.2.3 Formación de PC y RC

La formación de película es un proceso en el que se obtiene una fase sólida ordenada a partir de una fase líquida. Existen dos mecanismos generales para la formación de películas; el proceso seco y el húmedo. El proceso en seco se basa en las propiedades termoplásticas de los biopolímeros calentados por encima de su temperatura de transición vítrea en procesos tales como extrusión o moldeo por compresión, en condiciones de bajo contenido de agua. Mientras el proceso húmedo está basado en la disolución formadora de película (DFP), donde los biopolímeros son inicialmente dispersados o solubilizados en una fase líquida y posteriormente, son secados (Bertuzzi & Slavutsky, 2016; Sánchez, 2010). Los sistemas disolventes de grado alimenticio para PC y RC están limitados a agua, etanol o una combinación de ambos (Khwaldia, Perez, Banon, Desobry, & Hardy, 2004). El proceso húmedo es el más empleado para la formación de PC y RC en alimentos (Peressini et al., 2003).

La formación de películas involucra uno de los siguientes procesos (Greener-Donhowe & Fennema, 1994);

- **Coacervación:** Consiste en un cambio de fase del polímero formador. Puede ser simple o compleja. La simple da la precipitación del hidrocoloide mediante calor, alteraciones del pH o añadiendo disolventes. En la compleja se altera la carga, poniendo en contacto dos macromoléculas que se neutralizan entre ellas.
- **Retiro del disolvente:** permite la formación de la película sólida mediante su evaporación a la temperatura y humedad relativa deseada.
- **Solidificación de la disolución:** empleada en películas de naturaleza lipídica. La tasa de enfriamiento influye en estado polimórfico predominante.

De acuerdo a Krochta et al. (2002), la DFP se pueden aplicar a un alimento por

varios métodos como la impregnación al vacío, rociadura e inmersión.

2.2.2.4 Materiales para la elaboración de películas y RC

Los materiales utilizados para la elaboración de disoluciones formadoras de PC o RC, también denominados biopolímeros, proceden de diversas fuentes de origen animal y vegetal, tanto terrestre como marino, así como procedente de los microorganismos (Tharanathan, 2003). Dichas disoluciones pueden estar conformadas por proteínas, polisacáridos, lípidos o por una mezcla de los mismos (John M. Krochta, Baldwin, & Nisperos-Carriedo, 1994; Viroben, Barbot, Mouloungui, & Guéguen, 2000).

Debido a las características que pueden llegar a presentar los RC o PC en función del origen de los componentes base utilizados que permitan mejorar sus propiedades funcionales, al combinar las ventajas de cada uno, los RC y PC pueden clasificarse en tres categorías: (1) hidrocoloides (proteínas y polisacáridos), (2) lípidos, y (3) Compuestos (componentes antes mencionados) (figura 4).

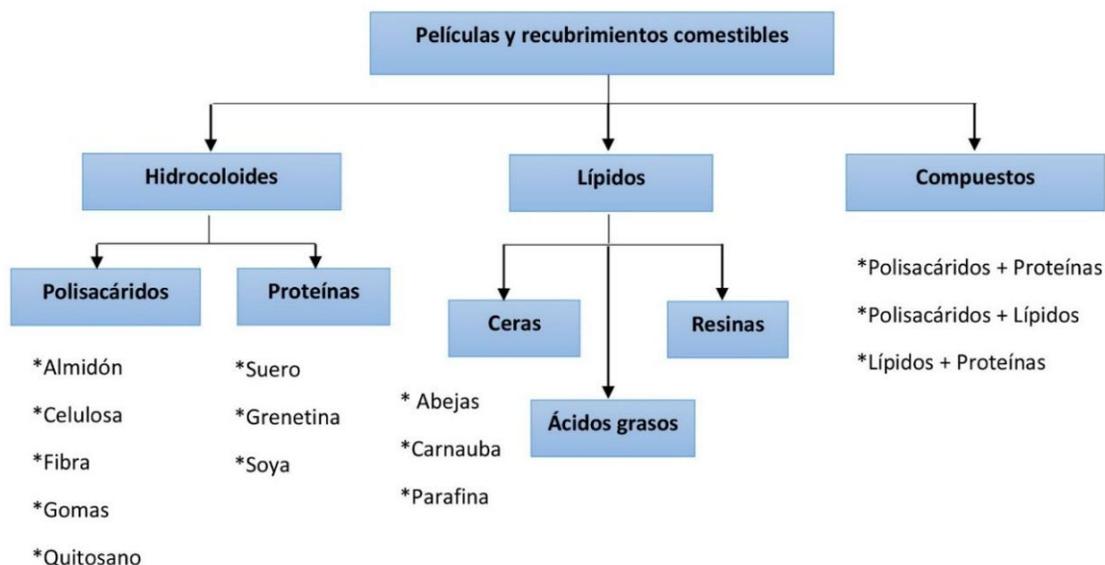


Figura 4. Clasificación de películas y recubrimientos comestibles aplicados en los alimentos según sus componentes (Kapetanakou, Manios, & Skandamis, 2014)

2.2.2.4.1 Hidrocoloides

Las películas de hidrocoloides pueden ser utilizadas en aplicaciones donde el control de la migración del vapor de agua no es el objetivo (Greener-Donhowe & Fennema, 1994), esto debido a su carácter hidrofílico. Respecto a la permeabilidad al gas, pueden ser selectivamente permeables a O₂ y CO₂ (Kester & Fennema, 1986) y la mayoría de estas películas suelen proporcionar mayores propiedades mecánicas a los envases comestibles que los lípidos y las sustancias hidrófobas (Debeaufort et al., 1998). En líneas muy generales, la formación de una red macromolecular de un biopolímero tipo hidrocoloide requiere de algunas etapas: en primer lugar la solubilización (parcial o total) que permita una ruptura de enlaces intermoleculares de baja energía que estabilicen a los polímeros en su estado nativo; de esta manera se facilita un reordenamiento y orientación de las cadenas poliméricas y una interacción con el resto de componentes que forman la película (esta estructura se estabiliza durante el secado) (Cuq, Gontard, Cuq y Guilbert, 1998; Mauri y Añón, 2008; López de Lacey, 2012). Así, los hidrocoloides utilizados para películas y recubrimientos van a depender en gran medida de su naturaleza, composición (polisacáridos y proteínas), carga molecular y solubilidad en agua.

2.2.2.4.1.1 Polisacáridos

Los materiales formadores de película incluyen almidones, gomas vegetales (por ejemplo alginatos, pectinas y goma arábica), almidones modificados químicamente y fibras. Los polisacáridos tienen monómeros simples, sin embargo, la conformación de las estructuras de polisacáridos es más complicada e impredecible. Debido al gran número de grupos hidroxilo u otros restos hidrófilos en la estructura de hidratos de carbono neutros, los enlaces de hidrógeno juegan el papel más significativo en la formación de la película y sus características (Han, 2014). A pesar de que la mayoría de los carbohidratos son neutrales, materiales como los alginatos y las pectinas requieren la adición de un ion polivalente (usualmente calcio) (Greener-Donhowe & Fennema, 1994), para facilitar la formación de la película. El peso

molecular del polisacárido también juega un papel importante en las propiedades. Los polímeros lineales de alto peso molecular y no iónico forman películas fuertes, como es el caso del agar y la metilcelulosa. En cambio, los polisacáridos más ramificados, con o sin carga aniónica, forman películas más débiles (Nieto, 2009). Ellos, al igual que las proteínas, son susceptibles a cambios de pH debido a su estado cargado.

En general las películas y recubrimientos comestibles producidos por los polisacáridos son transparentes, cohesivos y homogéneos (Bourtoom, 2008). La principal ventaja es que proporcionan propiedades mecánicas adecuadas, y su capacidad para retrasar la transmisión de O₂ y CO₂ (Kester & Fennema, 1986; A. E. Pavlath & Orts, 2009), no obstante al ser polímeros hidrófilos, presentan propiedades de barrera a la humedad y vapor de agua muy bajas (Rhim & Ng, 2007).

2.2.2.4.1.1 Fibra de Cítricos

Los residuos de la industria de zumos de frutas, por ejemplo, son una fuente rica en pectina, fibras dietéticas y fitoquímicos (Otoni et al., 2017). En particular, la fibra dietética (FD) es una fuente de diversos carbohidratos y la lignina resistentes, al menos en parte, a la hidrólisis de los enzimas digestivos humanos (Lee et al.; 1994; Anguera Vilà et al., 2007). La fibra dietética, no sólo tiene un alto valor nutricional, sino también la prevención de muchas enfermedades, siendo esencial para el metabolismo humano (Wang, Wu, Wang, & Zhu, 2012).

Su integración en formulaciones de películas y revestimientos comestibles ha sido escasamente estudiada, pero estudios realizados por (Moreira et al., 2015), reportaron un efecto positivo al incorporar este componente sobre las propiedades organolépticas y vida de anaquel del alimento. Generalmente, tanto las fibras solubles como las insolubles sirven para proporcionar resistencia a la película, estabilidad dimensional, acabado mate (aspecto), una característica de disolución deseada o como agentes para unirse y restringir la movilidad de ingredientes activos (por ejemplo, una vitamina a base de aceite). En algunos casos, la fibra está presente para proporcionar un beneficio nutricional o digestivo (Rossman, 2009). Al

ser materiales lignocelulósicos residuales, representan una fuente de origen renovable y biodegradable de sus derivados (Pacheco, 2002), la pectina se considera una importante materia prima debido a su naturaleza formada en su mayoría por varios residuos de ácido poligalacturónico interrumpido por enlaces cortos de ramnosa y alta solubilidad en agua. Propiedades como la deformación amplia de la molécula y la presencia en la disolución de agregación son similares a las que se encuentran en algunos polímeros sintéticos (Niño, Huerta, Verde, & Rodríguez, 2010), permitiendo su incorporación en la elaboración de materiales biodegradables (Ferreira, Linhares, & Martelli, 2016).

2.2.2.4.2 Proteínas

Las proteínas son macromoléculas con secuencias de aminoácidos y estructuras moleculares específicas. Dependiendo del orden secuencial pueden asumir diferentes estructuras mediante diversos tipos de enlaces (electrostático, hidrófobo, Van der Waals, puentes de hidrógeno, y las interacciones entre enlaces cruzados disulfuro) (Cheftel et al., 1985). Así, este tipo de películas se verá influenciado por la composición de aminoácidos, la carga electrostática, las propiedades anfífilas, así como los cambios de estructura secundaria, terciaria y cuaternaria debido al calor, la presión, la irradiación, el tratamiento mecánico, los ácidos, los álcalis, los iones metálicos, las sales, la hidrólisis química, etc., que permitan formar estructuras más extendidas y conseguir propiedades de película deseables (Bourtoom, 2008; Han, 2014; J.M. Krochta, 2002).

Las proteínas utilizadas en la formulación de recubrimientos comestibles pueden ser de origen animal (colágeno, gelatina, proteína miofibrilar de pescado, queratina, proteína de clara de huevo, caseína y proteína de suero de leche) o de origen vegetal (zeína de maíz, gluten de trigo, proteína de soja) (Kester & Fennema, 1986). Las proteínas de alto peso molecular y fibrilares -como el colágeno, la gelatina y las proteínas miofibrilares- pueden formar redes más amplias con buenas propiedades mecánicas (Guillbert y Graille, 1994). En cambio, las proteínas globulares,

frecuentemente de bajo peso molecular (como las proteínas aisladas de soja y proteínas sarcoplásmicas), hacen redes más compactas y menos elásticas (Mauri y Añón, 2008), aunque exhiben permeabilidades más altas (Pavlath & Orts, 2009). Las películas y revestimientos basados en proteínas tienen como ventaja principal su estabilidad estructural (Pavlath & Orts, 2009), pues son generalmente superiores a los polisacáridos en su capacidad para formar películas con mayores propiedades mecánicas y de barrera contra gases (Cuq et al., 1998; Suput, Lazic, Popovic, & Hromis, 2015); sin embargo, su pobre resistencia al vapor de agua comparado con la de los polisacáridos constituye su principal inconveniente (Campos et al., 2011; Kapetanakou, Manios, & Skandamis, 2014).

Por otro lado, la capacidad antioxidante de ciertas proteínas como las proteínas de la leche (Cervato, Cazzola y Cestaro, 1999), zeína de maíz (Wang, Fujimoto, Miyazawa y Endo, 1991), o gelatina de pescado (Alemán, Giménez, Montero y Gómez-Guillén, 2011) constituyen un valor añadido (López de Lacey, 2012).

2.2.2.4.2.1 Gelatina

La gelatina se obtiene mediante hidrólisis controlada de la proteína fibrosa insoluble, colágeno, que se encuentra ampliamente en la naturaleza como el constituyente principal de la piel, los huesos y el tejido conectivo (Bourtoom, 2008). Sus características difieren de otros hidrocoloides como una proteína completamente digerible, que contiene casi todos los aminoácidos esenciales (alto contenido de glicina, prolina e hidroxiprolina), excepto el triptófano (Fakhouri, Martelli, Caon, Velasco, & Mei, 2015). Aproximadamente a 35°C (punto de fusión), la gelatina forma una disolución viscosa de cadenas de polipéptidos lineales en espiral y al enfriar forman un gel físico termorreversible, recuperando la estructura de hélices de colágeno, aunque no muy largas (Kapetanakou et al., 2014; Skurtys et al., 2014).

La gelatina produce películas resistentes flexibles cuando se homogeniza junto con glicerina o sorbitol (Arvanitoyannis et al., 1997, Tharanathan, 2003). (Guilbert et al., 1995) sugiere una preparación con gelatina al 20-30% y agregar plastificante al 10-

30% (glicerina o sorbitol). Generalmente la gelatina se utiliza para encapsular ingredientes de alimentos de baja humedad o fase de aceite y productos farmacéuticos. En alimentos, como recubrimientos en carnes, Gennadios et al. (1994) expone que se han formado películas de gelatina para reducir el transporte de oxígeno, humedad y aceite (citado en Bourtoom, 2008). Las propiedades y capacidad de formación de la gelatina varían dependiendo del origen de la materia prima, así como del peso molecular, es decir, cuanto mayor es el peso molecular promedio, mejor es la calidad de la película (Ledward, 2000). Usualmente las gelatinas de mamíferos suelen tener mejores propiedades físicas y termoestabilidad que las gelatinas de pescado (Mitchell, 1998), lo cual se relaciona con su mayor contenido de aminoácidos (Gómez-Guillen et al., 2002) (citado en Skurtys et al., 2014).

2.2.2.4.2.2 Suero de leche

La proteína de suero es la fracción proteica que permanece soluble durante la elaboración del queso, una vez precipitada la caseína a pH 4.6. Dentro de las proteínas del suero se encuentran principalmente la α -Lactalbúmina (α -La), β -Lactoglobulina (β -Lg), seroalbúmina bovina (BSA), inmunoglobulinas (Ig) y proteosa-peptonas (PP), generalmente son de estructura globular y térmicamente lábiles por naturaleza. La β -Lg es el mayor componente (50-60%) (Sothornvit y Krochta, 2001) y contiene un grupo tiol (-SH) libre importante y dos grupos disulfuro (S-S) por monómero; 4 grupos hidrófobos se encuentran dentro de la estructura globular (Khwaldia et al., 2004). Generalmente el concentrado de proteína de suero de leche producido industrialmente (WPC) tiene un contenido de proteínas entre 25 y 80%, mientras que el aislamiento de proteína de suero (WPI) tiene un contenido de proteínas superior al 90% (Skurtys et al., 2014).

La formación de la película a partir de las proteínas de suero de leche, requiere la desnaturalización térmica de la β -Lg y α -La, de manera que el grupo tiol oculto por la alfa-hélice (Sawyer et al., 1999), sea expuesto y esté disponible para la formación

de enlaces disulfuro intermoleculares (Dangaran, Tomasula, & Qi, 2009). Sin embargo, estudios a partir de la desnaturalización por calor del suero de leche reportaron ser frágiles, requiriendo el uso de plastificantes que reduzcan las fuerzas intermoleculares a lo largo de las cadenas poliméricas (Banker, 1966) y aumentar así la flexibilidad de la película (McHugh & Krochta, 1994). Sin embargo, se debe dosificar adecuadamente, pues su incorporación también aumenta la permeabilidad al vapor de agua en la película (Gontard y otros 1993), disminuye la fuerza de tensión y el módulo de Young, no obstante aumenta la elongación (Skurtys et al., 2014). Con la adición de plastificante, las proteínas de suero desnaturalizadas por calor producen películas transparentes, blandas y flexibles con excelentes propiedades de barrera al oxígeno, aroma y aceite a baja humedad relativa (RH) (McHugh y Krochta, 1994, De Mulder-Johnston, 1999, como se cita en Perez-Gago & Krochta, 2002). Además son una buena opción para retrasar la oxidación lipídica (aperitivos, pescado graso congelado), pues revestimientos que incluyeron este componente en su formulación demostraron su capacidad para limitar la pérdida de agua y los cambios de oxidación de la grasa en el salmón (Galus & Kadzińska, 2015).

2.2.2.4.3 Lípidos

Las películas de lípidos se usan como barreras efectivas para limitar la migración de humedad/ vapor de agua dentro de los alimentos, debido a su naturaleza apolar (Morillon et al., 2002). Los lípidos consisten en ceras, aceites y resinas. Durante varias décadas, las ceras (cera de carnauba, cera de abejas y cera de parafina) y aceites (aceite mineral y vegetal) se han utilizado comercialmente como revestimientos protectores para frutas y verduras frescas (Baldwin 1994, citado en Kapetanakou et al., 2014), pues retardan su respiración y disminuyen la pérdida de humedad. Los lípidos no tienen influencia sobre las propiedades mecánicas pero algunos de ellos (ácidos grasos, fosfolípidos) se usan en la formulación como emulsionantes y agentes tensoactivos que aumentan la flexibilidad debilitando las fuerzas intermoleculares entre las cadenas del polímero (Milovanović & Pićurić-

Jovanović, 2001), además se utilizan a veces como barreras para los gases y / o la humedad en los pescados o productos cárnicos (Debeaufort & Voilley, 2009). Sin embargo, tienen propiedades limitadas de barrera al oxígeno y el uso de grasas como una cubierta protectora para los alimentos puede tener inconvenientes, como el comienzo de rancidez en las grasas, así como revestimiento superficial graso que las grasas pueden impartir (Kamper & Fennema, 1984; Rhim & Ng, 2007). Dado que estos materiales lipídicos no son polímeros, generalmente no forman películas cohesivas autónomas, es decir, forman películas frágiles.

Estudios en los que se utilizaron ácidos grasos de cadena larga y lípidos sólidos en la preparación de películas compuestas, mostraron poseer una resistencia mayor a la transmisión de gas y vapor de agua que aquellos en un estado líquido (Kamper y Fennema, 1984, Kester y Fennema, 1989), indicando que la movilidad molecular de los lípidos disminuye sus propiedades de barrera (Greener-Donhowe & Fennema, 1994; Liu, Kerry, & Kerry, 2006). Adicionalmente, algunos investigadores (Roth y Loncin, 1985, y Hagenmaier y Baker, 1997) han reportado que la introducción de enlaces dobles en la cadena aumenta la transmisión del vapor de agua aproximadamente 80 veces, lo que se atribuye a la pérdida de cristalinidad (Pavlath & Orts, 2009). Por lo anterior, aunque los ácidos grasos y los alcoholes grasos son barreras efectivas contra el vapor de agua, su fragilidad requiere que se utilicen conjuntamente con una matriz de soporte.

2.2.2.4.4 Componentes para formación de RC y PC

Las películas compuestas son estructuras heterogéneas de componentes lipídicos e hidrocoloides (proteínas o polisacáridos), cuyo fin principal es mejorar las características de permeabilidad o propiedades mecánicas al combinar las ventajas de cada componente. Las posibles combinaciones de compuestos biopolímeros son: (1) proteínas y polisacáridos, (2) proteínas y lípidos, y (3) polisacáridos y lípidos. En general, los lípidos aportan resistencia al vapor de agua y los hidrocoloides, permeabilidad selectiva al O₂ y CO₂, durabilidad, buena cohesión estructural o integridad (Navarro, 2010; Rhim & Ng, 2007). La asociación entre los

biopolímeros puede conseguirse mediante mezcla, extrusión, laminación o revestimiento, siendo la mezcla la manera más fácil y efectiva de preparar una capa de película homogénea (Campos, Gerschenson, & Flores, 2011). El compuesto de biopolímeros se puede producir bien como emulsiones bicapa o estables. En biopolímeros compuestos bi-capa, el lípido forma una segunda capa sobre la capa de polisacárido o proteína, mientras que en emulsión el lípido se dispersa e inmoviliza en la matriz de soporte de proteína o polisacárido (Pérez-Gago y Krochta 2005; Kapetanakou, Manios, & Skandamis, 2014).

2.2.2.5 Antimicrobianos naturales utilizados en RC y PC

Los RC y las PC tienen la funcionalidad de actuar como vehículos que incorporen en su formulación aditivos a los alimentos de manera intencional, permitiendo actuar como agentes antimicrobianos y/o antioxidantes que puedan extender la vida útil del producto y reducir el riesgo de crecimiento de patógenos en las superficies de los alimentos (Cagri, Ustunol, & Ryser, 2004). Los aditivos naturales con propiedades antimicrobianas empleados en los últimos años incluyen: enzimas como las lactoperoxidasas (leche) y lisozimas (clara de huevo); bacteriocinas como la nisina (bacterias lácticas); polisacáridos como el quitosano (esqueleto de crustáceos); ácidos orgánicos (ascórbico, cítrico, oxálico) y compuestos fenólicos (plantas y especies). Dentro de este último grupo, se han utilizado aceites esenciales de plantas aromáticas (romero, tomillo, orégano), especias (clavo, canela) y extractos fenólicos (té verde, ajo, cebolla) (Ancos et al., 2015).

2.2.2.5.1 Orégano

El orégano (*Origanum vulgare* L.) es una planta herbácea nativa de las regiones mediterráneas, la cual contiene un alto contenido de compuestos fenólicos que le atribuyen propiedades antimicrobianas, antioxidantes y antifúngicas (Irmak & Erbatur, 2008). Estudios han mostrado que los extractos de orégano y aceites

esenciales presentan actividad inhibitoria contra el crecimiento de diferentes bacterias (Kocić-Tanackov et al., 2012). En particular, el aceite esencial de orégano ha demostrado poseer actividad antimicrobiana sobre *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus* (Gómez y López, 2009). Los componentes principales del aceite esencial de orégano son carvacrol y timol (figura 5). La actividad antimicrobiana es debida al carácter hidrofóbico y lipofílico de los monoterpenos y compuestos fenólicos que contiene. La hidrofobicidad les otorga capacidad de atravesar y alterar las membranas celulares, interrumpiendo la fuerza motriz del protón, el flujo de electrones, el transporte activo y la coagulación de los contenidos celulares (Burt, 2004), permitiendo la muerte de los microorganismos.

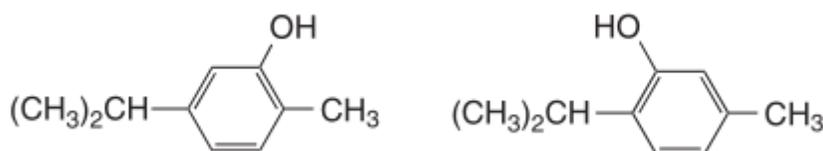


Figura 5. Estructuras de carvacrol y timol respectivamente.

La acción antimicrobiana de los aceites esenciales se reduce considerablemente en carnes, productos cárnicos y pescado con alto contenido de grasa (Gómez y López, 2009). Por ello, la selección de un antimicrobiano, debe considerar la efectividad contra el microorganismo objetivo, así como las posibles interacciones entre el biopolímero y los componentes presentes en el alimento. Estas interacciones pueden modificar la actividad antimicrobiana y las características de la película, siendo estos factores clave para el desarrollo de películas y recubrimientos antimicrobianos (Campos et al., 2011).

2.2.2.6 Aplicaciones de PC y RC a alimentos

Las PC y RC han sido una tecnología utilizada ya hace varios años. En los años 60s este tipo de tecnología era muy poco comercial y estaba limitada principalmente a capas de cera en las frutas (Pavlath & Orts, 2009), no obstante un mayor aprovechamiento de los componentes encontrados en los recursos naturales ha

permitido a esta mantenerse y diversificarse en una amplia gama de productos. Más de 90 patentes y artículos científicos sobre la fabricación de envases comestibles se han publicado desde 1990 (Debeaufort et al., 1998). Actualmente las PC y RC se aplican en alimentos frescos, mínimamente procesados y procesados. Estos incluyen a las frutas y vegetales; carnes, aves y pescados (congelados y ahumados); lácteos (helado y queso), granos (panificación y botanas), confitería y frutos secos (nueces). Las potencialidades de PC y RC dependerán de acuerdo con la aplicación específica, el tipo de producto alimenticio y sus principales mecanismos de deterioro (Guilbert, 2005; Zhang, Han, & Liu, 2008). A continuación se muestra la tabla 3, con aplicaciones de PC y RC en alimentos.

Tabla 3. Aplicaciones de películas y recubrimientos comestibles en alimentos.

Materiales para RC y PC	Alimentos	Efecto
Frutas y vegetales		
Alginato	Seta	Mantener firmeza y retrasar oscurecimiento y apertura de capa
Almidón de yuca	Fresa	Retraso en el deterioro
Ésteres de sacarosa y cera (brillo)	Aguacate, manzana, melones, cítricos	Proteger, aumentar el brillo y extender la vida útil
Proteína de soya	Manzanas	Cambios retardados en firmeza, color y acidez.
Pectina	Mango	Reducción de tasa del color, textura, y aumento de vida útil
Quitosano	Pimientos y pepinos	Respiración reducida, pérdida de color, marchitamiento e infección por hongos
	Cítricos	Barrera de O ₂ / H ₂ O/ CO ₂
	Brócoli	Reducción de microorganismos mesófilos y psicrotróficos.
Carnes, aves, pescados		
Colágeno	Salchicha	Costo reducido y mayor uniformidad
Gelatina + Aceite de orégano	Pez Bagre	Inhibición de <i>S. typhimurium</i> , y <i>E. coli</i> a 4°C.
Proteína de suero	Salmón congelado	Reducir pérdida de humedad y oxidación de lípidos
Quitosano	Carpa plateada	Buenas características fisicoquímicas, microbiológicas y mayor vida útil
Zeina	Bola de pescado	Conservar alimento rico en lípidos
Snacks y lácteos		
Almidón	Nueces	Retraso en la rancidez
Cera o ácidos grasos	Queso	Evitar el crecimiento del moho
Pectina / Celulosa	Patatas fritas	Reducción de la absorción de grasa

Fuente (Cagri et al., 2004; Dhall, 2016; Suput et al., 2015; Umaraw & Verma, 2017)

2.2.2.6.1 Aplicación de PC y RC en pescado

El pescado es uno de los productos alimenticios que por su alto contenido de humedad es considerado altamente perecedero pues su calidad durante el almacenamiento se ve disminuida por reacciones químicas, enzimáticas y deterioro microbiano, que acortan la vida útil del alimento (Campos et al., 2011). Por tanto, existe la necesidad de limitar la pérdida de agua durante el almacenamiento, evitando su deterioro. Un manejo adecuado, pre-tratamiento y las técnicas de conservación pueden mejorar la calidad de los productos pesqueros (M. Ramos, Valdés, Beltrán, & Garrigós, 2016). Otras alternativas a utilizarse incluyen los RC y los extractos de plantas que han demostrado buenos resultados para carnes y pescados frescos y congelados (Gómez-Estaca, Montero, Gimenez, & Gomez-Guillen, 2007). La adición de aceites esenciales y extractos de plantas da a los RC propiedades antimicrobianas y antioxidantes, así como efectos sobre la oxidación lipídica (LOX), la desintegración proteolítica y microbiana (Sánchez-Ortega et al., 2014). De acuerdo con esto, Stuchell y Krochta (1995) crearon recubrimientos a base de proteínas de suero y monoacilgliceroles demostrando una protección eficiente contra la LOX y la pérdida de agua en el salmón (Debeaufort et al., 1998). Películas a base de gelatina con extractos de orégano/romero tuvieron una mayor actividad antioxidante, y disminuyeron la LOX en la sardina ahumada en frío (Gómez-Estaca et al., 2007). En particular, la carpa (*Cyprinus carpio*), Mahmoud et al. (2006) utilizó un tratamiento combinado de aceite (0.5% de carvacrol + 0.5% de timol) reduciendo tanto la carga microbiana total (aprox. 100 veces) como las Bases Volátiles de Nitrógeno (VB-N). Martínez Del Prado (2014), empleó un RC a base de gelatina-inulina-suero con extractos acuosos (ajo y cebolla) en combinación con tecnologías de refrigeración y vacío, que redujo microorganismos como la *Salmonella*, *S. aureus* y bacterias mesófilas de manera significativa, además de preservar sus características texturales. Más recientemente Morachis-Valdez et al. (2017), empleó un RC con quitosano reportando el mantenimiento de la calidad del producto durante su almacenamiento, disminuyendo la pérdida de humedad, crecimiento bacteriano, LOX y proteínas en filetes de carpa común.

2.3 SECCIÓN C. PRODUCTOS ACUÍCOLAS Y/O MARINOS

La acuicultura hoy en día a tiene cada vez mayor importancia, no únicamente porque promueve la producción de organismos acuáticos con fines recreativos o comerciales, sino porque además crea la posibilidad de contribuir al suministro de alimentos de alta calidad proteica.

La acuicultura se define como el cultivo de organismos acuáticos que incluye a peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas, con diferentes fines. Habitualmente implica la permanente intervención del hombre en operaciones como la siembra, la nutrición, la sanidad, la reproducción, el manejo y la protección contra los depredadores; en general actividades de producción y post-producción, actuando siempre con una cultura de respeto y protección de los recursos naturales y el medio. Los sistemas de cultivo son muy diversos y van desde agua dulce o agua de mar, hasta cultivo bajo condiciones totalmente controladas (González-Martínez, 2010).

En México la piscicultura arranca a fines del siglo XIX, cuyo primer desarrollo se centralizó en organismos dulceacuícolas con énfasis en peces de aguas continentales como la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), la carpa (*Cyprinus carpio*), el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) y la tilapia (*Oreochromis spp.*) entre otros (Guerrero, 1997). Ésta, nace como una actividad complementaria de apoyo social a las comunidades rurales, con lo cual se pretendía incrementar el consumo de proteína animal y mejorar así los niveles nutricionales de la población (Juárez-Palacios, 1987). Actualmente la (FAO, 2016) en su documento titulado “El estado mundial de la pesca y la acuicultura” considera a la acuicultura como una actividad económica importante como fuente de alimentos, nutrición, ingresos y medios de vida para millones de personas. Además, derivado de la oferta mundial per cápita de pescado (20kg) en 2014, la acuicultura ha mostrado un crecimiento aportando la mitad de todo el pescado destinado al consumo humano, lo que representa una alternativa real para ampliar la oferta alimentaria en el país. La producción pesquera del país proviene tanto de la pesca por captura como por acuicultura. La acuicultura

participa en la producción pesquera nacional con poco más de 22 por ciento de la producción nacional (SAGARPA, 2017). La Carta Nacional Pesquera cita que en México se cultiva un total de 61 especies, de las cuales 40 son nativas y 21 son de origen exótico habiendo sido introducidas al país (FAO, 2013). Las principales formas de producción que se utilizan en el país incluyen los sistemas: extensivo, semi-intensivo e intensivo. De acuerdo con el Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca (2013), el territorio mexicano se encuentra dividido en cinco grandes regiones pesqueras, las cuales son: I Pacífico Norte, II Pacífico Sur, III Golfo de México, IV Golfo - Caribe y V Centro. Esta última región V, integra las entidades federativas que no tienen litorales y donde se practica la acuicultura (Tabla 4). Aunque esta actividad se ha diversificado más hacia peces dulce acuícolas, SAGARPA (2017) ha informado que en las regiones con litoral el camarón ocupa el primer lugar en especies cultivadas seguido de tilapia, ostión, carpa, y trucha.

