

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA



Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral, para la obtención del Grado Académico de: Doctora en Ciencia y Tecnología de los Alimentos
En el campo de: **Nanotecnología aplicada a los alimentos**

DESARROLLO Y APLICACIÓN DE RECUBRIMIENTOS NANOCOMPUESTOS PARA LA PRESERVACIÓN DE LA CALIDAD DE PRODUCTOS PANIFICADOS

Área de Biocoloides y Nanotecnología
Instituto de Tecnología de Alimentos - FIQ – UNL

Autora:

Lic. María Laura Griselda Deseta

Director: **Dr. Adrián A. Perez**

Co-directora: **MSc. Liliana G. Santiago**

Miembros del Jurado de la Tesis:

Dra. Ana BINETTI

Dra. Marcela MARTÍNEZ

Dra. María Cecilia PUPPO

2022

“Para mí, llegar a ser alguien no es llegar a un lugar o lograr un determinado objetivo. Para mí, es un movimiento hacia delante, un medio para evolucionar, una forma de alcanzar continuamente un yo mejor. El viaje no termina”

(Michelle Obama)

Dedicada a quienes me han motivado siempre a seguir, en especial a mis padres, quienes con mucho amor y esfuerzo han guiado siempre mi camino.

AGRADECIMIENTOS

A mi director, Adrián Perez, a quien admiro y agradezco profundamente por su apoyo incondicional y calidez humana. Gracias por haberme guiado y transmitido tus valiosos conocimientos durante todos estos años. Gran parte de este logro, no hubiera sido posible sin tu ayuda.

A mi co-directora Liliana Santiago, por su buena predisposición y ayuda brindada en el desarrollo de mi trabajo de tesis.

Al financiamiento de los siguientes proyectos:

-PIO-CONICET-UNER-146-201401-00025-CO: “Incorporación de nanopartículas biopoliméricas con actividad antimicrobiana en películas biodegradables”. Organismo Financiador: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET). Director responsable: Dr. Adrián A. Perez.

-PICT-2015-2961: “Recubrimientos comestibles nanocompuestos para la extensión de la vida útil de productos panificados”. Organismo Financiador: ANPCyT. Director: Dr. Adrian A. Perez.

A la Universidad Nacional del Litoral (UNL) por el otorgamiento de la Beca Doctoral y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET), por el otorgamiento de la Beca de finalización de Doctorado.

Al Instituto de Tecnología de Alimentos, y la Facultad de Ingeniería Química por brindarme el espacio y los recursos para la realización del desarrollo experimental de la presente tesis.

Al Sistema Nacional de Microscopia y a José L. Fernández por la adquisición de las imágenes AFM y el asesoramiento al respecto.

Al laboratorio de microbiología de la Facultad de Ingeniería Química, especialmente a Laura Frisón, por brindarme su espacio, recursos y experiencia para realizar parte del trabajo experimental de la presente tesis.

Al Grupo de Materiales Compuestos del Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA), en especial a Vera Álvarez y Andrés Torres Nicolini por brindarme sus conocimientos y permitirme realizar mis experiencias en su laboratorio.

A mis compañeros docentes y director del Centro Universitario Reconquista Avellaneda-UNL, Eduardo Baroni, por el apoyo y ayuda brindada.

A mi compañero Osvaldo, con quien he compartido muchos años de estudio y es quien me ha incentivado para continuar con el doctorado. También a mis compañeros del Área de Biocoloides y Nanotecnología, Flavia, Joana, Marianela, Martín, Eva, Agus y Sergio. Cada uno ha tenido de una u otra forma una contribución en el desarrollo de la presente tesis. Gracias por su compañerismo, su apoyo en cualquier circunstancia y por los lindos momentos compartidos.

A mis padres, hermanos Raúl, Lucas, Flor, Pablo y a mi novio Cristian, por su amor y apoyo incondicional. En especial a mi papá quién ya no está, pero desde allá arriba me sigue a todas partes. Gracias papá, por darme el ejemplo, por alentarme a seguir y enseñarme a ser fuerte en los momentos más difíciles. Sos y serás siempre la luz que guía mis pasos.

A mis compañeros del Instituto de Tecnología de Alimentos, quienes me han integrado desde el día que llegué a Santa Fe y con quienes he compartido hermosos momentos durante todos estos años de doctorado. En especial a Gladys y Mayu, a quienes quiero mucho y agradezco su hermosa amistad. Gracias por abrirme las puertas y permitirme ser parte.

PUBLICACIONES

El presente trabajo de Tesis dio lugar a las siguientes publicaciones:

Deseta, M.L.G., Sponton, O. E., Erben, M., Osella, C. A., Frisón, L. N., Fenoglio, C., Piagentini, A.M., Santiago, L.G., Perez, A.A. (2021). Nanocomplexes based on egg white protein nanoparticles and bioactive compounds as antifungal edible coatings to extend bread shelf life. *Food Research International*, 148, 110597. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110597>

Deseta, M.L.G., Sponton, O.E., Finos, M.B., Cuffia, F., Torres-Nicolini, A., Álvarez, V.A., Santiago, L.G., Perez, A.A. Development of antifungal films from nanocomplexes based on egg white protein nanogels and phenolic compounds. *Food Biophysics* (En proceso de revisión).

Deseta, M.L.G., Santiago, L.G., Perez, A.A. Nanoencapsulation of bioactive compounds in coatings and films to control fungal spoilage in bread. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. (En redacción).

Presentaciones en reuniones científicas:

Deseta, M.L.G.; Sponton, O.E.; Finos, M.B.; Torres-Nicolini, A.; Alvarez, V.A.; Santiago, L.G.; Perez, A.A. “Nanogeles de proteínas de clara de huevo y compuestos fenólicos como materiales formadores de películas antifúngicas”. XVI Simposio Argentino de Polímeros (SAP, 2021). Resumen. Modalidad: exposición oral.

Deseta M.L.G.; Venturini, F.; Santiago, L.G.; Perez, A.A. “Propiedades antifúngicas de películas a base de nanocomplejos de clara de huevo y compuestos fenólicos naturales: aplicación en pan”. XXI Congreso Latinoamericano y del Caribe de Ciencia y Tecnología de Alimentos & XVII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de alimentos (CYTAL, 2019). Resumen. Modalidad: póster.

Deseta M.L.G.; Marchetti, T.J.; Santiago, L.G.; Perez, A.A. “Potencial antifúngico de nanocomplejos de proteína de clara de huevo aplicados como recubrimientos en pan”. XXI Congreso Latinoamericano y del Caribe de Ciencia y Tecnología de Alimentos & XVII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de alimentos (CYTAL, 2019). Trabajo completo. Modalidad: exposición oral.

Deseta M. L. G., Finos, M.B., Gorostiague, M., Bof, M.J., Bordagaray, V.C., Locaso, D., Santiago, L.G., Perez, A.A. “Encapsulación de cinamaldehído en nanogeles de clara de huevo para su incorporación en películas biopoliméricas”. VII Congreso Internacional de Ciencias y Tecnología de los Alimentos (CICYTAC, 2018), Córdoba, Argentina. Resumen. Modalidad: póster.

Deseta M.L.G., Gorostiague, M., Finos, M., Bof, M.J., Musumeci, M.A., Santiago, L.G., Perez, A.A. “Propiedades antifúngicas de carvacrol y timol encapsulados en nanogeles de clara de huevo”. VII Congreso Internacional de Ciencias y Tecnología de los Alimentos (CICYTAC, 2018), Córdoba, Argentina. Resumen. Modalidad: póster.

Deseta M.L.G. , Finos, M., Gorostiague, M., Frison, L., Musumeci, M.A., Santiago L.G., Perez A.A. “Control del desarrollo fúngico de productos panificados mediante empleo de cinamaldehído vehiculizado en nanogeles de clara de huevo”. VII Congreso Internacional de Ciencias y Tecnología de los Alimentos (CICYTAC, 2018), Córdoba, Argentina. Resumen. Modalidad: exposición oral.

ÍNDICE

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS | 1 |
| RESUMEN | 4 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 30 |
| <i>1.1. Generalidades del pan</i> | 30 |
| 1.1.1. Producción y consumo mundial | 30 |
| 1.1.2. Proceso de elaboración | 30 |
| 1.1.3. Composición y valor nutricional | 34 |
| <i>1.2. Procesos de deterioro del pan</i> | 35 |
| 1.2.1. Deterioro físico..... | 35 |
| 1.2.2. Deterioro químico..... | 36 |
| 1.2.3. Deterioro microbiológico | 37 |
| <i>1.3. Estrategias utilizadas para el control del deterioro fúngico en pan</i> | 39 |
| <i>1.4. Tecnologías alternativas para el control del deterioro fúngico en pan</i> | 44 |
| 1.4.1. Fermentación con BAL y/o levaduras | 48 |
| 1.4.2. Compuestos antifúngicos naturales: aceites esenciales y sus compuestos bioactivos derivados | 50 |
| 1.4.2.1. Métodos de incorporación de los AE y sus CB derivados en pan..... | 34 |
| 1.4.2.1.1. Nanoencapsulación de AE y sus CB derivados..... | 36 |
| 1.4.3. Recubrimientos y películas de naturaleza biopolimérica | 44 |
| 1.4.3.1. Funcionalidad y composición..... | 44 |
| 1.4.3.2. Métodos de aplicación y formación de recubrimientos..... | 49 |
| 1.4.3.3. Métodos de obtención de películas..... | 52 |
| 1.4.3.4. Incorporación de AE o CB en recubrimientos y películas biopoliméricas..... | 55 |
| 1.4.3.5. Aplicación de recubrimientos y películas antifúngicas para conservación de pan..... | 57 |
| 1.4.4. Películas o sobres para envasado activo (no biopoliméricas)..... | 57 |
| 1.4.4.1. Sobres absorbentes de O ₂ y/o emisores de compuestos antimicrobianos..... | 60 |
| 1.4.4.2. Películas con actividad antifúngica | 61 |
| <i>1.5. Proteínas de clara de huevo</i> | 62 |
| 1.5.1. Composición y propiedades funcionales | 62 |
| 1.5.2. Antecedentes del uso de PCH en el desarrollo de nanovehículos para el transporte de CB | 64 |
| 1.5.3. Antecedentes del uso de PCH en el desarrollo de recubrimientos y películas | 66 |
| <i>1.6. Fundamentación del tema elegido</i> | 70 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2. OBJETIVOS | 73 |
| 2.1. <i>Objetivo general</i> | 73 |
| 2.2. <i>Objetivos específicos</i> | 73 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 74 |
| 3.1. <i>Materiales</i> | 74 |
| 3.2. <i>Métodos</i> | 76 |
| 3.2.1. Aislamiento y recuento total de hongos filamentosos | 76 |
| 3.2.2. Identificación de hongos filamentosos aislados | 77 |
| 3.2.2.1. Observación macroscópica de hongos filamentosos aislados | 77 |
| 3.2.2.2. Observación microscópica de hongos filamentosos aislados | 77 |
| 3.2.3. Determinación de Abundancia Porcentual y Frecuencia Relativa Porcentual de hongos filamentosos identificados | 78 |
| 3.2.4. Evaluación preliminar de la actividad antifúngica de los CA | 78 |
| 3.2.5. Obtención de nanopartículas de PCH (PCHn) | 79 |
| 3.2.6. Caracterización fisicoquímica y morfológica de nanopartículas PCHn | 80 |
| 3.2.6.1. Fluorescencia intrínseca y extrínseca | 80 |
| 3.2.6.2. Cromatografía de exclusión molecular en FPLC | 81 |
| 3.2.6.3. Análisis de distribución de tamaño de partícula y potencial ζ | 82 |
| 3.2.6.4. Estudio de los aspectos morfológicos..... | 85 |
| 3.2.7. Caracterización de la formación de complejos PCHn-CA | 85 |
| 3.2.7.1. Fluorescencia intrínseca y extrínseca | 85 |
| 3.2.7.2. Propiedades estequiométricas y parámetros termodinámicos | 86 |
| 3.2.7.3. Análisis de distribución de tamaño de partícula (PSD) y potencial ζ | 87 |
| 3.2.7.4. Estudio de los aspectos morfológicos..... | 88 |
| 3.2.7.5. Eficiencia de encapsulación (EE)..... | 88 |
| 3.2.7.6. Determinación de la actividad antifúngica | 89 |
| 3.2.7.6.1. Ensayo de microdilución en caldo..... | 89 |
| 3.2.7.6.2. Ensayo de dilución en agar..... | 90 |
| 3.2.8. Preparación de las soluciones formadoras de recubrimiento (SFR)..... | 90 |
| 3.2.9. Aplicación de SFR sobre la corteza de panes de molde sin conservantes..... | 90 |
| 3.2.10. Evaluación de los panes luego de la aplicación de las SFR | 91 |
| 3.2.10.1. Humedad y actividad acuosa (a_w)..... | 91 |
| 3.2.10.2. Análisis de textura y color..... | 91 |
| 3.2.10.3. Análisis microbiológico..... | 93 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.2.10.4. Análisis sensorial..... | 94 |
| 3.2.11. Obtención y caracterización de películas activas (PA) | 94 |
| 3.2.11.1. Preparación de nanopartículas PCH _{5-11,4} | 94 |
| 3.2.11.2. Obtención y caracterización de complejos PCH _{5-11,4} -CA..... | 95 |
| 3.2.11.2.1. Espectroscopia de fluorescencia intrínseca | 95 |
| 3.2.11.2.2. Análisis de distribución de tamaño de partícula (PSD) y potencial ζ | 95 |
| 3.2.11.2.3. Eficiencia de encapsulación (EE)..... | 96 |
| 3.2.11.2.4. Determinación de la actividad antifúngica | 96 |
| 3.2.11.3. Producción de PA..... | 96 |
| 3.2.11.4. Caracterización fisicoquímica de las PA..... | 96 |
| 3.2.11.4.1. Propiedades ópticas | 96 |
| 3.2.11.4.2. Análisis microestructural..... | 97 |
| 3.2.11.4.3. Propiedades mecánicas..... | 98 |
| 3.2.11.4.4. Análisis termogravimétrico (TGA) | 98 |
| 3.2.11.4.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)..... | 99 |
| 3.2.11.4.6. Adsorción de agua (AA)..... | 99 |
| 3.2.11.4.7. Permeabilidad al vapor de agua (WVP) | 99 |
| 3.2.11.5. Evaluación de la actividad antifúngica de las PA en pan de molde | 100 |
| 3.2.11.6. Análisis del contenido de CA liberados en las PA | 100 |
| 3.2.11.7. Análisis sensorial de los panes almacenados con PA..... | 101 |
| 3.2.12. Análisis estadístico | 101 |
| 4. RESULTADOS..... | 102 |
| 4.1. Aislamiento y recuento total de hongos filamentosos | 102 |
| 4.2. Identificación de hongos filamentosos aislados | 103 |
| 4.3. Determinación de Ab% y Fr% de hongos filamentosos identificados | 105 |
| 4.4. Evaluación preliminar de la actividad inhibitoria de los CA | 112 |
| 4.5. Caracterización fisicoquímica y morfológica de nanopartículas PCH _n | 117 |
| 4.5.1. Cromatografía de exclusión molecular en FPLC | 127 |
| 4.5.2. Análisis de distribución de tamaño de partícula y potencial ζ | 129 |
| 4.5.3. Estudio de los aspectos morfológicos de PCH _n | 132 |
| 4.6. Caracterización de la formación de complejos PCH _n -CA | 134 |
| 4.6.1. Fluorescencia intrínseca y extrínseca | 134 |
| 4.6.2. Propiedades estequiométricas y parámetros termodinámicos | 139 |
| 4.6.3. Análisis de distribución de tamaño de partícula (PSD) y potencial ζ | 143 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.6.4. Estudio de los aspectos morfológicos..... | 145 |
| 4.6.5. Eficiencia de encapsulación (EE)..... | 147 |
| 4.6.6. Determinación de actividad antifúngica..... | 148 |
| 4.6.6.1. Ensayo de microdilución en caldo..... | 148 |
| 4.6.6.2. Ensayo de dilución en agar..... | 149 |
| <i>4.7. Análisis de las soluciones formadoras de recubrimiento (SFR).....</i> | <i>150</i> |
| <i>4.8. Evaluación de los panes luego de la aplicación de las SFR.....</i> | <i>153</i> |
| 4.8.1. Humedad y actividad acuosa (a_w)..... | 153 |
| 4.8.2. Análisis de textura y color..... | 155 |
| 4.8.3. Análisis microbiológico..... | 157 |
| 4.8.4. Análisis sensorial..... | 159 |
| <i>4.9. Obtención y caracterización de PA.....</i> | <i>160</i> |
| 4.9.1. Obtención y caracterización de complejos PCH _{5-11,4} -CA..... | 161 |
| 4.9.1.1. Espectroscopia de fluorescencia intrínseca..... | 161 |
| 4.9.1.2. Análisis de distribución de tamaño de partícula (PSD) y potencial ζ | 162 |
| 4.9.1.3. Eficiencia de encapsulación (EE)..... | 163 |
| 4.9.1.4. Determinación de la actividad antifúngica..... | 164 |
| 4.9.2. Caracterización de las PA..... | 165 |
| 4.9.2.1. Propiedades ópticas..... | 166 |
| 4.9.2.2. Microestructura..... | 167 |
| 4.9.2.3. Propiedades mecánicas..... | 169 |
| 4.9.2.4. Análisis termogravimétrico (TGA)..... | 170 |
| 4.9.2.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)..... | 171 |
| 4.9.2.5. Adsorción de agua (AA)..... | 172 |
| 4.9.2.6. Permeabilidad al vapor de agua (WVP)..... | 173 |
| 4.9.2.7. Evaluación de la actividad antifúngica de las PA en pan de molde..... | 174 |
| 4.9.2.8. Análisis del contenido de CA en las PA..... | 177 |
| 4.9.2.9. Análisis sensorial de los panes almacenados con PA..... | 179 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 182 |
| 6. PERSPECTIVAS FUTURAS..... | 184 |
| 7. APÉNDICE..... | 182 |
| 7.1. Figuras y tablas..... | 182 |
| 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 214 |

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

| | |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| a* | Coordenada cromática desde el rojo (+) al verde (-) |
| AA | Adsorción de agua |
| Ab% | Abundancia porcentual |
| AE | Aceites esenciales |
| AFM | Microscopía de fuerza atómica |
| AM | Atmósferas modificadas |
| ANS | ácido 1-anilino-8-naftalenosulfónico |
| a _w | Actividad acuosa |
| b* | Coordenada cromática desde el amarillo (+) al azul (-) |
| CA | Compuesto antifúngico |
| CAR | Carvacrol |
| CB | Compuesto bioactivo |
| CIN | <i>trans</i> -cinamaldehído |
| d _H | Diámetro hidrodinámico |
| DLS | Dispersión dinámica de luz |
| DSC | Calorimetría diferencial de barrido |
| EA | Envasado activo |
| EB | Deformación a la rotura |
| EE | Eficiencia de encapsulación |
| EM | Módulo elástico o módulo de Young |
| Fr% | Frecuencia relativa porcentual |
| GRAS | Generalmente reconocido como seguro |
| HR | Humedad relativa |
| IA | Índice de amarillez |
| IF ₀ -ANS | Intensidad de fluorescencia extrínseca de máxima emisión a concentración de CA cero |
| IF ₀ -Trp | Intensidad de fluorescencia intrínseca de máxima emisión a concentración de CA cero |
| IF-ANS | Intensidad de fluorescencia debida al ANS |
| IF _{max} -ANS | Intensidad de fluorescencia máxima debida al ANS |
| IF _{max} -Trp | Intensidad de fluorescencia máxima debida al Trp |

| | |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IFR-ANS | Intensidad de fluorescencia extrínseca relativa |
| IFR-Trp | Intensidad de fluorescencia intrínseca relativa |
| IF-Trp | Intensidad de fluorescencia debida al Trp |
| Ka | Constante de asociación |
| L* | Coordenada cromática de luminosidad o claridad (0-100) |
| LIM | Limoneno |
| MEA | Agar extracto de malta |
| MFC | Concentración mínima fungicida |
| MIC | Concentración mínima inhibitoria |
| n | Número de moléculas de CA unidas por unidad monomérica de proteína |
| OVA | Ovoalbúmina |
| OVA ₃₋₁₀ | Nanopartículas obtenidas por tratamiento térmico (85°C, 5 min) de una solución de OVA al 3% m/m y pH 10 |
| OVA ₃₋₁₁ | Nanopartículas obtenidas por tratamiento térmico (85°C, 5 min) de una solución de OVA al 3% m/m y pH 11 |
| OVA _n | Nanopartículas de OVA |
| PA | Película activa |
| PCH | Proteínas de clara de huevo |
| PCH ₃₋₁₁ | Nanopartículas obtenidas por tratamiento térmico (85°C, 5 min) de una solución de PCH al 3% m/m y pH 11 |
| PCH _{5-11,4} | Nanopartículas obtenidas por tratamiento térmico (85°C, 5 min) de una solución de PCH al 5% m/m y pH 11,4 |
| PCH _n | Nanopartículas de PCH |
| PdI | Índice de polidispersidad global |
| Phe | Fenilalanina |
| pI | pH correspondiente al punto isoeléctrico |
| PM | Peso molecular |
| PSD | Distribución de tamaño de partículas |
| PSDi | Distribución de tamaño de partículas en función de la intensidad |
| PSDv | Distribución de tamaño de partículas en función del volumen |
| RC | Recubrimiento comestible |
| SEC-FPLC | Cromatografía de exclusión molecular y cromatografía líquida rápida de proteínas |

| | |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| SEM | Microscopía electrónica de barrido |
| SF | Solución filmogénica |
| SFR | Solución formadora de recubrimiento |
| SH | Grupos sulfhidrilo |
| SS | Puente disulfuro |
| TGA | Análisis termogravimétrico |
| TIM | Timol |
| TPA | Análisis de perfil de textura |
| Trp | Triptófano |
| TS | Tensión a la rotura |
| Tyr | Tirosina |
| UFC/g | Unidades formadoras de colonias por gramo |
| WVP | Permeabilidad al vapor de agua |
| WVTR | Velocidad de transmisión de vapor de agua |
| ΔE^* | Diferencia total de color |
| ΔG^0 | Cambio de energía libre estándar |
| ΔH^0 | Cambio de entalpía estándar |
| ΔS^0 | Cambio de entropía estándar |
| λ | Longitud de onda |
| λ_{em} | Longitud de onda de emisión |
| λ_{ex} | Longitud de onda de excitación |
| $\lambda_{max-ANS}$ | Longitud de onda correspondiente al máximo de intensidad de fluorescencia debida al ANS |
| $\lambda_{max-Trp}$ | Longitud de onda correspondiente al máximo de intensidad de fluorescencia debida al Trp |

RESUMEN

En el presente trabajo de tesis doctoral se planteó como objetivo, el desarrollo y la aplicación de recubrimientos y películas comestibles, a partir de nanocomplejos formados por nanopartículas de proteína de clara de huevo (PCHn) y compuestos antifúngicos (CA) derivados de aceites esenciales, para extender la vida útil de productos panificados.

Como parte inicial del trabajo, la actividad antifúngica de carvacrol (CAR), timol (TIM), *trans*-cinamaldehído (CIN) y limoneno (LIM), fue evaluada de forma preliminar utilizando el método de agar de pocillo. Para ello, se realizó un trabajo previo de aislamiento, identificación y selección de especies fúngicas a partir de panes de molde contaminados. En el rango de concentraciones evaluadas, todos los CA, a excepción de LIM, presentaron actividad antifúngica contra 5 especies fúngicas seleccionadas.

Luego, se estudió la formación de nanopartículas de proteínas de clara de huevo (PCHn) obtenidas por tratamiento térmico (85°C, 5 min) a distintas concentraciones (1-3% m/m) y pH del medio acuoso (9,5-11). Por espectroscopía de fluorescencia, se determinó que las PCHn se formaron por agregación e incrementaron significativamente su hidrofobicidad superficial. La estabilidad coloidal fue estudiada mediante distribución de tamaño de partícula y potencial ζ , a valores de pH 3 y 7. Las PCHn, caracterizadas a pH 7, presentaron un tamaño entre 30-140 nm, formas redondeadas (evaluada por microscopía de fuerza atómica) y potencial ζ de ~ -14 mV. En función de su menor tamaño y mayor estabilidad coloidal, para la obtención de complejos fueron seleccionadas las PCHn obtenidas con soluciones de PCH al 3% y pH 11 (PCH₃₋₁₁).

Seguidamente, se obtuvieron y caracterizaron nanocomplejos compuestos por PCH₃₋₁₁ y CA. La formación se examinó por fluorescencia y fueron calculados los parámetros estequiométricos y termodinámicos. El número de moléculas (n) y grado de afinidad (K_a) por PCH₃₋₁₁ fue similar para los tres CA, mientras que la naturaleza de la reacción y tipo de enlaces involucrados en la complejación dependieron del CA. Los nanocomplejos caracterizados a pH 7, presentaron formas redondeadas, tamaño < 100 nm, potencial ζ entre -16 y -21 mV, eficiencia de encapsulación (EE) >83% y actividad antifúngica *in vitro* contra *A. niger*.

A continuación, se obtuvieron soluciones formadoras de recubrimientos (SFR) a partir de soluciones de nanocomplejos PCH₃₋₁₁-CA y glicerol. Previamente, la formación de los recubrimientos fue evaluada sobre vidrio y teflón mediante la técnica de *casting*. Para comprobar la eficacia antifúngica, panes de molde sin conservantes fueron pincelados

con SFR y se almacenaron durante 7 días (25 °C). Los valores de humedad, a_w , textura, color, y características sensoriales de los panes no se vieron afectadas por las SFR. Por otro lado, las SFR basadas en PCHn-CAR y PCHn-TIM lograron retrasar efectivamente el crecimiento fúngico por 7 días.

Finalmente, se desarrollaron películas por *casting* a partir de nanocomplejos, formados por PCHn producidas en un reactor tipo batch (PCH_{5-11,4}), CAR, TIM y glicerol. Los nanocomplejos presentaron, a pH 11,5, un tamaño de ~32 nm, potencial ζ de -28 mV, EE > 81% y actividad antifúngica *in vitro* contra *A. niger*. Las películas obtenidas resultaron transparentes (medida por transmitancia a 600 nm), con coloración levemente amarilla (determinada por los parámetros a^* y b^*) y espesor de 0,18-0,27 mm. Presentaron una microestructura porosa, formada por agregados (SEM), excelentes propiedades mecánicas (evaluadas por ensayos de tracción) y resistencia térmica (determinada por TGA y DSC). Además, resultaron permeables y con capacidad de adsorber agua en cantidades variables en función de la HR de almacenamiento. Su efecto antifúngico fue demostrado al ser colocadas sobre rodajas de pan de molde sin conservantes e inhibir el crecimiento fúngico por 30 días. Por último, el análisis del contenido de CA en las películas puso en evidencia la liberación controlada de los CA durante el almacenamiento con panes.

En síntesis, la presente tesis realizó un abordaje básico y aplicado que abarcó desde el estudio de los sistemas de encapsulación proteicos o biopoliméricos para tres CA derivados de AE, hasta el desarrollo y aplicación como recubrimientos y películas comestibles y su potencial acción antifúngica en pan.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades del pan

1.1.1. Producción y consumo mundial

El pan forma parte de la dieta humana desde la antigüedad (10.000 años a.C.) y es uno de los alimentos básicos más consumidos en todo el mundo. Se estima una producción mundial de más de 100 millones de toneladas anuales de pan, siendo los principales productores la Unión Europea (65%), Estados Unidos (9%) y el continente asiático (9%) (Kosseva y Webb, 2020; Rosell y col., 2015). En Argentina, se producen alrededor de unos 3 millones de toneladas anuales de productos panificados, de los cuales un 94% corresponde al pan tradicional elaborados en panaderías artesanales y un 6% restante al pan envasado de tipo industrial (Paolilli y col., 2021).

Los patrones de consumo de pan en el mundo difieren ampliamente, pero la mayoría de los países tienen un consumo promedio estimado de 70 kg de pan por persona por año (Rahman y col., 2022). Dentro de la Unión Europea, la mayoría de los países tienen un consumo promedio de 50 kg de pan por persona por año, principalmente pan blanco. Los alemanes y austriacos poseen un consumo de alrededor de 80 kg, mientras que el Reino Unido, España e Irlanda se encuentran al final de la lista con un consumo anual de menos de 50 kg. Turquía es el país con mayor consumo per cápita de pan de 200 kg por persona, seguida por Serbia y Montenegro con 135 kg y Bulgaria con 133 kg. En América del Sur, el consumo de pan de trigo es alto solo en Chile y Argentina. El consumo de pan per cápita anual es de 96 kg en Chile, 74 kg en Argentina (70 kg de pan artesanal y 4 kg de pan envasado de tipo industrial), 28 kg en Perú, 27 kg en Brasil y 24 kg en Colombia (Paolilli y col., 2021; Rosell y col., 2015; Valenzuela y col., 2013).

1.1.2. Proceso de elaboración

El pan, es un producto fermentado cuyos cuatro ingredientes básicos son harina de trigo, agua, levadura y sal. Se han desarrollado diversos tipos de panes denominados “especiales”, elaborados adicionalmente con otros tipos de ingredientes tales como harinas de otros cereales y/o legumbres, azúcares, jarabe de glucosa, sólidos lácteos, grasas o aceites, huevos y aditivos (conservantes, reguladores de acidez, antioxidantes, etc.), entre otros. En el mercado argentino existen numerosos tipos de panes denominados por el Código Alimentario Argentino (CAA), en su capítulo IX, como: pan francés, pan de Viena, pan de molde o lacteado, pan inglés o de

sándwich, pan criollo, pan alemán, pan negro o integral, pan de Graham y pan de centeno, entre otros.

En general, el proceso de elaboración del pan, con las particularidades propias de cada sistema de elaboración y de cada tipo, consta de las siguientes etapas (Fig. 1) (Callejo González, 2002; Cauvain y Young, 2007):

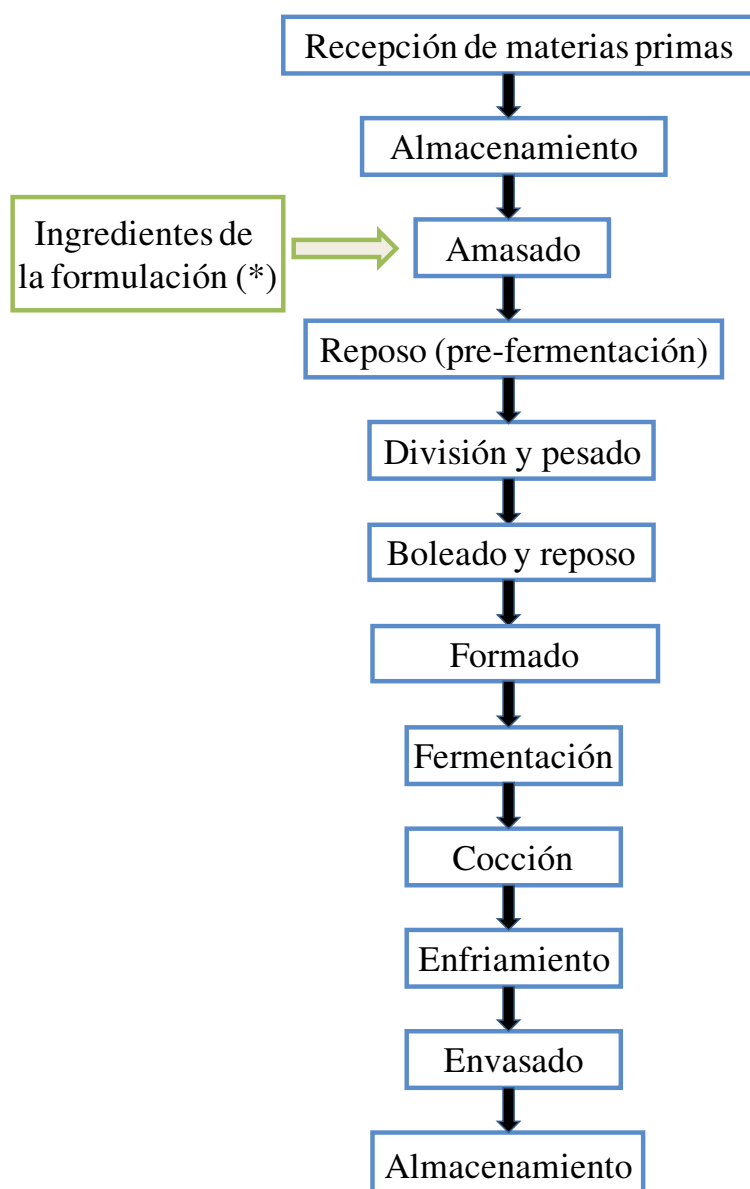


Figura 1. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de pan.

(*) La formulación depende del tipo de pan, por ejemplo el francés es elaborado con cuatros ingredientes básicos harina, agua, levadura, sal, y el de molde (o lacteado), incluye además grasa, azúcar y leche.

1. Amasado: el objetivo de esta etapa es mezclar los ingredientes para formar una masa con determinadas propiedades reológicas. Durante el amasado los componentes de la

harina absorben agua y las proteínas de trigo se combinan para formar la red de gluten. La intensidad, duración de la operación, así como el tipo de amasadora, determina en parte la calidad de la masa. Durante esta etapa se incorpora la levadura o fermento, ingrediente básico en la elaboración del pan. Entre los tipos de fermentos que pueden utilizarse se encuentran los siguientes:

- ✓ Masa fermentada (masa madre): se prepara añadiendo harina y agua a una porción de masa proveniente de un proceso de panificación anterior. La masa así obtenida, fermentada adecuadamente por levaduras y bacterias ácido lácticas (BAL) presentes naturalmente en la harina, se usa para formular una nueva masa panaria o se refresca, amasando de nuevo varias veces su peso en harina, cantidad apropiada de agua y se deja fermentar hasta el momento de usarla. El empleo de masa madre, va acompañado de fermentaciones largas y produce panes más aromáticos y de mejor conservación, pero este tipo de procesos esta hoy en día limitado a algunas elaboraciones artesanales muy concretas.
 - ✓ Levadura industrial (fresca o seca): compuesta por *Saccharomyces cerevisiae*, puede utilizarse alternativamente de dos formas. El método de la esponja consiste en preparar un cultivo previo o “esponja” unas horas antes del comienzo del amasado. La esponja se prepara con una parte de harina del total que se va a utilizar, toda la levadura y cantidad de agua suficiente como para conseguir el desarrollo de una masa. En el momento del amasado se incorporan a la amasadora el resto de la harina, el resto del agua y la sal junto con la esponja. La otra forma consiste en añadir la levadura directamente a la amasadora en el momento del comienzo del amasado y se conoce como método directo. Requiere un periodo de reposo de la masa de unos 45 min antes de la división de la misma. Sin embargo, no es útil en procesos mecanizados con división automática volumétrica.
 - ✓ Mixto: masa madre y levadura industrial.
2. Reposo o pre-fermentación: consiste en un período de descanso de la masa para su recuperación luego del amasado. Esta etapa puede llevarse a cabo a temperatura y humedad relativa (HR) ambiente o en cámaras de pre-fermentación bajo condiciones controladas (25-28°C, 80-85% de HR). En procesos industriales de producción de pan de molde esta etapa no se realiza.

3. División y pesado: la masa se fracciona en porciones de masa de igual tamaño y peso. El objetivo es asegurar la producción de piezas de pan homogénea con un peso constante.
4. Boleado: esta etapa consiste en dar forma de bollo a las porciones de masas obtenidas anteriormente consiguiendo un exterior liso que facilite su manejo en las operaciones siguientes. Durante la división de la masa, la estructura lograda durante el amasado suele romperse y desgarrarse. Por lo tanto, el objetivo de esta etapa es reconstruir la estructura de la masa tras la división.
5. Reposo: consiste en un período de descanso de la masa para su recuperación luego de la desgasificación sufrida durante la división y boleado. Esta etapa puede llevarse a cabo a temperatura y HR ambiente o en cámaras de pre-fermentación bajo condiciones controladas (25-28°C, 80-85% de HR).
6. Formado: su objetivo es dar la forma definitiva y que corresponde al tipo de pan a elaborar. Si la pieza es redonda, el resultado del boleado proporciona ya dicha forma.
7. Fermentación: corresponde al período que transcurre desde que se forma la pieza definitiva hasta el momento en que entra en el horno, durante el cual la pieza se desarrolla hasta alcanzar el volumen considerado como óptimo por el panadero. Esta etapa se realiza en cámaras de fermentación, bajo condiciones de temperatura y HR controladas (25-28°C, 80-85% de HR). Su duración es variable y depende de factores referidos a las materias primas (composición y calidad de la harina, cantidad y calidad de la levadura, exceso o escasez de sal), propios de la masa (hidratación, temperatura, acidez) y factores externos (temperatura y HR ambiente o de la cámara de fermentación). El proceso consiste básicamente en una fermentación alcohólica llevada a cabo por las levaduras (*S. cerevisiae*) que transforman los azúcares fermentables presentes en la harina o agregados, en etanol, CO₂ y algunos productos secundarios. En el caso de utilizar masa madre se producen en menor medida otras fermentaciones llevadas a cabo por bacterias lácticas. El objetivo es que el CO₂ formado, sea retenido por la masa e incremente su volumen y mejore el sabor del pan. En un sentido amplio, la fermentación se produce desde el tiempo que transcurre entre el amasado y el horneado, cuando la masa alcanza una temperatura de 50 °C en su interior.
8. Corte: es una operación intermedia que se hace en algunos tipos de masas de panes después de la fermentación, justo en el momento en el que la masa de pan va a ser

introducida en el horno. Consiste en practicar pequeñas incisiones en la superficie de las piezas para permitir el desarrollo del pan durante la cocción.

9. Cocción: el objetivo es la transformación de la masa fermentada en pan. Durante esta etapa se produce la evaporación de todo el etanol producido en la fermentación, la evaporación de parte del agua contenida en el pan, coagulación de las proteínas, transformación del almidón en dextrinas y azúcares menores y pardeamiento de la corteza. La cocción se realiza en hornos a temperaturas que van desde los 220 a los 260 °C, aunque el interior de la masa nunca llega a sobrepasar los 100 °C.
10. Enfriamiento, rebanado y envasado: luego de la cocción el producto se enfría rápidamente, para luego rebanarlo (en el caso de algunos panes como el de molde) y finalmente envasarlo.
11. Almacenamiento: las condiciones en las que se realiza esta etapa determinan en parte, el período de vida útil de estos productos. Los panes envasados pueden almacenarse a temperatura ambiente por períodos cortos (<20 días) o congelarse de forma rápida a -40°C y almacenarlos a -20°C por períodos más largos (>30 días).

