

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“Elaboración de *films* de gelatina con
nanopartículas de timol para la conservación
de manzana”**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER
POR**

MILAGROS PÉREZ MAGRO

JULIO, 2017





PROFESOR TUTOR:

Dr. D. Manuel Rendueles de la Vega (Universidad de Oviedo)

Dr. D. Ismael Marcet Manrique (Universidad de Oviedo)

CERTIFICA:

Que **Milagros Pérez Magro** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 11ª promoción curso 2016-2017.

Oviedo, 14 de Julio de 2017

D. Manuel Rendueles de la Vega

D. Ismael Marcet Manrique

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutor, el Dr. Manuel Rendueles y a mi cotutor, el Dr. Ismael Marcet por su esfuerzo y dedicación durante estos meses de trabajo. Sus conocimientos, su paciencia y su apoyo han hecho posible que este trabajo viera la luz.

A Sara, por su paciencia y dedicación en el laboratorio, por enseñarme tanto y por ayudarme cuando estaba perdida.

A mis compañeros de laboratorio, por hacer más amenas y entretenidas las interminables horas de trabajo y por su ayuda en los momentos de necesidad y a mis compañeros del MBtA por los buenos momentos vividos durante este año.

Por último, a mi familia, por animarme y apoyarme en mis decisiones y por estar siempre en los momentos importantes de mi vida. Sin ellos esto no habría sido posible. Y sobre todo gracias a Sergio, por aguantar mi mal humor en los malos momentos y por ayudarme siempre. Si he llegado hasta aquí ha sido por ti.

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABLAS	V
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES	4
2.1. “Films” y recubrimientos comestibles.....	4
2.1.1. Propiedades de los “films” y recubrimientos comestibles.....	6
2.1.2. “Films” aditivados con agentes antimicrobianos.....	8
2.1.3. Utilización de “films” para conservar frutas	13
2.2. Timol	16
2.2.1. Propiedades del timol	17
2.3. Nanopartículas	20
2.3.1. Ácido poli-láctico	20
2.3.2. Nanopartículas de timol.....	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1. Materiales	23
3.2. Elaboración de las nanopartículas	23
3.3. Caracterización de las manzanas tratadas con timol libre, con timol contenido en nanopartículas y sin tratar.....	24
3.3.1. Pérdida de peso	25
3.3.2. pH	25
3.3.3. Actividad antioxidante total.....	25
3.3.4. Sólidos solubles totales.....	26
3.3.5. Firmeza	26
3.4. Elaboración de los “films”.....	26
3.5. Caracterización de los “films”.....	27
3.5.1. Determinación del grosor	27
3.5.2. Propiedades mecánicas de los “films”	27
3.5.3. Absorción de la luz y transparencia.....	28
3.5.4. Capacidad antioxidante	28
3.5.5. Propiedades térmicas	29

3.5.6. Microscopía electrónica de barrido (MEB)	29
3.6. Preparación de los recubrimientos.....	29
3.7. Capacidad antimicrobiana del timol y las nanopartículas de timol	30
3.7.1. Cepa, medio y condiciones de cultivo	30
3.7.2. Evaluación de Escherichia coli CECT 101 en los distintos tratamientos.....	30
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1. Efecto de las soluciones acuosas de timol libre y encapsulado sobre los parámetros evaluados de la manzana	32
4.1.1. Caracterización visual de las manzanas tratadas y sin tratar	32
4.1.2. Pérdida de peso	33
4.1.3. Variación en el pH.....	35
4.1.4. Actividad antioxidante total.....	35
4.1.5. Sólidos solubles totales.....	37
4.1.6. Firmeza	37
4.2. Caracterización de los “films” que contienen timol encapsulado en nanopartículas de APL.....	40
4.2.1. Absorción de luz y transparencia.....	40
4.2.2. Propiedades mecánicas de los “films”	42
4.2.3. Propiedades térmicas	44
4.2.4. Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	47
4.2.5. Capacidad antioxidante	49
4.3. Capacidad antimicrobiana del timol y las nanopartículas de timol en soluciones acuosas, recubrimientos y “films”	50
4.3.1. Determinación de Escherichia coli CECT 101 en los distintos tratamientos	50
5. CONCLUSIONES.....	56
6. SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	57
7. BIBLIOGRAFÍA	58
8. APÉNDICES	68

RESUMEN

La creciente demanda por parte de los consumidores de alimentos seguros, de buena calidad y mínimamente procesados junto con la imagen negativa que tienen algunos envases de alimentos hoy en día, ha impulsado la investigación de nuevos métodos de envasado. Una posible alternativa es el uso de “films” y recubrimientos comestibles, que se definen como matrices continuas que pueden estar formadas por polisacáridos, proteínas o lípidos. Además, permiten la incorporación de diferentes agentes activos, como por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes o nutrientes, para prolongar la vida útil de alimentos.

En este trabajo se elaboraron “films” de gelatina enriquecidos con timol y nanopartículas de APL con timol y se investigó el efecto del agente activo sobre la vida útil de manzanas “Gala”. La solución acuosa de timol se utilizó para medir la influencia de este agente activo sobre algunas propiedades de las manzanas almacenadas durante 12 días a 4 °C, sin que se observaran mejoras significativas en los parámetros estudiados. Tanto la solución acuosa, como la solución formadora de “films” (recubrimientos) y los propios “films” con timol libre y encapsulado se probaron sobre manzanas inoculadas con *Escherichia coli*, mostrando buenos resultados para inhibir su crecimiento, especialmente cuando se emplearon altas concentraciones del agente activo. En este sentido, el tratamiento que resultó más eficaz fue el de los “films” cuyas concentraciones de timol eran del 2 y 3% (p/p) con respecto a la cantidad de proteína que presentaba cada “film”.

Las nanopartículas de timol resultaron ser siempre más efectivas que el timol libre, independientemente de la concentración. Por tanto, los “films” con nanopartículas de timol tienen potencial para ser utilizados como conservantes antimicrobianos en productos alimentarios, ya que se puede aumentar su concentración dentro de las nanopartículas sin ningún problema y se libera lentamente con el tiempo.

ABSTRACT

Responding to the increasing consumer demand for safe food, with good quality and minimally processed, together with the negative image linked to some wrappers nowadays, has boosted the research of new packaging methods. A potential alternative is the films and edible coatings, which are defined as continuous matrixes that could be made of polysaccharides, proteins or lipids. Furthermore, they enable the inclusion of active agents as antimicrobials, antioxidants or nutrients in order to extend the useful life of the foods.

In this paper, “films” of gelatin enriched with thymol and nanoparticles of PLA with thymol were elaborated and the impact of the active agent in the working life of a “Gala” apple was researched. The thymol’s aqueous solution was used to measure the influence of this active agent over the properties of apples stored for 12 days at 4 °C, no relevant improvements in the studied parameters were observed. Both the aqueous solution, the films former solution (coatings) and the films with free and encapsulated thymol themselves were tested on apples inoculated with *Escherichia coli*, being effective at inhibiting the growth, especially when high concentrations of the active agent were used. In this vein, the treatment that turned out to be the most successful was the films which thymol concentrations were 2 and 3% (w/w) related to the protein quantity in each film.

The thymol nanoparticles showed to be more efficient than the free thymol, regardless the concentration. Therefore, the films with thymol nanoparticles have potential to be used as antimicrobial preservatives in food products, because the concentration within the particles can be increased smoothly and it released slowly over time.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Uvas “Red Grimson” después de 21 días de almacenamiento en refrigeración: (i) muestra control y (ii) uvas cubiertas con almidón de maíz ceroso modificado y gelatina (1:1) con glicerol. Tomada de Fakhouri <i>et al</i> (2015).	15
Figura 2	Estructura química del Timol.	16
Figura 3	Síntesis del timol.	17
Figura 4	Evolución del color de la manzana durante los 12 días de almacenamiento refrigerado en los diferentes tratamientos: control (A), solución acuosa de timol (B) y solución acuosa de nanopartículas de timol (C).	33
Figura 5	Efecto de los diferentes tratamientos en la pérdida de peso de manzanas durante los 12 días de almacenamiento refrigerado.	34
Figura 6	Efecto de los diferentes tratamientos en el pH de manzanas durante los 12 días de almacenamiento refrigerado.	35
Figura 7	Efecto de los diferentes tratamientos en la actividad antioxidante total de manzanas durante los 12 días de almacenamiento refrigerado.	36
Figura 8	Efecto de los diferentes tratamientos sobre el contenido de sólidos solubles totales de manzanas durante los 12 días de almacenamiento refrigerado.	37
Figura 9	Efecto de los diferentes tratamientos en la firmeza de manzanas durante los 12 días de almacenamiento refrigerado.	38
Figura 10	Aspecto de la manzana con los distintos tratamiento después de 20 días de almacenamiento refrigerado: control (a), solución acuosa de timol (b) y solución acuosa de nanopartículas de timol (c).	39
Figura 11	Aspecto de los “films” obtenidos. A y E. “Film” de gelatina control. B. “Film” de gelatina con un 1% de timol encapsulado en NP. C. “Film” de gelatina con un 2% de timol encapsulado en NP. D y F. “Film” de gelatina con un 3% de timol encapsulado en NP.	41

Figura 12	Propiedades mecánicas de los “films” evaluados. Dentro de cada parámetro, diferentes letras entre los tratamientos indican una diferencia significativa ($p < 0,05$).	43
Figura 13	Curvas de TG del “film” de gelatina control (línea sólida), “films” con un 1% (línea a rayas), 2% (línea de puntos), y 3% (línea de puntos y rayas) de timol en nanopartículas de APL.	45
Figura 14	Curvas de DTG obtenidas a partir de la Figura 3. A. “Film” control (línea sólida) y con un 1% de contenido en timol en forma de nanopartículas de APL (línea a rayas). B. “Film” con un 2% (línea sólida) y con un 3% de contenido en timol (línea a rayas) en forma de nanopartículas de APL. C. Timol (línea sólida) y APL (línea de rayas).	46
Figura 15	Micrografías de la sección transversal de los “films” a 500 aumentos (columna de la izquierda) y de la parte superior de la sección transversal del “film” a 10000 aumentos (columna de la derecha) A. “Film” control. B. “Film” con 1% de timol en nanopartículas de APL. C. “Film” con un 2% de timol en nanopartículas de APL. D. “Film” con un 3% de timol en nanopartículas de APL.	48
Figura 16	Capacidad de inhibir al radical DPPH por parte de los “films” cargados con timol en forma de nanopartículas de APL.	50
Figura 17	Evolución del crecimiento de <i>E. coli</i> CECT 101 en manzanas sometidas a tratamiento con soluciones acuosas con diferente concentración de timol (libre y encapsulado en nanopartículas) a lo largo de 14 días.	52
Figura 18	Evolución del crecimiento de <i>E. coli</i> CECT 101 en manzanas sometidas a tratamiento con soluciones formadoras de “film” con diferente concentración de timol (libre y encapsulado en nanopartículas) a lo largo de 14 días.	53
Figura 19	Evolución del crecimiento de <i>E. coli</i> CECT 101 en manzanas sometidas a tratamiento con “films” con diferente concentración de timol (libre y encapsulado en nanopartículas) a lo largo de 13 días.	55

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Requisitos y ventajas de “films” y recubrimientos.	6
Tabla 2	Ejemplos de “films” aditivados con agentes antimicrobianos.	12
Tabla 3	Aplicación de “films” en frutas y verduras. Adaptada de Cagri <i>et al.</i> (2004).	15
Tabla 4	Propiedades antimicrobianas del timol y sus derivados. Adaptada de Marchese <i>et al.</i> (2016).	19
Tabla 5	Técnicas de preparación de nanopartículas.	21
Tabla 6	Tratamientos y concentraciones utilizadas.	30
Tabla 7	Grosor, transparencia y absorbancia a diferentes longitudes de onda del “film” de gelatina control, los “films” que se prepararon con diferentes concentraciones de nanopartículas (NP) cargadas con timol, el “film” con un 3% de timol libre y el “film” de APL.	42
Tabla 8	Propiedades mecánicas de “films” elaborados con proteínas que aparecen en la bibliografía.	43
Tabla 9	Valores de interés obtenidos a partir del análisis de las curvas de TG y DTG.	47

1. INTRODUCCIÓN

Las frutas constituyen un grupo de alimentos indispensable para nuestra salud, aportando fibra, vitaminas, minerales y sustancias de acción antioxidante. Existen evidencias científicas acerca de los efectos positivos del consumo de frutas sobre la salud. Aunque los mecanismos por los que se ejerce esta acción beneficiosa no están totalmente aclarados, sí existe un consenso, en el sentido de que los compuestos característicos de las frutas actúan, bien por sí solos o bien interactuando con otros compuestos de la dieta, de manera positiva en la prevención de ciertas enfermedades típicas de nuestra sociedad. Debido a esto, parece que en la actualidad existe una tendencia mundial hacia un consumo más elevado de frutas y hortalizas, motivada por la creciente preocupación de seguir una dieta más equilibrada. Sin embargo, esta tendencia cada vez se orienta más a consumir productos frescos, sanos y mínimamente tratados debido a la asociación que existe entre el consumo de conservantes químicos (benzoatos, nitritos y nitratos, anhídrido sulfuroso, etc.) y determinados problemas de salud, como son las intoxicaciones, el cáncer u otras enfermedades degenerativas.

La creciente demanda por parte de los consumidores de alimentos seguros, de alta calidad, menos procesados y más naturales ha llevado a explorar diferentes maneras de alargar la vida útil de los alimentos a través de la innovación en el envasado. A día de hoy y con el objetivo de prolongar la vida postcosecha de los productos hortofrutícolas, se están usando técnicas como el almacenamiento a bajas temperaturas, la utilización de envases de plástico para crear atmósferas modificadas o la aplicación de tratamientos hidrotérmicos entre otras. Estas tecnologías también ejercen cierto control en la incidencia de microorganismos como *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*, que llegan a las frutas a través de aguas contaminadas o durante la manipulación y pueden causar enfermedades graves a los seres humanos (Ramos-García, Bautista-Baños, Barrera-Necha, Bosquez-Molina, Alia-Tejacal, & Estrada-Carrillo, 2010). Sin embargo, algunos de estos métodos presentan una imagen negativa para un sector importante de la población, como ocurre con los envases utilizados para recubrir los alimentos. Por un lado, se cuestiona la salubridad de muchos materiales de envase y su incidencia en la calidad sensorial de los alimentos, ya que algunos componentes de estos envases, como pueden ser ciertos monómeros o aditivos de los materiales plásticos o los metales pesados en los envases metálicos o en el cartón, son

tóxicos. Por otro lado, tienen una parte de responsabilidad en el deterioro ambiental, ya que los envases se convierten en un residuo inútil y molesto del que hay que deshacerse tarde o temprano (Catalá & Gavara, 2001).

Una alternativa viable para la conservación de frutas y vegetales frescos es la utilización de embalajes activos, que se centran en la idea de que algunas interacciones activas entre el envase y el producto pueden tener efectos positivos. El embalaje activo se define como un sistema en el que se modifican las condiciones de los productos envasados para preservar mejor las propiedades, mejorar la seguridad y / o la calidad sensorial y prolongar la vida útil manteniendo la calidad de los alimentos (Guarda, Rubilar, Miltz, & Galotto, 2011). Dentro de este grupo se encuentran los “films” y recubrimientos comestibles, los cuales pueden elaborarse a partir de hidrocoloides, como los polisacáridos, las proteínas y los lípidos. Además, sirven como vehículos para incorporar aditivos específicos como agentes antimicrobianos, antioxidantes o nutrientes, para retrasar la pérdida de humedad o para evitar el transporte de gases y solutos, lo que les convierte en una opción muy atractiva. Estos agentes deben poseer propiedades mecánicas que garanticen la adecuada adhesividad a los alimentos y ser totalmente neutros con respecto al color, tacto, sabor y olor de los mismos. Entre los conservantes naturales más utilizados destacan los aceites esenciales y sus componentes extraídos de diversas plantas comestibles, medicinales y herbáceas, debido a su excelente acción contra bacterias, virus, hongos, parásitos e insectos y sus propiedades antioxidantes.

En este trabajo se elaboran “films” de gelatina aditivados con un agente antimicrobiano natural como es el timol, que se incorpora tanto de manera libre como en forma de nanopartículas, para comprobar su eficacia contra *Escherichia coli* inoculada en manzanas “Gala”. También se utilizaron soluciones acuosas de timol y nanopartículas de timol para evaluar la influencia de este agente activo sobre algunas propiedades de la manzana. La gelatina es un biopolímero natural derivado de la hidrólisis controlada del colágeno insoluble fibroso presente en los huesos y la piel, y que tiene buena biocompatibilidad y biodegradabilidad, mientras que el timol es el componente principal del aceite esencial preparado a partir de la hierba de tomillo (*Thymus vulgaris*). Las nanopartículas fueron desarrolladas con ácido poliláctico y se elaboraron por el método de emulsión simple.

Por tanto, teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto, el objetivo principal de este trabajo fue elaborar “films” y recubrimientos de gelatina capaces de contener nanopartículas de timol como agente antioxidante y antimicrobiano para la conservación de piezas de fruta. En este caso se utilizaron manzanas como fruta modelo debido a su amplia disponibilidad y a la facilidad con la que son manipulables. Para ello, se establecieron los siguientes objetivos secundarios:

1. Determinar la influencia del timol, tanto libre como en forma de nanopartículas, sobre manzanas sumergidas en soluciones acuosas que contenían el agente activo.
2. Estudiar las características principales de los “films”.
3. Determinar la capacidad antimicrobiana del timol y las nanopartículas de timol sobre *E. coli* inoculado en manzanas mediante tres procedimientos diferentes: (a) inmersión en solución acuosa; (b) recubrimiento de gelatina y; (c) “films” de gelatina.

2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES

2.1. “Films” y recubrimientos comestibles

La diferencia entre un “film” y un recubrimiento radica en sus métodos de elaboración y formación; los recubrimientos se forman directamente sobre la superficie de un alimento, mientras que los “films” se elaboran de forma separada. Ambos se definen como matrices continuas que pueden estar formadas por polisacáridos, proteínas y/o lípidos. Ya en el siglo XII, los chinos formaban “films” con cera para proteger productos cítricos de la pérdida de agua. El primer “film” comercial con fines de conservación fue la Yuba, que se desarrolló en Japón durante el Siglo XV y estaba formado a partir de leche de soja. En la Inglaterra del Siglo XVI algunos productos se protegían con lardo de cerdo y desde 1930 en Estados Unidos se empezó a utilizar comercialmente la cera para naranjas y manzanas.

Los “films” y los recubrimientos comestibles están formados por tres componentes principales: polímero, solvente y plastificante.

- **Polímero:** es el componente mayoritario. Los polímeros que se utilizan son los hidrocoloides o los lípidos. Para elaborar “films” o recubrimientos con hidrocoloides se utilizan polisacáridos como el almidón, el quitosano, los alginatos, o la celulosa y proteínas como las de la soja o el suero de leche, gelatina, gluten de trigo o colágeno. Cuando se utilizan lípidos, son de uso común las ceras, los acilgliceroles y los ácidos grasos libres.
- **Solvente:** es necesario que sea un compuesto adecuado e inocuo para los alimentos, por lo que generalmente se usa agua para poder solubilizar el polímero. En raras ocasiones, cuando el compuesto no es soluble en agua, se utilizan soluciones acuosas de etanol.
- **Plastificante:** es el componente que se encuentra en menor proporción en la formulación de “films” y recubrimientos, pero es indispensable. Su objetivo es emulsificar fases que no son miscibles, además de impartir características particulares como flexibilidad y cierta resistencia. Además, suaviza la rigidez de la estructura, incrementando la movilidad de las cadenas poliméricas y reduciendo las fuerzas intermoleculares, con lo que se mejoran las propiedades

mecánicas. Generalmente se utilizan compuestos con bajo peso molecular y alto punto de fusión, como el sorbitol, el glicerol, el manitol, la sacarosa y el polietilenglicol.

La formación del “film” generalmente involucra diferentes tipos de enlaces (iónico, covalente, puentes de hidrógeno, interacciones electroestáticas, fuerzas de Van der Waals) entre las cadenas que conforman al polímero, formando una red semirígida que atrapa e inmoviliza al solvente. Solo los polímeros de alto peso molecular tienen suficiente fuerza de cohesión y capacidad de coalescencia para producir estructuras apropiadas para diferentes solventes. Existen diferentes técnicas para darle la forma final a los “films” y recubrimientos comestibles, como son la eliminación del solvente, la gelación térmica y la solidificación (Ávila-Sosa & López-Malo, 2008).

La función principal de los “films” y recubrimientos comestibles es ofrecer una barrera protectora entre el alimento y el ambiente contra la humedad, el O₂, el sabor y/o el aroma. Esta acción protectora puede ser mejorada con la adición de antioxidantes, antimicrobianos, sabores, nutrientes, etc. Además, pueden mantener la integridad de la comida proporcionando cierta protección mecánica.