Tabla 4. Región V de especies cultivadas de acuerdo a su estado

Especie	Estado
Carpa	Estado de México, Hidalgo, San Luis potosí, Guanajuato, Coahuila, Tlaxcala Chihuahua, Durango y Puebla.
Mojarra	En todas las entidades federativas excepto el Distrito Federal.
Trucha	Estado de México, Puebla, Hidalgo, Durango y Chihuahua.
Bagre	San Luis Potosí, Coahuila, Zacatecas, Chihuahua, Hidalgo, Durango, Nuevo León
Charal	Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Tlaxcala
Lobina	Durango, Zacatecas, Hidalgo, Edo. De México, Coahuila y chihuahua

Fuente (CONAPESCA, 2013)

Por lo anterior, la piscicultura en México como en otros países, además de permitir la repoblación de ciertas especies, es una alternativa viable ante la creciente demanda de alimentos de origen proteico para el consumo generalizado de la población humana (Avilés, 2000). A continuación, se describen las generalidades de la carpa *Cyprinus carpio* como objeto del presente estudio de investigación.

2.3.1 Carpa común (*Cyprinus carpio*)

La carpa común (*Cyprinus carpio*) es un pez omnívoro de clima templado perteneciente a la familia de ciprínidos, usado comúnmente en acuicultura comercial. Se caracteriza por su cuerpo alargado y algo comprimido, de color variable; parduzco verdoso en la parte superior y amarillo a dorado sobre el dorso (figura 6a). Posee una base de la aleta dorsal larga con 17-22 rayos ramificados y una espina dorsal fuerte y dentada en el frente. Presenta labios gruesos, dos pares de barbillas en el ángulo de la boca con dientes faríngeos 5: 5 (FAO, 2004). Su longitud oscila entre 30 y 60 cm, aunque es habitual que haya ejemplares que superen esta cifra. Las variedades de carpa difieren por la forma de su cuerpo y el patrón de sus escamas; predominando el normal y espejo (figura 6b).

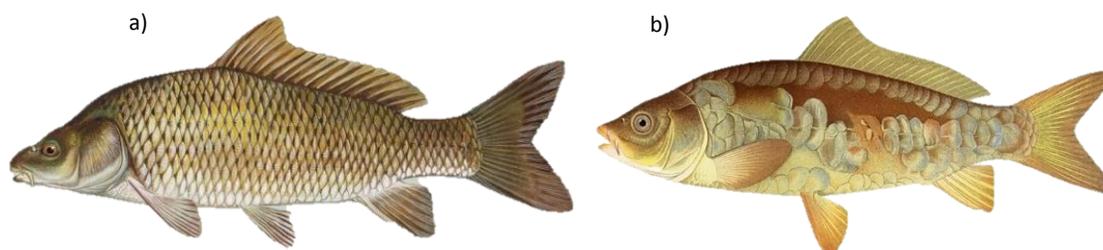


Figura 6. Carpa común (*Cyprinus carpio*) variedades con escamas a) normal; b) espejo

Los primeros informes escritos indican que la carpa común fue el primer pez que se cultivó hace aproximadamente 2000 años en China y desde entonces ha constituido la piscicultura más extendida en la actualidad. Esto se debe a su amplio espectro ecológico; las carpas son especies de ciclo energético corto, resisten un intervalo de temperatura que va de 1°C a 35°C y su régimen de alimentación es variada pues abarca desde organismos invertebrados, larvas, zooplancton hasta plantas acuáticas. Poseen un potencial reproductivo elevado, y sus huevos y larvas son resistentes a los cambios de temperatura. Para su cultivo se usa agua a temperatura ambiente (23 -30 °C), estancada y con baja cantidad de oxígeno (0,3-0,5 mg/L), pH de 6,5-9,0 y tolera salinidades hasta alrededor de 5%.

El crecimiento diario de la carpa puede llegar a ser 2 a 4 por ciento del peso corporal

pudiendo alcanzar 0,6 a 1,0 kg de peso corporal dentro de una estación tipo subtropical/tropical (FAO, 2004; Lemus, Mondragón, & Torres-García, 1997). En México, el cultivo de carpa comenzó a finales del siglo XIX, con la introducción de la carpa común, importada directamente de Europa. Desde entonces algunas variedades han sido desarrolladas. Las principales especies de carpas que se cultivan en nuestro país son la carpa común (*Cyprinus carpio*), espejo (*C. carpio specularis*), dorada (*Carassius auratus*), herbívora (*Ctenopharyngodon idellus*), plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), y la cabezona (*Aristhychthys nobilis*) (Alfaro, Ramírez-Martínez, González, & del Castillo, 2014; Lemus et al., 1997). Actualmente su cultivo está bien desarrollado, dada su capacidad reproductiva y gran adaptabilidad a los diferentes sistemas acuíferos del país. De acuerdo con el Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca (2013) la carpa por su volumen se encuentra posicionada en el lugar 8 de la producción pesquera en México; sin embargo, por su valor, la encontramos en el lugar 9. Las principales entidades productoras son el Estado de México (24.45%), Jalisco (22.57%), Hidalgo (13.49%) y Tamaulipas (8.94%); en donde ya se ha constituido como un recurso de consumo popular cuyo impacto socioeconómico en los últimos años se ha incrementado derivado del aumento en la producción de carne y de crías (figura 7). El consumo nacional de carpa en México durante 2013 fue de 32,127 toneladas. Esta especie se comercializa, entero fresco, congelado y/o eviscerado, o seco salado, y se considera como una especie semi grasa, debido a su contenido lipídico.

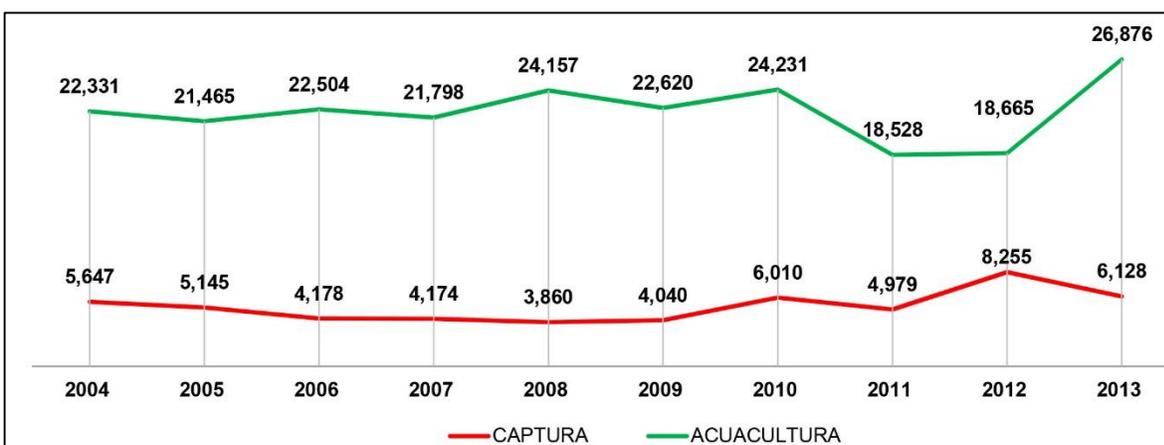


Figura 7. Serie histórica de la producción de carpa (peso vivo en toneladas por año). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca, (2013).

2.3.1.1 Composición química y valor nutrimental

El pescado es una fuente importante de nutrientes. La variación de la composición química es importante entre especies y entre individuos de una misma especie dependiendo de la edad, sexo, ambiente y estación, además de estar directamente relacionada con la ingesta de alimento, migración y cambios debido al desove. En un estudio realizado sobre la carpa en base seca, Aguilar-Martínez (2007) reportó la composición promedio de sus principales macroconstituyentes; 75% proteína, 19% lípidos, 5% cenizas y 1% carbohidratos. Estudios más recientes realizados por Castro-González, Maafs-Rodríguez, & Pérez-Gil Romo (2012), evaluando a la misma especie, reportaron una cantidad de 19.6 g en proteína y 4.63 g de lípidos totales; ambos por 100g de muestra.

En general, su composición promedio obtenida muestra que es una rica fuente de proteínas, y por su contenido semi graso es un alimento de bajas calorías. Además la carne de pescado es una buena fuente de vitamina B y minerales como calcio, fósforo, hierro y cobre (Sato et al., 1991; Aguilar-Martínez, 2007).

2.3.2 Cambios post-mortem en el pescado

La descomposición en el pescado fresco puede ser muy rápida una vez capturado, debido a su composición química y factores externos como el pre-procesamiento y métodos de procesado. Durante la descomposición del pescado, hay una ruptura y formación de varios compuestos, responsables de los cambios en el olor, sabor y textura de la carne de pescado. Los primeros cambios conciernen a su apariencia, textura y "*rigor mortis*". *Rigor mortis* es el proceso por el cual el pez pierde flexibilidad debido a la rigidez de los músculos de pescado a las pocas horas de su muerte (Adebowale, Dongo, Jayeola, & Orisajo, 2008). El deterioro de los peces se debe a tres mecanismos: autólisis enzimática, oxidación y crecimiento microbiano.

Descomposición enzimática autolítica; Ocurre durante las primeras etapas de almacenamiento. Se refiere a los cambios químicos postmortem en el tejido del

pescado, cuyo mayor impacto está en la calidad textural (disminución de rigor mortis) y análoga producción de hipoxantina y formaldehído por la acción de enzimas endógenas (lipolíticas, amilolíticas y proteolíticas) presentes en las vísceras y en los músculos (Ghaly et al., 2010). Las enzimas lipolíticas son responsables de la lipólisis, mientras que las enzimas amilolíticas son responsables del cambio de glucógeno a ácido láctico. La disminución del pH en el músculo vuelve permeable a las membranas lisosomales, liberando a las enzimas autolíticas; causando la suavidad de la carne y limitando su vida de anaquel (Hansen, Gill, Røntved, & Huss, 1996; Huss, 1999); siendo reportadas las calpainas (μ) y las catepsinas (D y L) como las enzimas proteolíticas con mayor relevancia en el ablandamiento de tejidos musculares acuícolas (Chéret et al., 2007; Godiksen et al., 2009), por lo que la actividad enzimática en peces, ha sido empleada como un indicador de los cambios en calidad. Por otro lado, como resultado de la autólisis de proteínas, se producen péptidos y aminoácidos libres, induciendo el crecimiento microbiano y la producción de aminas biogénicas (Fraser & Sumar, 1998).

Descomposición microbiana: la composición de la microflora en peces recién capturados depende en mayor medida del contenido microbiano del agua en que viven los peces. La microflora en peces de aguas templadas está dominada por bacterias psicrófilas Gram negativas, pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella* y *Flavobacterium* (Huss, 1999). Además, se debe tener en cuenta que cada crecimiento microbiano durante el almacenamiento dependerá de las condiciones de conservación. Gram y Huss (2000), indicaron que para peces sin conservas el deterioro correspondía a bacterias Gram-negativas y fermentativas (como *Vibrionaceae*), mientras que en pescado refrigerado las bacterias Gram-negativas psicotolerantes (como *Pseudomonas spp.* y *Shewanella spp.*) eran las causantes del deterioro (Gram & Dalgaard, 2002). Es, por tanto, importante distinguir entre la microflora sin deterioro de las bacterias de deterioro ya que muchas de las bacterias presentes en realidad no contribuyen a la descomposición (Huss, 1999). En general el metabolismo microbiano utilizan como sustratos para el deterioro la fracción soluble en agua, que incluye principalmente

óxido de trimetilamina (TMAO), aminoácidos que contienen azufre y nucleótidos (como inosina) para producir un amplio rango de componentes volátiles como la trimetilamina (TMA), hipoxantina, aminas biogénicas; putrescina, histamina y cadaverina, ácidos orgánicos, sulfuros, amoniacos, aldehídos y cetonas, causantes de los malos olores y sabores desagradables (Ghaly et al., 2010; Leisner & Gram, 2014).

Deterioro oxidativo: la oxidación lipídica ocurre por reacciones de oxidación o hidrólisis. A medida que avanza produce cambios en el olor (rancio) y por lo tanto la pérdida de las características sensoriales deseadas del mismo. La oxidación de los lípidos implica un mecanismo de tres etapas de radicales libres: iniciación, propagación y terminación. La iniciación implica la formación de radicales libres de lípidos (L•) a través de catalizadores como el calor, los iones metálicos y la irradiación. Estos radicales libres reaccionan con el oxígeno (O₂) para formar radicales peroxilo (LOO•). Durante la propagación, los radicales peroxilo reaccionan con otras moléculas de lípidos para formar hidroperóxidos (LOOH) y un nuevo radical libre. La terminación ocurre cuando una acumulación de estos radicales libres interactúa para formar productos no radicales (Ghaly et al., 2010), y la consecuente generación de productos secundarios responsables del olor rancio principalmente aldehídos, cetonas, alcoholes y ácidos carboxílicos (Huss, 1999). Los lípidos de los peces consisten en altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados, lo que los hace altamente susceptibles a la oxidación. La oxidación de los lípidos en el pescado se produce de dos maneras: enzimática y no enzimática. La hidrólisis enzimática de las grasas (lipólisis), ocurre cuando las lipasas presentes en la piel y fracciones microsomales del tejido dividen los glicéridos que forman los ácidos grasos libres (Fraser & Sumar, 1998). Las principales enzimas en la hidrólisis lipídica de los peces son la trigliceril-lipasa, la fosfolipasa A2 y la fosfolipasa B (Audley et al., 1978; Yorkowski y Brockerhoff, 1965). La oxidación no enzimática es causada por compuestos de hematina (hemoglobina, mioglobina y citocromo) que producen hidroperóxidos. Ambos procesos provocan el desarrollo de sabores desagradables y malos olores caracterizados como rancios (Leisner & Gram, 2014).

2.3.3 Métodos de preservación del pescado

Históricamente métodos como el secado, ahumado, la fermentación, la salmuera y el enlatado fueron los métodos para evitar el deterioro de los pescados y extender su vida útil. En respuesta a la demanda del consumidor por textura, apariencia y sabor, se desarrollaron nuevos métodos que incluyen: enfriamiento, congelación y conservación química; siendo los más comunes en la industria actual, para controlar la actividad del agua, el deterioro enzimático, oxidativo y microbiano (Ghaly et al., 2010).

Almacenamiento a bajas temperaturas: La temperatura es el factor de control que mayor impacto tiene en la frescura y vida de anaquel en el procesamiento de pescados; la congelación y el almacenamiento en frío son métodos eficientes de preservación de peces (Johnston et al., 1994). Esto se obtiene mediante diversos principios que incluyen: soplar aire frío sobre pescado, colocar el pescado en contacto con la placa de metal enfriada o capas hielo y sumergir el pescado en un líquido a baja temperatura (Ghaly et al., 2010). Generalmente se utiliza una congelación rápida, ya que si es demasiado lenta, se forman grandes cristales de hielo que afectan las paredes de las células y provoca la desnaturalización de las proteínas en el pescado (Berkel, Boogaard, & Heijnen, 2004). Las causas principales de pérdida de calidad durante el almacenamiento en congelación/descongelación son deshidratación, desnaturalización proteica y decoloración. En sí, este método de conservación reduce el metabolismo microbiano que es responsable del deterioro (Ashie et al., 1996), pero no previene el deterioro oxidativo ya que el deterioro enzimático continúa a un ritmo más lento (Neumeyer et al., 1997).

Tecnologías combinadas: Esta tecnología surge a partir de los principales factores conservantes para los alimentos, tales como; temperatura, pH, actividad de agua (a_w), potencial redox (Eh), flora competitiva y sus interacciones (Leistner, 2000). Dentro de este concepto, el uso de aditivos como cloruros, nitritos, sulfuros y ácidos orgánicos pueden tener una doble funcionalidad como antimicrobianos y/o inhibidores de enzimas autolíticas, previniendo el crecimiento microbiano y retardando el deterioro. O bien, el uso de antioxidantes de tipo primario (como

compuestos fenólicos) o secundario (como fosfatos); los primarios actúan como captadores de radicales, mientras que los secundarios actúan como descomponedores de peróxido (Andre et al., 2010), que en combinación con las tecnologías de almacenamiento a bajas temperaturas permitan prevenir el deterioro oxidativo y mejorar la vida útil (Ghaly et al., 2010). Dave & Ghaly (2011), reportan que un proceso que combina el ácido etiléndiaminotetraacético (EDTA) (1 mM); Terbutil Hidroquinona (TBHQ) (0,02%); ácido ascórbico; almacenamiento a temperaturas refrigeradas (5°C) en la oscuridad; puede ser el más positivo para controlar el deterioro del pescado y aumentar la vida de anaquel, pues abordaría la actividad antimicrobiana así como la oxidación de lípidos.

Alternativa-Bioempaques comestibles: Se ha observado que los bioempaques, elaborados a partir de materiales con proteínas, polisacáridos y aceites, prolongan la vida de anaquel y conservan atributos importantes en alimentos perecederos como pescados y mariscos (Kilincceker, Dogan, & Kucukoner, 2009; Soazo, Pérez, Rubiolo, & Verdini, 2013). Además de funcionar como una barrera al oxígeno y dióxido de carbono, proveen propiedades mecánicas a una humedad relativa baja, disminuyendo la interacción del alimento con el ambiente. Reducen la absorción de aceite durante el freído, reteniendo sin embargo, la humedad en el alimento, incrementando la calidad sensorial del producto y disminuyendo la pérdida en peso, lo cual no solo es importante por el impacto económico, sino por la relación de la humedad con la textura de los alimentos. También permiten la incorporación de antimicrobianos y/o antioxidantes; generalmente aceites esenciales y extractos de plantas, bacteriocinas, proteínas y/o quitosano, que mantienen los componentes nutricionales (vitaminas, aminoácidos, y ácidos grasos) y sensoriales. Los bioempaques *“eco-friendly packaging”* pueden ser una buena alternativa para mejorar la calidad de los alimentos congelados, principalmente por la reducción en la relación de transferencia de humedad entre el alimento y el ambiente, manteniendo la integridad estructural durante la descongelación y disminuyendo la presencia de quemaduras de frío, además de cumplir con las demandas sensoriales del consumidor, debido a los cambios de color y texturales después del freído (Kilincceker et al., 2009; Soazo et al., 2013; Umaraw & Verma, 2017).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de un bioempaque “eco-friendly” con características antimicrobianas y antioxidantes a base de fibra de cítricos y extracto de orégano, sobre las características fisicoquímicas y microbiológicas de *Cyprinus carpio*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar fisicoquímica y microbiológicamente la fibra obtenida a partir de la cáscara de naranja.
2. Caracterizar las propiedades ópticas, físicas y mecánicas de las películas comestibles a base de fibra, grenetina y suero de leche a partir de un diseño estadístico Box-Behnken.
3. Determinar las propiedades antimicrobianas y antioxidantes en el extracto de orégano por medio de la técnica difusión en disco, métodos ABTS, DPPH, y compuestos fenólicos.
4. Evaluar el efecto del recubrimiento en filetes de la especie *Cyprinus carpio*, durante su almacenamiento a temperatura de refrigeración, teniendo como variables de respuesta los análisis fisicoquímicos, microbiológicos y estrés oxidativo.

HIPÓTESIS

El uso de un bioempaque “eco-friendly” a base de fibra de cítricos y extracto de orégano, conservará las características fisicoquímicas y microbiológicas de la especie *Cyprinus carpio*, aumentando su vida de anaquel.

JUSTIFICACIÓN

Los subproductos de la industria alimentaria constituyen un problema serio de residuos en gran parte del mundo ya que además de repercutir significativamente en el ambiente, implican una pérdida considerable de otros recursos naturales. En este ámbito dentro de las materias primas de la industria alimentaria, las frutas y los vegetales se caracterizan por ser las que mayores residuos generan. Las pérdidas y desperdicio de alimentos representan una oportunidad no utilizada para ser aprovechables como fuentes de compuestos bioactivos, así como una elección atractiva para reducir la dependencia del petróleo y, al mismo tiempo, obtener compuestos que son económica o técnicamente inviables de obtener por síntesis química tradicional.

Se han realizado estudios a base de subproductos agroindustriales al ser considerados de gran importancia porque provienen de fuentes naturales que los hacen disponibles, abundantes y de bajo costo, por lo que pueden ser empleados para el desarrollo y evaluación de bioempaques, teniendo como ventaja principal la biodegradabilidad y nula toxicidad al ambiente. Para lo cual una alternativa es revalorizar y aprovechar los residuos agroindustriales tales como: el suero de leche; subproducto de la industria láctea y fibra de cáscara de naranja; subproducto de la industria de bebidas, obteniendo productos de valor agregado, como lo son empaques eco-friendly. La eficiencia de estos materiales se evaluará mediante técnicas fisicoquímicas y microbiológicas, aplicadas a una especie de interés económico y comercial como lo es la carpa común *Cyprinus carpio*. Por lo que el desarrollar y evaluar bioempaques con este propósito, reduciría significativamente los desechos del envasado asociada con los alimentos frescos y procesados, además de prolongar su vida de anaquel y conferirle características organolépticas deseadas.

3. METODOLOGÍA

El trabajo experimental se dividió en 4 etapas, el cual se muestra en la figura 8.

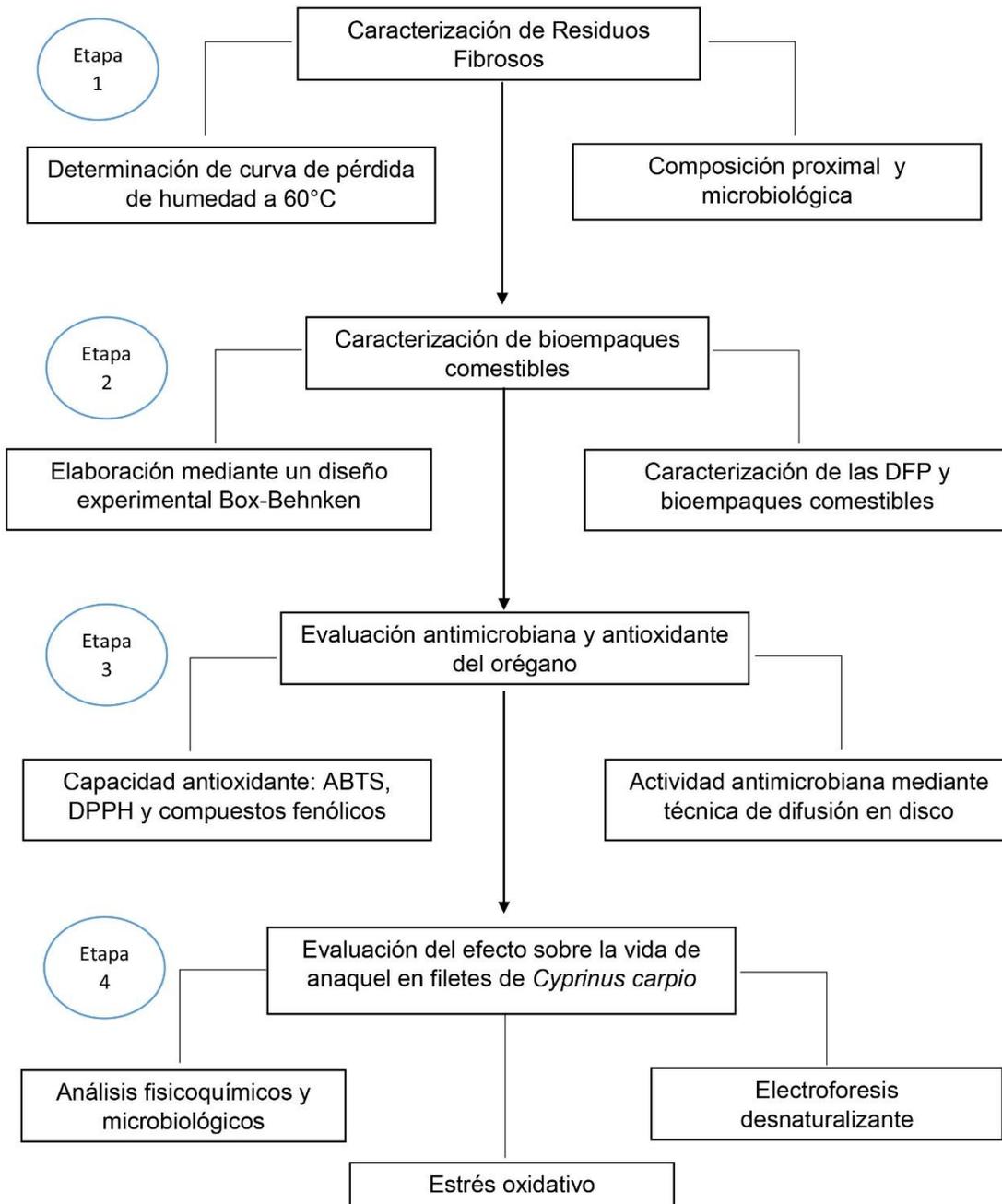


Figura 8. Esquema general del proyecto

3.1 CARACTERIZACIÓN DE RESIDUOS FIBROSOS (RF) DE CÁSCARA DE NARANJA

Las cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*) variedad valencia de la cosecha otoño 2016 correspondiente al mes de septiembre, fueron adquiridas de los microproductores de jugo y zumo de la fruta, ubicados en el municipio de Zinacantepec, Estado de México para la obtención de la fibra.

3.1.1 Obtención de Residuos Fibrosos (RF)

Para obtener la fibra de naranja se empleó una modificación del método empleado por Rosselló (2007) y Alvarez & Chamorro (2009). La preparación de las muestras consistió en seleccionar las cáscaras de naranja que se encontraran en buen estado. Se separó la pulpa (sáculos) (figura 9a), y después se realizó un primer lavado con agua y posteriormente una desinfección por inmersión con NaOCl a una concentración de 30 ppm. Se procedió a cortar la piel en piezas pequeñas en forma cuadrada, aproximadamente de 1×10^{-2} m de lado (fig.9b).



Figura 9. A) Separación de la pulpa. B) Piel cortada en forma de cuadro. Lado 1 cm.

Posteriormente se deshidrataron en un horno de secado (marca Riossa, modelo H-41) a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta alcanzar una humedad menor al 10% durante 6 h. Transcurrido el tiempo se pulverizó en un molino para café/especias (Krupps modelo GX4100), y se obtuvo un polvo homogéneo con un tamiz (Fiic, S.A. DE C.V.) de malla 100 (U.S. Number). El producto obtenido se almacenó en bolsas de polietileno dentro de un desecador hasta su posterior análisis. Las etapas del proceso en general se describen en la figura 10.

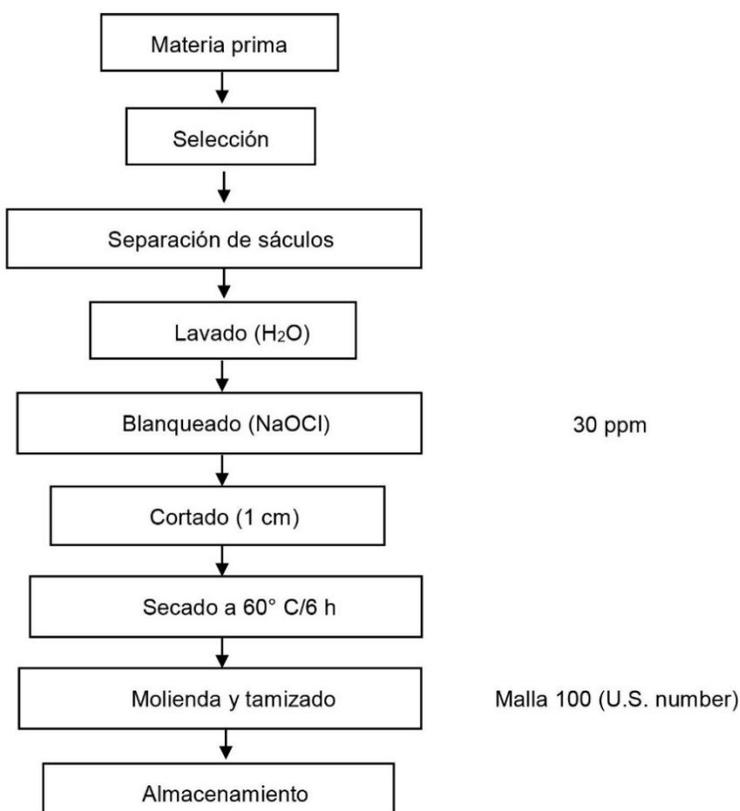


Figura 10. Diagrama general de proceso para obtener los RF de cáscara de naranja

3.1.2 Determinación de la curva de pérdida de humedad

Se determinó mediante este experimento el tiempo en el cual las muestras disminuyeran su contenido de humedad hasta un nivel considerado seguro para su almacenamiento ($H < 10\%$). La curva de secado se obtuvo al secar a 60°C muestras de 10 g de cáscara de naranja, troceada a un tamaño de 1 cm aproximadamente por lado, en un horno de secado (marca Riossa, modelo H-41). Se registraron los pesos de las muestras en intervalos de 2h durante 11h (Cruz, 2002).

3.1.2.1 Humedad

La determinación de humedad de las muestras de piel de naranja se determinó siguiendo el método oficial de la AOAC, núm. 934.06 (1990), mediante el secado de estufa a $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$, hasta peso constante, a partir de una muestra de unos 5 g aproximadamente, previamente homogenizada.

3.1.3 Composición proximal de residuos fibrosos (RF)

La composición proximal de los residuos de naranja se determinó de acuerdo con los métodos oficiales descritos por la AOAC (1997), reportado por Santiago Castro (2014), comprendiendo los siguientes análisis:

- **Humedad** (método 925.09). Se calculó como la pérdida de peso por secado de 2g de RF al secarse en una estufa a 110 °C por 2 h.
- **Cenizas** (método 923.03). Se determinaron como el peso remanente tras la calcinación de 2 g (b. s.) de la muestra en una mufla a 550 °C por 2 h.
- **Proteína cruda** (método 954.01). Se determinó por el método kjeldahl, el cual consiste en una digestión con H₂SO₄ de 1 g (b. s.) de muestra desgrasada, una posterior destilación para la recuperación del nitrógeno en ácido bórico y finalmente una valoración con NaOH (0.1N). Se empleó 6.25 como factor de conversión de nitrógeno a proteína.
- **Grasa cruda** (método 920.39). Se cuantificó el contenido de lípidos libres como la pérdida de peso de 3 g de RF (b. s.) tras su extracción semicontinua con éter de petróleo en un equipo con un sistema Soxhlet.

3.1.4 Caracterización microbiológica

Se analizaron los residuos fibrosos posteriormente a la etapa de molienda en los que se determinó bacterias mesófilas aerobias (NOM-092-SSA1-1994), mohos y levaduras (NOM-111-SSA1-1994), y coliformes totales (NOM-113-SSA1-1994) para identificar la inocuidad del producto final.

3.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS PELÍCULAS Y/O BIOEMPAQUES COMESTIBLES “ECO-FRIENDLY PACKAGING”

Los recubrimientos empleados fueron elaborados utilizando grenetina marca comercial Regia (280° Bloom), proteína aislada de suero de leche (Darigold Inc., Seattle, WA, USA), como plastificante glicerol (J.T. Baker Analyzed™, ACS Mexico), y fibra de cáscara de naranja; obtenida en el proceso.

3.2.1 Elaboración de películas aplicando un diseño experimental Box-Behnken

El diseño y desarrollo de bioempaques se llevó a cabo utilizando como diseño experimental un modelo simple de superficie de respuesta tipo Box Behnken, mediante el método propuesto por García-Argueta et al. (2013; 2016) y Herrera-Vázquez (2014), en donde las diferentes formulaciones de películas y/o bioempaques comestibles se realizarán con tres centros bajo un diseño de bloques completos al azar, obteniéndose como resultado 15 tratamientos diferentes, de los cuales se realizarán tres repeticiones. La tabla 5 muestra las proporciones generales de los componentes empleados para la matriz de películas y/o bioempaques comestibles, mientras que la tabla 6, expone las proporciones específicas de cada componente derivadas del diseño experimental.

Tabla 5. Componentes de la matriz de película comestible

Componente	%
Fibra	0-4
Suero de leche	7-13
Glicerol	9
Grenetina	3-6

Tabla 6. Formulación de las Películas comestibles mediante un diseño de superficie de respuesta Box-Behnken

Fórmula	Factor A	Factor B	Factor C	% Suero de leche	% Grenetina	% Fibra de Cítricos	% Glicerol
1	0	-1	-1	10	3	0	9
2	1	1	0	13	6	2	9
3	0	0	0	10	4.5	2	9
4	1	0	1	13	4.5	4	9
5	-1	-1	0	7	3	2	9
6	-1	0	1	7	4.5	4	9
7	0	0	0	10	4.5	2	9
8	1	0	-1	13	4.5	0	9
9	0	1	1	10	6	4	9
10	-1	0	-1	7	4.5	0	9
11	0	-1	1	10	3	4	9
12	1	-1	0	13	3	2	9
13	0	0	0	10	4.5	2	9
14	0	1	-1	10	6	0	9
15	-1	1	0	7	6	2	9

Factor A, suero de leche; factor B, grenetina; factor C, fibra de cítricos; -1= nivel mínimo del componente; 1= nivel máximo del componente; 0= nivel medio del componente. El glicerol se mantuvo constante en todas las DFP.