1.1.3. Composición y valor nutricional

El pan, se ha convertido en un alimento básico en todo el mundo y se ha establecido como parte integral de muchas dietas modernas. Desde el punto de vista nutricional, es un producto cuyo aporte a la dieta es principalmente energético y se estima en unas 200 a 300 Kcal cada 100 g de pan (Rosell y col., 2015).

Si bien la composición nutricional varía de acuerdo a la formulación y proceso de obtención de cada tipo, en general, el pan aporta cantidades significativas de carbohidratos complejos (40-60% m/m), proteínas vegetales (7-11% m/m), grasas o aceites (0,5-9% m/m), fibra dietaria (0,5-9% m/m), vitaminas y minerales (< 1% m/m). El aporte nutricional es mayor en los panes elaborados con harinas obtenidas a partir de la molienda del grano entero. En las harinas blancas refinadas, la eliminación de algunos de los componentes del grano como el salvado y germen modifica las cualidades nutricionales generales del producto resultante (Callejo González, 2002; Cauvain, 2015).

En las últimas décadas y en la actual, el consumo de pan ha ido disminuyendo debido a los cambios en las dietas de los consumidores modernos. El mayor conocimiento sobre los efectos adversos del consumo excesivo de grasas, azúcares, hidratos de carbono y sal, y su

relación con la prevalencia de enfermedades relacionadas a una ingesta excesiva de estos alimentos (obesidad, enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2, hipertensión, y ciertos tipos de cáncer), ha generado una mayor preocupación social por aspectos como la imagen y la salud (Rosell y col., 2015).

Sin embargo, el pan ha sido reconsiderado como un producto clave dirigido a grupos específicos de población que requieren alimentos especiales o hechos a medida. Se han elaborado panes con baja densidad calórica para la prevención y el control de la obesidad, sin gluten para pacientes celíacos, productos con alto contenido de fibra para aliviar la baja ingesta actual de fibra dietética, de bajo índice glucémico para diabéticos y pacientes con síndrome metabólico (Cauvain, 2015; Rosell y col., 2015).

1.2. Procesos de deterioro del pan

El deterioro del pan es un proceso complejo, que involucra alteraciones de tipo físicas, químicas y microbiológicas que, en conjunto, contribuyen a la pérdida de calidad y vida útil de este producto (Fadda y col., 2014; Melini y Melini, 2018; Rahman y col., 2022).

Estos problemas de deterioro en pan están influenciados por factores interrelacionados, tales como la temperatura y HR de almacenamiento, el contenido de aditivos (conservantes, emulsionantes, antioxidantes, etc.), el material de envasado y la atmósfera gaseosa que rodea al producto y, lo que es más importante, por el pH, contenido de humedad y a_w del producto (Smith y col., 2004).

1.2.1. Deterioro físico

Un problema relacionado al deterioro físico y de relevancia en los productos de panadería es el envejecimiento (Fadda y col., 2014). Desde el punto de vista de calidad organoléptica, el pan recién elaborado presenta una miga elástica, blanda y húmeda, una corteza crujiente y un aroma y sabor característico. Una vez que el producto se ha enfriado, tras su cocción en el horno, comienza la pérdida gradual de esas características, en un proceso denominado envejecimiento. El envejecimiento resume pues una serie de cambios complejos, distintos de la alteración microbiana, afectando al pan tras su cocción y llegando a hacerlo inaceptable para el consumo. Los principales cambios que ocurren después de la cocción son la redistribución de la humedad, el aumento de la firmeza y la pérdida de aroma y sabor (Fadda y col., 2014; Melini y Melini, 2018; Smith y col., 2004).

El mecanismo de envejecimiento ha sido objeto de muchas investigaciones. Varios estudios han sugerido que el envejecimiento se debe a la migración de humedad de la miga a la corteza y, más específicamente, a las interacciones almidón-gluten. Los productos con un contenido de humedad más alto, como el pan, envejecen más rápido que los productos de humedad intermedia o baja, como las galletitas. Sin embargo, el envejecimiento no se debe simplemente a la pérdida o migración de la humedad del producto. La retrogradación del almidón es la causa más frecuente que contribuye al envejecimiento del pan. Se ha demostrado que el grado y la velocidad de cristalización (asociación) de los componentes del almidón, específicamente de la fracción de amilopectina no lineal, es el principal responsable del envejecimiento (Fadda y col., 2014; Melini y Melini, 2018; Rahman y col., 2022; Smith y col., 2004).

Se utilizan varios métodos para retrasar el envejecimiento de los productos panificados, incluida la reformulación con lípidos, polisacáridos, monoglicéridos y diglicéridos, enzimas termorresistentes que hidrolizan la fracción de amilopectina, entre otros (Fadda y col., 2014).

1.2.2. Deterioro químico

Un tipo de deterioro químico al que están sujetos los productos de panadería, especialmente aquellos con un alto contenido de materia grasa, es la rancidez. La misma se origina por la degradación de los lípidos dando como resultado olores y sabores indeseables, disminuyendo la aceptabilidad y vida útil de los productos. Pueden ocurrir dos tipos de rancidez: oxidativa e hidrolítica (Pareyt y col., 2011; Smith y col., 2004).

La rancidez oxidativa da como resultado la descomposición de los ácidos grasos insaturados por el oxígeno a través de un mecanismo autocatalítico de radicales libres. En consecuencia, se forman aldehídos, cetonas y ácidos grasos de cadena corta de mal sabor y olor desagradable. Estos radicales libres y peróxidos, formados durante la oxidación de lípidos, pueden provocar efectos aún más perjudiciales en la calidad de los alimentos al blanquear los pigmentos, destruir ciertas vitaminas (A, E) y degradar proteínas (Pareyt y col., 2011; Smith y col., 2004).

En cambio, la rancidez hidrolítica, a diferencia de la oxidativa, ocurre en ausencia de oxígeno y da como resultado la hidrólisis de los triglicéridos, la posterior liberación de glicerol y ácidos grasos que generan sabores desagradables. Este tipo de rancidez se ve potenciada por la presencia de humedad y enzimas endógenas, como lipasas y lipoxigenasas, las cuales se encuentran comúnmente en los cereales y otros ingredientes. Las lipasas

hidrolizan los enlaces éster de los triglicéridos. Por su parte, las lipoxidasas catalizan la oxidación de ácidos grasos insaturados con dobles enlaces no conjugados. Estas enzimas oxigenan ácidos grasos poliinsaturados (libres) y/o sus ésteres (acilglicéridos y fosfoglicéridos). Estos hidroperóxidos sufren finalmente reacciones de descomposición dando productos de oxidación similares a los que se forman durante la oxidación química o autooxidación. Muchos de los peróxidos y compuestos producidos en esta reacción son estables al calor y sobreviven al proceso de cocción del pan (Pareyt y col., 2011; Smith y col., 2004).

1.2.3. Deterioro microbiológico

El deterioro microbiológico es, a menudo, el principal factor que limita la vida útil de los productos de panadería de humedad alta e intermedia y también es una causa importante de pérdidas económicas para la industria panadera (Kosseva y Webb, 2020).

El factor más importante que influye en el tipo de deterioro microbiológico de los productos de panadería es la a_w . Para productos panificados con poca humedad ($a_w < 0,60$), el deterioro microbiológico no es un problema. En aquellos con humedad intermedia (a_w 0,60–0,85), las levaduras y mohos osmófilos son los microorganismos alterantes que más predominan. Mientras que en productos de alta humedad (a_w 0,94–0,99), casi todas las bacterias, levaduras y mohos son capaces de crecer deteriorando la calidad del pan (Legan, 1993; Smith y col., 2004). A continuación, se describe cada tipo de deterioro microbiológico.

i. Deterioro bacteriano

Este tipo de deterioro se limita a los productos de panadería con un alto a_w . El principal problema de origen bacteriano en el pan es causado por *Bacillus subtilis*, bacteria formadora de esporas (Smith y col., 2004). Este microorganismo, que suele estar presente en los ingredientes crudos (por ejemplo: harina, azúcar y levadura), sobrevive al proceso de cocción, germina al enfriarse y crece en condiciones de envasado aeróbicas y anaeróbicas. La miga de pan se decolora y se vuelve pegajosa debido a la degradación de las proteínas y almidón durante el crecimiento de la bacteria. Se han identificado otras especies de *Bacillus* que causan el deterioro bacteriano del pan, incluidos *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* y *B. cereus* (Lavermicocca y col., 2016).

ii. Deterioro por levaduras

El deterioro de productos panificados por levaduras es el tipo de deterioro microbiano con prevalencia más baja. La contaminación ocurre principalmente después del contacto físico con superficies y equipos sucios, o con otros productos de panadería ya contaminados. Las etapas críticas del proceso en donde la contaminación con levaduras se da con mayor frecuencia son durante enfriamiento y, de manera más significativa, durante la etapa de rebanado (Cauvain y Young, 2007). Las levaduras que provocan deterioro de la superficie del pan son principalmente *Hypopichia burtonii* ("moho de tiza"), *Pichia anomala* y *Scopsis fibuligera* son responsables del deterioro temprano del pan, creciendo en forma de colonias bajas, blancas y dispersas que a veces parecen salpicaduras de polvo de tiza en la superficie del producto. En menor medida, se encuentran las levaduras *Candida guilliermondii*, *Hansenula anomala* y *Debaromyces hansenii* (Legan y Voysey, 1991).

iii. Deterioro fúngico

Un problema que limita la vida útil de los productos panificados de humedad intermedia y alta es el crecimiento de hongos filamentosos. Las especies frecuentemente involucradas en el deterioro del pan pertenecen a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Epicoccum*, *Mucor*, *Rhizopus* y *Neurospora* (Císarová y col., 2021; Dos Santos y col., 2016; Garcia y col., 2019b; Legan, 1993; Pitt y Hocking, 2009; Salim-ur-Rehman y col., 2007; Tančinová y col., 2021; Viljoen y von Holy, 1997).

La tolerancia a una amplia gama de condiciones ambientales y el desarrollo micelial les permite colonizar productos alimenticios rápidamente mediante la producción de numerosas enzimas hidrolíticas capaces de hidrolizar la matriz alimentaria. La razón por la cual los hongos filamentosos son importantes organismos de deterioro del pan es debido a que esta matriz alimenticia posee hidratos de carbono como nutrientes principales (~50% m/m), un contenido de humedad relativamente alto (30-40% m/m), un a_w entre 0,94–0,97 y un pH de aproximadamente 6. Estas propiedades favorecen la germinación y el crecimiento de una amplia gama de especies fúngicas que contaminan el producto (Magan y col., 2012).

Más del 90% de la contaminación fúngica en pan ocurre durante las operaciones posteriores a la cocción, tales como el enfriamiento, rebanado y envasado (Cauvain, 2015; Dos Santos y col., 2016; Garcia y col., 2019b; Legan, 1993). Si bien, las temperaturas utilizadas durante la etapa de cocción destruyen a la mayoría de los microorganismos causantes de deterioro, el producto puede recontaminarse con esporas fúngicas presentes en el ambiente y equipos de producción. El aire es el principal agente de transporte de esporas

fúngicas (bioaerosoles), las cuales pueden provenir del mismo ambiente de producción (materias primas como la harina de trigo contaminada con una alta carga de esporas fúngicas y/o micotoxinas) o desde el exterior (aire contaminado). Estos bioaerosoles se generan principalmente durante el proceso de elaboración del pan, especialmente durante la mezcla de ingredientes. Las partículas con esporas dispersas en el aire sedimentan por gravedad sobre la superficie de los equipos y/o sobre los productos recién elaborados durante el enfriamiento (Dos Santos y col., 2016; Garcia y col., 2019b; Legan, 1993).

La contaminación presente en el ambiente depende de muchos factores tales como la higiene y desinfección de las instalaciones del área de producción, calidad higiénica del aire de ventilación, temperatura y HR del ambiente de producción y la estación del año (Legan, 1993). Durante los meses de verano ocurre mayor contaminación debido a que las condiciones de almacenamiento más cálidas y húmedas, propician su persistencia en los ambientes. Por otro lado, las operaciones de rebanado y envasado, son puntos críticos del proceso. El corte manual o mecanizado del pan en rodajas incrementa la superficie de pan expuesta al deterioro fúngico. Además, los utensilios o equipos utilizados para esta operación pueden ser fuente de contaminación. La etapa de envasado de los productos sin un correcto enfriamiento provoca la condensación de humedad en el envase plástico generando también condiciones propicias para el desarrollo fúngico (Garcia y col., 2019a; Garcia y col., 2019b; Legan, 1993).

1.3. Estrategias utilizadas para el control del deterioro fúngico en pan

Dado que, el deterioro fúngico es a menudo el principal factor que limita la vida útil de los productos de panadería de humedad intermedia y alta, los métodos para controlarlo tienen una importancia económica significativa en la industria panadera. La amplia gama de técnicas existentes utilizadas para la conservación de productos de panadería se basan en tres principios fundamentales, los cuales se describen a continuación.

i. Restricción del acceso de esporas fúngicas al producto luego de la cocción y antes del envasado

Dado que las esporas fúngicas se destruyen durante la cocción, el deterioro fúngico del pan se produce como resultado de una contaminación posterior durante las etapas de enfriamiento y envasado. Por lo tanto, la vida útil del pan podría incrementarse implementando medidas higiénico-sanitarias de tipo preventivas para reducir el número de

esporas fúngicas contaminantes presentes en el ambiente de la planta de panificación. Entre las medidas utilizadas, se encuentran (Callejo González, 2002; Dos Santos y col., 2016; Garcia y col., 2019a; Garcia y col., 2019b; Melini y Melini, 2018; Smith y col., 2004):

- ✓ El uso de materias primas de buena calidad microbiológica, para evitar que a través del aire se dispersen y contaminen los diferentes sectores de la planta de elaboración.
- ✓ Separar físicamente las áreas de elaboración de mayor contaminación (recepción, almacenamiento y elaboración), de las áreas más críticas (enfriamiento, rebanado y envasado) para evitar contaminación cruzada.
- ✓ Implementación de procedimientos de limpieza y desinfección eficaces (pre y post-operacionales) para equipos, superficies, manipuladores, utilizando agentes sanitizantes apropiados en concentraciones adecuadas.
- ✓ Aplicación de un sistema de enfriamiento rápido del pan en condiciones asépticas luego de la cocción y previo al envasado, que evite la contaminación del producto final y/o la posterior condensación de humedad en el envase.
- ✓ Control de la calidad microbiológica del aire, principalmente en el sector de enfriamiento y envasado del producto final, utilizando sistemas de ventilación/filtración que introduzcan aire de buena calidad (presión positiva) o que impidan el ingreso de contaminación desde el exterior.

ii. Inactivación de la contaminación fúngica presente en la superficie del producto luego del envasado.

A pesar de las mejoras en el diseño de la planta de panificación, los sistemas de enfriamiento y envasado, los intentos de prevenir la contaminación posterior a la cocción de los productos de panadería con esporas fúngicas han tenido un éxito limitado (Smith y col., 2004).

Por lo tanto, la atención se ha centrado en métodos para destruir y controlar cualquier tipo de contaminación posterior al procesamiento de productos con esporas fúngicas. Se han investigado varios métodos para destruir la contaminación posterior a la cocción de productos de panadería, entre ellos (Callejo González, 2002; Cauvain, 2015; Garcia y Copetti, 2019; Rybak y col., 2021; Smith y col., 2004):

- ✓ Luz UV: es un tipo de tratamiento eficaz, siendo la longitud de onda (λ) más efectiva de 260 nm. Sin embargo, este tratamiento posee una capacidad de penetración generalmente pobre y dificultad para tratar un producto de múltiples superficies o pliegues, en donde las esporas presentes podrían estar protegidas de la irradiación.

Otras desventajas incluyen el costo, seguridad en cuanto al manejo, alteración de nutrientes y/o compuestos bioactivos y la posible contaminación posterior al tratamiento debido al sellado inadecuado del material de envasado.

- ✓ Microondas: la mayoría de los estudios realizados con alimentos se han llevado a cabo a dos frecuencias -915 y 2450 megaciclos/s. Se ha demostrado que el tratamiento experimental de pan envasado con energía de microondas de alta frecuencia durante 45 a 60 s prolonga la vida útil del mismo. Su aplicación permite un tratamiento uniforme de las piezas de pan sin generar grandes gradientes de temperatura entre la superficie y el interior. Sin embargo, la aplicación de este tratamiento está limitado debido a que puede causar problemas de condensación en el envase y afectar negativamente a la apariencia del producto.
- ✓ Radiación infrarroja: este tratamiento permite destruir esporas fúngicas, sin afectar negativamente la calidad y apariencia del producto o la integridad del material de empaque. Además, minimiza los problemas por condensación o expansión del aire. Entre las desventajas, vale la pena mencionar, que es un tratamiento costoso para los productos con varias superficies que deben rotar entre calentadores o ser tratados en dos hornos separados. Además, una limitación importante es el costo del material plástico necesario, el cual debe contar con propiedades termoplásticas óptimas.
- ✓ Luz pulsada: esta tecnología emergente, utiliza destellos de una luz de amplio espectro de λ , que van desde el espectro ultravioleta (200 nm) hasta el espectro infrarrojo (1000 nm). Cada pulso o destello de luz dura solo unos pocos μ s y tiene una intensidad de luz 20.000 veces más intensa que la luz solar en la superficie de la tierra. La luz pulsada se ha investigado como un recurso para prolongar la vida útil de productos panificados. En la Unión Europea, la radiación de luz se puede utilizar para el tratamiento de pan siendo el rango de λ permitido de 240 a 315 nm.

iii. Inhibición del desarrollo fúngico en el producto envasado

Es el método más utilizado por la industria panadera para extender la vida útil del pan envasado. El objetivo es controlar el crecimiento fúngico posterior al envasado del pan. Esto se puede lograr a través de

- ✓ *Reformulación del producto*: la vida útil de los productos de panadería con alto contenido de humedad, está relacionada con su pH y a_w por lo tanto, la reformulación del producto para modificar ambos parámetros podría utilizarse para aumentar la vida

útil (Legan, 1993; Magan y col., 2012). La reducción del pH se puede lograr mediante el uso de acidulantes, como ácidos orgánicos (ácidos cítrico, láctico, acético) o cultivos de bacterias ácido lácticas (por el agregado de masa madre o de cultivos iniciadores). La reducción de a_w se puede lograr mediante la adición de solutos, como azúcares, sales, polialcoholes o productos lácteos fraccionados. Sin embargo, una limitación de este enfoque, particularmente para controlar el deterioro fúngico, es que el nivel de solutos requerido para la inhibición puede resultar en cambios adversos sobre las propiedades sensoriales y de textura de los productos (Smith y col., 2004).

- ✓ *Uso de aditivos conservantes de origen sintético:* entre los compuestos utilizados para evitar el deterioro fúngico del pan y los productos a base de harina de trigo, se encuentran los ácidos propiónico y sórbico. Ambos son considerados aditivos GRAS (generalmente reconocidos como seguros). Debido a que estos ácidos son volátiles y corrosivos, sus sales de sodio, potasio o calcio son las formas más utilizadas debido a su mayor solubilidad en agua, estabilidad y facilidad de manejo (Legan, 1993; Magan y col., 2012; Smith y col., 2004). A bajos valores de pH, se encuentran en su forma no disociada y pueden penetrar fácilmente en la membrana plasmática de los microorganismos. Una vez en el interior de la célula, los ácidos se disocian y, debido a la liberación de protones, el citoplasma celular se acidifica. En consecuencia, el descenso del pH disminuye la actividad de la fosfofructoquinasa, una enzima clave de la glucólisis, y por lo tanto reduce la producción de ATP (Axel y col., 2017; Garcia y col., 2019a). El uso de estos conservantes se encuentra legislado en muchos países. En Argentina, el CAA (capítulo IX, artículo N° 747), establece que en la elaboración de pan con un contenido de humedad mayor al 12%, se permite el empleo de propionato de calcio o sodio de hasta 0,32% m/m en productos elaborados con harinas blancas y de 0,38% m/m para productos elaborados con harinas integrales o sus mezclas. Además, permite el empleo de soluciones alcohólicas de ácido sórbico y cítrico para aplicar por vaporización sobre la superficie de los productos previo a su envasado. Como límite máximo, se permite un nivel residual de ácido sórbico en pan de hasta 0,02% m/m y de alcohol etílico de hasta 0,3% en volumen (capítulo IX, artículo N° 749). En otros países como los de la Unión Europea, en panes envasados se permite el uso de sorbato hasta un 0,2% m/m y se puede añadir propionato de calcio hasta un máximo del 0,3 % m/m (Axel y col., 2017). Mientras que, Brasil por ejemplo, estableció que la cantidad de sorbato agregado al pan debe ser igual o inferior al 0,1% (m/m) y la adición de propionato ilimitada (de Jesus y col., 2018). Se ha demostrado

que el uso de una concentración del 0,3% m/m de propionato de calcio en la elaboración de pan blanco permite extender la vida útil por aproximadamente 14 días (Rizzello y col., 2011). Por otro lado, se encuentra el etanol, el cual también es considerado como GRAS. Posee una fuerte actividad antibacteriana, antifúngica, y escasa efectividad contra el crecimiento de levaduras (Melini y Melini, 2018; Smith y col., 2004). Su aplicación por aspersión sobre la superficie del pan antes del envasado, es un método frecuentemente utilizado para inhibir y retrasar el desarrollo fúngico. En Argentina no se encuentra listado como aditivo conservante para productos panificados. Sin embargo, se aplica junto con el sorbato de potasio por vaporización. Concentraciones que oscilan entre el 0,2% y el 12% v/v han demostrado ser eficaces para aumentar la vida útil del pan (Dao y Dantigny, 2011). Además, su adición sobre la superficie del pan contribuye a mejorar el efecto inhibitorio del sorbato y propionato (Katsinis y col., 2008). Sin embargo, se debe tener en cuenta que el uso de etanol en el envasado de alimentos tiene algunos inconvenientes debido al fuerte olor indeseable.

- ✓ *Envasado en atmósferas modificadas*: los métodos tradicionales incluyen envasado al vacío y envasado en atmósferas modificadas (AM), mientras que los métodos novedosos incluyen sobres interactivos, capaces de absorber O₂ o emitir etanol (Smith y col., 2004). Estas últimas se describen más adelante en la sección 1.4.4.1. El envasado al vacío consiste en colocar el producto dentro de un envase plástico de baja permeabilidad al O₂ y luego eliminar el aire por completo. El oxígeno en el espacio de cabeza del envase se reduce a <1%, es decir, niveles que retrasan el crecimiento fúngico. Sin embargo, esta tecnología no es adecuada para extender la vida útil de pan, debido a que la estructura porosa que posee este producto colapsa afectando seriamente sus propiedades organolépticas. Solo se ha utilizado para prevenir problemas de deterioro fúngico en panes planos de poco volumen como el pan tipo pita y en masas para pizza (Smith y col., 2004). El envasado en AM consiste en colocar el producto dentro de un envase plástico en contacto con una mezcla adecuada de gases. Los gases utilizados en el envasado incluyen principalmente N₂ y CO₂. El N₂ es un gas inerte que no tiene efecto antimicrobiano y se utiliza principalmente como gas de relleno. Entre los gases que tienen un efecto antimicrobiano, solo se permite el uso de CO₂ en productos de panadería por razones de estabilidad, baja toxicidad, no altera la calidad organoléptica de los productos y es de bajo costo. El CO₂ es tanto bacteriostático como fungistático, es decir, inhibe el crecimiento de bacterias y moho. Es altamente soluble en agua y grasas, donde forma ácido carbónico, lo que puede

resultar en una reducción del pH del producto (Legan, 1993; Magan y col., 2012). Su efectividad en el control de deterioro fúngico de pan depende de varios factores como el número y tipo de microorganismos presentes (mayor eficacia con un recuento inicial bajo, presencia de especies resistentes al CO₂), concentración (mayor porcentaje de CO₂, mayor eficacia), la temperatura (mayor efectividad a bajas temperaturas ya que favorecen la disolución de CO₂) y permeabilidad del material de envasado (impermeables al O₂ y CO₂) (Legan, 1993; Smith y col., 2004). El potencial de las atmósferas enriquecidas con CO₂ para prolongar la vida útil de pan ha sido demostrada. El almacenamiento de algunos tipos de pan bajo una atmósfera con 17% de CO₂, es capaz de inhibir parcialmente el crecimiento fúngico, mientras que con un 50% de CO₂ es posible inhibirlo completamente (Rodríguez y col., 2000; Skovholt y Bailey, 1933). Algunas de las desventajas de esta tecnología incluyen el costo inicial del equipo de empaque, problemas de fermentación secundaria causados por microorganismos resistentes al CO₂ y el crecimiento potencial de microorganismos de interés para la salud pública, particularmente *Clostridium botulinum*. Además, la estructura altamente porosa del pan no permite la eliminación completa del O₂ ni un eficiente intercambio de gases. Por lo tanto, el O₂ puede persistir en el envase y, con el tiempo, acumularse en el espacio superior hasta un nivel suficiente que permita el desarrollo fúngico (Melini y Melini, 2018).

1.4. Tecnologías alternativas para el control del deterioro fúngico en pan

Si bien son numerosas las estrategias tecnológicas utilizadas para controlar el deterioro fúngico en productos de panadería, solo algunas de estas técnicas se aplican comercialmente en pan (Debonne y col., 2018).

Durante muchos años, la industria del pan envasado, a nivel global, ha utilizado los conservantes propionato de calcio y/o sorbato de potasio como método para retrasar el deterioro fúngico e incrementar su vida útil. En la actualidad, su uso continúa siendo masivo y ambos conservantes suelen utilizarse en conjunto. El propionato de calcio es incorporado directamente en la masa, debido a que no afecta a las levaduras, mientras que el sorbato, cuyo espectro antifúngico es más amplio, suele ser aplicado por aspersión sobre la superficie del producto terminado (Smith y col., 2004). Sin embargo, el uso de estos conservantes presenta algunas desventajas y/o limitaciones tecnológicas, las cuales se analizan a continuación.

i. pH del alimento en donde se aplican

El pH máximo de actividad para el sorbato de potasio es de 6-6,5 y de 5-5,5 para el propionato de calcio (Liewen y Marth, 1985; Suhr y Nielsen, 2004). La eficacia de estos conservantes, en función de su concentración y el pH de la matriz alimentaria, ha sido evaluada. Arroyo (2003), estudió el número de días sin aparición de desarrollo fúngico de análogos de pan (formulación de pan desarrollada en una placa de Petri) con diferentes concentraciones de propionato de calcio y sorbato de potasio (0,003%, 0,03% y 0,3%, m/m) y a tres valores de pH (4,5, 6 y 7,5). La mayor eficacia, 30 días sin aparición de desarrollo fúngico, se obtuvo utilizando la máxima concentración (0,3%) y a pH 4,5. Luego, a pH 6 y 0,3% m/m de concentración, el número de días se redujo a 17 días con sorbato de potasio y a 3 días con propionato. A pH 7,5 la reducción del número de días fue aún mayor. Por otro lado, cuando utilizaron las concentraciones más bajas, la eficacia se redujo en gran medida.

ii. Desarrollo de resistencia fúngica

Se ha evidenciado que el uso prolongado de estos conservantes puede generar el desarrollo de resistencia fúngica de algunas especies e incluso la producción de micotoxinas (Levinskaite, 2012). Suhr y Nielsen (2004), investigaron sobre la inhibición de 8 especies fúngicas causantes de deterioro en productos panificados utilizando propionato de calcio en concentraciones de 0,003 %, 0,03 % y 0,3 % (m/v) en un medio formulado con a_w entre 0,94-0,97 y pH 4,4-4,8. Los resultados mostraron que la concentración más alta de propionato (0,3%) en todas las condiciones inhibió totalmente el crecimiento de hongos durante un período de 2 semanas, con la excepción de *P. roqueforti*, *P. commune* y *E. rubrum*. En otro trabajo, Marin y col. (2002) evaluaron el uso de sorbato de potasio, propionato de calcio y benzoato de sodio para evitar el deterioro por *A.niger*, *A. flavus* y *P. corylophilum* en análogos de un tipo de producto de panadería con un a_w entre 0,80-0,90 y pH de 6 y 7,5. En todos los casos, las condiciones de a_w de 0,80 y pH 6, resultaron ser las más efectivas para los 3 conservantes y las especies fúngicas evaluadas. Con un a_w de 0,90 y utilizando la máxima concentración de los 3 conservantes las especies de *Aspergillus* resultaron resistentes. Se determinó que el sorbato de potasio fue el más eficaz para prevenir el deterioro a la concentración máxima probada (0,3%). Además, el uso de concentraciones por debajo del nivel máximo (0,03%) estimuló el crecimiento de todas las especies evaluadas. Por otro lado, Arroyo y col. (2005) evaluaron la producción de ocratoxina por 3 cepas de *P. verrucosum* en análogos de pan adicionados con propionato de calcio y sorbato de potasio (0,03% y 0,3%

m/m), a pH 4,5 y 6. Cuando se utilizó una cantidad de 0,03% de conservantes, se detectaron hasta 7 $\mu\text{g/g}$ a pH 4,5. Mientras que a pH 6, las tres cepas produjeron ocratoxina en todas las condiciones de tratamiento, aunque en el pan tratado con conservantes tuvo menos presencia. Por lo tanto, el uso de este tipo de conservantes de origen sintético, implica revisar y ajustar la formulación del producto en donde se agregan (a_w , pH) para poder asegurar su eficacia antifúngica y extender la vida útil del producto. Lo cual se considera para determinados tipos de pan, una limitante.

iii. *Riesgos de salud (asociados a un exceso de consumo)*

Los propionatos y sorbatos son considerados de baja toxicidad humana y se metabolizan extensamente en el cuerpo humano. El Comité Mixto de la FAO/OMS estableció una ingesta diaria admisible (IDA) de sorbatos (expresada como ácido sórbico) en 25 mg/kg/día. Mientras que la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria en 2015 reevaluó los sorbatos como aditivos alimentarios y redujo la IDA recomendada de 25 a 3 mg/kg/día para el ácido sórbico y su sal de potasio. En cambio, se consideró innecesario establecer una IDA recomendada para los propionatos (de Jesus y col., 2018). Sin embargo, estos conservantes podrían representar un riesgo para la salud si se utilizan de manera inespecífica o en exceso. En algunos trabajos se ha determinado el contenido de propionato de calcio en muestras comerciales de pan, en donde las cantidades halladas excedían significativamente los límites reglamentarios permitidos por la legislación de cada país (Faraji y Dastmalchi, 2016; Phechkrajang y Yooyong, 2017).

Los altos niveles de ingesta dietaria de ácido propiónico se han asociado con acidemia propiónica en niños (Pena y Burton, 2012). Las complicaciones de esta enfermedad pueden incluir dificultades de aprendizaje, convulsiones, arritmia, síntomas gastrointestinales e infecciones recurrentes y muchas otras (Schreiber y col., 2012; Wajner y Goodman, 2011). Wajner y col. (1999) informaron que el efecto inmunosupresor del propionato dietario podría reducir la resistencia a las infecciones, lo que explica las infecciones recurrentes típicas de los pacientes con acidemia propiónica. En otro trabajo, se determinó que ciertos niveles de consumo de propionato pueden causar irritabilidad, inquietud, falta de atención y trastornos del sueño en algunos niños (Dengate y Ruben, 2002). En el caso del sorbato de potasio, cuya toxicidad ha sido reevaluada, algunos estudios han demostrado que el aumento en su ingesta puede causar citotoxicidad y genotoxicidad, inducidos por la aberración cromosómica, el intercambio de cromátidas hermanas y la rotura del ADN. Estos factores pueden conducir a

muchas enfermedades crónicas, especialmente diabetes y cáncer, entre otras (Dehghan y col., 2018; Wang y col., 2020; Zengin y col., 2011).

iv. Tendencias del consumidor moderno

Durante la última década, el comportamiento del consumidor y el tipo de alimentos que consume ha cambiado. En particular, las preocupaciones de los consumidores sobre la seguridad y el contenido de aditivos en los alimentos han recibido mucha atención. Además, el número de consumidores conscientes de la salud es cada vez mayor. Aquellos productos que se muestran orgánicos o naturales, respetuosos con el medio ambiente, socialmente sostenibles e innovadores también están cautivando la atención de los consumidores. En consecuencia, existe en el mercado una gran demanda de alimentos “naturales” y “saludables” sin conservantes ni aditivos (Axel y col., 2017).

Siguiendo estas tendencias, los fabricantes de alimentos en general se han movilizado cada vez más para producir los llamados alimentos “*clean-label*” (etiqueta limpia) que se ajustan a este estilo de vida más saludable de los consumidores. Este término no es una definición científica, pero es una definición popular ampliamente aceptada por la industria alimentaria, los consumidores y la comunidad científica. La definición se refiere a productos elaborados con la menor cantidad posible de ingredientes, asegurándose de que los consumidores puedan identificarlos fácilmente como ingredientes no artificiales, no sintéticos y saludables. El etiquetado de dichos productos tiene afirmaciones como "sin conservantes" o "natural". A su vez, este tipo de alimentos mínimamente procesados sin conservantes sintéticos u otros aditivos artificiales deben ser de alta calidad y tener una vida útil prolongada (Vargas y Simsek, 2021).

Por lo tanto, existe la necesidad de encontrar alternativas naturales y saludables a los aditivos conservantes utilizados tradicionalmente. Los productos de panadería no son una excepción a esta tendencia y existe un impulso por parte de la industria hacia la búsqueda de alternativas naturales para evitar el deterioro fúngico. Durante los últimos años se han explorado diversas alternativas tecnológicas tales como el uso de fermentos a base de bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras, compuestos antifúngicos extraídos de fuentes naturales, recubrimientos y películas comestibles y tecnologías de envasado activo (Samapundo y col., 2017; Tebben y col., 2018; Vargas y Simsek, 2021).

1.4.1. Fermentación con BAL y/o levaduras

Antiguamente, el pan natural, aromatizado y de larga conservación se obtenía mediante un proceso tradicional de fermentación conocido como “masa madre”. La palabra "masa madre" describe una receta de pan particular en la que se fermenta una masa obtenida a partir de harina, agua, BAL y levaduras (presentes naturalmente en la harina) (Rahman y col., 2022). Debido a su notable actividad antifúngica, la industria panadera recientemente comenzó a reconsiderar este método de fermentación tradicional para posiblemente reemplazar los conservantes sintéticos y así garantizar una etiqueta limpia (Axel y col., 2017).

La masa madre se ha convertido así en una forma establecida de bioconservación de alimentos y el papel que desempeñan las BAL como bioagentes e inhibidores del deterioro del pan se ha explorado y destacado científicamente (Axel y col., 2017; Melini y Melini, 2018; Rahman y col., 2022). Al mismo tiempo este tipo de fermentación imparte efectos positivos adicionales, como un mejor sabor, textura y propiedades nutricionales, junto con una mayor aceptación por parte del consumidor. Otro beneficio, es que muchas especies de BAL pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*, se han incluido en la lista de Presunción Cualificada de Seguridad para uso autorizado en la cadena de alimentos dentro de la Unión Europea. Lo mismo se aplica a los Estados Unidos, donde son consideradas GRAS por la FDA (Axel y col., 2017).

Se ha encontrado una sólida base científica sobre la capacidad de los fermentos o masa madre para retardar el envejecimiento, proteger el pan del deterioro y, posteriormente, contribuir a prolongar la vida útil del pan (Axel y col., 2016; Corsetti y col., 2000; Moroni y col., 2009; Samapundo y col., 2017). *Lactobacillus acidophilus* ATCC 20079, *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280, *Levilactobacillus brevis* R2D, *Limosilactobacillus fermentum* Te007, *Levilactobacillus hammesi*, *Lacticaseibacillus paracasei* D5, *Companilactobacillus paralimentarius* PB127, *Lactiplantibacillus pentosus* G004, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus reuteri* R29, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Furfurilactobacillus rossiae* LD108, *Lactococcus* BSN, *Pediococcus acidilactici* KTU05-7, *Pediococcus pentosaceus* KTU 05-8 y KTU 05-10, así como *Leuconostoc citreum* C5 y HO12 son algunas de las cepas de BAL con una interesante acción bioconservadora del pan cuando se utilizan como cultivos iniciadores (Axel y col., 2017; Melini y Melini, 2018; Rahman y col., 2022).

La caída del pH y la acidificación, que generalmente se asocian con la producción de ácidos láctico y acético, pueden prolongar la vida útil del pan solo de forma limitada y no influyen en gran medida en la inhibición fúngica. La capacidad antimicrobiana que han

demostrado poseer las BAL, está relacionada con los compuestos activos que producen y/o liberan y que son complementarios a los conservantes sintéticos o que incluso pueden sustituir su uso. Los metabolitos que ejercen principalmente actividad antifúngica son específicamente compuestos de bajo peso molecular, como bacteriocinas, dipéptidos cíclicos, ácidos grasos, ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, ácido feniláctico, diacetilo y reuterina, entre otros (Axel y col., 2017; Corsetti y col., 2015).

Algunos autores han evaluado el uso de BAL como cultivos iniciadores y su impacto sobre la vida útil de pan. La eficacia antifúngica de *Lactobacillus amylovorus* DSM19280 como cultivo iniciador de masa fermentada fue evaluado por Axel y col. (2015). Como resultado se observó que la vida útil del pan aumentó 4 días, en relación a las muestras control, que presentaron desarrollo fúngico después de solo 2 días. Por otro lado, Cizeikiene y col. (2013) utilizaron cepas de *Pediococcus acidilactici* KTU05-7, *Pediococcus pentosaceus* KTU05-8 y KTU05-10 en masa fermentada para elaboración de pan. Sus hallazgos mostraron que agregar masa madre hecha con estas cepas, inhibió el crecimiento fúngico durante un período de almacenamiento de 8 días. En otro trabajo realizado por Rizzello y col. (2011), se evaluó la eficacia antifúngica de un fermento elaborado con germen de trigo, *Lactiplantibacillus plantarum* LB1 y *Furfurilactobacillus rossiae* LB5. Los panes obtenidos con estos fermentos (4% m/m) se cortaron en rodajas, se envasaron en bolsas de polietileno y se almacenaron a temperatura ambiente. Luego de 28 días de almacenamiento, no se observó crecimiento fúngico en las rodajas de pan elaboradas con el fermento.