Las propiedades de barrera comúnmente estudiadas para determinar la capacidad de este tipo de “films” para proteger a los alimentos son la permeabilidad al vapor de agua y la permeabilidad al oxígeno. La capacidad para proteger los alimentos contra los daños mecánicos se evalúa normalmente determinando: (1) los módulos de Young, que determinan la rigidez del “film”; (2) la resistencia a la tracción, que indica la fuerza de tracción requerida para romper el “film”; y (3) el alargamiento a la rotura, que da el grado al cual el “film” puede estirarse antes de romperse (Valencia-Chamorro, Palou, del Río, & Pérez-Gago, 2011).

En la Tabla 1 se recogen algunos requisitos y ventajas que deben tener estos “films” para considerarse adecuados (Dhall, 2013).

Tabla 1. Requisitos y ventajas de “films” y recubrimientos.

“Films” y recubrimientos comestibles	
Requisitos	Ventajas
<ul style="list-style-type: none"> • Ser resistentes al agua, para que permanezcan intactos y cubran el producto adecuadamente cuando se apliquen. • No agotar el O₂ ni acumular CO₂ en exceso y reducir la permeabilidad al vapor de agua. • Mejorar la apariencia y las propiedades mecánicas de manipulación, mantener la integridad estructural, transportar agentes activos y retener compuestos volátiles de sabor. • Derretirse por encima de 40 °C sin descomponerse. • Ser fácilmente emulsionables, no pegajosos y tener un rendimiento de secado eficiente. • Tener baja viscosidad y ser capaces de tolerar una ligera presión. • Ser económicos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Mejoran la apariencia externa de la fruta, dando brillo adicional a la superficie. • Reducen la pérdida de peso y mantienen la fruta firme, al proporcionar una barrera contra la humedad. • Reducen la velocidad de respiración y la producción de etileno, retardando así la senescencia. • Previenen de las lesiones por frío y los trastornos del almacenamiento. • Actúan como barrera para el intercambio libre de gases. • Tienen la capacidad de encapsular compuestos. • Reducen el uso de materiales de envase sintéticos

2.1.1. Propiedades de los “films” y recubrimientos comestibles

Como ya se ha comentado, los “films” y recubrimientos comestibles pueden formarse con dos polímeros diferentes: hidrocoloides (polisacáridos y proteínas) y lípidos. Por tanto, las propiedades que posean dependerán, principalmente, de su estructura química.

A. Hidrocoloides

Tanto los polisacáridos como las proteínas presentan buenas propiedades de barrera frente a gases como el O₂ y el CO₂ debido a su estructura de red unida por hidrógeno y una baja solubilidad. Sin embargo, forman una barrera pobre contra el vapor de agua debido a sus características hidrofílicas. Al limitar la disponibilidad de O₂ puedan retardar la respiración y la maduración de muchas frutas y verduras; la pobre propiedad de barrera al vapor de agua permite el movimiento del vapor a través del “film”, evitando la condensación del agua, que puede ser una fuente potencial de deterioro microbiano. También son una buena barrera contra los olores y los lípidos (Cha & Chinnan, 2004).

B. Lípidos

Los lípidos, debido a su naturaleza hidrófoba, se utilizan principalmente por ofrecer grandes propiedades de barrera contra el vapor de agua, ya que retardan la pérdida de humedad. También mejoran la apariencia al dar brillo a la superficie y proporcionan un soporte para fungicidas o reguladores de crecimiento. Sin embargo, forman “films” quebradizos que provocan condiciones aeróbicas a temperaturas de almacenamiento más altas y que no se adhieren a superficies de corte hidrófilas (Colla, do Amaral Sobral, & Menegalli, 2006). Pueden existir como monocapa (películas de grasa dura) o pueden añadirse a otros hidrocoloides para crear estructuras en forma de emulsión, dispersión, bicapa o multicapa (Basiak, Debeaufort, & Lenart, 2016). La estructura, el grado de saturación, la longitud de la cadena, el estado físico, la forma y la dimensión del cristal y su distribución influyen en las propiedades funcionales del “film”. (Cha & Chinnan, 2004).

Con el objetivo de mejorar las características generales de los “films” y recubrimientos, en muchos casos interesa combinarlos para formar “films” compuestos, basados en la combinación de hidrocoloides y lípidos. De esta forma, los lípidos proporcionan resistencia al vapor de agua y los hidrocoloides proporcionan la estabilidad estructural y la cohesión. Pero la mezcla de polímeros también tiene alguna desventaja, como lo es el que los lípidos reducen las propiedades mecánicas de los “films”, interfiriendo con los enlaces inter e intra moleculares por puentes de hidrógeno que se forman entre los hidrocoloides, lo cual produce un decremento en la fuerza de tensión y la temperatura de transición vítrea (Ávila-Sosa & López-Malo, 2008).

En un estudio de Oh J.H *et al.* (2004) desarrollaron “films” de proteínas de suero y caseína con/sin transglutaminasa y con/sin hidrolizado de zeína para ver como variaban las propiedades físicas y mecánicas. Los resultados mostraron que la adición de hidrolizado de zeína y transglutaminasa disminuye la solubilidad de los “films” de proteína de suero, pero no afecta significativamente la solubilidad de los “films” de caseína. Por otro lado, los “films” con hidrolizado de zeína mostraron menor resistencia a la tracción pero mayores valores de alargamiento, lo que indica una flexibilidad mejorada. Con estos datos concluyeron que, el hidrolizado de zeína y la transglutaminasa podrían utilizarse para mejorar la flexibilidad de los “films”, con un uso reducido de plastificante, sin sacrificar su permeabilidad al agua.

En 2014, Insaward *et al.* estudiaron el efecto de la adicción de ácido fenólico sobre “films” de proteína de soja. Para ello utilizaron ácidos ferúlico, caféico y gálico así como sus productos oxidados, comprobando que los ácidos fenólicos oxidados producían “films” con mayor resistencia a la tracción y alargamiento a la rotura que sus homólogos no oxidados, siendo los “films” con ácido gálico los que presentaban mayores valores. La adición de ácido fenólico también afectó al color y la transparencia. Además, mostraron una reducida permeabilidad al vapor de agua y una solubilidad en agua aumentada, especialmente a altas concentraciones.

Oliveira *et al.* (2015) comprobaron que la adicción de fibras de celulosa mejora las propiedades mecánicas de los “films” producidos con proteínas de grano de ricino. Aumentan la fuerza de punción, la resistencia a la tracción y la elasticidad y disminuyen el alargamiento a la rotura. Además, la carga de fibras de celulosa no afectó a otros parámetros como la humedad, el espesor, la solubilidad y la permeabilidad al vapor.

Recientemente, Basiak *et al.* (2016), para reducir el carácter higroscópico de los “films” de almidón, incorporaron aceite de colza mediante laminación (almidón de trigo-aceite de colza-almidón de trigo) y compararon estos “films” con otros que presentaban lípidos en su composición. Los “films” compuestos son más brillantes y menos transparentes que los “films” de almidón libres de grasa. La adición de grasa también aumentó notablemente la resistencia al vapor de agua y la permeabilidad al O₂ y mejoró la hidrofobicidad superficial.

2.1.2. “Films” aditivados con agentes antimicrobianos

La principal causa de deterioro de muchos alimentos es el crecimiento microbiano en la superficie del producto. Los patógenos más habituales en los alimentos son las bacterias, aunque también pueden tener virus, mohos o levaduras. Las bacterias más comunes en los alimentos son *Salmonella*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *S. aureus*, *Shigella* y *Y. enterocolitica*. Estas bacterias pueden causar infección, debido a la ingesta de alimentos contaminados con bacterias vivas que entran en el huésped y provocan enfermedad, e intoxicación, que aparece cuando se ingieren alimentos que antes se han contaminado con bacterias que producen toxinas causantes de enfermedad. Ambas se manifiestan con síntomas gastrointestinales que producen dolor abdominal, náuseas, vómitos y diarreas.

Todas estas bacterias pueden estar presentes en frutas o verduras, ya sea de forma directa o por tratamiento con agua contaminada. En este trabajo nos interesa especialmente *E. coli*, ya que es la bacteria que se va a inocular posteriormente en manzanas.

El género *Escherichia* contiene una única especie de interés desde el punto de vista de la microbiología humana: *E. coli*. Se trata de un bacilo Gram-negativo y anaerobio facultativo, perteneciente a la familia de las Enterobacterias, que se encuentra en el tracto gastrointestinal de los seres humanos (principalmente en el colon). La mayoría de las veces es inocua para el individuo que la alberga, ya que se establece una relación simbiótica (se nutre de los alimentos de su hospedador pero también sintetiza vitamina K, nutriente indispensable para la coagulación de la sangre que el ser humano no puede sintetizar por sí mismo). Sin embargo, existen al menos cinco cepas de *E. coli* que se transmiten por ingestión de agua o alimentos contaminados con materia fecal que causan enfermedad y son:

1. *E. coli* enteropatógena (ECEP): adhesión íntima y destrucción de las microvellosidades de los enterocitos. El cuadro clínico que produce se manifiesta con diarrea acuosa leve o moderada, vómitos, fiebre baja y mala absorción. Esta cepa afecta principalmente a niños menos de seis meses y a niños de dos años.
2. *E. coli* enterotoxigénica (ECET): adhesión + enterotoxina termolábil o termoestable o ambas. Causa diarrea aguda, generalmente sin sangre, sin moco y sin pus y en pocos casos se presenta con fiebre y vómitos. Es importante en niños menores de edad, sobre todo en lactantes menores de seis meses.
3. *E. coli* enteroadhesiva o enteroagregante (ECEA): en niños puede manifestarse con diarrea acuosa de color verde, con moco, sin sangre y sin fiebre, que en ocasiones puede llegar a ser severa y requerir de rehidratación intravenosa. Algunas veces, el cuadro clínico se presenta como diarrea con moco con o sin sangre, vómitos y con o sin fiebre.
4. *E. coli* enteroinvasiva (ECEI): adhesión + invasión enterocitos y propagación a enterocitos adyacentes. Causa diarrea acuosa con sangre y moco debido a la invasión y destrucción del epitelio intestinal, aunque en algunos casos solo se presenta diarrea (indiferenciable de la que produce ECET). Es importante en niños mayores de seis meses.

5. *E. coli* enterohemorrágica (ECEH): es la que más preocupa por causar cuadros clínicos muy graves. Tiene un doble mecanismo de patogenicidad: (1) la mayoría de las cepas se adhieren de forma íntima a las microvellosidades intestinales y las erosionan hasta hacerlas desaparecer, causando diarreas acuosas sin fiebre; (2) las cepas producen toxina de Shiga (verotoxina) que destruye los capilares intestinales, dando lugar a diarreas sanguinolentas con dolor abdominal intenso pero sin fiebre (colitis hemorrágicas) y a veces los capilares de los riñones, lo que a su vez origina el síndrome hemolítico urémico (SHU), un cuadro clínico que implica fallo renal muy severo y potencialmente mortal. La mayoría de los brotes se deben al consumo de carne de vacuno poco cocinada, pero también pueden producirse por vegetales regados con agua contaminada.

E. coli puede crecer a temperaturas que oscilan entre 7 y 50 °C, con una temperatura óptima de 37 °C. Se destruye cocinando los alimentos hasta que todas las partes alcancen una temperatura de 70 °C o más.

La aplicación de agentes antimicrobianos puede crear un ambiente que retrase o incluso impida el crecimiento de estos microorganismos en la superficie del producto y, por lo tanto, conducir a una extensión de la vida útil y la seguridad del alimento. Estos antimicrobianos pueden incorporarse a los materiales de envasado o recubrirse sobre la superficie de los alimentos y deben clasificarse como aditivos de calidad alimentaria o compuestos generalmente reconocidos como seguros (Generally Recognized As Safe, GRAS) por las regulaciones pertinentes.

El objetivo de los “films” aditivados es alterar las condiciones que rodean al alimento para mantener la calidad del producto mediante la difusión controlada de uno o más agentes antimicrobianos del material de envasado al alimento, sin aumentar en exceso su concentración final en el producto (Cagri, Ustunol, & Ryser, 2004). Los “films” antimicrobianos se pueden dividir en dos tipos: en primer lugar, aquellos que contienen un agente antimicrobiano que migra a la superficie del alimento; en segundo lugar, los que son eficaces contra el crecimiento superficial sin la migración de los agentes activos al alimento. Al seleccionar el agente antimicrobiano que se va a incorporar se debe considerar su efectividad frente a los microorganismos diana, pero es igualmente importante observar su interacción potencial con el hidrocoloide y con los componentes

alimenticios sobre los que actuará. Entre los compuestos que pueden portar los “films” se encuentran enzimas, agentes quelantes, bacteriocinas, benzoatos, propionatos, parabenos, sorbatos, agentes curantes y antimicrobianos de origen natural como los aceites esenciales. Estos compuestos tienen la capacidad de extender la vida de un producto y reducir el riesgo de crecimiento de patógenos en la superficie de los alimentos (Cha & Chinnan, 2004).

La eficacia funcional de los “films” antimicrobianos depende en gran medida de (1) la naturaleza y tipo de hidrocoloide utilizado en la matriz estructural, (2) el agente antimicrobiano seleccionado, (3) las características fisicoquímicas del producto alimenticio a proteger y (4) todas sus interacciones. Existen muchos estudios en los que se prueba la eficacia de “films” aditivados con agentes activos como los aceites esenciales, los ácidos orgánicos y la nisina entre otros. Algunos de estos estudios se comentan a continuación y, además, en la Tabla 2 se pueden encontrar más ejemplos. En un estudio de Rojas-Graü *et al.* (2006) se desarrollaron “films” a base de pectina y puré de manzana con aceites esenciales de orégano, canela y limoncillo que presentaban actividad antimicrobiana contra *E. coli*, siendo el “film” de orégano el más efectivo. Similarmente, Du *et al.* (2009) comprobaron la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de pimienta, ajo y orégano en “films” de pectina y puré de tomate contra *E. coli*, *S. entérica* y *L. monocytogenes* siendo nuevamente el más efectivo el de orégano.

Jin *et al.* (2009) utilizaron la actividad antimicrobiana de “films” de pectina incorporados con nisina, y su combinación con el tratamiento de la radiación ionizante, para controlar *L. monocytogenes* en carne de pavo. Los resultados mostraron que en el tratamiento sin irradiación se redujo *L. monocytogenes* en 1,76 log UFC/cm², mientras que con irradiación la reducción fue más elevada (3,95 log UFC/cm² a 1 kGy y 5,35 log UFC/cm² a 2 kGy).

Además, según Mild *et al.* (2011), el carvacrol o el cinamaldehído incorporados en “films” comestibles de manzana, han mostrado actividad antimicrobiana contra *C. jejuni*, una de las principales causas de enfermedad diarreica bacteriana en todo el mundo, en pechugas de pollo.

En 2013, Kavooosi *et al.* hicieron “films” de gelatina mezclados con timol con el fin de evaluar su uso potencial como apósito antioxidante y antimicrobiano para nano heridas. Para ello prepararon “films” con el 10% de gelatina que contenían timol al 1, 2, 4 y 8% de su peso, glutaraldehído como reticulante y glicerol como plastificante. La actividad

antibacteriana se ensayó contra dos bacterias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli*) y dos bacterias Gram-positivas (*S. aureus* y *Bacillus subtilis*) y fue mayor contra *S. aureus* y *B. subtilis* seguidos de *E. coli* y por último *P. aeruginosa*.

Tabla 2. Ejemplos de “films” aditivados con agentes antimicrobianos.

“Film”	Antimicrobiano	Objetivo	Efecto	Referencia
Proteínas de soja	Ácidos cítrico, láctico, málico y tartárico	<i>L. monocytogenes</i> <i>E. coli</i> O157:H7 <i>Salmonella gaminara</i>	Inhibición total de <i>L. monocytogenes</i> . Ácidos málico y tartárico más eficaces que el cítrico contra <i>S. gaminara</i> . Ácidos cítrico y tartárico más eficaces que el málico y el láctico contra <i>E.coli</i> O157:H7.	Eswaranandam <i>et al.</i> (2004)
	Nisina con extracto de semilla de uva	<i>L. monocytogenes</i> <i>S. typhimurium</i> <i>E. coli</i> O157:H7	Reducción de <i>L. monocytogenes</i> en 2,9 UFC mL ⁻¹ , de <i>E. coli</i> O157:H7 en 1,8 UFC mL ⁻¹ y de <i>S. typhimurium</i> en 0,6 UFC mL ⁻¹ .	Sivarooaban <i>et al.</i> (2008)
HPMC	Nisina	<i>Listeria</i> <i>Enterococcus</i> <i>Bacillus spp</i>	Los “films” demostraron eficacia contra las tres cepas.	Imran <i>et al.</i> (2010)
Almidón de patata	Sorbato de potasio	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	Solo inhiben <i>E. coli</i>	Shen <i>et al.</i> (2010)
Proteínas de suero de leche	Ácidos láctico, málico y cítrico	<i>L. monocytogenes</i>	Eficacia del ácido láctico < ácido cítrico < ácido málico	Pintado <i>et al.</i> (2009)
	Nisina con ácidos láctico, málico o cítrico		Mayor inhibición del ácido málico con nisina	
	Orégano, clavo, cilantro, tomillo, laurel, romero	<i>L. innocua</i> <i>S. aureus</i> <i>S. enteritidis</i> <i>Pseudomonas fragi</i>	Los “films” de orégano y clavo resultan eficaces contra las cuatro cepas probadas	Fernández-Pan <i>et al.</i> (2012)

2.1.3. Utilización de “films” para conservar frutas

Los productos alimenticios están constantemente expuestos a deshidratación, deterioro y pérdida de color, sabor y valores nutricionales durante la manipulación, el almacenamiento y el transporte. Por este motivo, la industria alimentaria busca continuamente nuevos sistemas y materiales de envasado para prevenir el deterioro de alimentos y la pérdida de calidad de los mismos, y así prolongar su vida útil. Los “films” y recubrimientos comestibles pueden contribuir a prolongar la vida útil de las frutas recién cortadas al reducir la humedad y la migración de los solutos, el intercambio gaseoso, la respiración, las tasas de reacción oxidativa e incluso, la supresión de trastornos fisiológicos. Todo ello reforzado con su alto potencial para transportar ingredientes activos (Rezvani, Schleining, Sümen, & Taherian, 2013).

Los “films” vienen probándose desde hace años como método de conservación de frutas y verduras (Tabla 3), pero en los últimos años se han llevado a cabo muchos trabajos basados en el desarrollo de “films” y recubrimientos de proteínas y polisacáridos con aditivos alimentarios para controlar el crecimiento microbiano en alimentos frescos y procesados. Los “films” de quitosano que contienen natamicina fueron eficaces para controlar la desintegración de los melones "Hami" causada por infecciones naturales de *Alternaria alternata* y *Fusarium semitectum*. Este “film” también mejoró las propiedades de calidad de la fruta recubierta (Cong, Zhang, & Dong, 2007).

Rojas-Graü *et al.* (2007) incorporaron aceites de limoncillo y orégano y vainillina en revestimientos comestibles de puré-alginato de manzana para prolongar la vida útil de manzanas "Fuji". Todos los antimicrobianos inhibieron significativamente el crecimiento de aerobios, levaduras y mohos psicrófilos. Los “films” que contenían aceite de limón o de orégano exhibían la actividad antimicrobiana más fuerte contra *L. innocua*. Además, los “films” redujeron la tasa de respiración y la producción de etileno de las manzanas recién cortadas recubiertas. La adición de cloruro de calcio a los “films” mantuvo la firmeza y el color de la fruta, excepto en los que contenían hierba de limón que causó un ablandamiento severo. Los “films” que contenían vainillina fueron los mejores en términos de calidad sensorial.

En un estudio de Oms-Oliu *et al.* (2008) se probó el efecto de “films” comestibles basados en alginato, pectina y gellan con N-acetilcisteína y glutatión en el intercambio gaseoso, las propiedades antioxidantes, la calidad sensorial y la estabilidad microbiana en peras “Flor de Invierno”. El uso de estos “films” basados en polisacáridos aumentó la

resistencia al vapor de agua. Además, la incorporación de N-acetilcisteína y glutatión no sólo ayudó a controlar el pardeamiento enzimático, sino que también retrasó el deterioro microbiológico y dio como resultado una reducción de la producción de etileno. Los recubrimientos de alginato y pectina también resultaron eficaces para mantener la calidad sensorial durante 2 semanas. También en este año, Sangsuwan *et al.* aplicaron tres tipos de “films” (comercial, quitosano y metil celulosa, quitosano y metil celulosa con vainillina) sobre melón y piña. Los “films” de quitosano/metil celulosa y de vainillina proporcionaron efecto inhibitorio contra *E.coli* y *S. cerevisiae*. Además, el “film” de vainillina redujo más rápido el número de levaduras en ambas frutas y aumentó la intensidad del color en la piña, pero también redujo su contenido en ácido ascórbico (al final del almacenamiento su contenido era solo el 10% de su concentración inicial). Por su parte, el “film” comercial mantuvo mejor el contenido de humedad y la piña extraída de estos “films” tenía mayores tasas de respiración y contenido de etanol.