En concordancia con lo anterior, se utilizó la metodología de Escobar *et al.* (2009) reportada por García-Argueta *et al.* (2013: 2016) para la elaboración de la película comestible (PC).

Se utilizó una base de 100 mL por cada formulación; la grenetina se hidrató en 25mL de agua destilada, e inmediatamente se mezcló con 50mL del de agua a una temperatura de 75°C para su disolución. El resto de los componentes se adicionaron en agitación constante hasta su completa disolución (aproximadamente de 5-8 min) a una temperatura de 70°C manteniendo el siguiente orden; suero de leche, fibra de cítricos; en este punto, se adiciona el volumen restante de agua (25mL) que servirá para quitar parte de los componentes en las paredes del recipiente, además de

disminuir la temperatura de la disolución; finalmente al estar la mezcla a una temperatura de 60°C se adicionó el glicerol. Esta disolución se mantuvo en agitación hasta disminuir su temperatura a 40°C, dicha disolución se identificó como disolución formadora de película (DFP). Las películas comestibles se prepararon bajo condiciones de asépticas tanto en el lugar de trabajo como en los utensilios utilizados para su elaboración.

3.2.2 Caracterización de la disolución formadora de película (DFP)

Se realizaron los siguientes análisis para su caracterización de acuerdo con los métodos descritos.

pH (NOM-F-317-S-1978). Se empleó un potenciómetro (conductronic, pH 140) previamente calibrado con disoluciones buffer de pH4, pH7 y pH10. Se utilizó una muestra homogenizada de 25 mL de la DFP a temperatura ambiente. El análisis se realizó por triplicado.

Acidez (NMX-F-102-NORMEX-2010). La acidez titulable se determinó por triplicado. La determinación se hizo por titulación con una solución valorada de hidróxido de sodio 0.1 N, se transfirieron 10 mL de la muestra a un matraz Erlenmeyer y se adicionaron 3 gotas de fenolftaleína. Posteriormente se procedió a valorar la muestra hasta mantener un color rosa por más de 30 segundos. La acidez titulable se reportó como ácido láctico y se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ácido láctico} = \left(\frac{(V - V_b) (N_{\text{NaOH}}) (\text{meq ácido láctico})}{\text{volumen de muestra}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

V= volumen de NaOH gastado en la muestra

V_b= volumen de NaOH gastado en el blanco

N= normalidad

3.2.3 Caracterización de bioempaque comestible

La caracterización de las PC se llevó a cabo al medir las siguientes propiedades: físicas, ópticas (color) y mecánicas.

3.2.3.1 Propiedades físicas

3.2.3.1.1 Espesor

Para ello se empleó un micrómetro digital. Se realizaron 5 mediciones de forma aleatoria en la película y se obtuvo su media. El resultado se expresó en μm . Se utilizó el valor promedio del espesor en el cálculo de las propiedades de textura.

3.2.3.1.2 Humedad

Calculada como la pérdida de peso por secado de aproximadamente 0.5 g de película. Las muestras se secaron en una estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h, de acuerdo con la AOAC (1995). El contenido de humedad se calculó de acuerdo con la ecuación 2 y se expresó en porcentaje de humedad (%H).

$$\% H = \frac{M_f - M_c}{M_i} (100) \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde m_i es el peso de la muestra, m_f es el peso de la muestra y la capsula después del secado y m_c es el peso de la capsula de aluminio.

3.2.3.1.3 Capacidad de retención de agua (CRA)

Para obtener la capacidad de retención se empleó una modificación del método empleado en la norma ASTM D5229 (2004). Las muestras de película se secaron durante 24 h a $105 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se pesaron, y se sumergieron en agua durante 24 h a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se retiró el líquido, se secaron con papel absorbente eliminando el exceso de agua de la superficie y finalmente se registró su peso. Se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$CRA = \frac{w_2 - w_1}{w_1} (100) \quad \text{Ecuación 3}$$

Dónde: w_2 es el peso húmedo y w_1 es el peso seco de las películas.

3.2.3.1.4 Solubilidad

Se utilizó una modificación del método propuesto por Gómez-Estaca, Montero, Fernández-Martín, & Gómez-Guillén (2009). Muestras de película de 5 cm de diámetro fueron secadas en una estufa a 105°C por 24 h. Después cada muestra fue inmersa en 10 mL de agua destilada por 24 h a 20°C. Posteriormente el agua fue removida de las películas por el método de decantación y estas a su vez fueron secadas nuevamente a 105°C por 24 h. La solubilidad fue calculada por diferencia de pesos mediante la ecuación 4.

$$Sol(\%) = \frac{(w_1 - w_2)}{w_1} (100) \quad \text{Ecuación 4}$$

Dónde: w_2 es el peso húmedo y w_1 es el peso seco de las películas.

3.2.3.2 Color

Se midió utilizando un colorímetro Konica Minolta (modelo Chroma Meter CR-400, Sessing, Inc., Japan), con placa de calibración número 12633047 y estándares de $L=97.3$, $a=0.17$, $b=1.9$. Las muestras fueron colocadas sobre una base color blanca estándar, el colorímetro previamente calibrado se colocó sobre la película comestible y se realizó un disparo registrándose los valores en escala Hunter L, a^* , b^* , donde L con valores de 0% = negro y 100% = blanco; $+a > 0$ = rojo, $-a < 0$ = verde, $+b > 0$ = amarillo, $-b < 0$ = azul.

La diferencia de color (ΔE^*), cromaticidad (C) y tonalidad (H) son valores en coordenadas cilíndricas, estas se obtuvieron directamente del equipo. Donde C corresponde a la intensidad y h representa el ángulo en una rueda de color de 360°,

en la que 0° , 90° , 180° y 270° representan el rojo-púrpura, amarillo, verde azulado y azul, respectivamente.

3.2.3.3 Propiedades mecánicas

Se utilizó un Texturómetro, TA-XT2 Instron Universal (Texture Analyser, Stable Micro Systems, Texture Technologies, Corp.). La resistencia a la ruptura, módulo de Young, elasticidad y porcentaje de elongación (% E) se determinaron de acuerdo con la metodología descrita por Silva-Ríos et al. (2013)

El texturómetro fue calibrado utilizando los siguientes parámetros:

- Modo de prueba: Medición de la fuerza en compresión
- Tipo de prueba: Regreso al inicio
- Unidades de fuerza: Newtons
- Unidades de distancia: mm
- Velocidad pre-prueba: 2.0 mm/s
- Velocidad de prueba: 1.0 mm/s
- Velocidad después de prueba: 2.0 mm/s
- Distancia de penetración: 30.0mm
- Punta: P.0.255 ¼" Spherical stainless

Los parámetros de textura se determinaron a partir de una prueba de punción, la cual consistió en sujetar la película entre dos placas metálicas provistas de una perforación circular de 25.4 mm de diámetro y hacer pasar por el centro un punzón de punta esférica de 6.5 mm de diámetro (el área de contacto de la esfera con la película fue de 33.18 mm^2). El texturómetro midió la fuerza (N) necesaria con la cual el punzón recorrió una distancia vertical (mm) hacia abajo hasta lograr traspasarla por completo (Silva-Ríos et al., 2013).

Con los datos obtenidos de la distancia máxima antes de la ruptura, la elongación se calculó mediante el teorema de Pitágoras ($E^2 = R^2 + D^2$). El triángulo rectángulo,

base de esta metodología, se presenta en la figura 11a. El porcentaje de elongación se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Elongación (\%)} = \left\{ \left[(12.7^2 + D^2)^{1/2} - 12.7 \right] / 12.7 \right\} * 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

Para determinar la elasticidad de las películas fue calculado el módulo de Young, el cual representa la pendiente del punto en el que la curva de esfuerzo- deformación, se desvía de la linealidad (Figura 11b). El diferencial de deformación (Dd) se calculó como la diferencia de la longitud máxima de la película alcanzada antes de su ruptura y la longitud inicial de la película en el tiempo 0. El porcentaje de elongación (%E) es el Dd expresada en porcentaje.

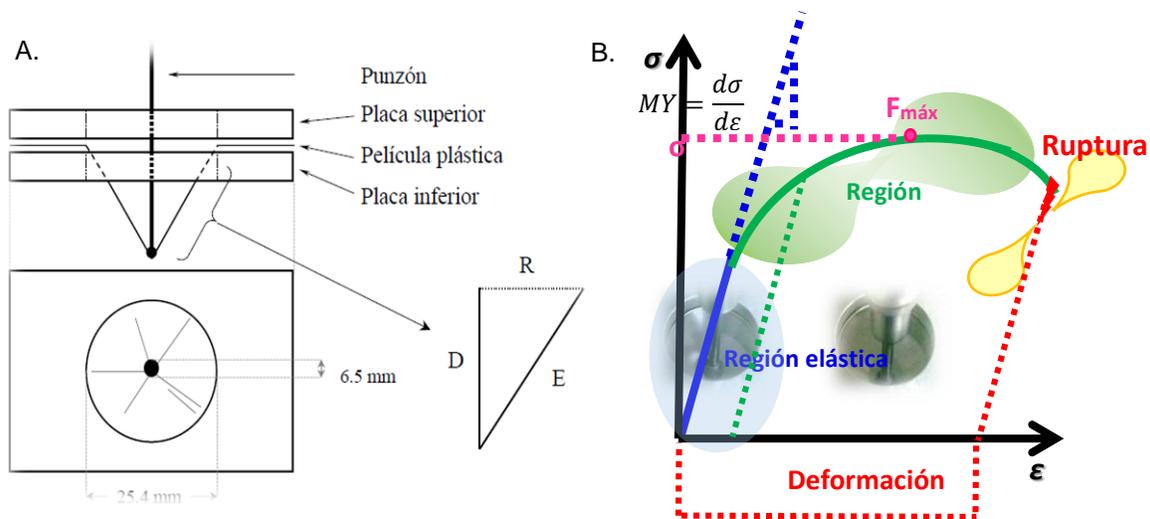


Figura 11. a) Bases para la determinación de elongación de la PC, con base en el Teorema de Pitágoras. D: Distancia máxima de penetración del punzón antes de la ruptura (mm). R: Radio de circunferencia de la placa (12.7mm). E: Elongación (mm) de la película. b) Representación gráfica del comportamiento mecánico de una película comestible cuando es sometido a un ensayo de tensión para producir una curva de tensión (σ)- deformación (ϵ). Fuente: Silva-Ríos et al. (2013) y Herrera-Vázquez (2014).

3.3 EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE IN VITRO DE EXTRACTO DE ORÉGANO (*Origanum vulgare*)

El orégano (*Origanum vulgare*), fue adquirido en el mercado de Zinacantepec, Toluca, Estado de México. Éste se irradió durante 12h y se homogenizó durante periodos cada 30 minutos. Se envasó en papel estraza y se mantuvo a temperatura ambiente en un lugar protegido de la luz hasta su posterior utilización. El orégano se pulverizó en un molino para café/especias (KRUPS GX4100) durante 15 segundos; hasta obtener un polvo fino.

3.3.1 Obtención de extractos de orégano

Para la obtención de los extractos se utilizó la metodología descrita por Sevilla-Ascencio (2013) con ciertas modificaciones.

3.3.1.1 Extracto acuoso

Se pesaron $0.1\text{g} \pm 0.001\text{g}$ de orégano y se colocó en tubos de vidrio de 13 mL con tapón de rosca, se añadió 10 mL de agua destilada para colocarse en un baño maría digital (LabTech co LWB-11D) a 50°C durante 3 h, se agitaron cada 30 min durante 1 min con un vórtex (scientific genie 2, modelo G560). Finalizado el tiempo se colectaron los sobrenadantes y se colocaron en tubos de plástico con tapa de rosca. El extracto se hizo por triplicado y se mantuvieron en refrigeración a $\sim 4^{\circ}\text{C}$ y ocultos de la luz hasta su posterior uso.

3.3.1.2 Extracto etanólico (agua-etanol-acetona)

Se pesaron $0.1\text{g} \pm 0.001\text{g}$ de orégano y fueron colocados en tubos de plástico de 50 mL que contenían una mezcla de 10 mL de etanol-agua (50:50 v/v). Se agitaron en un agitador orbital (Lab-Line Orbit), en condiciones de ausencia de luz a temperatura ambiente durante 1 h. Transcurrido el tiempo la muestra se filtró con papel Whatman No.41; los sobrenadantes se retiraron y los residuos se extrajeron

nuevamente con 10 mL de una mezcla acetona-agua (70:30 v/v) manteniendo las mismas condiciones que la primera extracción. Los sobrenadantes del extracto etanólico y acetona se mezclaron en un matraz Erlenmeyer de 50 mL y se filtraron (Padilla *et al.*, 2008). Posteriormente con un rotavapor (modelo RE500, Yamato Scientific, Tokio, Japón) la mezcla se evaporó a 55°C y finalmente se almacenó en refrigeración a una temperatura de ~4°C hasta su posterior uso. El extracto se realizó por triplicado.

3.3.2 Determinación de Compuestos Fenólicos Totales

Se utilizó la metodología de Folin-Ciocalteu, descrita por Gutiérrez-Avella *et al.*, (2008). Se determinaron en base a una curva estándar (Anexo 1). Se preparó una muestra diluida de extracto de orégano al 20 % (20 µL de extracto se agregaron 80 µL de agua destilada). Se tomaron 20 µL de esta dilución y se mezclaron con 250 µL del reactivo de Folin 1N (dilución 1:1 del reactivo en agua destilada), 1250 µL de carbonato de sodio al 20%, y 480 µL de agua. Se almacenó en oscuridad a temperatura ambiente durante 120 min. Posteriormente se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro (Thermo scientific, Genesys 10S UV-VIS). Para el blanco se efectuó el mismo proceso, sólo se sustituyó la muestra por un aumento del volumen de agua (500 µL), manteniendo las mismas cantidades para los demás reactivos. Este análisis se realizó por triplicado para cada muestra (acuoso y etanólico). Los resultados se expresaron como mg equivalentes a ácido gálico/g de muestra.

3.3.3 Determinación antioxidante en los extractos de orégano

Para la determinación de la capacidad antioxidante se aplicaron las siguientes metodologías:

3.3.3.1 Método ABTS•+

Se siguió el método de Pellegrini *et al.* (2006) reportado por Lopez-Martinez *et al.*

(2009) con algunas modificaciones. Consiste en la formación del radical catión ABTS (2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato) a partir de una mezcla de 5 mL de la solución ABTS (7 mM) y 88 µL de persulfato de potasio (140 mM) y su posterior reposo en refrigeración durante 12 h y en oscuridad. Una vez formado el radical ABTS•⁺ se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Thermo scientific, Genesys 10 VIS) y se diluyó con metanol hasta obtener un valor de 0.74 a 734 nm. Para la muestra, se tomó una alícuota de 100 µL del extracto, 3 mL de la solución ABTS•⁺, se homogenizaron y se mantuvieron en oscuridad por 10 min, la absorbancia se midió a 734 nm en un espectrofotómetro calibrado con metanol. Como blanco se utilizó la solución de ABTS•⁺ (con absorbancia de 0.74 en reposo por 10 min). Con los resultados de absorbancia se calculó el % de inhibición, y su concentración correspondiente (TEAC mg /ml) se determinó en base a una curva patrón de Trolox 2mM (Anexo 2); se determinó en iguales condiciones que la muestra. El porcentaje de inhibición se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = [(Ab-Am)/Ab] \times 100$$

Dónde:

Ab: Absorbancia del blanco; Am: Absorbancia muestra

3.3.3.2 Método DPPH•

Se basa en la reducción de la absorbancia medida a 515 nm del radical DPPH, por antioxidantes, con modificaciones del método descrito por Lopez-Martinez et al. (2009) y Sevilla-Ascencio (2013). A 100 µL de muestra se le añadió 3.9 mL de una solución en metanol de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) 0.1 mM, y se protegió de la luz. Se homogenizaron los tubos y se dejaron reposar en oscuridad durante 30 min. Se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm en un espectrofotómetro (Thermo scientific, Genesys 10 VIS) antes de añadir la muestra (A0) y transcurrido los 30 min (AF). El metanol se utilizó como blanco, Trolox 1.2 mM como antioxidante sintético de referencia y el control fue una mezcla de 3.9 mL de DPPH• y 100 µL de metanol. Para convertir el % de inhibición de radical DPPH

en equivalente Trolox (TEAC mg /ml), los resultados se determinaron usando una curva estándar de Trolox (Anexo 3); se ensayó en condiciones iguales a la muestra. La actividad antioxidante se expresó como el porcentaje de inhibición, y se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = [(Ab-Am)/Ab] \times 100$$

Dónde:

Ab: Absorbancia del blanco; Am: Absorbancia muestra

3.3.4 Técnica de difusión en disco para prueba antimicrobiana en extracto acuoso y etanólico de orégano

Se evaluó mediante la técnica de difusión en disco en agar de Bauer et al. (1966) citada por Rodríguez Triviño (2015), la cual consiste colocar discos impregnados a una concentración específica del antimicrobiano sobre la superficie de una placa de agar inoculado con un microorganismo. El antimicrobiano (EO) se difunde radialmente desde el disco a través del agar, produciendo una inhibición en zonas que se evidencia por la formación de halos transparentes. Para esta prueba, el inóculo fue preparado de la selección de 3-5 colonias para cada microorganismo, tomando a partir de una disolución salina con turbidez equivalente a 0.5 unidades de la escala de Mcfarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml) (Anexo 4).

3.3.4.1 Preparación del antimicrobiano acuoso y etanólico

Se prepararon tres concentraciones de 10, 15, 20% (p/v) para extracto acuoso y etanólico respectivamente. El orégano pesado se colocó en tubos de plástico con tapón de rosca, se adicionó a cada tubo un volumen de 10 mL siendo agua estéril para el extracto acuoso y alcohol etílico 96° G.L. para el extracto etanólico respectivamente, se agitaron en un vórtex (scientific genie 2, modelo G560) de manera constante durante 15 min a velocidad media.

3.3.4.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana

Se evaluó el efecto antimicrobiano mediante la metodología de difusión en disco de Bauer *et al.* (1966) descrita anteriormente. Las cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* que se utilizaron para la prueba fueron aisladas a partir de un cultivo puro.

- **Ensayo antimicrobiano**

La prueba consistió previamente en elaborar el inóculo, tomando a partir de un cultivo puro del microorganismo (vigencia menor a un mes) la selección de 3-5 colonias típicas en 5 mL de caldo nutritivo e incubar en una estufa incubadora durante 24 h a 36°C. Posteriormente se tomó una asada de cada microorganismo y se sembraron en agar nutritivo incubando las cepas nuevamente durante 24 h a 36°C. Antes de transcurrir las 24 h para la suspensión se tomaron de 3-5 colonias y se diluyeron en 5 mL de caldo nutritivo hasta obtener la concentración equivalente a 0.5 unidades de la escala de Mcfarland. De esta última suspensión se tomaron 100 µL y en cajas petri solidificadas previamente con agar nutritivo se procedió a sembrar en superficie con ayuda de un hisopo estéril (no superar los 15 min). Antes de colocar los discos dejar secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 min para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido (Sacsquispe *et al.*, 2002). Una vez inoculado se colocaron en cada placa seis discos (papel filtro Whatman n° 1, diámetro 6 mm) de forma equidistante sobre la superficie del agar y posteriormente se impregnaron con 10 µL de los extractos elaborados. Después de 12-15 minutos de tiempo de difusión a temperatura ambiente, las placas se incubaron durante 24 h a 36°C. Como control positivo se utilizó microdyn (desinfectante comercial), así como hipoclorito de sodio (300 ppm; preparado a partir de una disolución comercial al 13% para comparar el efecto de inhibición respecto a las tres bacterias. Como control negativo se utilizaron los discos estériles sin adicionar algún disolvente. Transcurrido el tiempo de incubación se midieron los diámetros del halo de inhibición (milímetros) para cada microorganismo. Se realizaron dos repeticiones de este experimento.

3.4 EVALUACIÓN DE LA VIDA DE ANAQUEL EN FILETES DE CARPA COMÚN CON UN RECUBRIMIENTO COMESTIBLE INCORPORADO CON FIBRA DE CÍTRICOS Y EXTRACTO ETANÓLICO DE ORÉGANO (*ORIGANUM VULGARE*)

Los filetes de Carpa común (*Cyprinus carpio*), se adquirieron en el mercado de San Luis Mextepec, Zinacantepec, Estado de México. Estos se encontraban envasados en bolsas de plástico en porciones de 100 g cada una, se trasladaron en cavas de hielo al laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Química Unidad Cerrillo de la UAEM, y se mantuvieron en congelación para su posterior utilización.

3.4.1 Tratamiento del filete de carpa

Todos los filetes se descongelaron a temperatura ambiente, fueron lavados, se sumergieron durante 5 min en una disolución de 100 ppm de hipoclorito de sodio para disminuir la posible carga microbiológica y se dejaron escurrir sobre una superficie limpia (figura 12a). En este punto se observó que la apariencia general del pescado se encontrara fresco y en buenas condiciones para proceder a cortarlos en porciones pequeñas (figura 12b).



Figura 12. a) Filete de carpa común posterior al tratamiento. b) Filetes de carpa rebanados en trozos pequeños.

3.4.2 Elaboración del recubrimiento

El recubrimiento elaborado en este estudio se seleccionó a partir de los resultados

obtenidos en las fases preliminares, así como la evaluación de la capacidad antimicrobiana del extracto acuoso de orégano (EAO) y el extracto etanólico de orégano (EEO).

3.4.2.1 Recubrimiento sin extracto

En este caso se siguió la metodología descrita por García-Argueta et al. (2013, 2016) y Herrera-Vázquez (2014), en la cual la mezcla fue realizada en un vaso de precipitado de vidrio de 1000 mL a una temperatura de 75°C, agitación constante (agitador magnético) y velocidad media sobre una parrilla de calentamiento. El recubrimiento contó con la siguiente proporción de ingredientes: grenetina (4.5%), suero de leche (10%), fibra de cáscara de naranja (2%), glicerol (9%) y agua (100%).

3.4.2.2 Recubrimiento con extracto

Inicialmente se preparó el extracto etanólico de orégano a una concentración del 15% (p/v). Se pesaron 45g de orégano, se colocó en un vaso de precipitado de vidrio de 1000 mL que contenía 300 mL de etanol, se agitó con un agitador magnético sobre una parrilla de agitación a una velocidad media de manera constante durante 15 min. Transcurrido el tiempo, éste se filtró con manta de cielo para separar las partículas suspendidas.

La proporción del extracto adicionado fue en una proporción 50: 50 con respecto al volumen total de agua destilada, esto debido a la mayor solubilidad que presenta la grenetina en etanol. Para lo cual la proporción de los ingredientes fue la siguiente: grenetina (4.5%), suero de leche (10%), fibra de cáscara de naranja (2%), glicerol (9%); agua (50%) y extracto etanólico de orégano (50%). Se utilizó la misma metodología que la del recubrimiento sin extracto con algunas modificaciones. Consistió en disolver primero la grenetina en 50% de agua y una vez homogenizada se procedió a mezclar con el 50% de etanol correspondiente; para la mezcla de los componentes fue calentado a una temperatura $\leq 70^{\circ}\text{C}$, para posteriormente añadir los demás componentes en igual orden; suero de leche, fibra de cítricos y glicerol.

Para la homogenización de la mezcla se utilizó un agitador magnético a velocidad media sobre una parrilla de calentamiento.

3.4.3 Aplicación del recubrimiento

Con el producto cárnico cortado en porciones pequeñas, se procedió a homogeneizar los filetes de manera aleatoria sobre una bandeja para seleccionarse al azar, los cuales se sumergieron en la mezcla del recubrimiento durante 20 s una vez se encontrará a una temperatura de 40°C. Éstos fueron envasados en porciones de tres filetes sobre un platillo de unicel recubierto de papel hule pack, y etiquetados de acuerdo al día que se realizaría el muestreo (0, 3, 6, y 9) (figura 13). Este procedimiento fue realizado para la muestra control (C), el recubrimiento sin extracto (R) y recubrimiento con extracto de orégano (R+E), considerándose para cada muestra un triplicado. Las muestras envasadas se almacenaron en un refrigerador a una temperatura de 4°C durante su estudio.



Figura 13. Filetes de carpa de muestra C; P; P+E envasados

3.4.4 Evaluación de las propiedades físicas en filetes de carpa común (*Cyprinus carpio*)

A través de estos estudios se evaluará la eficacia del recubrimiento obtenido durante el tiempo de almacenamiento.

3.4.4.1 pH

Se siguió la metodología citada por Dublán-García et al. (2006) la cual consiste en tomar una porción de 10g de muestra homogenizando en una licuadora durante 1 min con 90 mL de agua. Se procede a filtrar con manta de cielo para medir el pH con un potenciómetro (conductronic pH140) previamente calibrado. Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados fueron expresados como un promedio de los datos obtenidos.

3.4.4.2 Acidez

Se llevó a cabo mediante el método descrito por Pérez-Chabela et al. (2013) y la NMX-F-102-S-1978 “Determinación de la acidez titulable en productos elaborados a partir de frutas y hortalizas” y con algunas modificaciones. Se pesaron 10g de muestra homogenizando en una licuadora con 90 mL de agua durante 1 min. Se filtró con manta de cielo para eliminar el tejido conectivo, y se recibe en un matraz erlenmeyer de 250 mL, se añaden 3 gotas de fenolftaleína agitar suavemente y titular con NaOH 0.1N. Se preparó un blanco con agua destilada. Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados fueron expresados en porcentaje de ácido láctico aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ácido láctico} = \left(\frac{(V - V_b) (N_{NaOH}) (\text{meq ácido láctico})}{\text{volumen de muestra}} \right) \times 100$$

Donde:

V = volumen de NaOH gastado en la muestra

V_b = volumen de NaOH gastado en el blanco

N = normalidad del NaOH

3.4.4.3 Capacidad de retención de agua (CRA)

Se llevó a cabo mediante la metodología de Honikel & Hamm (1983), descrita por Dublán-García et al. (2006). Se tomaron 10g de muestra y se picaron finamente,

colocando 5 g en un tubo de centrifuga con 8 mL de una disolución de NaCl 0.6 M. Se agitó con una varilla de vidrio durante 1 min en un baño de hielo y posteriormente se dejó reposar 30 min. Posteriormente se agitó nuevamente por 1 min. Se centrifugó durante 15 min a 3500 rpm. Se decantó el sobrenadante y se midió el volumen. Se reportó el volumen de NaCl 0.6 M retenido por 5 g de músculo.

3.4.4.4 Color

Se midió utilizando un colorímetro Konica Minolta (modelo CR-400 Chroma Meter, Sesting, Inc., Japan), con placa de calibración número 12633047 y estándares de $L=97.3$, $a=0.17$, $b= 1.9$. Las determinaciones de color se realizaron sobre la superficie de las muestras control, con recubrimiento y sin recubrimiento. Las muestras se leyeron por triplicado. Los resultados se expresaran en términos de las coordenadas colorimétricas luminosidad (L^*), índice verde-rojo ($-a^*$, $+a^*$) e índice azul amarillo ($-b^*$, $+b^*$).

3.4.5 Determinación microbiológica en los filetes de carpa común

Los análisis de las muestras se realizaron los días 0, 3, 6, 9 de almacenamiento en base a la NOM-210-SSA1-2015, así como las respectivas normas que corresponde a cada microorganismo. Para los análisis se utilizaron 10g de muestra la cual se homogenizó en una licuadora durante 1 min en envases estériles de vidrio con 90 mL de agua peptonada. Este procedimiento se realizó para los tres tratamientos (C, P y P+E), en el cual se utilizaron tres muestras por lote respectivamente.

El procedimiento para identificar presencia de *E. coli* (NOM-112-SSA1-1994; NOM-113-SSA1-1994) se realizó por la técnica de vaciado en placa, colocando 1 mL de muestra en cajas petri estériles utilizando agar Eosina y Azul de Metileno (E.M.B.), que posteriormente se incubarían a una temperatura de 37°C durante 24 h. Las cajas con colonias típicas se identificaron como positivas.

Para determinar la presencia de *Salmonella sp.* (NOM-114-SSA1-1994) fueron

empleados 25 g de cada muestra en 225 ml de agua peptonada, las muestras fueron incubadas a 37°C durante 24 h. Para la fase de enriquecimiento se utilizó base de caldo de tetrionato (Oxoid) incubado a 37°C durante 24 h. Por último las muestras se sembraron en agar *Salmonella-Shigella* y se incubaron a 37°C durante 24 h.

El recuento de *Staphylococcus aureus* (NOM-115-SSA1-1994) fue realizado mediante siembra de diluciones seriadas de 10^{-2} a 10^{-3} en superficie utilizando agar Baird Parker (Bioxon), incubado a 37°C durante 48 h. Todos los recuentos microbiológicos se expresan como el registro de las unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) de muestra.

3.4.6 Electroforesis desnaturalizante

Se utilizó la metodología de Garcia y col. (1993) reportada en Dublán-García (2001). El análisis se llevó a cabo a corriente constante de 200 volts, utilizándose un equipo de electroforesis Mini-Protean II Slab cell de Bio-Rad (Richmond, CA.) a 4 °C. Se utilizó un volumen de 7 µL para las muestras y 5 µL para el marcador de peso molecular. La elaboración de los reactivos, así como las condiciones de la prueba se describen en el Anexo 5.

3.4.6.1 Preparación de muestras

Para la extracción de las proteínas miofibrilares de los filetes con y sin recubrimiento se pesaron aproximadamente 0.1g de cada muestra y se colocaron en tubos eppendorf de 2 mL, estos se etiquetaron conforme al tratamiento y día correspondiente. Se adicionaron 200 µL de disolución de urea, 700 µL de buffer muestra, y se homogenizaron durante 15 segundos en un agitador. Éstos se colocaron en baño maría a temperatura de ebullición durante 10 min, se dejaron enfriar las muestras y finalmente se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min.

3.4.6.2 Condiciones de electroforesis

Los geles se prepararon en dos placas de vidrio cuyas dimensiones fueron 72.101 mm, utilizando separadores de 0.75 mm y un peine del mismo espesor. Se inyectaron 7 μL de muestra en cada carril del gel compactador (10% de poliacrilamida y 5% separador), y 5 μL para el marcador de peso molecular. Para el corrimiento electroforético se virtió el buffer de corrida en la cámara de electroforesis (BIO-RAD Mini-PROTEAN II Cell), y el equipo se conectó a una fuente de poder (BIO-RAD Power Pak 300), con un potencial de 200 V y temperatura de 4°C, para evitar así el efecto Joule. Una vez colocada la muestra en los carriles, se deja correr durante 55 min (hasta que el azul de bromofenol alcance la parte final del gel). Terminado el proceso los geles se desmontaron para sumergirse en disolución fijadora por un periodo de 20 min. Se lavaron con agua destilada y se tiñeron durante 60 min empleando una disolución azul de Coomassie R-250 0.1%. Finalmente se colocaron en solución desteñidora hasta poder observar las bandas de las proteínas correspondientes.

3.4.7 Evaluación del estrés oxidativo en filetes de carpa común

3.4.7.1 Preparación de las muestras

Se pesaron 0.4 g de cada muestra y se mezcló en una relación 1:4 con reactivo PBS. Se procedió a licuar la muestra con una batidora hasta su homogenización. El volumen de la muestra se dividió en 2 tubos; enumerados como tubo 1 y tubo 2 respectivamente.

Del tubo 1 se tomaron 500 μL y se mezcló en relación 1:1 con ácido tricloroacético al 20% (ATC), se centrifugó a 11495 rpm a 4°C por 15 min. El precipitado se utilizó para la determinación del contenido de proteínas carboniladas (POx), mientras que el sobrenadante para el grado de lipoperoxidación (LPx).

Del tubo 2 se tomaron 700 μL del homogenizado, se centrifugó a 12500 rpm a 4°C por 15 min, el cual sirvió para el contenido de proteínas totales (PT).