Por otra parte, la aplicación de levaduras diferentes a la utilizada en panificación (*S. cerevisiae*) con o sin la combinación de BAL representa una alternativa prometedora para la conservación de pan (Axel y col., 2017). Las levaduras compiten por los nutrientes con los patógenos fúngicos y producen micotoxinas capaces de actuar contra microorganismos patógenos presentes en los alimentos. Algunos géneros de levaduras producen compuestos extracelulares e intracelulares que poseen propiedades antibacterianas. La producción de etanol de alta concentración y ácidos orgánicos resulta en un cambio de pH del medio también responsable de la efectividad de las levaduras como bioconservadores (Rahman y col., 2022). Con *Lactiplantibacillus plantarum* 1A7 como iniciador, se ocupó la levadura *Wickerhamomyces anomalus* LCF1695 (anteriormente reconocida como *Pichia anomala*) para la fermentación de masa madre. Se encontró que cuando se inoculó artificialmente *Penicillium roqueforti* DPPMAF1 (10^2 conidios/mL) con esta combinación y se almacenó a temperatura ambiente, la vida útil se prolongó hasta al menos 14 días (Coda y col., 2011). El crecimiento de *Penicillium panneum* KACC 44834 en pan blanco fermentado con *Penicillium anomala*

SKM-T, se redujo significativamente en comparación con la levadura de panadería estándar y mejoró la vida útil del pan (Mo y Sung, 2014). Por otra lado, la obtención de masas fermentadas a partir de un cultivo iniciador mixto formado por *Meyerozyma guilliermondii* LCF1353, *Wickerhamomyces anomalus* LCF1695 y *Lactiplantibacillus plantarum* 1A7, permitieron obtener excelentes resultados en la extensión de vida útil de pan (Coda y col., 2008).

1.4.2. Compuestos antifúngicos naturales: aceites esenciales y sus compuestos bioactivos derivados

Los aceites esenciales (AE), metabolitos secundarios producidos por las plantas, se caracterizan por ser líquidos aromáticos y de naturaleza oleosa. Se extraen de diferentes partes de la planta, tales como flores (jazmín, rosa, violeta y lavanda), brotes (clavo), hojas (tomillo, orégano, romero, eucalipto, salvia), frutos (anís, anís estrellado), corteza (canela), cáscara (cítricos), semillas (cardamomo), madera (sándalo), rizoma y raíces (jengibre). Su extracción se puede llevar a cabo por diferentes métodos, siendo la destilación por arrastre con vapor el más utilizado para la producción comercial de AE (Burt, 2004; El Asbahani y col., 2015; Hanif y col., 2019).

Los AE han sido utilizados por la humanidad desde la Edad Media, por su amplio espectro de propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antitumorales, antihipertensivas, inmunomoduladoras, antihepatotóxicas, insecticidas y antimicrobianas. Durante los últimos años, han recibido considerable atención por parte del sector de la industria de alimentos debido a su potencial como saborizantes, aromatizantes y principalmente como conservantes naturales (Bakkali y col., 2008; Burt, 2004; Hyldgaard y col., 2012). En la actualidad se conocen aproximadamente 3000 tipos de AE, de los cuales 300 son comercialmente importantes (Burt, 2004). Son considerados GRAS por la FDA y en Argentina, el CAA autoriza su uso como aditivos saborizantes y/o aromatizantes (capítulo VIII, Res. GMC N° 10/06).

Los AE son mezclas naturales muy complejas que pueden contener entre 20 y 60 compuestos bioactivos (CB) en concentraciones variables. Se caracterizan por tener dos o tres componentes principales en concentraciones más altas (20–70%) o componentes mayoritarios, en comparación con otros componentes presentes en cantidades mínimas (componentes minoritarios o traza). Las propiedades biológicas que presentan, se atribuyen a sus CB (Bakkali y col., 2008).

Las plantas, como mecanismo de defensa frente a patógenos (microorganismos, insectos, parásitos, etc.), son capaces de producir una gran variedad de CB, que se pueden clasificar en tres categorías: (1) fitoanticipinas que son componentes antimicrobianos preformados presentes en las plantas; (2) compuestos preformados inducibles y; (3) fitoalexinas que incluyen componentes inhibitorios inducidos cuando la planta está bajo ataque de patógenos (Debonne y col., 2018). Estos componentes son metabolitos secundarios de bajo peso molecular, de amplio espectro antimicrobiano (Gould, 1996; Sanchez Maldonado y col., 2015). Las tres categorías tienen actividad conservadora potencial en productos alimenticios. Dentro de la categoría 1, la mayor parte de estos compuestos se encuentran en los AE. En comparación con la categoría 1, las categorías 2 y 3 están mucho menos documentadas. Hasta el día de hoy, todavía se sabe muy poco sobre las aplicaciones reales de estos últimos compuestos en productos alimenticios (Debonne y col., 2018).

Los CB de la categoría 1, se pueden clasificar en terpenos, terpenoides, fenilpropenos y otros (Hyldgaard y col., 2012). Los terpenos son hidrocarburos producidos a partir de la combinación de varias unidades de isopreno (C_5H_8). Son sintetizados en el citoplasma de las células vegetales y la síntesis procede a través de la vía del ácido mevalónico a partir de la acetil-CoA. Los principales terpenos son los monoterpenos ($C_{10}H_{16}$) y los sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$), pero también existen cadenas más largas como los diterpenos ($C_{20}H_{32}$), triterpenos ($C_{30}H_{40}$), etc. Los ejemplos de terpenos incluyen ρ -cimeno, limoneno, terpineno, sabineno y pineno. Estos compuestos poseen escasa actividad antimicrobiana (Hanif y col., 2019; Hyldgaard y col., 2012).

Los terpenoides, son terpenos que sufren modificaciones bioquímicas a través de enzimas que agregan moléculas de oxígeno y mueven o eliminan grupos metilo. Se pueden subdividir en alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas, éteres, fenoles y epóxidos. Ejemplos de terpenoides son: timol, carvacrol, linalol, acetato de linalilo, citronelal, piperitona, mentol y geraniol. La actividad antimicrobiana de la mayoría de los terpenoides está ligada a sus grupos funcionales y se ha demostrado que el grupo -OH de los terpenoides fenólicos y la presencia de electrones deslocalizados son importantes para la actividad antimicrobiana (Hyldgaard y col., 2012; Konuk y Ergüden, 2020).

Los fenilpropenos constituyen una subfamilia entre los diversos grupos de compuestos orgánicos denominados fenilpropanoides que se sintetizan a partir del aminoácido precursor fenilalanina en las plantas. Los fenilpropanoides tienen su nombre del grupo fenol aromático de seis carbonos y la cola de propeno de tres carbonos del ácido cinámico, producidos en el primer paso de la biosíntesis de fenilpropanoides. Los fenilpropenos constituyen una parte

relativamente pequeña de los AE, y los que se han estudiado más a fondo son el eugenol, isoeugenol, vainillina, safrol y cinamaldehído. La actividad antimicrobiana de estos CB depende del tipo y la cantidad de sustituyentes en el anillo aromático, las cepas microbianas seleccionadas y los parámetros de prueba experimentales, como la elección del medio de cultivo, la temperatura, etc. (Hyldgaard y col., 2012; Pauli y Kubeczka, 2010).

La actividad antimicrobiana de los AE, generalmente se asocia no solo con sus componentes mayoritarios sino también con los componentes minoritarios o traza. Su composición química varía según, el tipo de especie vegetal, su ubicación geográfica, ambiente y etapa de maduración, así como el método de obtención del AE. Además, la parte de la planta de donde se obtiene el AE es otro factor crítico. Actualmente existe abundante información sobre la actividad antibacteriana, sin embargo, la actividad antifúngica y antimicotoxigénica de los AE aún continúa siendo escasa y no se ha estudiado en profundidad. Recientemente, Mutlu-Ingok y col. (2020) y Debonne y col. (2018), llevaron a cabo una extensa revisión bibliográfica sobre la actividad antifúngica *in vitro* de los AE sobre especies fúngicas causantes de deterioro en productos panificados. Entre ellos, se han explorado en gran parte la actividad de los aceites de canela, orégano, tomillo, romero, clavo y en menor medida de menta, limón, lima. Se han determinado efectos inhibitorios contra un gran número de especies pertenecientes principalmente a los géneros *Aspergillus* (*flavus*, *niger*, *oryzae*, *fumigatus*, *parasiticus*, *ochraceus*), *Penicillium* (*expansum*, *brevicompactum*, *italicum*, *chrysogenum*), *Fusarium* (*oxysporum*, *verticillioides*, *solanum*) y *Rhizopus* (*nigricans* y *stolonifer*).

Entre los CB responsables de la actividad antifúngica de los AE de orégano, tomillo, canela y cítricos (limón, naranja, lima) se encuentran el carvacrol, timol, *trans*-cinamaldehído y limoneno, respectivamente, los cuales han sido utilizados en la presente tesis doctoral. A continuación, se describen las características y propiedades de cada uno.

Carvacrol y timol

Los compuestos carvacrol (CAR: 5-isopropil-2-metilfenol) y timol (TIM: 2-isopropil-5-metilfenol), son monoterpenos de naturaleza fenólica. Se encuentran presentes naturalmente en los aceites esenciales aislados de plantas pertenecientes a la familia *Lamiaceae* (géneros *Thymus*, *Ocimum*, *Origanum* y *Monarda*), y otras plantas como las pertenecientes a las *Verbenaceae*, familias *Scrophulariaceae*, *Ranunculaceae* y *Apiaceae*. La fuente principal de estos CB son los aceites esenciales de orégano (*Origanum spp*) y tomillo (*Thymus spp*), los

cuales se encuentran en cantidades variables (30-80% m/m) (Babili y col., 2011; Burt, 2004; Houmani y col., 2002; Hyldgaard y col., 2012). Ambos, son biosintetizados mediante la hidroxilación de ρ -cimeno y sus estructuras químicas se muestran en la Fig. 2. Como puede apreciarse, ambos compuestos son isómeros que difieren en la posición del grupo $-OH$ (Hyldgaard y col., 2012).

El interés científico de estas moléculas se debe a su amplio espectro de propiedades biológicas y farmacológicas, como antiinflamatorias, antioxidantes, antitumorales, antihipertensivas, inmunomoduladoras, antihepatotóxicas, insecticidas y antimicrobiana (Marchese y col., 2016; Rathod y col., 2021).

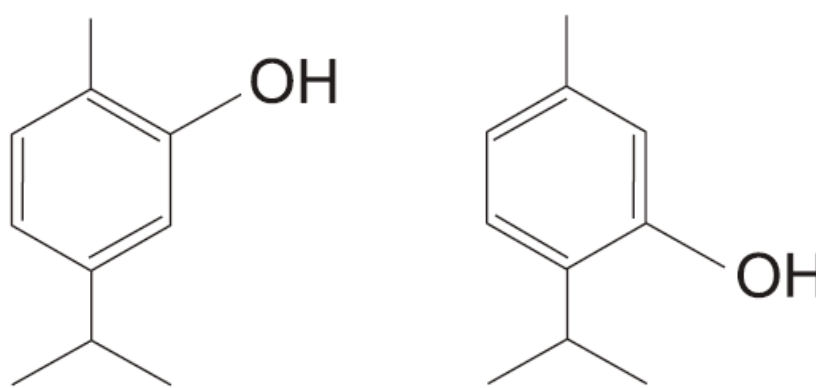


Figura 2. Estructura química de los compuestos CAR (izq.) y TIM (der.) (Burt, 2004).

El modo de acción principal como antifúngicos aún no se ha dilucidado completamente, pero hasta el momento, se conoce que debido a su naturaleza lipofílica el sitio de acción de CAR y TIM es la membrana citoplasmática. Su presencia en la misma, provoca daños estructurales y funcionales. Estos daños involucran la ruptura de la membrana, alteración de vesículas y alteración de la biosíntesis de ergosterol, lo que, en consecuencia, afecta la integridad de la membrana celular. Cabe destacar, que el ergosterol regula la fluidez y la asimetría de la membrana de manera similar al colesterol en las células animales. En consecuencia, se produce la alteración de la permeabilidad de la membrana, evidenciada por la pérdida de potencial, fugas de iones de potasio y ATP (Chavan y Tupe, 2014; Cristani y col., 2007; Hyldgaard y col., 2012; Qu y col., 2021; Zhang y col., 2019). Su actividad antifúngica también se atribuye a la presencia de grupos $-OH$ y electrones deslocalizados. Los electrones deslocalizados permiten la liberación de protones de los grupos $-OH$ de manera que se reduce el gradiente de protones a través de la membrana celular. El gradiente de protones

reducido, junto con el agotamiento resultante de la reserva de ATP, mata las células microbianas (Konuk y Ergüden, 2020).

Su actividad antifúngica *in vitro* ha sido demostrada contra un amplio espectro de especies fúngicas patógenas, causantes de deterioro en productos panificados, utilizando diversas técnicas microbiológicas (Rathod y col., 2021). En las Tablas 1 y 2 se resumen los resultados hallados en la bibliografía, indicando la especie fúngica estudiada, el método utilizado para determinar la actividad antifúngica y el resultado obtenido.

Tabla 1. Actividad antifúngica de CAR contra especies fúngicas patógenas y causantes de deterioro de productos panificados.¹

| Carvacrol | | | |
|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| Especie fúngica | Método | CMI/Inhibición ⁽¹⁾ | Referencia |
| <i>A. niger</i> | | 50 µg/mL | |
| <i>A. fumigates</i> | | 100 µg/mL | |
| <i>A. flavus</i> | | 100 µg/mL | |
| <i>A. ochraceus</i> | | 100 µg/mL | |
| <i>Alternaria alternata</i> | Microdilución en caldo | 350 µg/mL | Abbaszadeh y col. (2014) |
| <i>B. cinerea</i> | | 300 µg/mL | |
| <i>Cladosporium</i> spp. | | 100 µg/mL | |
| <i>P. citrinum</i> | | 150 µg/mL | |
| <i>P. chrysogenum</i> | | 125 µg/mL | |
| <i>F. oxysporum</i> | | 125 µg/mL | |
| <i>R. oryzae</i> | | 200 µg/mL | |
| <i>A. flavus</i> | Dilución en agar | 200 µg/mL Inhibición de la producción de aflatoxina B ₁ | Qu y col. (2021) |
| <i>A. niger</i> | Difusión en agar | Diámetro del halo inhibición ≥85 mm (10% v/v) | Bouddine y col. (2012) |
| | Macrodilución en caldo | 0,25 µL/mL | |
| <i>P. verrucosum</i> | Macrodilución en caldo | 100 µg/mL | Schlösser y Prange (2019) |
| <i>A. flavus</i> | | 200 µg/mL | |
| <i>P. roqueforti</i> | Macrodilución en caldo | 100 µg/mL | Manso y col. (2015) |

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

⁽¹⁾: La inhibición se indicó para estudios en los que no se indica el valor de CMI.

*EC₅₀: concentración que causa el 50% de inhibición del crecimiento de micelio.

¹ Tabla de elaboración propia

Tabla 2. Actividad antifúngica de TIM contra especies fúngicas patógenas y causantes de deterioro de productos panificados.²

| Timol | | | |
|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------|
| Especie fúngica | Método | CMI/Inhibición⁽¹⁾ | Referencia |
| <i>A. niger</i> | | 200 µg/mL | |
| <i>A. fumigates</i> | | 150 µg/mL | |
| <i>A. flavus</i> | | 125 µg/mL | |
| <i>A. ochraceus</i> | | 125 µg/mL | |
| <i>Alternaria alternata</i> | Microdilución en caldo | 400 µg/mL | Abbaszadeh y col. (2014) |
| <i>Cladosporium spp.</i> | | 100 µg/mL | |
| <i>P. citrinum</i> | | 250 µg/mL | |
| <i>P. chrysogenum</i> | | 500 µg/mL | |
| <i>F. oxysporum</i> | | 300 µg/mL | |
| <i>R. oryzae</i> | | 450 µg/mL | |
| <i>A. niger</i> | Difusión en agar | Diámetro del halo inhibición ≥85 mm (10% v/v) | Bouddine y col. (2012) |
| | Macrodilución en caldo | 0,25 µL/mL | |
| <i>A. flavus</i> | Macrodilución en caldo | 0,25 µL/mL | Mishra y col. (2013) |
| <i>A. niger</i> | | *EC ₅₀ =23,80 mg/mL | |
| <i>P. digitatum</i> | Dilución en agar | *EC ₅₀ =20,14 mg/mL | Marei y col. (2012) |
| <i>F. oxysporum</i> | | *EC ₅₀ =50,37 mg/mL | |

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

⁽¹⁾: La inhibición se indicó para estudios en los que no se indica el valor de CMI.

*EC₅₀: concentración que causa el 50% de inhibición del crecimiento de micelio.

Trans-cinamaldehído

El compuesto *trans*-cinamaldehído (CIN: *trans*-3-fenilprop-2-enal) es el principal componente de algunos aceites esenciales de canela. Se produce naturalmente en las hojas y en la corteza de los caneleros. Este importante CB es un aldehído aromático α,β -insaturado (está compuesto por un aldehído insaturado unido a un grupo fenilo), perteneciente al grupo de compuestos llamado fenilpropanoides (Doyle y Stephens, 2019; Sun y col., 2020) (Fig. 3).

Es un líquido aceitoso de color amarillo y posee olor y sabor dulce a canela. Desde hace tiempo, se utiliza como agente aromatizante en gomas de mascar, helados, golosinas, bebidas y dulces. Además, es ampliamente utilizado para dar olor y/o sabor a canela a productos médicos, cosméticos y perfumes (Sun y col., 2020).

² Tabla de elaboración propia

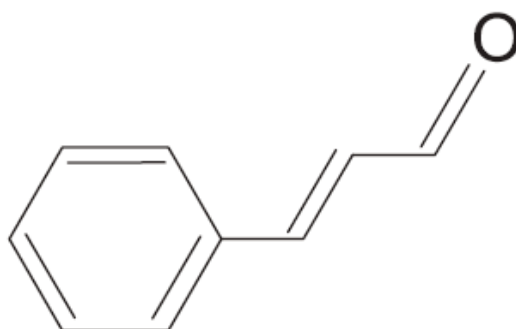


Figura 3. Estructura química del compuesto *trans*-cinamaldehído (Burt, 2004).

La actividad antifúngica de CIN ha sido ampliamente demostrada. En la [Tabla 3](#) se resumen algunos resultados sobre determinación de actividad antifúngica de CIN hallados en la bibliografía. El mecanismo por el cual CIN ejerce acción antifúngica aún no se conoce completamente. Al igual que los compuestos CAR y TIM, debido a su naturaleza lipofílica, el CIN puede difundir a través de la pared celular, alterando la estructura celular, la integridad de la membrana y las funciones de las organelas (Sun y col., 2016; Wang y col., 2018a; Wang y col., 2018b; Xing y col., 2014).

Tabla 3. Actividad antifúngica de CIN contra especies fúngicas patógenas y causantes de deterioro de productos panificados.³

| <i>Trans</i> -cinamaldehído | | | |
|-----------------------------|------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------|
| Especie fúngica | Método | CMI/Inhibición ⁽¹⁾ | Referencia |
| <i>A. niger</i> | Dilución en agar | 0,10 µL/mL | Niu y col. (2022) |
| | Difusión gaseosa | 0,00625 µL/mL | |
| <i>A. niger</i> | Macrodilución en caldo | ≥ 75 µg/mL | Sun y col. (2020) |
| | Dilución en agar | 150 µg/mL | |
| | Difusión gaseosa | ≥ 300 µg/mL | |
| <i>P. verrucosum</i> | Macrodilución en caldo | 80 µg/mL | Schlösser y Prange (2019) |
| <i>A. flavus</i> | Difusión gaseosa | 21,8 µL/L de atmósfera sobre la superficie del agar | López y col. (2007) |
| <i>A. flavus</i> | Macrodilución en caldo | 100 µg/mL | Manso y col. (2015) |
| <i>P. roqueforti</i> | | 100 µg/mL | |
| <i>F. verticillioides</i> | Dilución en agar | 45 µL/L | Xing y col. (2014) |

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

⁽¹⁾: La inhibición se indicó para estudios en los que no se indica el valor de CMI.

*EC₅₀: concentración que causa el 50% de inhibición del crecimiento de micelio.

³ Tabla de elaboración propia

Por otro lado, también se han observado efectos inhibitorios de CIN sobre la producción de micotoxinas, tales como la ocratoxina A producida por *A. ochraceus* (Wang y col., 2018a) y de patulina (Wang y col., 2018c).

Recientemente, Sun y col. (2020), estudiaron el modo de acción de CIN frente a *A. niger*. Determinaron que el tratamiento con CIN produjo cambios irreversibles en la morfología y la ultraestructura de las células del micelio, con una notable plasmólisis y deformación que indicaron la presencia de pérdida citoplasmática y daño de organelas. Además, se observó que el tratamiento con CIN produjo una inhibición de la producción de ergosterol, alterando en consecuencia la integridad de la membrana, y la producción de sustancias reactivas al oxígeno en las hifas (estrés oxidativo), impidiendo el desarrollo de las células fúngicas, al atacar las mitocondrias, los ácidos nucleicos y proteínas, además de conducir a la peroxidación de lípidos.

Limoneno

El limoneno (LIM: 4-isopropenil-1-metilciclohexeno) es un hidrocarburo monoterpénico y monocíclico (Fig. 4), sintetizado naturalmente en muchas plantas a través de la ciclación del pirofosfato de geranilo por una monoterpeneo sintetasa. Constituye uno de los monoterpeneos monocíclicos más abundantes en el reino vegetal. De hecho, se ha encontrado en más de 300 aceites esenciales y principalmente en las especies *Citrus spp.* (30-98%) (Bora y col., 2020; González-Mas y col., 2019; Stević y col., 2014; Van Hung y col., 2013).

Sus propiedades biológicas han sido ampliamente estudiadas, demostrando tener efectos antiinflamatorios, antioxidantes, antinociceptivos, anticancerígenos, antidiabéticos, antihiperalgésicos, antivirales, gastroprotectores y antimicrobianos entre otros (Jing y col., 2014; Vieira y col., 2018).

Existe en forma de dos tipos de isómeros ópticos, llamados d- y l-limoneno, así como una mezcla racémica. El más común, el d-limoneno ((+)-limoneno) es un líquido incoloro con un olor característico y agradable a limón, obtenido normalmente del prensado en frío de cáscaras y pulpas de cítricos donde se puede encontrar en concentraciones superiores al 90% (Ibáñez y col., 2020). Mientras que el l-limoneno ((-)-limoneno) está más presente en otras especies como en AE de *Mentha spp.* Ambos son aditivos utilizados comúnmente en cosméticos, alimentos, solventes industriales y productos farmacéuticos debido a su fragancia e inocuidad (Ibáñez y col., 2020).

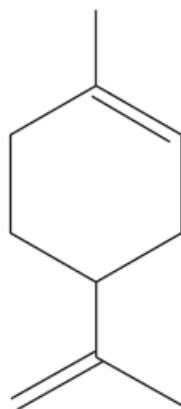


Figura 4. Estructura química del compuesto limoneno (Burt, 2004).

El conocimiento sobre el mecanismo de acción antifúngica de LIM es aún escaso. Yu y col. (2022) estudiaron el mecanismo de acción de d-limoneno contra el patógeno oportunista *C. tropicalis*. La actividad antifúngica se atribuyó principalmente a la falla del transporte de iones y la generación de ATP en la membrana, la interrupción de la homeostasis de iones intracelulares y la fuga extensa de sustancia intracelular causada por el potencial, la permeabilidad y la integridad de la membrana celular. Además, el d-limoneno también condujo a la supresión o trastornos metabólicos intracelulares en *C. tropicalis*.

La actividad antifúngica de LIM ha sido evaluada y demostrada por numerosos autores. Los resultados hallados en la bibliografía sobre la actividad antifúngica de LIM contra especies fúngicas deteriorantes de productos panificados se resumen en la Tabla 4. Cabe destacar que, en algunos trabajos se ha utilizado AE de naranja con alto contenido de LIM (>90% m/m) por lo que la inhibición observada podría atribuirse a dicho compuesto.

1.4.2.1. Métodos de incorporación de los AE y sus CB derivados en pan

La adición directa de los AE y/o de sus CB derivados en alimentos presenta algunos inconvenientes. Por un lado, podrían generarse pérdidas importantes de los compuestos inmediatamente después de haber sido aplicado debido a su elevada volatilidad, su capacidad de reaccionar con otros componentes del alimento, su sensibilidad a la luz y temperatura, podría oxidarlos o descomponerlos, lo que supondría una disminución de su eficacia antimicrobiana (Debonne y col., 2018; Gutierrez y col., 2009; Hyldgaard y col., 2012).

Tabla 4. Actividad antifúngica de LIM contra especies fúngicas patógenas y causantes de deterioro de productos panificados.⁴

| Limoneno | | | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Especie fúngica | Método | CMI/Inhibición⁽¹⁾ | Referencia | | |
| <i>A. niger</i> <i>P. digitatum</i> <i>F. oxysporum</i> | Dilución en agar | *EC ₅₀ =38,04 mg/mL *EC ₅₀ =26,83 mg/mL *EC ₅₀ =153,2 mg/mL | Marei y col. (2012) | | |
| <i>A. flavus</i> ⁽²⁾ | Dilución en agar Difusión gaseosa | 16000 mg/L 8000 mg/L de aire | Velázquez-Nuñez y col. (2013) | | |
| <i>P. chrysogenum</i> ⁽³⁾ | Difusión en agar | Zona de inhibición: 18,99 mm | Tao y col. (2009) | | |
| | Microdilución en caldo | 9,33 µL/mL | | | |
| <i>Penicillium sp.</i> <i>F. oxysporum</i> <i>F. solani</i> <i>F. verticilloides</i> <i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> <i>A. alternata</i> | Microdilución en caldo ⁽⁴⁾ | 16 mg/mL 9,70 mg/mL 12 mg/mL 12,10 mg/mL 15,20 mg/mL 12,10 mg/mL 16,40 mg/mL | Stević y col. (2014) | | |
| <i>F. verticillioides</i> | | Dilución en agar semisólido | | 1 mL/mL | Dambolena y col. (2008) |
| <i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i> | | Microdilución en caldo | | 2,70 mg/mL 3,15 mg/mL | Rammanee y Hongpattarakere (2011) |
| <i>A. niger</i> ⁽⁵⁾ | | | | Difusión en agar de pocillo | |
| | | Difusión en agar (disco de papel de filtro) | | Diámetro del halo 6 mm (30µL) | |
| <i>A. niger</i> ⁽⁶⁾ | | Difusión en agar de pocillo | | Diámetro del halo de inhibición 5,5 mm (30µL) | Mahdavi Omran y col. (2011) |
| | | Difusión en agar (disco de papel de filtro) | | Diámetro del halo de inhibición 7,5 mm (30µL) | |
| <i>Penicillium sp.</i> ⁽⁵⁾ | Difusión en agar de pocillo | Diámetro del halo de inhibición 3 mm (30µL) | Mahdavi Omran y col. (2011) | | |
| | Difusión en agar (disco de papel de filtro) | Diámetro del halo de inhibición 1,5 mm (30µL) | | | |
| <i>Penicillium sp.</i> ⁽⁶⁾ | Difusión en agar de pocillo | Diámetro del halo de inhibición 0 mm (30µL) | Mahdavi Omran y col. (2011) | | |
| | Difusión en agar (disco de papel de filtro) | Diámetro del halo de inhibición 3,5 mm (30µL) | | | |

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

⁽¹⁾: La inhibición se indicó para estudios en los que no se indica el valor de CMI.*EC₅₀: concentración que causa el 50% de inhibición del crecimiento de micelio.⁴ Tabla de elaboración propia

⁽²⁾ AE de naranja (*C. sinensis* *Osborn*) con un contenido de limoneno de 96,62% (m/m); ⁽³⁾ AE de naranja (*C. sinensis* *Osborn*) con un contenido de limoneno de 77,49% (m/m); ⁽⁴⁾ AE de naranja (*C. aurantium amara*) con un contenido de limoneno de 90,1% (m/m); ⁽⁵⁾ (R)-(+)-limoneno; ⁽⁶⁾ (S)-(-)-limoneno

Por otro lado, la baja solubilidad en agua de estos CB, además de limitar su aplicación, dificulta su acción en aquellas áreas del alimento donde los microorganismos probablemente crecen y proliferan más, tales como fases acuosas o interfases sólido-líquido. Además, estos compuestos fuertemente aromáticos podrían otorgarle aroma y sabor excesivo al alimento, alterando drásticamente las propiedades sensoriales del mismo (Hyldgaard y col., 2012).

Por lo tanto, se requieren de estrategias para proteger las propiedades bioactivas de los AE y sus CB derivados durante el procesamiento de alimentos. Como alternativa a esta problemática, existen actualmente técnicas muy utilizadas como la encapsulación, la incorporación en recubrimientos, películas comestibles y en películas o sobres (no comestibles) para envasado activo (Mutlu-Ingok y col., 2020). Estas técnicas se describen en secciones posteriores.

1.4.2.1.1. Nanoencapsulación de AE y sus CB derivados

El desarrollo de sistemas de vehiculización mediante encapsulación ha ganado considerable interés en la industria alimentaria. Esta estrategia consiste en encapsular compuestos activos con características fisicoquímicas y propiedades funcionales específicas en matrices poliméricas, con el objetivo de transportarlos y liberarlos de forma controlada. Su uso en alimentos implica que los materiales utilizados para la encapsulación sean considerados seguros y comestibles (Delshadi y col., 2020).

En general, la encapsulación se define como un proceso que atrapa una sustancia (agente activo) en otra sustancia (material de pared o de soporte), produciendo partículas en la escala nanométrica (nanoencapsulación), micrométrica (microencapsulación) y hasta milimétrica (Joye y McClements, 2014).

La micro y nanoencapsulación son dos métodos comunes que se han utilizado para la vehiculización de AE y sus CB en el sector alimentario y que presenta una serie de ventajas respecto a una posible aplicación directa, tales como (Chaudhari y col., 2021; Prakash y col., 2018):

- i. *Protección de los compuestos frente a condiciones adversas:* casi el 90-95% de los AE son constituyentes volátiles, tales como terpenos, terpenoides, aldehídos alifáticos, alcoholes y ésteres. Estos compuestos pueden verse fácilmente afectados por las

condiciones externas, como el aire, el calor, la luz y la irradiación, por lo que su bioactividad puede verse comprometida.

- ii. *Mejora de la solubilidad:* partes de los CB, como los alcoholes orgánicos, ácidos grasos, alcanos, éteres, cetonas, etc., hacen que la mayoría de los AE sean hidrofóbicos. Por lo tanto, la encapsulación en polímeros hidrofílicos los hace solubles en un medio acuoso. Esto es importante ya que la gran mayoría de los alimentos son de naturaleza acuosa. Por otra parte, asegura una distribución homogénea en la matriz del alimento.
- iii. *Promueve una liberación controlada:* se retiene una mayor cantidad en la matriz del producto, reduciendo la cantidad necesaria para lograr el efecto antimicrobiano. Además, el efecto antimicrobiano se prolonga por mayor tiempo a lo largo de la vida útil del producto.
- iv. *Previene la interacción* con otros componentes de los alimentos (almidón, grasas, proteínas).
- v. *Enmascara los aromas y sabores* que podrían afectar negativamente el sabor y aroma de los alimentos en donde se aplican.

Actualmente, existe una amplia gama de biopolímeros que poseen propiedades específicas y pueden usarse para recubrir, atrapar o encapsular AE y sus CB. Estos biopolímeros generalmente se reconocen como seguros, biocompatibles, biodegradables y, en algunas condiciones, poseen naturalmente propiedades antibacterianas y antioxidantes. En su mayoría, los biopolímeros de calidad alimentaria que se utilizan son polisacáridos, lípidos y proteínas (McClements y Li, 2010).

Entre los polisacáridos, el quitosano, el alginato, los almidones, ciclodextrinas, derivados de celulosa, pectina y gomas, se utilizan masivamente ya que abundan en la naturaleza, son de bajo costo, seguros y fáciles de utilizar (Rezaei y col., 2019).

Los lípidos comúnmente utilizados para la formación de nanoestructuras son los fosfolípidos como la fosfatidilcolina, colesterol, lecitina de soja para formar liposomas, aceites vegetales (soja, girasol, maíz) y triglicéridos de cadena media para la obtención de nanoemulsiones, monoestearato de glicerilo para la obtención de nanopartículas lipídicas (SLN), entre otros (Prakash y col., 2018).

Recientemente, muchos investigadores han documentado que las proteínas tienen un gran potencial como agentes emulsionantes, estabilizadores y espesantes para la fabricación de diferentes nanoestructuras que se utilizan para la incorporación de diferentes AE y sus CB

(Rehman y col., 2020). Las proteínas, también han ganado popularidad entre los biopolímeros utilizados para nanoencapsulación, debido a sus propiedades nutricionales, biocompatibilidad y biodegradabilidad. Generalmente se obtienen de plantas, animales y microorganismos; las de origen animal incluyen: proteínas de suero, caseínas, gelatina, colágeno, albúmina, elastina, mientras que las proteínas extraídas de plantas son proteínas de soja, proteínas de cereales, zeína, gliadina y proteínas de legumbres (Rezaei y col., 2019).

La nanotecnología representa actualmente, una herramienta importante y una opción eficiente para extender la vida útil de los alimentos. La reducción del tamaño de las partículas a escala nanométrica otorga a los materiales propiedades distintas y mejoradas en comparación con los sistemas más grandes (Zambrano-Zaragoza y col., 2018). Para aplicaciones alimentarias, esta tecnología permite la incorporación de sustancias lipofílicas e hidrofóbicas con propiedades antimicrobianas que pueden ser liberadas durante los períodos de almacenamiento para aumentar la vida útil de diversos productos.

Los sistemas de nanoencapsulación frecuentemente utilizados para vehicular compuestos de naturaleza hidrofóbica, tales como los AE y sus CB, son (Chaudhari y col., 2021; Prakash y col., 2018; Rezaei y col., 2019):

- i. *Complejos de inclusión*: consiste en la encapsulación de una molécula o CB dentro de una cavidad o sitio de una molécula que oficia de soporte. Las ciclodextrinas, amilosa, y células de levadura pueden formar este tipo de complejos (Fig. 5).

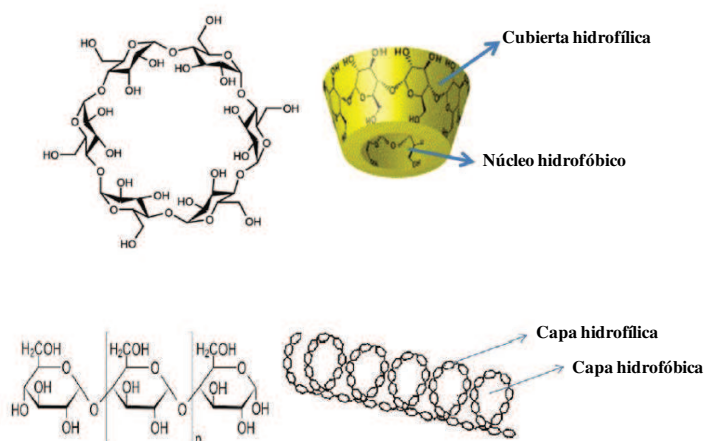


Figura 5. Estructura de la β-ciclodextrina (sup.) y amilosa (inf.) (Rezaei y col., 2019).

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos con forma de cono truncado y derivan del almidón. El núcleo de la estructura de las ciclodextrinas es hidrófobo y la cubierta es hidrófila, tienen la capacidad de formar enlaces no covalentes con moléculas hidrofóbicas y protegerlas de la degradación, la evaporación y la oxidación. La

amilosa tiene la capacidad de formar estructuras helicoidales y puede formar un complejo de inclusión con otros CB mediante unión no covalente y liberarlos después de la hidrólisis. Las células de levadura son vehículos adecuados para la encapsulación de compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos debido a su membrana fosfolipídica. La más utilizada para encapsulación es *Saccharomyces cerevisiae*.

- ii. *Nanogeles*: son redes tridimensionales reticuladas con gran capacidad de retener agua que pueden producirse mediante reticulación física o química de los monómeros o polímeros (Fig. 6) (Chaudhari y col., 2021). Se pueden crear nanogeles con estructuras porosas, con diferentes tamaños de poros y estructuras de poros ajustables que tienen una alta capacidad de carga. Los nanogeles hidrófilos (nanohidrogeles) e hidrófobos (nanoorganogeles) tienen la ventaja de atrapar CB solubles e insolubles en agua, respectivamente (Chaudhari y col., 2021; Rezaei y col., 2019).



Figura 6. Estructura de nanogeles obtenidos con dos tipos de entrecruzamientos (Rezaei y col., 2019)

- iii. *Nanoemulsiones*: las nanoemulsiones se componen de al menos tres constituyentes, aceite, agua y un emulsionante (Fig. 7). En las nanoemulsiones de aceite en agua, las gotas de aceite se dispersan en agua y generalmente tienen un tamaño de gota promedio entre 50 y 500 nm. El aceite y el agua pueden poseer varios otros constituyentes. Además, se pueden aplicar uno o varios tipos de emulsionantes. Las nanoemulsiones son vehículos apropiados para la entrega de AE y sus CB, debido a su hidrofobicidad y baja solubilidad acuosa. Se pueden producir con ingredientes naturales y también son prácticas para aplicaciones industriales mediante

homogeneización a alta presión o métodos ultrasónicos (de Oliveira Filho y col., 2021; Delshadi y col., 2020; Prakash y col., 2018).

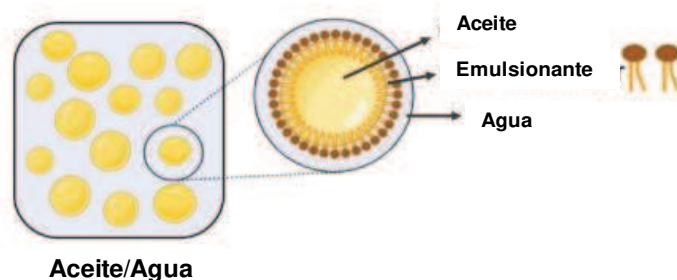


Figura 7. Estructura de una emulsión de tipo aceite en agua (de Oliveira Filho y col., 2021)

- iv. *Nanoesponjas*: son partículas porosas sólidas con nanocavidades (cavidad interna o externa) en su estructura que les otorgan la capacidad de atrapar los CB (Fig. 8). Estos nanotransportadores pueden cargar altos niveles de compuestos, lo que los destaca de otros nanotransportadores (Tannous y col., 2021). Por otro lado, las nanoesponjas mejoran la solubilidad de CB insolubles o poco solubles en agua y mejoran su liberación controlada. También pueden atrapar iones metálicos y moléculas orgánicas en concentraciones muy bajas para eliminarlos de soluciones acuosas y purificar el medio ambiente. Otras aplicaciones son proteger los compuestos sensibles y degradables, proporcionarles una liberación sostenida y prolongada, enmascarando sabores desagradables, convirtiendo las sustancias líquidas en polvos sólidos y, por lo tanto, mejorando el manejo del material (Rezaei y col., 2019; Tannous y col., 2021; Trotta y col., 2012).