En 2009, Valencia-Chamorro *et al.* estudiaron la eficacia de “films” compuestos de hidroxipropil-metil-celulosa (HPMC) - lípidos con aditivos alimentarios antifúngicos (sales minerales, sales de ácidos orgánicos y sus mezclas, parabenos y sus mezclas, y otros compuestos GRAS) para controlar moldes verdes y azules en diferentes variedades de naranjas y mandarinas incubadas a 20 °C durante 7 días. Entre todos los “films” ensayados, los que contenían sorbato de potasio, benzoato de sodio, propionato de sodio y sus mezclas fueron los más efectivos para reducir la incidencia y gravedad de los moldes verdes y azules cuando las naranjas o las mandarinas fueron recubiertas 24 horas después de la inoculación fúngica.

Recientemente, Koushesh Saba (2015) comprobó que los “films” de carboximetilcelulosa (CMC) en combinación con ácido ascórbico parecen tener un efecto sinérgico para el control del pardeamiento superficial de manzanas, retardan el ablandamiento de los tejidos, mantienen la vitamina C y tienen mayor capacidad antioxidante en comparación con manzanas no recubiertas. Ese mismo año, Fakhouri *et al.* desarrollaron y evaluaron las propiedades fisicoquímicas de “films” a base de almidón de maíz y gelatina con glicerol o sorbitol, utilizando el que presentaba los valores más adecuados para recubrir uvas “Red Crimson”, con el objetivo de alargar su vida útil. Se usaron “films” de almidón de maíz ceroso modificado y gelatina (1:1) con glicerol y, como se observa en la Figura 1, se consiguió mejorar la apariencia de las

uvas después de 21 días de almacenamiento en refrigeración, produciéndose menor pérdida de peso que en el control.

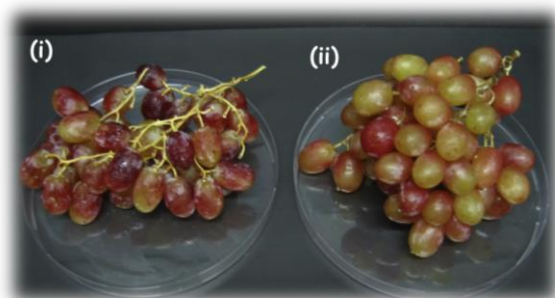


Figura 1. Uvas “Red Grimson” después de 21 días de almacenamiento en refrigeración: (i) muestra control y (ii) uvas cubiertas con almidón de maíz ceroso modificado y gelatina (1:1) con glicerol. Tomada de Fakhouri *et al.* (2015).

Tabla 3. Aplicación de “films” en frutas y verduras. Adaptada de Cagri *et al.* (2004).

“Films”	Frutas y verduras	Beneficios	Referencias
Dextrina	Manzanas	Reducen pardeamiento oxidativo	Murray <i>et al.</i> (1973)
Quitosano	Pimiento verde y pepino	Reducen respiración, pérdida de color, marchitamiento e infección por hongos.	Ghaouth <i>et al.</i> (1991)
	Tomate	Madurez retardada y vida útil prolongada	El Ghaouth <i>et al.</i> (1992)
	Melocotón	Reducen pudrición parda y retrasan aparición de enfermedad por <i>Monilinia</i>	Li <i>et al.</i> (2001)
	Papaya	Reducen un 40% la antracnosis postcosecha por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Bautista-Baños <i>et al.</i> (2003)
	Manzana	Resistencia al moho azul postcosecha causado por <i>Penicillium expansum</i>	De Capdeville <i>et al.</i> (2002)
	Fresa	Reducen pérdida de peso durante almacenamiento y presentan actividad antifúngica contra <i>Rhizopus sp.</i> y <i>Cladosporium sp.</i>	Park <i>et al.</i> (2005)
Caseína	Zanahoria	Reducen deshidratación y formación de rubor blanco	Avena-Bustillos <i>et al.</i> (1993) (1994)
Caseinato de sodio	Pimiento verde	Reducen la penetración de O ₂ y CO ₂	Lerdthanangkul <i>et al.</i> (1996)
Proteína de soja	Manzanas “Fuji” y “Golden”	Cambios retardados de firmeza, color y acidez	

2.2. Timol

El timol (2-*isopropil*-5-metilfenol) es una sustancia cristalina e incolora con un olor característico, perteneciente al grupo de los terpenos, cuya estructura química está representada por un grupo fenólico con un alto poder hidrofóbico (Figura 2). Es un fenol monoterpénico, también conocido como “hidroxi cimeno”, que se encuentra en los aceites esenciales extraídos de plantas pertenecientes a la familia *Lamiaceae*, como los de los géneros *Thymus*, *Ocimum*, *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra* y *Monarda*. Tiene baja solubilidad en agua y es rápidamente absorbido o degradado dentro del estómago y el intestino delgado (Marchese, Orhan, Daglia, Barbieri, Di Lorenzo, Nabavi, et al., 2016).

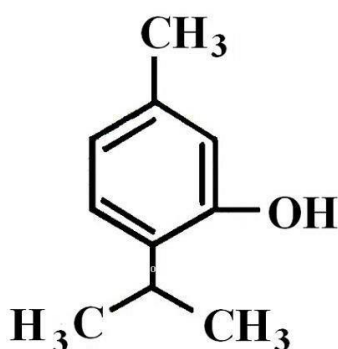


Figura 2. Estructura química del Timol.

Los aceites esenciales obtenidos de las especies anteriores han sido utilizados en la industria alimentaria desde la antigüedad como agentes aromatizantes y conservantes gracias a sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Hay constancia de que los antiguos egipcios utilizaban el tomillo, y por tanto el timol, para la conservación de sus momias debido a sus propiedades bactericidas.

El timol y otros componentes presentes en los aceites esenciales (carvacrol, carvona, cinamaldehído, citral, p-cimeno, eugenol, limoneno y mentol) han sido registrados por la Comisión Europea para su uso como aromatizantes de productos alimentarios debido a la falta de riesgo para la salud del consumidor. Por otra parte, la Administración de Alimentos y Medicamentos (*Food and Drug Administration, FDA*) de los Estados Unidos clasifica estas sustancias como GRAS o como aditivos alimentarios sintéticos. (Falcone, Speranza, Del Nobile, Corbo, & Sinigaglia, 2005).

Además de usarse en la industria alimentaria, las hierbas aromáticas mencionadas anteriormente y su componente principal de aceite esencial, el timol, se han utilizado desde la antigüedad por sus propiedades medicinales. Por ejemplo, la albahaca (*Ocimum basilicum L.*) se ha utilizado tradicionalmente como planta medicinal en el tratamiento de dolores de cabeza, tos, diarrea, estreñimiento, verrugas, gusanos y malfuncionamiento renal. También se usa en formulaciones comerciales por su efecto repelente sobre los mosquitos, por lo que podría ser útil en la búsqueda de nuevos insecticidas naturales (Marchese, et al., 2016).

En lo que respecta a su síntesis, el timol se obtiene por adición de m-cresol a propeno (Figura 3).

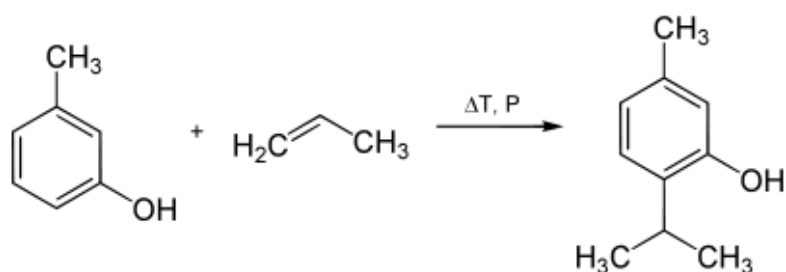


Figura 3. Síntesis del timol.

En cuanto a su mecanismo de acción, el timol es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, permitiendo la salida de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática (García-García & Palou-García, 2008).

2.2.1. Propiedades del timol

El timol y su principal fuente natural, el tomillo (*Thymus vulgaris*), se emplean por sus propiedades antioxidantes positivas, antiinflamatorias, anestésicas locales, cicatrizantes, antisépticas, antibacterianas y antifúngicas, así como por sus efectos beneficiosos sobre el sistema cardiovascular (Marchese, et al., 2016).

A continuación, nos centraremos exclusivamente en su eficacia antioxidante y antimicrobiana, las cuales son ampliamente reconocidas (Tabla 4). Sus propiedades antimicrobianas se han investigado mediante ensayos in vitro e in vivo, lo que demuestra que es eficaz contra bacterias de deterioro natural y contra patógenos

transmitidos por alimentos. La actividad antibacteriana del timol puede resultar, al menos en parte, de la disrupción de una capa lipídica de la membrana citoplasmática de las células, lo que da lugar a una interrupción de su continuidad (K.-K. Li, Yin, Yin, Tang, Yang, & Wen, 2013).

Un estudio de Olasupo *et al.* (2003) determinó la actividad antibacteriana de timol en comparación con carvacrol, ácido trans-cinámico, eugenol y diacetilo, contra *Escherichia coli* y *Salmonella entérica serotipo Typhimurium*, comprobando que el timol era el más eficaz. Por su parte, Trombetta *et al.* (2005) evaluaron la capacidad del timol y otros monoterpenos para dañar las membranas lipídicas bacterianas, a fin de comprender mejor sus mecanismos de acción. También informaron de sus actividades antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus* ATCC 68380 y *E. coli* ATCC 15221 aislados utilizando el método de microdilución. Los resultados del estudio mostraron que *S. aureus* parece ser más sensible que *E. coli* al timol. Sobre la base de resultados de permeabilidad los autores especularon que el efecto antimicrobiano del timol puede resultar, al menos en parte, de una perturbación de la fracción lipídica de la membrana plasmática bacteriana que resulta en la fuga de materiales intracelulares.

En 2008, Xu *et al.* estudiaron los efectos del timol sobre *E. coli* utilizando el método de la curva de tiempo de muerte. Para ello, los autores utilizaron colorantes fluorescentes combinados con citometría de flujo para analizar el efecto de los monoterpenos sobre la permeabilidad de la membrana y el potencial de membrana. Los resultados de la curva de tiempo de muerte muestran que el timol (a 200 mg mL⁻¹) podría inhibir el crecimiento de *E. coli*. Además, este estudio confirmó que el efecto antibacteriano está relacionado con la capacidad de este compuesto natural para inducir la permeabilización y despolarización de la membrana citoplasmática y mostró el uso potencial de la citometría de flujo como un método para investigar el mecanismo de acción antimicrobiana de monoterpenos.

Wattanasatcha *et al.* (2012) sugirieron el uso de timol encapsulado en formulaciones cosméticas de loción como conservante contra la contaminación bacteriana. Ese mismo año, Shah *et al.* evaluaron la eficacia del timol dispersado en nanocápsulas, en la inhibición de *E. coli* O157: H7 y *Listeria monocytogenes* en sidra de manzana y leche reducida en grasa, en comparación con timol libre (bajo diferentes pH y condiciones de temperatura), ejerciéndose actividad inhibidora contra ambos patógenos en todos los tratamientos.

Tabla 4. Propiedades antimicrobianas del timol y sus derivados. Adaptada de Marchese *et al.* (2016).

Tipo de muestra	Bacterias y Hongos	Resultado principal	Referencia
Aceites esenciales de <i>Thymus vulgaris</i>	<i>E. coli</i> <i>Proteus mirabili y vulgaris</i> <i>S. typhimurium</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Pseudomonas fluorescens y putida</i> <i>Micrococcus spp.</i> <i>Sarracenia flava</i> <i>S. aureus</i> <i>Bacillus licheniformi y thuringiensis</i> <i>Listeria innocua</i>	Todos los aceites esenciales de tomillo tenían actividad bacteriostática contra los microorganismos ensayados	Marino <i>et al.</i> (1999)
Timol y otros aceites esenciales	<i>E. coli</i> <i>S. typhimurium</i>	Concentración inhibitoria mínima (CIM): 1,2 mmol L ⁻¹ y 1,0 mmol L ⁻¹ respectivamente	Olasupo <i>et al.</i> (2003)
Timol	<i>S. aureus</i> ATCC 68380 <i>E. coli</i> ATCC 15221	CIM: 0,31 mg mL ⁻¹ y 5,00 mg mL ⁻¹ respectivamente	Trombetta <i>et al.</i> (2005)
Timol y otros aceites esenciales	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 <i>E. coli</i> ATCC 25922 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	CIM: 0,156 mg mL ⁻¹ para <i>S. aureus</i> , 0,039 mg mL ⁻¹ para <i>P. aeruginosa</i> y 0,010 mg mL ⁻¹ para <i>E. coli</i>	Wattanasatcha <i>et al.</i> (2012)
Timol	<i>E. coli</i> O157:H7 <i>L. monocytogenes</i>	CIM: 0,5 g L ⁻¹ para ambos patógenos	Shah <i>et al.</i> (2012)
Aceites esenciales de <i>T. vulgaris</i> y <i>T. serpyllum</i>	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i> mostró una alta sensibilidad al timol, <i>E. coli</i> mostró menor sensibilidad al timol y <i>P. aeruginosa</i> mostró resistencia a la mayoría de los aceites esenciales probados, excepto al timol.	Abu-Darwish <i>et al.</i> (2012)
Timol	<i>L. monocytogenes</i>	CIM: 0,2 mg L ⁻¹	Pan <i>et al.</i> (2014)
Timol y otros compuestos	<i>L. monocytogenes</i> <i>S. typhimurium</i> ,	CIM: 1024 µg mL ⁻¹ para <i>L. monocytogenes</i> y 256 µg mL ⁻¹ para <i>S. typhimurium</i>	Liu <i>et al.</i> (2015)

Sin embargo, existen algunas limitaciones en cuanto a su uso en productos alimenticios. Debido a su baja solubilidad en agua, es difícil dispersar timol uniformemente en matrices alimentarias cuando se requiere una dosis por encima de su solubilidad. Además, la actividad antimicrobiana del timol está relacionada con la despolarización de la membrana citoplasmática bacteriana y se requiere una concentración de timol suficientemente alta para acceder y modificar la estructura de dicha membrana. Un método común para superar la baja solubilidad de compuestos bioactivos es disolverlos en un disolvente menos polar o dispersarlos en sistemas de suministro tales como emulsiones o partículas de biopolímero (Pan, Chen, Davidson, & Zhong, 2014).

2.3. Nanopartículas

Las nanopartículas son sistemas coloidales que varían en tamaño de 10 a 100 nm de diámetro y están formuladas a partir de un polímero biodegradable en el que el agente terapéutico está atrapado, adsorbido o acoplado químicamente sobre la matriz polimérica. Aunque se han investigado diversos polímeros para la formulación de nanopartículas biodegradables, los ácidos poliláctico (APL) y poliláctico-co-glicólico (APLG) que son polímeros biocompatibles y biodegradables aprobados por la FDA, han sido los más ampliamente estudiados (Sahoo, Panyam, Prabha, & Labhsetwar, 2002). A continuación se explican las características del APL, ya que es el polímero utilizado para la realización de las nanopartículas en este trabajo.

2.3.1. Ácido poli-láctico

El APL es un poliéster alifático altamente versátil producido enteramente a partir de recursos 100% renovables, como la remolacha azucarera, el maíz y el trigo tras la fermentación del almidón y la polimerización por condensación del ácido láctico. Durante los últimos años, ha sido ampliamente estudiado para su uso en aplicaciones biomédicas y farmacéuticas debido a su biocompatibilidad y su biodegradabilidad. Sin embargo, el desarrollo de nuevas tecnologías para la fabricación a gran escala y los menores costos de procesamiento permiten su uso en otras áreas de productos como

materiales compuestos y embalajes. (Gonçalves, Tomé, Garcia, Brandão, Mendes, & Marrucho, 2013).

Como material de envasado es atractivo porque presenta una resistencia a la tracción comparable a la de termoplásticos derivados del petróleo, se degrada en condiciones de compostaje comercial, puede sellarse a bajas temperaturas y es resistente al aceite. También ha demostrado actividad antimicrobiana cuando se usa en una solución de oligómeros o en combinación con algunos ácidos orgánicos o agentes antimicrobianos (L. Liu, Finkenstadt, Liu, Jin, Fishman, & Hicks, 2007). Sus inconvenientes principales son la fragilidad excesiva y la insuficiente barrera al O₂, el CO₂ y el vapor de agua (Gonçalves, Tomé, Garcia, Brandão, Mendes, & Marrucho, 2013) y sus aplicaciones están limitadas por factores como su baja temperatura de transmisión vítrea, su baja estabilidad térmica y su baja tenacidad y ductilidad (Jamshidian, Tehrany, Cleymand, Leconte, Falher, & Desobry, 2012).

2.3.2. Nanopartículas de timol

Como se puede ver en la Tabla 5, existen varias técnicas para la preparación de nanopartículas, que se pueden clasificar en cuatro categorías (Lee, Yun, & Park, 2016).

Tabla 5. Técnicas de preparación de nanopartículas.

Categoría	Métodos
1. Métodos tradicionales basados en emulsión	<ul style="list-style-type: none"> - Emulsión simple - Emulsión doble - Emulsiones múltiples
2. Métodos basados en la precipitación	<ul style="list-style-type: none"> - Nano-precipitación - Rápido extensión del fluido supercrítico en líquido - Salado - Diálisis
3. Métodos de composición directa	<ul style="list-style-type: none"> - Técnica de fusión - Secado por pulverización - Técnica de fluidos supercríticos (SCF)
4. Nuevos enfoques	<ul style="list-style-type: none"> - Técnica microfluídica - Técnica basada en moldes

En este trabajo, para la preparación de las nanopartículas de APL se utilizó la técnica de emulsión simple o extracción con disolvente, que es una de las más sencillas. Consiste en formar una solución del polímero y el compuesto activo en un disolvente orgánico inmisible o parcialmente miscible en agua. Posteriormente, la fase orgánica es emulsificada en agua mediante agitación intensa por medio de un homogeneizador, por microfluidización o por ultrasonido (en algunas ocasiones se emplea un tensoactivo para estabilizar la emulsión). Finalmente, el solvente orgánico se evapora (algunas veces a presiones reducidas, de acuerdo a la estabilidad del principio activo que se esté atrapando), lo que causa que el polímero insoluble en agua precipite, formando nanopartículas con el compuesto activo incluido. Estas se recuperan por centrifugación o filtración y se resuspenden en agua para una posterior liofilización con el objetivo de almacenarlas. La cantidad de compuesto activo que se puede atrapar se ve limitada tanto por la cantidad que se puede solubilizar en el solvente a emplear, como por la afinidad del compuesto activo por el agua, ya que los compuestos que son altamente hidrófilos pueden migrar hacia el agua, disminuyendo la cantidad que se atrapa dentro de las nanopartículas (Lancheros, Beleño, Guerrero, & Godoy-Silva, 2014).

En un estudio de Guarda *et al.* (2011) se determinaron las propiedades antimicrobianas de “films” con un revestimiento de microcápsulas que contenían carvacrol y timol. Ambos agentes mostraron actividad antimicrobiana significativa frente a *E. coli* O157: H7, *S. aureus*, *L. innocua*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus niger*. Estos resultados demuestran la posibilidad de utilizar carvacrol y timol microencapsulado en una matriz polimérica para la conservación de alimentos frescos. A esta misma conclusión llegaron Chen *et al.* (2015), al co-encapsular el timol y el eugenol en nanopartículas de zeína/caseína. Las concentraciones de eugenol y timol realmente disueltos en el suero de leche fueron mucho menores que sus concentraciones totales, pero el eugenol y el timol co-encapsulados fueron eficaces para inhibir el crecimiento de *E. coli* O157: H7 y *L. monocytogenes*.

Por último, Pan *et al.* (2014) compararon las propiedades antimicrobianas del timol encapsulado en caseinato de sodio con las del timol libre, utilizando *L. monocytogenes* como una bacteria diana en medios de crecimiento microbiano y leche. Los resultados mostraron una actividad antilisterial significativamente mejorada en el timol encapsulado.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

El APL (180 kDa) ha sido producido por NatureWorks bajo la marca Ingeo™ (4032D). Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Aldrich (St Louis, USA): Gelatina, (ref. G1890), timol (ref. T0501), diclorometano (DCM, ref. 270997), alcohol de polivinilo (APV, ref. P8136), solución tamponadora Trizma® (ref. T1819), el 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH, ref. D9132) y medio *Nutrient Broth* (NB, ref. 70149NB). El agar se adquirió en VWR (Pensilvania, USA) y el medio de soja-triptona (ST) fue suministrado por Biokar Diagnostics (Grupo Solabia, Francia).