3.4.7.2 Evaluación del grado de lipoperoxidación

Se llevó a cabo mediante el método Buege & Aust (1978). A 50 μL de sobrenadante se le añadieron 450 μL de disolución tampón Tris HCl 150mM (pH 7.4) y 1 mL de disolución TCA-TBA (0,375% tiobarbitúrico, en ácido tricloroacético al 15%). Posteriormente se sumergen en baño maría a temperatura de ebullición durante 10 min y se enfriaron bruscamente para provocar un choque térmico. Se incubaron los tubos a 37°C por 30 min. Seguido de esto se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min. Finalmente la absorbancia se determinó a 535 nm en un espectrofotómetro (Optizen-POP UV-VIS) usando una reacción de blanco. Los resultados obtenidos se expresaron en mmol de malondialdehído/miligramo de proteínas, usando el coeficiente de extinción molar (CEM) de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.4.7.3 Evaluación del contenido de proteínas carboniladas

Se llevó a cabo por el método de Levine et al. (1994); Burcham (2007). A 200 μL del sobrenadante se le añadieron 150 μL de 2,4-dinitrofenil hidrazina (DNPH) 10 mM en HCl 2 M. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 h en oscuridad. Transcurrido el tiempo se adicionaron 500 μL de ácido tricloroacético al 20%, y se dejó reposar durante 15 min a 4°C. El precipitado se centrifugó a 11000 rpm durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y el botón se lavó varias veces con etanol: acetato de etilo 1:1 hasta obtener un botón blanco, y posteriormente se disolvió en 1mL de guanidina 6M (pH 2.3), y se incubó a 37° C durante 30 min. La absorbancia se determinó a 366 nm. Los resultados se expresaron en nmol de carbonilos reactivos (C=O)/mg de proteína utilizando el CEM de $21\ 000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.4.7.4 Determinación de proteínas totales

Se llevó a cabo mediante el método de Bradford (1976). A 1.5 μL de sobrenadante se le añadieron 75 μL de agua destilada y 1.25 mL del reactivo de Bradford (0.05 g de azul de Cummassi, 25 mL de etanol al 96% y 50 mL de H_3PO_4 en 500 mL de

agua desionizada). Se agitaron los tubos, y se dejaron reposar por 5 min a temperatura ambiente protegidos de la luz. Se determinó la absorbancia de la disolución a 595 nm. Los resultados se extrapolaron en una curva estándar de albúmina (Tabla 7), la cual se muestra en el anexo 6. Las concentraciones de albúmina se prepararon a partir de una disolución de 1 mg/mL.

Tabla 7. Curva para la determinación de proteínas totales

Tubo	Albúmina (μL)	Agua (μL)
1	10	90
2	25	75
3	50	50
4	75	25
5	90	10
6	100	0
Blanco	0	100

3.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en las determinaciones fueron sometidos a un análisis de varianza unifactorial (ANOVA) y las diferencias de las medias de cada grupo fueron comparadas contra el testigo correspondiente, con una ($p < 0.05$) con el software estadístico SPSS 8.0.

4. Resultados y Discusión

4.1 CARACTERIZACIÓN DE RESIDUOS FIBROSOS (RF) DE CÁSCARA DE NARANJA

4.1.1 Contenido de humedad en la cáscara de naranja

Para la determinación de humedad de la cáscara de naranja (*Citrus sinensis*) variedad valencia obtenida de los microproductores de jugo, se obtuvo un promedio de $69.96\% \pm 0.315$. Según Cháfer et al. (2003), el contenido de humedad de la cáscara de naranja valencia es de $74.8\% \pm 0.012$ (Zanella et al., 2013); resultado ligeramente superior al obtenido en el presente estudio, mientras que un valor similar encontró Quiroz-Valle (2009), quien reporta un contenido de humedad promedio de 71,0% para el mismo tipo de naranja. Una vez que se obtuvo este parámetro, se realizó el secado de esta, durante 11 horas (figura 14).

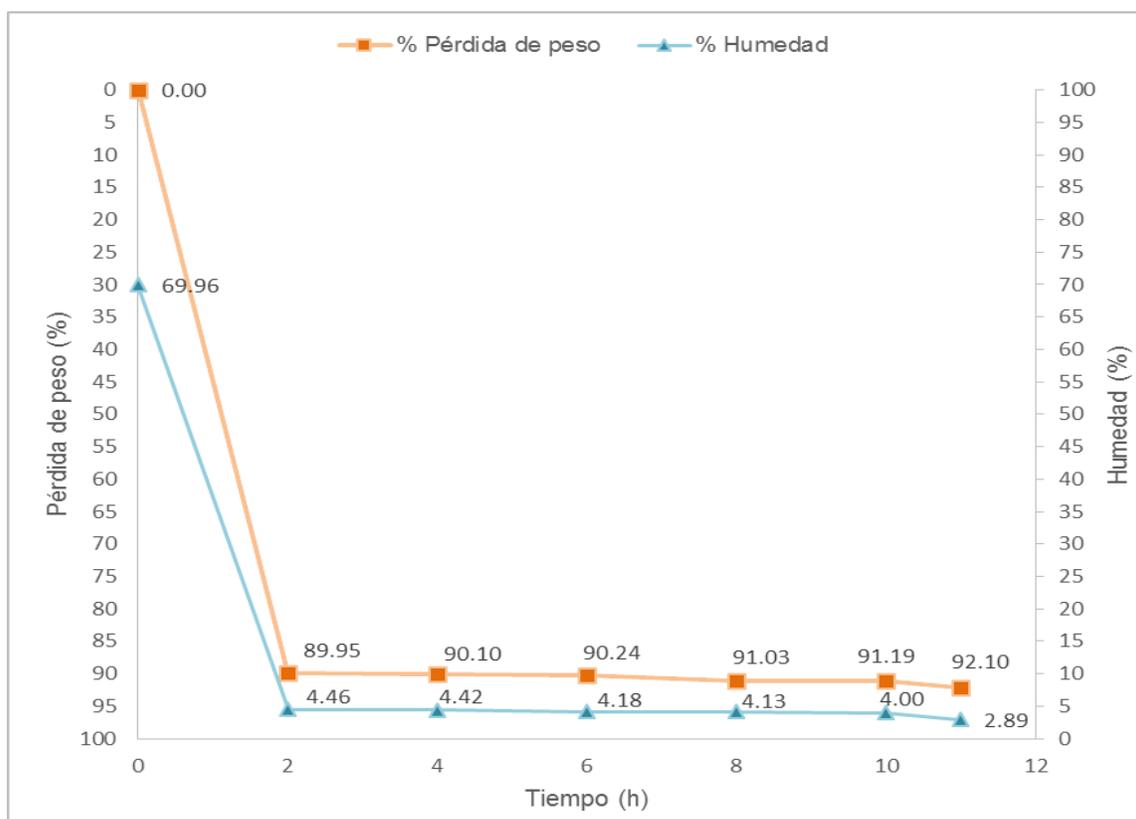


Figura 14. Curva de pérdida de peso y humedad de RF secados a 60°C

La cascara de naranja durante las primeras dos horas redujo su peso en 89.95%, teniendo una humedad en base seca de 4.46%. A partir de las 2h hasta las 10h, la pérdida de peso y contenido de humedad disminuyeron con ligeras variaciones como se observa en la curva de pérdida de humedad, habiendo una disminución del 0.46%. A las 11h de secado la pérdida de peso fue de 92.10% respecto al material fresco, con una humedad final de 2.89%. Cabe mencionar que la naranja empleada en el presente estudio corresponde a la cosecha de otoño, cuyo grosor en la cáscara de naranja tiende a ser más delgada en comparación con otras temporadas, permitiendo facilitar su proceso de secado.

Si bien la humedad deseada (<10%) se obtuvo durante las primeras dos horas del proceso, se seleccionó 6h como el tiempo adecuado para el secado y obtención de residuos fibrosos (RF) de la cáscara, pues en este tiempo se asegura una deshidratación uniforme y homogénea en todos los trozos de la cáscara, permitiendo reducir la actividad microbiana e incrementar la vida útil del producto. Un menor tiempo implicaba una humedad mayor a pesar de que el peso no presentó diferencia significativa, como se muestra en la curva. Por otra parte, al seleccionar un periodo de tiempo intermedio, no se observan cambios en las características como color, sabor y propiedades funcionales de la FD, tal como ocurre en periodos de secado prolongados tanto a temperaturas bajas como elevadas (Garau et al., 2007; Lario et al., 2004).

Este tiempo fue menor a lo reportado para cítricos por Sendra et al. (2008) y Nassar et al. (2008), en donde se emplean tiempos de 24 h, así como Manjarres-Pinzon (2013) quien emplea 7 h con una temperatura de secado al aire de 60 °C, pero mayor a lo reportado por Figuerola et al. (2005) quien empleó un secador de túnel de aire a 60 °C durante 30 minutos, así como De Moraes Crizel, (de Moraes Crizel, Jablonski, de Oliveira Rios, Rech, & Flôres, 2013b), quien utilizó un secador de bandeja a 60 °C durante aproximadamente 4 h; lo cual indica que partir tanto del tratamiento como del método utilizado se puede optimizar el tiempo de secado, evitando un gasto energético mayor al requerido.

4.1.2 Composición proximal de los

Residuos Fibrosos (RF)

La composición de residuos fibrosos (RF) de la naranja en base seca (DM) se muestra en la tabla 8. Al llevar a cabo el análisis de humedad, Gutiérrez et al. (2002), informó una composición similar, reportando un valor de humedad de 4.5% en su investigación con fibra de cáscara de naranja; valor que debe ser bajo (<10%) para evitar la proliferación de microorganismos y poder así prolongar la vida útil del producto.

Tabla 8. Composición proximal de RF de cáscara de naranja

Parámetro	Porcentaje (%)
Humedad	4.24 ± 0.27
Cenizas	3.87 ± 0.08
Proteína	4.17 ± 0.21
Grasa	1.45 ± 0.10

En cuanto al contenido de cenizas, el valor obtenido (3.87%) indica un alto contenido en minerales como el calcio, fósforo y magnesio; componentes encontrados en harina de cáscara de naranja, según reporta Rincón et al. (2005). El valor es cercano al reportado por Fernández y Rodríguez (2001), y Gutiérrez et al. (2002) para valores que comprenden un intervalo de 3.6-3.7 g / 100 g (DM) en cáscaras de cítricos, pero mayor con respecto al de diversos autores como Figuerola et al. (2005); Sáenz, Estévez, & Sanhueza (2007); Talens, Arboleya, Castro-Giraldez, & Fito (2017); quienes reportaron un valor comprendido entre 2.7 a 3.2% respectivamente.

El porcentaje de proteína obtenido (4.17%) a pesar de ser uno de los componentes mayoritarios, éste resultó ser menor al valor del 5% reportado por Rincón, Vásquez, Padilla, & C (2005) y Girón (2015). Esta diferencia pudo deberse a factores relacionados con el origen de la materia prima, como puede ser; el grado de madurez, variedad, lugar de cultivo, condiciones y temporada de cultivo del fruto (Marlett & Vollendorf, 1994). Pues el contenido de glucoproteínas que están

presentes en la pared celular y las cuales forman una red de microfibrillas con la celulosa (Rincón et al., 2005) puede variar dependiendo de los factores anteriormente mencionados.

Por último, el contenido de grasa en los RF fue el parámetro más bajo de los valores obtenidos (1.45%), no obstante el valor presenta relación al reportado por Rincón et al. (2005) y Cerón-Salazar & Cardona-Alzate (2011), quienes encontraron un porcentaje de 1.64 y 1.55% respectivamente, para harinas de cáscara de naranja. Se debe de tener en cuenta que la mayor parte de los componentes lipídicos se encuentran en la cáscara del fruto (Badui, 2006; Priego Mendoza, 2007).

4.1.3 Caracterización microbiológica

Los análisis microbiológicos en los RF se efectuaron una vez secados a 60°C y su posterior molienda. La dilución utilizada para los tres análisis fue de 10^{-1} ; los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Cuenta de microorganismos en RF de cáscara de naranja (UFC/g de muestra).

Coliformes Totales	Bacterias mesófilas aerobias	Mohos
< 100	60	50
valor estimado	valor estimado	valor estimado

De acuerdo con los resultados obtenidos, los valores indican una calidad microbiológica aceptable para los RF de cáscara de naranja; el crecimiento para el grupo de coliformes totales fue nulo; mientras que el recuento de bacterias mesófilas aerobias (5 y 6 colonias) promedió un valor de 60 UFC/g valor estimado; para el caso de los mohos, que pudieran presentar un valor alto debido a la composición y origen del fruto, el recuento (4 y 5 colonias) promedió un valor de 50 UFC/g valor estimado.

Aunque actualmente no existe una norma que estandarice los parámetros sobre fibras obtenidas a partir de residuos de frutas, al comparar los resultados obtenidos en base a lo estipulado por la NOM-247-SSA1-2008 para harinas de trigo (NA, 50,000 UFC/g, 300 UFC/g, para coliformes totales, mesofílicos aerobios y hongos, respectivamente), la cantidad de microorganismos se encuentra por debajo del límite permitido. Por otro lado, de acuerdo con lo reportado por Fernández-Pérez y Rodríguez-Sánchez (2001) para concentrados de FD comerciales, los RF obtenidos se encuentran de igual forma por debajo del límite para coliformes totales (<100 UFC/g) y bacterias mesófilas (<10,000 UFC/g) (citado en Priego Mendoza, 2007). Otros autores como Priego Mendoza (2007) y Santiago Castro (2014) obtuvieron resultados similares en la fibra obtenida a partir de los sáculos de naranja, utilizando escaldados con vapor a temperaturas de secado análogas.

No obstante, se debe considerar en todo momento la sanidad de los equipos que estén en contacto directo con el alimento durante las diferentes etapas del proceso, ya que de lo contrario, pudiera existir una contaminación cruzada que altere los valores finales en el producto.

Por lo anterior, se puede observar que el proceso empleado incluyendo su secado a una temperatura de 60°C para la obtención de RF a partir de la cáscara de naranja resulta ser eficiente al contabilizar una baja carga microbiana que no presente algún riesgo para la salud del consumidor, permitiendo su incorporación como materia prima en la elaboración de películas comestibles.

4.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS PELÍCULAS Y/O BIOEMPAQUES COMESTIBLES “ECO-FRIENDLY PACKAGING”

De estudios previos realizados por García-Argueta et al. (García-Argueta et al., 2013, 2016); Peña Santana (2013); Herrera-Vázquez (2014), quienes emplearon como materias primas; inulina, gretina, suero de leche y glicerol para el desarrollo de recubrimientos comestibles, observaron que dichos materiales tuvieron características idóneas como vehículos de sustancias tales como antimicrobianos y antioxidantes. De acuerdo con lo anterior, las propiedades funcionales de las PC se

investigaron mediante un diseño estadístico Box-Behnken, la diferencia reside en la incorporación de fibra de cáscara de naranja en la formulación, quien junto al suero de leche y gretina su concentración fue variable, manteniendo constante la concentración de glicerol. La influencia de los componentes antes mencionados se evaluó en las 15 formulaciones obtenidas, en primer lugar la caracterización de la DFP, dónde se ensayó la acidez y pH. A continuación se efectuó la caracterización de las PC, en esta parte del experimento correspondió a evaluar sus propiedades físicas, ópticas y mecánicas.

4.2.1 Caracterización de la disolución formadora de película (DFP)

Los análisis correspondientes a la caracterización de las DFP incluyen las variables de acidez y pH respectivamente. En la tabla 10 se presentan los promedios obtenidos para las 15 formulaciones al llevar a cabo un análisis de varianza ANOVA.

Tabla 10. Variables fisicoquímicas medidas en la DFP

DFP	pH	Acidez
1	6.14 ^J	0.21 ± 0.015 ^a
2	5.45 ^d	0.44 ± 0.045 ^g
3	5.60 ^g	0.39 ± 0.010 ^f
4	5.29 ^c	0.61 ± 0.006 ^J
5	5.56 ^{ef}	0.31 ± 0.003 ^c
6	5.21 ^a	0.44 ± 0.006 ^g
7	5.54 ^e	0.40 ± 0.010 ^f
8	6.04 ⁱ	0.34 ± 0.014 ^{cd}
9	5.24 ^b	0.57 ± 0.009 ⁱ
10	6.16 ^J	0.21 ± 0.006 ^a
11	5.26 ^b	0.49 ± 0.005 ^h
12	5.59 ^g	0.46 ± 0.018 ^g
13	5.67 ^h	0.38 ± 0.010 ^{ef}
14	6.06 ⁱ	0.25 ± 0.001 ^b
15	5.58 ^{fg}	0.36 ± 0.011 ^{de}

Los valores son promedios ± SD (n =3).

Las diferentes letras en la misma columna indican diferencia significativa (P < 0.05), de acuerdo con la prueba de Duncan.

En general, los datos obtenidos presentaron diferencias tanto para el pH como acidez a un nivel de significancia del 0,05. En el caso del pH los componentes disminuyeron su valor casi una unidad, indicando una tendencia ligeramente ácida en la DFP, al estar los valores en un intervalo de 5.21 a 6.16. Se pudo observar que una alta concentración de fibra tuvo un efecto inversamente proporcional en el pH de la DFP, es decir, a una baja concentración (2%) de este componente, el pH de la PC fue mayor (5.45-5.67), y a mayor concentración (4%) el pH final de las PC es menor (5.21-5.29); formulaciones 6, 9, 11 y 4. Esto se puede atribuir a que la cáscara de naranja contiene altas cantidades de un compuesto (aceite) llamado limoneno que le provee un carácter mayormente ácido. Por otra parte la interacción de suero de leche-grenetina (SL-Gre) reduce el pH, en donde una alta concentración de suero de leche (13%) resulta en la disminución del mismo, coincidiendo con lo reportado por Herrera-Vázquez (2014). Se observó además, exceptuando las formulaciones 7; 5; 15, 12; 3 y 1; 10, que hubo diferencia con el resto de las formulaciones, lo que indicaría que la concentración de suero de leche; grenetina; fibra; influye de manera significativa en el pH de la DFP. Esta variable es de gran importancia, en el caso de la gelatina su punto isoeléctrico se encuentra en un intervalo de pH 4.8-5, por lo que valores de pH lejanos a este intervalo favorecen la solubilidad de la proteína, manteniéndola dispuesta a interactuar con los demás componentes.

Con respecto a la acidez, se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la concentración de las formulaciones, ya que las interacciones entre los tres componentes (suero de leche-grenetina-fibra) contribuyen al aumento de acidez en la DFP, y cuyo intervalo se encuentra de 0.21 a 0.61%. Se observó que la adición de fibra de cáscara de naranja fue la variable que mayor efecto tuvo en el aumento de este parámetro, seguido del suero de leche y grenetina; existiendo una relación directamente proporcional con la acidez, tal como sucedió con el pH (orden inverso). Este efecto se debe a que el pH de una disolución decae cuando crece la concentración de iones hidronio (H_3O^+), es decir, aumenta su acidez (Le Vay, 2008). Por lo que las formulaciones con mayor porcentaje de fibra (4%) tuvieron un carácter más ácido (0.57-0.61%), y no así las que lo prescindieron (0.21%).

4.2.2 Caracterización de películas comestibles

Los films resultantes de las dispersiones de suero de leche-grenetina y fibra de cáscara de naranja con baja concentración (2%), con glicerol como plastificante resultaron ser lisos, delgados, con superficies homogéneas, y exhibieron una ligera coloración amarilla (figura 15). Por otra parte, se observó que una mayor concentración de fibra (4%) impartía una coloración amarillenta más intensa en la PC, así como una menor uniformidad del componente.



Figura 15. Película comestible a base de suero de leche, grenetina, fibra y glicerol

4.2.2.1 Propiedades físicas

En la tabla 11, se muestran los valores promedio de las variables físicas de las PC.

El espesor es un parámetro que influye en otras propiedades de las PC, tales como el color, transparencia y ciertas propiedades mecánicas, ya que al contener mayor o menor cantidad de sólidos, las películas se comportan de diferente manera. Debido a ello, se fijó una cantidad de 5g de DFP en cada placa petri, obteniendo valores con un intervalo de 0.07 a 0.24 μm . Los resultados de ANOVA ($p < 0.05$) indicaron que únicamente la concentración de suero de leche afectó el espesor de las PC, lo cual puede deberse a que es el componente que se encuentra en mayor proporción (7-13%) en la matriz de los films, mientras que no fue así para sus interacciones con los demás componentes. Se observó además, una diferencia

significativa ($p < 0.05$) sólo para la formulación 5, 11, 10 y 14, como se muestra en la tabla 11, no habiendo diferencia con el resto de las muestras, lo que indicaría que independientemente de la concentración, el espesor no varía significativamente.

Tabla 11. Valores promedio de las variables físicas de las diferentes formulaciones de películas comestibles.

PC	Espesor (μm)	H (%)	CRA (%)	S (%)
1	0.18 ± 0.03^{bc}	35.13 ± 2.67^{bc}	109.33 ± 8.26^b	44.27 ± 6.40^{ab}
2	0.16 ± 0.04^{bc}	27.75 ± 0.34^a	174.52 ± 5.78^f	45.86 ± 5.73^{abc}
3	0.17 ± 0.05^{bc}	33.80 ± 1.24^b	161.57 ± 3.30^e	49.78 ± 4.75^{bcde}
4	0.18 ± 0.12^{bc}	27.20 ± 1.07^a	141.53 ± 4.16^c	52.34 ± 2.20^{de}
5	0.15 ± 0.03^b	40.64 ± 1.48^d	203.31 ± 3.29^h	50.29 ± 2.03^{cde}
6	0.13 ± 0.02^{ab}	36.58 ± 0.89^{bc}	151.88 ± 4.76^d	42.68 ± 2.36^a
7	0.14 ± 0.04^{ab}	36.14 ± 1.24^{bc}	192.53 ± 6.86^g	48.21 ± 1.48^{abcd}
8	0.17 ± 0.02^{bc}	34.73 ± 1.72^{bc}	184.68 ± 6.33^g	52.84 ± 2.11^{de}
9	0.14 ± 0.02^{ab}	29.82 ± 1.38^a	136.00 ± 2.85^c	45.05 ± 0.71^{abc}
10	0.07 ± 0.01^a	34.34 ± 2.26^b	134.25 ± 3.87^d	50.54 ± 1.83^{cde}
11	0.15 ± 0.02^b	36.60 ± 1.65^{bc}	135.46 ± 5.19^d	50.84 ± 2.31^{cde}
12	0.16 ± 0.01^{bc}	38.10 ± 2.16^{cd}	169.27 ± 6.18^{ef}	54.19 ± 2.91^e
13	0.16 ± 0.02^{bc}	34.65 ± 2.80^{bc}	209.07 ± 5.05^h	50.53 ± 2.05^{cde}
14	0.24 ± 0.04^c	27.47 ± 2.69^a	99.30 ± 3.53^a	49.58 ± 0.72^{bcde}
15	0.15 ± 0.02^{ab}	29.29 ± 2.57^a	133.72 ± 2.13^d	45.53 ± 1.15^{abc}

Los valores son promedios \pm SD ($n = 3$).

Las diferentes letras en la misma columna indican diferencia significativa ($P < 0.05$), de acuerdo con la prueba de Duncan.

Con respecto a la humedad (H%), las películas presentaron valores de 27.20 a 40.64 %, tal como se muestra en la tabla 11, existiendo una diferencia significativa ($p < 0.05$) en el contenido de humedad para las siguientes formulaciones 4, 14, 2, 15, 9; 3, 10; 5. Un bajo contenido de humedad (27.47-27.82%) fue observado en las formulaciones 2, 9, 14 y 15 (6% de gelatina), mientras que un contenido de humedad más alto (35.13-40.64%) se observó en la formulación 1, 5, 11, 12 (3% de gelatina). Determinado que la interacción de la gretina con los demás componentes podría ser el componente que afecta a este parámetro. Por otro parte, aunque la concentración de glicerol se mantuvo constante (9%) en todas las formulaciones,

esta influyó en la obtención de altos valores de humedad en las PC, pues estudios realizados por Rivero, García, & Pinotti (2010), y Ramos et al. (Ó. L. Ramos et al., 2013), al ensayar diferentes concentraciones de glicerol (10-100%; 40-60% w/w) en películas a base de gelatina y concentrados de suero de leche respectivamente, observaron que al emplear una mayor concentración del plastificante (glicerol) el contenido de humedad se incrementaba de manera significativa (10.3-44.6%; 17.91-21.71%). Por lo que el aumento observado en el presente estudio se puede atribuir a la concentración de glicerol empleada (9%) y la naturaleza higroscópica del mismo, que atrae y retiene moléculas de agua, lo que favorece la humectación de la superficie de la película y la absorción de humedad (Kokoszka et al., 2010).

En cuanto a la capacidad de retención de agua (CRA), propiedad relacionada con la capacidad de ligar agua en la matriz de la PC, se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) para las diferentes formulaciones en el intervalo comprendido de 99.3 a 209.07% (tabla 11). Los resultados indicaron que las interacciones suero de leche-gelatina y suero de leche-fibra afectaron de manera significativa la CRA en las películas. Al incrementar la concentración de suero de leche (10-13%) en la DFP, aumentó la CRA. Esto coincide con lo reportado por Harper, Barbut, Lim, & Marcone (2013), quienes al ensayar diferentes concentraciones de proteína aislada de suero (0.4 y 0.8 %) en geles a base de alginato, observaron una pérdida de humedad mayor (29.4%) a una concentración baja de suero, en comparación con la de mayor concentración (28.9%). Lo anterior se explica debido a que con la adición de suero de leche aumenta la cantidad de agua ligada en las redes que forma la PC, dado que contiene grupos hidrofílicos que por efecto del proceso térmico interactúan con el agua, aumentando la CRA (Cáñez-Carrasco et al., 2016). Por otro lado, la fibra también tuvo un efecto significativo en esta propiedad, en su interaccionar con la gelatina se observó una disminución en la CRA al aumentar la concentración de ambos componentes (4% y 6%). En cambio, presentó valores altos de retención de agua en las formulaciones (5 y 12) donde la concentración de gelatina y fibra fue menor (3% y 2%). Esto puede atribuirse al pH en las DFP que fueron de tipo ácido, las cuales al encontrarse en un punto cercano al punto isoeléctrico de la gelatina,

podiera aumentar las interacciones proteína-proteína como consecuencia de la disminución de la repulsión electrostática, disminuyendo simultáneamente las interacciones proteína-agua, implicando una disminución de los puentes de hidrógeno no formando una red tridimensional tan compacta, impidiendo una mayor fijación de agua por la matriz.

La solubilidad es una propiedad física relacionada con la capacidad de las PC para disolverse en el agua, por lo que cuando se ingiere puede digerirse adecuadamente o, si se vierte al medio ambiente, se puede descomponer de forma natural (Arham, Mulyati, Metusalach, & Salengke, 2016). Por lo que la solubilidad deseada de un film dependerá de su aplicación o intención de uso. El intervalo de esta propiedad se encontró de 42.68 a 54.19%, como se muestra en la tabla 11. Valores de solubilidad similares (40.9-64.2) fueron reportados por Pitak y Rakshit (2011) en films compuestos a base de harina de plátano y quitosano. Los resultados del ANOVA, indicaron que la concentración de suero de leche y su interacción con la fibra afectaron significativamente ($p < 0.05$) la solubilidad de la PC. Se observó que en las formulaciones (2, 4, 8, 12) donde se utilizó una mayor concentración de suero (13%) la solubilidad fue superior (45.86-54.19%) con respecto a las demás, coincidiendo con lo reportado por Herrera-Vázquez (2014) para PC a base de suero de leche, grenetina e inulina. De igual forma la gelatina, en su interacción con el suero tuvo el mismo efecto pero en una menor proporción. Esto se debe, a que al aumentar el contenido de componentes hidrofílicos en la matriz, aumenta la solubilidad (de Andrade, Fonseca, Innocentini Mei, & Fakhouri, 2017). Por otro lado, la interacción fibra-grenetina tuvo un efecto negativo en esta propiedad, al observarse en las formulaciones (3; 9, 5; 6, 4; 12) una depreciación de la solubilidad con el aumento de la concentración de ambos componentes. Lo anterior puede deberse a que en el caso de la fibra, su composición contiene un mayor porcentaje de fibra del tipo insoluble, mientras que en la gelatina pudiera existir una disminución de la solubilidad que al aproximarse al punto isoeléctrico, el desplegamiento incrementa las interacciones hidrofóbicas de la superficie.

4.2.2.2 Propiedades ópticas

Los atributos de color son de primordial importancia porque influyen directamente en el atractivo del producto y la aceptabilidad del consumidor. Por tanto, para comprender mejor las propiedades ópticas de las películas a base de suero de leche-gelatina-fibra de cítricos con glicerol como plastificante, se analizaron los parámetros de color L^* , a^* , b^* , la opacidad de la película, y se determinó la diferencia de color total (ΔE). La tabla 12 muestra los valores de estos parámetros ópticos en las películas estudiadas.

Tabla 12. Propiedades ópticas de las diferentes formulaciones de PC a base de SL-Gre-fibra.

PC	L	a^*	b^*	C	$^{\circ}H$	ΔE^*
1	90.25 ± 1.71 ^{de}	-1.65 ± 0.90 ^{def}	8.53 ± 1.53 ^{ab}	8.92 ± 1.54 ^{ab}	97.94 ± 0.32 ^{cd}	9.02 ± 1.51 ^{ab}
2	90.95 ± 0.21 ^e	-2.35 ± 0.12 ^{abcd}	12.97 ± 0.82 ^{cdefg}	10.68 ± 1.09 ^{bc}	100.13 ± 0.23 ^{efg}	13.32 ± 0.80 ^{cde}
3	91.22 ± 0.31 ^e	-2.10 ± 0.49 ^{bcde}	12.16 ± 2.20 ^{cdef}	12.51 ± 2.14 ^{cdef}	100.02 ± 0.16 ^{ef}	12.50 ± 2.04 ^{cd}
4	88.85 ± 1.05 ^{cd}	-2.93 ± 0.31 ^a	15.92 ± 2.05 ^g	16.19 ± 2.07 ^g	100.44 ± 0.29 ^{efg}	16.99 ± 2.29 ^{fg}
5	90.73 ± 1.28 ^e	-1.33 ± 0.99 ^{ef}	10.64 ± 1.10 ^{bcd}	10.83 ± 1.11 ^{bcd}	100.62 ± 0.12 ^{efg}	11.51 ± 1.66 ^{bc}
6	88.76 ± 0.09 ^{cd}	-2.82 ± 0.22 ^{ab}	14.78 ± 1.34 ^{fg}	15.05 ± 1.35 ^{fg}	100.81 ± 0.23 ^g	16.09 ± 1.10 ^{ef}
7	90.59 ± 0.29 ^{de}	-1.99 ± 0.23 ^{cde}	11.17 ± 1.25 ^{bcde}	11.35 ± 1.27 ^{bcde}	100.10 ± 0.02 ^{efg}	12.02 ± 0.95 ^{bcd}
8	88.83 ± 0.97 ^{cd}	-1.39 ± 0.25 ^{ef}	10.26 ± 1.58 ^{bc}	13.52 ± 0.93 ^{defg}	97.56 ± 0.06 ^{bc}	12.41 ± 1.80 ^{cd}
9	86.22 ± 0.93 ^b	-2.99 ± 0.11 ^a	14.24 ± 0.50 ^{fg}	15.85 ± 0.51 ^g	100.71 ± 0.04 ^{fg}	16.79 ± 0.91 ^{fg}
10	91.72 ± 0.08 ^e	-0.92 ± 0.05 ^f	6.88 ± 0.22 ^a	6.89 ± 0.38 ^a	97.02 ± 0.17 ^{ab}	7.46 ± 0.10 ^a
11	86.41 ± 0.29 ^b	-2.81 ± 0.12 ^{ab}	13.87 ± 0.58 ^{efg}	14.91 ± 0.33 ^{fg}	100.41 ± 0.23 ^{efg}	16.36 ± 0.63 ^{ef}
12	83.46 ± 0.21 ^a	-2.60 ± 0.02 ^{abc}	15.91 ± 0.41 ^g	18.78 ± 1.06 ^h	98.53 ± 0.83 ^d	19.79 ± 0.40 ^{gh}
13	87.56 ± 1.62 ^{bc}	-2.48 ± 0.42 ^{abc}	13.32 ± 2.61 ^{defg}	13.46 ± 2.02 ^{defg}	99.92 ± 0.21 ^e	15.16 ± 3.06 ^{def}
14	86.30 ± 2.21 ^b	-2.56 ± 0.20 ^{abc}	18.87 ± 3.19 ^h	19.65 ± 1.09 ^h	96.82 ± 1.05 ^a	20.36 ± 3.87 ^h
15	87.26 ± 0.64 ^{bc}	-2.47 ± 0.30 ^{abc}	12.94 ± 1.36 ^{cdefg}	14.03 ± 2.70 ^{efg}	100.08 ± 0.10 ^{efg}	15.08 ± 1.45 ^{def}

Los valores son promedios ± SD (n =3).