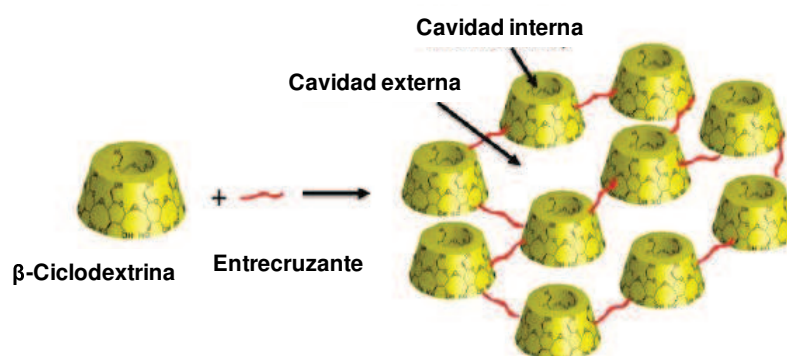


Figura 8. Estructura de nanoesponja compuesta por β -ciclodextrinas (Rezaei y col., 2019).

- v. *Nanofibras*: el electrohilado es un nuevo método de encapsulación que puede producir nanofibras utilizando un alto voltaje (Fig. 9). Las nanofibras electrohiladas tienen un área de superficie específica alta que es adecuada para la liberación controlada de CB

encapsulados porque aumenta su sensibilidad a los cambios ambientales. El electrospinning se realiza a temperatura ambiente y es muy apropiado para la encapsulación de compuestos sensibles y volátiles como los AE y sus CB derivados (Mele, 2020; Rezaei y col., 2019).

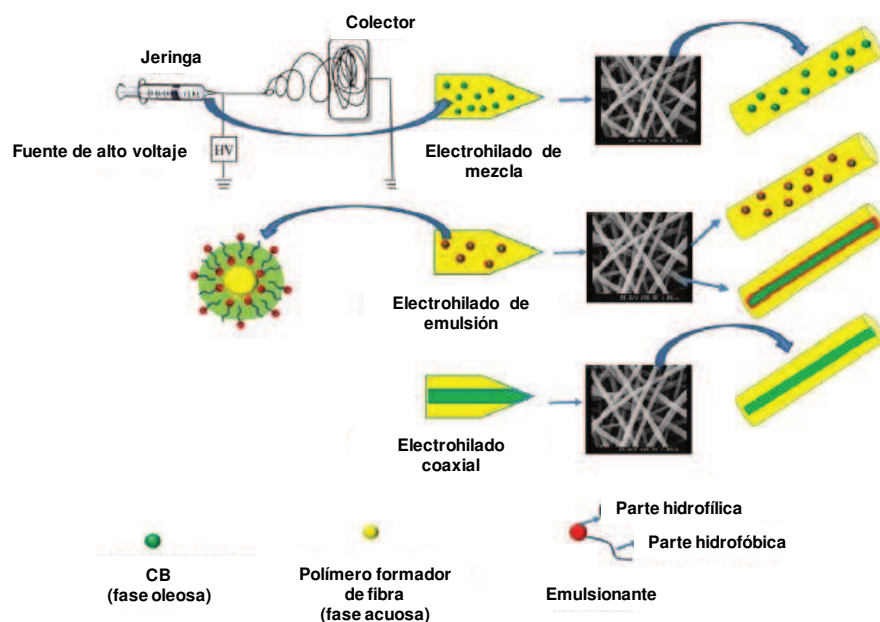


Figura 9. Nanofibras obtenidas por diferentes métodos de electrohilado (Rezaei y col., 2019).

En el electrohilado de mezcla, el CB se dispersa o disuelve en la solución. La distribución del CB en las nanofibras depende de su interacción con la solución y las propiedades de la solución (Rezaei y col., 2019). En el electrohilado coaxial, se necesita una doble aguja concéntrica que produce las nanofibras con estructuras de núcleo-envoltura. En este método, el CB tiene más protección debido a la inyección por separado. En el electrohilado de emulsión, el CB primero se emulsiona en la solución de electrohilado usando un tensioactivo y forma una emulsión (emulsiones de agua en aceite o aceite en agua). Por ejemplo, el CB se disuelve en la fase oleosa y el polímero se disuelve en la fase acuosa en el caso de las emulsiones aceite en agua. Después de electrohilar la emulsión, las nanofibras obtenidas tienen una estructura de núcleo-corteza o tienen regiones localizadas de la fase dispersa en su columna como la estructura de una fase continua (Munteanu y Vasile, 2021; Rezaei y col., 2019).

- vi. *Nanoliposomas:* son estructuras coloidales esféricas autoensambladas, formadas por una o más bicapas de fosfolípidos que encierran material acuoso o soluble en lípidos

(Fig. 10) (Aguilar-Pérez y col., 2020). Los nanoliposomas son adecuados para la encapsulación de sustancias hidrofílicas, hidrofóbicas y también anfifílicas. Las sustancias hidrofílicas se pueden incorporar en la parte interior, las sustancias hidrofóbicas se pueden atrapar dentro de la bicapa hidrofóbica y los compuestos anfifílicos se pueden incorporar en la interfaz lípido/agua (Aguilar-Pérez y col., 2020; Delshadi y col., 2020; Prakash y col., 2018). En general, los liposomas tienen algunas limitaciones, como la inestabilidad física y química que da como resultado la degradación, oxidación, hidrólisis y agregación de fosfolípidos. La modificación de su superficie podría mejorar su aplicabilidad. Un ejemplo es el recubrimiento de polímero con quitosano o quitosano derivatizado con tiol, puede mejorar las propiedades de los liposomas y mejorar su estabilidad para tener una liberación sostenida de compuestos encapsulados (Rezaei y col., 2019).

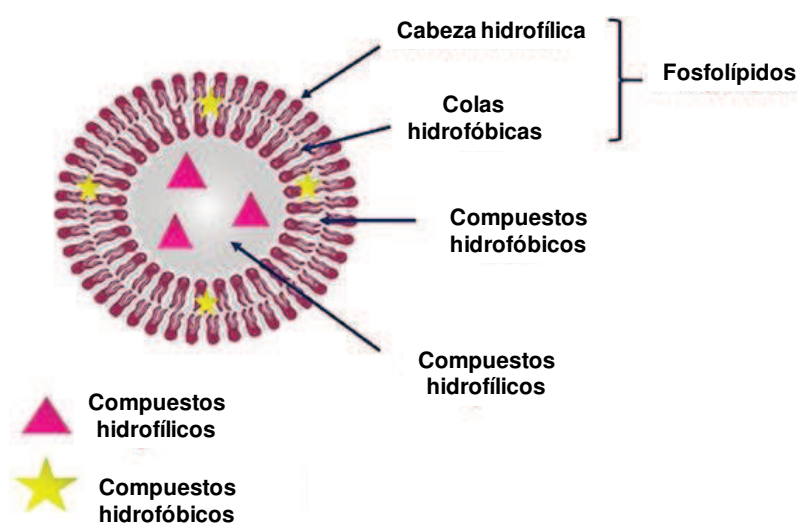


Figura 10. Estructura de un nanoliposoma (Aguilar-Pérez y col., 2020)

- vii. *Nanopartículas (lipídicas y biopoliméricas)*: son transportadores sólidos que se encuentran en forma de nanoesferas o nanocápsulas (Fig. 11). Las nanoesferas están formadas por una matriz polimérica densa. Son estructuras en las que los CB pueden adsorberse o dispersarse molecularmente en la matriz. Las nanocápsulas tienen una estructura vesicular con un núcleo central encerrado por una membrana polimérica y las sustancias pueden disolverse en el núcleo interno o adsorberse en la superficie de la cápsula. Las nanopartículas poseen propiedades de liberación sostenida y controlada, biocompatibilidad con células y tejidos y un tamaño de partícula subcelular (Chaudhari y col., 2021; Lammari y col., 2020).

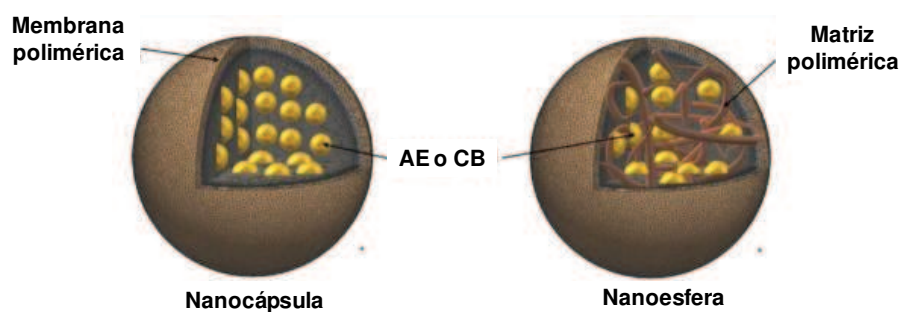


Figura 11. Diferentes tipos de nanopartículas biopoliméricas (Lammari y col., 2020)

Las nanopartículas lipídicas sólidas (SLN, siglas en inglés) y los vehículos lipídicos nanoestructurados (NLC, siglas en inglés) son dos tipos de nanopartículas lipídicas (Fig. 12). Ambas poseen una matriz lipofílica que consiste en lípidos biocompatibles y biodegradables que son completamente (para SLN) o principalmente (para NLC) sólidos a temperatura ambiente. La clasificación de SLN y NLC es de acuerdo a su estructura interna. Los SLN están constituidos únicamente por lípidos sólidos (como triglicéridos, mezclas de glicéridos o ceras), mientras que los NLC están formados por una mezcla de lípidos sólidos y líquidos (Prakash y col., 2018; Rezaei y col., 2019).

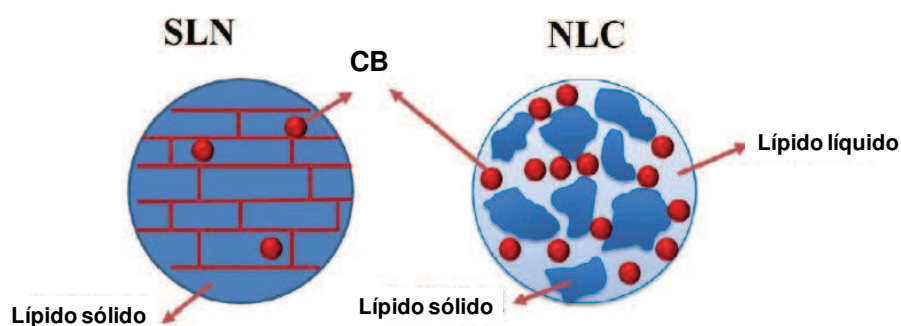


Figura 12. Estructura de nanopartículas lipídicas SLN y NLC (Rezaei y col., 2019).

En la literatura se ha informado una amplia gama de técnicas de nanoencapsulación para la fabricación de nanosistemas de AE y sus CB basados en polímeros, entre las técnicas más utilizadas se encuentran la gelación iónica, la coacervación, emulsificación, secado spray, electrohilado y electropulverización, auto-ensamblaje y precipitación anti-solvente (Chaudhari y col., 2021; Rehman y col., 2020).

1.4.3. Recubrimientos y películas de naturaleza biopolimérica

Los recubrimientos y películas son capas delgadas de materiales biopoliméricos (comestibles), con un espesor generalmente menor a 0,3 mm, que se utilizan para el envasado primario de alimentos (Quirós-Sauceda y col., 2014).

Aunque su función en el producto final es la misma, las películas y los recubrimientos presentan características y aplicaciones muy diferentes. Un recubrimiento se forma directamente sobre la superficie del alimento y se consume con el mismo (recubrimiento comestible, RC), mientras que una película o *film* se produce por separado y posteriormente se implementa en los productos alimenticios, colocándose sobre o entre los componentes del alimento. En este contexto, los RC deben aplicarse en forma líquida, generalmente sumergiendo el alimento en una solución, mientras que las películas primero se moldean como láminas sólidas y luego se aplican como envase en el producto final (Aguirre-Joya y col., 2018; Suhag y col., 2020).

1.4.3.1. Funcionalidad y composición

Los recubrimientos y películas mejoran la calidad de los productos alimenticios al protegerlos del deterioro físico, químico y biológico, lo que da como resultado una vida útil prolongada y una mayor seguridad (Salgado y col., 2015).

Pueden actuar como barreras contra gases o vapores, aceites y solutos; proporcionar protección estructural para evitar daños mecánicos durante el transporte, manipulación y exhibición; proteger los alimentos contra la oxidación y otras reacciones químicas; y del crecimiento de microorganismos. También pueden utilizarse para mejorar las características visuales y táctiles de los productos alimenticios y para transportar sustancias activas como antioxidantes, nutraceuticos, colorantes, saborizantes y antimicrobianas (Salgado y col., 2015).

Los recubrimientos y películas son elaborados a partir de una gran variedad de biopolímeros principalmente polisacáridos, proteínas y lípidos, los cuales han sido objeto de numerosas investigaciones, debido a sus ventajas especiales, que incluyen bajo costo, fácil disponibilidad, biodegradabilidad y biocompatibilidad (Ribeiro y col., 2021).

Los principales componentes, con los cuales se elaboran los recubrimientos y películas, y funcionalidad son: (i) biopolímeros para la formación de la matriz cohesiva; (ii) aditivos, tales como plastificantes, entrecruzantes, surfactantes y reforzantes para mejorar las propiedades funcionales de la matriz; y (iii) solventes que, debido a los requisitos del

producto final en términos de comestibilidad, solo puede ser agua o etanol (Salgado y col., 2015). En la [Tabla 5](#) se indican los componentes más utilizados y citados en la bibliografía para la obtención de RC y P (Quirós-Sauceda y col., 2014; Salgado y col., 2015; Suhag y col., 2020; Zambrano-Zaragoza y col., 2018).

Tabla 5. Componentes más utilizados para la obtención de recubrimientos y películas.⁵

| Componentes de las soluciones formadoras de recubrimientos y películas | | |
|-------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Biopolímeros (~ <10% m/v) | | |
| Polisacáridos | Origen vegetal | |
| | Derivados de celulosa | |
| | Almidón | |
| | Pectina | |
| | Origen marino | |
| | Alginato | |
| | Quitosano | |
| | Carragenina | |
| | Origen microbiano | |
| | Gomas (gellan, xantana) | |
| | Proteínas | Origen vegetal |
| | | Zeína de maíz |
| Gluten de trigo | | |
| Soja | | |
| Girasol | | |
| Origen animal | | |
| Colágeno | | |
| Gelatina | | |
| Caseína | | |
| Suero de leche | | |
| Clara de huevo | | |
| Lípidos | | Ceras y resinas (carnauba, candelilla, abeja, salvado de arroz, parafina, goma laca) |
| | Aceites vegetales | |
| | Monoglicéridos acetilados | |

⁵ Tabla de elaboración propia

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | Ácidos grasos libres Ésteres de sucrosa |
| Solventes (~ 70-80% v/v) | Agua Etanol |
| Aditivos (~ <3% m/v) | |
| Para modificar las propiedades funcionales del material biopolimérico | <u>Plastificantes</u> (glicerol, propilenglicol, sorbitol, sacarosa, polietilenglicol, jarabe de maíz) <u>Agentes entrecruzantes</u> (tripolifosfato, genipina y aldehídos para proteínas; y ácido cítrico, ascórbico, tánico y cloruro de calcio para polisacáridos) <u>Reforzadores para mejorar propiedades mecánicas</u> (fibras y nanofibras de celulosa, nanocristales de almidón, filamentos de quitosano) <u>Emulsionantes o surfactantes</u> (monoglicéridos acetilados, lecitina, monopalmitato y monoestearato de glicerol, polisorbato, monoleato de sorbitán) |
| Para mejorar la calidad, estabilidad y seguridad de los alimentos envasados | <u>Antioxidantes</u> (AE y sus CB derivados, vitamina C, E, ácido elálgico, cítrico, etc.) <u>Antimicrobianos</u> (AE y sus CB derivados, extracto de té verde, nisina, BAL, sorbato de potasio) <u>Probióticos</u> (BAL: <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12, <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> GG, etc.) <u>Agentes aromatizantes, saborizantes y colorantes</u> (AE y sus CB, extractos vegetales, luteína, licopeno) <u>Nutrientes</u> (minerales, vitaminas, fitoesteroles, ácidos grasos) |

Biopolímeros

Los polisacáridos, proteínas, lípidos y sus mezclas, son los polímeros más utilizados para la preparación de recubrimientos y películas. Se obtienen a partir de numerosas fuentes naturales y renovables (vegetal, animal, microbiana), no son tóxicos y en general de bajo costo (Quirós-Sauceda y col., 2014). Sus propiedades filmogénicas los convierten en materiales óptimos para la formación de una matriz continua y cohesiva. Estas propiedades se atribuyen a la formación de interacciones intermoleculares entre las cadenas de los biopolímeros. Además, poseen características físicas y químicas muy diferentes, por lo que

influirían en la funcionalidad de los materiales formados (Hassan y col., 2018; Salgado y col., 2015).

Tanto las películas formadas por polisacáridos como por proteínas, generalmente exhiben excelentes propiedades de barrera contra el O₂, los lípidos y los aromas, propiedades mecánicas moderadas pero altas permeabilidades al vapor de agua (de Oliveira Filho y col., 2021; Ribeiro y col., 2021).

Los polisacáridos, como material de recubrimiento, se han aplicado ampliamente en los últimos años, particularmente debido a su disponibilidad y bajo precio, mayor solubilidad, estabilidad, seguridad, y por no tener sabor ni olor adicionales y formar recubrimientos transparentes (Hassan y col., 2018). Para la obtención de la matriz polimérica, generalmente suelen utilizarse soluciones de polisacáridos con concentraciones entre el 2-3% (m/v), las cuales se tratan previamente antes de su aplicación. Al tratarse de un grupo de moléculas muy heterogéneo, el tratamiento dependerá del origen del polisacárido. Algunos, como el quitosano, requieren ser dispersados en soluciones ácidas para ser aplicados directamente sobre el alimento (Moreira y col., 2011). Otros, como el alginato, requieren de un tratamiento térmico previo (70-80°C) para su correcta hidratación y solubilización y de agentes entrecruzantes como el cloruro de calcio, ácidos cítrico y ascórbico para producir un gel (Azarakhsh y col., 2014; Song y col., 2011). El almidón, polisacárido ampliamente utilizado para la formación de recubrimientos y películas, requiere de un tratamiento térmico (entre 70-90°C, dependiendo del origen del almidón) para producir un gel (Oyom y col., 2022). Otros polisacáridos como las gomas en general, agar, pectinas, carrageninas se solubilizan o dispersan en agua y se someten a un calentamiento previo (entre 40-70°C) para su correcta dispersión y posterior formación de matrices gelificadas (Panahirad y col., 2021; Sedayu y col., 2019; Tahir y col., 2019).

En el caso de las proteínas, la formación de la matriz polimérica, depende de su origen, estructura y configuración molecular (Hauzoukim y Mohanty, 2020). Para la formación de la matriz polimérica, generalmente las proteínas requieren de un proceso de desnaturalización para modificar su conformación molecular, generalmente llevado a cabo mediante el uso de ácidos, bases, solventes o calor. Después de su desnaturalización, las proteínas pueden interactuar con moléculas vecinas, lo que, a través de enlaces de hidrógeno, iónico o covalente, da lugar a la formación de películas resistentes, cohesivas y viscoelásticas. Esta capacidad de unión intermolecular es responsable de la compleja composición y estructura de las proteínas que, a su vez, las convierte en biopolímeros con múltiples propiedades funcionales (Hauzoukim y Mohanty, 2020; Mihalca y col., 2021).

Los lípidos son pequeñas biomoléculas hidrofóbicas y anfífilas, solubles en solventes no polares. Normalmente, las películas y recubrimientos hechos de materiales lipídicos son más frágiles y de mayor espesor debido a su hidrofobicidad (Ribeiro y col., 2021). Estas biomoléculas son excelentes barreras contra la migración de humedad, lo que se relaciona con su baja polaridad. Los materiales formados por lípidos y resinas pueden proporcionar un brillo deseable y una barrera eficaz contra la pérdida de agua (de Oliveira Filho y col., 2021; Ribeiro y col., 2021). Sin embargo, los lípidos tienen una gran desventaja asociada con el condicionamiento de la apariencia y sabor de los productos finales, lo que conduce a películas y recubrimientos más opacos, frágiles e inestables. Por ello, suelen utilizarse junto a proteínas y polisacáridos con el objetivo de mejorar las propiedades de barrera (Hassan y col., 2018; Salgado y col., 2015)

Por otro lado, recientemente, varios trabajos de investigación se han centrado en la producción de películas compuestas o multicomponentes que consisten en la combinación de diferentes materiales con propiedades beneficiosas (Quirós-Sauceda y col., 2014). Las películas compuestas se pueden crear mezclando dos o más de estos componentes, produciendo una capa de película homogénea o multicapa, para lograr las mejores propiedades de cada componente y minimizar sus desventajas. Por lo tanto, las ventajas de las propiedades de barrera contra el agua de los lípidos y la capacidad de formar películas cohesivas con buenas propiedades de permeabilidad a los gases y sin textura grasosa de polisacáridos o proteínas, se pueden combinar para formar emulsiones comestibles o recubrimientos bicapa (Salgado y col., 2015). Las propiedades funcionales de estos recubrimientos y películas compuestas dependen no solo de los compuestos utilizados en la matriz polimérica (tipo y cantidad) y del método de preparación, sino también de la compatibilidad entre los diferentes biopolímeros (Quirós-Sauceda y col., 2014).

Aditivos

Las características mecánicas, funcionales, organolépticas y nutricionales de los recubrimientos y películas pueden mejorarse con la adición de algunos aditivos naturales o químicos, que permiten mejorar la funcionalidad básica (Aguirre-Joya y col., 2018; de Oliveira Filho y col., 2021; Ribeiro y col., 2021; Salgado y col., 2015).

- ✓ *Plastificantes*: son en la mayoría de los casos, ingredientes necesarios para los recubrimientos y películas, particularmente cuando se utilizan polisacáridos y proteínas. Las extensas interacciones entre las cadenas de los biopolímeros pueden conducir a una estructura rígida y quebradiza, que se puede solucionar incorporando

plastificantes en sus formulaciones (Ribeiro y col., 2021). Estos compuestos son moléculas pequeñas con baja volatilidad, que se posicionan entre las moléculas del polímero para reducir las interacciones entre cadenas y aumentar su movilidad. Por lo tanto, los plastificantes comúnmente disminuyen la resistencia a la tracción y aumentan el alargamiento de la P que, a su vez, se traduce en una mejora en la flexibilidad y extensibilidad. Además, esta mejora en las propiedades físicas y mecánicas, también afecta la permeabilidad al vapor de agua, al oxígeno y a los solutos (Ribeiro y col., 2021; Suhag y col., 2020).

- ✓ *Emulsionantes o surfactantes*: son agentes de naturaleza anfifílica que interactúan en la interfaz agua-lípidos y reducen la tensión superficial entre las fases dispersa y continua para mejorar la estabilidad de la emulsión cuando se combinan hidrocoloides y lípidos. Además, los emulsionantes añadidos a las formulaciones de recubrimientos o películas promueven una buena humectación de la superficie, esparcimiento y adhesión del recubrimiento a la superficie del alimento. Los emulsionantes típicos que se utilizan en los recubrimientos y películas son los ácidos grasos, el monoestearato de etilenglicol, el monoestearato de glicerol, los ésteres de ácidos grasos, la lecitina, el éster de sacarosa y el monoestearato de sorbitán o polisorbatos (Ribeiro y col., 2021).
- ✓ *Entrecruzantes*: otro desarrollo para la creación de recubrimientos y películas más fuertes y menos permeables es el uso de agentes entrecruzantes. Estos compuestos reducen la movilidad del polímero al formar enlaces covalentes intermoleculares más estrechos en las redes de polímero. Se pueden aplicar varios tipos de reticulación para mejorar las características de las películas y se pueden inducir por calentamiento; tratamientos ácidos/alcalinos; la adición de aldehídos, glioxal, compuestos fenólicos y enzimas; irradiación; y por tratamiento ultrasónico/asistido por microondas (Ribeiro y col., 2021).
- ✓ *Otros aditivos*: la calidad, estabilidad y seguridad de los alimentos envasados también se pueden mejorar con la incorporación de algunos agentes antimicrobianos, antioxidantes, saborizantes y colorantes en la formulación de recubrimientos y películas. Una de las fuentes naturales de aditivos más utilizadas son los AE y sus CB.

1.4.3.2. Métodos de aplicación y formación de recubrimientos

La efectividad de los recubrimientos en la conservación de alimentos está influenciada por el método de aplicación, el cual se elige en función de la naturaleza del alimento a

recubrir, los atributos de la superficie (rugosidad, geometría), las propiedades de la solución formadora de recubrimiento o SFR (densidad, viscosidad, tensión superficial) y el propósito principal del recubrimiento (Suhag y col., 2020).

Las SFR pueden aplicarse de forma manual por pincelado (o cepillado), inmersión o de forma mecánica por aspersión (Suhag y col., 2020). Los dos primeros métodos son factibles de aplicar a pequeña escala, mientras que la aspersión se utiliza a escala industrial.

El pincelado (Fig. 13-a), también conocido como cepillado, es más adecuado para SFR de alta viscosidad que se esparcen directamente sobre la superficie del material y luego se secan. La calidad y uniformidad de la capa de SFR aplicada por pincelado es realizado generalmente de forma manual y, por tanto, se ven fuertemente afectadas por el factor humano. Por ello, este método es más adecuado para producciones de pequeña escala (Pirozzi y col., 2021).

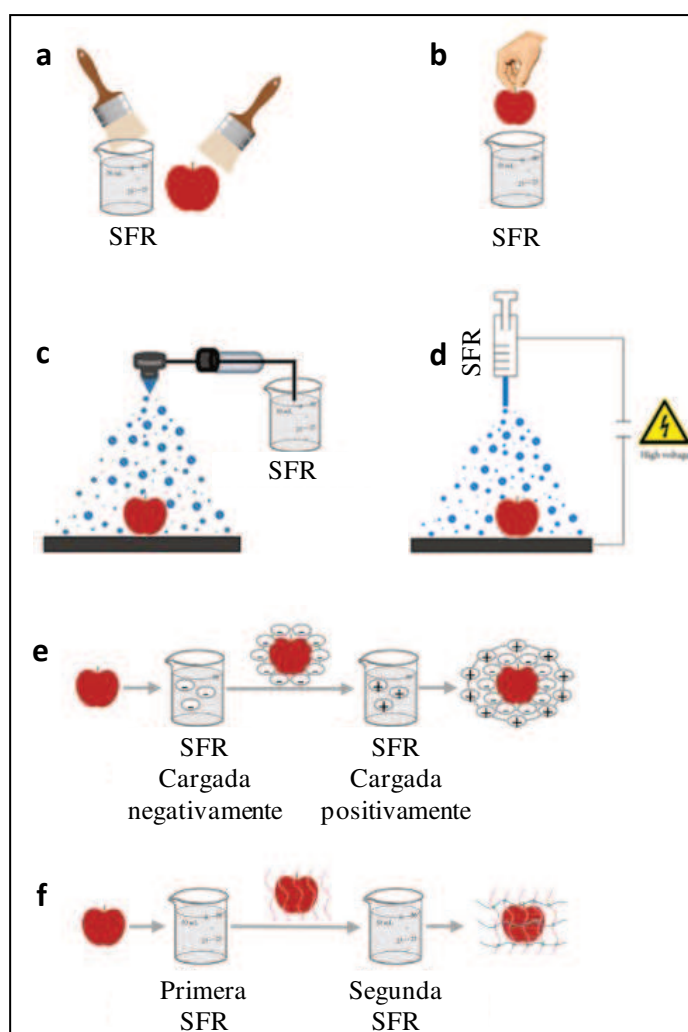


Figura 13. Métodos de aplicación de soluciones formadoras de recubrimiento (SFR) (a-d) y formación de recubrimientos (e y f) (Pirozzi y col., 2021).

La inmersión consiste en sumergir el alimento en la SFR, cubriendo la totalidad de su superficie (Fig. 13-b). Luego, el exceso de SFR se drena para eliminar la sobrecarga de SFR sobre la superficie del alimento. Finalmente, se somete a un proceso de secado cuyo objetivo es evaporar el solvente de la SFR y, de ese modo, formar el recubrimiento sobre la superficie del alimento. El secado puede tener lugar a temperatura ambiente o con aire caliente utilizando un túnel (Suhag y col., 2020).

Esta técnica permite la aplicación de SFR con un amplio rango de viscosidad. Un punto negativo, es la posibilidad de contaminación cruzada durante el proceso de inmersión debido a la acumulación de residuos y microorganismos en la SFR. Para evitar este problema, los productos que se recubren se limpian y desinfectan previamente, y la SFR se reemplaza con frecuencia. Por otro lado, solo puede ser utilizada para determinado grupo de alimentos, como las frutas y verduras, debido a que el proceso de inmersión podría afectar a las propiedades organolépticas y texturales del alimento (de Oliveira Filho y col., 2021).

La técnica de aspersión o pulverización (Fig. 13-c) proporciona un recubrimiento homogéneo y atractivo. Además, evita la posibilidad de contaminar la SFR. Este proceso aumenta la superficie del líquido mediante la formación de gotas y las distribuye sobre la superficie del alimento. Durante la aplicación por aspersión, el alimento se coloca sobre un plato o rodillos giratorios a una velocidad coordinada, bajo boquillas de dispersión activadas manual o automáticamente. Este procedimiento se repite hasta lograr el espesor de recubrimiento deseado. Un inconveniente de esta técnica es que no se pueden pulverizar SFR viscosas ya que obstruyen el equipo (de Oliveira Filho y col., 2021).

Una técnica novedosa para la aplicación de recubrimientos es la electropulverización (Fig. 13-d), donde la atomización de las SFR se lleva a cabo en un campo eléctrico de alta intensidad, lo que permite la formación de gotas micro y nanométricas cargadas con una distribución de tamaño extremadamente estrecha. Por lo tanto, en comparación con la aspersión, que produce gotas sin carga, la electropulverización ofrece la ventaja adicional de promover aún más la adhesión a la superficie del alimento, debido a las interacciones electrostáticas. Durante la electropulverización, el tamaño de las gotas, la velocidad de deposición y el espesor de la capa se pueden controlar mediante la optimización de los principales parámetros del proceso, como el caudal y las propiedades de la SFR, es decir, la conductividad y la viscosidad (Pirozzi y col., 2021).

La aplicación de recubrimientos a menudo se ve limitada por la difícil adhesión de la SFR a la superficie del producto, especialmente en el caso de alimentos caracterizados por superficies altamente hidrofílicas. En el método de deposición capa por capa (Fig. 13-e), la

adhesión a la superficie del alimento se ve reforzada por la interacción electrostática de la superficie del alimento con polielectrolitos cargados. Las interacciones electrostáticas también se aprovechan para formar recubrimientos hechos de dos o más capas de dimensiones nanométricas, que están física o químicamente unidas entre sí, lo que permite el control eficiente de las propiedades fisicoquímicas y la funcionalidad de los recubrimientos (Pirozzi y col., 2021).

Esta técnica de deposición electrostática generalmente se basa en la combinación de polielectrolitos de carga opuesta, a través de la inmersión alterna del producto alimenticio en diferentes SFR. El proceso de inmersión alterna se repite tantas veces como capas de recubrimiento se deseen. La cantidad de polielectrolito adsorbido en la superficie del alimento durante cada inmersión depende de la fuerza iónica, el pH y las densidades de carga de cada SFR. Este método puede llevarse a cabo con macromoléculas capaces de desarrollar interacciones de enlaces de hidrógeno, hidrofóbicas o covalentes a través de sitios de unión que interactúan entre sí (Pirozzi y col., 2021).

Otra técnica para la formación de recubrimientos es la de entrecruzamiento que se puede describir como el procedimiento de unir las cadenas poliméricas mediante enlaces covalentes y no covalentes. Los recubrimientos entrecruzados (Fig. 13-f), generalmente se producen mediante la deposición de la SFR sobre la superficie del alimento mediante rociado por aspersión, inmersión o pincelado, seguido de la deposición de un agente de entrecruzamiento, para la formación de un recubrimiento más compacto y resistente. Los recubrimientos reticulados ofrecen ventajas significativas, especialmente en la reducción de la migración de moléculas externas hacia los recubrimientos, así como en la mejora de la resistencia mecánica, la resistencia química y la estabilidad térmica del recubrimiento. Los agentes de entrecruzamiento más comunes son compuestos bifuncionales simétricos con grupos reactivos con especificidad por los grupos funcionales presentes en las macromoléculas de la matriz. El entrecruzamiento es especialmente útil para materiales biopoliméricos, como los derivados de proteínas o polisacáridos (Pirozzi y col., 2021).

1.4.3.3. Métodos de obtención de películas

Las películas se pueden obtener a partir de dos métodos: proceso húmedo o seco, también denominados procesos de *casting* y extrusión, respectivamente. La solubilidad de los biopolímeros formadores de películas y los aditivos es vital para el método de *casting*, mientras que la termoplaticidad de los biopolímeros junto con las características de

transición de fase, transición vítrea y gelatinización son factores críticos que deben conocerse para el proceso de obtención de películas por extrusión (Suhag y col., 2020).

El proceso de evaporación de solvente (*casting*, en inglés) es el método más comúnmente utilizado para la formación de una película a escala laboratorio y piloto. Este método involucra, en general, cuatro etapas (Fig. 14): i) solubilización del biopolímero en un solvente adecuado, ii) colocación de la solución en el molde, iii) secado de la solución y iv) desprendimiento de la película (Suhag y col., 2020).

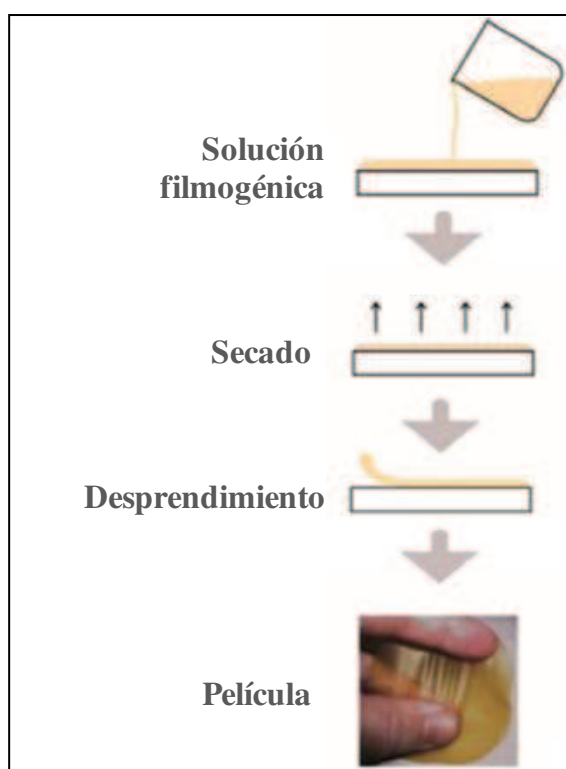


Figura 14. Proceso de *casting* para obtención de películas (Mohamed y col., 2020)

La selección del biopolímero y el solvente son factores muy importantes ya que se requiere una correcta solubilización para garantizar la formación de la película. Además, el proceso de secado debe proporcionar suficiente tiempo para evaporar el solvente y permitir la formación de una película que se adhiera al molde (Suhag y col., 2020). El secado con aire, tales como los hornos o estufas de aire caliente, secadores de bandeja, microondas y los secadores al vacío, se utilizan para la obtención de la película por *casting*, para facilitar la eliminación de solventes y el desprendimiento de la misma. Por otro lado, el procedimiento de secado o evaporación de solvente, es un paso muy importante para mejorar la relación intramolecular entre las cadenas poliméricas y obtener una microestructura adecuada (Sperling, 2005).

La principal ventaja del método de *casting* es la facilidad de fabricación sin el uso de equipos especializados y a bajo costo. Al ser un procedimiento húmedo, conduce a una mejor interacción partícula-partícula, obteniendo películas más homogéneas, con menos defectos. Las temperaturas utilizadas en el proceso, más bajas que las utilizadas en procesos de extrusión, representan una ventaja, ya que no inducen cambios estructurales irreversibles en el material (Suhag y col., 2020). Además, el método de *casting* posee una serie de características especiales como la excelente transparencia y baja turbidez (Siemann, 2005).

Por otra parte, los principales inconvenientes del método de *casting* son (Suhag y col., 2020): i) restricción en cuanto a las formas, ya que solo se pueden obtener películas en forma de láminas o tubos; ii) posibilidad de que queden restos de solventes tóxicos utilizados durante el proceso de obtención; iii) restricción en cuanto a la cantidad de película obtenida; iv) diferentes niveles de evaporación de solvente y temperaturas pueden conducir a la obtención de películas con características variables; v) se requiere mayor tiempo de secado; vi) diferentes velocidades y temperaturas de secado podrían causar diferencias de calidad e impedir la obtención de películas con calidad constante.

La extrusión es otro método utilizado para producir películas y es una de las principales técnicas de procesamiento de polímeros actualmente en uso a escala industrial. Este método cambia la estructura de los materiales y mejora las propiedades fisicoquímicas del material extrudido (Hernandez-Izquierdo y Krochta, 2008). En combinación con el proceso de extrusión puede utilizarse un método de procesamiento para la obtención de láminas denominado calandrado, el cual se indica en la Fig. 15 (Pranata y col., 2019).

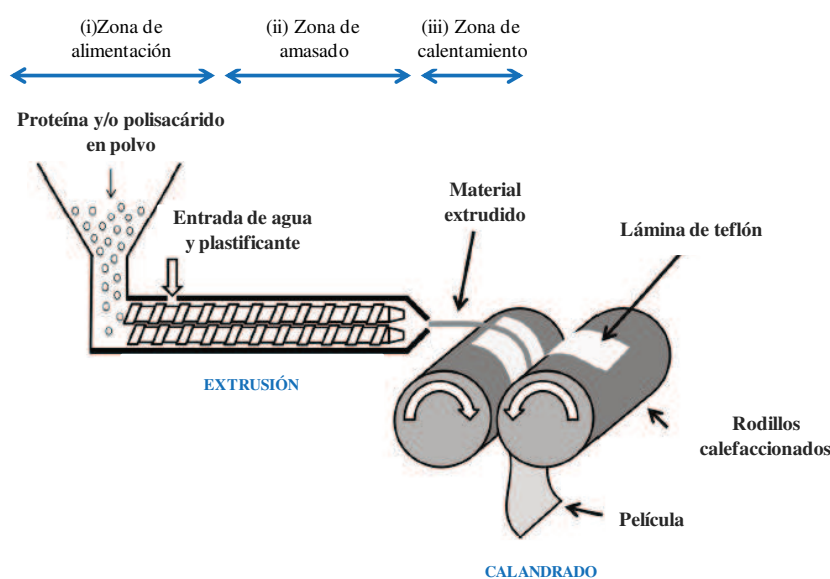


Figura 15. Proceso de extrusión y calandrado para obtención de películas (Pranata y col., 2019)

El proceso de extrusión, en general, se puede dividir en tres zonas (Fig. 15): i) la zona de alimentación, ii) la zona de amasado y iii) la zona de calentamiento en la parte final/salida de la máquina (Calderón-Castro y col., 2018). La mezcla de los componentes de la película es el primer paso que se lleva a la zona de alimentación y se comprime con aire. Este método funciona mejor con un contenido mínimo de agua o disolventes, por lo que también se denomina proceso seco. Sin embargo, para aumentar la flexibilidad de la película, se necesitan plastificantes. A menudo se agregan plastificantes como polietilenglicol o sorbitol en una medida del 10 % al 60 % m/m (Skurtys, 2010).