3.2. Elaboración de las nanopartículas

Se prepararon 5 mL de DCM con 150 mg de APL y otros 2,5 mL de DCM con 150 mg de timol. Estas dos soluciones se mezclaron y se añadieron a 30 mL de una solución acuosa saturada en timol y con 1% (p/v) de APV. Esta mezcla se trató con ultrasonidos durante 2,5 minutos usando el sistema Sonopuls HD 2070 (Bandelin, Alemania), equipado con una sonda MS 73, a una frecuencia de 20 kHz y aplicando una amplitud de sonicación del 90% (100% de amplitud equivalen a 212 μm). Durante el tratamiento con ultrasonidos la muestra se mantuvo en hielo para evitar el aumento de temperatura. A continuación, para eliminar del medio el DCM contenido en la muestra, se utilizó un rotavapor (Büchi R-205, Büchi Labortechnik, Essen, Alemania) operado a 40 °C durante 50 minutos. La solución libre de DCM fue centrifugada a 13000 rpm durante 20 minutos para producir la precipitación de todas las partículas de APL formadas y eliminar de esta forma el sobrenadante, el cual contiene un exceso de APV y de timol. El sedimento fue resuspendido en agua destilada y la muestra fue nuevamente centrifugada, pero esta vez a 4000 rpm durante 5 minutos con el objetivo de eliminar las partículas más grandes formadas, por lo que el sedimento fue descartado. El tamaño de las nanopartículas contenidas en la muestra fue de $244,6 \pm 4,5$ nm y esta medida se determinó mediante un dispositivo de dispersión de luz dinámica (nanosizer zs, Malvern, UK). Para medir el contenido en timol se realizó una extracción con etanol

(96°), de tal forma que una alícuota de la solución con nanopartículas fue centrifugada a 13000 rpm durante 20 minutos, el sobrenadante fue descartado y el mismo volumen fue incorporado en forma de etanol. El sedimento fue dispersado con ayuda del sonicador, para a continuación volver a centrifugar la mezcla a 13000 rpm durante 20 minutos. Finalmente, a 9,9 mL de etanol se le añadieron 0,1 mL del sobrenadante obtenido y la absorbancia de esta disolución fue medida a 275 nm utilizando un espectrofotómetro (Spekol 1500, Analytik Jena AG, Jena, Alemania). Previamente, cantidades conocidas de timol fueron disueltas en etanol, realizándose una recta de calibrado a esa misma longitud de onda. La eficacia de encapsulación del timol fue del $60,3 \pm 9\%$.

3.3. Caracterización de las manzanas tratadas con timol libre, con timol contenido en nanopartículas y sin tratar

Se eligieron manzanas “Gala” de un mismo lote, con aproximadamente el mismo grado de madurez, seleccionadas por tener un tamaño uniforme y descartando las que tenían lesiones mecánicas. Las manzanas se desinfectaron por inmersión en una solución 500 ppm de hipoclorito de sodio durante 1 minuto, se aclararon con agua y se secaron. A continuación, se cortaron en 8 gajos de similares proporciones con un cuchillo de acero inoxidable previamente desinfectado con alcohol (96°), retirando la cavidad de la semilla. Finalmente, estos gajos se sometieron a tratamiento durante 2 minutos de la siguiente manera:

- i. Inmersión en agua como control.
- ii. Inmersión en una solución de agua destilada saturada con timol ($0,94 \text{ mg mL}^{-1}$).
- iii. Inmersión en una solución de nanopartículas de timol de 2 mg mL^{-1} .

La concentración de timol ensayada en agua destilada fue la máxima solubilidad obtenida después de mantener bajo agitación durante 15 horas una mezcla de agua con 2 mg mL^{-1} de cristales de timol. Después de ese tiempo, el exceso de timol fue filtrado con bomba de vacío, primero utilizando papel Whatman N°1, y a continuación utilizando un filtro de PVDF de $0,45 \mu\text{m}$ de MWCO. La cantidad de timol solubilizado se determinó midiendo la absorbancia de la solución acuosa a 275 nm y comparando los valores obtenidos con una recta de calibrado realizada previamente. Por otro lado, para

ensayar el efecto del timol contenido en las nanopartículas se ensayó una concentración de 2 mg mL^{-1} , para así evidenciar el efecto del timol más allá de su solubilidad en agua destilada.

Las piezas de manzana, una vez tratadas, se colocaron en recipientes y se dejaron secar durante una 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se pesaron y se almacenaron bajo refrigeración a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en un recipiente de plástico cerrado herméticamente. Se analizaron diferentes parámetros cada 2 días durante 12 días.

3.3.1. Pérdida de peso

La pérdida de peso se expresó como el porcentaje de pérdida respecto al peso inicial.

3.3.2. pH

El pH de la manzana se determinó con un pH metro Crison Basic 20+ (Crison, España). Para ello, se trituró el gajo de manzana con el doble de su peso en agua. A continuación, se filtró con bomba de vacío y papel Whatman N°1 y se centrifugó (Centrífuga Kubota 6500, Japón) a 10.000 rpm durante 5 minutos para obtener zumo.

3.3.3. Actividad antioxidante total

La actividad antioxidante total se determinó mediante el método de eliminación del radical DPPH según Tanzadehpanah *et al.* (2012). Las muestras contenían $0,6 \text{ mL}$ de la solución del radical DPPH 1.0 mM , $0,6 \text{ mL}$ de zumo de manzana y 4 mL de etanol (96°). Además, se tuvo en cuenta un control en el cual la muestra fue sustituida por agua destilada. Todos los tubos fueron agitados y se mantuvieron a oscuras durante 30 min . La absorbancia se midió a 517 nm con un espectrofotómetro. Para el cálculo de la actividad antioxidante se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{capacidad antioxidante (\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{control}}] \times 100 \quad (1)$$

Donde A_{control} es la absorbancia del control y A_{muestra} es la absorbancia de la muestra.

3.3.4. Sólidos solubles totales

Los sólidos solubles totales se determinaron mediante un refractómetro de mesa digital con compensación de temperatura (Abbe WYA-1S, Lan Optics, España) y se expresaron en °Brix.

3.3.5. Firmeza

La evaluación de la firmeza de la manzana se realizó según Pilon *et al.* (2015). Se utilizó un analizador de textura (TA.XT.plus Texture Analyser, Stable Microsystems, UK) y se midió la máxima fuerza requerida para que una sonda de 5 mm de diámetro (SMS P/5S) penetrara en un cilindro de manzana de 1,5 cm de altura. La distancia de penetración se fijó en 40 mm, a una velocidad y profundidad de 5 mm s⁻¹ y retorno automático. Los trozos de manzana se colocaron perpendiculares a la sonda, de tal forma que la sonda se introdujera en su centro geométrico. Se tomaron dos muestras por día.

3.4. Elaboración de los “films”

Para la elaboración de los “films” se preparó una solución *stock* de gelatina al 6% en agua destilada. Para conseguir solubilizar la proteína, la mezcla fue calentada en un baño de agua a 65 °C durante 25 minutos. A continuación, se añadió una cantidad de glicerol equivalente al 30% (p/p) del total de proteína y se dejó enfriar la solución hasta alcanzar los 35 °C. Con este *stock* se prepararon diferentes soluciones formadoras de “films” que contenían un 1, 2 y 3% (p/p) de timol libre o encapsulado en nanopartículas de APL con respecto a la cantidad de proteína presente en la mezcla. Estas soluciones fueron distribuidas en placas Petri con un diámetro de 4 cm, de tal manera que cada “film” tuviese una cantidad constante de 216 mg de proteína y una cantidad variable de timol, tal y como se acaba de detallar. Estas soluciones formadoras se dejaron secar durante dos días. Una vez transcurrido este tiempo, los “films” pudieron ser retirados de manera íntegra del molde, y fueron acondicionados al menos durante 2 días a temperatura ambiente en una cámara cerrada que contenía una solución saturada de Mg(NO₃)₂.

3.5. Caracterización de los “films”

3.5.1. Determinación del grosor

El espesor del “film” se midió con un micrómetro digital (Mitutoyo C., Japon). Con una precisión de $\pm 1 \mu\text{m}$. Las mediciones se tomaron en cinco lugares, una de las cuales fue en la parte central del “film” y las otras cuatro alrededor de su perímetro.

3.5.2. Propiedades mecánicas de los “films”

Para ensayar la dureza y la elasticidad de los “films” se usó un texturómetro equipado con una célula de carga de 5 kg. Para este propósito, los “films” fueron cortados en tiras con una geometría de 40 x 20 mm y colocados en la plataforma de ensayo. El “film” fue firmemente sujeto entre dos platos que presentaban un orificio central de 1 cm de diámetro. A continuación, la sonda de 5 mm de diámetro descendió perpendicularmente a la superficie del “film” a una velocidad de 1 mm s^{-1} , haciendo contacto con él a través del orificio de la plataforma y estirándolo hasta su ruptura. De esta manera se calculó la fuerza de punción (FP) necesaria para romper el “film” y su elasticidad. Estos parámetros han sido usados previamente por otros autores para caracterizar las propiedades mecánicas de “films” de proteínas (Otero-Pazos, Sendón, Blanco-Fernandez, Blanco-Dorado, Alvarez-Lorenzo, Concheiro, et al., 2016).

$$FP = F_m/Gr \quad (2)$$

$$\text{Elasticidad} = ((\sqrt{D^2 + R^2} - R)/R) \times 100 \quad (3)$$

Donde FP es la fuerza de punción (N mm^{-1}); F_m es la fuerza máxima aplicada antes de que se produzca la ruptura del “film” (N); Gr es el grosor del “film” (mm); D es la distancia cubierta por la sonda mientras está en contacto con el “film” hasta que se produce su ruptura (mm); R es el radio del orificio entre los platos (mm).

En este caso y con la ayuda de un programa informático (Statgraphics® V.15.2.06), se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) y se calcularon las diferencias mínimas significativas entre las muestras mediante el test de Fisher.

3.5.3. Absorción de la luz y transparencia

Para la determinación de estos parámetros se siguió el procedimiento de Blanco-Pascual *et al.*, (2014). Se calcularon las propiedades de barrera frente a la luz y la transparencia de los “films” usando un espectrofotómetro UV (Spekol 1500, analytik jena, Alemania) a longitudes de onda seleccionadas entre los 200 y 800 nm. Además de los “films” de gelatina con nanopartículas cargadas con timol, se preparó un “film” de APL disolviendo este polímero en DCM a una concentración del 3% (p/v). Esta solución (5 mL) se dejó secar a temperatura ambiente en una placa Petri de vidrio. Después de 6 horas el “film” de APL podía ser desmoldado de manera íntegra. Los “films” se cortaron en forma rectangular y se colocaron directamente en la cubeta del espectrofotómetro, utilizando como referencia una cubeta vacía. La transparencia de los “films” se calculó con la ecuación

$$\text{Transparencia} = A_{600}/Gr \quad (4)$$

Donde Gr el grosor del “film” (mm) y A_{600} es la absorbancia de la muestra a 600 nm. De acuerdo con esta ecuación, los valores más bajos indican mayor grado de transparencia.

3.5.4. Capacidad antioxidante

La capacidad de retirar del medio el radical DPPH se determinó de acuerdo con Tanzadehpanah *et al.* (2012) con algunas modificaciones. Se prepararon alícuotas de 4,6 mL de una solución que contenía 0,6 mL de DPPH y 4 mL de etanol (96°). En cada alícuota de esta solución se sumergieron fragmentos de “films”, con una geometría rectangular y con un peso de 50 mg, que contenían timol libre y contenido en nanopartículas de APL. La absorbancia a 517 nm de la solución de DPPH fue medida a diferentes tiempos para así monitorizar su capacidad de eliminar el radical DPPH con el tiempo. El porcentaje de inhibición de este radical fue calculado de acuerdo con la ecuación (1) presentada con anterioridad. En este caso el control fue la solución de DPPH que contenía el “film” control sin timol.

3.5.5. Propiedades térmicas

Los análisis de termogravimetría (TG) se llevaron a cabo utilizando un TGA analyser SDTA851e (Mettler-Toledo, Suiza) desde los 25 °C hasta los 650 °C en atmósfera de nitrógeno. La tasa de calentamiento fue de 10 °C min⁻¹.

3.5.6. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Las micrografías de la sección transversal de los “films” se realizaron de acuerdo con Kadam *et al.* (2015) y usando un microscopio electrónico de barrido (JSM-6610LV, JEOL, USA). Para obtener imágenes de la microestructura de la sección transversal, los “films” fueron liofilizados y cortados en cuadrados de 1x1 cm. Estos cuadrados fueron montados perpendicularmente sobre soportes de aluminio, siendo recubiertos con oro. El microscopio se operó con un voltaje de 5 kV.

3.6. Preparación de los recubrimientos

De una manera similar a como se prepararon los “films”, se elaboraron las soluciones formadoras de “film” con un 5% (p/v) de gelatina y con una cantidad de glicerol equivalente al 30% (p/p) del total de proteína. Cada solución formadora contenía diferentes concentraciones de timol encapsulado en nanopartículas de APL: 1 mg mL⁻¹, 0,5 mg mL⁻¹ y 0,1 mg mL⁻¹. En el caso de preparar los recubrimientos con timol libre, se utilizaron las mismas concentraciones, con la diferencia de que la concentración máxima que se alcanzó fue de 0,94 mg mL⁻¹ debido a la baja solubilidad del timol en agua. En esta ocasión, la concentración de timol es con respecto al volumen total de la solución formadora de “film”, y no con respecto a su contenido en proteína. Para aplicar los recubrimientos las muestras deben de ser sumergidas en esta solución formadora durante un tiempo determinado. A continuación, las muestras son retiradas y el exceso de solución formadora se elimina por gravedad. De esta manera, y una vez se produce el secado de la solución formadora, el recubrimiento de gelatina quedará distribuido homogéneamente sobre la superficie de la muestra.

3.7. Capacidad antimicrobiana del timol y las nanopartículas de timol

3.7.1. Cepa, medio y condiciones de cultivo

Para comprobar la capacidad antimicrobiana del timol y las nanopartículas de timol se inocularon trozos de manzana, de aproximadamente 1 gramo, con la cepa no patogénica *E. coli* CECT 101.

La cepa se cultivó empleando medio NB, suplementado con un 2% de agar, y se incubó a 30 °C durante 48 horas. Para la preparación de los inóculos líquidos, *E. coli* CECT 101 se incubó en medio NB líquido durante 10 horas, a 30 °C y con una agitación de 250 rpm.

3.7.2. Evaluación de Escherichia coli CECT 101 en los distintos tratamientos

Se evaluó el efecto bactericida del timol y las nanopartículas de timol con diferentes concentraciones y en distintos estados: en solución acuosa, en la solución formadora de “films” y en los propios “films” (Tabla 6).

Tabla 6. Tratamientos y concentraciones utilizadas.

	Concentración	
Tratamientos	Timol (mg mL ⁻¹)	Nanopartículas de timol (mg mL ⁻¹)
Solución acuosa	0,94; 0,5 y 0,1	0,94; 0,5 y 0,1
Solución formadora de “films”	0,1	0,94; 0,5 y 0,1
Tratamiento	Timol (%) ^a	Nanopartículas de timol (%) ^a
“Films”	3	2 y 3

a: porcentaje en peso con respecto a la cantidad de proteína contenida en el film.

Para ello se siguió el procedimiento de Salvia-Trujillo *et al.* (2015), con algunas modificaciones. En todos los tratamientos realizados, los trozos de manzana, de aproximadamente 1 gramo de peso, fueron inoculados con 100 µL de *E. coli* CECT 101 con una concentración de 10⁵ UFC mL⁻¹. Se empleó una alta concentración de *E. coli*

CECT 101 para poder observar la reducción del crecimiento en las manzanas con los distintos tratamientos. Las manzanas tratadas con la solución acuosa de timol y nanopartículas de timol, así como las tratadas con la solución formadora de “film” de gelatina (el recubrimiento de gelatina), se sumergieron en 5 mL de estas soluciones durante 1 minuto y medio con agitación suave. En el caso del tratamiento de los “film” aditivados con timol y nanopartículas de timol, los trozos de manzana fueron envueltos y sellados por calor. En todos los casos, las muestras se almacenaron a 5 °C hasta su análisis.

Para el seguimiento microbiológico de cada uno de los tratamientos se tomaron muestras cada 3 o 4 días durante un periodo de 13-14 días. Sobre los trozos de manzana se añadieron 9 ml de NaCl 0,7% y se trituraron empleando un Stomacher (IUL Instruments, Barcelona, Spain), a máxima velocidad durante 120 segundos. A partir de las muestras líquidas se prepararon diluciones seriadas 1:10 que fueron sembradas en placas de NB con un 2% de agar. Las placas se hicieron por triplicado y tras 24 horas de incubación a 30 °C se contaron las colonias, que fueron expresadas como \log_{10} UFC mL⁻¹.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto de las soluciones acuosas de timol libre y encapsulado sobre los parámetros evaluados de la manzana

4.1.1. Caracterización visual de las manzanas tratadas y sin tratar

En la Figura 4 se muestra la evaluación del color de la superficie de la manzana con los distintos tratamientos (soluciones acuosas de timol libre y encapsulado) durante el almacenamiento de 12 días. La oxidación de la manzana se observó desde el primer día en todas las muestras, pero su intensidad aumentó con el tiempo. En esta oxidación, conocida como pardeamiento enzimático, aparecen compuestos pardos como consecuencia de una serie de reacciones enzimáticas y no enzimáticas, que tienen como resultado la conversión de los compuestos fenólicos en polímeros coloreados (Holderbaum, Kon, Kudo, & Guerra, 2010). Por este motivo la manzana, que es un alimento rico en compuestos fenólicos, se oscurece tan rápido al entrar en contacto con el O₂. Además, ni el timol ni las nanopartículas de timol tuvieron el efecto deseado sobre esta reacción, ya que las muestras tratadas con estas soluciones presentaban un color más oscuro que las muestras tratadas únicamente con agua al finalizar el almacenamiento. Se utilizó timol por ser un agente activo con propiedades antioxidantes reconocidas (Llana-Ruiz-Cabello, Gutiérrez-Praena, Puerto, Pichardo, Jos, & Cameán, 2015), pero en este caso no ha resultado efectivo a la hora de reducir el pardeamiento enzimático en manzanas.



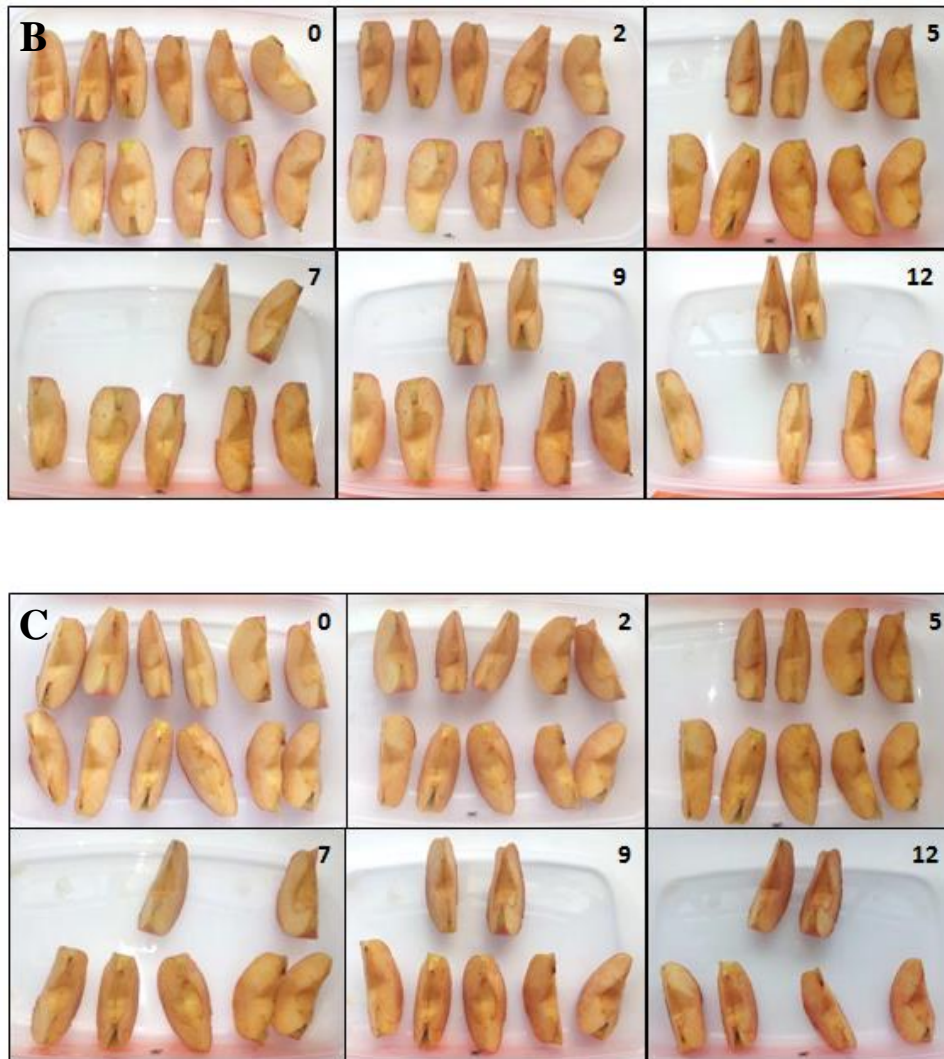


Figura 4. Evolución del color de la manzana durante los 12 días de almacenamiento refrigerado en los diferentes tratamientos: A. Control; B. Solución acuosa de timol; C. Solución acuosa de nanopartículas de timol.

4.1.2. Pérdida de peso

La Figura 5 muestra los cambios en el porcentaje de pérdida de peso tanto del control como de las manzanas tratadas con timol y con nanopartículas de timol. No se aprecian diferencias entre el control y los tratamientos, y la pérdida de peso apenas supera el 1%.