Las diferentes letras en la misma columna indican diferencia significativa (P < 0.05), de acuerdo con la prueba de Duncan.

Para la variable L, que es luminosidad, al llevar a cabo el análisis de varianza ANOVA, se observó que existe diferencia significativa ($p < 0.05$), para las diferentes formulaciones de PC, determinando que la concentración en que se adicionan los componentes, afecta este parámetro. En este caso, la luminosidad fue disminuida

al emplear una alta concentración del componente (13% suero, 6% gelatina y 4% fibra), existiendo una relación inversa con respecto a la variable. Como puede observarse en la tabla 12, la mayoría de las películas presentaron valores de alta luminosidad (83.46 a 91.72). Estos valores son similares a los obtenidos por Herrera-Vázquez (2014) y Galus & Kadzińska (2016) para otras películas comestibles basadas en proteína de suero de leche.

Con respecto a las coordenadas cromáticas a^* y b^* , los valores presentaron diferencia significativa ($p < 0.05$) para las diferentes formulaciones, mostrando en el caso de a^* , un comportamiento negativo (-0.92 a -2.99), que indica una coloración con tendencia al verde, mientras que para la variable b^* , los valores presentaron un comportamiento positivo (6.88 a 18.87), lo que indica una coloración con tendencia al amarillo, esto en base a la ubicación en las coordenadas situadas en la esfera de color (figura 16). La presencia de fibra en la matriz de proteína de suero aumentó el tono verde. Por tanto, el parámetro a^* disminuyó y b^* aumentó. Este mismo efecto se observó para el suero de leche y gelatina (excepto formulación 2; 12). Por lo anterior, considerando los parámetros L, a^* y b^* , así como el ángulo cuyo intervalo fue de 96.82-100.81 °H las películas a base de suero-gelatina-fibra presentaron una coloración amarillo (tono predominante) verde (fig.15), permaneciendo traslucidas, lo que con la adición de una alta concentración de suero de leche (13%) resultó en películas con un mayor grado de opacidad.

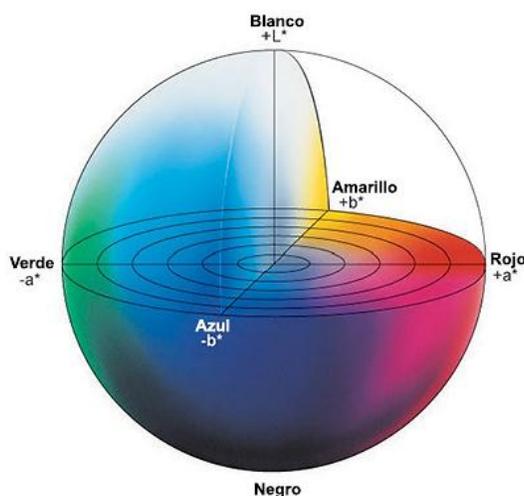


Figura 16. Esfera de color

La cromaticidad (C) es un parámetro similar al delta E (ΔE), el primero indica el grado de tonalidad en el color de las muestras, mientras el segundo la diferencia de color total de la muestra con respecto a la placa de calibración estándar, por lo que los valores obtenidos en ambos casos presentaron una misma tendencia. Al realizar el análisis de varianza ANOVA, ambos parámetros presentaron diferencia significativa ($p < 0.05$), lo que indicaría que la diferencia de color entre las muestras fue una consecuencia de la formulación. El intervalo para cromaticidad fue de 6.89-19.65 y 7.46-20.36 para ΔE , respectivamente. Las películas obtenidas en el presente estudio presentaron un color amarillento, cuya diferencia de color entre las muestras varió de un tono amarillo claro a uno mayormente opaco (ámbar), tal como se puede observar en la figura 17. A medida que aumentó la proporción de suero de leche, el color amarillento también lo hizo (medido por un aumento en b^*) y las películas fueron más opacas (indicadas por la disminución en L), esto se atribuye a su coloración amarillenta ligeramente opaca. Simultáneamente la fibra de cítricos presentó una coloración similar, con lo cual, al adicionarse en una mayor concentración a la matriz de la película, se vieron afectados dichos parámetros. Ramos et al. (Ó. L. Ramos et al., 2013) atribuye tal coloración observada en películas de concentrado de suero de leche a la presencia de grasa y fosfolípidos, lo cual no implica un problema, pues puede superarse mediante la adición de agentes colorantes, como se hace frecuentemente en las películas de envasado de alimentos.

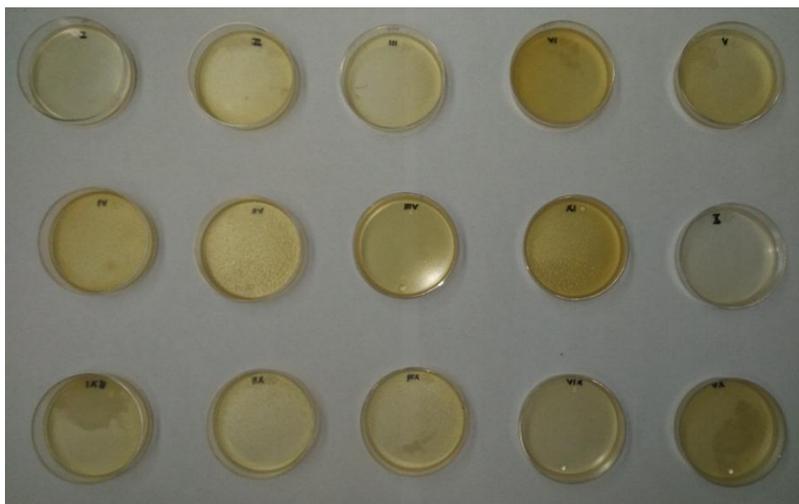


Figura 17. PC con diferente formulación a base de suero de leche, gelatina y fibra

4.2.2.3 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de las películas comestibles son importantes para garantizar que la película tenga la resistencia mecánica y la integridad adecuada durante el transporte, la manipulación y el almacenamiento de los alimentos cubiertos con ellas (Ozdemir & Floros, 2008). Las propiedades mecánicas evaluadas en las PC se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Propiedades mecánicas de las películas comestibles.

PC	Resistencia (N)	MY (N/mm)	Elongación (mm)	%E
1	0.59 ± 0.07 ^a	0.07 ± 0.01 ^a	15.37 ± 0.28 ^b	21.06 ± 2.18 ^b
2	9.61 ± 1.98 ^e	0.66 ± 0.12 ^f	19.41 ± 0.10 ^e	52.82 ± 0.82 ^e
3	5.03 ± 1.87 ^{cd}	0.32 ± 0.12 ^{cd}	19.22 ± 0.73 ^e	51.31 ± 5.71 ^e
4	4.46 ± 1.54 ^{bcd}	0.50 ± 0.06 ^e	16.45 ± 0.47 ^c	29.54 ± 3.73 ^c
5	2.75 ± 0.70 ^{abc}	0.16 ± 0.09 ^{ab}	21.70 ± 0.30 ^{gh}	70.84 ± 2.34 ^{gh}
6	4.32 ± 0.31 ^{bcd}	0.45 ± 0.06 ^{de}	16.91 ± 0.53 ^{cd}	33.17 ± 4.18 ^{cd}
7	3.77 ± 0.66 ^{abcd}	0.24 ± 0.05 ^{bc}	20.17 ± 0.39 ^f	58.81 ± 3.10 ^f
8	2.97 ± 1.44 ^{abc}	0.24 ± 0.12 ^{bc}	16.96 ± 0.29 ^{cd}	33.55 ± 2.26 ^{cd}
9	7.09 ± 0.74 ^{de}	0.68 ± 0.07 ^f	17.41 ± 0.24 ^d	37.11 ± 1.93 ^d
10	3.11 ± 0.97 ^{abc}	0.07 ± 0.02 ^a	22.25 ± 0.72 ^h	75.19 ± 5.67 ^h
11	2.40 ± 0.27 ^{abc}	0.42 ± 0.04 ^{de}	15.03 ± 0.25 ^b	18.36 ± 2.00 ^b
12	1.06 ± 0.08 ^{ab}	0.25 ± 0.03 ^{bc}	13.86 ± 0.15 ^a	9.16 ± 1.17 ^a
13	2.39 ± 0.55 ^{abc}	0.13 ± 0.03 ^{ab}	20.35 ± 0.29 ^f	60.23 ± 2.31 ^f
14	29.98 ± 5.66 ^f	0.69 ± 0.07 ^f	25.31 ± 0.61 ⁱ	99.30 ± 4.83 ⁱ
15	7.23 ± 2.94 ^{de}	0.34 ± 0.12 ^{cd}	21.16 ± 0.30 ^g	66.58 ± 2.40 ^g

Los valores son promedios ± SD (n =3).

Las diferentes letras en la misma columna indican diferencia significativa (P < 0.05), de acuerdo con la prueba de Duncan.

La resistencia a la ruptura de las PC presentó diferencias significativas al llevar a cabo un análisis de varianza ANOVA (p<0.05) para las siguientes formulaciones; 1, 6, 4, 3, 9, 15, 2 y 14, existiendo diferencia con el resto de las muestras. Los valores indicaron una resistencia de tensión máxima en el intervalo de 0.59-29.98 N (tabla 13), en el cual, la concentración de grenetina, fibra, y su interacción, afectó

significativamente ($p < 0.05$) la resistencia de las PC. Las películas (2, 9, 14, 15) elaboradas con una mayor concentración de gelatina (6%) presentaron los valores más altos de resistencia (7.09-29.98 N), dicho efecto coincide con el observado por Cao et al. (2007) y Denavi et al. (2009), quienes notaron que la fuerza de ruptura como otras propiedades mecánicas en películas compuestas (aislado de proteína de soja con gelatina de hueso bovino tipo B, y con gelatina de bacalao respectivamente) mejoraron progresivamente con proporciones crecientes de gelatina. Sin embargo, es contrario con el observado en películas multicapa a base de polihidroxialcanoatos con la adición de suero de queso/ gelatina, reportado por de Andrade et al. (2017). De igual forma la incorporación de fibra en la matriz de la película tuvo un efecto positivo en este parámetro. Este incremento en los niveles de tensión, pudiera deberse a la interacción química entre los componentes del residuo agroindustrial (celulosa, hemicelulosa y lignina) con la gelatina, provocándose una mayor fuerza de unión entre éstos, con uniones hidrofílicas, lo cual repercute directamente en la propiedad de resistencia a la ruptura (Niño, Huerta, Verde, & Rodríguez, 2010). Por otro lado, la adición de suero de leche afectó ligeramente la resistencia de las PC.

El módulo de Young (MY) es una medida de la rigidez de la película, mientras la elongación, es el cambio máximo en la longitud de una muestra antes de romperse (Galus & Kadzińska, 2016). Por lo general, se requiere para que una película mantenga su integridad cuando se aplica a productos alimenticios (Arham et al., 2016). Al evaluar el MY y la elongación en las películas, la concentración de suero, gelatina y fibra, así como sus interacciones (excepto suero-fibra para el MY) causaron diferencias significativas ($p < 0.05$) para ambos parámetros en las PC. En el caso del MY, el intervalo se encontró de 0.07 a 0.69 N/mm, presentando una tendencia similar a la observada en el parámetro de resistencia a la ruptura, en donde los valores más altos (0.66-0.69 N/mm) se encontraron en las formulaciones (2, 9, 14) con un mayor concentración de gelatina (6%). De igual forma, la adición de fibra de cítricos afectó positivamente; cuanto mayor fue el contenido de fibra (4%) en las formulaciones (4, 6, 9 y 11), mayores fueron los valores del MY (0.42-0.68

N/mm), mientras la adición de suero de leche tuvo un impacto positivo, pero en menor proporción con respecto a la otras dos materias primas.

En el caso de la elongación, se encontró un intervalo de 13.86 a 25.31 mm (tabla 13), observándose una tendencia distinta. La adición de fibra y suero de leche presentaron un efecto negativo en este parámetro, lo cual puede atribuirse a que las películas proteínicas son generalmente frágiles y susceptibles de agrietarse (debido a la fuerte densidad de energía cohesiva de los polímeros) (Lim, Mine, Britt, & Tung, 2002). Jiang, Li, Chai, & Leng (2010) observaron al evaluar películas compuestas a base de proteína asilada de suero (WPI) y gelatina mediante imágenes captadas por microscopía electrónica de barrido que después de mezclar con WPI, las cadenas largas dispuestas en paralelo por parte de la gelatina fueron algo desordenadas y la deformación disminuyó, causando una microestructura discontinua, en donde la distribución de la fuerza sobre cada enlace de la matriz se volvía irregular y conducía a una disminución de la resistencia mecánica del sistema. Por otra parte, la adición de gelatina fue el único factor que afectó al sistema de manera positiva, al incrementar los valores de elongación, coincidiendo con lo reportado por Irianto et al. (2006), quien ha reportado que una mayor concentración del hidrocoloide carragenina aumentó la elongación de la película. Lo anterior puede atribuirse a la capacidad de la gelatina para formar geles que junto a sus propiedades fisicoquímicas, crean sinergia entre los demás componentes, permitiendo la formación de redes tridimensionales más flexibles en las PC (García-Argueta et al., 2013). Los valores de elongación presentados en el presente estudio, son mayores a los reportados para películas elaboradas a base de cáscara de limón, alcohol polivinílico y benzoato de sodio (3.02-5.9%) (Niño et al., 2010).

Selección de Película

Inicialmente se consideró la matriz alimentaria a la cual se iba aplicar la película, en este caso, en filetes de carpa común. El pescado es altamente susceptible a la descomposición, lo que puede ser causado tanto por reacciones químicas como por el crecimiento microbiano (Gram & Dalgaard, 2002). Por ello, en productos pesqueros una barrera contra la migración de humedad y oxígeno puede ser beneficiosa (Dehghani, Hosseini, & Regenstein, 2017). En este punto, el parámetro de solubilidad fue de gran importancia al momento de seleccionar la PC, optando por considerar aquellas con una solubilidad intermedia. Los valores de solubilidad obtenidos en las PC se encontraron un intervalo 42.68 a 54.19%. Lo anterior, considerando que la solubilidad en agua de películas puede ser ventajosa en situaciones en las que la película será consumida con un producto que tiene un pretratamiento (lavado o calentamiento) antes del consumo. Durante el tratamiento, la película o revestimiento se disolvería, e idealmente, no alteraría las propiedades sensoriales del alimento (Greener-Donhowe & Fennema, 1994). Por lo anterior, se seleccionó la formulación 3, ya que además de presentar una solubilidad intermedia (49.78%), también mostró una alta retención de agua (161.57%), lo cual en productos con alta humedad, como el filete de pescado, puede resultar benéfico, ya que puede aplicarse como una película relativamente gruesa en las superficie del alimento para absorber intencionalmente agua y proporcionar protección temporal contra pérdidas de humedad (A. Pavlath & Orts, 2009). Adicionalmente presentó propiedades ópticas aceptables, así como de barrera. Su composición se muestra en la tabla 14.

Tabla 14. Formulación seleccionada para aplicación.

Fórmula	% Suero de leche	% Grenetina	% Fibra de Cítricos	% Glicerol
3	10	4.5	2	9

4.3 EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE IN VITRO DE EXTRACTO DE ORÉGANO (ORIGANUM VULGARE)

Estudios en donde se han empleado plantas medicinales, el orégano es bien conocido por sus propiedades benéficas, las cuales se encuentran relacionadas con sus propiedades antioxidantes. Por ello, en este apartado del presente estudio se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) así como la actividad antioxidante en los extractos de la especie *Origanum vulgare* L. para su posterior incorporación en la película comestible.

4.3.1 Compuestos fenólicos totales

El contenido de fenólicos totales (CFT) en la especie *Origanum vulgare* L., por el método de Folin-Ciocalteu, fue de 47.22 a 67.51 mg de AGE/1g de muestra seca, como se muestra en la tabla 15. Los valores obtenidos mostraron un alto contenido de fenólicos, existiendo diferencias para los diferentes extractos, indicando que el nivel más alto de CFT se encontró en el extracto etanólico. Esto se debe a que al existir una polaridad similar de los disolventes empleados con respecto a la de los compuestos fenólicos permite una mayor afinidad para lograr su extracción. El Babili et al. (2011) reportó que una decocción (extracción de agua con tratamiento térmico) mostró un menor contenido de CFT que la extracción con un disolvente orgánico (etanol, éter de petróleo, acetato de etilo). En este estudio, la extracción con la mezcla agua-etanol-acetona mostró compuestos fenólicos más altos. Estudios realizados por L. Pizzale *et al.* (2002) sobre la composición fenólica de *Origanum vulgare* L., informaron que el ácido cafeico, rosmarínico y carvacrol corresponden al 55% del contenido fenólico total (Unver et al., 2009).

Tabla 15. Contenido de compuestos fenólicos del extracto de orégano.

Extracto	mg AGE/g de orégano
Acuoso	47.22 ± 2.31
Etanólico	67.51 ± 0.93

AGE= Ácido Gálico Equivalente

Estudios realizados por Sevilla-Asencio, Dublán-García, Gómez-Oliván, & López-Martínez (2013), reportaron que el contenido de compuestos fenólicos de las extracciones acuosas de la especie *Origanum vulgare* L., fue de 48.2 mg/g, siendo similar al valor obtenido en el presente estudio. En cambio, Karimi, Min Brownmiller, & Lee (2015), reportó en orégano de la misma especie, también conocido como mediterráneo, un contenido menor de 20.6 mg GAEg⁻¹, mientras que en orégano mexicano (*Lippia graveolens*) reportó 47.7 mg GAEg⁻¹, utilizando en ambas pruebas agua como disolvente.

En cuanto al extracto etanólico, la concentración de CFT de orégano fue de 67.51 mg AGE/g, cercano al extracto etanólico (72.87 mg GAE/g) reportado por Pereira Moura Aranha & Neuza (2012). Sin embargo, en el estudio realizado por Kwon, Ko, & Shin (2015), el contenido de compuestos fenólicos fue de 22.23 mg GAE/100 g, mientras que en el estudio realizado por Amarowicz et al. (2009) el contenido de compuestos fenólicos fue de 288 mg /g, en este caso el valor fue mayor ya que se utilizó el ácido sinápico como estándar. El valor reportado en el presente estudio para el extracto etanólico, puede atribuirse la polaridad resultante de la mezcla agua-etanol-acetona que tuvo una mayor afinidad con la polaridad de los compuestos fenólicos del orégano para su extracción. Esto puede explicarse en base al estudio realizado por Karimi et al. (2015), quien al emplear diferentes disolventes para la extracción de CFT en el *Origanum vulgare* L., observó que con la acetona se obtuvo un mayor rendimiento, y en la proporción 40:60 y 60:40 (acetona: agua) exhibió un contenido de CFT y actividad antioxidante significativamente mayor. Por lo que, tales diferencias pueden atribuirse al tratamiento utilizado para la extracción, el tipo de disolvente y su proporción, así como aspectos relacionados con la especie, ya que sus características pueden variar según la zona geográfica de procedencia y el proceso previo al que fue sometida, indicando, tal como describe Karimi et al. (2015), lo que podría ser una posible razón de la mayor variabilidad reportada en el contenido de CFT de hierbas y plantas medicinales, por lo que en este caso, los resultados obtenidos indican que la cantidad de compuestos fenólicos presentes en la especie *Origanum vulgare* L., se encuentra dentro del intervalo reportado en los estudios ya mencionados.

4.3.2 Determinación antioxidante en los extractos de orégano

Generalmente, cuando una muestra tiene un mayor contenido fenólico, se espera que muestre mayores propiedades antioxidantes.

La actividad antioxidante reflejada por el ensayo de captación de radicales ABTS^{•+} fue similar en agua y en el extracto etanólico, no existiendo diferencias, a pesar de que el contenido fenólico total en ambos extractos fue diferente (tabla 16). De las muestras evaluadas, el extracto etanólico de orégano exhibió un mayor efecto de inhibición con el 98.70% a una concentración de 243.57 µg/mL. En cambio, el extracto acuoso fue menor con un 98.21% de inhibición a una concentración de 242.3 µg/mL. Considerando que el antioxidante de referencia utilizado Trolox, presentó un valor del 98.93% de efecto de inhibición contra el radical ABTS^{•+} a una concentración de 250.29 µg / mL, se puede suponer que en esta prueba, el orégano fue tan eficaz como el Trolox.

Tabla 16. Actividad antioxidante del extracto de orégano por el método ABTS

Extracto	Concentración (mg/L)	% inhibición
Acuoso	242.3 ± 0.22	98.21
Etanólico	243.57 ± 0.38	98.70

Los valores encontrados en el presente estudio también fueron comparables con trabajos de investigación similares, como el reportado por Kwon et al. (2015), quien al utilizar una concentración de 500 µg / mL del extracto etanólico de *Origanum vulgare*, reportó un 65.83% de efecto de inhibición de ABTS^{•+}. En cambio, difiere al realizado por Chun, Vattem, Lin & Shetty, (2005), quienes a una concentración de 50 µg fenólicos/ml de orégano reportaron porcentajes de inhibición más altos en extractos de agua (>70%) que los extractos de etanol. Debido a las diferentes características químicas (como la polaridad) que podrían afectar los resultados de los ensayos con antioxidantes, generalmente se utilizan dos o más métodos (Karimi et al., 2015).

El ensayo con DPPH• que evalúa la capacidad de los compuestos antioxidantes (AH) al actuar como donantes de hidrógeno, y reducir el radical DPPH a su derivado de hidrazina (Sousa et al., 2007), indicó que ambos extractos mostraron actividad antioxidante (tabla 17), observándose diferencias en la actividad entre los extractos de agua y etanol, lo cual pudiera explicarse por el contenido total de fenoles.

Tabla 17. Actividad antioxidante del extracto de orégano por el método DPPH

Extracto	Concentración (mg/L)	% inhibición
Acuoso	268.80 ± 2.62	83.12
Etanólico	293.03 ± 1.59	91.21

Para este ensayo el agua fue el disolvente con menor eficiencia. La extracción de muestras de orégano con disolventes orgánicos causó una mayor actividad de captación. Entre los 2 extractos evaluados, el etanólico exhibió una actividad mayor con un 91.21% de inhibición contra el radical DPPH• a una concentración de 293.03 µg/mL. El valor obtenido es cercano al reportado por Exarchou et al. (2002) en extracto de *Origanum vulgare* L. (99.1%), quien utilizó etanol como disolvente. Por el contrario, el extracto acuoso exhibió una inhibición menor con el 83.12% a una concentración de 268.8 µg/mL. Este valor donde la actividad del extracto acuoso fue superior al 80% fue similar al reportado por Matsuura et al. (2003) cuando probó la porción de 10 mg equivalentes, siendo el extracto de orégano (*O. vulgare*) el que mostró la mayor actividad. Milos et al. (2006) publican que la familia Lamiaceae en la que se encuentra especias como el orégano tiene gran capacidad antioxidante, con la infusión de orégano (0.5 g/L) reportan un porcentaje de captura de radicales libres DPPH de 85% (Morales-Olán, 2009). Considerando que el antioxidante de referencia (Trolox), mostró 93.81% de inhibición contra el radical ABTS, a una concentración de 300.34 µg / mL, se puede considerar que los extractos de orégano fueron antioxidantes casi tan efectivos como el de tipo sintético. Por lo tanto, el efecto de inhibición mostró la misma tendencia que el contenido de fenólicos totales, lo que indica una correlación entre la actividad de eliminación/captación de radicales y el contenido fenólico de los extractos de orégano.

4.3.3 Actividad antimicrobiana del extracto acuoso y etanólico de orégano

A partir de los inóculos preparados de cada microorganismo, con turbidez equivalente al estándar 0.5 unidades de la escala de Mcfarland se analizó su absorbancia a 625nm, y mediante un modelo de regresión lineal (anexo 4) se determinó la posible concentración de Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/mL) presentes en los inóculos, tal como se muestra en la tabla 18.

Tabla 18. Concentraciones de bacterias en los inóculos estandarizados.

Microorganismo/ Extracto	Concentración bacteriana UFC/mL (1×10^8)		
	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella ssp.</i>	<i>S. aureus</i>
Acuoso	1.50	1.78	2.59
Etanólico	1.13	1.70	1.57

A tales concentraciones se llevó a cabo las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana utilizando la técnica de difusión en disco, una vez impregnado con el respectivo extracto de orégano; acuoso (EAO) y etanólico (EEO). Asimismo, el hipoclorito de sodio (NaOCl) a una concentración de 300 ppm y un desinfectante comercial microdyn, fueron utilizados como medio de comparación frente a los resultados obtenidos con ambos extractos. Los extractos de especias mostraron diversos grados de inhibición contra las cepas bacterianas, teniendo en cuenta que se consideró actividad antibacteriana positiva cuando se observaron zonas de inhibición de crecimiento con un diámetro igual o superior a 10 mm de diámetro, tal como se muestra los radios de inhibición en la tabla 20. Los resultados de este estudio mostraron que los mayores halos de inhibición fueron presentados por el EEO para los microorganismos *E. coli*, *S. aureus* y *Salmonella ssp.*, usados a las concentraciones obtenidas de 0.5 unidades de la escala de Mc Farland (tabla 19). La inhibición se muestra en el siguiente orden; EEO > microdyn > NaOCl > EAO.

Tabla 19. Radio de inhibición de los antimicrobianos mediante el método de difusión de disco.

Antimicrobiano	<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>			<i>Salmonella ssp.</i>		
		Inhibición (mm)	Inhibición (mm)	Inhibición (mm)	Inhibición (mm)	Inhibición (mm)	Inhibición (mm)	Inhibición (mm)	Inhibición (mm)
EAO	10%	6± 0.0	9± 0.0	7± 0.0					
	15%	7.5± 0.0	9.5± 0.0	6± 0.0					
	20%	7.5± 0.0	9.5± 0.0	7± 0.0					
EEO	10%	13.5 ± 0.7	12.5 ± 2.1	15 ± 0.0					
	15%	14.5 ± 0.7	15 ± 0.0	15.5 ± 0.7					
	20%	14.5 ± 0.7	16.5 ± 0.07	14.5 ± 0.7					
NaOCl (300ppm)		6 ± 0.0	9.5 ± 0.7	6 ± 0.0					
Microdyn		10 ± 0.0	9.8 ± 0.4	9.5 ± 0.7					

(-) El diámetro de la zona de inhibición menor que 10 mm (Resistente). (+) El diámetro de la zona de inhibición igual o superior a 10 mm (sensible).

Para los EAO los resultados revelaron que las bacterias del tipo Gram-negativas fueron resistentes a las diferentes concentraciones (10, 15 y 20%) evaluadas, observándose una baja inhibición en los halos. Sin embargo, se observó un efecto más pronunciado (9-9.5 mm) para la bacteria Gram-positiva, específicamente *S. aureus*. Este comportamiento fue similar al observado en el NaOCl. La diferencia de sensibilidad entre los dos grupos de bacterias se debe a que las bacterias Gram-negativas poseen una membrana externa y un espacio periplásmico único que no se encuentra en las bacterias Gram-positivas, lo cual las hace más sensibles a los extractos de especias y hierbas (Ceylan & Fung, 2004; Radha krishnan et al., 2014). Saeed & Tariq (2009), al utilizar una infusión de orégano y su respectivo aceite esencial, observaron que ambos mostraron actividad antibacteriana contra aislados bacterianos Gram-positivos pertenecientes a 23 especies diferentes entre las que se encontraba *S. aureus*. En contraste, Martins et al. (2014) al utilizar una infusión y decocción de orégano a una concentración menor (20 mg/mL), observaron una inhibición moderada para *E. coli* y *P. aeruginosa*, pero nula inhibición para *S. aureus*, esto puede ser atribuido a la alta variabilidad que se puede presentar en la composición química de los diferentes extractos.

Por otra parte, el microbicida microdyn, fue uno de los más efectivos con un efecto

de inhibición alrededor de los 10 mm contra los tres tipos de bacterias, esto debido a su compuesto activo a base de plata ionizada estable.

En el presente estudio, el extracto etanólico fue capaz de inhibir el crecimiento de la mayoría de las bacterias, tanto Gram-positivas como Gram-negativas a diferentes concentraciones de orégano (10, 15 y 20%) ensayadas. El extracto etanólico fue rico en fenoles totales y eso podría explicar su actividad. Los halos de inhibición para *E. coli*, *S. aureus* y *Salmonella spp.*, fueron de 13.5-14.5 mm, 12.5-16.5 mm y 14.5-15.5 mm, respectivamente, siendo mayores que los obtenidos en el extracto acuoso, tal como se puede observar en la figura 18. Resultados de Chun et al. (2005) mostraron que los extractos etanólicos de dos muestras de orégano (*O. vulgare* comercial y clonado) presentaron una mayor inhibición contra *H. pylori* ATCC 43504 respecto a los acuosos, atribuyendo al orégano clonado una mayor eficiencia por presentar una mayor concentración de fenoles.

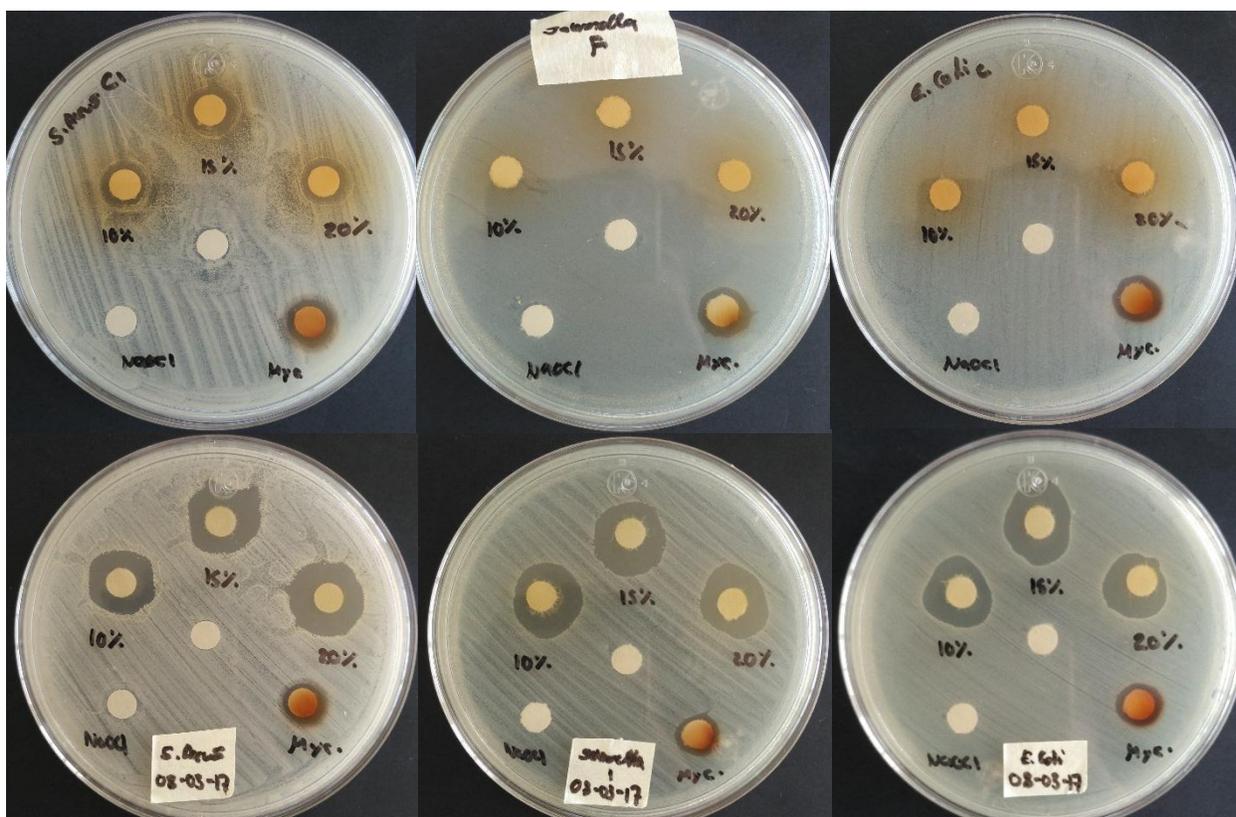


Figura 18. Técnica de difusión de disco en extracto acuoso (arriba) y etanólico (debajo) en los tres tipos de bacterias. De izquierda a derecha; *S. aureus*, *Salmonella spp.*, y *E. coli*.