Este método presenta como ventajas, el corto tiempo de procesamiento con bajo consumo de energía en comparación con el método de *casting*, propiedades mecánicas y ópticas mejoradas (Hernandez-Izquierdo y Krochta, 2008). Es un proceso de alto rendimiento, bajo costo y eficiente utilizado en el sector alimentario para la producción a nivel comercial. Además, otras ventajas incluyen el no uso de solventes, fácil manejo de polímeros de alta viscosidad, una amplia gama de condiciones de procesamiento (temperaturas de 70-500°C y presión de 0-500 bares), mejor control del tiempo de residencia de alimentación y grado de mezcla (van Duin y col., 2001). El método de extrusión para la formación de películas es eficiente en el control de las propiedades mecánicas de la película y puede generar una amplia gama de formas que no ofrece el método de *casting*. Sin embargo, las desventajas de este método se centran principalmente en la limitación para procesar solo mezclas de materias primas tolerantes a la temperatura y de baja humedad, lo que restringe el uso de ciertos polímeros. Además, el uso de esta tecnología implica un mayor costo inicial de equipo especializado y de mantenimiento (Suhag y col., 2020).

1.4.3.4. Incorporación de AE o CB en recubrimientos y películas bipoliméricas

La aplicación de recubrimientos y películas en alimentos se han considerado un método eficaz para vehicular AE o sus CB derivados para maximizar sus efectos benéficos sobre la calidad de los alimentos frescos (Ribeiro y col., 2021; Salgado y col., 2015). De acuerdo a Zhang y col. (2021), las formas en que podrían incorporarse los AE o CB a un RC o película son:

- i. Encapsulación de AE o CB en la misma matriz polimérica con la que se elabora el recubrimiento o película (Fig. 16). En este caso, el AE o CB se agrega directamente a la solución del biopolímero. Para lograr una dispersión homogénea suelen utilizarse diferentes técnicas como la homogeneización (Ultra-Turrax), tratamiento térmico

(para modificar la estructura de las proteínas y mejorar la solubilidad de los polisacáridos), agentes entrecruzantes (especialmente para los polisacáridos) y emulsionantes o surfactantes.

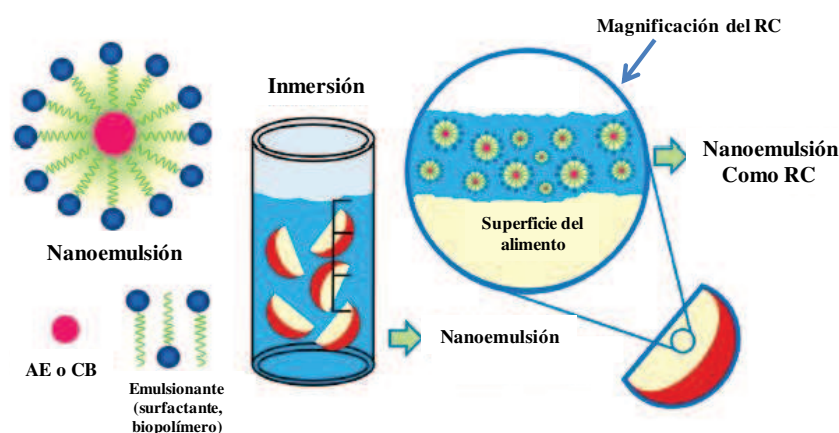


Figura 16. Representación esquemática de la incorporación directa de AE o CB a través de la formación de una nanoemulsión y aplicación como recubrimiento (Zambrano-Zaragoza y col., 2018).

- ii. Encapsulación de los AE o CB y posterior incorporación en la matriz polimérica del RC o PC (Fig. 17). Este tipo de recubrimiento o película se denomina como “compuesto” y se define como la combinación de dos o más materiales, para formar una mezcla que mejora las propiedades de un componente. Cuando se incorporan AE o CB nanoencapsulados los recubrimientos y películas se denominan “nanocompuestos”. El desarrollo de los nanocompuestos ha permitido utilizar recubrimientos o películas como “sistemas de liberación controlada” que liberan sustancias activas desde la matriz de una película al alimento, para mejorar su conservación.

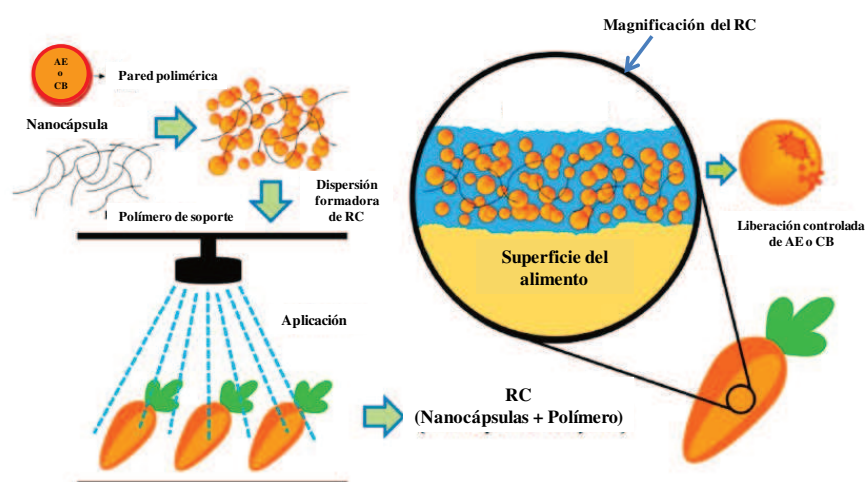


Figura 17. Representación esquemática de la incorporación de AE o CB encapsulados en una matriz polimérica y aplicación como recubrimiento (Zambrano-Zaragoza y col., 2018).

1.4.3.5. Aplicación de recubrimientos y películas antifúngicas para conservación de pan

Actualmente, en la bibliografía existen algunos trabajos que han evaluado la eficacia de recubrimientos comestibles (RC) y películas para evitar el deterioro fúngico y extender de la vida útil de pan (Tabla 6 y 7).

La obtención y aplicación de recubrimientos antifúngicos en pan aún es escasa. Bartkiene y col. (2019), lograron inhibir el deterioro fúngico en pan durante 10 días utilizando un RC formulado a base de pulpa de manzana y BAL. Luego, Gregirchak y col. (2020), obtuvieron un tipo de un RC a base de alginato de sodio, proteínas de suero, glicerol y BAL; y otros 3 tipos de RC a base de almidón modificado con alto contenido de amilosa, gelatina, glicerol con diferentes tipos de BAL. Luego de 3 a 4 días de almacenamiento, la aplicación de los RC logró inhibir el desarrollo fúngico en los panes.

Por otro lado, se han obtenido películas antifúngicas por el método de *casting* para conservación de pan. Se ha utilizado metilcelulosa, nanoemulsiones de AE de orégano y polietilenglicol como aditivo plastificante. La aplicación de las mismas en pan, inhibió el desarrollo fúngico durante 15 días (Otoni y col., 2014). Luego, Lopes y col. (2014) lograron extender la vida útil de pan por 12 días aplicando películas formadas por derivados de celulosa y CIN. Por último, Balaguer y col. (2013) desarrollaron una película utilizando gliadina, CIN y glicerol como plastificante. Su aplicación en pan logró extender su vida útil por hasta 30 días.

1.4.4. Películas o sobres para envasado activo (no biopoliméricas)

El envasado activo (EA) se destaca como una alternativa tecnológica innovadora cuyo principal objetivo no es solo ser una barrera a factores externos sino también interactuar con el producto alimenticio para extender su vida útil (Sharma y col., 2021; Zhang y col., 2021). Los AE y sus CB derivados se utilizan ampliamente en EA debido a sus propiedades antimicrobianas, disponibilidad y potencial para reemplazar el empleo de conservantes sintéticos en los alimentos (Sharma y col., 2021).

Para la conservación de productos panificados, se han desarrollado algunos materiales para capturar oxígeno y emitir compuestos antimicrobianos. Estos materiales pueden aplicarse en forma de sobres (absorbentes o emisores) (Otoni y col., 2016) o de películas liberadoras de compuestos antimicrobianos (Sharma y col., 2021). Cabe destacar que, como el proceso de obtención de estos materiales involucra el uso de polímeros, solventes o aditivos químicos

que no son aptos para el consumo humano, se los considera no comestibles. A continuación, se describen algunos de ellos.

Tabla 6. RC con propiedades antifúngicas utilizados para conservación de pan. ⁶

| Formulación | Método de obtención /Aplicación | Determinación de la eficacia antifúngica | Resultados | Referencia |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| 1) Pulpa de manzana (residuo de la extracción de jugo). 2) BAL ⁽¹⁾ | Pincelado de la superficie del pan, luego de su cocción y enfriamiento. El pan fue elaborado con masa madre (mismas BAL que las utilizadas en el RC). | Observación visual del desarrollo fúngico (número de colonias visibles sobre la superficie del pan) | Los RC extendieron la vida útil del pan hasta 10 días. | Bartkiene y col. (2019) |
| 1) RC-1: Alg, PS, Glic y BAL ⁽²⁾ 2) RC-2: Alm, Gel, Glic y BAL ⁽³⁾ 3) RC-3: Alm, Gel, Glic y BAL ⁽⁴⁾ 4) RC-4: Alm, Gel, Glic y BAL ⁽⁵⁾ | Pincelado de la superficie del pan, después de la cocción y enfriamiento. Luego, se envasaron y almacenaron a 23°C y 75% HR. | 1) Recuento de hongos y levaduras 2) Ensayo de desafío utilizando las cepas <i>A. niger</i> BT-2 y <i>P. chrysogenum</i> F-7. El pan fue inoculado con suspensiones de ambas especies fúngicas. Se llevó a cabo una medición del área contaminada respecto a un control. | 1) Luego de 86 h (3-4 días) de almacenamiento, los panes con RC-1, 2 y 4 no presentaron desarrollo fúngico y los panes con RC-3 presentaron valores de recuento de $(1,2 \pm 0,1) \times 10^2$ UFC/g. 2) Solo el RC-1 produjo menor área de contaminación tanto para <i>A. Niger</i> como para <i>P. chrysogenum</i> . | Gregirchak y col. (2020) |

UFC/g: unidades formadoras de colonias por gramo; **BAL:** bacterias ácido lácticas; **Alg:** alginato de sodio, **PS:** proteínas de suero; **Glic:** glicerol; **Alm:** almidón modificado con alto contenido de amilosa; **Gel:** gelatina.

⁽¹⁾ *Loigolactobacillus coryniformis*, *Latilactobacillus curvatus*, *Lactobacillus arraginis* y *Leuconostoc mesenteroides*.

⁽²⁾ *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* y *Lactobacillus acidophilus*.

⁽³⁾ *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* y *Lactobacillus acidophilus*.

⁶ Tabla de elaboración propia

⁽⁴⁾*Acetobacter aceti*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Propionibacterium freudenreichii*.

⁽⁵⁾*Enterococcus faecium* y *Streptococcus thermophilus*.

Tabla 7. Películas con propiedades antifúngicas utilizadas para conservación de pan.⁷

| Formulación | Método de obtención /Aplicación | Determinación de la eficacia antifúngica | Resultados | Referencia |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 1) Metilcelulosa 2) Nanoemulsión de AE de orégano y Tween 80, producida por ultrasonificación. 3) Plastificante: PEG | 1) Obtención: <i> Casting </i> en placas de vidrio, secado a 25°C durante toda la noche. 2) Aplicación: colocación de rodajas de pan sin conservantes entre dos películas. | Recuento de mohos y levaduras a los 0, 5, 10 y 15 días de almacenamiento a 25°C | Luego de 15 días de almacenamiento las películas con AE de orégano y clavo de olor redujeron significativamente los recuentos respecto al control (~5,5 Log UFC/g vs ~2,5 Log UFC/g) | Otoni y col. (2014) |
| 1) Derivado de celulosa 2) CIN | 1) Obtención: <i> Casting </i> . 2) Aplicación: panes enteros sin conservantes fueron envueltos en las películas. | Recuento de mohos y levaduras a los 0, 3, 6, 9 y 12 días de almacenamiento a 23°C. | Luego de 12 días de almacenamiento las películas con CIN redujeron significativamente los recuentos de mohos y levaduras respecto al control (<2 Log UFC/g vs >6 Log UFC/g) | Lopes y col. (2014) |
| 1) Proteínas de trigo (gliadinas) 2) Plastificante: Glic 3) CIN | 1) Obtención: <i> Casting </i> en placas de vidrio, secado a 37°C por 24 h. 2) Aplicación: colocación de rodajas de pan sin conservantes inoculadas con <i>P. expansum</i> y sin inocular (flora fúngica naturalmente presente), en contacto con las películas. | El desarrollo fúngico fue evaluado visualmente, de acuerdo al % de cobertura de la superficie de las rodajas de pan. Fue evaluado a los 7, 14 y 30 días de almacenamiento a 25°C. | Luego de 30 días de almacenamiento, las películas con CIN inhibieron totalmente el desarrollo fúngico de <i>P. expansum</i> ; mientras que en las muestras sin inocular se observó menos de un 25% de cobertura fúngica. | Balaguer y col. (2013) |

PEG: polietilenglicol; **Glic:** glicerol; **CIN:** trans-cinamaldehído

⁷ Tabla de elaboración propia

1.4.4.1. Sobres absorbentes de O₂ y/o emisores de compuestos antimicrobianos

Un método novedoso e innovador de control de O₂ y una alternativa al envasado al vacío o en AM, implica el uso de absorbentes de O₂. Los absorbentes de O₂ se pueden definir como una gama de compuestos químicos introducidos en envases para AM (no en el producto) para alterar la atmósfera dentro del mismo (Hempel y col., 2013; Smith y col., 2004).

En general, las tecnologías de eliminación de O₂ se basan en la oxidación de hierro en polvo, ácido ascórbico, catecol, colorantes fotosensibles, entre otros. Sin embargo, la mayoría de los sistemas se basan en la capacidad del hierro para formar un óxido no tóxico en condiciones de humedad apropiadas. Estos sobres deben cumplir criterios específicos para ser efectivos y tener éxito comercial. Deben absorber O₂ a una velocidad adecuada, ser compactos y de tamaño uniforme, no deben ser tóxicos ni producir reacciones secundarias desfavorables. Su elección está influenciada por las propiedades de los alimentos, como el tamaño, la forma, el peso y el a_w, la cantidad de oxígeno disuelto en el alimento, la vida útil deseada del producto y la permeabilidad del material de envasado al O₂ (Melini y Melini, 2018).

Los sobres pueden utilizarse como sistemas emisores o liberadores de compuestos antimicrobianos (Otoni y col., 2016). Para la conservación de pan se han desarrollado sobres emisores de etanol. Como se indicó anteriormente, el etanol permite retrasar el deterioro fúngico en pan, por medio del rociado sobre la superficie de los productos antes de envasarlos. Sin embargo, un método más práctico y seguro para vaporizar el etanol es mediante el uso de sobres generadores o emisores de vapor de etanol (Melini y Melini, 2018).

Actualmente en el mercado existen sobres interactivos fabricados por Freund Company Ltd. (Japón), vendidos bajo el nombre comercial Ethicap®. Estos sobres de papel/copolímero de etilvinilacetato contienen en su interior alcohol de calidad alimentaria (55% m/m) absorbido en polvo de dióxido de silicio (35% m/m). Cuando los alimentos se envasan junto con estos sobres, la humedad del alimento se absorbe y el vapor de etanol se libera del soporte en donde está absorbido y penetra en el espacio superior del envase. Sin embargo, tanto el nivel inicial como el final de vapor de etanol en el espacio superior del paquete son una función del tamaño del sobre y el a_w del producto (Smith y col., 2004).

Otro tipo de generador de vapor de etanol producido por Freund es Negamold®. Este sobre de doble función absorbe O₂ y genera etanol, aunque es aproximadamente el 50% del vapor de etanol generado por los sobres de Ethicap® (Melini y Melini, 2018; Smith y col.,

2004). [Latou y col. \(2010\)](#) evaluaron la vida útil de muestras de pan blanco almacenadas con sobres absorbentes de O₂ y otras almacenadas con la combinación de sobres absorbentes de O₂ y sobres emisores de etanol, a 20°C y durante 30 días. Durante ese tiempo evaluaron los cambios microbiológicos, fisicoquímicos y sensoriales de las muestras de pan. Los mismos hallaron una vida útil de pan de 24 días para aquellos almacenados con sobres absorbentes de O₂ y de 30 días para las almacenadas con la combinación de absorbentes de O₂ y emisores de etanol.

Los AE y sus CB derivados también han sido incorporados en sobres para conservación de productos panificados. Generalmente, son absorbidos en resinas poliméricas de alta absorción y colocados dentro de sobres elaborados con materiales porosos que permiten la difusión de los compuestos volátiles. Debido a la naturaleza volátil de los AE y sus CB, pueden liberarse fácilmente en forma gaseosa al espacio de cabeza dentro de un empaque cerrado ([Otoni y col., 2016](#)). La principal ventaja de utilizar estos tipos de compuestos antimicrobianos volátiles es que no hay necesidad de contacto directo entre el alimento y el material de empaque. En cambio, el compuesto en fase gaseosa puede llegar a casi cualquier matriz alimentaria contenida en el sistema de envasado. Este sistema, representa una opción eficaz para la incorporación de AE y sus CB derivados, debido a su naturaleza volátil. Además, se ha demostrado que la forma de vapor de los AE y CB presentan una mayor actividad antimicrobiana que los métodos de contacto con la solución ([Otoni y col., 2016](#); [Passarinho y col., 2014](#)).

1.4.4.2. Películas con actividad antifúngica

El desarrollo de nuevos materiales de envasado activo y biodegradable es actualmente un tópico de interés. La demanda de materiales biodegradables y renovables para aplicaciones de envasado ha aumentado enormemente. Este aumento está relacionado con las crecientes preocupaciones ambientales sobre el uso generalizado de envases poliméricos sintéticos y no biodegradables, en particular el polietileno. Además, la incorporación de compuestos antimicrobianos para producir materiales de envasado activo o con barrera mejorada proporciona una opción atractiva para proteger los alimentos del desarrollo y la propagación de microorganismos ([Zhong y col., 2020](#)).

Las películas antifúngicas son un tipo de EA capaz de transportar y liberar gradualmente compuestos antifúngicos para actuar sobre la superficie de los alimentos

envasados para reducir, retrasar o incluso inhibir el crecimiento microbiano (Otoni et al., 2016).

Actualmente los materiales más utilizados son los polímeros obtenidos a partir de fuentes renovables tales como: el PLA (ácido poliláctico) obtenido por fermentación; PHA y PHB (poli hidroxialcanoatos) obtenidos a partir de microorganismos (Zhong y col., 2020). Otros polímeros biodegradables muy utilizados, pero obtenidos a partir de fuentes fósiles son el PBAT (Poli(butilén adipato-co-tereftalato)) y PBSA (Poli (succinato-co-adipato de butileno)).

Generalmente, el método de obtención de este tipo de material plástico es la extrusión (utilizando temperaturas de ~150°C). Recientemente algunos trabajos han evaluado la obtención de PA obtenidas por extrusión para conservación y extensión de la vida útil de pan. Entre ellos, Suwanamornlert y col. (2020) lograron extender la vida útil de pan por 9 días almacenándolo en películas elaboradas con PLA+PBSA y TIM. En otro trabajo, realizado por Srisa y Harnkarnsujarit (2020) se obtuvieron películas de PLA+PBAT y CIN capaces de extender la vida útil de pan por 21 días. Luego, el envasado de pan en películas de PLA+PBAT y CAR, inhibieron el desarrollo fúngico visible por al menos 8 días (Klinmalai y col., 2021). Por último, y más recientemente, Sharma y col. (2022) produjeron películas a base de un copolímero de PHB y AE de tomillo, logrando extender la vida útil de pan por 5 días.

1.5. Proteínas de clara de huevo

1.5.1. Composición y propiedades funcionales

Las proteínas de clara de huevo (PCH) se han utilizado ampliamente como ingredientes en la formulación de alimentos debido a sus propiedades funcionales únicas, como la gelificación, retención de agua, formación de espumas y emulsiones (Sunwoo y Gujral, 2015).

Cabe destacar, que la clara de huevo representa aproximadamente el 67 % del peso total del huevo y se compone principalmente de agua (87,8 %) y proteínas (9,7–10,6 %), con carbohidratos, cenizas y lípidos traza que constituyen el resto (1 %). Los carbohidratos, glucosa principalmente, existen en forma libre o combinados con las proteínas (Dong y Zhang, 2021; Sunwoo y Gujral, 2015).

Las proteínas más abundantes en la clara de huevo son la ovoalbúmina, ovotransferrina, ovomucoide, ovomucina y lisozima (Dong y Zhang, 2021). En general presentan una estructura globular y varias de ellas son glicoproteínas (ovoalbúmina, ovomucoide,

ovomucina), es decir, que están unidas covalentemente a una fracción de carbohidratos. Sus pesos moleculares, punto isoeléctrico (pI), estructura molecular y composición se observan en la [Tabla 8](#).

Las proteínas minoritarias ovoinhibidor (1,5 %), ovogluco proteína (1 %), flavoproteína (0,8 %), ovomacroglobulina (0,5 %), cistatina (0,05 %) y la avidina (0,05 %) son las más destacadas entre las proteínas menores que se encuentran en la clara de huevo ([Sunwoo y Gujral, 2015](#)).

Tabla 8. Composición, estructura molecular y composición de las principales proteínas de la clara de huevo ([Dong y Zhang, 2021](#)).

| Componente de PCH (% m/m) | Estructura molecular y composición |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ovoalbúmina (54%) | Glicoproteína (45 kDa, pI 4,5), 385 residuos de aminoácidos y N-terminal acetilado, incluidas 6 cisteínas con un solo enlace disulfuro entre Cys74 y Cys121. |
| Ovotransferrina (13%) | Proteína fijadora de hierro (76–77,7 kDa, pI 6,1); contiene 686 residuos de aminoácidos, tiene 15 enlaces disulfuro y se encuentra glucosilada. |
| Ovomucoide (11%) | Glicoproteína (28 kDa, pI 4,1); contiene 9 enlaces disulfuro, no posee grupos tiol; en condiciones ácidas, las propiedades fisicoquímicas no se ven afectadas por el calentamiento a largo plazo a 100°C. Es el componente alergénico más importante de PCH. |
| Ovomucina (3,5%) | Complejo de glicoproteína sulfatada e insoluble que contiene α -ovomucina (180–210 kDa) y β -ovomucina (400–720 kDa). La β -ovomucina es la principal responsable de las propiedades gelificantes de la ovomucina debido a su alto contenido de carbohidratos. |
| Lisozima (3,4 %) | Glucósido hidrolasa con 129 residuos de aminoácidos y 4 enlaces disulfuro (14,3 kDa, pI 10,7). Posee propiedades antibacterianas. |

1.5.2. Antecedentes del uso de PCH en el desarrollo de nanovehículos para el transporte de CB

Recientemente se ha planteado el uso de las PCH como nanovehículos de CB. Se han realizado varios estudios sobre la obtención de nanopartículas utilizando tanto sus proteínas mayoritarias purificadas como la ovoalbúmina (OVA) y PCH comercial.

Sponton y col. (2015b) y Sponton y col. (2016) produjeron nanopartículas a partir de OVA nativa (OVAn) por calentamiento (10 g/L, 85°C, 5 min, pH 7,5) y encontraron que tienen mayor capacidad de ligar ácido linoleico (AL) que la proteína nativa. Las OVAn presentaron un tamaño de alrededor de 80 nm y su producción se llevó a cabo utilizando la metodología *bottom-up*, que consiste en la construcción de nanopartículas por autoensamblaje de moléculas debido a cambios en las condiciones ambientales, tales como el pH, la fuerza iónica, la temperatura o la concentración. Ejemplos de ello son la desolvatación, la coacervación y la formación de complejos de inclusión (Joye y McClements, 2014). Como se indicó anteriormente, OVA es una proteína globular constituida por 385 aminoácidos (la mayoría con carácter ácido), de los cuales la mitad son hidrofóbicos y un tercio posee carga. Además, OVA posee cuatro grupos sulfhidrilo (SH) y un puente disulfuro (SS) en el interior de su estructura. Los grupos SH pueden ser expuestos superficialmente como consecuencia del desdoblamiento de la proteína inducido por calor. De esta manera, los grupos SH pueden interactuar con el grupo SS mediante reacciones de intercambio SH/SS. Estas reacciones son responsables, en parte, de la agregación de OVA cuando se somete a calentamiento, llevando a estructuras macromoleculares grandes en comparación con las moléculas de OVA sin tratar (nativa) (Croguennec y col., 2007; Visentini y col., 2019). Además, el calentamiento produce la exposición de grupos hidrofóbicos internos y promueve así la formación de geles por medio de interacciones hidrofóbicas, generando agregados con hidrofobicidad superficial mayor a la de OVA nativa (Croguennec y col., 2007).

En base a estos resultados con OVA, Visentini y col. (2017), realizaron experiencias sobre la producción de OVAn (10 g/L, 85°C, 5 min, pH 7,5) para la vehiculización y la preservación fotoquímica del retinol (RET). La producción de OVAn involucró dos etapas: (i) formación de nanocomplejos de proteína-RET y (ii) deposición de un polisacárido (pectina de alto metoxilo, PAM) sobre la superficie de nanocomplejos de proteína-RET, mediante ajuste a pH 6. Como proteína se utilizaron OVA nativa y OVAn generadas por calentamiento. Con respecto al tamaño de partícula los sistemas presentaron distribuciones de tamaño < 500 nm, siendo siempre el tamaño de RET-proteína-PAM > RET-proteína > proteína. Respecto a la estabilidad fotoquímica del RET, el agregado de PAM mejoró la estabilidad mientras que el

uso de la OVAn fue mejor que el de OVA nativa. Es decir, que tanto las OVAn como vehículos y la utilización de polisacárido aumentan la estabilidad fotoquímica del RET.

Con respecto a la utilización de PCH, [Arzeni y col. \(2015\)](#), generaron nanopartículas a partir de PCH y evaluaron su capacidad para unir ácido fólico (AF) y actuar como posibles portadores de la vitamina. Para ello, utilizaron PCH comercial en polvo cuyas soluciones (5% m/m) se trataron por ultrasonido de alta intensidad (HIUS) sin y con aplicación de calentamiento simultáneo (termosonicación a 85°C). El primer tipo de nanopartículas de PCH se obtuvo mediante tratamiento HIUS durante 20 min a pH 3 y presentó una distribución monomodal de 220 nm de diámetro. El otro tipo de nanopartículas, fueron obtenidas por termosonicación, durante 20 min y pH 3, produciendo una distribución de tamaño bimodal (~70 nm y 295 nm). Las soluciones de nanopartículas se mezclaron con la solución de AF a pH 7. La distribución del tamaño de partícula obtenida por HIUS permaneció inalterada después de la unión de AF, mientras que las obtenidas por termosonicación presentaron un pequeño aumento en el tamaño de partícula. El porcentaje de AF unido en ambos casos estuvo alrededor del 80%. Además, se observó una ligera formación de agregados en las muestras después de la liofilización y redispersión de los nanovehículos.

Por otro lado, [Sponton y col. \(2017\)](#), realizaron ensayos para la obtención de nanovehículos de compuestos hidrofóbicos mediante tratamiento térmico controlado de dispersiones de PCH (0,85% m/m), evaluando el efecto del tiempo de calentamiento a 80°C (0-20 min) y el pH de la solución (9,6-11,4) sobre el tamaño de partícula, la hidrofobicidad superficial y la capacidad de unión de AL. Se obtuvieron dispersiones turbias coloidalmente estables, lo que indicaría la presencia de agregados proteicos. La turbidez disminuyó considerablemente con el aumento del pH en el rango evaluado, mientras que aumentó con el tiempo de calentamiento. En cuanto al tamaño de partículas, todas las condiciones de calentamiento produjeron agregados proteicos con tamaños nanométricos (diámetro <100 nm), a un rango de pH de 10,2-11,4 (distribuciones monomodales) y <300 nm a pH 9,6 (distribución bimodal). Con respecto a la hidrofobicidad superficial, el tratamiento térmico produjo un aumento de 6-9 veces en la hidrofobicidad superficial, lo que sugiere que el despliegue de proteínas produjo la exposición de dominios hidrofóbicos ocultos en la estructura globular. Finalmente, con relación a la capacidad de unir AL se determinó que el tratamiento térmico de las dispersiones de PCH promovió un aumento en la capacidad de unión a AL. Además, cuando el pH aumentó, se formó un mayor número de sitios de unión a AL. En general, el pH ejerció los efectos más importantes sobre el tamaño de partícula y la capacidad de unión a AL de PCHn.

Posteriormente, [Sponton y col. \(2020\)](#), continuaron con la producción de nanopartículas proteicas para vehiculizar AL mediante tratamiento térmico de PCH industrial (líquida y pasteurizada) en un reactor. Evaluaron el efecto de la temperatura (65-85°C) y tiempo de calentamiento (0-60 min, a 85°C) durante el procesamiento en reactor (1 Lt de solución de PCH al 5% m/m y pH 11,4), sobre el tamaño de partícula, hidrofobicidad superficial y capacidad para unir AL. El calentamiento en todo el rango de temperatura y tiempo evaluado produjo partículas con diámetros menores a 100 nm. Por otro lado, la máxima hidrofobicidad superficial y capacidad de unir AL fueron alcanzadas con 5 min de tratamiento térmico a 85°C, valores que se mantuvieron sin cambios por hasta 20 min de calentamiento. Como se indicó en trabajos anteriores ([Sponton y col., 2016](#)), la exposición de dominios hidrofóbicos producto del tratamiento térmico promueve la formación de sitios de unión para el AL. Además, después de 10 min de calentamiento, hubo una ligera disminución de estos parámetros como consecuencia de la agregación de proteínas que habría comprometido los sitios de unión hidrófobos de AL. Debido a las tendencias de similitud observadas tanto para la hidrofobicidad superficial como capacidad para unir AL, se propuso una correlación entre estos parámetros. De esta forma se obtuvo una correlación lineal (R^2 de 0,968). Por lo tanto, la capacidad de las nanopartículas de PCH para unir AL se explicaría por la exposición de residuos de aminoácidos hidrofóbicos y la generación de nuevos sitios de unión en la superficie. Por lo tanto, a partir de estos resultados, fueron seleccionados como parámetros óptimos el calentamiento en reactor a 85°C durante 5 min debido a que en dichas condiciones se obtuvo la máxima capacidad de carga de AL.

1.5.3. Antecedentes del uso de PCH en el desarrollo de recubrimientos y películas

Las PCH son reconocidas por sus excelentes propiedades filmogénicas. Tal como se indicó anteriormente, debido a la presencia de numerosos grupos SH y SS, las PCH son capaces de formar una matriz polimérica continua y cohesiva. Numerosos autores han estudiado la obtención y formación de películas de PCH.

Se han obtenido y estudiado las propiedades de películas de PCH elaboradas por *casting*, utilizando PCH líquida tratada térmicamente ([Gennadios y col., 1996](#); [Handa y col., 1999a](#)); también se han obtenido películas por los métodos de compresión y moldeado, extrusión y calandrado a partir de PCH en polvo ([Lee y col., 2013](#); [Pranata y col., 2019](#)). Por otro lado, se han obtenido y caracterizado películas de PCH compuestas. Entre ellas, las formuladas con lípidos (sólidos de yema de huevo, ácido oleico, sólidos grasos de leche,

aceite de oliva) (Gennadios y col., 1996; Handa y col., 1999b; Taqi y col., 2011), gel de aloe vera (López-Mata y col., 2016); κ -carragenina (Huang y col., 2020); y polisacáridos como el pululano (Han y col., 2020). La composición, métodos de obtención y ensayos de caracterización de estas películas se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9. Métodos de obtención y caracterización de películas obtenidas con PCH.⁸

| Composición de la solución filmogénica (SF) | Métodos de obtención y caracterización | Referencia |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1) Solución de PCH (9% m/v) | <u>Obtención</u> Se evaluó la obtención de películas de PCH con y sin sólidos de yema de huevo | Gennadios y col. (1996) |
| 2) Plastificantes: - Glicerol (30, 40 y 50 % m/m de proteínas totales) - Sorbitol (50 o 60 % m/m de proteínas totales). - Polietilenglicol (PEG) (50 o 60 % m/m de proteínas totales) | 1) Preparación de las SF: ajuste de pH a 11,25, seguido de un calentamiento a baño maría a 40°C durante 20 min. 2) Obtención de las películas por <i>casting</i> : colocación de las SF en una placa de vidrio con teflón. Secado durante 5-6 h a temperatura ambiente hasta solidificar, seguido de un secado durante 15 h en ambiente con 50% de HR. | |
| 3) Sólidos de yema de huevo (sustitución del 10, 30, 50 ó 70% de sólidos de PCH y usando 60% de PEG como plastificante) | <u>Caracterización</u> Espesor (micrómetro), propiedades mecánicas (ensayos de tracción), color (parámetros L*, a*, b*), permeabilidad al vapor de agua. | |
| 1) Solución de PCH (9% m/v) | <u>Obtención</u> Se evaluó la obtención de películas a partir de SF con y sin calentamiento. | Handa y col. (1999a) |
| 2) Plastificante: PEG (60 % m/m de proteínas totales) | 1) Preparación de las SF: ajuste de pH (10,5, 11 y 11,5), seguido de un calentamiento a baño maría a 40°C durante 30 min. 2) Obtención de las películas por <i>casting</i> : colocación de las SF en una placa de vidrio con teflón. Secado durante 4-5 h a temperatura ambiente hasta solidificar, seguido de un secado durante 15 h a 25°C y 50% de HR. | |
| | <u>Caracterización</u> Espesor (micrómetro), propiedades mecánicas (ensayos de tracción), materia soluble total (porcentaje de materia seca de la película solubilizada después de 4 h de inmersión en agua destilada), características moleculares de PCH por electroforesis (análisis de las SF y películas). | |

⁸ Tabla de elaboración propia

| | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| 1) Solución de PCH (9% m/v) | <u>Obtención</u> Se evaluó la obtención de films de PCH con y sin lípidos | Handa y col. (1999b) |
| 2) Plastificante: PEG (60 % m/m de proteínas totales) | 1) Preparación de las SF: ajuste de pH a 11,25, seguido de un calentamiento a baño maría a 45°C durante 20 min. | |
| 3) Lípidos: - Sólidos grasos de leche (10 o 20% m/m total de sólidos de PCH) - Ácido oleico (10% m/m total de sólidos de PCH) - Yema de huevo (10 o 20% m/m total de sólidos de PCH) | 2) Obtención de las películas por <i>casting</i> : colocación de las SF en una placa de vidrio con teflón. Secado durante 5-6 h a temperatura ambiente hasta solidificar, seguido de un secado durante 15 h a 25°C y 50% de HR. | |
| | <u>Caracterización</u> Espesor (micrómetro), propiedades mecánicas (ensayos de tracción), color (parámetros L*, a*, b*), permeabilidad al vapor de agua. | |
| 1) Solución de PCH (9% m/v) | <u>Obtención</u> 1) Preparación de las SF: ajuste de pH a 11,25, seguido de un calentamiento a baño maría a 45°C durante 20 min. | Taqi y col. (2011) |
| 2) Plastificante: PEG (60 % m/m de proteínas totales) | Las SF que incorporan lípidos fueron homogeneizadas durante 1 min a 15.000 rpm. | |
| 3) Lípidos (1 y 1,5 % v/v): - Aceite de oliva - Ácido oleico | 2) Obtención de las películas por <i>casting</i> : colocación de las SF en una placa de vidrio con teflón. Secado durante 20 h a 25°C y 50% HR. | |
| | <u>Caracterización</u> Espesor (micrómetro), permeabilidad al vapor de agua y al O ₂ , solubilidad en agua, propiedades mecánicas (ensayos de tracción), color (parámetros L*, a* y b*), opacidad (medida de absorbancia a 600nm), microestructura por microscopía de fuerza atómica (AFM). | |
| 1) PCH en polvo (secada por spray) | <u>Obtención</u> Moldeado por compresión: la mezcla sólida de PCH+Glicerol fueron sometidas durante un tiempo de 8 min, presión de 2 MPa y 128°C. | Lee y col. (2013) |
| 2) Plastificante: glicerol (35, 40 y 45% m/m) | <u>Caracterización</u> Humedad, espesor (micrómetro), análisis térmico (calorimetría diferencial de barrido, DSC y termogravimetría, TGA), propiedades mecánicas (análisis mecánico dinámico y ensayos de tracción), color (parámetros L*, a* y b*), opacidad (medida de transmitancia a 600nm), microestructura (microscopía electrónica, SEM). | |

| | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| <p>1) PCH líquida</p> <p>2) Gel de aloe vera (AV)</p> | <p style="text-align: center;"><u>Obtención</u></p> <p>Se evaluó la obtención de films con diferentes relaciones AV/PCH (50:50, 40:60, 30:70, 0/100, m/m)</p> <p>1) Las SF se prepararon por agitaron de PCH+AV a 80 rpm durante 5 min y luego se filtraron.</p> <p>2) Obtención de las películas por <i>casting</i>: colocación de las SF en un molde de silicona y se sometieron a proceso de secado en estufa de vacío a diferentes temperaturas y ciclos de tiempo (30°C durante 22 h; 80°C durante 1 h; 40°C durante 20 h).</p> | <p>López-Mat a y col. (2016)</p> |
| <p><u>Caracterización</u></p> <p>Espesor (micrómetro), microestructura (SEM), solubilidad en agua, permeabilidad al vapor de agua, color (parámetros L*, a* y b*), transparencia (transmitancia a 600nm), propiedades mecánicas (ensayos de tracción), contenido de proteína soluble, actividad antibacteriana <i>in vitro</i> (difusión en agar, películas en forma de disco)</p> | | |
| <p>1) PCH en polvo (secada por spray)</p> <p>2) Plastificante: glicerol (35, 40 y 45% m/m)</p> | <p style="text-align: center;"><u>Obtención</u></p> <p>Extrusión+calandrado: para el proceso de extrusión se utilizaron mezclas de PCH:glicerol:agua (2:1:1)</p> <p>Se evaluaron diferentes temperaturas en el extrusor (40, 50, 60, 70 y 75°C), la velocidad de rotación y temperatura del tambor donde se realiza el calandrado (115-120°C).</p> | <p>Pranata y col. (2019)</p> |
| <p><u>Caracterización</u></p> <p>Espesor (micrómetro), análisis térmico (DSC y TGA), propiedades mecánicas (ensayos de tracción), permeabilidad al vapor de agua, al O₂ y al etanol, color (parámetros L*, a* y b*), transparencia (transmitancia a 600nm), resistencia fúngica (las películas fueron inoculadas con suspensiones de <i>A. niger</i> y <i>P. pinophilum</i>), pérdida de plastificante (determinación de glicerol en agua)</p> | | |
| <p>1) PCH en polvo</p> <p>2) κ-carragenina</p> <p>3) Plastificante: glicerol (0,5 mL/g de PCH en polvo)</p> | <p style="text-align: center;"><u>Obtención</u></p> <p>Se evaluó la obtención de películas compuestas mezclando diferentes proporciones de PCH/ κ-carragenina (0:100, 20:80, 40:60, 60:40, 80:20, and 100:0, m/m)</p> | <p>Huang y col. (2020)</p> |

Obtención de las películas por *casting*: colocación de las SF en una placa de Petri y se dejó secar en estufa a 40°C hasta peso constante.