Debido a la ausencia de referencias bibliográficas sobre el tratamiento de piezas de fruta con soluciones acuosas que contengan agentes activos, si comparamos estos resultados con los obtenidos en estudios de recubrimientos se observa en todos los casos pérdidas de peso mucho mayores. Por ejemplo, en un estudio de Das *et al.* (2013) en el que se

recubrieron tomates con soluciones de almidón-glicerol, almidón-glicerol-lípido y almidón-glicerol-lípido-antioxidante y se compararon con tomates sin recubrir como control, se vio una pérdida de peso de entorno al 12% al finalizar los 20 días de almacenamiento, a temperatura ambiente, en el control y la muestra recubierta con almidón-glicerol. Los tomates con recubrimientos almidón-glicerol-lípido y almidón-glicerol-lípido-antioxidante mostraron una pérdida de peso menor, debido a la naturaleza hidrófoba del aceite y a la acción combinada de la grasa y el antioxidante como barreras efectivas contra los gases y la humedad. En otro estudio de Qi *et al.* (2011) después de 2 días de almacenamiento las manzanas control perdieron alrededor del 19% de su peso y las manzanas recubiertas el 15%, por lo que los recubrimientos de quitosano no demostraron funcionar de forma eficaz como barreras de vapor de agua. Las muestras fueron almacenadas en bastidores de plástico a 5 °C durante 8 días y a 20 °C durante 24 horas.

En el caso de las manzanas tratadas con timol libre y contenido en nanopartículas de APL, el resultado obtenido puede deberse a que las manzanas tratadas con timol estaban almacenadas en recipientes de plástico herméticamente cerrados, por lo que al no estar en contacto con el aire la pérdida de agua por evaporación es menor.

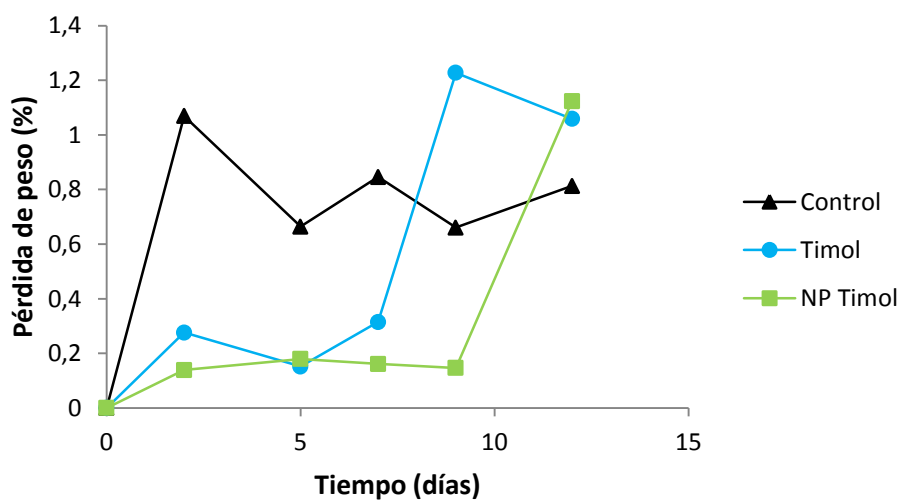


Figura 5. Efecto de los diferentes tratamientos en la pérdida de peso de manzanas durante los 12 días de almacenamiento refrigerado.

4.1.3. Variación en el pH

La manzana es un alimento de naturaleza ácida debido a la presencia de diferentes ácidos orgánicos, siendo el principal el ácido málico. Su pH varía entre 3 y 5, y su acidez total aumenta durante el desarrollo del fruto y disminuye en la etapa de sobremaduración, debido principalmente a la disminución de este ácido. El efecto de la solución acuosa de timol y de nanopartículas de timol sobre el pH se muestra en la Figura 6.

El pH se mantuvo prácticamente constante durante los 12 días de almacenamiento, tanto en el control como en los tratamientos, por lo que el timol no tiene ningún efecto sobre este parámetro. Estudios previos, como el de Vargas *et al.* (2006) o el de Valenzuela *et al.* (2015), tampoco encontraron cambios en el pH de fresas recubiertas con soluciones formadoras de “films” a base de quitosano-ácido oleico y de quitosano-proteína de quinoa respectivamente, al compararlas con las muestras control sin ningún tratamiento.

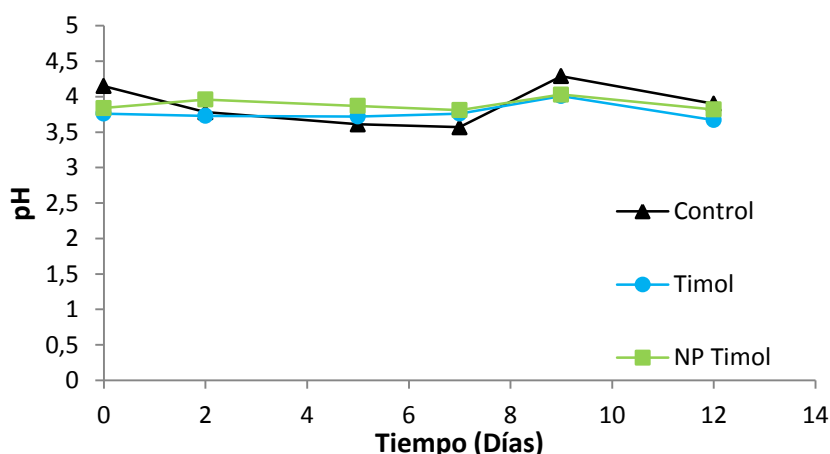


Figura 6. Efecto de los diferentes tratamientos en el pH de manzanas durante los 12 días de almacenamiento refrigerado.

4.1.4. Actividad antioxidante total

La manzana es una fruta rica en compuestos fenólicos, especialmente flavonoides, cuya actividad y concentración difieren con el método de cultivo, la etapa de madurez, las condiciones ambientales y la parte de la fruta. La Figura 7 muestra el efecto de la

solución acuosa de timol y de nanopartículas con timol sobre la actividad antioxidante total de manzanas. Se observa que los trozos de manzana tratados con nanopartículas empiezan a perder capacidad antioxidante al quinto día de almacenamiento, mientras que el control lo hace el día 7 y la manzana tratada con timol libre el día 9. Sin embargo, al finalizar el almacenamiento las manzanas control han perdido toda su capacidad antioxidante, mientras que las tratadas con timol conservan aproximadamente un 15%. En un estudio de Pajak *et al.* (2017) se comprobó que los “films” de almidón enriquecidos con extracto de té exhibían mejores propiedades antioxidantes sobre manzanas que aquellos que no tenían aditivos. En este caso, el uso del timol como agente activo sin formar parte de “films” o recubrimientos no mejoró de la misma forma las propiedades antioxidantes de la manzana, aunque sí que retarda mínimamente la pérdida de capacidad antioxidante. Además, resulta destacable que una mayor concentración de timol en disolución en forma de nanopartículas de APL resultó perjudicial para este parámetro. El APL tiene una muy baja reactividad en medios acuosos y es particularmente estable en entornos ácidos (L. Xu, Crawford, & Gorman, 2011), por lo que la pérdida de capacidad antioxidante en la manzana sólo pudo ser debida al exceso de timol incorporado en las nanopartículas con respecto al timol libre.

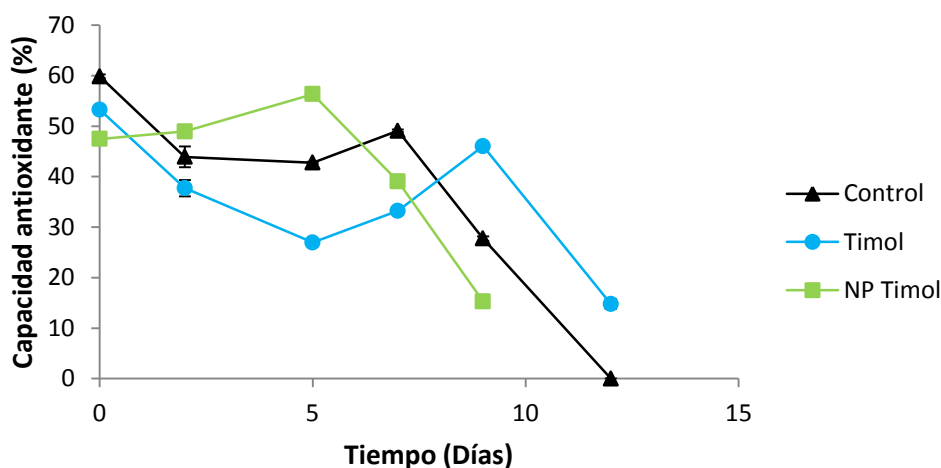


Figura 7. Efecto de los diferentes tratamientos en la actividad antioxidante total de manzanas durante los 12 días de almacenamiento refrigerado.

4.1.5. Sólidos solubles totales

El contenido de sólidos solubles totales para los diferentes tratamientos se muestra en la Figura 8. Los valores se mantienen constantes a lo largo del tiempo y no se observan diferencias entre los tratamientos y el control. Sin embargo, en un estudio de Amal *et al.* (2010) el contenido de sólidos solubles totales en fresas aumentó durante los tres primeros días y después disminuyó progresivamente durante el resto del almacenamiento, según ellos debido al proceso respiratorio. Utilizaron recubrimientos de proteína de soja o gluten de trigo aditivados con timol o cloruro de calcio y los compararon con fresas sumergidas en agua como control. Todos los tratamientos redujeron significativamente la pérdida de sólidos solubles totales en comparación con el control, resultando más eficaces los recubrimientos aditivados con timol. Las diferencias observadas en el caso de utilizar manzanas tratadas con timol pueden deberse al tipo de fruta, al método de almacenamiento, o a las diferencias existentes en el tratamiento al incorporar un recubrimiento de proteína.

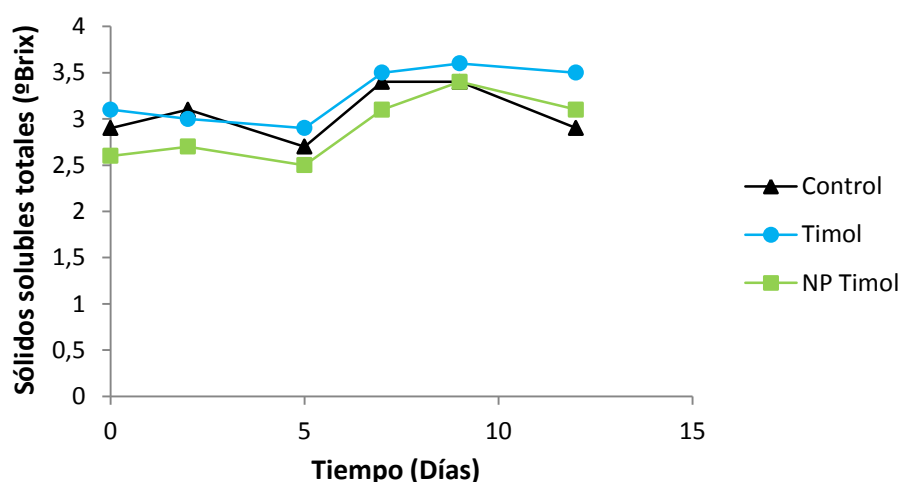


Figura 8. Efecto de los diferentes tratamientos sobre el contenido de sólidos solubles totales de manzanas durante los 12 días de almacenamiento refrigerado.

4.1.6. Firmeza

La pérdida de textura es el cambio más notable que ocurre en las frutas y hortalizas durante el almacenamiento prolongado, y está relacionada con los cambios metabólicos y el contenido de agua (García, Martino, & Zaritzky, 1998). El efecto de los

tratamientos sobre la firmeza de la manzana durante los 12 días de almacenamiento se muestra en la Figura 9. Se observa que el timol tiene un efecto negativo sobre este parámetro, ya que las manzanas tratadas pierden más firmeza que el control. Es cierto que los trozos de manzana tratados con nanopartículas de timol mostraron una pérdida de firmeza menos acusada durante el almacenamiento que con el tratamiento de timol libre y el control, pero si tenemos en cuenta que se parte de manzanas más o menos homogéneas y que por tanto la firmeza inicial debería ser muy similar, se puede observar cómo estos trozos de manzana perdieron su textura desde que se sumergieron en la solución con nanopartículas. Este hecho, como en el caso de la actividad antioxidante total, se puede justificar debido a que el exceso de timol contenido en las nanopartículas resultó perjudicial para este parámetro, especialmente a tiempos cortos, nada más producirse el tratamiento.

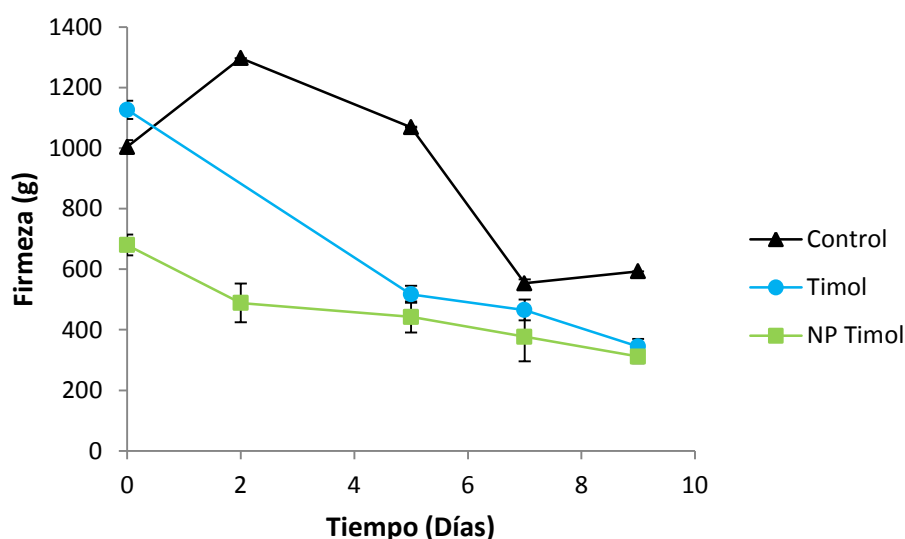


Figura 9. Efecto de los diferentes tratamientos en la firmeza de manzanas durante los 12 días de almacenamiento refrigerado

Teniendo en cuenta todos estos resultados, parece que ni el timol libre a una concentración de $0,94 \text{ mg mL}^{-1}$, ni el timol contenido en nanopartículas a una concentración de 2 mg mL^{-1} , tuvieron algún efecto positivo lo suficientemente importante en los parámetros evaluados como para considerar estos tratamientos como beneficiosos. Sin embargo, en la Figura 10 se muestran fotografías de trozos de manzana tratados y sin tratar después de 20 días de almacenamiento. En el caso de los

trozos de manzana usados como control se observa el crecimiento de hongos en 3 de las cuatro piezas conservadas (Figura 10.A). Cuando las manzanas fueron tratadas con $0,94 \text{ mg mL}^{-1}$ de timol en agua destilada, se puede observar como el crecimiento de hongos fue más limitado, y sólo alcanza a una de las 4 piezas almacenadas (Figura 10.B). Sin embargo, cuando el tratamiento fue con 2 mg mL^{-1} de timol en forma de nanopartículas ninguna pieza de fruta apareció con signos que indiquen el crecimiento de hongos (Figura 10.C). En este último caso, el exceso de timol contenido en nanopartículas con respecto a las concentraciones alcanzadas según su máxima solubilidad en agua destilada tuvieron un efecto protector adicional.

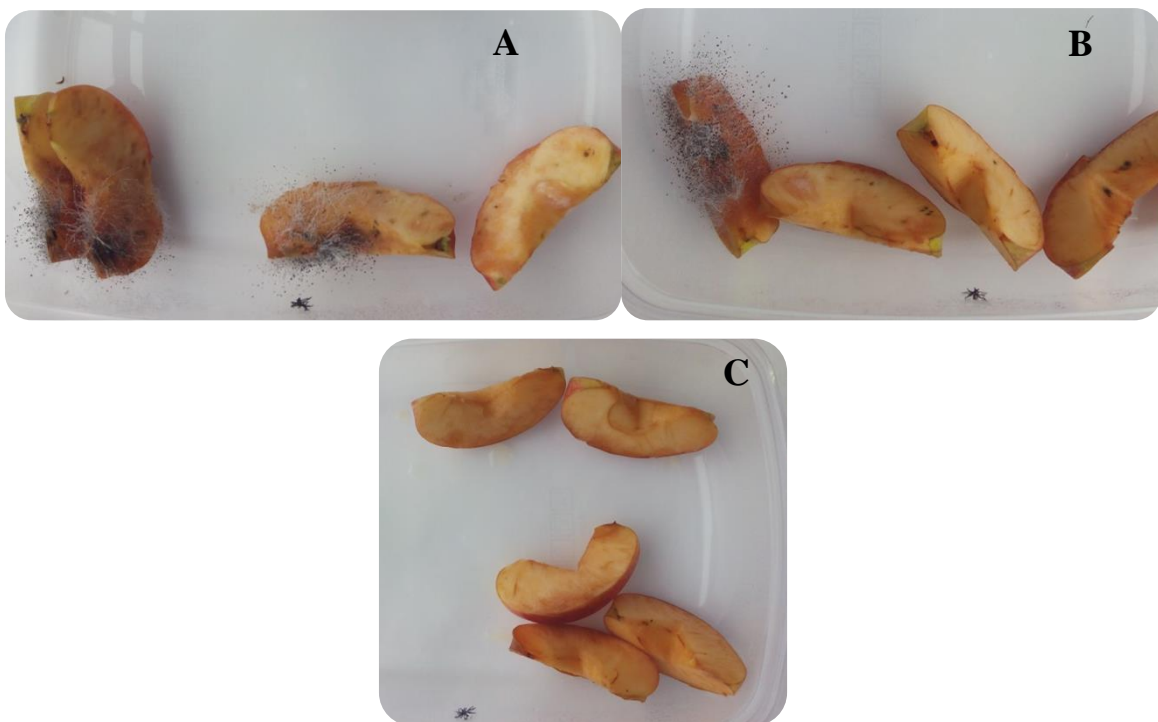


Figura 10. Aspecto de la manzana con los distintos tratamiento después de 20 días de almacenamiento refrigerado: A. Control; B. Solución acuosa de timol; C. Solución acuosa de nanopartículas de timol.

4.2. Caracterización de los “films” que contienen timol encapsulado en nanopartículas de APL

4.2.1. Absorción de luz y transparencia

Después de producirse el secado de la solución formadora durante dos días a temperatura ambiente, los “films” pudieron desmoldarse fácilmente y de manera íntegra. Su aspecto visual puede apreciarse en la Figura 11, observándose como al aumentar la cantidad de nanopartículas adicionadas el “film” va perdiendo progresivamente transparencia. Este hecho puede apreciarse al comparar directamente la fotografía del “film” de gelatina control (Figura 11E) y la fotografía del “film” de gelatina con un 3% de timol encapsulado (Figura 11F). El aspecto visual del “film” con un 3% de timol libre era idéntico al del control y no se muestra en la Figura 11. Los valores de transparencia que aparecen en la Tabla 7 muestran numéricamente como la presencia cada vez mayor de nanopartículas resulta en una disminución progresiva en la transparencia de los “films”, ya que valores más altos en este parámetro se asocian con transparencias más bajas. Esto se puede atribuir al color blanco característico del APL, que en forma de “film” muestra el valor de transparencia más alto medido.

En cuanto a la absorbancia de luz a diferentes longitudes de onda (Tabla 7), se suelen valorar positivamente las propiedades barrera frente a la luz ultravioleta de los “films” de proteínas, ya que, a estas longitudes de onda, la luz se comporta como un importante iniciador de la degradación oxidativa de los lípidos (Coupland & McClements, 1996). Habitualmente, los “films” de proteínas suelen tener una alta absorbancia a estas longitudes de onda debido a la presencia de aminoácidos con cadenas laterales aromáticas en su composición, sin embargo, la gelatina no tiene triptófano, y tiene un contenido bajo en tirosina y en fenilalanina (Nhari, Hafidz, Che Man, Ismail, & Anuar, 2011). Esto resulta en “films” que tienen unas propiedades protectoras frente a la luz ultravioleta que se pueden considerar como bajas en comparación con otros “films” de proteínas. Teniendo esto en cuenta, y de acuerdo con los resultados expuestos en la Tabla 7, aunque el control presente la absorbancia más baja a 280 nm, aumentos en el contenido en nanopartículas se traducen en incrementos en los valores de absorbancia medidos a esta longitud de onda. Mientras que el “film” de APL no tiene una absorbancia especialmente alta a 250 y 280 nm, a estas mismas longitudes de onda los “films” de gelatina con un 3% de nanopartículas cargadas con timol resultaron tener un

67% y un 88% más de absorbancia respectivamente que el “film” de gelatina control. Esto se debe principalmente a la presencia de timol, cuyo espectro de absorción tiene un máximo a 274 nm (Hajimehdipoor, Shekarchi, Khanavi, Adib, & Amri, 2010). Por tanto, en este caso, el aumento en las propiedades barrera de los “films” cargados con nanopartículas podría atribuirse principalmente a la adición del timol encapsulado. En el caso del “film” que presenta un 3% de timol libre, las propiedades de absorción de luz resultaron ser idénticas las del control, sugiriendo este resultado la total evaporación del timol durante los dos días de secado.