Los diámetros de inhibición obtenidos en el presente estudio fueron menores a los observados por Al-Joboury (2015), quien reporta zonas de inhibición superiores a los 25 mm para los tres tipos de bacterias empleadas, utilizando una concentración de 100 mg/mL de extracto crudo de orégano. Esta diferencia puede atribuirse al tipo de extracción empleada, ya que es aceptado que las variaciones antibacteriales que presentan diferentes extractos/aceites se deben al perfil polifenólico, y metodologías utilizadas para evaluar sus actividades biológicas (Rodríguez Triviño, 2015).

Esta mayor eficiencia en el extracto etanólico de orégano, también fue reportado por Teixeira et al. (2013), quien observó que el extracto etanólico de *O. vulgare* y el aceite esencial mostraron propiedades antibacterianas en diferentes cepas bacterianas entre las que se encontraba *E. coli* y *S. typhimurium* (1 mm y 2mm de inhibición), aunque fueron más fuertes con el aceite esencial (29 mm y 32 mm de inhibición). Esta observación confirma la evidencia de que el aceite esencial contiene una mayor cantidad de sustancias antimicrobianas que otros extractos en agua, alcohol o metanol (Şahin et al., 2004), en donde el carvacrol y timol afectan más fácilmente la composición de mureína y las paredes celulares de las cepas bacterianas.

Teniendo en cuenta las diferentes proporciones de orégano utilizados en la prueba, se observó que la concentración de 150 mg/mL de orégano (15%) mostró un efecto de inhibición mayor a los obtenidos a una concentración de 100 mg/mL (10%), no existiendo diferencia significativa con la concentración mayor de 200 mg/mL (20%). Por consiguiente, el EEO a una concentración del 15% se consideró para ser incorporado en el recubrimiento a aplicar en la matriz alimentaria con las características observadas de la formulación 3 de las PC, ya justificada anteriormente. Sin embargo, ya que la grenetina, componente de la película, no es totalmente soluble en etanol, se ensayaron diferentes ratios agua: etanol (70:30, 50: 50, 30: 70). La selección se inclinó por la proporción con mayor porcentaje de etanol que no viera disminuido el efecto antimicrobiano mostrado en el ensayo, y mostrara una solubilidad correcta del componente. Por lo que la proporción 50: 50 fue la que se eligió, ya que al emplear un ratio donde el etanol se encontraba en mayor proporción (30: 70), la grenetina aún mostró ser insoluble.

4.4 EVALUACIÓN DE LA VIDA DE ANAQUEL EN FILETES DE CARPA COMÚN CON UN RECUBRIMIENTO COMESTIBLE INCORPORADO CON FIBRA DE CÍTRICOS Y EXTRACTO ETANÓLICO DE ORÉGANO (*Origanum vulgare* L.)

El recubrimiento elaborado en este estudio fue el resultado de ensayos preliminares, en donde el EEO tuvo una mayor inhibición microbiana. Éste se adicionó en una proporción 1:1 con agua y se identificó como recubrimiento más extracto etanólico de orégano (R+EEO). De igual forma se elaboró el recubrimiento sin extracto (R) a la misma base de suero de leche, gelatina, fibra de cítricos, glicerol y agua.

El efecto de los recubrimientos antes mencionados se evaluó en los filetes de carpa común así como el respectivo control (sin recubrimiento). En primer lugar, se efectuó la evaluación de sus propiedades fisicoquímicas, dónde se ensayó el pH, acidez, capacidad de retención de agua (CRA) y las correspondientes propiedades ópticas. Consecutivamente se efectuaron los análisis microbiológicos respecto a tres tipos de bacterias como *E. coli*, *Salmonella spp.*, y *S. aureus*. Por último, se evaluaron los cambios en la calidad de los filetes de carpa a través de la degradación proteica y lipídica, en esta parte del experimento se ensayó la electroforesis, contenido de proteínas carboniladas (PCC) y lipoperoxidación (LPX) a los 0, 3, 6 y 9 días de tratamiento correspondiente.

4.4.1 Evaluación de variables fisicoquímicas en filetes de carpa común (*Cyprinus carpio*)

Los resultados de las propiedades físicas evaluadas en los diferentes tratamientos se muestran en la tabla 20.

La disminución post mortem en el pH del músculo de pescado tiene un efecto en las propiedades físicas del músculo, ya que a un determinado valor de este parámetro la actividad de cada microorganismo y enzima aumenta. Los valores iniciales de pH del control, R, y R+EEO fueron $7.03 \pm 0,01$, $6.87 \pm 0,13$ y $7.02 \pm 0,08$, respectivamente. Durante el almacenamiento en refrigeración a 4°C, el pH para todas las muestras inicialmente disminuyó y aumentó gradualmente después del día

6. La disminución en el valor del pH podría ser atribuible a la generación de ácido láctico durante la glucólisis anaeróbica en el músculo del pez, mientras que el aumento en el pH fue causado por componentes alcalinos como el amoníaco y la trimetil-amina, producidos por las bacterias de la descomposición (Abdollahi, Rezaei, & Farzi, 2014; Song et al., 2010). Similares observaciones fueron reportadas por Moosavi-Nasab et al. (2016) al utilizar un recubrimiento de quitosano con aceite esencial de pimienta negra en carpa común (*Cyprinus carpio*). Al evaluar este parámetro durante el almacenamiento mediante un análisis de varianza ANOVA, se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) sólo para el control del día cero (C 0); recubrimiento más extracto del día 0 (R+EEO 0), recubrimiento del día 6 (R 6) y recubrimiento más extracto del día 6 (R+EEO 6), no habiendo diferencia con el resto de las muestras, lo que nos indicaría que, sin importar el tratamiento, el pH no varía significativamente. Sin embargo, tal como se muestra en la tabla 13, los valores de pH de las muestras recubiertas con el R y R+EEO fueron menores que el control, lo que podría estar relacionado con las propiedades antimicrobianas del recubrimiento (suero de leche y fibra) y el extracto etanólico de orégano.

Tabla 20. Propiedades físicas de los filetes evaluadas en los diferentes tratamientos.

Muestra	pH	Acidez	CRA
C 0	7.03 ± 0,01 ^b	0.47 ± 0,08 ^{ab}	7.67 ± 0,5 ^{ef}
C 3	6.80 ± 0,16 ^{ab}	0.65 ± 0,07 ^{bcd}	7.2 ± 1,27 ^{def}
C 6	6.69 ± 0,47 ^{ab}	0.75 ± 0,2 ^{cdef}	6.25 ± 1.56 ^{def}
C 9	6.85 ± 0,11 ^{ab}	0.95 ± 0,2 ^f	3.47 ± 0.81 ^a
R 0	6.87 ± 0,13 ^{ab}	0.43 ± 0,06 ^a	8.00 ± 0,0 ^f
R 3	6.85 ± 0,19 ^{ab}	0.72 ± 0,11 ^{cde}	7.32 ± 1,18 ^{def}
R 6	6.64 ± 0,17 ^a	0.74 ± 0,10 ^{cde}	5.57 ± 1,40 ^{bcd}
R 9	6.79 ± 0,10 ^{ab}	0.76 ± 0,02 ^{def}	4.45 ± 1,10 ^{abc}
R+EEO 0	7.02 ± 0,08 ^b	0.54 ± 0,11 ^{abc}	8.00 ± 0,0 ^f
R+EEO 3	6.93 ± 0,07 ^{ab}	0.72 ± 0,09 ^{cde}	6.65 ± 0,44 ^{def}
R+EEO 6	6.64 ± 0,23 ^a	0.77 ± 0,03 ^{def}	6.07 ± 0,95 ^{cde}
R+EEO 9	6.73 ± 0,13 ^{ab}	0.87 ± 0,06 ^{ef}	4.28 ± 0,55 ^{ab}

Los valores son promedios ± SD (n =3). Donde C=control, R=recubrimiento y R+EEO= Recubrimiento más extracto. Las diferentes letras en la misma columna indican diferencia significativa ($P < 0.05$), de acuerdo con la prueba de Duncan.

Con respecto a la acidez, se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) al transcurrir el tiempo de almacenamiento, lo que puede deberse a la producción de ácidos orgánicos por los microorganismos a partir de los aminoácidos como la cisteína y metionina, entre otros, sin embargo, este incremento no es significativo en el día de tratamiento, es decir, que para el día 0 no hay diferencia entre los tres tratamientos, así respectivamente con el resto de los días. También se puede observar que existe una relación inversamente proporcional con el pH, es decir, al transcurrir el tiempo la acidez aumentó, mientras el pH disminuyó hasta el día de tratamiento 6. El intervalo de acidez para las muestras control fue de 0.47–0.95%, para las muestras con R de 0.43–0.7%, mientras que para las muestras de R+EEO obtuvieron un valor de 0.54–0.87%.

En cuanto a la CRA, el análisis estadístico indicó diferencias significativas ($p < 0.05$) para los diferentes tratamientos al transcurrir el tiempo de almacenamiento, observándose una disminución progresiva para todas las muestras durante el almacenamiento, oscilando entre 7.67–3.47, 8.0–4.45, 8.0–4.28 mL de NaCl para control, R y R+EEO, respectivamente. Esto se debe a que una disminución en el pH reduce la carga neta de la superficie de las proteínas musculares, causando su desnaturalización parcial y disminuyendo su capacidad de enlazar agua (Huss, 1999). El R y R+EEO disminuyó la pérdida de agua en las muestras de filete durante los días 0 y 9, sin embargo, esta diferencia no fue significativa ($p < 0.05$), es decir, que para el día 0 y 9 no existió diferencia entre los tratamientos, siendo igual con el resto de los días. Para el caso del R+EEO poco o ningún exudado de las muestras recubiertas era visible, lo cual es un atributo importante ya que su presencia no es atractiva para el consumidor (Vital et al., 2016).

4.4.1.1 Evaluación de las propiedades ópticas

Para el caso del color, la variable L, que es la luminosidad, los resultados se encontraron en un intervalo de 44.73 a 51.74, tal como se muestra en la tabla 21, no existiendo diferencia significativa ($p < 0.05$) para las diferentes muestras. Esto

podría suponerse, ya que las PC caracterizadas previamente, mostraron valores altos de luminosidad, por lo que la adición del recubrimiento y recubrimiento más extracto, no afecta este parámetro.

Tabla 21. Propiedades de color en los filetes evaluados en los diferentes tratamientos.

Muestra	L*	a*	b*
C 0	47.67 ± 2.74 ^{abc}	4.75 ± 1.12 ^{abc}	9.03 ± 0.78 ^{ab}
C 3	48.15 ± 2.12 ^{abc}	4.28 ± 3.21 ^{abc}	7.1 ± 1.12 ^a
C 6	45.52 ± 0.96 ^{abc}	6.47 ± 1.54 ^{bc}	9.54 ± 3.25 ^{ab}
C 9	50.78 ± 5.41 ^{bc}	7.85 ± 0.55 ^c	12.83 ± 1.67 ^{bc}
R 0	51.74 ± 3.32 ^c	6.18 ± 1.78 ^{bc}	10.87 ± 2.56 ^{abc}
R 3	44.73 ± 3.36 ^{ab}	6.34 ± 1.64 ^{bc}	10.71 ± 3.35 ^{abc}
R 6	49.19 ± 4.16 ^{bc}	4.84 ± 0.6 ^{abc}	10.6 ± 2.08 ^{abc}
R 9	41.97 ± 2.06 ^a	7.57 ± 2.1 ^c	10.22 ± 2.45 ^{ab}
R+EEO 0	47.22 ± 4.53 ^{abc}	2.47 ± 3.31 ^{ab}	17.1 ± 1.77 ^{de}
R+EEO 3	49.68 ± 3.50 ^{bc}	0.97 ± 3.3 ^a	18.51 ± 1.20 ^e
R+EEO 6	48.46 ± 1.0 ^{bc}	1.82 ± 2.93 ^a	14.46 ± 2.13 ^{cd}
R+EEO 9	47.41 ± 2.70 ^{abc}	1.59 ± 0.15 ^a	13.09 ± 1.1 ^{bc}

Los valores son promedios ± SD (n =3). Donde C=control, R=recubrimiento y R+EEO= Recubrimiento más extracto. Las diferentes letras en la misma columna indican diferencia significativa (P < 0.05), de acuerdo con la prueba de Duncan.

Con respecto a las coordenadas cromáticas a* y b*, los valores presentaron diferencia significativa (p<0.05) para los diferentes tratamientos, mostrando en el caso de a*, un comportamiento positivo (0.97 a 7.85), que indica una coloración con tendencia al rojo, mientras que para la variable b*, los valores presentaron un comportamiento positivo de igual forma (9.03 a 18.51), lo que indica una coloración con tendencia al amarillo. En el caso del control y R presentaron similitudes en las variables, mientras que el R+EEO que tiene los valores más pequeños de a*, la tendencia es hacia un color rojo menos intenso, y para b* un amarillo más opaco, por lo que, considerando las 3 variables, las muestras presentaron una coloración rojo claro (fig.19).

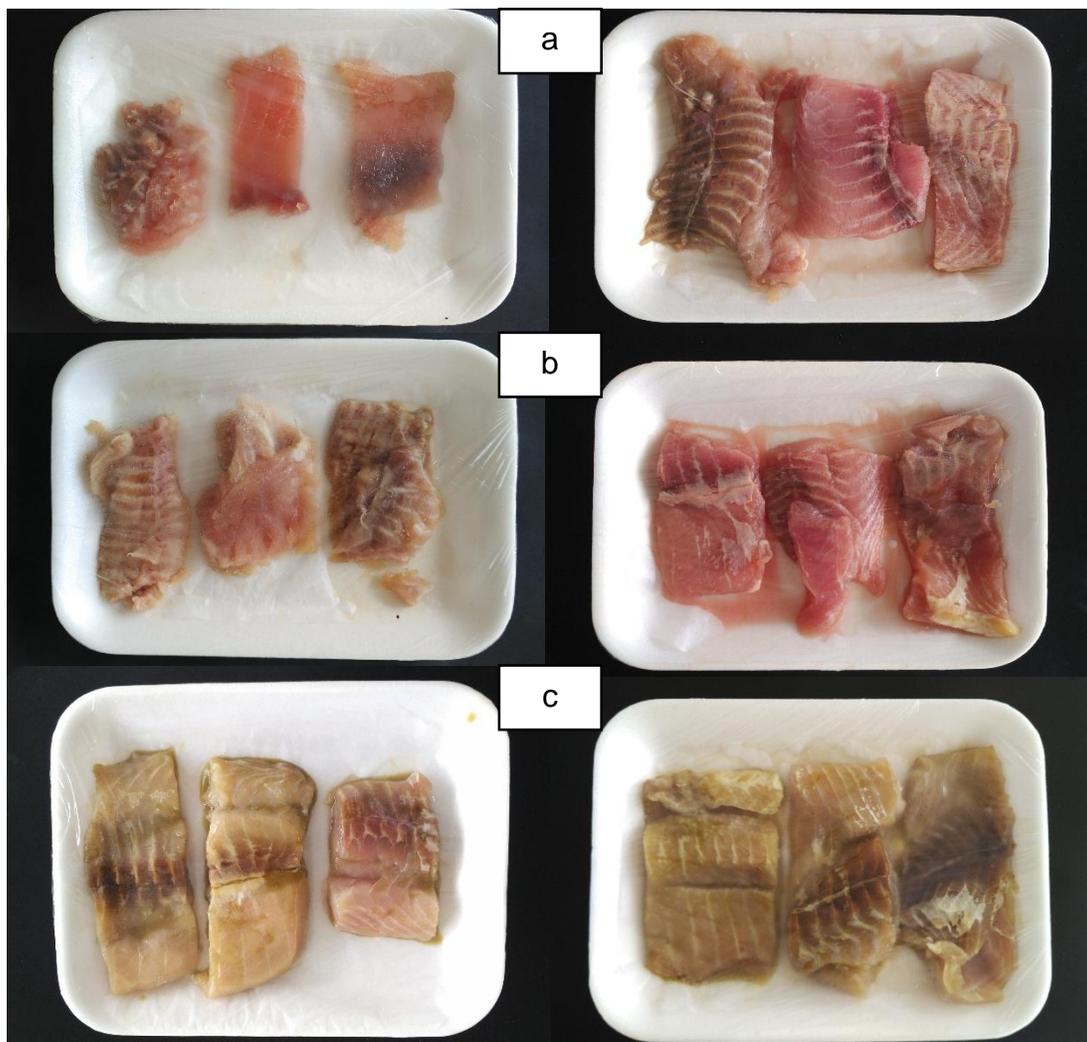


Figura 19. Filetes de carpa común. a) Control, b) Recubrimiento y c) R+E. Día cero (izquierda) y día 9 (derecha).

4.4.3 Determinación microbiológica en los filetes de carpa común

En esta parte de la investigación resultó ser de gran importancia ya que la carga microbiana es un parámetro de las condiciones sanitarias con que se ha elaborado y manejado un producto, además refleja también la calidad de la materia prima que se ha empleado para su elaboración y es un indicativo de la probable vida útil que puede tener el alimento. Por lo anterior, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 22.

Tabla 22. Análisis microbiológico de los filetes de carpa común.

Parámetro	Fuente de origen
	Filete de carpa (<i>Cyprinus carpio</i>)
<i>E. coli</i>	Negativo
<i>Salmonella</i>	Presencia

Los resultados muestran que en el caso de la bacteria *E.coli*, la cual se evaluó sólo por presencia en las muestras, no fue detectada.

Por otra parte, fue aislada *Salmonella spp.*, en todas las muestras evaluadas para los diferentes días, sin excepción alguna del tratamiento utilizado; con recubrimiento y recubrimiento más extracto, así como el respectivo control. A pesar de que el ensayo antimicrobiano previo mostró resultados positivos contra este tipo de bacteria, al incorporar a una matriz alimentaria como los filetes de carpa esta inhibición no se observó, en parte pudiera ser que la disminución de la proporción del volumen de etanol utilizada viera afectada negativamente el efecto antimicrobiano de la película. Este tipo de comportamiento se podría atribuir también al manejo sanitario que recibió la materia prima, en este caso el pescado fresco en el lugar de la post-cosecha, donde *Salmonella* es un microorganismo común de la flota intestinal de los animales, o bien a la contaminación ocasionada durante el fileteado ya que este microorganismo puede permanecer en la superficies de los equipos, utensilios y contaminar la materia prima (Quiñones et al., 2000; Rodríguez Triviño, 2015).

En lo que respecta a *S. aureus*, al contabilizar el número de colonias para los diferentes tratamientos, el número de colonias se expresó como porcentaje de inhibición, en donde las colonias de la muestra control se tomaron como el 100%, expresándose como el 0% de inhibición, con respecto a los tratamientos con el recubrimiento. En la figura 20 se presenta el porcentaje de inhibición al utilizar los dos tratamientos; R y R+EEO. La incorporación del R y el R+EEO presentaron un porcentaje de inhibición significativo ($p < 0.05$), con respecto al control, observándose que el R+EEO presentó un efecto de inhibición superior al del R sin extracto para los diferentes días. Esto se debe a las propiedades antimicrobianas relacionadas a

los componentes fenólicos del orégano debilitan la carga microbiana, además al ser *S. aureus* una bacteria Gram-positiva, esta presenta mayor susceptibilidad por no presentar una membrana externa y un espacio periplásmico como en el caso de las Gram-negativas (Ceylan & Fung, 2004; Radha krishnan et al., 2014).

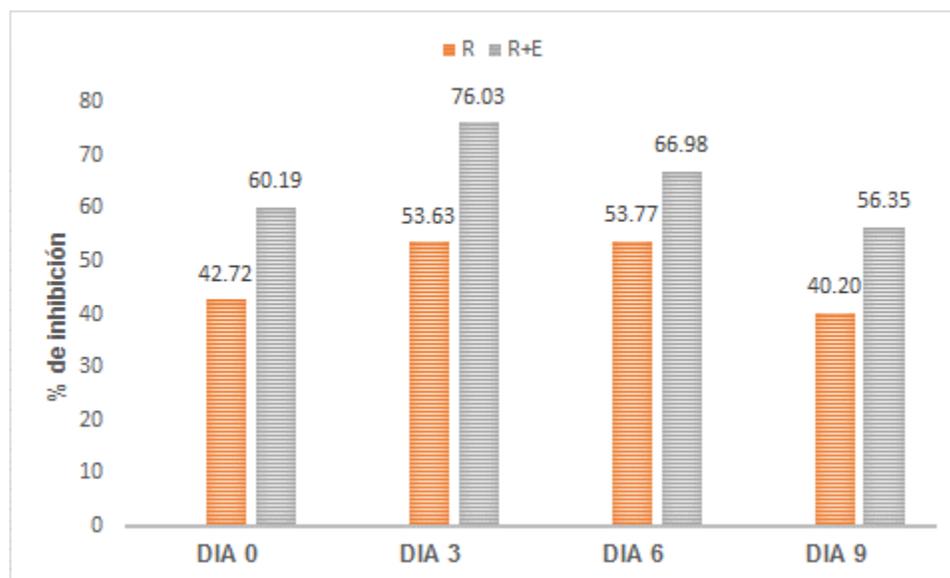


Figura 20. Efecto de inhibición de los recubrimientos sobre *S. aureus*.

4.4.2 Electroforesis desnaturizante

En la figura 21 se muestra el perfil de pesos moleculares mediante la SDS-PAGE de las muestras de filete de carpa a diferentes tratamientos durante el almacenamiento.

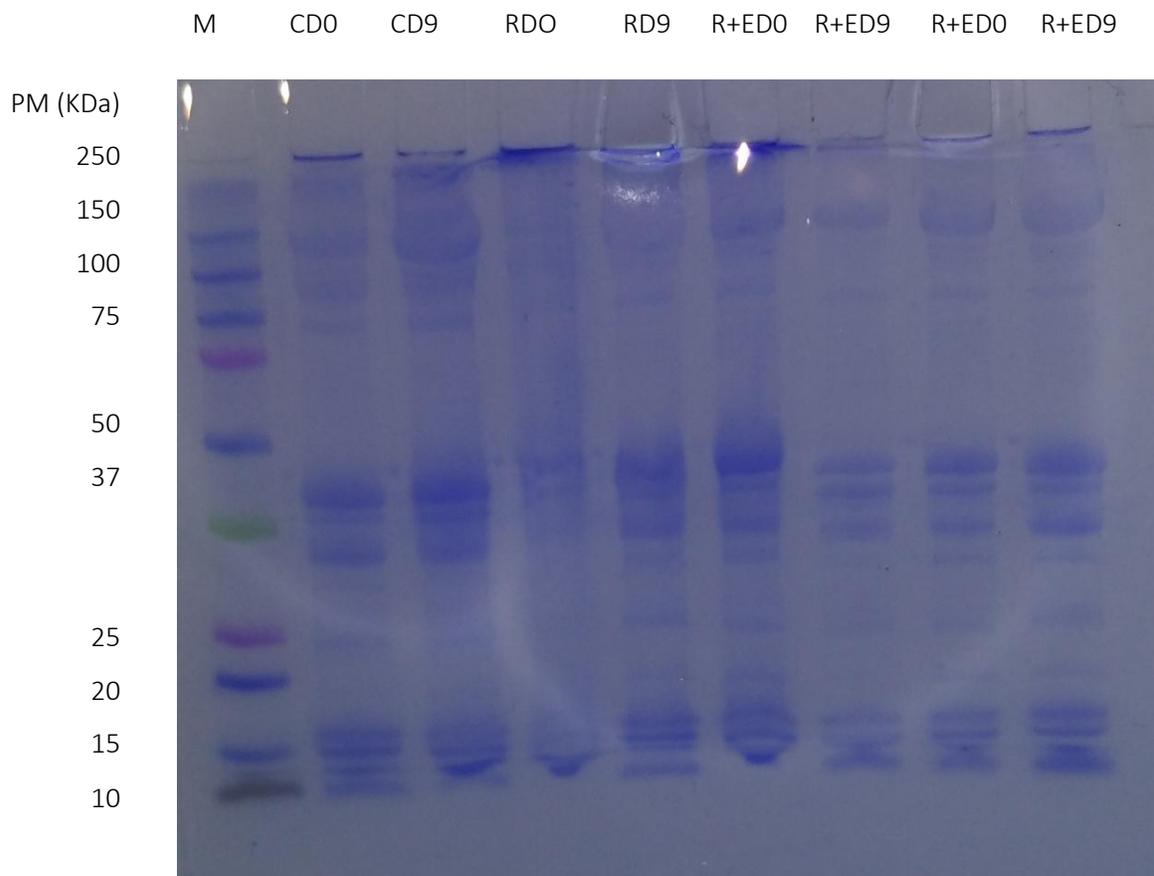


Figura 21. SDS-PAGE de filetes de carpa común (*Cyprinus carpio*) almacenados a 4°C. M; Estándar de peso molecular conocido. C; control, R; recubrimiento y R+E; recubrimiento + extracto. DX; día de tratamiento

Al transcurrir el tiempo de almacenamiento, se observa una disminución de la miosina, principal proteína que es susceptible a la oxidación, desnaturalización e hidrólisis, formándose péptidos de bajo peso molecular. La muestra que presenta el recubrimiento, mostró un efecto protector ya que la disminución de la miosina se observa en menor grado, retardando así la degradación de los componentes proteicos del pescado. Este efecto también fue observado por Morachis-Valdez et al. (2017) para la misma especie aplicando una película a base de quitosano bajo condiciones de almacenamiento a bajas temperaturas.

4.4.4 Evaluación del estrés oxidativo en filetes de carpa común

A continuación, se muestran los cambios que se llevaron a nivel proteico y lipídico

en los filetes de carpa común a los diferentes días de tratamiento correspondiente.

La oxidación de lípidos en el pescado está influenciada por varios factores como el contenido de grasa, el grado de microsoma asociado con el sistema de oxidación, el contenido del grupo hemo y la presencia de iones (Morachis-Valdez et al., 2017). Los resultados de lipoperoxidación se muestran en la figura 22. Se observó un menor grado de LPX con respecto al grupo control en la muestra con recubrimiento y recubrimiento más extracto, excepto para el día 3, en el cual el R+E fue mayor con respecto al control. Los recubrimientos con fibra y extracto de orégano actúan como barreras que impiden el intercambio de gases, una vez que se aplican directamente sobre la superficie, impidiendo y/o retardando que los ácidos grasos poliinsaturados con dobles enlaces reaccionen con el radical hidroxilo (HO) y el peroxinitrito RNS (ONOO-), a través de un mecanismo de reacción en cadena.

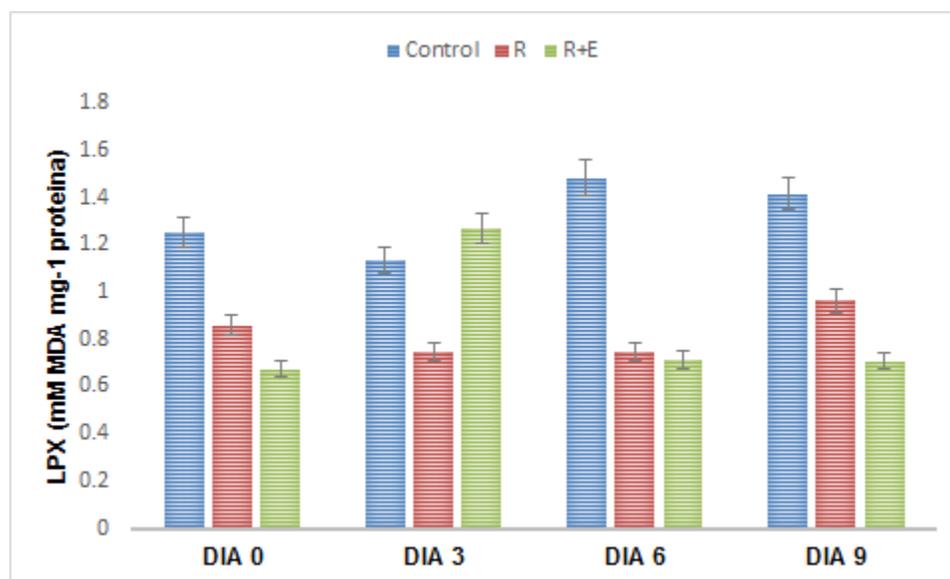


Figura 22. Lipoperoxidación (LPX) en filetes de *Cyprinus carpio* a distintos tratamientos durante el almacenamiento a 4°C por 9 días.

La oxidación de las proteínas se asocia con la disminución de los grupos sulfhidrilo, cuyo producto se convierte en grupos disulfuro. Los resultados de PCC se muestran

en la Figura 23. Se observó una reducción significativa con respecto al grupo de control ($P < 0.05$) en la muestra con recubrimiento y muestra con recubrimiento más extracto. Los niveles de carbonilación de proteínas fueron significativamente más altos en las muestras control, lo que indica que los filetes de carpa sufrieron estrés oxidativo como resultado de la exposición a una temperatura de refrigeración sin algún tipo de recubrimiento. Se sabe que las proteínas son atacadas por especies de oxígeno reactivo (ROS), cuya interacción induce la formación de grupos carbonilo y la pérdida de grupos sulfhidrilo que afectan a las propiedades estructurales, funcionales y nutricionales en el pescado, por lo que el uso del recubrimiento y recubrimiento + extracto de orégano vio reducido los posibles efectos mencionados.

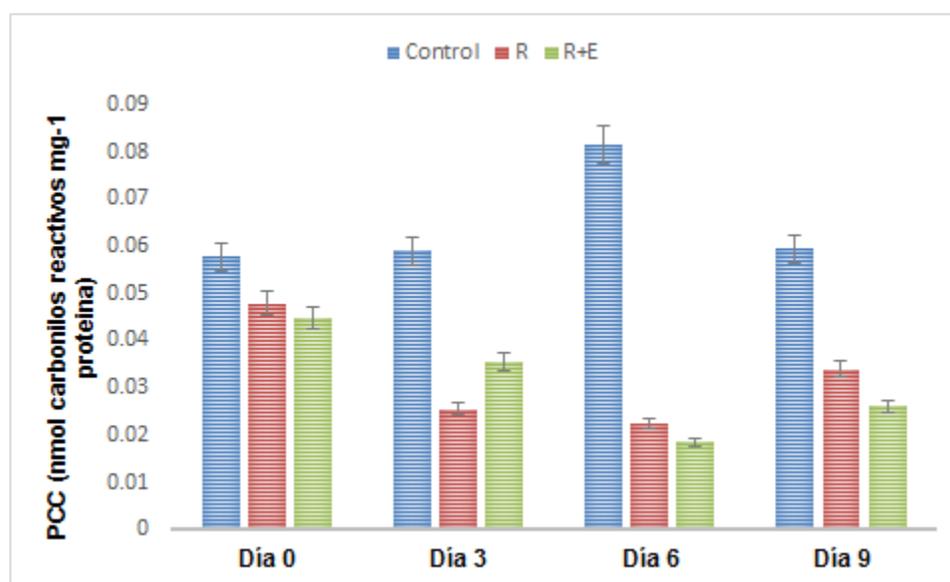


Figura 23. Contenido de proteínas carboniladas (PCC) en filetes de *Cyprinus carpio* a distintos tratamientos durante el almacenamiento a 4°C por 9 días.

CONCLUSIONES

La cáscara de naranja resultó ser una buena fuente de RF cuyas condiciones óptimas fueron 60°C durante 6h con contenido de humedad final del 4.24%.

Fue posible la obtención de películas biodegradables, elaboradas a base fibra de cáscara de naranja como un residuo agroindustrial en combinación con suero de leche, gelatina y glicerol como plastificante.

Las propiedades físicas y mecánicas de las películas obtenidas fueron aceptables, y dependieron de la concentración e interacción de los componentes. Las propiedades mecánicas indicaron que un incremento en la concentración de fibra y gelatina incremento el módulo de Young, la resistencia a la ruptura, y la elongación.

El análisis de color demostró que el suero de leche modifica esta propiedad, ya que, a mayor proporción de suero, las películas se iban tornando menos translúcidas.

Se observó que el orégano (*Origanum vulgare* L.) mostró un alto contenido de compuestos fenólicos totales, así como una alta actividad antioxidante.

Se determinó que el extracto etanólico de *O. vulgare* a una concentración de 150 mg/mL (15%) fue más eficiente que las otras concentraciones.