Caracterización

Propiedades mecánicas (ensayos de tracción), transmisión de luz (medida de absorbancia a 430 nm), color (parámetros L*, a* y b*), tiempo de solubilidad en agua, permeabilidad al vapor de agua y al O₂, espesor (micrómetro), microestructura (SEM), análisis por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), interacciones químicas (colocación de las películas en diferentes soluciones químicas y determinación del contenido de proteínas), análisis térmico (DSC), aplicación de las películas para el envasado de aceite (análisis químico del aceite y de las películas luego del almacenamiento).

| | | |
|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| 1) PCH en polvo | <u>Obtención</u> | Han y col. (2020) |
| 2) Pululano (Pu) | Se obtuvieron películas compuestas mezclando diferentes proporciones de Pu/PCH (4:0, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 y 1:3) | |
| 3) Plastificante: glicerol (1,8 g/100 mL) | Obtención de las películas por <i>casting</i> : colocación de las SF en una placa de Petri y se dejó secar en estufa a 40°C por 48 h. | |
| | <u>Caracterización</u> | |
| | Análisis por difracción de rayos X, microestructura (SEM), análisis térmico (TGA), color (parámetros L*, a* y b*), análisis por FTIR, análisis de estructura secundaria (espectropolarímetro), determinación de grupos amino libres, propiedades mecánicas (ensayos de tracción). | |

Por último, cabe destacar que, hasta el momento, no se han reportado en la literatura RC elaborados a partir de PCH. Tampoco se han obtenido películas de PCH con propiedades antifúngicas o que incorporen los CA utilizados en la presente tesis.

1.6. Fundamentación del tema elegido

Durante los últimos años, la demanda de productos panificados libres de conservantes sintéticos ha impulsado el empleo de conservantes naturales derivados de especias y plantas aromáticas, tales como los AE y sus CB derivados. Sin embargo, como consecuencia de su intenso olor y sabor, la adición directa de estos compuestos en formulaciones de alimentos repercute negativamente en la aceptabilidad del producto y, además, requiere altas

concentraciones para inhibir el desarrollo microbiano. Por otro lado, debido a sus características fisicoquímicas, la incorporación de estos compuestos en los alimentos presenta limitaciones asociadas a su escasa solubilidad en medios acuosos y su volatilidad.

Por lo tanto, en la presente tesis doctoral se plantea abordar una estrategia alternativa a esta problemática mediante el desarrollo de RC (para su aplicación directa sobre el producto) y de películas activas (PA) (para su aplicación como envase) innovadores capaces de extender la vida útil de productos panificados. Debido a que uno de los principales factores que influyen sobre la calidad de productos panificados es el desarrollo superficial de hongos, el presente trabajo de tesis intentará aportar soluciones a esta problemática utilizando CA derivados de AE como alternativa más conveniente al empleo de conservantes sintéticos.

La incorporación de los CA se realizará bajo la forma de nanocomplejos con el objeto de promover su solubilización en medios acuosos, reducir su volatilidad y retención en la matriz de los RC. Cabe destacar que estos CA derivan de los AE de orégano, tomillo, canela y cítricos, y han sido utilizados en el presente trabajo de tesis como compuestos modelo. Se emplearán como nanopartículas biopoliméricas, agregados de PCH (PCH_n) con elevada hidrofobicidad superficial y tamaño nanométrico. Como se indicó anteriormente en la [sección 1.5.2](#), existen estudios previos que indican que es posible producir nanopartículas de PCH por tratamiento térmico con una hidrofobicidad adecuada para la adsorción superficial de compuestos lipofílicos mediante interacciones hidrofóbicas. Con lo cual, debido a la naturaleza lipofílica de estos CA, las nanopartículas podrían ser excelentes agentes transportadores que permitirían aumentar su solubilidad en medios acuosos y reducir su volatilidad.

Por otro lado, los nanocomplejos obtenidos serán utilizados para la formulación de un RC con propiedades antifúngicas, el cual será adaptado a productos panificados. Las propiedades filmogénicas de PCH han sido estudiadas como ya se indicó anteriormente ([Gennadios y col., 1996](#); [Handa y col., 1999a](#)) y podrían ser óptimas para la formación de un RC. Además, el tratamiento térmico de soluciones de PCH, utilizado para obtener las PCH_n, podrían mejorar estas propiedades filmogénicas. Luego, se evaluará la producción de PA por el método de *casting* para ser aplicadas como envase activo. De esta forma las PA obtenidas se caracterizarán fisicoquímicamente y se evaluará su eficacia antifúngica mediante aplicación sobre pan sin conservantes.

Cabe destacar que hasta el momento no se han estudiado las propiedades filmogénicas de PCH como RC o PA con propiedades antifúngicas para aplicación en pan. Tampoco se han incorporado estos CA en RC elaborados a partir de otros biopolímeros para este tipo de

producto panificado. Sin embargo, el pan es una matriz que ha sido estudiada para la aplicación de otros tipos de RC. Entre ellos, RC elaborados con alginato de sodio, proteínas de suero y microorganismos probióticos (Soukoulis y col., 2014); RC formulados a base de pulpa de manzana y BAL para retrasar el deterioro fúngico (Bartkiene y col., 2019); RC formulados a base de alginato de sodio, proteínas de suero y glicerol con BAL o almidón modificado, gelatina, glicerol y BAL, para evitar el deterioro fúngico (Gregirchak y col., 2020). Es importante destacar que en estos trabajos no se evaluó el impacto de los RC sobre las características fisicoquímicas (humedad, a_w , textura, color, entre otros) y propiedades sensoriales del pan.

Por todo lo mencionado, la realización de la presente tesis brindará información desde un punto de vista básico en el estudio de las interacciones entre los diferentes compuestos que constituirán los nanocomplejos antifúngicos. El estudio de las condiciones óptimas que permitan la obtención de un RC y una PA también conllevaría al desarrollo de una tecnología con potencial aplicación en la conservación de productos panificados.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

El presente trabajo de tesis doctoral tiene, por objetivo general, reunir conocimientos científicos que permitan el desarrollo y la aplicación de recubrimientos y películas comestibles nanocompuestas capaces de extender la vida útil de productos panificados.

2.2. Objetivos específicos

En virtud de lo anteriormente expuesto, los objetivos específicos que se plantean son los siguientes:

Objetivo 1. Aislar e identificar hongos filamentosos a partir de productos panificados contaminados para evaluar de forma preliminar la eficacia antifúngica de compuestos antifúngicos (CA).

Objetivo 2. Estudiar la complejación de los CA a nanopartículas biopoliméricas obtenidas a partir de proteínas de clara de huevo (PCHn).

Objetivo 3. Determinar la actividad antifúngica de los nanocomplejos PCHn-CA.

Objetivo 4. Obtener recubrimientos comestibles (RC) que incorporen nanocomplejos PCHn-CA en su formulación, para su aplicación directa sobre la superficie de pan de molde sin conservantes y evaluar sus propiedades durante el almacenamiento.

Objetivo 5. Obtener películas activas (PA) a partir de nanocomplejos PCHn-CA para su aplicación como envase, caracterizarlas y analizar su eficacia antifúngica en pan de molde sin conservantes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

Para los estudios desarrollados en la presente tesis doctoral se utilizaron los siguientes materiales:

- Panes de molde sin conservantes elaborados en el Área de Panificación del Instituto de Tecnología de Alimentos (FIQ-UNL). Para su preparación se utilizó harina de trigo refinada (100 g), agua (57 g), levadura prensada (5 g), oleomargarina (5 g), azúcar (5 g), leche desnatada en polvo (3 g) y sal (2 g), de acuerdo a la metodología propuesta por [Visentín y col. \(2009\)](#). Los ingredientes se mezclaron durante 10 min en una mezcladora de 5 kg de capacidad (BP-60, Batiplane, Buenos Aires, Argentina). La masa se colocó en una cámara de fermentación con temperatura y humedad relativa (HR) controladas (a 27°C y 75-80%, respectivamente) para una primera fermentación hasta duplicar el volumen (~ 40 min). Posteriormente la masa se dividió en porciones de 230 g y se dejaron reposar durante 10 min. Estos se moldearon y colocaron en moldes rectangulares de metal lubricados para una segunda fermentación (a 27 °C y HR de 75-80%) hasta cuadruplicar su volumen (~ 1 h). Finalmente, las masas se hornearon en un horno rotatorio eléctrico (ZU-95, Zunino, Entre Ríos, Argentina) a 210 °C durante 25 min.
- Panes de molde (sin conservantes) adquiridos en una panificadora de la ciudad de Santa Fe (Argentina).
- Medios de cultivo, soluciones y colorantes. Se utilizaron para el aislamiento e identificación de hongos filamentosos y fueron los propuestos por [Pitt y Hocking \(2009\)](#):
 - Agar Extracto de Malta (MEA) con cloranfenicol: extracto de malta (20 g), peptona (1 g), glucosa (20 g), agar (20 g), cloranfenicol (0,1 g), agua destilada (1000 ml).
 - Agar Extracto de Levadura-Czapek (CYA): K₂HPO₄ (1 g), czapek concentrado (10 ml), extracto de levadura (5 g), sacarosa (30 g), agar (15 g), agua destilada (1000 ml).
 - Agar Nitrato con 25 % Glicerol (G25N): K₂HPO₄ (0,75 g), czapek concentrado (7,5 ml), extracto de levadura (3,7 g), glicerol (250 g), agar (12 g), agua destilada (750 ml).
 - Agar Papa-Dextrosa (PDA): infusión de papas (250 g), glucosa (20 g), agar (15 g), agua destilada (1000 ml).

- Agar Creatina Sacarosa Neutro (CSN): creatina sacarosa concentrada (10 ml), sacarosa (10 g), creatina (5 g), KH_2PO_4 (1 g), púrpura de bromocresol (0,05 g), agar (15 g), agua destilada (1000 ml). *Creatina sacarosa concentrada*: KCl (5 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5 g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,05 g), agua destilada (100 ml).
- Agar-Agua (0,2 % m/v): agar (0,2 g), agua destilada (100 ml).
- Agua de peptona (0,1 % m/v): peptona de caseína (0,1 g), agua destilada (100 ml).

Luego de su preparación, los medios de cultivo y las soluciones fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Para la observación de mohos al microscopio óptico se utilizó solución colorante de azul de algodón: solución saturada de azul de algodón (azul anilina soluble) (10 ml), glicerol (10 ml), agua (80 ml).

- **Compuestos antifúngicos (CA)**: se utilizaron los compuestos carvacrol (CAR, pureza del 98%), timol (TIM, 98,5% de pureza), (*R*)-(+)–limoneno (LIM, pureza 96,5 %) y *trans*-cinamaldehído (CIN, 99% de pureza) adquiridos en Sigma-Aldrich (Estados Unidos) y se conservaron a 4 °C hasta el momento de ser utilizados.
- **Proteínas de clara de huevo (PCH) liofilizada**, obtenida a partir de huevos frescos adquiridos en un comercio local de la ciudad de Santa Fe (Argentina). Para su obtención, previamente se llevó a cabo la separación de la yema mediante succión y la PCH líquida se congeló y liofilizó (Presión < 500 mT y temperatura de placa de condensación de -80°C) en un liofilizador Flexi-Dry™ (Estados Unidos). La misma fue envasada y almacenada en recipientes con cierre hermético a 4°C.
- **PCH líquida pasteurizada**, adquirida en Compañía Avícola SA (Santa Fe, Argentina). Composición según fabricante (% m/v): proteínas totales 10,50%, cenizas 0,40%, grasas 0,03%. Sólidos totales 14,20° Brix.
- **Reactivos analíticos adicionales** tales como NaCl, Na(OH), HCl, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , etanol absoluto, acetato de etilo y glicerol fueron suministrados por Cicarelli (Argentina). Para los estudios de fluorescencia extrínseca se utilizó la sonda fluorescente, ácido 1-anilino-8-naftalenosulfónico (ANS), comprada en Fluka Chemie

AG (Suiza). Para la determinación de viabilidad celular se utilizó la sal MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) adquirida en Thermo Fisher Scientific Inc. (Estados Unidos).

3.2. Métodos

3.2.1. Aislamiento y recuento total de hongos filamentosos

Se analizaron 8 piezas de pan de molde sin conservantes, las cuales fueron colocadas durante 10 días, en el período marzo–agosto, en diferentes espacios a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocaron dentro de bolsas de polietileno estériles, para su posterior evaluación. Los hongos filamentosos presentes en las muestras de pan de molde contaminadas fueron aislados mediante el método de diluciones seriadas.

Se tomaron en condiciones de esterilidad 10 g de cada muestra de pan de molde y se colocaron en un erlenmeyer conteniendo 90 ml de agua de peptona 0,1 % m/v. El contenido del erlenmeyer se agitó manualmente y a partir de la dilución obtenida (10^{-1}) se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-7} con agua de peptona 0,1% m/v. Las últimas 3 diluciones realizadas se sembraron en profundidad, adicionando en una placa estéril 1 ml de la dilución correspondiente y 10 ml de medio MEA con antibiótico (100 mg/L de cloranfenicol), se mezcló suavemente y de manera uniforme. La adición de cloranfenicol al medio tuvo como objetivo inhibir el desarrollo bacteriano. Este es un antibiótico de amplio espectro y con buena estabilidad térmica, lo que representó una ventaja al momento de preparar los medios de cultivo ya que fue posible añadirlo antes de la esterilización en autoclave (Beuchat y Cousin, 2001).

El contenido de las placas se dejó solidificar y, luego, estas se introdujeron invertidas en bolsas de polietileno. Se incubaron a 25 °C y, transcurridos 5–7 días, se observaron para detectar el desarrollo de colonias. Se realizó el recuento total de hongos filamentosos contando en lupa estereoscópica (ZOOM 2000, modelo Z45 V, Leica-Microsystems, Alemania) las colonias formadas y, afectando por el factor de dilución, se expresaron los resultados como unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (UFC/g).

Con el objetivo de obtener cultivos puros (libre de contaminación) para una correcta identificación, las diferentes colonias halladas en las placas fueron aisladas por inoculación de hifas o conidios con ansa de aguja en una nueva placa conteniendo MEA. Este procedimiento

se realizó sucesivas veces hasta constatar la pureza de las colonias mediante la uniformidad en la apariencia luego de incubación durante 5–7 días a 25 °C.

3.2.2. Identificación de hongos filamentosos aislados

Los hongos filamentosos aislados se identificaron siguiendo la metodología de Pitt y Hocking (2009) y consultando bibliografía accesoria (Carmichael y col., 1980; Klich y Pitt, 1994). Para ello, las colonias adecuadamente aisladas se sembraron en medios específicos, tales como:

- Agar Extracto de Malta (MEA)
- Agar Extracto de Levadura-Czapeck (CYA)
- Agar Nitrato con 25 % Glicerol (G25N)
- Agar Papa-Dextrosa (PDA)
- Agar Creatina Sacarosa Neutro (CSN)

Luego, se incubaron a distintas temperaturas (5, 25 y 37 °C) durante 7 días, según fue requerido por las claves taxonómicas de la bibliografía.

3.2.2.1. Observación macroscópica de hongos filamentosos aislados

Las características macroscópicas de las colonias de los hongos filamentosos aislados fueron observadas utilizando una lupa estereoscópica (Leica ZOOM 2000, modelo Z45 V–Leica Microsystems, Alemania).

Para cada cepa aislada se determinó el color de los conidios, el color del micelio, el aspecto de la colonia, la apariencia del reverso de la colonia, la presencia o ausencia de exudado o de pigmentos solubles y el diámetro promedio de la colonia. Este último fue determinado con calibre Vernier, midiendo tres veces el diámetro del reverso de la colonia (pasando por diferentes puntos de la circunferencia) y calculando el promedio de los tres valores obtenidos. El resultado se expresó en milímetros (mm).

3.2.2.2. Observación microscópica de hongos filamentosos aislados

Se llevó a cabo la observación de las estructuras características de los hongos filamentosos aislados, utilizando microscopio óptico (modelo CME, Leica-Microsystems, Alemania), en 10x y 40x. Para tal fin, se realizaron preparados raspando la colonia con ansa aguja en condiciones de esterilidad, y colocando el material entre portaobjetos y cubreobjetos,

sobre una gota de colorante Azul de Algodón. Para determinar la textura de conidios y estipes, se observó en 100x adicionando una gota de aceite de inmersión sobre el cubreobjetos.

Una vez identificados los géneros, se retomó la observación de las colonias presentes en las placas de diluciones seriadas correspondientes a cada muestra de pan contaminada, con el objetivo de obtener el recuento de cada género.

Las cepas puras aisladas e identificadas fueron conservadas a 5 °C en crioviales conteniendo Agar–Agua al 0,2 % m/v, hasta el momento de ser utilizadas.

3.2.3. Determinación de Abundancia Porcentual y Frecuencia Relativa Porcentual de hongos filamentosos identificados

Se determinó la Abundancia Porcentual (Ab %) de los géneros identificados, según:

$$Ab \% = \frac{n^{\circ} UFC \text{ del género}}{n^{\circ} UFC \text{ totales}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

La Frecuencia Relativa Porcentual (Fr %) de los géneros o especies de hongos filamentosos identificados se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$Fr \% = \frac{n^{\circ} \text{ de veces que aparece el moho}}{n^{\circ} \text{ de muestras evaluadas}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Subsecuentemente, se seleccionaron para su posterior evaluación aquellas cepas fúngicas que presentaron mayor Fr % en las muestras de pan de molde contaminadas. El criterio de selección, además, incluyó la importancia del microorganismo como agente contaminante de alimentos y su potencial patogenicidad.

3.2.4. Evaluación preliminar de la actividad antifúngica de los CA

La actividad inhibitoria de CAR, TIM, LIM y CIN puros disueltos en etanol absoluto fue evaluada utilizando las especies fúngicas seleccionadas anteriormente en la [Sección 3.2.3](#). La metodología utilizada para determinar la actividad inhibitoria de los CA fue la de difusión en agar con pocillo descrito por [Deans y Ritchie \(1987\)](#), con algunas modificaciones. En primer lugar, las especies fúngicas seleccionadas se sembraron en placas de Petri (diámetro 90 mm) conteniendo 10 mL de medio de cultivo MEA y se incubaron a 25°C durante 7 días. Luego, suspensiones de esporas fúngicas fueron preparadas con Tween 20 al 0,1% v/v y posteriormente se diluyó hasta obtener un inóculo de 10⁶ esporas/mL. El recuento fue

chequeado con cámara de Neubauer. Se prepararon placas de Petri (diámetro 90 mm) adicionando 1 mL de las suspensiones correspondientes y 20 mL de MEA. Una vez solidificado el medio, se realizaron 5 pocillos equidistantes por placa, de 8 mm de diámetro, utilizando un cilindro de vidrio con extremo cortante estéril. En cada pocillo se adicionó un volumen de 65 μ L de solución etanólica de CA en un rango de concentración de 0 a 5 mg/mL. Posteriormente, las placas fueron colocadas en bolsas de polietileno e incubadas a 25 °C. Luego de 72 h, se midió el diámetro de los halos de inhibición formados alrededor de cada pocillo mediante un calibre Vernier.

3.2.5. Obtención de nanopartículas de PCH (PCHn)

La producción de PCHn se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento descrito por Sponton y col. (2017), con algunas modificaciones. En primer lugar, se preparó una solución stock de PCH nativa disolviendo 7 g de PCH liofilizada en 100 mL de NaCl 50 mM dejando por 6 horas en agitación magnética. Luego, se determinó la concentración proteica de la solución midiendo la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Jenway 7305, Reino Unido). Se utilizó un coeficiente de extinción de 0,835 L/gcm el cual fue determinado previamente a partir de la pendiente de la curva de calibrado (Croguennec y col., 2007). Luego, se ajustó el pH a 6 con HCl 1 M y se almacenó *overnight* a 4°C. Posteriormente se verificó y corrigió el pH nuevamente a 6 y se dejó en refrigeración durante 1 hora. Por último, con el objetivo de eliminar material insoluble y mucinas, se centrifugó a 2000g (4208 rpm) en una centrífuga refrigerada (Heal Force Neofuge 18R, China) durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido fue separado y utilizado como solución stock de PCH nativa. La concentración proteica de esta solución fue verificada nuevamente por absorbancia a 280 nm. Luego, se prepararon soluciones de PCH nativa por dilución de la solución stock de PCH nativa en NaCl 50 mM con concentraciones de 0,1 a 3 % m/v, según requirió el método experimental al cual se destinó, y se mantuvo a 4 °C, *overnight*.

En segundo lugar, para la obtención de PCHn se prepararon soluciones de PCH nativa en NaCl 50 mM al 1, 2 y 3% m/v. El pH de cada una de ellas fue ajustado a 10, 10,5 y 11 con NaOH 1M. Alternativamente, una solución de PCH nativa en NaCl 50 mM al 1% m/v también se ajustó a pH 9,5. Para el tratamiento térmico, se distribuyeron 2 mL de las respectivas soluciones en tubos de vidrio con tapa y se sometieron a un tratamiento térmico por inmersión en un baño de agua a una temperatura de 85°C por un tiempo de 5 minutos. Luego, las muestras fueron retiradas y colocadas inmediatamente en baño de hielo de manera

de detener las reacciones de agregación proteica. Subsecuentemente, las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta el momento de ser utilizadas.

3.2.6. Caracterización fisicoquímica y morfológica de nanopartículas PCHn

3.2.6.1. Fluorescencia intrínseca y extrínseca

La espectroscopía de fluorescencia es una técnica ampliamente utilizada para el análisis estructural de proteínas y el estudio de su interacción con otras moléculas o ligandos. La fluorescencia es un tipo de luminiscencia (emisión de luz a partir de una sustancia) que ocurre a partir de estados electrónicamente excitados. En una población de moléculas el pasaje de electrones de un único nivel electrónico fundamental a un estado excitado es inducido por absorción de luz (fotones). En el estado excitado la molécula es energéticamente inestable y puede retornar al estado basal. Este tipo de moléculas que absorben fotones son denominadas cromóforos y un cromóforo que puede emitir un fotón es denominado fluoróforo (Albani, 2004; Lakowicz, 2006).

El fenómeno de fluorescencia en las proteínas ocurre típicamente a partir de sus aminoácidos aromáticos triptófano (Trp), tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe), denominados fluoróforos intrínsecos. Los grupos indol de los residuos de Trp dominan la absorbancia UV y emisión en proteínas. La Tyr tiene un rendimiento cuántico similar al Trp, pero su espectro de emisión está más estrechamente distribuido en la escala de λ . Esto da la impresión de un mayor rendimiento cuántico para la Tyr. En proteínas nativas la emisión de Tyr se ve disminuída o apagada (*quencheada*), lo que puede deberse a su interacción con la cadena peptídica o a la transferencia de energía al Trp. La emisión de Phe se observa solo cuando la proteína carece de residuos de Tyr y Trp. La máxima absorción, en agua y a pH neutro, ocurre a una λ de 295 nm para Trp, 275 nm para Tyr y 260nm para Phe. Mientras que, en promedio, la máxima emisión se encuentra alrededor de los 350nm para el Trp, 304nm para Try y 282nm para Phe (Lakowicz, 2006). Los espectros de emisión de Trp se modifican sensiblemente cuando el entorno en los que se encuentran los residuos de Trp en la proteína se ve alterado por las transiciones conformacionales de proteínas, asociación de subunidades, unión de ligandos o desnaturalización. Por lo tanto el rango de λ de excitación (λ_{ex}) mayoritariamente utilizado para estudiar los fenómenos de fluorescencia en proteínas se encuentra alrededor de 295-300 nm y corresponde al fluoróforo Trp (Albani, 2004; Lakowicz, 2006)

Por otro lado también existen fluoróforos extrínsecos (aquellos que se agregan a una muestra que no posee propiedades de fluorescencia), como el ANS. Este tipo de fluoróforos son frecuentemente débiles o no fluorescentes en agua, pero presentan una fuerte fluorescencia cuando se unen a proteínas o membranas (Albani, 2004; Lakowicz, 2006). El ANS es anfifílico, por lo que la región no polar prefiere adsorberse a las regiones no polares de las macromoléculas. Dado que el ANS en fase acuosa no contribuye a la emisión, la señal observada se debe a la unión de la sonda con la macromolécula. Ambos tipos de fluoróforos (intrínsecos y extrínsecos) permiten realizar caracterizaciones estructurales y de interacción proteína-ligando (Chandel y col., 2018; Lakowicz, 2006).

Con el objetivo de evaluar y caracterizar el efecto del tratamiento térmico sobre la estructura tridimensional de PCH nativa, se determinó la fluorescencia intrínseca (debido a la emisión de Trp) y extrínseca utilizando ANS como sonda fluorescente. El equipo utilizado para realizar las mediciones de fluorescencia fue un espectrofotómetro de fluorescencia (modelo F-2000, Hitachi, Japón), el cual cuenta con una lámpara de Xenón de 500 W y celda de cuarzo para la muestra. Para realizar todas las mediciones se prepararon 4 mL de diluciones de PCH nativa y PCHn al 0,0043% m/v con buffer fosfato 50 mM pH 7. La determinación de la fluorescencia intrínseca fue realizada a una λ_{ex} de 295 nm y el espectro de emisión fue recogido desde 308 a 420 nm (λ_{em}). Los datos de intensidad de fluorescencia fueron informados como Intensidad de Fluorescencia Intrínseca Máxima ($IF_{max-Trp}$). La λ correspondiente al máximo de intensidad ($\lambda_{max-Trp}$) también fue informada.

Las determinaciones de fluorescencia extrínseca fueron realizadas utilizando ANS como sonda fluorescente, tal como se mencionó previamente. Se agregaron 20 μ l de una solución de ANS 8 mM diluido en buffer fosfato (50 mM, pH 7) a cada muestra. El espectro de fluorescencia extrínseca fue obtenido a una λ_{ex} de 390 nm en un rango de λ_{em} de 420 a 600 nm (Croguennec y col., 2007). Los datos de intensidad de fluorescencia fueron informados como Intensidad de Fluorescencia Extrínseca Máxima ($IF_{max-ANS}$). La λ correspondiente a la máxima intensidad ($\lambda_{max-ANS}$) también fue obtenida. Las determinaciones de fluorescencia intrínseca y extrínseca fueron realizadas por triplicado y a temperatura ambiente.

3.2.6.2. Cromatografía de exclusión molecular en FPLC

Entre las técnicas comúnmente utilizadas para separar y cuantificar proteínas se encuentra la cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel (SEC, del inglés *Size Exclusion Chromatography*) (Fekete y col., 2014; Mori y Barth, 2013). El equipamiento

utilizado para llevar a cabo la separación y purificación de proteínas por filtración en gel es esencialmente un equipo de cromatografía líquida (FPLC, del inglés *Fast Protein Liquid Chromatography*) que proporciona alta resolución mediante fases estacionarias de pequeño diámetro para la caracterización y separación de proteínas. La luz UV es el modo de detección más utilizado para proteínas. Las λ en el rango UV, de 270, 275 y 280 nm dan una respuesta específica para los aminoácidos aromáticos (Trp, Tyr, Phe). Las condiciones de elución utilizadas en esta técnica permiten la caracterización de la proteína con un impacto mínimo en su estructura conformacional y el entorno local (Healthcare, 2012).

En la presente tesis doctoral, el análisis de las nanopartículas PCHn fue realizado utilizando una columna Superdex 200 (GE, Healthcare). Como control se incluyó el análisis de PCH nativa. La columna fue conectada a un dispositivo FPLC (modelo Akta Basic – GE, Healthcare) y se equilibró con buffer fosfato 50 mM y NaCl 150 mM a pH 7,6. La calibración del equipo se realizó utilizando un kit de calibración de filtración en gel (GE, Healthcare), que incluyó los siguientes Marcadores de Peso Molecular (PM):

- ✓ Tiroglobulina (669 kDa) 3 mg/ml
- ✓ Ferritina (440 kDa) 0,3 mg/ml
- ✓ Aldolasa (158 kDa) 3 mg/ml
- ✓ Conalbúmina (75 kDa) 3 mg/ml
- ✓ Ovoalbúmina (44 kDa) 3 mg/ml
- ✓ Anhidrasa Carbónica (29 kDa) 3 mg/ml
- ✓ Ribonucleasa (13,7 kDa) 3 mg/ml
- ✓ Aprotinina (6,5 kDa) 3 mg/ml

El volumen de inyección fue 100 μ l y la velocidad de flujo utilizada fue 0,5 ml/min. La cuantificación se realizó con un detector UV midiendo absorbancia a 280 nm.

3.2.6.3. Análisis de distribución de tamaño de partícula y potencial ζ

La distribución de tamaño de partícula (PSD) fue obtenida por dispersión de luz dinámica (DLS, del inglés *Dynamic Light Scattering*) a un ángulo fijo de 90°.

DLS es una técnica no invasiva y no destructiva que permite medir el tamaño de una gran población de partículas en un corto período de tiempo (Arzenšek y col., 2010; Bhattacharjee, 2016; Malvern Instruments, 2013). La técnica se basa en el hecho de que las partículas y las macromoléculas en solución a temperatura constante están sometidas a movimiento Browniano, un movimiento aleatorio producto de la colisión de las moléculas de solvente con las partículas bajo análisis. A una viscosidad y temperatura constante, la

velocidad del movimiento Browniano (definida por el coeficiente de difusión traslacional, D) dependerá del tamaño de partícula (Malvern Instruments, 2013). Como consecuencia de este movimiento la luz dispersada del conjunto de partículas fluctuará con el tiempo. La fluctuación de la luz dispersada con el tiempo es procesada por un correlador, que básicamente es un comparador de señales, el cual genera la función de correlación de la muestra (Falke y Betzel, 2019; Malvern Instruments, 2013).

A partir de la deconvolución de la función de correlación se obtiene la PSD. La misma es obtenida a partir de un gráfico de la intensidad relativa de luz dispersada por las partículas de varios tamaños y es conocida como distribución de tamaño en intensidad (PSDi) (Arzenšek y col., 2010). El área debajo de cada pico en la gráfica PSDi es proporcional a la intensidad dispersada relativa de cada familia de partículas (Malvern Instruments, 2013). Cuando la curva de correlación es ajustada a un algoritmo cumulante exponencial simple, es posible obtener un único valor de D representativo del conjunto de partículas, a partir del cual es posible calcular un único valor de d_H (asumiendo que las partículas tienen forma esférica) utilizando la ecuación de Stokes-Einstein (Arzenšek y col., 2010). El d_H medido por DLS se define como el diámetro de una esfera rígida que difunde a la misma velocidad de difusión que la partícula bajo análisis (independientemente de si la partícula es esférica o no) (Bhattacharjee, 2016).

Por otro lado, el análisis de cumulantes de la función de autocorrelación permite obtener el índice de polidispersidad global (PdI), el cual es indicativo del ancho de una distribución de tamaño global asumiendo un único valor medio. El término polidispersidad se utiliza para describir el grado de "no uniformidad" de una distribución de tamaño. Distribuciones con $PdI < 0,1$ se denominan monodispersas, mientras que valores de $PdI > 0,1$ caracterizan muestras polidispersas pudiendo ser de polidispersidad moderada (0,1-0,4) o amplia ($> 0,4$) (Bhattacharjee, 2016). Si bien DLS permite obtener la PSDi, es posible realizar las transformaciones a partir de ella a fin de obtener las PSD en volumen (PSDv) y en número (PSDn) aplicando la teoría de Mie, donde son empleadas las propiedades ópticas del analito (índice de refracción y absorción) (Malvern Instruments, 2013).

El potencial ζ es una propiedad física que exhiben las partículas en suspensión, las moléculas y los materiales de interfase. Está asociado a la presencia de cargas en la superficie de las mismas. La carga neta en la superficie de una partícula afecta la distribución de los iones de la región interfacial a su alrededor, resultando en un aumento de la concentración de contra iones (iones de carga opuesta a la de la partícula) cerca de la superficie (Malvern Instruments, 2013). La capa de líquido que rodea a una partícula se divide en dos partes: la

capa de Stern, donde los iones están fuertemente unidos a la partícula, y la capa difusa donde los iones están unidos de manera más débil. A su vez, dentro de la capa difusa se define un borde o límite hipotético dentro del cual los iones y las partículas forman una entidad estable. Es decir, que cuando la partícula se mueve, los iones dentro de este límite también se mueven con ella. El potencial en este límite hipotético es lo que se conoce como potencial ζ y su magnitud es un indicador de la estabilidad coloidal del sistema en estudio (Bhattacharjee, 2016).

El potencial ζ no se puede medir directamente y se deduce de la movilidad electroforética (U_E) de partículas cargadas por dispersión de luz electroforética. La U_E de las partículas se calcula primero como la relación entre la velocidad de la partícula ($\mu\text{m/s}$) y la intensidad del campo eléctrico (V/cm). Luego, conociendo el valor de U_E el potencial ζ se calcula por medio de la ecuación de Henry:

$$U_E = \frac{2 \varepsilon \zeta f(Ka)}{3 \eta} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde ε es la constante dieléctrica, ζ es el potencial ζ , $f(ka)$ es la función de Henry y η es la viscosidad. Para partículas pequeñas en medio acuoso y con baja concentración de electrolitos, se usa $f(ka) = 1$ según la aproximación de Smoluchowski (Bhattacharjee, 2016; Malvern Instruments, 2013). La serie Zetasizer Nano calcula la U_E por dispersión de luz electroforética de una dispersión o moléculas en solución. El principio físico fundamental es el de la electroforesis. Las partículas móviles durante la electroforesis dispersan un láser incidente. Como las partículas son móviles, la luz dispersada tiene una frecuencia diferente a la del láser original y el cambio de frecuencia es proporcional a la velocidad de las partículas (velocimetría por láser Doppler) (Malvern Instruments, 2013).

En la presente tesis doctoral, la distribución de tamaño de partícula (PSD) y el potencial ζ de PCH nativa (control) y PCHn fueron obtenidos utilizando un equipo Zetasizer Nano (modelo ZS90, Malvern Instruments Limited, Reino Unido) equipado con un láser de He-Ne de λ de salida de 632,8 nm. Para determinar PSD y potencial ζ , las muestras fueron diluidas con NaCl 50 mM, de manera de obtener una concentración de 0,1% m/v. Luego, se corrigió el pH del medio acuoso a valores de 3 y 7 utilizando HCl. Los índices de refracción para el solvente y los agregados de proteína utilizados fueron 1,33 y 1,50, respectivamente (Croguennec y col., 2007). El d_H fue obtenido a partir del pico de la curva intensidad (PSDi, %) vs. diámetro (nm). El PDI, la PSDv fueron también considerados en el análisis de PSD. El

valor de potencial ζ fue calculado de acuerdo con el modelo de Smoluchowski, utilizando el software que provee el equipo (Malvern Instruments, 2013). Todas las mediciones fueron realizadas a 25 °C por triplicado.

3.2.6.4. Estudio de los aspectos morfológicos

La morfología y ultraestructura de las nanopartículas obtenidas en la presente tesis doctoral fue analizada por microscopía de fuerza atómica (AFM).

Las mediciones realizadas se llevaron a cabo adsorbiendo 2 μL de muestra (dilución: 0,0001% m/v) sobre una superficie de mica escindida (1 cm^2) y secada en cámara de vacío. Las imágenes de AFM se realizaron en modo *tapping* con un microscopio Agilent 5400 (Agilent Technologies, EE.UU). Se utilizaron *cantilevers* de AFM recubiertos de aluminio (modelo OPUS: 160AC-NA) con las siguientes especificaciones: longitud: 160 μm ; radio de tip: <7 nm; ancho medio: 40 ± 2 μm ; espesor: $4 \pm 0,5$ μm ; altura de tip: 14 μm y fuerza de resorte: 26 N.m^{-1} . Se empleó una frecuencia de oscilación de 280 kHz. Las muestras fueron escaneadas a 1 línea s^{-1} . Para el procesamiento de imágenes, se utilizó el software Gwyddion 2.44. Se obtuvieron imágenes topográficas, de fase y en formato 3D a fin de mostrar una mejor definición de las partículas proteicas.

3.2.7. Caracterización de la formación de complejos PCHn-CA

Las propiedades de las nanopartículas PCHn de unir CA fueron estudiadas mediante fluorescencia intrínseca y extrínseca. Los mismos, fueron preparados adicionando soluciones etanólicas de CA a las muestras de PCHn. Se determinó la PSD y potencial ζ de los complejos obtenidos, tal como fue descrito anteriormente. Además, fue evaluada la morfología (AFM), eficiencia de encapsulación de PCHn y actividad antifúngica de los complejos obtenidos.

3.2.7.1. Fluorescencia intrínseca y extrínseca

El proceso de formación de complejos fue caracterizado por espectroscopia de fluorescencia intrínseca y extrínseca utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia (modelo F-2000, Hitachi, Japón). Se incluyeron complejos formados con PCH nativa (PCH-CA) como control, con el objetivo de evaluar el efecto del tratamiento térmico en la formación de los complejos. Se prepararon diluciones de PCH nativa y PCHn en buffer fosfato (pH 7, 50mM) a 0,0043% m/v y se titularon con volúmenes crecientes de soluciones etanólicas stock de CA (6 y 12 mM) (Zimet y Livney, 2009). El rango de concentración

evaluado para los CA fue 0-200 μM . En todos los casos, la concentración final de etanol fue inferior a 2% v/v para evitar posibles efectos sobre la conformación de los sistemas proteicos (Cogan y col., 1976). Luego, los sistemas se dejaron equilibrar a temperatura ambiente (25°C) durante 24 h. Los espectros de emisión intrínseca (debido a la emisión de residuos Trp) se registraron en el rango de 308-420 nm, a una λ_{ex} de 295 nm. La $\text{IF}_{\text{max-}}\text{Trp}$ y la λ_{em} correspondiente fue registrada para cada espectro. Los resultados fueron informados como Intensidad de Fluorescencia Intrínseca Relativa (IFR-Trp), la cual fue calculada como la relación entre la $\text{IF}_{\text{max-}}\text{Trp}$ a una concentración de CA dada y la intensidad de fluorescencia intrínseca de máxima emisión a concentración de CA cero ($\text{IF}_0\text{-Trp}$). Las curvas de titulación fueron representadas como IFR-Trp en función de la concentración de CA. Las mediciones fueron llevadas a cabo por triplicado, a 15, 25, 35 y 45 °C.