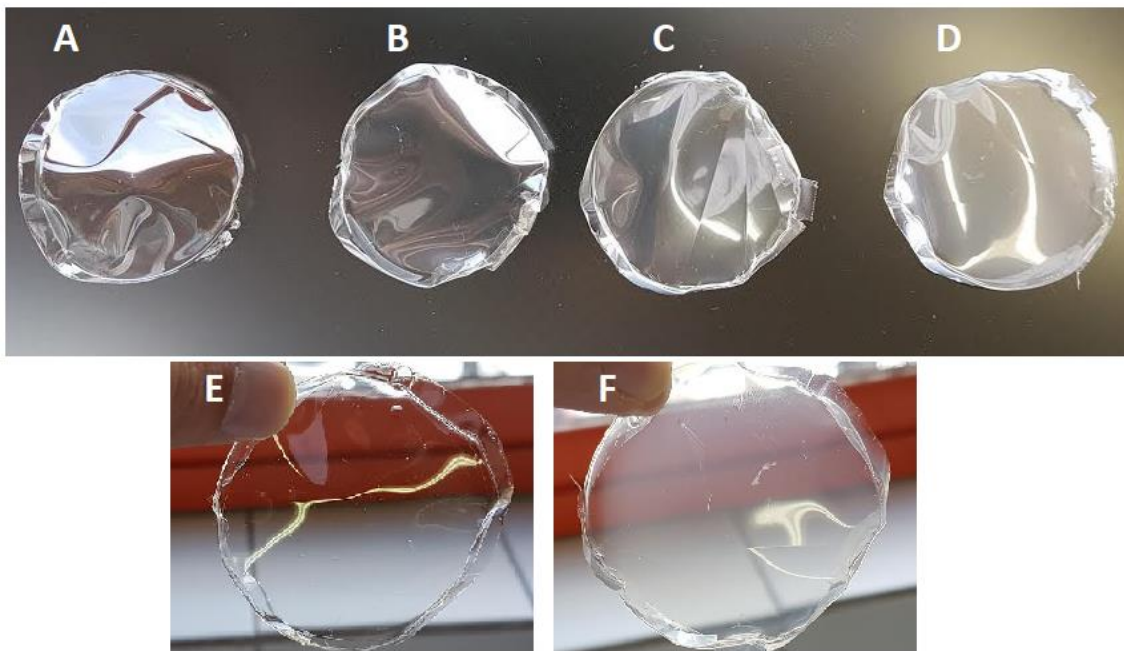


Figura 11. Aspecto de los “films” obtenidos: A y E. “Film” de gelatina control. B. “Film” de gelatina con un 1% de timol encapsulado en NP. C. “Film” de gelatina con un 2% de timol encapsulado en NP. D y F. “Film” de gelatina con un 3% de timol encapsulado en NP.

Tabla 7. Grosor, transparencia y absorbancia a diferentes longitudes de onda del “film” de gelatina control, los “films” que se prepararon con diferentes concentraciones de nanopartículas (NP) cargadas con timol, el “film” con un 3% de timol libre y el “film” de APL.

	Grosor	Absorbancia de luz a diferentes longitudes de onda (nm)									Transparencia
		200	250	280	300	400	500	600	700	800	
Control	0,094 ± 0,007	2,407	0,894	0,808	0,181	0,056	0,046	0,045	0,044	0,043	0,48
NP 1%	0,102 ± 0,002	> 3,0	1,147	1,059	0,289	0,112	0,085	0,072	0,065	0,064	0,71
NP 2%	0,102 ± 0,003	> 3,0	1,198	1,189	0,323	0,132	0,099	0,083	0,075	0,069	0,81
NP 3%	0,110 ± 0,003	2,846	1,496	1,521	0,452	0,196	0,142	0,115	0,102	0,09	1,04
3% Libre	0,096 ± 0,005	2,455	0,880	0,838	0,191	0,058	0,045	0,045	0,044	0,043	0,46
APL	0,06 ± 0,01	1,994	0,227	0,251	0,239	0,202	0,204	0,219	0,234	0,234	3,65

4.2.2. Propiedades mecánicas de los “films”

La FP necesaria para romper los “films”, así como su elasticidad, se presenta en la Figura 12. La FP es una medida que indica la resistencia mecánica de un “film”, y en este caso, la adición de nanopartículas cargadas con timol no produjo una variación estadísticamente significativa en este parámetro ($p < 0,05$), teniendo en cuenta las desviaciones estándar calculadas. Comparando estos valores con otros encontrados en bibliografía (Tabla 8), estos “films” de gelatina resultaron tener una resistencia mecánica superior a la de otros “films” elaborados con proteína de pescado, con proteína de suero de leche, con caseína, o con proteína de soja.

A diferencia de lo que ocurre con la FP, cuando se analiza la elasticidad sí aparece una diferencia significativa entre el control y los “films” con un 2% y 3% de timol en nanopartículas de APL. Hay que tener en cuenta que durante el secado de la solución formadora las cadenas de proteína se van aproximando y estableciendo interacciones no covalentes entre ellas. En este tipo de “films”, el glicerol y el agua que permanece en la matriz del material actúan impidiendo un excesivo ordenamiento de las cadenas poliméricas, favoreciendo su flexibilidad. Es posible que la composición de las

nanopartículas, o su tamaño, o la poca cantidad adicionada, o tal vez una mezcla de todas estas variables sean las responsables de que las nanopartículas no entorpezcan las interacciones que determinan la resistencia mecánica del “film”. Sin embargo, cabe esperar que las nanopartículas ocupen los espacios en los cuales se acumule el glicerol o el agua, evacuándolos y afectando a la flexibilidad del material. En cualquier caso, y en comparación con otros “films” que se pueden encontrar en la bibliografía, estos “films” de gelatina resultaron tener una elasticidad similar (proteína de pescado) o superior (soja).

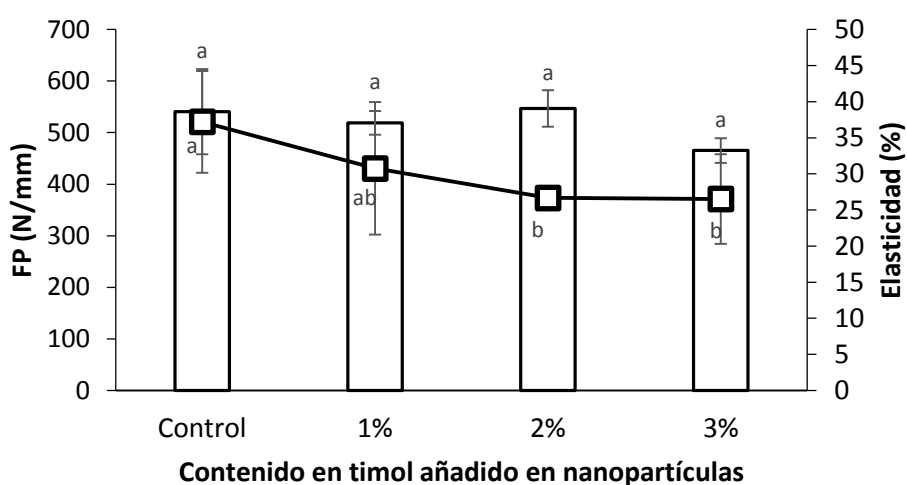


Figura 12. Propiedades mecánicas de los “films” evaluados. Dentro de cada parámetro, diferentes letras entre los tratamientos indican una diferencia significativa ($p < 0,05$).

Tabla 8. Propiedades mecánicas de “films” elaborados con proteínas que aparecen en la bibliografía.

Fuente	FP (N/mm)	Elasticidad (%)	Referencia
Proteína de pescado	217,8	33,5	(Teixeira, Marques, Pires, Ramos, Batista, Saraiva, et al., 2014)
Suero de leche	229,3	ND	(Beristain-Bauza, Mani-López, Palou, & López-Malo, 2016)
Caseína	393,7	ND	(Beristain-Bauza, Mani-López, Palou, & López-Malo, 2016)
Soja	76,6	ND	(T. Sivarooban, N. S. Hettiarachchy, & M. G. Johnson, 2008)
Soja	< 53,2	< 20	(Denavi, Pérez-Mateos, Añón, Montero, Mauri, & Gómez-Guillén, 2009)

ND: No disponible.

4.2.3. Propiedades térmicas

Las curvas de TG de los “films” de gelatina con timol en forma de nanopartículas de APL se presentan en la Figura 13, así como un control sin timol. En general, los “films” de proteínas presentan una pérdida de peso conforme aumenta la temperatura que puede dividirse en tres fases diferentes. En la primera fase, desde los 40 hasta los 150-160 °C, se produce la pérdida del agua que es retenida por el material (Guo, Ge, Li, Mu, & Li, 2014). En la segunda fase, desde los 150-160 °C hasta los 270-280 °C, el glicerol se volatiliza de la muestra (Hoque, Benjakul, & Prodpran, 2011). Finalmente, en la tercera fase se produce la degradación de la proteína, y esta comienza sobre los 270-280 °C (Ge, Li, Zhang, Yang, Ye, Li, et al., 2015). De acuerdo a lo observado en la Figura 13, es difícil apreciar diferencias entre las muestras analizadas debido a la similitud en su composición. Además, resulta complicado distinguir cada una de las fases anteriormente citadas y su importancia relativa en la degradación térmica de los “films”. Para una mejor comprensión, y con el objetivo de facilitar el análisis, la derivada de las curvas de TG fue calculada (DTG) y se muestra en la Figura 14. Los datos de interés que resultan de estas Figuras se detallan en la Tabla 9. En la curva de DTG de los “films” se pueden apreciar tres picos, cada uno de los cuales representa la degradación de cada uno de los componentes citados anteriormente. Entre los 24 y 125 °C se produce la evaporación del agua contenida en los “films”, la cual representa el 11% del peso total. Entre los 132 y 283 °C se produce la volatilización del glicerol, que se corresponde con el 25% del peso húmedo del “film”. Finalmente, entre los 283 y 500 grados centígrados se produce la combustión de la proteína. Estas fases aparecen en todos los “films” evaluados, adquiriendo las curvas de degradación térmica un perfil similar independientemente del contenido en nanopartículas. Las curvas de DTG del timol y del APL que forman parte de las nanopartículas se muestran en la Figura 14C. El timol presenta un único pico de descomposición que se sitúa entre los 65 y 190 °C, con una máxima tasa de descomposición a los 158 °C. Por su parte, el APL se descompone entre los 280 y 370 °C, y su descomposición máxima se produce a los 357 °C. Teniendo en cuenta estos valores de descomposición térmica cabría esperar la aparición de nuevos picos en las curvas de DTG de los “films”, especialmente uno que diera cuenta de la volatilización del timol y que se resolviera en torno a los 150 °C. Sin embargo, el timol en los “films” se encuentra encapsulado en nanopartículas de APL, por lo que su perfil de TG podría verse modificado pudiendo resolverse su combustión a temperaturas más altas de las

esperadas. Aun teniendo en cuenta todos estos factores, al examinar las curvas de TG y de DTG de los “films” con nanopartículas no se pueden apreciar variaciones en las diferentes fases de degradación con respecto al “film” control, por lo que se puede suponer que incluso un 3% de timol es una cantidad lo suficientemente baja como para no ser apreciada en este tipo de ensayos. En cuanto al APL, su descomposición se produce en un rango de temperaturas similar a la de las proteínas, por lo que su combustión podría quedar enmascarada por estas. La única influencia detectable en estas curvas, en cuanto a la adición de las nanopartículas se refiere, es un ligero aumento en la resistencia térmica en la tercera fase de degradación en el caso del “film” con un 3% de timol. En este caso, esta tercera fase tiene una máxima tasa de descomposición a los 329 °C (Tabla 9), cuando en todos los demás “films” esta fase tiene una máxima tasa de descomposición a los 311 °C. Esto podría deberse a la influencia de las nanopartículas, especialmente al APL que tiene una máxima tasa de descomposición a una temperatura ligeramente más alta que las proteínas, por lo que puede estar aumentando ligeramente la resistencia térmica del “film”.

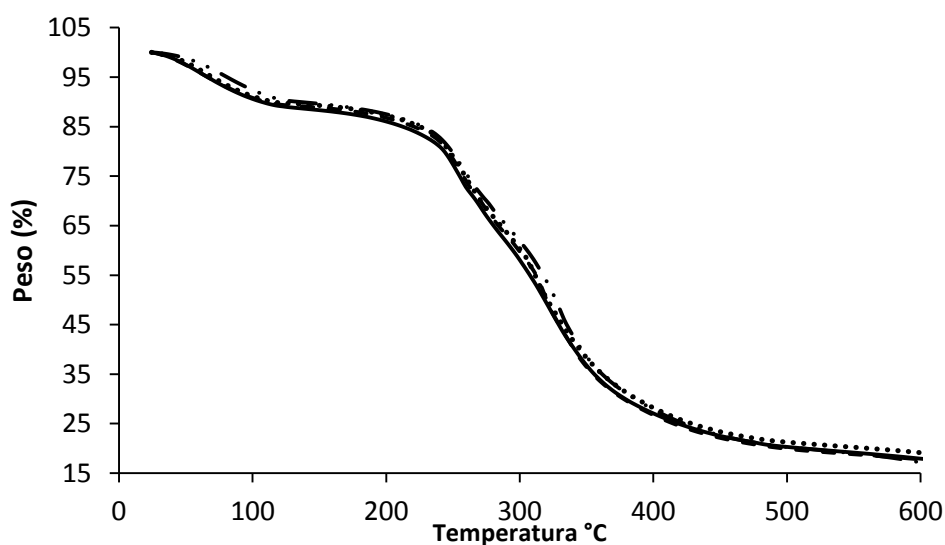


Figura 13. Curvas de TG del “film” de gelatina control (línea sólida), “films” con un 1% (línea a rayas), 2% (línea de puntos), y 3% (línea de puntos y rayas) de timol en nanopartículas de APL.

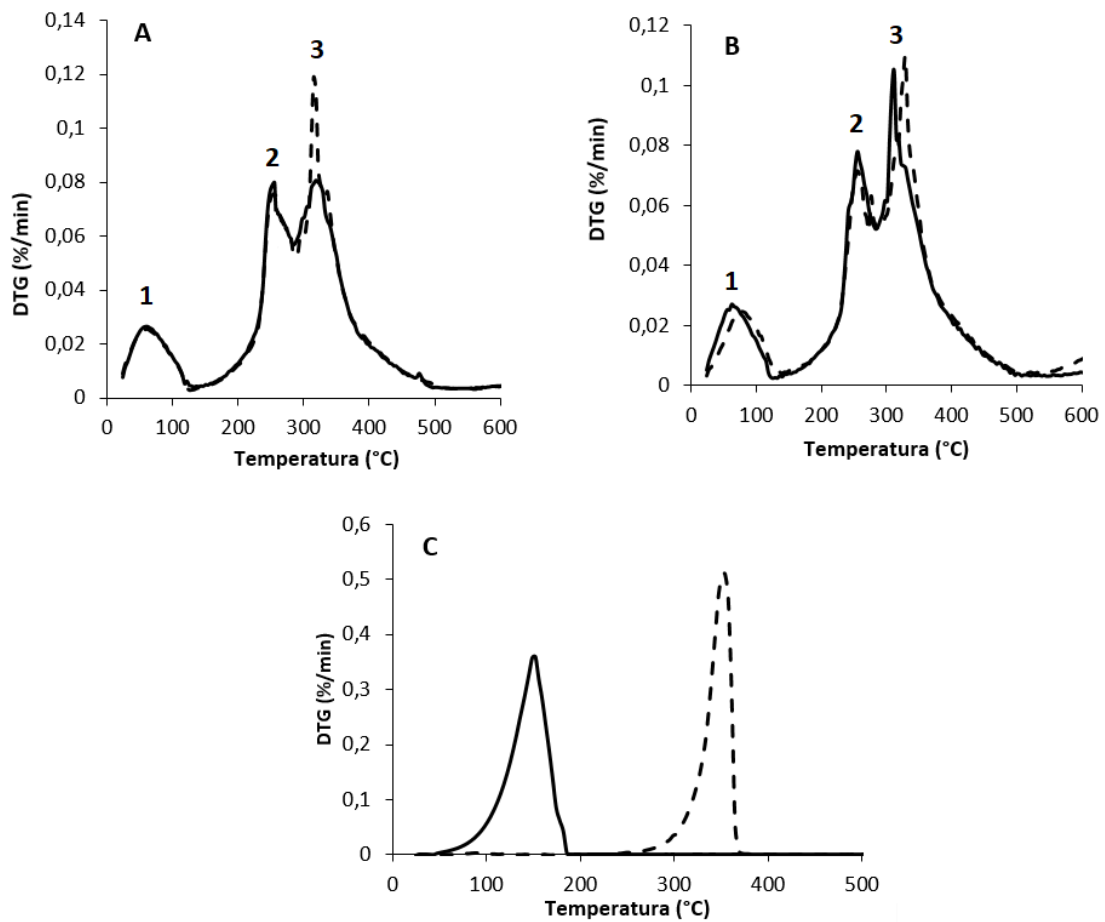


Figura 14. Curvas de DTG obtenidas a partir de la Figura 3: A. “Film” control (línea sólida) y con un 1% de contenido en timol en forma de nanopartículas de APL (línea a rayas). B. “Film” con un 2% (línea sólida) y con un 3% de contenido en timol (línea a rayas) en forma de nanopartículas de APL. C. Timol (línea sólida) y APL (línea de rayas).

Tabla 9. Valores de interés obtenidos a partir del análisis de las curvas de TG y DTG.

Muestra	Fases de descomposición	Rango de temperatura (°C)	Picos de DTG (°C)	Pérdida de peso (%)	T ₅₀ ^a (°C)
Control	1	24-125	62,5	11	319
	2	132-283	252	25	
	3	283-500	311	47	
1% NP	1	24-125	62,5	11	319
	2	132-283	252	25	
	3	283-500	311	47	
2% NP	1	120-250	182	11	322
	2	132-284	255	25	
	3	287-500	311	48	
3% NP	1	24-136	76	11	319
	2	140-287	259	25	
	3	287-500	329	47	
Timol	1	65-190	158	100	145
APL	1	280-370	357	100	347

4.2.4. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Las micrografías obtenidas a partir de la observación con microscopio electrónico de los cortes transversales de los “films” se muestran en la Figura 15. En estas micrografías se observa como todos los “films” presentan una sección transversal homogénea, sin embargo, a medida que aumenta la cantidad de nanopartículas adicionadas, aparece una ligera heterogeneidad, especialmente en la parte superior de los “films”. En los “films” adicionados con un 3% de timol en nanopartículas de APL esta heterogeneidad es más evidente, y podría estar relacionada con la pérdida de elasticidad que se discutió previamente.

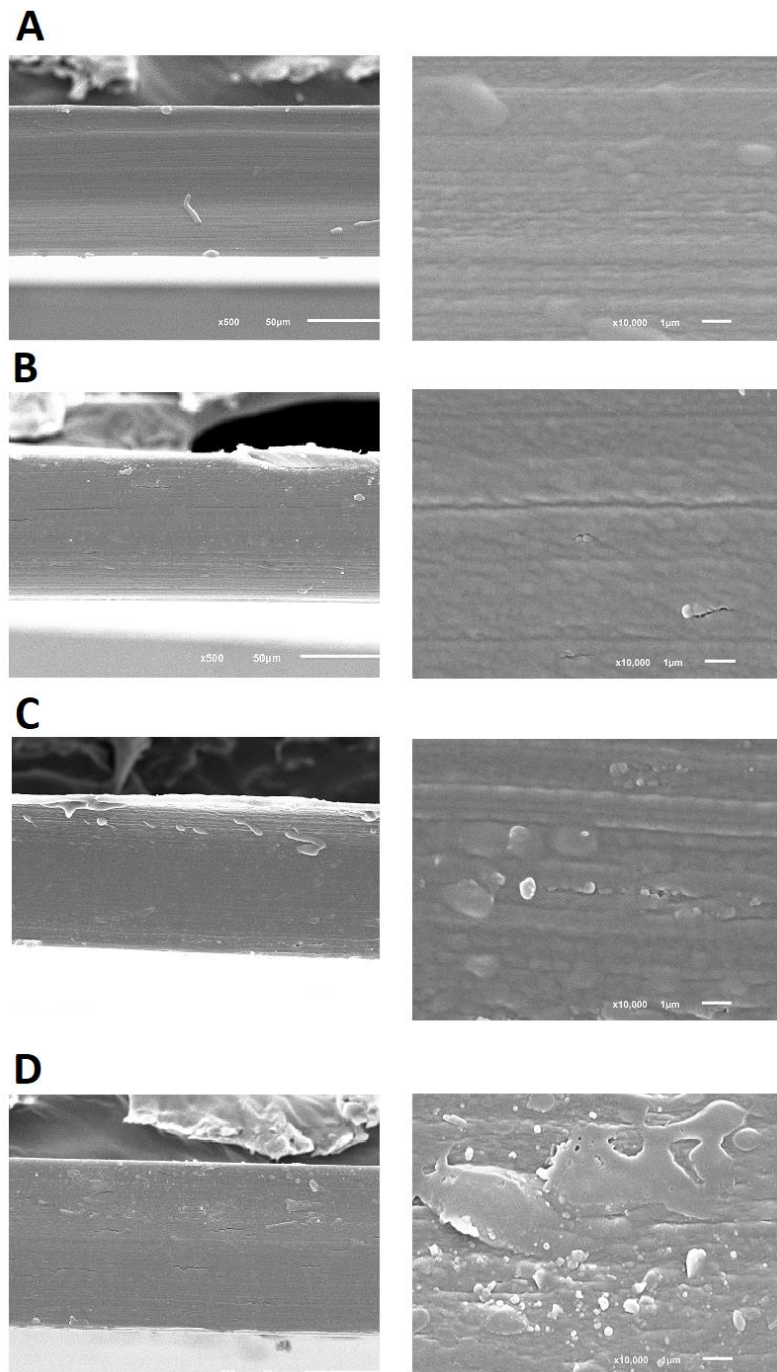


Figura 15. Micrograffas de la sección transversal de los “films” a 500 aumentos (columna de la izquierda) y de la parte superior de la sección transversal del “film” a 10000 aumentos (columna de la derecha): A. “Film” control. B. “Film” con 1% de timol en nanopartículas de APL. C. “Film” con un 2% de timol en nanopartículas de APL. D. “Film” con un 3% de timol en nanopartículas de APL.