Las muestras con tratamientos diferentes no mostraron diferencias significativas para las variables fisicoquímicas, mientras que los tratamientos con recubrimiento presentaron una inhibición mayor respecto al control en *S. aureus*.

Se comprobó que durante el tiempo de almacenamiento existió una mayor degradación de miosina cuando la muestra no contenía algún tratamiento. De igual forma ocurrió para lipoperoxidación y proteínas carboniladas

RECOMENDACIONES

Es conveniente evaluar en la fibra obtenida, sus propiedades funcionales; la capacidad de retención de agua, la capacidad de retención de lípidos y la capacidad de hinchamiento. Tales propiedades pueden ayudar a valorar la calidad de la fibra resultante de la deshidratación.

Al caracterizar las diferentes películas, sería conveniente considerar el análisis de permeabilidad al vapor de agua para observar el grado de permeabilidad en las películas frente al vapor de agua y otro tipo de gases, así como también un análisis de microscopía electrónica de barrido para observar y comprender la interacción de los diversos componentes a un nivel microestructural en la matriz de la película comestible.

Realizar un estudio en el cual se pueda saber el porcentaje de absorción que tiene el alimento sobre el recubrimiento aplicado.

REFERENCIAS

1. Abdollahi, M., Rezaei, M., & Farzi, G. (2014). Influence of chitosan/clay functional bionanocomposite activated with rosemary essential oil on the shelf life of fresh silver carp. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(3), 811–818. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12369>
2. Adebowale, B. A., Dongo, L. N., Jayeola, C. O., & Orisajo, S. B. (2008). Comparative Quality Assessment of Fish (*Clarias gariepinus*) Smoked with Cocoa Pod Husk and Three Other Different Smoking Materials. *Journal of Food Technology*, 6: 5-8. <https://doi.org/10.3923/jftech.2008.5.8>
3. Aguilar-Martínez, J. (2007). *Determinacion pesticidas organoclorados en Cyprinus Carpio Linnaeus, 1758, del lago de Tecocomulco, Hidalgo* (Licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo.
4. Alfaro, R. M., Ramírez-Martínez, C., González, C. A., & del Castillo, M. E. M. (2014). Principales vías de introducción de las especies exóticas. *Mendoza, R. & Koleff, P.(coords.) Especies acuáticas invasoras em México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México*, 43–73.
5. Al-Joboury, M. A. (2015). Effect of crude extract of *Origanum vulgare* on the inhibition of some pathogenic bacteria and causing spoilage of food. *Al-Anbar Journal of Veterinary Sciences*, 8(2), 6.
6. Almarcha Agulló, R. (2016). Estudio de subproductos para alimentación animal en la Vega Baja. Recuperado a partir de <http://dspace.umh.es/bitstream/11000/2819/1/TFM%20Almarcha%20Agull%C3%B3,%20Rafael.pdf>

-
7. Alvarez, E. C., & Chamorro, R. A. M. (2009). Obtención de Fibra Insoluble a Partir de Cáscaras de Naranja (*Citrus sinensis*). *Revista de Investigación Universitaria*, 1(1). Recuperado a partir de <http://revistascientificas.upeu.edu.pe/index.php/riu/article/view/8>
8. Amarowicz, R., Żegarska, Z., Rafałowski, R., Pegg, R. B., Karamać, M., & Kosińska, A. (2009). Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of ethanolic extracts of thyme, oregano, and marjoram. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(11), 1111–1117. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200800170>
9. Ancos, B. de, González-Peña, D., Colina Coca, C., & Sánchez-Moreno, C. (2015). Uso de películas/recubrimientos comestibles en los productos de IV y V gama. Recuperado a partir de <https://digital.csic.es/handle/10261/139238>
10. Anguera Vilà, A., Solà Alberich, R. M., Universitat Rovira i Virgili, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de Reus, Universitat Rovira i Virgili, & Departament de Medicina i Cirurgia. (2007). *Efectos de la fibra soluble cáscaras de Plantago ovata sobre factores lipídicos de riesgo cardiovascular tesis doctoral*. Tarragona: Universitat Rovira i Virgili. Recuperado a partir de <http://www.tdx.cat/TDX-0801107-112545/>
11. Arham, R., Mulyati, M. T., Metusalach, M., & Salengke, S. (2016). Physical and mechanical properties of agar based edible film with glycerol plasticizer. *International Food Research Journal*, 23(4).
12. Arvanitoyannis, I. S., & Kasaveti, A. (2008). *Consumer attitude to food packaging and the market for environmentally compatible products*. <https://doi.org/10.1533/9781845694784.2.161>
13. Bayer, I. S., Guzman-Puyol, S., Heredia-Guerrero, J. A., Ceseracciu, L., Pignatelli, F., Ruffilli, R., ... Athanassiou, A. (2014). Direct Transformation of Edible Vegetable

-
- Waste into Bioplastics. *Macromolecules*, 47(15), 5135–5143.
<https://doi.org/10.1021/ma5008557>
14. Berkel, B. M., Boogaard, B. V. D., & Heijnen, C. (2004). *Preservation of fish and meat*. Wageningen, The Netherlands: Agromisa.
 15. Bertuzzi, M. A., & Slavutsky, A. M. (2016). Standard and New Processing Techniques Used in the Preparation of Films and Coatings at the Lab Level and Scale-Up. En *Edible Films and Coatings* (Vols. 1–0, pp. 1–23). CRC Press.
<https://doi.org/10.1201/9781315373713-2>
 16. Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 15(3), 237–248.
 17. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
 18. Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, 302–310.
 19. Burcham, P. C. (2007). Modified protein carbonyl assay detects oxidised membrane proteins: a new tool for assessing drug- and chemically-induced oxidative cell injury. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 56(1), 18–22.
<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2006.02.015>
 20. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
 21. Cagri, A., Ustunol, Z., & Ryser, E. T. (2004). Antimicrobial edible films and coatings. *Journal of food protection*, 67(4), 833–848.

-
22. Campos, C. A., Gerschenson, L. N., & Flores, S. K. (2011). Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 849–875. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0434-1>
23. CANILEC. (2011). *El Libro Blanco de la leche y sus productos lácteos* (1a ed., Vol. 1). México, D.F.: Autor. Recuperado a partir de http://www.canilec.org.mx/descarga_archivos_publico/Libro_Blanco_mail.pdf
24. Cádiz-Carrasco, M. G., Cumplido-Barbetia, L. G., Orduño-Fragoza, O., Corella-Madueño, M. A. G., Cádiz-Carrasco, M. G., Cumplido-Barbetia, L. G., ... Corella-Madueño, M. A. G. (2016). Estudio de las propiedades funcionales de mezclas de proteínas en un sistema modelo. *Acta universitaria*, 26(4), 3–11. <https://doi.org/10.15174/au.2016.970>
25. Carrillo, J. Luis. (2002). Tratamiento y reutilización del suero de leche. *Revista Con-versus IPN*, 10, 27–30.
26. Castro-González, M. I., Maafs-Rodríguez, A. G., & Pérez-Gil Romo, F. (2012). Evaluación de diez especies de pescado para su inclusión como parte de la dieta renal, por su contenido de proteína, fósforo y ácidos grasos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 62(2), 127–136.
27. Cerón-Salazar, I., & Cardona-Alzate, C. (2011). Integral evaluation process for obtaining pectin and essential oil from orange peel. *Ingeniería y Ciencia*, 7(13), 65–86.
28. Chamorro, R. A. M., & Mamani, E. C. (2015). Importancia de la fibra dietética, sus propiedades funcionales en la alimentación humana y en la industria alimentaria. *Revista de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1). Recuperado a partir de http://revistascientificas.upeu.edu.pe/index.php/ri_alimentos/article/view/362

-
29. Chun, S.-S., Vatter, D. A., Lin, Y.-T., & Shetty, K. (2005). Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry*, 40(2), 809–816. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.02.018>
30. COFECE. (2015). *Reporte sobre las condiciones de competencia en el sector agroalimentario* (p. 570). COFECE. Recuperado a partir de https://www.cofece.mx/cofece/images/Estudios/COFECE_reporte%20final-ok_SIN_RESUMEN_ALTA_RES-7enero.pdf
31. CONAPESCA. (2013). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. Recuperado a partir de http://www.conapesca.gob.mx/work/sites/cona/dgppe/2013/ANUARIO_ESTADISTICO_DE_ACUACULTURA_Y_PESCA_2013.zip
32. Danganan, K., Tomasula, P. M., & Qi, P. (2009). Structure and Function of Protein-Based Edible Films and Coatings. En *Edible Films and Coatings for Food Applications* (pp. 25–56). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1_2
33. Dave, D., & Ghaly, A. E. (2011). Meat spoilage mechanisms and preservation techniques: a critical review. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 6(4), 486–510.
34. de Andrade, C. S., Fonseca, G. G., Innocentini Mei, L. H., & Fakhouri, F. M. (2017). Development and characterization of multilayer films based on polyhydroxyalkanoates and hydrocolloids. *Journal of Applied Polymer Science*, 134(6). <https://doi.org/10.1002/app.44458>

-
35. de Moraes Crizel, T., Jablonski, A., de Oliveira Rios, A., Rech, R., & Flôres, S. H. (2013a). Dietary fiber from orange byproducts as a potential fat replacer. *LWT - Food Science and Technology*, 53(1), 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.02.002>
36. de Moraes Crizel, T., Jablonski, A., de Oliveira Rios, A., Rech, R., & Flôres, S. H. (2013b). Dietary fiber from orange byproducts as a potential fat replacer. *LWT - Food Science and Technology*, 53(1), 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.02.002>
37. Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J.-A., & Voilley, A. (1998). Edible Films and Coatings: Tomorrow's Packagings: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(4), 299–313. <https://doi.org/10.1080/10408699891274219>
38. Debeaufort, F., & Voilley, A. (2009). Lipid-Based Edible Films and Coatings. En *Edible Films and Coatings for Food Applications* (pp. 135–168). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1_5
39. Dehghani, S., Hosseini, S. V., & Regenstein, J. M. (2017). Edible films and coatings in seafood preservation: A review. *Food Chemistry*, 240, 505–513. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.034>
40. Denavi, G. A., Pérez-Mateos, M., Añón, M. C., Montero, P., Mauri, A. N., & Gómez-Guillén, M. C. (2009). Structural and functional properties of soy protein isolate and cod gelatin blend films. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2094–2101. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.03.007>
41. Dhall, R. K. (2016). Application of Edible Films and Coatings on Fruits and Vegetables. En *Edible Films and Coatings* (Vols. 1–0, pp. 361–390). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315373713-20>
42. Dublán-García, O. (2001). *Evaluación De La Actividad Proteolítica Del Manto Del Calamar Gigante (Dosidicus gigas)* (Tesis de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana, México, Distrito federal.

-
43. Dublán-García, O., Cruz-Camarillo, R., Guerrero-Legarreta, I., & Ponce-Alquicira, E. (2006). Effect of Refrigerated Storage on Proteolytic Activity and Physicochemical and Microstructural Properties of Giant Squid (*Dosidicus Gigas*) Mantle Muscle. *Journal of Muscle Foods*, 17(3), 291–310. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4573.2006.00051.x>
44. El Babili, F., Bouajila, J., Souchard, J. P., Bertrand, C., Bellvert, F., Fouraste, I., ... Valentin, A. (2011). Oregano: chemical analysis and evaluation of its antimalarial, antioxidant, and cytotoxic activities. *Journal of Food Science*, 76(3), C512-518. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02109.x>
45. Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I. P., Troganis, A., & Boskou, D. (2002). Antioxidant Activities and Phenolic Composition of Extracts from Greek Oregano, Greek Sage, and Summer Savory. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(19), 5294–5299. <https://doi.org/10.1021/jf020408a>
46. Fakhouri, F. M., Martelli, S. M., Caon, T., Velasco, J. I., & Mei, L. H. I. (2015). Edible films and coatings based on starch/gelatin: Film properties and effect of coatings on quality of refrigerated Red Crimson grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 109, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.05.015>
47. Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A., & Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6), 292–303. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.02.004>
48. FAO. (2004). Programa de información de especies acuáticas. *Cyprinus carpio*. Recuperado el 18 de octubre de 2017, a partir de http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Cyprinus_carpio/es

-
49. FAO. (2013). Fisheries & Aquaculture - Visión general del sector acuícola nacional - México. FAO. Recuperado a partir de http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_mexico/es
50. FAO. (2015). *Pérdidas y Desperdicios de Alimentos en América Latina y el Caribe* (2a ed.). Roma: Autor. Recuperado a partir de <http://www.fao.org/3/a-i4655s.pdf>
51. FAO. (2016). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016*. Place of publication not identified: Food & Agriculture Org.
52. Fernández, G. J. M., Tudela, C. M., Caballero, S. B., González, M. M., & Madera, B. E. (2008). Generación de subproductos de la industria agroalimentaria: situación y alternativas para su aprovechamiento y revalorización. *Especial Alimentaria*, (08), 39–42.
53. Ferreira, M. S. L., Linhares, R., & Martelli, M. (2016). Films and Coatings from Agro-Industrial Residues. En *Edible Films and Coatings* (Vols. 1–0, pp. 193–214). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315373713-12>
54. FIAB. (2008). Oportunidades de mejora de la gestión ambiental en la industria alimentaria española. Autor. Recuperado a partir de http://www.fiab.es/archivos/documentomenu/documentomenu_20100422103009.pdf
55. Figuerola, F., Hurtado, M. L., Estévez, A. M., Chiffelle, I., & Asenjo, F. (2005). Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. *Food Chemistry*, 91(3), 395–401.
56. Fraser, O., & Sumar, S. (1998). Compositional changes and spoilage in fish - an introduction. *Nutrition & Food Science*, 98(5), 275–279. <https://doi.org/10.1108/00346659810224208>

-
57. Galanakis, C. M. (Ed.). (2015). *Food waste recovery: processing technologies and industrial techniques*. London, UK ; San Diego, CA, USA: Academic Press is an imprint of Elsevier.
58. Gallego, M. R. (2006). Producción más limpia en la industria alimentaria. Recuperado a partir de <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/handle/10567/217>
59. Galus, S., & Kadzińska, J. (2015). Food applications of emulsion-based edible films and coatings. *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 273–283. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.011>
60. Galus, S., & Kadzińska, J. (2016). Moisture Sensitivity, Optical, Mechanical and Structural Properties of Whey Protein-Based Edible Films Incorporated with Rapeseed Oil. *Food Technology and Biotechnology*, 54(1), 78–89. <https://doi.org/10.17113/ftb.54.01.16.3889>
61. Garau, M. C., Simal, S., Rosselló, C., & Femenia, A. (2007). Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium* v. Canoneta) by-products. *Food Chemistry*, 104(3), 1014–1024. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.009>
62. García Luján, C., Martínez, A., Ortega, J. L., & Castro, F. (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Química Viva*, 9(2). Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/html/863/86314868005/>
63. Garcia, M. P. M., Gómez-Guillén, M. C., López-Caballero, M. E., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2016). *Edible Films and Coatings: Fundamentals and Applications*. CRC Press.
64. García-Argueta, I., Dublán-García, O., Quintero-Salazar, B., Dominguez-Lopez, A., Gómez-Oliván, L. M., & Salem, A.-F. Z. (2013). Effect of lactic acid bacteria on the

-
- textural properties of an edible film based on whey, inulin and gelatin. *African Journal of Biotechnology*, 12(19).
65. García-Argueta, I., Salazar, B. Q., & Lopez, A. D. (2016). Effect of Edible Coating Based on Whey, Inulin and Gelatine with *Lactobacillus casei* on the Textural and Sensorial Properties of a Cracker Cookie. *Journal of Probiotics & Health*, 04(03).
<https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000153>
66. Ghaly, A. E., Dave, D., Budge, S., & Brooks, M. S. (2010). *Fish Spoilage Mechanisms and Preservation Techniques: Review* (Vol. 7).
67. Girón, J. M., Escué, C. F. D., & Rojas, L. M. (2015). Propiedades hidrodinámicas de la fibra dietaria a partir de harina de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*) y mango (*Mangifera indica* L). *Ingenium*, 9(26), 11–19.
68. Gómez-Estaca, J., Montero, P., Gimenez, B., & Gomez-Guillen, M. (2007). *Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (Sardina pilchardus)* (Vol. 105).
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.006>
69. Goncalves, de M. I., Vasconcelos, de S. A., Lemos, M. A. A. S., & Alves, M. A. V. (2016). Bioplastics from agrowastes for food packaging applications. En *Nanotechnology in the Agri-Food Industry Food Packaging* (Vol. 7, p. 42). Elsevier.
70. González-Martínez, K. (2010, junio 19). Productos Acuicolas. Recuperado el 17 de octubre de 2017, a partir de <https://materiasprimaspecuariasmyblog.wordpress.com/productos-acuicolas/>
71. Gram, L., & Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria – problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 262–266. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00309-9](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00309-9)

-
72. Greener-Donhowe, I., & Fennema, O. (1994). Edible films and coatings: characteristics, formation definitions and testing methods. En *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*. CRC Press.
73. Guato Guato, E. M. (2006). *Utilización de cáscaras de cítricos en la elaboración de mermelada de guayaba (Psidium guayaba L.)* (B.S. thesis). Recuperado a partir de <http://redi.uta.edu.ec/handle/123456789/3367>
74. Guerra, A. V. A., Castro, L. M. M., & Tovar, A. L. Q. (2013). Aprovechamiento del lactosuero como fuente de energía nutricional para minimizar el problema de contaminación ambiental. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 4(2), 55–66.
75. Guerrero, D. A. (1997). *Efecto de la densidad de siembra de juveniles del pargo amarillo Brjanlis argenliventris (Peters, 1869) cultivado en jaulas* (Maestría). Instituto Politecnico Nacional, La Paz, C.S.
76. Guilbert, S., Gontard, N., & Cuq, B. (1995). Technology and applications of edible protective films. *Packaging Technology and Science*, 8(6), 339–346.
77. Gutiérrez, E. L., Medina, G. B., Roman, M. O., Florez, O. A., & Martínez, O. L. (2002). Obtención y cuantificación de fibra dietaria a partir de residuos de algunas frutas comunes en Colombia. *Vitae*, 9(1). Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/pdf/1698/169818118001.pdf>
78. Gutiérrez-Avella, D. M., García, C. A. O., & Cisneros, A. M. (2008). Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. En *Memorias del Simposio de Metrología. Universidad Autónoma de Querétaro. Centro Nacional de Querétaro*.

-
79. Han, J. H. (2014). Chapter 9 - Edible Films and Coatings: A Review. En *Innovations in Food Packaging (Second Edition)* (pp. 213–255). San Diego: Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00009-6>
80. Hannibal, B., Antonio, S., Mercy, A., Evelyn, R., Paola, V., & Adriana, R. (2015). APROVECHAMIENTO DEL SUERO DE LECHE COMO BEBIDA ENERGIZANTE PARA MINIMIZAR EL IMPACTO AMBIENTAL. *European Scientific Journal, ESJ*, 11(26). Recuperado a partir de <http://www.eujournal.org/index.php/esj/article/view/6245>
81. Hansen, L. T., Gill, T., Røntved, S. D., & Huss, H. H. (1996). Importance of autolysis and microbiological activity on quality of cold-smoked salmon. *Food Research International*, 29(2), 181–188. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(96\)00003-8](https://doi.org/10.1016/0963-9969(96)00003-8)
82. Harper, B. A., Barbut, S., Lim, L.-T., & Marcone, M. F. (2013). Characterization of ‘wet’ alginate and composite films containing gelatin, whey or soy protein. *Food Research International*, 52(2), 452–459.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.041>
83. Hernández-Cázares, A. S., Real-Luna, N., Delgado-Blancas, M. I., Bautista-Hernández, L., & Velasco-Velasco, J. (2016). Residuos agroindustriales con potencial de compostaje.
84. Herrera-Vázquez, S. E. (2014). *Efecto de un recubrimiento comestible a base de suero de leche, inulina, gnetina y glicerol, sobre las características fisicoquímicas, texturales, y sensoriales de la fresa (fragaria vesca l.), durante su vida útil* (Maestría). Universidad Autónoma Del Estado De México, México.
85. Huss, H. H. (1999). *El Pescado Fresco: Su Calidad y Cambios de su Calidad* (Vol. Reimpresión). Rome, Italy: Food & Agriculture Org.

-
86. Irmak, S., & Erbatur, O. (2008). 11 - Additives for environmentally compatible active food packaging A2 - Chiellini, Emo. En *Environmentally Compatible Food Packaging* (pp. 263–293). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845694784.2.263>
87. Jiang, Y., Li, Y., Chai, Z., & Leng, X. (2010). Study of the Physical Properties of Whey Protein Isolate and Gelatin Composite Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 5100–5108. <https://doi.org/10.1021/jf9040904>
88. Kamper, S. L., & Fennema, O. (1984). Water Vapor Permeability of Edible Bilayer Films. *Journal of Food Science*, 49(6), 1478–1481. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1984.tb12825.x>
89. Kapetanakou, A., Manios, S., & Skandamis, P. (2014). Application of Edible Films and Coatings on Food. En I. Boziaris (Ed.), *Novel Food Preservation and Microbial Assessment Techniques* (pp. 237–273). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b16758-11>
90. Karimi, A., Min, B., Brownmiller, C., & Lee, S.-O. (2015). Effects of Extraction Techniques on Total Phenolic Content and Antioxidant Capacities of Two Oregano Leaves. *Journal of Food Research*, 4. <https://doi.org/10.5539/jfr.v4n1p112>
91. Kester, J. J., & Fennema, O. R. (1986). Edible films and coatings: a review. *Food Technology (USA)*. Recuperado a partir de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US8836195>
92. Khwaldia, K., Perez, C., Banon, S., Desobry, S., & Hardy, J. (2004). Milk Proteins for Edible Films and Coatings. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 239–251. <https://doi.org/10.1080/10408690490464906>

-
93. Kilincceker, O., Dogan, İ. S., & Kucukoner, E. (2009). Effect of edible coatings on the quality of frozen fish fillets. *LWT - Food Science and Technology*, 42(4), 868–873. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.11.003>
94. Kocić-Tanackov, S., Dimić, G., Tanackov, I., Pejin, D., Mojović, L., & Pejin, J. (2012). The inhibitory effect of oregano extract on the growth of *Aspergillus* spp. and on sterigmatocystin biosynthesis. *LWT - Food Science and Technology*, 49(1), 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.013>
95. Kokoszka, S., Debeaufort, F., Lenart, A., & Voilley, A. (2010). Water vapour permeability, thermal and wetting properties of whey protein isolate based edible films. *International Dairy Journal*, 20(1), 53–60.
96. Krochta, J. M. (2002). Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status and opportunity. En *Protein-Based Films and Coatings* (p. 22). CRC Press.
97. Krochta, J. M., Baldwin, E. A., & Nisperos-Carriedo, M. (1994). *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*. Florida, United States of America: CRC Press.
98. Kwon, H., Ko, J. H., & Shin, H.-S. (2015). Evaluation of antioxidant activity and oxidative stability of spice-added mayonnaise. *Food Science and Biotechnology*, 24(4), 1285–1292. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0165-1>
99. Lario, Y., Sendra, E., García-Pérez, J., Fuentes, C., Sayas-Barberá, E., Fernández-López, J., & Pérez-Alvarez, J. A. (2004). Preparation of high dietary fiber powder from lemon juice by-products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5(1), 113–117. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2003.08.001>
100. Le Vay, D. (2008). Biofísica y bioquímica básicas. En *Anatomía y Fisiología Humana*. Editorial Paidotribo.

-
101. Leisner, J. J., & Gram, L. (2014). FISH | Spoilage of Fish A2 - Batt, Carl A. En M. L. Tortorello (Ed.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (pp. 932–937). Oxford: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00125-7>
102. Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1), 181–186. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00161-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00161-6)
103. Lemus, J. L. C., Mondragón, M. F., & Torres-García, M. del P. T. (1997). *El Oceano y Sus Recursos XI: Acuicultura*. Secretaría de Educación Pública.
104. Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. R., & Shacter, E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 233, 346–357.
105. Lim, L.-T., Mine, Y., Britt, I. J., & Tung, M. A. (2002). Formation And Properties Of Egg White Films And Coatings. *Protein-based Films and Coatings*, 233–252. <https://doi.org/10.1201/9781420031980.ch9>
106. Liu, L., Kerry, J. F., & Kerry, J. P. (2006). Effect of food ingredients and selected lipids on the physical properties of extruded edible films/casings. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(3), 295–302. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.01063.x>
107. López de Lacey, A. (2012). Diseño, desarrollo y aplicación de envases comestibles potencialmente bioactivos. *Universidad Complutense de Madrid (Doctoral thesis)*. Recuperado a partir de <http://eprints.ucm.es/17857/1/T34125.pdf>
108. Lopez-Martinez, L. X., Oliart-Ros, R. M., Valerio-Alfaro, G., Lee, C.-H., Parkin, K. L., & Garcia, H. S. (2009). Antioxidant activity, phenolic compounds and

-
- anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *LWT - Food Science and Technology*, 42(6), 1187–1192. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.10.010>
109. Manjarres-Pinzon, K., Cortes-Rodriguez, M., & Rodríguez-Sandoval, E. (2013). Effect of drying conditions on the physical properties of impregnated orange peel. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 30(3), 667–676. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322013000300023>
110. Marlett, J. A., & Vollendorf, N. W. (1994). Dietary fiber content and composition of different forms of fruits. *Food Chemistry*, 51(1), 39–44. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90045-0](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90045-0)
111. Martínez, D. la T. (2009). Estudio de Mercado para identificación de necesidades de infraestructura logística para la comercialización de jugo de cítricos en Veracruz. Recuperado a partir de https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjrm6_Fu5fWAhVM2IMKHephAtgQFggnMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.sagarpa.gob.mx%2Fagronegocios%2FDocuments%2FEstudios_promercado%2FSISTPROD_CITRICOS.pdf&usg=AFQjCNH16eVYdJZEvDDd02DI7krNlrqz3g
112. Martínez Del Prado, J. M. (2014). *Efecto de extractos acuosos de ajo (Allium sativum L.) y cebolla (Allium cepa L.) adicionados a un recubrimiento comestible sobre las características microbiológicas, fisicoquímicas y texturales durante la vida de anaquel de filetes de carpa común (Cyprinus carpio)* (Licenciatura). Universidad Autónoma Del Estado De México, Toluca, México.
113. Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: Different performances regarding bioactivity and phenolic

-
- compounds. *Food Chemistry*, 158(Supplement C), 73–80.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.099>
114. Matsuura, H., Chiji, H., Asakawa, C., Amano, M., Yoshihara, T., & Mizutani, J. (2003). DPPH radical scavengers from dried leaves of oregano (*Origanum vulgare*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(11), 2311–2316.
<https://doi.org/10.1271/bbb.67.2311>
115. McHugh, T. H., & Krochta, J. M. (1994). Sorbitol-vs glycerol-plasticized whey protein edible films: integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(4), 841–845.
116. Miller, K. S., & Krochta, J. M. (1997). Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 8(7), 228–237.
117. Milovanović, M., & Pićurić-Jovanović, K. (2001). Lipids and biopackaging: Usage of lipids in edible films. *Journal of Agricultural Sciences*, 46(1), 79–87.
118. Moosavi-Nasab, M., Shad, E., Ziaee, E., Yousefabad, S. H. A., Golmakani, M. T., & Azizinia, M. (2016). Biodegradable Chitosan Coating Incorporated with Black Pepper Essential Oil for Shelf Life Extension of Common Carp (*Cyprinus carpio*) during Refrigerated Storage. *Journal of Food Protection*, 79(6), 986–993.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-246>
119. Morachis-Valdez, A. G., Gómez-Oliván, L. M., García-Argueta, I., Hernández-Navarro, M. D., Díaz-Bandera, D., & Dublán-García, O. (2017). Effect of Chitosan Edible Coating on the Biochemical and Physical Characteristics of Carp Fillet (*Cyprinus carpio*) Stored at -18°C . *International Journal of Food Science*, 2017.
<https://doi.org/10.1155/2017/2812483>
120. Morales, J. L. G. (2015). *Residuos agroalimentarios I.3*. Ediciones Paraninfo, S.A.