Los experimentos extrínsecos se llevaron a cabo utilizando ANS como sonda fluorescente. El espectro de fluorescencia extrínseca fue obtenido adicionando 9 μl de una solución de ANS 15 mM a los complejos generados anteriormente para las determinaciones de fluorescencia intrínseca (PCH-CA y PCHn-CA, titulados en un rango de 0 a 200 μM con solución de CA en etanol absoluto). El espectro de emisión fue obtenido entre 420 y 600 nm a una λ_{ex} de 390 nm. Los resultados se expresaron en términos relativos como Intensidad de Fluorescencia Extrínseca Relativa (IFR-ANS), la cual fue definida como la relación entre la intensidad de fluorescencia extrínseca de máxima emisión a una dada concentración de CA ($\text{IF}_{\text{max-}}\text{ANS}$) y la intensidad de fluorescencia extrínseca de máxima emisión a concentración de CA cero ($\text{IF}_0\text{-ANS}$). Las mediciones fueron llevadas a cabo por triplicado y a temperatura ambiente.

3.2.7.2. Propiedades estequiométricas y parámetros termodinámicos

Con el objetivo de estudiar las interacciones moleculares entre proteína y los CA, calcular la estequiometría de unión o número de moléculas de CA unidas por unidad monomérica de proteína, determinada en base al PM obtenido anteriormente por SEC-FPLC, (n) y la constante de asociación (K_a), los resultados de fluorescencia se ajustaron al modelo de Scatchard modificado utilizando la siguiente ecuación (Le Maux y col., 2013):

$$[P] \cdot (1 - f_i) = \frac{[CA]}{n} \cdot \left(\frac{1}{f_i} - 1 \right) - \frac{1}{K_a \cdot n} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde [P] es la concentración total de PCH o PCHn en Molaridad (M), [CA] es la concentración total de CA en Molaridad (M), n es el número de moléculas de CA unidas a PCH o PCHn a nivel de la saturación, K_a es la constante de asociación (1/M) y f_i es la fracción de sitios ocupados por CA, la cual se define como:

$$f_i = \frac{F - F_0}{F_{sat} - F_0} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde F, F_0 y F_{sat} es la intensidad de fluorescencia máxima, máxima a concentración cero de CA y máxima en la saturación, respectivamente. Al graficar $[P] \cdot (1 - f_i)$ en función de $[CA] \cdot [(1/f_i) - 1]$ se obtiene una recta en donde la pendiente es $1/n$ y la ordenada al origen $-(1/K_a \cdot n)$. Por otro lado, los parámetros termodinámicos involucrados en el proceso de formación de complejos, tales como energía libre estándar (ΔG° , J/mol), entalpía (ΔH° , J/mol) y entropía (ΔS° , J/mol) fueron obtenidos a partir de los resultados de fluorescencia a diferentes temperaturas (en el rango mencionado anteriormente). Para ello, se utilizaron las siguientes ecuaciones (Wu y col., 2011):

$$\ln K_a = \frac{\Delta S^\circ}{R} - \frac{\Delta H^\circ}{RT} \quad \text{Ecuación 6}$$

$$\Delta G^\circ = -T \cdot \Delta S^\circ + \Delta H^\circ \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde K_a es la constante de equilibrio (1/M), T es la temperatura (K) y R la constante de los gases (J/mol.K). Al graficar $\ln K_a$ en función de $1/T$ se obtiene una gráfica en la cual la pendiente es $-(\Delta H^\circ/R)$ y la ordenada al origen es $\Delta S^\circ/R$.

3.2.7.3. Análisis de distribución de tamaño de partícula (PSD) y potencial ζ

Los análisis de PSD y potencial ζ de PCHn-CA se llevaron a cabo a valores de pH 3 y 7 del medio acuoso. Para las mediciones se prepararon soluciones proteicas de PCHn al 0,1% m/v diluyendo con solución de NaCl (50 mM, pH 7) y se adicionaron volúmenes de solución de CA en etanol absoluto de manera que la concentración final de ligando corresponda a la saturación de los sitios de unión calculada a partir de los resultados de fluorescencia. En todos los casos, el porcentaje de etanol no superó el 2 % v/v. Luego, se corrigió el pH del medio acuoso con HCl. Las determinaciones se realizaron utilizando un equipo Zetasizer Nano (modelo ZS90, Malvern Instruments Limited, Reino Unido), del mismo modo en que se

realizaron para las nanopartículas sin ligando. Las mediciones fueron realizadas a 25 °C, por triplicado.

3.2.7.4. Estudio de los aspectos morfológicos

La morfología de los complejos PCHn-CA obtenidos fue analizada por AFM. La preparación de las muestras y el análisis de las imágenes se realizaron como se describió anteriormente en la [sección 3.2.6.4](#).

3.2.7.5. Eficiencia de encapsulación (EE)

La concentración de los CA encapsulados por PCHn fue determinada por espectroscopia UV-Vis de acuerdo al protocolo descrito por [Pan y col. \(2014\)](#) y [Parris y col. \(2005\)](#), con algunas modificaciones.

En primer lugar, se obtuvieron los complejos PCHn-CA mediante la mezcla de volúmenes de solución de nanopartículas PCHn y solución etanólica de CA al 4% m/v, en relación 10:1 (133mg de CA/g de proteínas). La mezcla fue realizada bajo leve agitación durante 30 min. Esta relación volumétrica y concentración de CA fue escogida sobre la base de ensayos de estabilidad coloidal realizados de manera preliminar. A partir de los mismos, se observó que concentraciones y volúmenes mayores de solución etanólica de CA producían la precipitación de los sistemas. Luego, se realizó la precipitación de los complejos obtenidos bajando el pH de la solución a 4,5 (punto isoeléctrico de PCH) con una solución de HCl 0,1 M. A continuación, se centrifugó a 10.000g durante 10 min. Se tomó un volumen de 0,3 mL del sobrenadante obtenido y se realizó la extracción de CA libre agregando 3 mL de acetato de etilo. Se agitó durante 1 min en vortex y luego se centrifugó a 2.000 g durante 2 min. Se tomó un volumen de la fase de acetato de etilo y se midió absorbancia a 275 nm (CAR y TIM) y 280 nm (CIN). Para determinar la concentración de CA libre se obtuvieron previamente curvas de calibrado utilizando un rango de concentraciones de los compuestos puros disueltos en acetato de etilo. Además, se realizó un blanco de solución de proteínas sin CA. La concentración de CA encapsulado (CA_E) se obtuvo como la diferencia entre la concentración total inicialmente agregada (CA_T) y la concentración encontrada en el sobrenadante (CA_S , CA no encapsulado). Así, la EE (%) se calculó de la siguiente manera:

$$EE (\% \text{ m/m}) = (CA_E / CA_T) \times 100$$

Ecuación 8

3.2.7.6. Determinación de la actividad antifúngica

A partir del aislamiento y caracterización realizado en la [sección 3.2.3](#), y de los ensayos preliminares de actividad antifúngica ([sección 3.2.4](#)), se seleccionó la especie fúngica *A. niger* para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y mínima fungicida (CMF). La selección se realizó en base a su resistencia a los CA puros disueltos en etanol. Se tuvo en cuenta, además, la Fr % en productos panificados, su importancia como agente contaminante de alimentos y su potencial patogenicidad.

Para el análisis de la eficacia antifúngica de los complejos PCHn-CA contra *A. niger* se emplearon dos técnicas: microdilución en caldo y dilución en agar.

3.2.7.6.1. Ensayo de microdilución en caldo

Se utilizó el método de microdilución en caldo utilizando microplacas de 96 pocillos de acuerdo a la metodología propuesta por [Bouddine y col. \(2012\)](#). Se empleó caldo extracto de malta (MEB) para determinar la CMI y CMF. Los experimentos se realizaron por triplicado utilizando microplacas de 96 pocillos en las que se expuso una dispersión de esporas de *A. niger* a soluciones de complejos a 0-700 µg/mL de CA. Se preparó una solución stock de nanocomplejos tal como se indicó en la [sección 3.2.7.5](#). (4 mg de CA/mL) a partir de la cual se diluyó para obtener el rango de concentración indicado. Se utilizó una suspensión de 10⁶ esporas/mL, la cual se preparó tal como se indicó en la [sección 3.2.4](#). Las microplacas se incubaron a 25 °C durante 7 días. Como controles se incluyeron pocillos solo con MEB, con soluciones puras de PCHn (sin CA) y con soluciones de CA puros disueltos en etanol. La CMI se definió como la concentración de PCHn pura o CA más baja (puros o encapsulados) a la que no se evidenció visualmente el crecimiento de hongos en comparación con el control correspondiente al pocillo que contenía solo MEB. Además, para comprobar la CMI, se aplicó un ensayo colorimétrico utilizando MTT, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, como sonda de viabilidad celular. Se preparó una solución de MTT en buffer fosfato (50 mM, pH 7) y se añadieron alícuotas de 25 µl a cada pocillo. Luego, la microplaca se incubó a 37 °C durante 3 h ([Kavitha y Satish, 2013](#)). Para determinar la CMF, los pocillos en los que no se observó color violeta (células viables) se sembraron asépticamente en profundidad en placas MEA y se incubaron a 25 °C durante 7 días. Por tanto, se consideró CMF como la concentración de PCHn pura o CA (puros o encapsulados) a la que no se evidenció crecimiento de hongos.

3.2.7.6.2. Ensayo de dilución en agar

La actividad antifúngica de los CA puros disueltos en etanol y de PCHn-CA fue determinada mediante la técnica de dilución en agar (Bansod y Rai, 2008). El rango de concentración evaluado fue 0-50 μg de CA/mL. Para ello, soluciones stocks de CA puros disueltos en etanol y complejos PCHn-CA, fueron diluidas en 10 mL de MEA a 40°C de manera de obtener placas con 0, 10, 20, 30, 40 y 50 μg de CA/mL. Al igual que en el ensayo de microdilución, se utilizó la solución stock de nanocomplejos de 4 mg de CA/mL (sección 3.2.7.5.) a partir de la cual se realizaron diluciones para obtener las concentraciones finales de CA encapsulado deseadas. Además, se evaluó la actividad de PCHn pura (sin CA). Luego, se distribuyeron en placas de Petri (diámetro 90 mm) y una vez solidificado el agar se inoculó con 3 μL de la suspensión de *A. niger* de 10^6 esporas/mL en tres puntos equidistantes de las placas y se incubó durante 7 días a 25°C. Se obtuvo la CMI, la cual se definió como la concentración más baja que produjo una disminución visual del crecimiento (disminución del diámetro de las colonias) respecto al control (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Por otro lado, también se obtuvo la CMF o concentración más baja que demostró una ausencia total de crecimiento en placa.

3.2.8. Preparación de las soluciones formadoras de recubrimiento (SFR)

Para obtener las SFR, soluciones de PCHn-CA se mezclaron con diferentes concentraciones de glicerol del 30, 40 y 50% m/m total de proteínas (Gennadios y col., 1996). Los complejos PCHn-CA se obtuvieron tal como se indicó en la sección 3.2.7.5, de manera de utilizar la máxima concentración de CA.

Para evaluar el aspecto visual de las SFR obtenidas, se colocó un volumen de 1,5 mL de cada una sobre superficies de vidrio y teflón, dejando secar luego durante 24 horas a temperatura ambiente (25 °C).

3.2.9. Aplicación de SFR sobre la corteza de panes de molde sin conservantes

Las SFR se aplicaron sobre la corteza de piezas de pan de molde mediante la técnica de pincelado. Para ello se elaboraron piezas de pan de 50 g como se describió en la sección 3.1. Una vez horneados, estos se enfriaron inmediatamente durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, los panes se pincelaron uniformemente con las SFR cubriendo toda su superficie y se secaron a 30 °C y 40% de HR durante 1 hora. Finalmente, los panes recubiertos se envasaron en bolsas de polietileno, se sellaron y almacenaron durante 7 días a

25 °C. Se incluyeron como controles piezas de pan sin recubrir (sin SFR) y recubiertas con SFR (PCHn-Glicerol, sin CA).

3.2.10. Evaluación de los panes luego de la aplicación de las SFR

3.2.10.1. Humedad y actividad acuosa (a_w)

Se evaluó el impacto de la aplicación de las SFR sobre el contenido de humedad (% m/m) y a_w de la corteza y miga de los panes. Las determinaciones se realizaron después de la aplicación de las SFR (día 0) y después de 7 días de almacenamiento a 25 °C (día 7). Para la medición de la humedad, se pesaron 2,5 g de muestra en una balanza halógena (modelo PMR 50 NH, Radwag, Polonia) y se calentó a 105 °C hasta peso constante. El porcentaje de humedad se calculó como:

$$\text{Humedad (\% m/m)} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde, P_i y P_f , son los pesos (g) antes y después del secado a 105 °C, respectivamente. El a_w de la corteza y la miga se determinó utilizando un equipo Aqua LAB (modelo CX-2T, Decagon Devices Inc., EE.UU). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.2.10.2. Análisis de textura y color

Con el objetivo de evaluar el impacto de los recubrimientos sobre los panes, se realizó un análisis de perfil de textura (TPA) y color. Ambos, son atributos muy importantes utilizados en la industria alimentaria para evaluar calidad y aceptabilidad de un producto alimenticio. Su evaluación puede realizarse mediante pruebas objetivas (instrumentales) (Angioloni y Collar, 2009).

El texturómetro, dispositivo que imita la condición de masticación, presenta una excelente correlación con la evaluación sensorial de la textura (Szczesniak, 1963). El análisis consiste en someter a una muestra a dos o más ciclos de compresión entre dos superficies paralelas. A partir de los resultados obtenidos se genera una curva fuerza-tiempo o TPA (Fig. 18) (Bourne, 2002; Khan y Rahman, 2021).

A partir de la misma se determinan los atributos de textura. En la Fig. 18, A indica el comienzo de la primera compresión y B el comienzo de la segunda compresión. La altura del

pico de fuerza en el primer ciclo de compresión (primer mordisco) se define como *dureza*. La *fracturabilidad* (originalmente llamada fragilidad) como la fuerza de ruptura significativa en la curva correspondiente al primer mordisco que normalmente aparece antes de la dureza (que, en este caso, se muestra como una línea discontinua en la Fig.18).

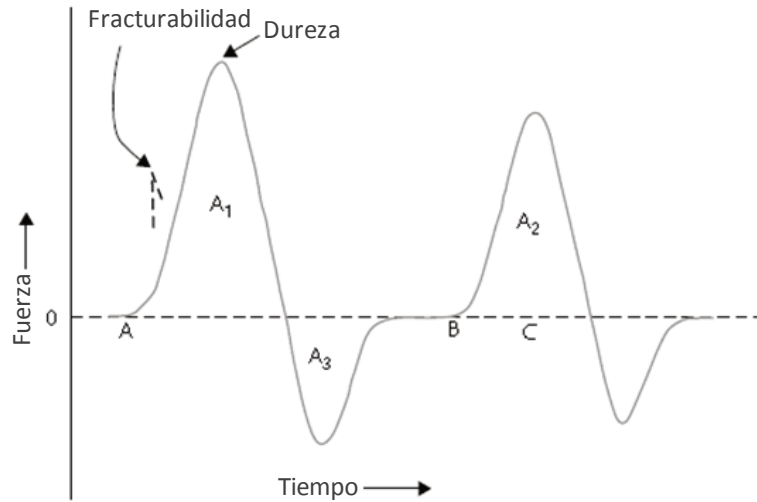


Figura 18. Curva típica de TPA generada por el texturómetro (Bourne, 2002)

. La relación de las áreas de fuerza positiva bajo la primera y la segunda compresión (A_2/A_1) se define como *cohesividad*. La *adhesividad* corresponde al área de fuerza negativa del primer mordisco (A_3), representa el trabajo necesario para sacar el émbolo de compresión de la muestra. La distancia en altura que el alimento recuperó durante el tiempo transcurrido entre el final del primer mordisco y el comienzo del segundo mordisco (BC) se define como *elasticidad*. La *resiliencia*, es el área durante la retirada de la primera compresión (es decir, descompresión) dividida por el área de la primera compresión (A_3/A_1). Luego, por cálculo se derivan otros dos parámetros a partir de los parámetros medidos: *gomosidad*, definida como el producto de dureza x cohesividad y *masticabilidad* como el producto de gomosisidad x elasticidad (Bourne, 2002; Khan y Rahman, 2021)

En la presente tesis doctoral se realizó un TPA de las muestras de pan (50x40 mm) el día de su elaboración (día 0) y luego de 7 días de almacenamiento. Se utilizó un analizador de textura TA-XT Plus (Stable Microsystems, Reino Unido) equipado con un disco plano de aluminio de 75 mm y una celda de carga de 50 kg. Los ajustes del analizador de textura fueron: prueba de doble compresión, velocidad de prueba previa 10 mm/s, velocidad de prueba 1,7 mm/s, velocidad posterior a la prueba 10 mm/s, distancia 10 mm, tiempo 3 s, fuerza de disparo 0,049 N, área de contacto de 1963,5 mm² y deformación del 25%. Para

calcular los valores de dureza, elasticidad, cohesividad, gomosidad, masticabilidad y resiliencia se aplicó el software TA-XT Exponent. Los valores de TPA informados fueron los promedios de 3 determinaciones.

Luego se determinó el color de la corteza de los panes utilizando un espectrofotómetro Minolta (modelo CM-508d/8, Minolta, Japón), equipado con un iluminante estándar D65, con un ángulo de observación de 10° y componente especular excluido (Rodríguez-Arzuaga y Piagentini, 2018). Se evaluaron los componentes del sistema CIE, espacio de color definido por las coordenadas rectangulares L*, a*, b*. Los tres parámetros en el modelo representan: la luminosidad o claridad del color (L*) que va del negro (L*=0) al blanco (L*=100), su posición entre rojo y verde (a*, valores negativos indican verde mientras valores positivos indican rojo) y su posición entre amarillo y azul (b*, valores negativos indican azul y valores positivos indican amarillo). Se realizaron seis mediciones de color por muestra. Luego, se determinó la diferencia de color total (ΔE^*) entre la muestra control (pan sin recubrir) y los panes recubiertos, y se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación (Pathare y col., 2013):

$$\Delta E^* = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{0.5} \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde ΔL^* , Δa^* y Δb^* son las diferencias entre cada parámetro de color correspondiente a las muestras y el control.

3.2.10.3. Análisis microbiológico

La calidad microbiológica de los panes fue analizada mediante la técnica de recuento en placa de mohos y levaduras (Khan y Rahman, 2021). Los panes recubiertos y envasados fueron analizados el día 0 (posterior al proceso de recubrimiento) y luego de 7 días de almacenamiento a 25°C. También fueron analizadas muestras de pan sin SFR (control) y recubiertas con SFR (PCHn-Glicerol, sin CA). Para ello, se homogeneizaron 10 g de muestra de pan y se diluyeron en 90 mL de agua de peptona al 0,1% m/v. Se prepararon diluciones seriadas (en el rango de 10^{-2} a 10^{-8}) y se sembró en profundidad 1 mL de cada una en MEA. Se incubaron placas de Petri a 25 °C durante 5 días y se obtuvieron las unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (UFC/g). Las pruebas microbiológicas se realizaron por triplicado.

3.2.10.4. Análisis sensorial

En el presente trabajo de tesis, se realizó un ensayo de aceptabilidad con consumidores (Yousif y col., 2012). El ensayo se llevó a cabo con 60 voluntarios (consumidores habituales de pan) de entre 20 y 65 años (22 hombres y 38 mujeres) de la ciudad de Santa Fe (Argentina). Se contempló una escala hedónica verbal horizontal de 9 puntos (donde: 9- “me gusta muchísimo”, 8-“me gusta mucho”, 7-“me gusta moderadamente”, 6-“me gusta poco”, 5-“no me gusta, ni me disgusta”, 4-“me disgusta poco”, 3-“me disgusta moderadamente”, 2-“me disgusta mucho” y 1-“me disgusta muchísimo”) (Ares y col., 2017). Los consumidores probaron 4 muestras: pan sin recubrimiento (control), pan recubierto con SFR-TIM, pan recubierto con SFR-CAR y pan recubierto con SFR-CIN. Se evaluó el olor, sabor y la aceptabilidad global de los panes. Las muestras se analizaron un día después de hornear y pincelar. Se presentaron en rodajas de 4,5x5 cm (incluyendo corteza y miga), envasadas en bolsas plásticas y codificadas con números aleatorios de 3 dígitos. Las muestras se entregaron al azar y se utilizó agua para enjuagar la boca después de probar cada una de ellas.

3.2.11. Obtención y caracterización de películas activas (PA)

Las PA fueron obtenidas a partir de los complejos formados por nanopartículas obtenidas por tratamiento térmico (85°C, 5 min) de una solución de PCH al 5% m/m y pH 11,4 (PCH_{5-11,4}), los compuestos CAR, TIM y glicerol como agente plastificante.

3.2.11.1. Preparación de nanopartículas PCH_{5-11,4}

Las nanopartículas PCH_{5-11,4} fueron obtenidas de acuerdo al procedimiento descrito por Sponton y col. (2020). En primer lugar, se preparó una solución stock diluyendo 1 L de clara de huevo líquida pasteurizada con 200 mL de agua destilada. El pH de la solución resultante se ajustó a 6,0 usando HCl 2N. Luego, la solución se centrifugó a ~2000 g (durante 20 min) para eliminar las mucinas. Posteriormente, el pH del sobrenadante se ajustó a 11,4 usando NaOH 2 N y se verificó la concentración proteica por absorbancia a 280 nm, tal como se indicó en la sección 3.2.5. De esta forma, una solución stock al 8,5% m/v fue obtenida. A partir de esta solución stock, se preparó por dilución una solución al 5% m/v y pH 11,4. Posteriormente, se colocó 1 L de esta solución en un reactor discontinuo y se calentó bajo agitación magnética por circulación de agua hasta 85 °C durante 5 min, luego la solución se

enfrió mediante circulación de agua fría. Se mantuvo en almacenamiento a 4°C hasta su posterior uso.

3.2.11.2. Obtención y caracterización de complejos PCH_{5-11,4}-CA

Los complejos se obtuvieron mezclando un volumen de solución de PCH_{5-11,4} a pH 11,5 (ajustado con NaOH 2 N) con un volumen de solución etanólica de TIM y CAR al 4 % m/v, en relación 10:1,5 (120 mg de CA/g de proteínas). La mezcla se agitó durante 30 min y se equilibró durante 1 h a 25°C. Esta relación se eligió en base a pruebas preliminares de estabilidad coloidal las cuales evidenciaron que mayores concentraciones de CA y mayores volúmenes de solución etanólica de CA producían la gelificación de los sistemas mixtos. Por otro lado, la concentración de etanol utilizada se mantuvo por debajo del 20% v/v, concentración por encima de la cual podría producir cambios conformacionales en PCH (Yao y col., 2020).

3.2.11.2.1. Espectroscopia de fluorescencia intrínseca

La interacción entre PCH_{5-11,4} y los CA fue evaluada midiendo la IF_{\max} -Trp. Para ello, se prepararon diluciones de PCH_{5-11,4} y PCH_{5-11,4}-CA en agua destilada (pH 11,5) con una concentración proteica del 0,0043% m/v. Luego, los sistemas mixtos se equilibraron a temperatura ambiente (25°C) durante 24 h. Los espectros de emisión intrínsecos (debido a la emisión de residuos de Trp) se registraron en el rango de 308-400 nm, a una λ_{ex} de 295 nm. Las mediciones se realizaron por triplicado a 25 °C usando un espectrofotómetro de fluorescencia (modelo F-2000, Hitachi, Japón).

3.2.11.2.2. Análisis de distribución de tamaño de partícula (PSD) y potencial ζ

El tamaño de partícula y el potencial ζ se determinaron utilizando el mismo equipo y condiciones de medición que se indicaron en la [sección 3.2.6.3](#). Para estas medidas, las diluciones de PCH_{5-11,4} y PCH_{5-11,4}-CA al 0,1% m/v se prepararon con agua destilada a pH 11,5. Se obtuvieron el d_H y la PSDv para informar la composición de los sistemas evaluados. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado a 25 °C.

3.2.11.2.3. Eficiencia de encapsulación (EE)

La concentración de CA encapsulada por PCH_{5-11,4} se determinó mediante espectroscopía UV-Vis de acuerdo a la metodología descrita anteriormente en la [sección 3.2.7.5](#).

3.2.11.2.4. Determinación de la actividad antifúngica

La actividad antifúngica de los complejos se determinó mediante la técnica de dilución en agar descrita en la [sección 3.2.7.6.2](#) utilizando la cepa fúngica *A. niger*. Las soluciones etanólicas de los CA puros y las soluciones de complejos de PCH_{5-11,4}-CA se diluyeron a 0-500 µg de CA/mL utilizando 10 mL de MEA a 40 °C (en placas de Petri de 90 mm de diámetro). Además, se evaluó la actividad de las nanopartículas PCH_{5-11,4} puras como control.

3.2.11.3. Producción de PA

En primer lugar, se prepararon las soluciones filmogénicas añadiendo glicerol (40% m/m total de proteínas) a las soluciones de nanocomplejos PCH_{5-11,4}-CA obtenidas anteriormente ([sección 3.2.11.2](#)). A continuación, las soluciones se agitaron durante 30 min hasta su homogeneización. Se preparó un control de PCH_{5-11,4}-Glicerol (sin CA).

Las PA se obtuvieron por el método de *casting*, colocando 25 g de las soluciones filmogénicas en placas de Petri de plástico (90 mm de diámetro) y secando en estufa de aire forzado (Tecno Dalvo SRL, Argentina) a 40 °C durante 48 h. Posteriormente, se retiraron de la estufa y se dejaron equilibrar a temperatura ambiente durante 24 h. Finalmente, las PA se despegaron de la superficie de las placas de Petri y se acondicionaron previamente a 25°C y 60% de HR durante 72 h antes de los ensayos de caracterización. El espesor de las mismas se determinó utilizando un micrómetro digital (Mitutoyo, Japón) con una resolución de 0,001 mm. Para ello, se tomaron aleatoriamente 10 mediciones en diferentes lugares para cada muestra y se informaron los valores medios.

3.2.11.4. Caracterización fisicoquímica de las PA

3.2.11.4.1. Propiedades ópticas

El color de las PA obtenidas por *casting* se determinó utilizando un espectrofotómetro Minolta (modelo CM-508d/8, Minolta, Japón), equipado con un iluminante estándar D65,

ángulo de observación de 10° y componente especular excluido. Los parámetros CIE, L*, a* y b* se obtuvieron colocando porciones de PA en una placa estándar reflectora color blanca. Se tomaron cinco medidas en distintos puntos de la superficie de cada PA. La diferencia de color total (ΔE^*) y el índice de amarillez (IA) se calcularon de acuerdo a lo descrito por Taqi y col. (2011):

$$\Delta E^* = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{0.5} \quad \text{Ecuación 11}$$

$$IA = 142.86 \frac{b^*}{L^*} \quad \text{Ecuación 12}$$

Donde ΔL^* , Δa^* y Δb^* son las diferencias entre el parámetro de color correspondiente de las muestras y la PA control (PCH_{5-11,4}Glicerol, sin CA).

La transparencia de las PA (T) se determinó de acuerdo al procedimiento descrito por López-Mata y col. (2016). Un trozo de película (1,0 x 4,5 cm) se colocó sobre una de las caras de una cubeta de cuarzo y se midió la transmitancia a 600 nm (T_{600}) con un espectrofotómetro UV-vis (Jenway 7305, Reino Unido). La cubeta sin película se utilizó como blanco. Se registró la T_{600} y se calculó la transparencia de la película mediante la siguiente ecuación:

$$T = \text{Log} \left(\frac{T_{600}}{G} \right) \quad \text{Ecuación 13}$$

Donde G representa el espesor de la película (mm). Se realizaron cinco mediciones de cada PA.

3.2.11.4.2. Análisis microestructural

Las características microestructurales de la superficie y sección transversal de las PA se examinaron por microscopía electrónica de barrido (SEM, del inglés *Scanning Electron Microscopy*). Se utilizó un microscopio electrónico de barrido Phenom Pro (Phenom-World BV, Países Bajos) a un voltaje de aceleración de 10 KV y una distancia de trabajo de $2,5 \pm 0,5$ mm. Las muestras se recubrieron con una película de oro depositada por pulverización catódica con un recubridor de pulverización catódica Emitech K500X operado con argón (1 mBar) a 2,5 kV y 40 mA durante 5 min.

3.2.11.4.3. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de las PA obtenidas fueron evaluadas de acuerdo al método estándar establecido por la ASTM (del inglés, *American Standard for Testing Materials*). La norma ASTM D882 es un estándar de prueba diseñado específicamente para ensayar películas con menos de 1 mm de espesor. La prueba se realiza en un equipo de ensayo universal y consiste en someter una muestra, sostenida en ambos extremos por dos mordazas, a una fuerza de tracción. Se emplea una velocidad constante de separación de las mordazas que sostienen los extremos de la muestra de prueba (ASTM, 2003a).

En el presente trabajo de tesis, se utilizó una máquina universal Instron (EMIC 23-50) de acuerdo con el método estándar ASTM D 882-03 (ASTM, 2003a; Cheng y col., 2019). Se tomaron diez mediciones de espesor en diferentes lugares de cada muestra con un micrómetro digital (Mitutoyo, Japón) y se utilizó la media en los cálculos de tensión a la rotura (TS, del inglés *Tensile Strength*). La separación de agarre inicial y velocidad de la cruceta se establecieron en 50 mm y 20 mm/min, respectivamente. Se analizaron diez tiras preparadas a partir de cada película. A partir del ensayo se obtuvieron los parámetros TS, deformación a la rotura (EB, del inglés *Elongation at Break*) y el módulo elástico (EM, del inglés *Elastic Modulus*). TS se considera la máxima resistencia a la tracción que puede soportar una película, EB la capacidad de la película para estirarse antes de romperse y EM, también conocido como módulo de Young, es una medida de elasticidad de la película (ASTM, 2003a).

3.2.11.4.4. Análisis termogravimétrico (TGA)

Los procesos de degradación térmica de las PA se investigaron mediante un análisis termogravimétrico (TGA, del inglés *Thermogravimetric analysis*). Se utilizó un equipo TGA Q500 (TA Instrument, EE. UU.). En una cubeta de platino se colocaron entre 7 y 10 mg de cada muestra y se calentaron de 30° a 700 °C en atmósfera inerte mantenida mediante la inyección de nitrógeno a un caudal de 35 mL/min, con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Los resultados de las mediciones de TGA se presentaron gráficamente en una curva TGA en la que se representó la masa de la muestra (Peso, %) en función de la temperatura (°C). Además, para determinar la velocidad con la que varió la masa durante el calentamiento, se calculó la primera derivada de la curva TGA (%/°C) y se graficó respecto a la temperatura (°C).

3.2.11.4.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El comportamiento térmico de las PA se investigó por DSC (del inglés, *Differential Scanning Calorimetry*), utilizando un calorímetro diferencial de barrido DSC-Q2000 (TA-Instruments, EE. UU.). Se pesaron muestras de aproximadamente 10 ± 1 mg y se sellaron herméticamente en cápsulas de aluminio. A continuación, se calentaron en el rango de -50 a 200°C a una velocidad de 10 °C/min bajo atmósfera de nitrógeno (50 mL/min). Los resultados se obtuvieron gráficamente en una curva que representó el cambio en el flujo de calor (mW) en función de la temperatura (°C). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.2.11.4.6. Adsorción de agua (AA)

La AA (% m/m) se determinó según el procedimiento descrito por [Erben y col. \(2019\)](#). Las PA se almacenaron durante 72 h en desecadores con HR controlada de 60, 75 y 85 %. La HR de cada desecador fueron obtenidas utilizando soluciones acuosas de glicerol, variando la concentración del mismo (72%, 58% y 44% g de glicerol/100 mL de agua). La prueba se llevó a cabo a 25 °C y 1 atm. El agua adsorbida se calculó aplicando la [Ec. \(14\)](#):

$$AA(\%) = \frac{(m_0 - m_t)}{m_0} \times 100 \quad \text{Ecuación 14}$$

Donde m_0 es la masa inicial y m_t es la masa final en un tiempo dado (t).

3.2.11.4.7. Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

La permeabilidad al vapor de agua (WVP, del inglés *water vapor permeability*) de las PA se determinó de acuerdo con la norma ASTM E398-03 ([ASTM, 2003b](#); [Mendes y col., 2019](#)) utilizando un equipo Permatran W 1/50G (Mocon Inc., EE. UU.). Este método de prueba evalúa la dinámica de la tasa de transferencia de vapor de agua a través de un material de barrera flexible. Las muestras se colocaron entre dos cámaras, una de HR alta (40%) y la otra de HR baja (10%). Luego las cámaras se acondicionaron y aislaron, y a continuación se midió la velocidad con la que aumentó la humedad dentro de la cámara de baja HR en un intervalo de tiempo predeterminado. Esta velocidad se comparó con la velocidad de una muestra patrón (calibrada gravimétricamente) y se determinó la velocidad de transmisión de

vapor de agua (WVTR, del inglés *water vapor transmission rate*). Luego, la WVP (g mm/m² h KPa) se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$WVP = \frac{WVTR \cdot \delta}{\Delta P} \quad \text{Ecuación 15}$$

Donde δ es el espesor de la PC (mm), WVTR es la velocidad de transmisión de vapor de agua (g/m² h), y ΔP representa la diferencia de presión de vapor entre las dos caras de la PA: $\Delta P = S(R_1 - R_2)$; S es la presión de vapor saturado a 25 °C (3,10 kPa), R1 es la HR del lado húmedo de la cámara (40%), R2 es la HR del lado seco de la cámara (10%). Las pruebas se realizaron por triplicado.

3.2.11.5. Evaluación de la actividad antifúngica de las PA en pan de molde

El objetivo de esta prueba fue evaluar la eficacia antifúngica de las PA de PCH_{5-11,4}-CA contra la flora fúngica contaminante naturalmente presente en panes de molde sin conservantes. Los mismos fueron adquiridos en una panadería local (Panificadora Perez, Santa Fe, Argentina). Se cortaron en rodajas de 4,5x5 cm (incluyendo la corteza y la miga) del mismo espesor (~1,5 cm) y se colocaron entre 2 placas de Petri conteniendo PA control (PCH_{5-11,4}) y PCH_{5-11,4}-CA. Luego, se envasaron en bolsas plásticas y se almacenaron a 25 °C durante 30 días. Como muestra testigo, se incluyó una rodaja de pan entre 2 cajas de Petri sin PA. Se realizó un recuento de mohos y levaduras a los 0, 7, 15 y 30 días de almacenamiento. Las pruebas se realizaron por triplicado (3 rodajas por sistema). Para ello se tomaron 10 g de cada rodaja de pan y se diluyeron en 90 mL de agua peptonada al 0,1% m/v. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas (10⁻² a 10⁻⁸), y se sembró en profundidad 1 mL en MEA. Las placas se incubaron a 25 °C durante 5 días y el recuento se expresó como UFC/g.

3.2.11.6. Análisis del contenido de CA liberados en las PA

El contenido de CA liberado en las PA luego del período de almacenamiento con las muestras de pan (sección 3.2.11.5) se determinó de acuerdo al procedimiento descrito por Li y col. (2020). La extracción de los CA de las PA se realizó con acetato de etilo. Para ello, las PC expuestas a cada rodaja de pan se mezclaron con un volumen de acetato de etilo en relación 1:10 y se agitaron durante 24 h a 25 °C. Luego, el extracto se filtró y diluyó para medir la absorbancia a 275 nm utilizando un espectrofotómetro UV-visible (Lambda 20,

Perkin-Elmer, EE. UU.). Como control, se evaluaron PA formadas por PCH_{5-11,4}, sin CA. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

3.2.11.7. Análisis sensorial de los panes almacenados con PA

El impacto de las PA sobre las características sensoriales de rodajas de pan de molde fue analizado mediante un ensayo de aceptabilidad con consumidores. Se reclutaron un total de 80 consumidores en función de su consumo de pan (al menos dos veces por semana), disponibilidad e interés en participar. Los participantes tenían entre 18 y 65 años, siendo el 56% mujeres de la ciudad de Santa Fe.

Los consumidores probaron 3 muestras de pan, las cuales fueron almacenadas durante 10 días a temperatura ambiente en contacto con PA de PCH_{5-11,4}-CAR, PCH_{5-11,4}-TIM y sin PA (control). Las muestras fueron evaluadas en ese período debido al impacto negativo que tiene el proceso de envejecimiento en la aceptabilidad del pan (Gámbaro y col., 2004; Giménez y col., 2007). Las muestras se entregaron en porciones de 30 g (incluyendo la corteza y la miga) y se sirvieron a 24 °C. Cada muestra de pan se codificó con números aleatorios de 3 dígitos. Las muestras se entregaron al azar para minimizar cualquier sesgo sensorial y se utilizó agua para enjuagar la boca después de probar cada una de ellas.

Los participantes evaluaron la aceptabilidad global de los panes utilizando una escala hedónica horizontal en la que 9=me gusta muchísimo; 8=me gusta mucho; 7=me gusta moderadamente; 6=me gusta un poco; 5=ni me gusta ni me disgusta; 4=me desagrada levemente; 3=me desagrada moderadamente; 2=me disgusta mucho; y 1=me disgusta extremadamente (Ares y col., 2017).

3.2.12. Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas se determinaron mediante análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software StatGraphics Plus 3.0. Para esto, se aplicó el método de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher a un nivel de confianza del 95%.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Aislamiento y recuento total de hongos filamentosos

La exposición de las muestras de pan a temperatura ambiente y en diferentes ambientes (incluida la planta en donde fueron elaborados), produjo la contaminación de las mismas con hongos filamentosos (Fig. 19). El objetivo, en esta primer parte del presente trabajo de tesis, fue obtener información sobre la ecología fúngica que caracteriza a este tipo de producto elaborado principalmente a base de harina de trigo, para luego optimizar el desarrollo de nanocomplejos antifúngicos.



Figura 19. Panes de molde almacenados en la Planta de Panificación del Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA-FIQ-UNL) durante 10 días y a temperatura ambiente.

La razón por la cual los hongos son importantes organismos de deterioro del pan, es debido a que esta matriz alimenticia posee un contenido de humedad relativamente alto (alrededor del 40%), a_w de 0,94-0,97 y un pH de aproximadamente 6. Estas propiedades favorecen la germinación y el crecimiento de una amplia gama de mohos que contaminan el producto durante o después de la producción (Magan y col., 2012).