4.2.5. Capacidad antioxidante

El mecanismo de eliminación del radical DPPH es a través de la donación de un átomo de hidrógeno por parte del antioxidante, de tal manera que se forma la molécula de DPPH-H. El timol es capaz de reducir al radical DPPH en función de su propia concentración, de tal forma que a mayor concentración de timol, mayor será la eliminación de este radical (Esmaeili & Khodadadi, 2012; Mastelic, Jerkovic, Blažević, Poljak-Blaži, Borović, Ivančić-Baće, et al., 2008). En el caso de los “films” de gelatina, hay que tener en cuenta que el timol se ha suministrado en forma de nanopartículas de APL, por lo que el agente activo debe de ser capaz de difundir primero hacia el exterior de las nanopartículas, y luego atravesar la matriz proteica del “film” hasta alcanzar el medio sobre el que se encuentra el embalaje. En este caso, se utilizó una solución con DPPH para evaluar la migración del timol hacia el exterior del “film”, además de para confirmar la capacidad antioxidante de este agente activo encapsulado. En la Figura 16 se muestra la capacidad antioxidante a diferentes tiempos de los “films” inmersos en una solución que contiene el radical DPPH. En este caso sólo se muestran los resultados de los “films” elaborados con nanopartículas, ya que los “films” preparados con timol libre no mostraron ninguna capacidad antioxidante durante el tiempo ensayado. Este resultado sugiere, junto con el presentado en la sección de “absorción de luz y transparencia”, que los “films” de gelatina que contenían timol libre perdieron todo el agente activo durante el secado de la solución formadora. Esto se debe a que el timol es un compuesto fenólico volátil, que no pudo ser retenido en la matriz proteica del “film”. En cuanto a los “films” con timol en forma de nanopartículas, tal y como se muestra en la Figura 16, su capacidad antioxidante se fue acrecentando con el tiempo, lo cual indica una liberación controlada del timol. De acuerdo con esta Figura, las mayores tasas de liberación de agente activo se produjeron durante los dos primeros días, para a continuación atenuarse la cantidad de timol liberado. Además, tal y como cabría esperar, los “films” que contenían una mayor cantidad de timol demostraron una capacidad antioxidante mayor. En el caso de los “films” con un 3% de timol en nanopartículas, después de 9 días de ensayo mostraron un 66% de inhibición del radical DPPH, mientras que los “films” con un 2% de timol produjeron un 51% y los que tenían un 1% de timol mostraron un 23%. Ya que la eliminación del radical DPPH depende de la cantidad de timol en el medio, estos valores son proporcionales a la cantidad de timol que se había dispuesto originalmente en cada uno de los “films”, de tal manera que los

“films” con un 3% de timol mostraron aproximadamente un 30% más de capacidad antioxidante que los “films” con un 2% de timol, y prácticamente el triple de capacidad antioxidante que los que tenían un 1% de timol.

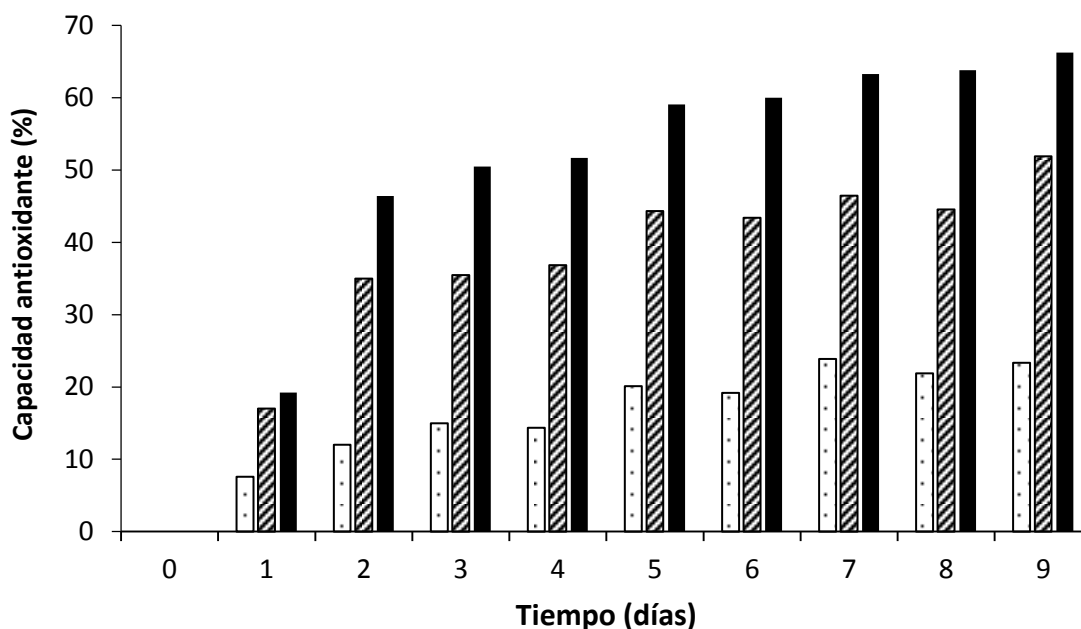


Figura 16. Capacidad de inhibir al radical DPPH por parte de los “films” cargados con timol en forma de nanopartículas de APL.

4.3. Capacidad antimicrobiana del timol y las nanopartículas de timol en soluciones acuosas, recubrimientos y “films”

4.3.1. Determinación de Escherichia coli CECT 101 en los distintos tratamientos

Para comprobar la efectividad del timol y las nanopartículas de timol, tanto en la solución acuosa como en los recubrimientos y los “films”, se inocularon manzanas con una concentración conocida de *E. coli* y se analizó la evolución del crecimiento microbiano a lo largo del tiempo.

En la Figura 17 se muestra el efecto de la solución acuosa de timol libre y encapsulado en nanopartículas sobre el crecimiento de *E. coli*. En las muestras sumergidas en soluciones que contenían $0,94 \text{ mg ml}^{-1}$ de timol en su forma libre y 1 mg ml^{-1}

encapsulado en nanopartículas de APL, no se observó crecimiento de *E. coli* a lo largo de los 14 días de seguimiento. Por otra parte, las soluciones con una concentración de timol de $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ apenas redujeron 0,5 unidades logarítmicas de UFC g^{-1} de *E. coli* y presentaron un comportamiento muy similar al control, no observándose diferencias entre el timol libre y encapsulado en nanopartículas. Por tanto, una concentración baja de compuesto antimicrobiano no tiene prácticamente efecto inhibitorio sobre *E. coli*. En cuanto a la solución de $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$, resulta más eficaz el tratamiento con nanopartículas, ya que producen un descenso gradual del crecimiento gracias a la liberación lenta de timol, mientras que el timol libre es más efectivo al principio pero luego se mitiga su efecto. Las propiedades antimicrobianas del timol encapsulado fueron estudiadas por Chen *et al.* (2015), los cuales realizaron nanocápsulas de zeína-caseína secadas por pulverización añadiendo eugenol y timol co-encapsulados. Comprobaron que se producía la liberación controlada de ambos compuestos en 24 horas, mostrando una velocidad de liberación mayor el eugenol que el timol, pero siendo los dos eficaces para inhibir el crecimiento de *E. coli* O157:H7 y de *L. monocytogenes*. Shah *et al.* (2012) compararon el efecto del timol libre y encapsulado en términos de su eficacia antimicrobiana frente a diferentes cepas de *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en sidra de manzana y leche reducida en grasa. Tanto el timol libre como el timol encapsulado mostraron eficacia antimicrobiana en ambos alimentos pero dicha eficacia depende de las condiciones de pH y de la matriz alimentaria. Por tanto, las nanocápsulas pueden ser empleadas como conservantes antimicrobianos de liberación lenta y controlada en diferentes tipos de productos alimentarios, teniendo en cuenta las propiedades de los mismos.

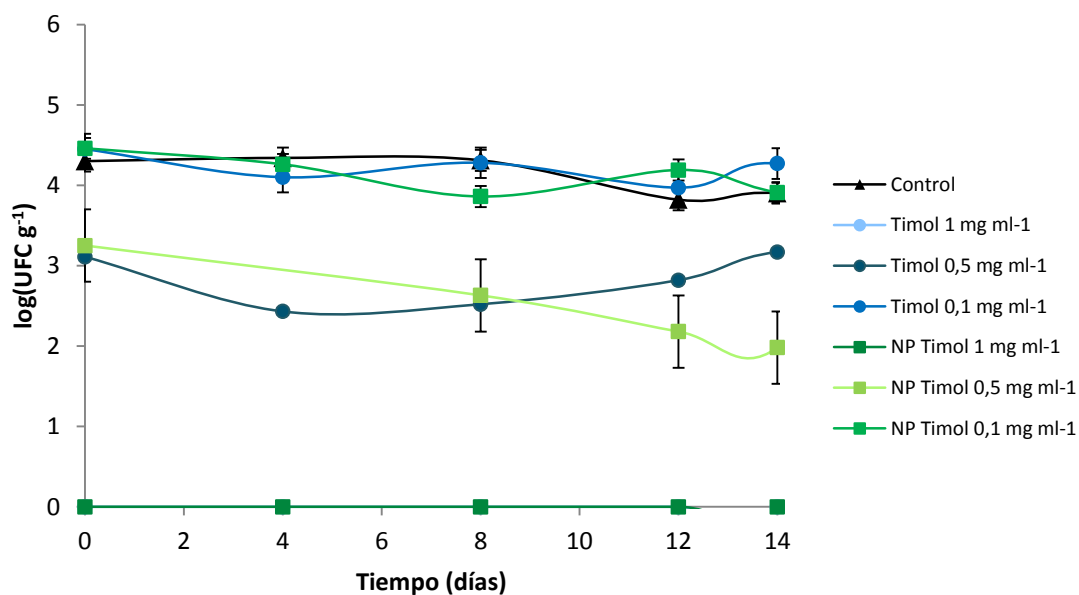


Figura 17. Evolución del crecimiento de *E. coli* CECT 101 en manzanas sometidas a tratamiento con soluciones acuosas con diferente concentración de timol (libre y encapsulado en nanopartículas) a lo largo de 14 días.

El efecto de la solución formadora de “films” sobre el crecimiento de *E. coli* se puede observar en la Figura 18. La población de *E. coli* disminuye a medida que se aumenta la concentración de timol, siendo más eficaz el timol encapsulado que en su forma libre. El tratamiento más eficaz fue el de nanopartículas de timol con una concentración de 1 mg ml⁻¹, que redujo la concentración de *E. coli* de 5,12 a 2,38 unidades logarítmicas de UFC g⁻¹ durante los 14 días de almacenamiento en refrigeración. El recubrimiento con una concentración de timol libre de 0,1 mg ml⁻¹ apenas mostró poder antimicrobiano, obteniéndose valores muy semejantes al control, mientras que los recubrimientos con timol encapsulado a esa misma concentración dieron lugar a menores valores de crecimiento de *E. coli*. En este sentido, Salvia-Trujillo *et al.* (2015) concluyeron que las manzanas tratadas con recubrimientos con aceite esencial de limón en forma de nanopartículas mostraron menor tasa de crecimiento en comparación con las manzanas recubiertas con emulsiones convencionales a la misma concentración de aceite y, además, el descenso de microorganismos era más acusado cuanto mayor era la concentración de aceite esencial de limón dentro de las nanopartículas. Shah *et al.* (2012) llegaron a la conclusión de que la encapsulación permite distribuir uniformemente el timol en alimentos para mejorar su seguridad, ya que al ser un

compuesto poco soluble en agua tiende a unirse a los alimentos con lípidos o proteínas, lo que hace difícil dispensarlo de forma uniforme y reduce su eficacia antimicrobiana. Esto permite explicar que el recubrimiento con nanopartículas de timol presente mejor capacidad antimicrobiana que el recubrimiento con timol libre.

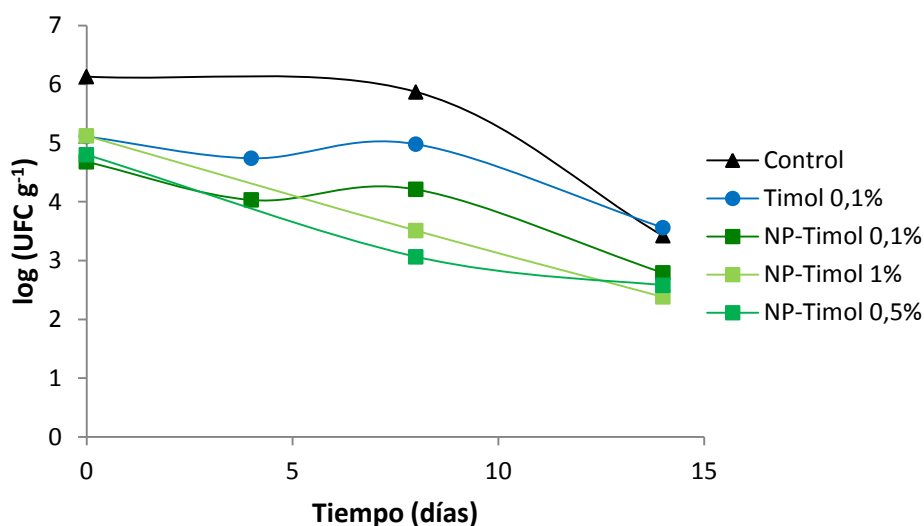


Figura 18. Evolución del crecimiento de *E. coli* CECT 101 en manzanas sometidas a tratamiento con soluciones formadoras de “film” con diferente concentración de timol (libre y encapsulado en nanopartículas) a lo largo de 14 días.

Por último, el efecto de los “films” de timol y nanopartículas de timol se representa en la Figura 19. En este caso se utilizaron concentraciones diferentes a las utilizadas en los dos tratamientos anteriores, tanto de timol libre como encapsulado. Además, solo se prepararon “films” de timol libre con una concentración de 3 mg ml⁻¹, ya que cabía la posibilidad de que el timol se hubiese evaporado durante el proceso de elaboración y secado del “film”, tal y como se ha comentado en las secciones anteriores.

Se observó que las muestras recubiertas con “films” elaborados con 3 mg ml⁻¹ de timol presentaron, desde el primer día de almacenamiento, un comportamiento prácticamente idéntico a las muestras control y ninguno de los dos tratamientos redujo significativamente el crecimiento de *E. coli*. Se concluyó que el timol libre se evapora durante la fase de secado de los “films” y por eso no se observó efecto antimicrobiano. Por otro lado, durante los 3 primeros días de almacenamiento el comportamiento de los

“films” de nanopartículas de timol, tanto con una concentración de 2 mg ml⁻¹ como con 3 mg ml⁻¹, fue similar, pero a partir del día 6 empezó a ser diferente. Los trozos de manzana recubiertos con “films” de nanopartículas con 3 mg ml⁻¹ redujeron el drásticamente crecimiento de *E. coli* al sexto día de almacenamiento, disminuyendo de 4,4 unidades logarítmicas de UFC g⁻¹ iniciales a 1,95 unidades logarítmicas de UFC g⁻¹. En ese mismo periodo de tiempo, el crecimiento en las manzanas recubiertas con “film” de nanopartículas con 2 mg ml⁻¹ solo se redujo a un valor de 3,9 unidades logarítmicas de UFC g⁻¹. En los últimos días de muestreo, el descenso fue más acusado en los “films” con 2 mg ml⁻¹ y se mantuvo prácticamente constante en los de 3 mg ml⁻¹. Al final de periodo de almacenamiento, se obtuvo un valor de 2,9 unidades logarítmicas de UFC g⁻¹ para las manzanas tratadas con “films” con una concentración de 3 mg ml⁻¹ de timol encapsulado y un valor de 2,9 para la concentración de 2 mg ml⁻¹. Ramos *et al.* (2012) estudiaron las propiedades de “films” elaborados con polipropileno a los que se les incorporó timol y carvacrol en tres porcentajes diferentes: 4, 6 y 8%. Ambos compuestos demostraron su potencial antimicrobiano a altas concentraciones (8% en peso) contra *E. coli* y *S. aureus*, siendo mayor la inhibición por parte del timol. Estos resultados demostraron la permanencia de ciertas cantidades de timol y carvacrol en la matriz polimérica, pudiendo ser aplicados como “films” de envasado de alimentos. Por tanto, podría concluirse que los “films” con timol libre no inhiben el crecimiento de *E. coli* porque la mayor parte de su concentración se evapora, la preparación de “films” de gelatina con una mayor concentración de timol es problemática debido a la baja solubilidad del timol en soluciones acuosas.

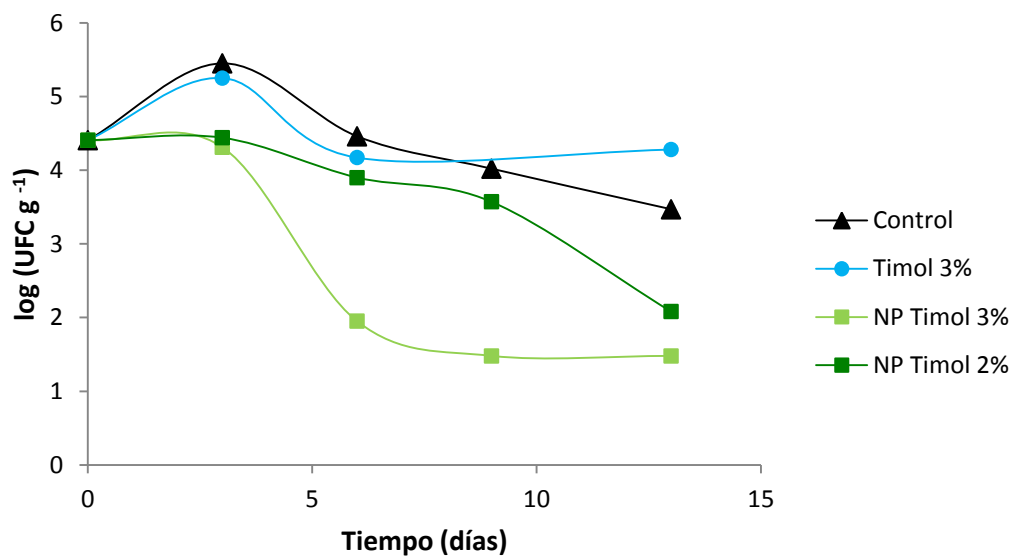


Figura 19. Evolución del crecimiento de *E. coli* CECT 101 en manzanas sometidas a tratamiento con “films” con diferente concentración de timol (libre y encapsulado en nanopartículas) a lo largo de 13 días.

Las diferentes formas de tratamiento con timol libre y encapsulado mostraron buenos resultados para inhibir el crecimiento de *E. coli*, especialmente cuando se emplearon altas concentraciones de timol. El tratamiento con “films” resultó ser el más efectivo, debido a que se empleó una concentración de timol mucho mayor que en los otros dos tratamientos. Independientemente de la concentración de timol empleada, las nanopartículas de timol resultaron ser siempre más efectivas que el timol libre, gracias a la posibilidad de la liberación gradual del timol a lo largo del tiempo. Junto con la liberación lenta, la posibilidad de poder aumentar la concentración de antimicrobiano dentro de las nanopartículas hace que sean un buen método para mejorar la conservación de los productos alimentarios.

5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se pueden extraer de este trabajo son:

1. Las soluciones de agua con timol a $0,94 \text{ mg mL}^{-1}$ y de nanopartículas de APL con timol a 2 mg mL^{-1} no tuvieron el efecto que se esperaba sobre las propiedades de la manzana ensayadas, por lo que no resultó ser un buen agente activo para el mantenimiento de estos parámetros evaluados.
2. Las diferentes formas de tratamiento con timol libre y encapsulado mostraron buenos resultados para inhibir el crecimiento de *E. coli* en manzana, especialmente al utilizar altas concentraciones de agente activo. Son de especial interés los “films” de gelatina que contienen nanopartículas de APL enriquecidas con timol, ya que podrían ser una buena alternativa para aumentar la vida útil de algunos alimentos.
3. El hecho de que el timol encapsulado sea más efectivo que el libre se explica por la posibilidad de liberarse de forma gradual a lo largo del tiempo, y por ser capaz de albergar mayores concentraciones. Por el contrario, la mala solubilidad del timol en agua y el hecho de que se evapore en la formulación de los “films” limitan su utilidad en forma no encapsulada.

6. SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

APL	Ácido poliláctico
APLG	Ácido poliláctico-co-glicólico
APV	Alcohol de polivinilo
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
CMC	Carboximetilcelulosa
DCM	Diclorometano
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
ECEA	<i>Escherichia coli</i> enteroadhesiva o enteroagregante
ECEI	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
ECEH	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
ECEP	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ECET	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
FDA	Food and Drug Administration
FP	Fuerza de punción
GRAS	Generally Recognized As Safe
HPMC	Hidroxipropil-metil-celulosa
MEB	Microscopía electrónica de barrido
Mg(NO₃)₂	Nitrato de magnesio
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NB	Nutrient Broth
NP	Nanopartículas
PCA	Plate Count Agar
TG	Termogravimetría
SHU	Síndrome hemolítico urémico
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Darwish, M. S., Al-Ramamneh, E., Kyslychenko, V. S., & Karpiuk, U. V. (2012). The antimicrobial activity of essential oils and extracts of some medicinal plants grown in Ash-shoubak region-South of Jordan. *Pak J Pharm Sci*, 25(1), 239-246.
- Amal, S., El-Mogy, M., Aboul-Anean, H., & Alsanius, B. (2010). Improving strawberry fruit storability by edible coating as a carrier of thymol or calcium chloride. *J Hort Sci & Ornament Plants*, 2(3), 88-97.
- Avena-Bustillos, R., Cisneros-Zevallos, L., Krochta, J., & Saltveit, M. (1993). Optimization of edible coatings on minimally processed carrots using response surface methodology. *Transactions of the ASAE*, 36(3), 801-805.
- Avena-Bustillos, R. J., Cisneros-Zevallos, L. A., Krochta, J. M., & Saltveit, M. E. (1994). Application of casein-lipid edible film emulsions to reduce white blush on minimally processed carrots. *Postharvest biology and Technology*, 4(4), 319-329.
- Ávila-Sosa, R., & López-Malo, A. (2008). Aplicación de sustancias antimicrobianas a películas y recubrimientos comestibles. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 2(2), 4-13.
- Basiak, E., Debeaufort, F., & Lenart, A. (2016). Effect of oil lamination between plasticized starch layers on film properties. *Food Chemistry*, 195, 56-63.
- Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Bosquez-Molina, E., & Wilson, C. (2003). Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop protection*, 22(9), 1087-1092.
- Beristain-Bauza, S. C., Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2016). Antimicrobial activity and physical properties of protein films added with cell-free supernatant of *Lactobacillus rhamnosus*. *Food Control*, 62, 44-51.
- Blanco-Pascual, N., Montero, M., & Gómez-Guillén, M. (2014). Antioxidant film development from unrefined extracts of brown seaweeds *Laminaria digitata* and *Ascophyllum nodosum*. *Food Hydrocolloids*, 37, 100-110.

- Cagri, A., Ustunol, Z., & Ryser, E. T. (2004). Antimicrobial edible films and coatings. *Journal of food protection*, 67(4), 833-848.
- Catalá, R., & Gavara, R. (2001). Nuevos envases. De la protección pasiva a la defensa activa de los alimentos envasados. *Arbor*, 168(661), 109-127.
- Colla, E., do Amaral Sobral, P. J., & Menegalli, F. C. (2006). Amaranthus cruentus flour edible films: influence of stearic acid addition, plasticizer concentration, and emulsion stirring speed on water vapor permeability and mechanical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(18), 6645-6653.
- Cong, F., Zhang, Y., & Dong, W. (2007). Use of surface coatings with natamycin to improve the storability of Hami melon at ambient temperature. *Postharvest Biology and Technology*, 46(1), 71-75.
- Coupland, J. N., & McClements, D. J. (1996). Lipid oxidation in food emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, 7(3), 83-91.
- Cha, D. S., & Chinnan, M. S. (2004). Biopolymer-based antimicrobial packaging: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 223-237.
- Chen, H., Zhang, Y., & Zhong, Q. (2015). Physical and antimicrobial properties of spray-dried zein–casein nanocapsules with co-encapsulated eugenol and thymol. *Journal of Food Engineering*, 144, 93-102.
- Das, D. K., Dutta, H., & Mahanta, C. L. (2013). Development of a rice starch-based coating with antioxidant and microbe-barrier properties and study of its effect on tomatoes stored at room temperature. *LWT-Food Science and Technology*, 50(1), 272-278.
- de Capdeville, G., Wilson, C. L., Beer, S. V., & Aist, J. R. (2002). Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested 'Red Delicious' apple fruit. *Phytopathology*, 92(8), 900-908.
- 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.
- Dhall, R. (2013). Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(5), 435-450.

- Du, W. X., Olsen, C., Avena-Bustillos, R., McHugh, T., Levin, C., Mandrell, R., & Friedman, M. (2009). Antibacterial Effects of Allspice, Garlic, and Oregano Essential Oils in Tomato Films Determined by Overlay and Vapor-Phase Methods. *Journal of Food Science*, 74(7).
- El Ghaouth, A., Ponnampalam, R., Castaigne, F., & Arul, J. (1992). Chitosan coating to extend the storage life of tomatoes. *HortScience*, 27(9), 1016-1018.
- Esmaeili, A., & Khodadadi, A. (2012). Antioxidant activity of a solution of thymol in ethanol. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 14(7), 14-18.
- Eswaranandam, S., Hettiarachchy, N., & Johnson, M. (2004). Antimicrobial activity of citric, lactic, malic, or tartaric acids and nisin incorporated soy protein film against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7, and *Salmonella gaminara*. *Journal of Food Science*, 69(3).
- 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.
- Falcone, P., Speranza, B., Del Nobile, M., Corbo, M., & Sinigaglia, M. (2005). A study on the antimicrobial activity of thymol intended as a natural preservative. *Journal of food protection*, 68(8), 1664-1670.
- Fernández-Pan, I., Royo, M., & Ignacio Maté, J. (2012). Antimicrobial activity of whey protein isolate edible films with essential oils against food spoilers and foodborne pathogens. *Journal of Food Science*, 77(7).
- García-García, R., & Palou-García, E. (2008). Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 2(2), 41-51.
- Garcia, M. A., Martino, M. N., & Zaritzky, N. E. (1998). Plasticized starch-based coatings to improve strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) quality and stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3758-3767.
- Ge, L., Li, X., Zhang, R., Yang, T., Ye, X., Li, D., & Mu, C. (2015). Development and characterisation of dialdehyde xanthan gum crosslinked gelatin based edible

films incorporated with amino-functionalized montmorillonite. *Food Hydrocolloids*.

- Ghaouth, A., Arul, J., Ponnampalam, R., & Boulet, M. (1991). Use of chitosan coating to reduce water loss and maintain quality of cucumber and bell pepper fruits. *Journal of Food Processing and Preservation*, 15(5), 359-368.
- Gonçalves, C. M., Tomé, L. C., Garcia, H., Brandão, L., Mendes, A. M., & Marrucho, I. M. (2013). Effect of natural and synthetic antioxidants incorporation on the gas permeation properties of poly (lactic acid) films. *Journal of Food Engineering*, 116(2), 562-571.
- Guarda, A., Rubilar, J. F., Miltz, J., & Galotto, M. J. (2011). The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International journal of food microbiology*, 146(2), 144-150.
- Guo, J., Ge, L., Li, X., Mu, C., & Li, D. (2014). Periodate oxidation of xanthan gum and its crosslinking effects on gelatin-based edible films. *Food Hydrocolloids*, 39, 243-250.
- Hajimehdipoor, H., Shekarchi, M., Khanavi, M., Adib, N., & Amri, M. (2010). A validated high performance liquid chromatography method for the analysis of thymol and carvacrol in *Thymus vulgaris* L. volatile oil. *Pharmacognosy Magazine*, 6(23), 154-158.
- Holderbaum, D. F., Kon, T., Kudo, T., & Guerra, M. P. (2010). Enzymatic browning, polyphenol oxidase activity, and polyphenols in four apple cultivars: dynamics during fruit development. *HortScience*, 45(8), 1150-1154.
- Hoque, M. S., Benjakul, S., & Prodpran, T. (2011). Properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin incorporated with cinnamon, clove and star anise extracts. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1085-1097.
- Imran, M., El-Fahmy, S., Revol-Junelles, A.-M., & Desobry, S. (2010). Cellulose derivative based active coatings: Effects of nisin and plasticizer on physico-chemical and antimicrobial properties of hydroxypropyl methylcellulose films. *Carbohydrate Polymers*, 81(2), 219-225.

- Insaward, A., Duangmal, K., & Mahawanich, T. (2014). Mechanical, optical, and barrier properties of soy protein film as affected by phenolic acid addition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(43), 9421-9426.
- Jamshidian, M., Tehrani, E. A., Cleymand, F., Leconte, S., Falher, T., & Desobry, S. (2012). Effects of synthetic phenolic antioxidants on physical, structural, mechanical and barrier properties of poly lactic acid film. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 1763-1773.
- Jin, T., Liu, L., Sommers, C. H., Boyd, G., & Zhang, H. (2009). Radiation sensitization and postirradiation proliferation of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat deli meat in the presence of pectin-nisin films. *Journal of food protection*, 72(3), 644-649.
- Kadam, S. U., Pankaj, S. K., Tiwari, B. K., Cullen, P. J., & O'Donnell, C. P. (2015). Development of biopolymer-based gelatin and casein films incorporating brown seaweed *Ascophyllum nodosum* extract. *Food Packaging and Shelf Life*, 6, 68-74.
- Kavoosi, G., Dadfar, S. M. M., & Purfard, A. M. (2013). Mechanical, physical, antioxidant, and antimicrobial properties of gelatin films incorporated with thymol for potential use as nano wound dressing. *Journal of Food Science*, 78(2).
- Koushesh Saba, M. (2015). Combination of carboxymethyl cellulose-based coatings with calcium and ascorbic acid impacts in browning and quality of fresh-cut apples.
- Lancheros, R. J., Beleño, J. Á., Guerrero, C. A., & Godoy-Silva, R. D. (2014). Producción de nanopartículas de PLGA por el método de emulsión y evaporación para encapsular N-Acetilcisteína (NAC). *Universitas Scientiarum*, 19(2), 161.
- Lee, B. K., Yun, Y., & Park, K. (2016). PLA micro-and nano-particles. *Advanced drug delivery reviews*, 107, 176-191.
- Lerdthanangkul, S., & Krochta, J. M. (1996). Edible coating effects on postharvest quality of green bell peppers. *Journal of Food Science*, 61(1), 176-179.

- Li, H., & Yu, T. (2001). Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(2), 269-274.
- Li, K.-K., Yin, S.-W., Yin, Y.-C., Tang, C.-H., Yang, X.-Q., & Wen, S.-H. (2013). Preparation of water-soluble antimicrobial zein nanoparticles by a modified antisolvent approach and their characterization. *Journal of Food Engineering*, 119(2), 343-352.
- Liu, L., Finkenstadt, V., Liu, C. K., Jin, T., Fishman, M., & Hicks, K. (2007). Preparation of poly (lactic acid) and pectin composite films intended for applications in antimicrobial packaging. *Journal of applied polymer science*, 106(2), 801-810.
- Liu, Q., Niu, H., Zhang, W., Mu, H., Sun, C., & Duan, J. (2015). Synergy among thymol, eugenol, berberine, cinnamaldehyde and streptomycin against planktonic and biofilm-associated food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 60(5), 421-430.
- Llana-Ruiz-Cabello, M., Gutiérrez-Praena, D., Puerto, M., Pichardo, S., Jos, Á., & Cameán, A. M. (2015). In vitro pro-oxidant/antioxidant role of carvacrol, thymol and their mixture in the intestinal Caco-2 cell line. *Toxicology in Vitro*, 29(4), 647-656.
- Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F., Gortzi, O., Izadi, M., & Nabavi, S. M. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: a brief review of the literature. *Food Chemistry*, 210, 402-414.
- Marino, M., Bersani, C., & Comi, G. (1999). Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *Journal of food protection*, 62(9), 1017-1023.
- Mastelic, J., Jerkovic, I., Blažević, I., Poljak-Blaži, M., Borović, S., Ivančić-Baće, I., Smrečki, V., Žarković, N., Brčić-Kostić, K., & Vikić-Topić, D. (2008). Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(11), 3989-3996.

- Mild, R. M., Joens, L. A., Friedman, M., Olsen, C. W., McHugh, T. H., Law, B., & Ravishankar, S. (2011). Antimicrobial edible apple films inactivate antibiotic resistant and susceptible *Campylobacter jejuni* strains on chicken breast. *Journal of Food Science*, 76(3).
- Murray, D., & Luft, L. (1973). Low DE corn starch hydrolysates: multi-functional carbohydrates aid in food formulation. *Food technology*.
- Nhari, R., Hafidz, R. M., Che Man, Y., Ismail, A., & Anuar, N. (2011). Chemical and functional properties of bovine and porcine skin gelatin. *International Food Research Journal*, 18(2), 813-817.
- Oh, J. H., Wang, B., Field, P. D., & Aglan, H. A. (2004). Characteristics of edible films made from dairy proteins and zein hydrolysate cross-linked with transglutaminase. *International Journal of Food Science & Technology*, 39(3), 287-294.
- Olasupo, N., Fitzgerald, D., Gasson, M., & Narbad, A. (2003). Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Letters in Applied Microbiology*, 37(6), 448-451.
- Oliveira, T., Makishi, G., Chambi, H., Bittante, A., Lourenço, R., & Sobral, P. (2015). Cellulose fiber reinforced biodegradable films based on proteins extracted from castor bean (*Ricinus communis* L.) cake. *Industrial Crops and Products*, 67, 355-363.
- Oms-Oliu, G., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2008). Edible coatings with antibrowning agents to maintain sensory quality and antioxidant properties of fresh-cut pears. *Postharvest Biology and Technology*, 50(1), 87-94.
- Otero-Pazos, P., Sendón, R., Blanco-Fernandez, B., Blanco-Dorado, S., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., Angulo, I., Paseiro-Losada, P., & de Quirós, A. R.-B. (2016). Preparation of antioxidant active films based on chitosan: diffusivity study of α -tocopherol into food simulants. *Journal of Food Science and Technology*, 53(6), 2817-2826.
- Pająk, P., Socha, R., Łakoma, P., & Fortuna, T. (2017). Antioxidant properties of apple slices stored in starch-based films. *International Journal of Food Properties*, 20(5), 1117-1128.

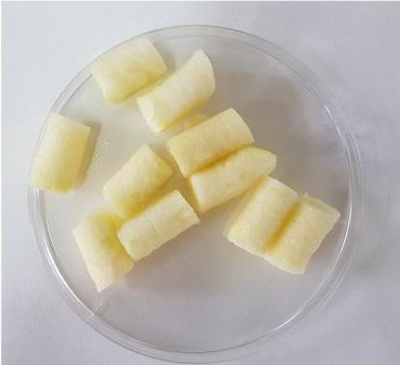
- Pan, K., Chen, H., Davidson, P. M., & Zhong, Q. (2014). Thymol nanoencapsulated by sodium caseinate: physical and antilisterial properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(7), 1649-1657.
- Park, S. I., Stan, S. D., Daeschel, M. A., & Zhao, Y. (2005). Antifungal coatings on fresh strawberries (*Fragaria* × *ananassa*) to control mold growth during cold storage. *Journal of Food Science*, 70(4).
- Pilon, L., Spricigo, P. C., Miranda, M., Moura, M. R., Assis, O. B. G., Mattoso, L. H. C., & Ferreira, M. D. (2015). Chitosan nanoparticle coatings reduce microbial growth on fresh-cut apples while not affecting quality attributes. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(2), 440-448.
- Pintado, C. M., Ferreira, M. A., & Sousa, I. (2009). Properties of whey protein-based films containing organic acids and nisin to control *Listeria monocytogenes*. *Journal of food protection*, 72(9), 1891-1896.
- Qi, H., Hu, W., Jiang, A., Tian, M., & Li, Y. (2011). Extending shelf-life of fresh-cut 'Fuji' apples with chitosan-coatings. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(1), 62-66.
- Ramos-García, M. d. L., Bautista-Baños, S., Barrera-Necha, L. L., Bosquez-Molina, E., Alia-Tejagal, I., & Estrada-Carrillo, M. (2010). Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortofrutícolas. *Revista mexicana de fitopatología*, 28(1), 44-57.
- Ramos, M., Jiménez, A., Peltzer, M., & Garrigós, M. C. (2012). Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. *Journal of Food Engineering*, 109(3), 513-519.
- Rezvani, E., Schleining, G., Sümen, G., & Taherian, A. R. (2013). Assessment of physical and mechanical properties of sodium caseinate and stearic acid based film-forming emulsions and edible films. *Journal of Food Engineering*, 116(2), 598-605.
- Rojas-Graü, M. A., Avena-Bustillos, R. J., Friedman, M., Henika, P. R., Martín-Belloso, O., & McHugh, T. H. (2006). Mechanical, barrier, and antimicrobial properties of apple puree edible films containing plant essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(24), 9262-9267.

- Rojas-Graü, M. A., Raybaudi-Massilia, R. M., Soliva-Fortuny, R. C., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H., & Martín-Belloso, O. (2007). Apple puree-alginate edible coating as carrier of antimicrobial agents to prolong shelf-life of fresh-cut apples. *Postharvest biology and Technology*, 45(2), 254-264.
- Sahoo, S. K., Panyam, J., Prabha, S., & Labhsetwar, V. (2002). Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *Journal of Controlled Release*, 82(1), 105-114.
- Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2015). Use of antimicrobial nanoemulsions as edible coatings: Impact on safety and quality attributes of fresh-cut Fuji apples. *Postharvest Biology and Technology*, 105, 8-16.
- Sangsuwan, J., Rattanapanone, N., & Rachtanapun, P. (2008). Effect of chitosan/methyl cellulose films on microbial and quality characteristics of fresh-cut cantaloupe and pineapple. *Postharvest Biology and Technology*, 49(3), 403-410.
- Shah, B., Davidson, P. M., & Zhong, Q. (2012). Nanocapsular dispersion of thymol for enhanced dispersibility and increased antimicrobial effectiveness against *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* in model food systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(23), 8448-8453.
- Shen, X. L., Wu, J. M., Chen, Y., & Zhao, G. (2010). Antimicrobial and physical properties of sweet potato starch films incorporated with potassium sorbate or chitosan. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 285-290.
- Sivarooban, T., Hettiarachchy, N., & Johnson, M. (2008). Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Research International*, 41(8), 781-785.
- Sivarooban, T., Hettiarachchy, N. S., & Johnson, M. G. (2008). Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Research International*, 41(8), 781-785.
- Tanzadehpanah, H., Asoodeh, A., & Chamani, J. (2012). An antioxidant peptide derived from Ostrich (*Struthio camelus*) egg white protein hydrolysates. *Food Research International*, 49(1), 105-111.

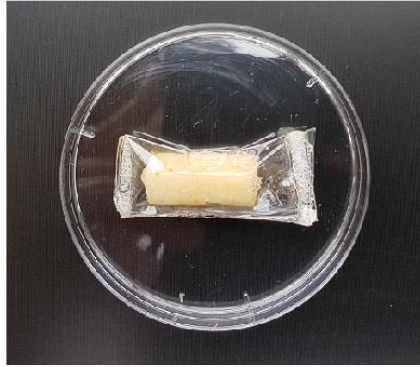
- Teixeira, B., Marques, A., Pires, C., Ramos, C., Batista, I., Saraiva, J. A., & Nunes, M. L. (2014). Characterization of fish protein films incorporated with essential oils of clove, garlic and origanum: Physical, antioxidant and antibacterial properties. *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 533-539.
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G., & Bisignano, G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(6), 2474-2478.
- Valencia-Chamorro, S. A., Palou, L., del Río, M. A., & Pérez-Gago, M. B. (2011). Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(9), 872-900.
- Valencia-Chamorro, S. A., Perez-Gago, M. B., Del Río, M. A., & Palou, L. (2009). Curative and preventive activity of hydroxypropyl methylcellulose-lipid edible composite coatings containing antifungal food additives to control citrus postharvest green and blue molds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(7), 2770-2777.
- Valenzuela, C., Tapia, C., López, L., Bungler, A., Escalona, V., & Abugoch, L. (2015). Effect of edible quinoa protein-chitosan based films on refrigerated strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) quality. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(6), 406-411.
- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2006). Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan–oleic acid edible coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 41(2), 164-171.
- Wattanasatcha, A., Rengpipat, S., & Wanichwecharungruang, S. (2012). Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent. *International journal of pharmaceutics*, 434(1), 360-365.
- Xu, J., Zhou, F., Ji, B. P., Pei, R. S., & Xu, N. (2008). The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 47(3), 174-179.
- Xu, L., Crawford, K., & Gorman, C. B. (2011). Effects of temperature and pH on the degradation of poly (lactic acid) brushes. *Macromolecules*, 44(12), 4777-4782.

8. APÉNDICES

A



B



C