-
121. Morales-Olán, G. (2009). *Efecto de antioxidantes naturales sobre la formación de acrilamida en papas fritas* (Maestría). Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz.
122. Moreira, M. R., Cassani, L., Martín-Belloso, O., & Soliva-Fortuny, R. (2015). Effects of polysaccharide-based edible coatings enriched with dietary fiber on quality attributes of fresh-cut apples. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7795–7805. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1907-z>
123. Nassar, A. G., Abdel-hamied, A. A., & El-naggar, E. A. (2008). Effect of Citrus by-Products Flour Incorporation on Chemical, Rheological and Organoleptic Characteristics of Biscuits. *World Journal of Agricultural Sciences*, 4(5), 612–616.
124. Navarro, C. P. (2010). *Recubrimientos comestibles a base de hidroxipropil metilcelulosa: caracterización y aplicación*. Universitat Politècnica de València. Recuperado a partir de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=87935>
125. Nieto, M. B. (2009). Structure and Function of Polysaccharide Gum-Based Edible Films and Coatings. En *Edible Films and Coatings for Food Applications* (pp. 57–112). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1_3
126. Niño, K. A., Huerta, M. E. A., Verde, M. G. R., & Rodríguez, L. A. M. (2010). Películas biodegradables a partir de residuos de cítricos: propuesta de empaques activos, 11.
127. Niño, K. A., Huerta, M. E. A., Verde, M. G. R., & Rodríguez, L. A. M. (s/f). Películas biodegradables a partir de residuos de cítricos: propuesta de empaques activos. 2010. Recuperado a partir de <http://uniciencia.ambientalex.info/revistas/vol1n21.pdf>
128. Otoni, C. G., Avena-Bustillos, R. J., Azeredo, H. M. C., Lorevice, M. V., Moura, M. R., Mattoso, L. H. C., & McHugh, T. H. (2017). Recent Advances on Edible

-
- Films Based on Fruits and Vegetables—A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 1151–1169. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12281>
129. Ozdemir, M., & Floros, J. D. (2008). Optimization of edible whey protein films containing preservatives for mechanical and optical properties. *Journal of Food Engineering*, 84(1), 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.04.029>
130. Parra Huertas, R. A. (2009). Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 62(1). Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/html/1799/179915377021/>
131. Pavlath, A. E., & Orts, W. (2009). Edible Films and Coatings: Why, What, and How? En K. C. Huber & M. E. Embuscado (Eds.), *Edible Films and Coatings for Food Applications* (pp. 1–23). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1_1
132. Pavlath, A., & Orts, W. (2009). *Edible Films and Coatings: Why, What, and How?* https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1_1
133. Pereira Moura Aranha, C., & Neuza, J. (2012). Antioxidant potential of oregano extract (*Origanum vulgare* L.). *British Food Journal*, 114(7), 954–965. <https://doi.org/10.1108/00070701211241554>
134. Pérez-Chabela, M. ., & Ponce-Alquicira, E. (2013). *Manual de prácticas de laboratorio tecnología de carnes*. UAM. México.
135. Perez-Gago, M., & Krochta, J. M. (2002). Formation And Properties Of Whey Protein Films And Coatings. En *Protein-Based Films and Coatings*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420031980.ch6>
136. Pitak, N., & Rakshit, S. K. (2011). Physical and antimicrobial properties of banana flour/chitosan biodegradable and self sealing films used for preserving

-
- Fresh-cut vegetables. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 2310–2315.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.05.024>
137. Prakash, G., & Pathak, P. (2017). Intention to buy eco-friendly packaged products among young consumers of India: A study on developing nation. *Journal of Cleaner Production*, 141, 385–393. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.09.116>
138. Priego Mendoza, N. (2007). *Obtención de Fibra Dietética a Partir de Sáculos de Naranja aplicando un Tratamiento con Vapor*. Universidad Tecnológica de la Mixteca, Huajuapán de León, Oaxaca. Recuperado a partir de https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwin2__rzZvWAhUQ02MKHciTA_sQFggnMAA&url=http%3A%2F%2Fjupiter.utm.mx%2F~tesis_dig%2F10354.pdf&usg=AFQjCNGv1iAt_PFI B3ah0Gplgnjz6N1rA
139. ProMéxico. (2015a). Alimentos procesados. Autor. Recuperado a partir de <https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjYIJP5lvTVAhUrxYMKHdwCC-YQFggyMAI&url=http%3A%2F%2Fwww.promexico.gob.mx%2Fdocumentos%2Fdiagnosticos-sectoriales%2Falimentos-procesados.pdf&usg=AFQjCNFtVrAUxBEBOWFnUsc9JxX1SM-VeA>
140. ProMéxico. (2015b). Sector Agroalimentario. Recuperado a partir de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/133109/Sector_Agroalimentario.pdf
141. ProMéxico. (2016). Mapa de Inversión en México - Perfil del sector. Recuperado el 1 de septiembre de 2017, a partir de http://mim.promexico.gob.mx/es/mim/Perfil_del_sector_ap

-
142. Quiroz-Valle, A. E. (2009). *Utilización de residuos de cáscara de naranja para la preparación de un desengrasante doméstico e industrial* (Tesis de Licenciatura). Universidad Internacional SEK, Quito, Ecuador.
143. Radha krishnan, K., Babuskin, S., Azhagu Saravana Babu, P., Sasikala, M., Sabina, K., Archana, G., ... Sukumar, M. (2014). Antimicrobial and antioxidant effects of spice extracts on the shelf life extension of raw chicken meat. *International Journal of Food Microbiology*, 171, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.011>
144. Ramos, M., Valdés, A., Beltrán, A., & Garrigós, M. C. (2016). Gelatin-Based Films and Coatings for Food Packaging Applications. *Coatings*, 6(4), 41. <https://doi.org/10.3390/coatings6040041>
145. Ramos, Ó. L., Reinas, I., Silva, S. I., Fernandes, J. C., Cerqueira, M. A., Pereira, R. N., ... Malcata, F. X. (2013). Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 110–122. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.05.001>
146. Rhim, J.-W., & Ng, P. K. W. (2007). Natural Biopolymer-Based Nanocomposite Films for Packaging Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(4), 411–433. <https://doi.org/10.1080/10408390600846366>
147. Rincón, A. M., Vásquez, A., Padilla, M., & C, F. (2005). composición química y compuestos bioactivos de las harinas de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*) y toronja (*Citrus paradisi*) cultivadas en Venezuela. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 55(3), 305–310.
148. Rivero, S., García, M. A., & Pinotti, A. (2010). Correlations between structural, barrier, thermal and mechanical properties of plasticized gelatin films. *Innovative*

-
- Food Science & Emerging Technologies*, 11(2), 369–375.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.07.005>
149. Rodríguez Triviño, A. P. (2015). *Aplicación de recubrimiento comestible adicionado con extractos etanólicos de propóleo y aceites esenciales a un producto cárnico tipo “luncheon fish”* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia-Bogotá, Bogotá, Colombia.
150. Rosselló, C. (2007). *Estudi sobre la viabilitat d'utilitzar els excedents i residus agrícoles del camp mallorquí com a fibra dietètica*. Palma de Mallorca: Conselleria d'Agricultura i Pesca.
151. Rossman, J. M. (2009). Commercial Manufacture of Edible Films. En *Edible Films and Coatings for Food Applications* (pp. 367–390).
https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1_14
152. Saeed, S., & Tariq, P. (2009). Antibacterial activity of oregano (*Origanum vulgare* Linn.) against gram positive bacteria. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22(4), 421–424.
153. Sáenz, C., Estévez, A. M., & Sanhueza, S. (2007). Utilización de residuos de la industria de jugos de naranja como fuente de fibra dietética en la elaboración de alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57(2), 186–191.
154. SAGARPA. (2016). Atlas-Agroalimentario-2016.pdf. Autor. Recuperado a partir de http://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/descargar/2016/Atlas-Agroalimentario-2016
155. SAGARPA. (2017). *Avanza México como una potencia en producción acuícola* (p. 2). México, D.F. Recuperado a partir de http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/boletines/Paginas/JAC_00135_15.aspx#

-
156. Şahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., ... Özer, H. (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, 15(7), 549–557. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2003.08.009>
157. Santiago Castro, J. T. (2014). *Obtención y caracterización fisicoquímica, microbiológica y organoléptica de residuos fibrosos de naranja (Citrus sinensis) obtenidos a 50 °C y su incorporación en un sistema alimenticio*. Universidad Tecnológica de la Mixteca, Huajuapán de León, Oaxaca. Recuperado a partir de https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjXjtPApJHWAhUfKWMKHQQZBYoQFggnMAA&url=http%3A%2F%2Fjupiter.utm.mx%2F~tesis_dig%2F12220.pdf&usg=AFQjCNG8M_UieNKCI9jrTnnnHhmn9Jb3w
158. Saura Calixto, F. D., & Jiménez Escrig, A. (2003). Fibra dietética antioxidante y concentrado de antioxidantes naturales de alga *Fucus* y sus procedimientos de obtención. Recuperado a partir de <https://digital.csic.es/handle/10261/6690>
159. Saval, S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: Pasado, presente y futuro. *BioTecnología*, 16(2), 14–46.
160. Sendra, E., Lario, Y., Sayas-Barbera, E., Perez-Alvarez, J. A., Aleson-Carbonell, L., Fernandez-Gines, J. M., & Fernandez-Lopez, J. (2008). Obtention of lemon fibre from lemon juice by-products. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 19(2), 22.
161. Sevilla-Ascencio, O., A. (2013). *Cuantificación de compuestos fenólicos totales y evaluación de la capacidad antioxidante de extractos acuosos y acuoso-orgánicos de seis especias utilizadas en el estado de México por los métodos de DPPH• y ABTS•+*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Química, Edo. De México, México.

-
162. Sevilla-Asencio, O. A., Dublán-García, O., Gómez-Oliván, L. M., & López-Martínez, L. X. (2013). Actividad inhibitoria sobre a-glucosidasa y a-amilasa de extractos acuosos de algunas especias utilizados en la cocina mexicana. *CienciaUAT*, 8(1).
163. SIAP, & SAGARPA. (2016). Panorama de la leche en México. Autor. Recuperado a partir de http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Brochure%20leche_Diciembre2016.pdf
164. Silva-Ríos, A., Dublán-García, O., Quintero-Salazar, B., Dominguez-Lopez, A., Gómez-Oliván, L. M., López-Martínez, L. X., & Salem, A.-F. Z. (2013). Evaluation of physicochemical, functional and textural properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) stored at low temperatures. *African Journal of Biotechnology*, 12(32). Recuperado a partir de <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/134862>
165. Skurtys, O., Acevedo, C., Pedreschi, F., Enronoe, J., Osorio, F., & Aguilera, J. M. (2014). *Food hydrocolloid edible films and coatings*. Nova Science Publishers, Incorporated. Recuperado a partir de <http://library1.ue-varna.bg:7480/ft/KNG/R0030370.PDF>
166. Soazo, M., Pérez, L., Rubiolo, A., & Verdini, R. (2013). Efecto de la congelación sobre la microestructura y las propiedades físicas de películas comestibles a base de proteínas del lactosuero. *Ingeniería Alimentaria*, 105, 22.
167. Sousa, C. M. de M., Silva, H. R. e, Vieira-Jr., G. M., Ayres, M. C. C., Costa, C. L. S. da, Araújo, D. S., ... Chaves, M. H. (2007). Total phenolics and antioxidant activity of five medicinal plants. *Química Nova*, 30(2), 351–355. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200021>

-
168. Suput, D., Lazic, V., Popovic, S., & Hromis, N. (2015). Edible films and coatings: Sources, properties and application. *Food and Feed Research*, 42(1), 11–22. <https://doi.org/10.5937/FFR1501011S>
169. Sutton, S. (2011). Measurement of Cell Concentration in Suspension by Optical Density. *Journal Of Validation Technology*, 4.
170. Swain, S. N., Biswal, S. M., Nanda, P. K., & Nayak, P. L. (2004). Biodegradable soy-based plastics: opportunities and challenges. *Journal of Polymers and the Environment*, 12(1), 35–42.
171. Talens, C., Arboleya, J. C., Castro-Giraldez, M., & Fito, P. J. (2017). Effect of microwave power coupled with hot air drying on process efficiency and physico-chemical properties of a new dietary fibre ingredient obtained from orange peel. *LWT - Food Science and Technology*, 77(Supplement C), 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.036>
172. Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Serrano, C., Matos, O., Neng, N. R., ... Nunes, M. L. (2013). Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(11), 2707–2714. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6089>
173. Tharanathan, R. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*, 14(3), 71–78. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00280-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00280-7)
174. Trejo Márquez, M. A., Lira-Vargas, A. A., & Pascual-Bustamante, S. (2017). Fibra para el futuro: Propiedades y beneficios. *OmniaScience Monographs*. Recuperado a partir de <http://omniascience.com/monographs/index.php/monograficos/article/view/354>

-
175. Umaraw, P., & Verma, A. K. (2017). Comprehensive review on application of edible film on meat and meat products: An eco-friendly approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(6), 1270–1279. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.986563>
176. Unver, A., Arslan, D., Ozcan, M. M., & Akbulut, M. (2009). Phenolic content and antioxidant activity of some spices. *World Applied Sciences Journal*, 6(3), 373–377.
177. Valencia, E. D., & Ramírez, M. L. C. (2009). La industria de la leche y la contaminación del agua. *Elementos: Ciencia y cultura*, 16(73), 27–31.
178. Vazquez, G. B., & Velazquez, G. (2012). *Aprovechamiento biotecnológico de productos agropecuarios III*. México: Editorial Plaza y Valdés.
179. Villena, L. J. (1995). Contaminación de industrias lácteas. Recuperado a partir de <http://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/3823/08-1995-02.pdf?sequence=1>
180. Viroben, G., Barbot, J., Mouloungui, Z., & Guéguen, J. (2000). Preparation and Characterization of Films from Pea Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1064–1069. <https://doi.org/10.1021/jf9813891>
181. Vital, A. C. P., Guerrero, A., Monteschio, J. de O., Valero, M. V., Carvalho, C. B., de Abreu Filho, B. A., ... do Prado, I. N. (2016). Effect of Edible and Active Coating (with Rosemary and Oregano Essential Oils) on Beef Characteristics and Consumer Acceptability. *PLoS ONE*, 11(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160535>
182. Wang, A., Wu, L., Wang, X., & Zhu, J. (2012). Method for preparing edible wrapping paper by taking corn-peel dietary fibers as raw materials. Recuperado a partir de <http://www.google.com/patents/CN102071595B>

-
183. Wei, L. T., & Yazdanifard, R. (2013). Edible Food Packaging as an Eco-friendly Technology using Green Marketing Strategy. *Global Journal Of Commerce and Management Perspective*, 2, 8–11.
184. Wittaya, T. (2008). *Edible films and coatings: Characteristics and properties* (Vol. 15).
185. Zanella, K., Lima Pinheiro, C., Tomaz, E., & Taranto, O. (2013). *Study of Volatiles from “Pera” Sweet Orange Peel Using Karl Fischer Titration, GC-FID and GC/MS Techniques* (Vol. 32). <https://doi.org/10.3303/CET1332069>
186. Zhang, Y., Han, J., & Liu, Z. (2008). *Starch-based edible films*. <https://doi.org/10.1533/9781845694784.1.108>

Otras fuentes consultadas:

NMX-F-102-NORMEX-2010. Norma Mexicana (2010). Alimentos-determinación de acidez titulable en alimentos- método de ensayo (prueba). FOODS-DETERMINATION ACIDITY TITRATABLE-TEST METHOD

NMX-F-317-NORMEX-2013. Norma Mexicana (2013). Alimentos-Determinación de pH en Alimentos y Bebidas No Alcohólicas- Método Potenciométrico- Método de Prueba. FOODS-DETERMINATION OF pH IN FOODS AND BEVERAGES-POTENCIOMETRIC METHOD-TEST METHOD.

NOM-092-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana. (1994). Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Secretaria de Salubridad y Asistencia, México.

NOM-111-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana. (1994). Bienes y Servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Secretaria de Salubridad y Asistencia, México.

NOM-112-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana (1994). Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.

NOM-113-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana. (1994). Bienes y Servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

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

NOM-115-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. (1994). Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos.

NOM-210-SSA1-2015. Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. (2015). Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.

NOM-F-317-S-1978. Norma Oficial Mexicana. (1978). Bienes y Servicios. Determinación de pH en Alimentos. Secretaria de Salubridad y Asistencia, México.

ANEXOS

Anexo 1. Curva de calibración para determinación de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu (Gutiérrez-Avella et al., 2008).

a) Preparación de reactivos:

1. Disolución patrón de ácido gálico. Pesar 0.1g de ácido gálico y aforar a un litro de agua destilada. (Utilizar una solución recién preparada).

2. Disolución de carbonato de sodio al 20 %. Pesar 20 g de carbonato de sodio, disolver en 40 mL de agua destilada y aforar con agua destilada en un matraz aforado de 100 mL.

3. Reactivo de Folin Ciocalteu 1N. Diluir en relación 1:1 (v/v) con agua destilada, proteger de la luz.

Tabla 23. Valores de concentración para la determinación de compuestos fenólicos.

Tubos	Ac. Gálico* (μL)	Folin (μL)	Agitación	Na₂CO₃ 20% (μL)	H₂O (μL)
1	0	250	5 min	1250	500
2	20	250	5 min	1250	480
3	40	250	5 min	1250	460
4	60	250	5 min	1250	440
5	80	250	5 min	1250	420
6	100	250	5 min	1250	400

*A partir de una solución de 0.1g/L

Posteriormente:

1. Incubar protegidos de la luz por 90 minutos a temperatura ambiente.
2. Leer en el espectrofotómetro a 760 nm.

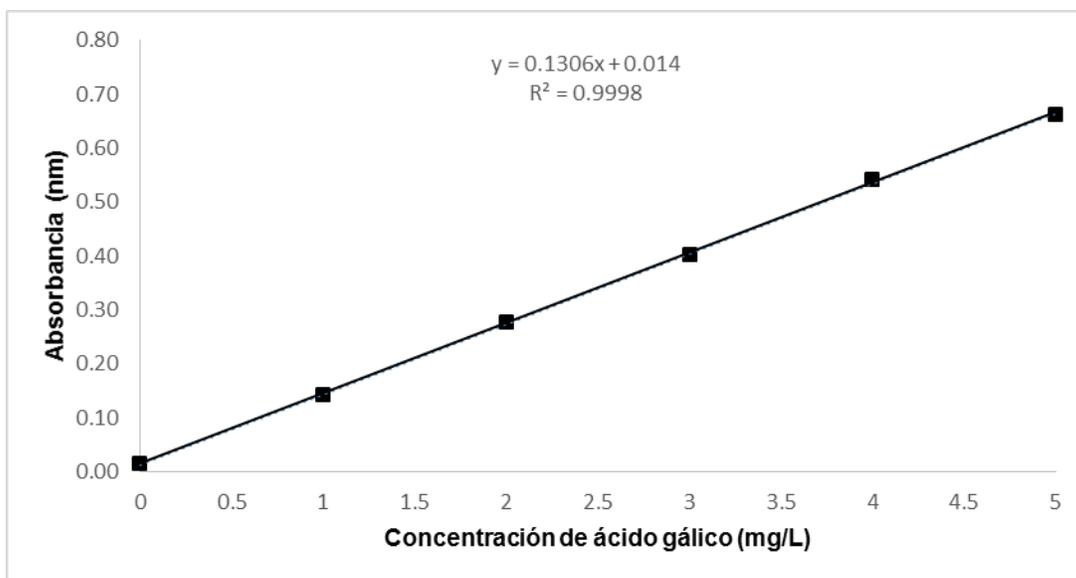


Figura 24. Curva de calibración de ácido gálico para determinación de compuestos fenólicos

b) Preparación de muestra

Extracto de orégano al 20%. Se tomaron 20 μL de cada extracto (acuoso y etanólico) y se diluyeron en 80 μL de agua destilada, a partir de esta dilución se tomaron alícuotas para preparar los siguientes tubos:

Tabla 24. Valores de concentración para la determinación de compuestos fenólicos en muestra.

Extracto	μL	Folin (μL)	Agitación	Na_2CO_3 20% (μL)	H_2O (μL)
Blanco	0	250	-	1250	500
Acuoso	20	250	5 min	1250	480
Etanólico	20	250	5 min	1250	480

Posteriormente:

1. Incubar protegidos de la luz por 120 minutos a temperatura ambiente.
2. Leer en el espectrofotómetro a 760 nm.

Anexo 2. Curva de calibración para la determinación de la capacidad antioxidante mediante ABTS•+ (Método de López-Martínez *et al.*, 2009)

Tabla 25. Valores de concentración para la determinación de capacidad antioxidante por ABTS.

Tubo	Trolox* (μL)	Metanol (μL)	ABTS•+ (mL)
1	10	990	3
2	100	900	3
3	200	800	3
4	300	700	3
5	400	600	3
6	500	500	3

* A partir de Trolox 2 mM

Posteriormente:

1. Incubar protegidos de la luz por 10 minutos a temperatura ambiente.
2. Leer en el espectrofotómetro a 734 nm

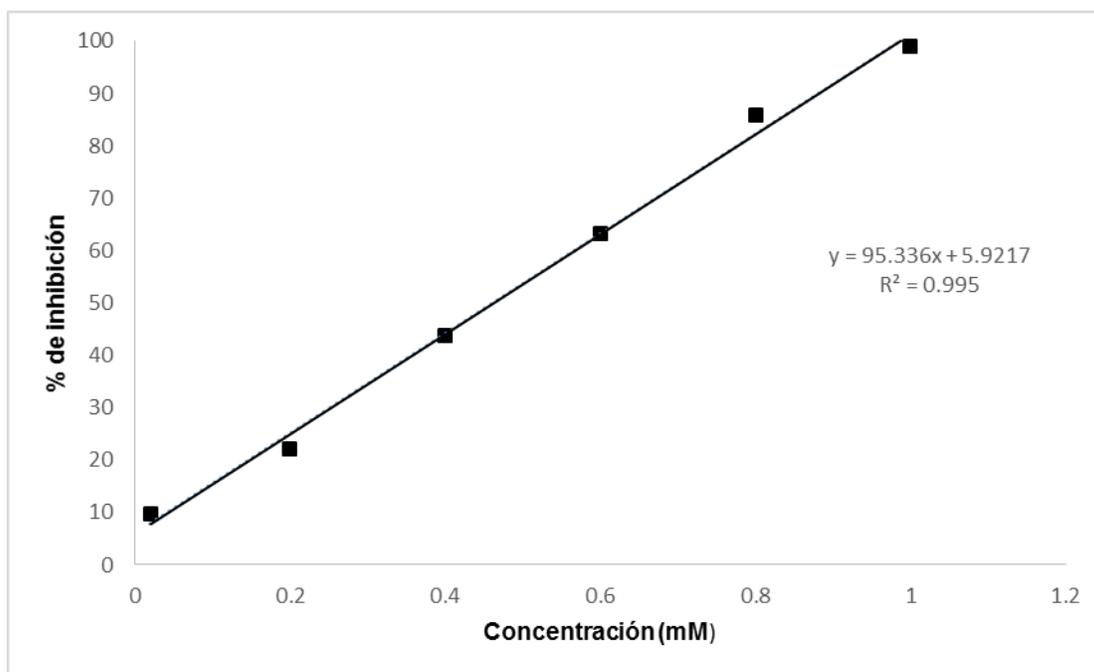


Figura 25. Curva de calibración de Trolox para el ensayo de radical ABTS•+

Anexo 3. Curva de calibración para la determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH• (Método de López-Martínez *et al.*, 2009)

Tabla 26. Valores de concentración para la determinación de capacidad antioxidante por DPPH.

Tubo	Trolox* (μL)	Metanol (μL)	DPPH• (mL)
1	10	990	3.9
2	25	975	3.9
3	125	875	3.9
4	250	750	3.9
5	500	500	3.9
6	750	350	3.9
7	1000	0	3.9

* A partir de Trolox 1.2 mM

Posteriormente:

1. Homogenizar e incubar protegidos de la luz por 30 minutos
2. Leer en el espectrofotómetro a 515 nm.

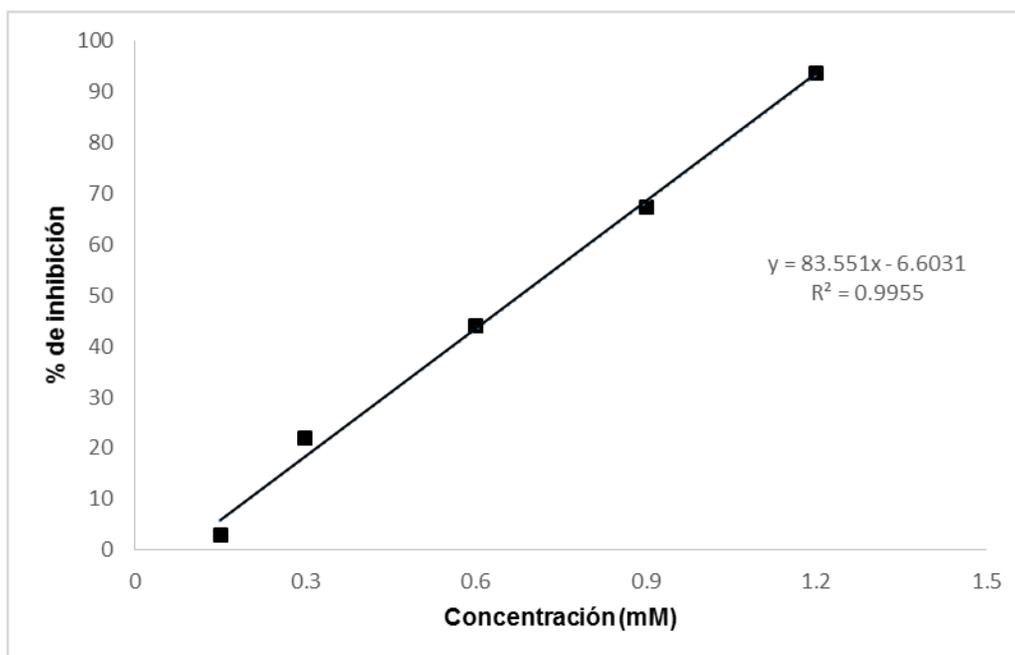


Figura 26. Curva de calibración de Trolox para el ensayo de radical DPPH

Anexo 4. Curva de calibración para la determinación de la concentración de bacterias por Mc Farland (Método de Sutton, 2011)

Un estándar de McFarland es una disolución química de BaCl_2 y H_2SO_4 ; la reacción entre estos produce un precipitado fino, BaSO_4 . Cuando se agita bien, la turbidez de un estándar McFarland es visualmente comparable a una suspensión bacteriana de concentración conocida como se indica a continuación.

Tabla 27. Estándares de turbidez Mc Farland.

Estándar No.	BaCl_2 al 1 % (mL)	H_2SO_4 al 1.0% (mL)	UFC/mL (1×10^8)
0.5	0.05	9.95	1.5
1	0.1	9.9	3
2	0.2	9.8	6
3	0.3	9.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15
6	0.6	9.4	18

Posteriormente: Homogenizar en vórtex y Leer absorbancia en el espectrofotómetro a 625 nm.

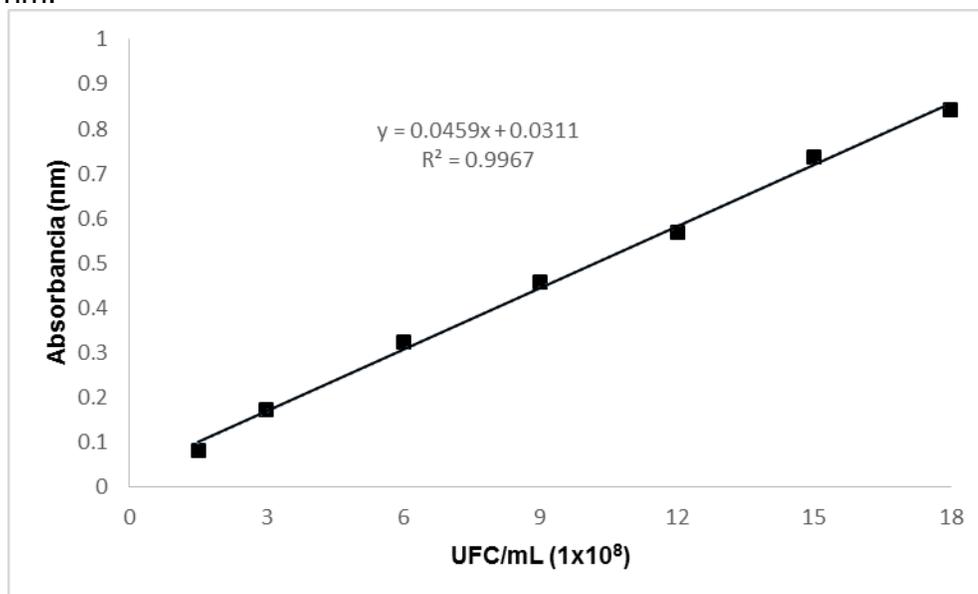


Figura 27. Curva de calibración Mc Farland

Anexo 5. Elaboración de geles de poliacrilamida

I. Elaboración de reactivos:

- **Amortiguador de corrida, pH 8.3 (5x).** Pesar 9.0g base-tris, 43.28 de glicina y 3g de SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) y adicionar a 600 mL. Para una corrida electroforética diluir 60 mL de amortiguador 5x en 240 mL de agua desionizada.
- **Amortiguador Tris-Glicina-EDTA.** Pesar 10.4g de base-Tris, 6.9g de glicina, 1.2g de EDTA, aforar a 1L, ajustar pH a 8.
- **Amortiguador Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8 (gel de separación).** Pesar 18.15g de base-Tris y aforar a 100 mL, ajustar a pH con HCl 6N.
- **Amortiguador Tris-HCl 0.5M, pH 6.8 (gel compactador).** Pesar 6.0g de base-Tris y aforar a 100 mL, ajustar a pH 6.8 con HCl 6N.
- **Amortiguador de muestras (reductor).** Mezclar 10 mL de Tris-HCl 0.5M pH 6.8, 16 mL SDS al 10%, 50mg de azul bromofenol, 12 mL de glicerol, 4 mL de agua desionizada y 2 mL de 2-B-mercaptoetanol.
- **Disolución de acrilamida /bis.** Pesar 14.6g de acrilamida, 0,4g de N'N'-bis-metilen- acrilamida, disolver en 35 mL de agua y aforar a 50 mL. Almacenar a 4°C.
- **Disolución desteñidora.** Se prepara con ácido acético, metanol y agua destilada en proporciones de 10:40:50, respectivamente.
- **Disolución teñidora.** Se prepara con ácido acético, metanol y agua destilada en proporciones de 10:40:50, y 0.1% de azul comossie R-250.

- **Disolución de urea.** Pesar 120g de urea y aforar a 250mL con buffer Tris-glicina-EDTA pH 8.
- **Persulfato de amonio al 10%.** Disolver 0.1 g en 1 mL de agua. Este reactivo se prepara al momento de utilizar.

II. Preparación de los geles

A) Gel de separación

Se prepararon 10 mL de gel de separación utilizando una concentración al 10%, tal como se indica en la tabla siguiente:

H ₂ O (mL)	Acrilamida/Bis (mL)	Amortiguador pH 8.8 (mL)	10% SDS (mL)	Persulfato de amonio 10% (µL)	N,N,N',N'-Tetrametilendiamina (TEMED) (µL)
4.1	3.3	2.5	0.1	50	5

Con la mezcla de los componentes a temperatura ambiente, se aplica vacío para desgasificar durante 15 minutos, posteriormente se da paso a la polimerización añadiendo persulfato de amonio (10%) y TEMED. Inmediatamente se mezcla y vierte la solución entre las placas de vidrio previamente montadas. Transcurrido unos minutos, adicionar 150 µL de agua y dejar reposar 20-30 minutos para asegurar la gelificación total.

B) Gel compactador

Se prepararon 10 mL de gel de separación utilizando una concentración de 5%, tal como se indica en la tabla siguiente:

H ₂ O (mL)	Acrilamida/Bis (mL)	Amortiguador pH 6.8 (mL)	10% SDS (mL)	Persulfato de amonio 10% (μL)	N, N, N', N''Tetrametilendiami na (TEMED) (μL)
5.7	1.7	2.5	0.1	50	10

De igual forma a la mezcla de los componentes se le aplica vacío para desgasificar durante 15 minutos, posteriormente se da paso a la polimerización añadiendo persulfato de amonio (10%) y TEMED. Se elimina el agua del gel anterior, y la mezcla del gel superior se vierte sobre el primer gel. Inmediatamente se colocan los peines para marcar los carriles. Dejar polimerizar 15-20 minutos para asegurar la gelificación total.

III. Preparación de muestras

Para la extracción de las proteínas miofibrilares de los filetes con y sin bioempaquete se pesaron aproximadamente 0.1g de cada muestra y se colocaron en tubos eppendorf de 2mL, estos se etiquetaron conforme al tratamiento y día correspondiente. Se adicionaron 200 μL de disolución de urea, 700 μL de buffer muestra [disolución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% + mercaptoetanol al 5% + azul de bromofenol al 0.05%+ glicerol, 0.5M Tris-HCl pH 6.8], y se homogenizaron durante 15 segundos en un agitador. Éstos se colocaron en baño maría a temperatura de ebullición durante 10 minutos, se dejaron enfriar las muestras y finalmente se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos.

IV. Condiciones de electroforesis

Los geles se prepararon en dos placas de vidrio cuyas dimensiones fueron 72.101 mm, utilizando separadores de 0.75 mm y un peine del mismo espesor. Se inyectaron 7 μL de muestra en cada carril del gel compactador (10% de

poliacrilamida y 5% separador), y 5 μ L para el marcador de peso molecular. Para el corrimiento electroforético se vertió el buffer de corrida en la cámara de electroforesis (BIO-RAD Mini-PROTEAN II Cell), y el equipo se conectó a una fuente de poder (BIO-RAD Power Pak 300), con un potencial de 200 V y temperatura de 4°C, para evitar así el efecto Joule. Una vez colocada la muestra en los carriles, se deja correr durante 55 min (hasta que el azul de bromofenol alcance la parte final del gel). Terminado el proceso los geles se desmontaron para sumergirse en solución fijadora (100 mL de solución desteñidora + 1 mL de formalina) por un periodo de 20 minutos. Se lavaron con agua destilada y se tiñeron durante 60 minutos empleando una disolución azul de Coomasie R-250 0.1%. Finalmente se colocaron en solución desteñidora hasta poder observar las bandas de las proteínas correspondientes.

Anexo 6. Curva de calibración para la determinación de proteínas totales
(Método de Bradford 1976).

Las concentraciones de albúmina se prepararon a partir de una disolución de 1 mg/mL.

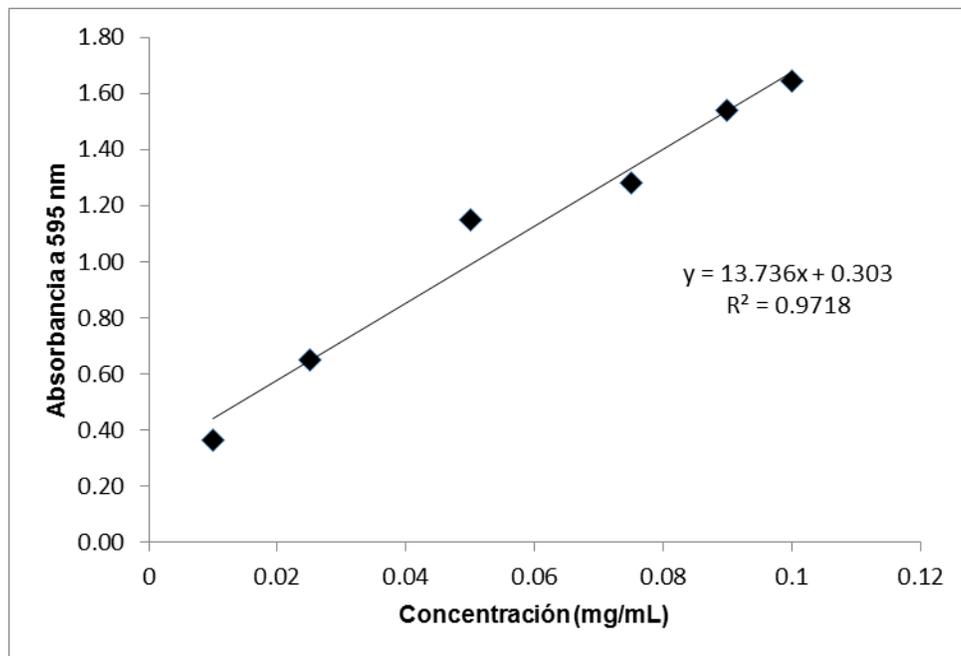


Figura 28. Curva de calibración para la determinación de proteínas totales