El recuento total de hongos filamentosos aislados a partir de cada muestra de pan de molde almacenada durante 10 días a temperatura ambiente se indica en la Tabla 10. Tal como se observa, los valores de recuento total se encontraron en el rango de 10^7 - 10^9 UFC/g. Trabajos reportados por otros autores, indicaron valores similares, obteniendo recuentos superiores a 10^4 UFC/g. En todos los casos se observó, además, un incremento gradual de los valores de recuento con el tiempo de almacenamiento (Latou y col., 2010; Passarinho y col., 2014; Suwanamornlert y col., 2020). La temperatura de almacenamiento, estación del año (principalmente en verano), condiciones higiénico-sanitarias del ambiente y el tiempo de exposición a dichas condiciones son factores relevantes que podrían influir en la carga fúngica. La mayor parte de la contaminación se produce a partir de las esporas fúngicas que se

encuentran en el ambiente y que son transportadas por el aire (Dos Santos y col., 2016; Garcia y Copetti, 2019; Magan y col., 2012).

Tabla 10. Recuento total expresado en UFC/g, correspondiente a cada muestra de pan de molde almacenada durante 10 días a temperatura ambiente.

| Muestra de pan (*) | Recuento total (UFC/g) |
|--------------------|------------------------|
| I | 3×10^7 |
| II | 4×10^8 |
| III | 1×10^8 |
| IV | 1×10^9 |
| V | 7×10^8 |
| VI | 7×10^7 |
| VII | 3×10^8 |
| VIII | 4×10^8 |

(*) Piezas de pan de molde de ~200 g.

4.2. Identificación de hongos filamentosos aislados

Los hongos filamentosos aislados anteriormente se identificaron siguiendo la metodología de Pitt y Hocking (2009). Se encontró que todos los mohos contaminantes de pan pertenecieron a los filos Ascomycota y Mucoromycota. Estos mohos correspondieron a los géneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Rhizopus*. Consistentemente, Legan (1993), Císarová y col. (2021) y Pitt y Hocking (2009) señalaron a estos géneros como principales causantes de contaminación fúngica en pan.

En la Tabla 11 se indican las especies de hongos filamentosos aisladas a partir de cada una de las muestras de pan. Se aislaron e identificaron 4 especies pertenecientes al género *Aspergillus* (*A. candidus*, *A. niger*, *A. ochraceus* y *A. parasiticus*), 1 especie del género *Cladosporium* (*C. cladosporioides*), 1 especie del género *Eurotium* (*E. chevalieri*), 1 especie del género *Fusarium* (*F. oxysporum*), 4 especies del género *Penicillium* (*P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum* y *P. corylophilum*) y 2 especies del género *Rhizopus* (*R. oryzae* y

R. stolonifer). Las cepas de *Penicillium* spp. halladas en los panes II y III no se identificaron a nivel de especie debido a que no pudieron ser aisladas adecuadamente.

Tabla 11. Especies de hongos filamentosos aisladas a partir de las muestras de pan de molde.

| Muestra de pan | Especie |
|-----------------------|-------------------------------------|
| I | <i>Aspergillus niger</i> |
| | <i>Eurotium chevalieri</i> |
| | <i>Fusarium oxysporum</i> |
| | <i>Penicillium corylophilum</i> |
| II | <i>Aspergillus niger</i> |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> |
| | <i>Aspergillus parasiticus</i> |
| | <i>Penicillium</i> spp. |
| | <i>Rhizopus oryzae</i> |
| III | <i>Aspergillus niger</i> |
| | <i>Penicillium</i> spp. |
| | <i>Rhizopus stolonifer</i> |
| IV | <i>Penicillium chrysogenum</i> |
| V | <i>Penicillium chrysogenum</i> |
| VI | <i>Aspergillus candidus</i> |
| | <i>Cladosporium cladosporioides</i> |
| | <i>Penicillium brevicompactum</i> |
| VII | <i>Aspergillus niger</i> |
| | <i>Penicillium brevicompactum</i> |
| | <i>Penicillium citrinum</i> |
| VIII | <i>Aspergillus niger</i> |
| | <i>Penicillium brevicompactum</i> |

Las características macroscópicas y microscópicas de las colonias observadas se describen y presentan en el [Apéndice \(Tabla A1-A13\)](#).

4.3. Determinación de Ab% y Fr% de hongos filamentosos identificados

Los recuentos obtenidos de cada género aislado a partir de las muestras de pan, se especifican a continuación en la [Tabla 12](#).

Tabla 12. Recuento de cada género de hongo filamentoso aislado por cada muestra de pan de molde, expresado en UFC/g.

| Muestra de pan | Recuento por género (UFC/g) | | | | | |
|----------------------|-----------------------------|---------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | <i>Aspergillus</i> | <i>Cladosporium</i> | <i>Eurotium</i> | <i>Fusarium</i> | <i>Penicillium</i> | <i>Rhizopus</i> |
| I | 1×10 ⁶ | – | 3×10 ⁶ | 8×10 ⁵ | 3×10 ⁷ | – |
| II | 3×10 ⁸ | – | – | – | 1×10 ⁷ | 1×10 ⁸ |
| III | 1×10 ⁷ | – | – | – | 2×10 ⁷ | 1×10 ⁸ |
| IV | – | – | – | – | 1×10 ⁹ | – |
| V | – | – | – | – | 7×10 ⁸ | – |
| VI | 2×10 ⁷ | 5×10 ⁷ | – | – | 3×10 ⁶ | – |
| VII | 4×10 ⁶ | – | – | – | 3×10 ⁸ | – |
| VIII | 4×10 ⁶ | – | – | – | 4×10 ⁸ | – |

Luego, en la [Tabla 13](#) se observa el recuento por cada género aislado a partir de las muestras de pan de molde y su valor de Ab %. Como se observa, el género *Penicillium* exhibió la mayor Ab %, alcanzando un valor de 80 %, aproximadamente. Luego, los géneros *Aspergillus* y *Rhizopus* presentaron valores de Ab % considerablemente menores (11,13 y 6,60 %, respectivamente). En la denominación “otros” se incluyen los mohos de aparición esporádica, con una Ab % menor o igual a 1,72 % (*Cladosporium*, *Eurotium* y *Fusarium*).

Por otra parte, en la [Tabla 14](#) se observa el número de veces que aparecieron los géneros en las muestras de pan de molde y la Fr % de cada uno de ellos.

Tabla 13. Recuento y Ab % de cada género de hongo filamentoso aislado a partir de las muestras de pan de molde.

| | Género de hongo filamentoso | | | | | |
|------------------------------------|-----------------------------|---------------------|-----------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| | <i>Aspergillus</i> | <i>Cladosporium</i> | <i>Eurotium</i> | <i>Fusarium</i> | <i>Penicillium</i> | <i>Rhizopus</i> |
| Recuento por género (UFC/g) | 3×10^8 | 5×10^7 | 3×10^6 | 8×10^5 | 2×10^9 | 2×10^8 |
| Ab % (%) | 11,13 | 1,72 | 0,10 | 0,02 | 80,42 | 6,60 |

* Abundancia Porcentual (Ab %) = (n° UFC del género / n° UFC totales) x 100

* n° UFC totales = 3×10^9 UFC/g

Tabla 14. Número de veces que apareció cada género en las muestras de pan de molde y su Frecuencia Relativa Porcentual (Fr %).

| | Género de hongo filamentoso | | | | | |
|-----------------|-----------------------------|---------------------|-----------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| | <i>Aspergillus</i> | <i>Cladosporium</i> | <i>Eurotium</i> | <i>Fusarium</i> | <i>Penicillium</i> | <i>Rhizopus</i> |
| n | 6 | 1 | 1 | 1 | 8 | 2 |
| Fr % (%) | 75,0 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 100,0 | 25,0 |

* n: número de veces que aparece el moho

* Frecuencia Relativa Porcentual (Fr %) = (n° de veces que aparece el moho / n° de muestras evaluadas) x 100

El género *Penicillium* presentó una Fr % de 100%, es decir, fue aislado a partir del total de las muestras de pan de molde evaluadas. El género *Aspergillus* obtuvo una Fr % de 75%, por lo que resultó el segundo género más frecuente entre las muestras evaluadas, seguido por *Rhizopus* con una Fr % de 25%. En la denominación “otros” se incluyen los mohos de aparición esporádica, con una Fr % de 12,5% (*Cladosporium*, *Eurotium* y *Fusarium*).

Los resultados, fueron consistentes con los hallados por Císarová y col. (2021) quienes realizaron 195 aislamientos a partir de 8 muestras de pan adquiridas en un comercio local, las cuales fueron almacenadas en bolsas plásticas durante 3 días a 25°C. Se encontraron especies del género *Penicillium* con una Fr % de 100%. En segundo lugar, especies del género *Aspergillus* y *Cladosporium* con una Fr % de 87,5% y 75%, respectivamente. Luego, los

géneros *Eurotium* y *Epicoccum* se hallaron con una Fr % de 62,5%, para ambos. Finalmente para los géneros *Mycelia sterilia*, *Trichoderma*, *Rhizopus* y *Alternaria* la Fr % fue inferior al 40%. Por otro lado, los resultados de las investigaciones reportadas por Legan (1993) también presentaron una cierta concordancia con los del presente trabajo, teniendo en consideración la gran diferencia en el número de muestras evaluadas que existió entre un trabajo y el otro. Estos autores evaluaron muestras de pan provistas por 46 panaderías del Reino Unido en distintos meses del año, las cuales fueron almacenadas a 22 °C en bolsas de plástico selladas, durante 5-6 días hasta el crecimiento de colonias fúngicas. El género *Penicillium* estuvo presente en el 90-100 % de las muestras de pan (dependiendo del mes del año), mientras que los géneros *Aspergillus* y *Cladosporium* se encontraron en el 50 % de las muestras de pan, aproximadamente.

Los elevados valores de Fr % de las especies de *Penicillium* y *Aspergillus* en pan se deben, en parte, a la capacidad que poseen estos mohos de crecer bajo un amplio rango de temperatura y actividad acuosa. El género *Penicillium*, a diferencia de *Aspergillus*, tiene la capacidad de desarrollarse en un amplio rango de temperaturas (5°-30°C) y posee una gran diversidad de especies capaces de producir cantidades abundantes de conidios los cuales podrían ser fácilmente transportados por el aire y permanecer suspendidos en los ambientes (Magan, 2007; Pitt y Hocking, 2009). Por otro lado, debido a su naturaleza xerofílica, ambos géneros forman parte de la flora contaminante natural de los cereales y sus harinas, en donde las esporas permanecen viables (Pitt y Hocking, 2009). Al ser utilizados como materia prima de productos panificados, las esporas están dispersas en el aire y el ambiente en donde se elaboran, equipos y superficies. Si bien, durante el proceso de cocción se eliminan, las esporas dispersas en el aire del ambiente de elaboración sirven como fuente de contaminación cuando se depositan en la superficie de los productos recién horneados durante la etapa de enfriamiento (García y col., 2019a; Legan, 1993).

Para continuar con la evaluación de la actividad inhibitoria de los CA, y considerando los resultados expuestos anteriormente, se seleccionaron cinco especies de hongos filamentosos. En primer lugar, los elevados valores de Ab % y Fr % del género *Penicillium* en pan, exhibidos en este trabajo y en estudios previos mencionados recientemente, tornaron indispensable la selección de una especie perteneciente a este género para futuros análisis. Además, para poder comparar el comportamiento de distintas especies de un mismo género, se encontró conveniente la selección de dos cepas del género *Penicillium*. Una de las principales diferencias que existen entre las especies de este género es el número de verticilos del pincel, por lo tanto, la elección se basó en ello. Se analizaron, entonces, las características

microscópicas de las cepas aisladas e identificadas a partir de las muestras de pan de molde y se observó que *P. brevicompactum* y *P. chrysogenum* son especies terveticiladas, y *P. citrinum* y *P. corylophilum*, biverticiladas. Luego, se determinaron los valores de Fr % de estas cuatro cepas, evaluando su presencia o ausencia en cada muestra de pan de molde y utilizando la ecuación correspondiente (Tabla 15 y 16), con el objetivo de seleccionar la más frecuente de cada grupo. Por un lado, ambas especies biverticiladas presentaron el mismo valor de Fr % (12,5 %), de modo que se optó por *P. corylophilum* para continuar con los ensayos microbiológicos debido a que un mayor número de trabajos referidos a productos panificados han reportado su aislamiento en relación con *P. citrinum*, entre ellos los de Nielsen y Rios (2000), Lund y col. (1996) y Suhr y Nielsen (2003). En segundo lugar, *P. brevicompactum* presentó mayor Fr % que *P. chrysogenum*. Sin embargo, autores tales como Reiss (1977), Girardin (1997) y García-Estrada y col. (2011) han señalado a esta última como una especie capaz de producir micotoxinas en diferentes tipos de pan elaborados con harina de trigo y centeno, por lo tanto, fue seleccionada para evaluar los efectos inhibitorios de los CA.

Tabla 15. Especies de *Penicillium* aisladas a partir de cada muestra de pan de molde.

| Muestra de pan | Especie de hongo filamentoso | | | |
|----------------------|------------------------------|-----------------------|--------------------|------------------------|
| | <i>P. brevicompactum</i> | <i>P. chrysogenum</i> | <i>P. citrinum</i> | <i>P. corylophilum</i> |
| I | – | – | – | + |
| II | – | – | – | – |
| III | – | – | – | – |
| IV | – | + | – | – |
| V | – | + | – | – |
| VI | + | – | – | – |
| VII | + | – | + | – |
| VIII | + | – | – | – |

* (+): Presencia; (-): Ausencia

Tabla 16. Número de veces que apareció cada especie de *Penicillium* en las muestras de pan de molde y su Frecuencia Relativa Porcentual (Fr %).

| | Especie de hongo filamentoso | | | |
|---------------------|------------------------------|-----------------------|--------------------|------------------------|
| | <i>P. brevicompactum</i> | <i>P. chrysogenum</i> | <i>P. citrinum</i> | <i>P. corylophilum</i> |
| n | 3 | 2 | 1 | 1 |
| Fr % (%) | 37,5 | 25 | 12,5 | 12,5 |

* n: número de veces que aparece el moho

* Frecuencia Relativa Porcentual (Fr %) = (n° de veces que aparece el moho / n° de muestras evaluadas) x 100

Por otro lado, el género *Aspergillus* también evidenció altos valores de Ab % y Fr % en pan. Este resultado fue consistente con los de Paramasivan y Kalyanasundaram (1986), Legan (1993) y Císarová y col. (2021), quienes reportaron elevada Fr % por parte de *Aspergillus* e indicaron que, incluso, dicho valor podría aumentar en climas más cálidos. De este modo, se dispuso la selección de *A. niger* en representación del género *Aspergillus* en futuros ensayos. El motivo principal de esta elección fue la existencia de numerosos trabajos, entre los cuales se encuentran los de Frisón y col. (2015), Balaguer y col. (2013), y Sun y col. (2020), que indican a esta especie como la más resistente frente a ciertos factores que podrían inhibir el desarrollo fúngico, entre un grupo de mohos evaluados. Esta característica convierte a *A. niger* en un óptimo modelo de estudio, ya que cualquier efecto observado en esta especie debido a la exposición a un factor externo podría potencialmente extrapolarse a otra no evaluada, e incluso permitiría suponer consecuencias más drásticas sobre esta última.

Por otra parte, se determinó la Fr % de cada especie del género *Aspergillus* hallada en las muestras de pan y se observó que *A. niger* fue significativamente más “frecuente” que el resto (Tabla 17 y 18). Para ello fue necesario evaluar la presencia o ausencia de las especies en cada muestra de pan de molde y utilizar la ecuación correspondiente, como se indicó anteriormente.

Como se discutió anteriormente, *Rhizopus* obtuvo el tercer lugar en términos de Ab % y Fr %, motivo por el cual se lo consideró un importante moho contaminante de pan, como han sugerido Banwart (2012) y Saranraj y Geetha (2012), entre otros. Las especies aisladas a partir de las muestras de pan pertenecientes a este género fueron *R. oryzae* y *R. stolonifer*. Como se observa en la Tabla 11, cada una de ellas fue hallada en una única muestra de pan, por lo que ambas presentaron la misma Fr % (12,5 %). Sin embargo, se seleccionó a *R.*

stolonifer para evaluar la actividad inhibitoria de los CA por ser reportada más frecuentemente que *R. oryzae* en pan y otros productos panificados, tal como mencionaron Chakre y col. (1984) y Göcmen y Sahin (1997).

Tabla 17. Especies de *Aspergillus* aisladas a partir de cada muestra de pan de molde.

| Muestra de pan | Especie de hongo filamentoso | | | |
|----------------|------------------------------|-----------------|---------------------|-----------------------|
| | <i>A. candidus</i> | <i>A. niger</i> | <i>A. ochraceus</i> | <i>A. parasiticus</i> |
| I | – | + | – | – |
| II | – | + | + | + |
| III | – | + | – | – |
| IV | – | – | – | – |
| V | – | – | – | – |
| VI | + | – | – | – |
| VII | – | + | – | – |
| VIII | – | + | – | – |

* (+): Presencia; (–): Ausencia

Tabla 18. Número de veces que apareció cada especie de *Aspergillus* en las muestras de pan de molde y su Frecuencia Relativa Porcentual (Fr %).

| | Especie de hongo filamentoso | | | |
|---------------------|------------------------------|-----------------|---------------------|-----------------------|
| | <i>A. candidus</i> | <i>A. niger</i> | <i>A. ochraceus</i> | <i>A. parasiticus</i> |
| n | 1 | 5 | 1 | 1 |
| Fr % (%) | 12,5 | 62,5 | 12,5 | 12,5 |

* n: número de veces que aparece el moho

* Frecuencia Relativa Porcentual (Fr %) = (nº de veces que aparece el moho / nº de muestras evaluadas) x 100

Por último, se analizó el grupo de hongos filamentosos de aparición esporádica para determinar si correspondía evaluar el efecto inhibitorio de los CA frente a alguno de ellos. Legan (1993) ha reportado que los géneros *Cladosporium* y *Eurotium* no son principales

contaminantes de pan, sino que aparecen ocasionalmente en dicho alimento, al igual que *Alternaria*, *Endomyces*, *Monilia*, *Mucor* y otros, y no son importantes productores de micotoxinas. Por otro lado, Bottalico y Perrone (2002), De Koe y Juodeikiene (2012), De Ruyck y col. (2015), Foroud y Eudes (2009) y Morcia y col. (2017) han coincidido en que el género *Fusarium* es frecuentemente hallado en cereales utilizados para obtener harina, materia prima de los productos panificados, y es uno de los principales géneros productores de micotoxinas. Por este motivo, se determinó que *Fusarium* era el género más relevante, principalmente en términos de salud humana, y se seleccionó a *F. oxysporum* para evaluar el efecto inhibitorio de los CA.

En la Tabla 19 se detalla la taxonomía correspondiente a cada una de las 5 especies seleccionadas para continuar con los ensayos microbiológicos, la cual fue extraída de la base de datos de NCBC (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>).

Tabla 19. Taxonomía de las especies seleccionadas.

| | | | | |
|-------------------|--------------------|---------------------|-------------------------------------------------|----------------------|
| Superreino | Eukaryota | Eukaryota | Eukaryota | Eukaryota |
| Reino | Fungi | Fungi | Fungi | Fungi |
| Subreino | Dikarya | Dikarya | Dikarya | |
| Filo | Ascomycota | Ascomycota | Ascomycota | Mucoromycota |
| Subfilo | Pezizomycotina | Pezizomycotina | Pezizomycotina | Mucoromycotina |
| Clase | Eurotiomycetes | Sordariomycetes | Eurotiomycetes | |
| Subclase | Eurotiomycetidae | Hypocreomycetidae | Eurotiomycetidae | |
| Orden | Eurotiales | Hypocreales | Eurotiales | Mucorales |
| Suborden | | | | Mucorineae |
| Familia | Aspergillaceae | Nectriaceae | Aspergillaceae | Rhizopodaceae |
| Género | <i>Aspergillus</i> | <i>Fusarium</i> | <i>Penicillium</i> | <i>Rhizopus</i> |
| Especie | <i>A. niger</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>P. chrysogenum</i> <i>P. corylophilum</i> | <i>R. stolonifer</i> |

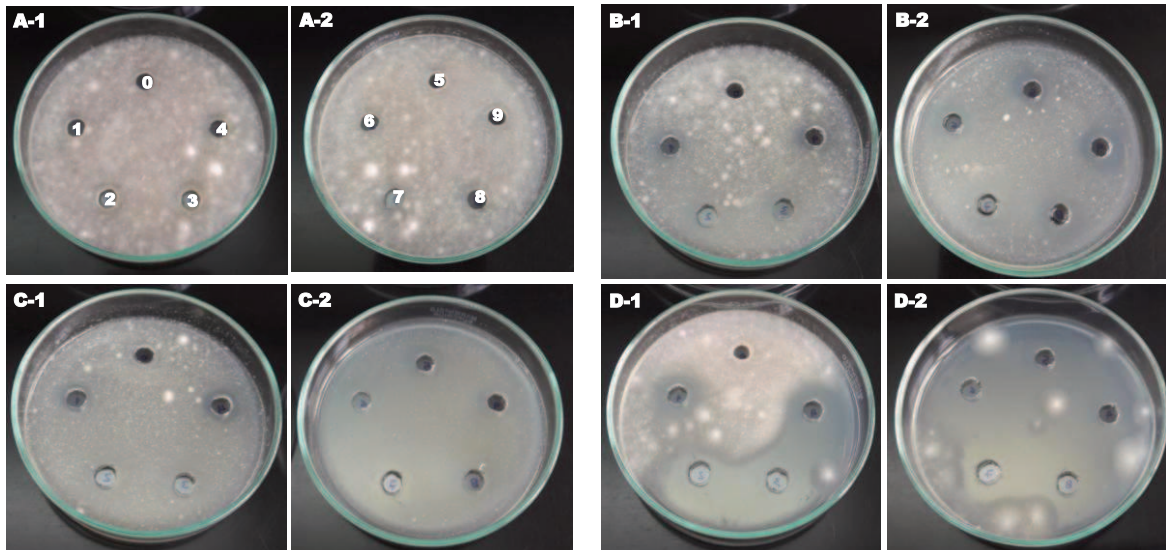
4.4. Evaluación preliminar de la actividad inhibitoria de los CA

Las 5 especies de hongos aisladas en la sección anterior, fueron utilizadas para evaluar la actividad inhibitoria de los CA disueltos en etanol mediante el método de difusión en agar con pocillo. Esta metodología resultó ser adecuada como evaluación inicial, ya que su enfoque semi-cuantitativo permitió una caracterización rápida, sencilla y general de la susceptibilidad de los mohos frente a los CA.

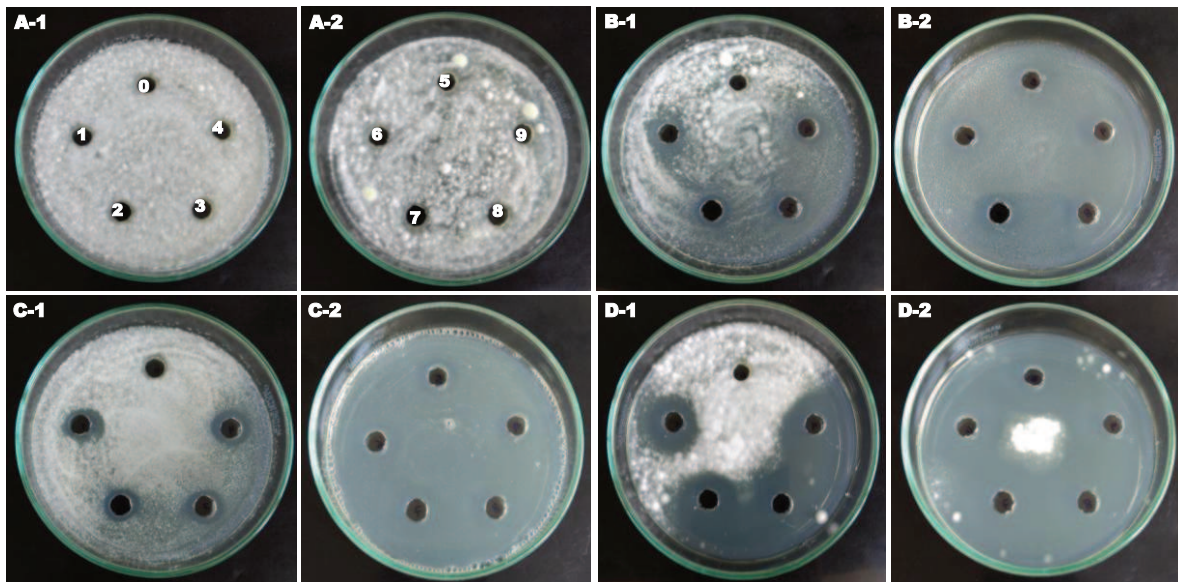
Los resultados obtenidos se muestran en la [Fig. 20](#). Los compuestos CAR, TIM y CIN produjeron halos de inhibición en todas las especies fúngicas. Mientras que para las soluciones de LIM no se observaron zonas de inhibición en todo el rango de concentraciones evaluado ([Fig. 20, A1 y A2](#)).

Las diferencias observadas en la eficacia antifúngica de estos CA podría deberse principalmente a su naturaleza estructural. En el caso de LIM, como se indicó anteriormente ([sección 1.4.2.](#)), se encuentra dentro del grupo de los terpenos, los cuales poseen escasa actividad antimicrobiana. Por otro lado, tal como se observa en la [Tabla 4](#), las CMI para este compuesto son muy superiores que las de CAR, TIM y CIN ([Tabla 1, 2 y 3](#)). La presencia de grupos activos, como el grupo –OH en CAR y TIM, y en el caso de CIN, grupos aldehídos, doble enlaces conjugados y cadenas hidrocarbonadas largas unidas a un anillo aromático, son determinantes en la actividad inhibitoria de estos CA ([Cheng y col., 2008](#); [Konuk y Ergüden, 2020](#); [Sun y col., 2020](#)).

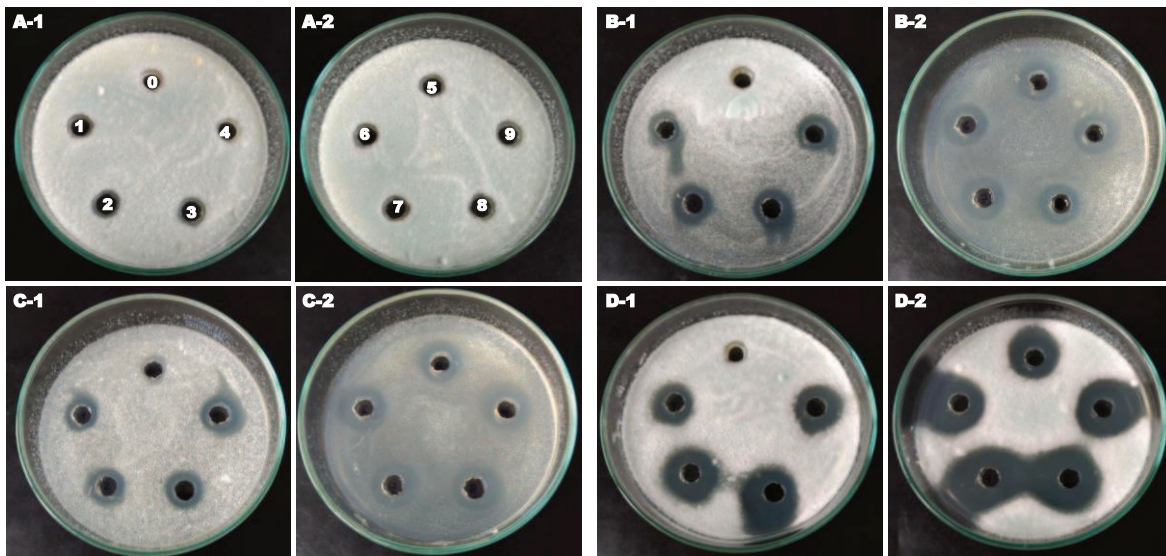
Por otra parte, a 0 mg/mL de CA (pocillo N° 0) no se registró ningún halo de inhibición. Este resultado indicó que el etanol absoluto no tuvo efecto inhibitorio sobre estas especies de hongos en las condiciones especificadas por la metodología.



1-F.oxysporum



2-P. corylophilum



3- P. chrysogenum

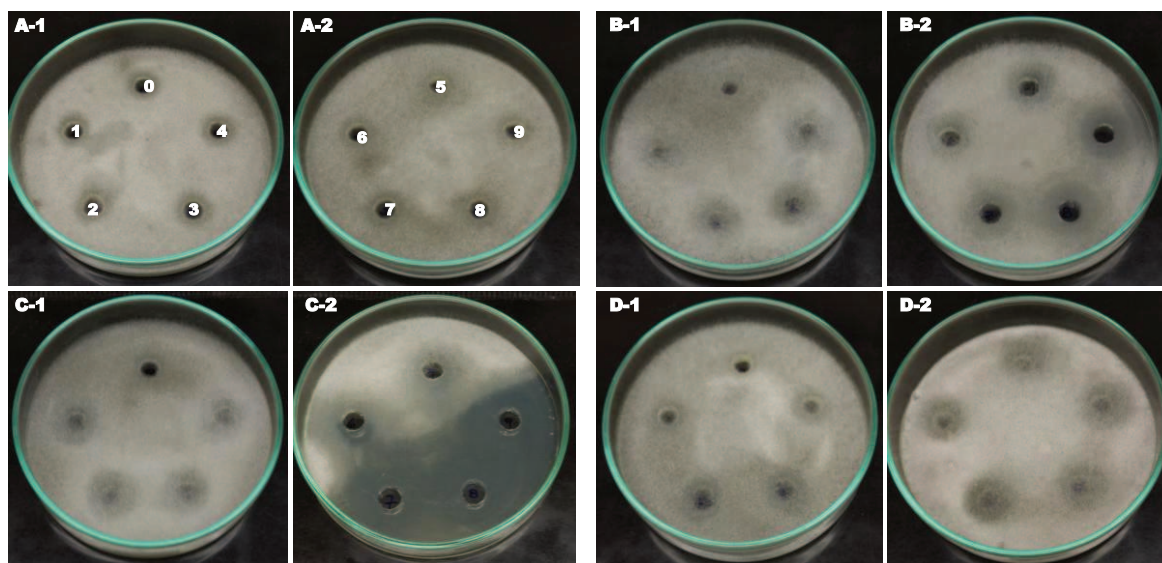
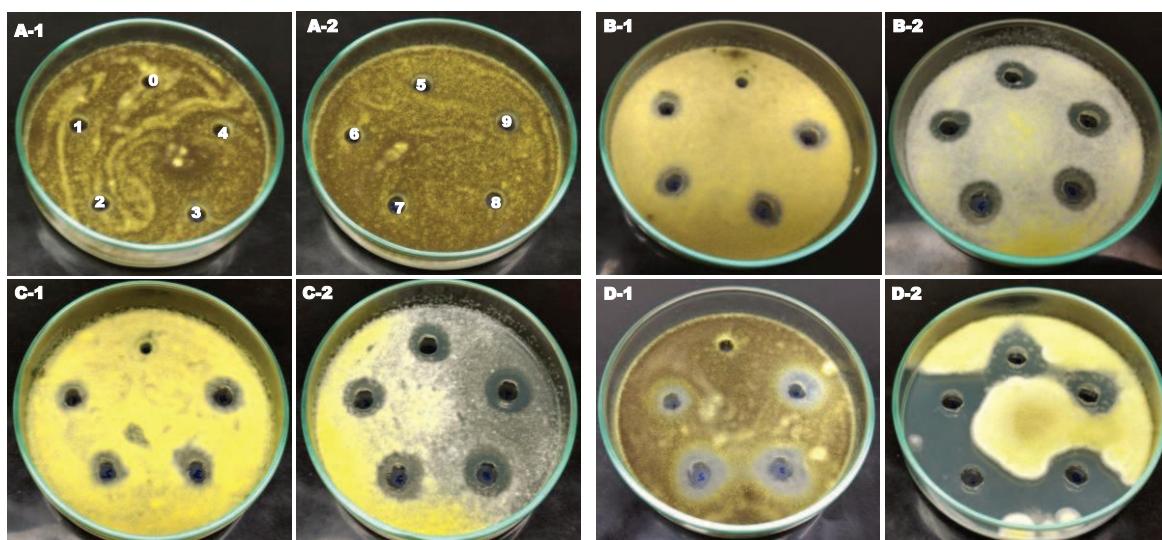
4-*R. stolonifer*5-*A. niger*

Figura 20. Placas de *F. oxysporum*, *P. corylophilum*, *P. chrysogenum*, *R. stolonifer* y *A. niger* frente a las soluciones de LIM (A-1 y A-2), CAR (B-1 y B-2), TIM (C-1 y C-2) y CIN (D-1 y D-2) en el rango de concentración 0-5 mg/mL. La numeración de los pocillos (A-1 y A-2) indican el rango de concentraciones evaluadas: 0 a 4 corresponde al rango de 0 a 3,5 mg/mL y de 5 a 9 al rango de 4 a 5 mg/mL. Condiciones: placas sembradas con 1 mL de suspensión fúngica (10^6 esporas/mL) sembrada en profundidad con 20 mL de MEA, volumen de solución etanólica de CA por pocillo 65 μ L, incubación a 25°C por 72 horas.

Las medidas de los diámetros promedio y desviaciones estándar de los halos de inhibición obtenidos para CAR, TIM y CIN se observan en las [Tablas A14-A16 del Apéndice](#), respectivamente. Para poder realizar un análisis comparativo, dichos valores fueron graficados en función de la concentración de cada CA en el rango de 0 a 5 mg/mL ([Fig. 21](#)).

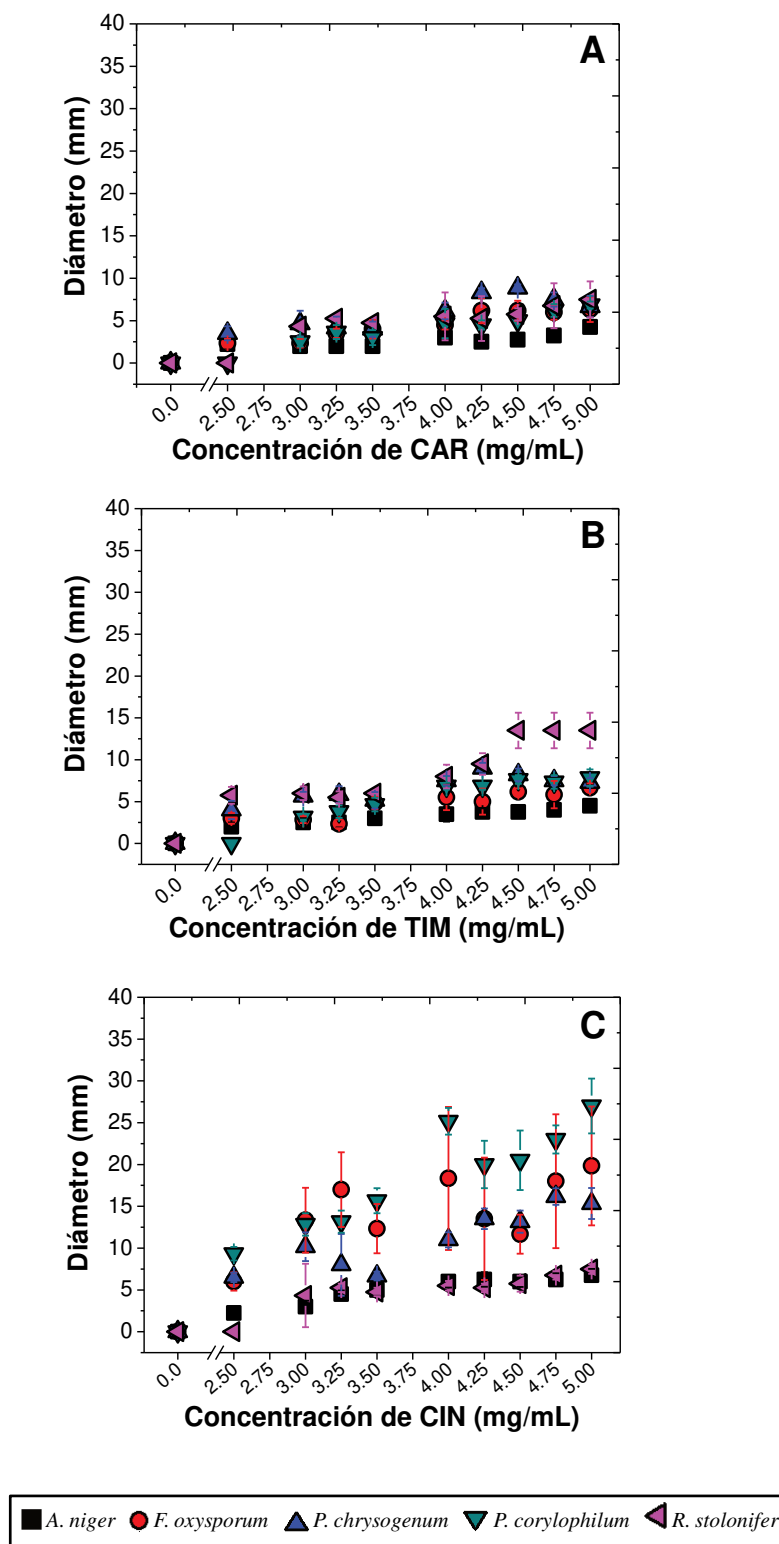


Figura 21. Diámetro de los halos de inhibición (mm) obtenidos para las 5 especies fúngicas en función de la concentración de CAR (A), TIM (B) Y CIN (C) en el rango de 0 a 5 mg/mL.

Tal como se observa, para los compuestos CAR y TIM se observó una actividad antifúngica similar (Fig. 21-A y B). La especie más resistente a estos compuestos fue *A. niger*, mientras que *R. stolonifer* fue la más sensible al compuesto TIM. Para las demás

especies, se obtuvieron halos de inhibición con diámetros similares (Tablas A14 y A15 del Apéndice). Luego, para el compuesto CIN, se obtuvieron zonas de inhibición con mayor diámetro. *A. niger* y *R. stolonifer* fueron las especies más resistentes, mientras que *P. corylophilum* exhibió la mayor sensibilidad frente a dicho compuesto (Fig. 21-C y Tabla A16 del Apéndice). El aumento en las concentraciones de todos los CA provocaron aumentos significativos ($p < 0,05$) en los diámetros de los halos de inhibición para todas las especies fúngicas examinadas (Tabla A14-16 del Apéndice).

Por otro lado, las placas que contenían las concentraciones más altas de CA (Fig. 20, B-2, C-2 y D-2), especialmente de CAR y TIM, exhibieron cambios en las características macroscópicas del césped de todas las especies fúngicas, lo que estaría indicando cierta anomalía en el desarrollo del moho. Debido a que la variación de color exhibida no se manifestó exclusivamente en las zonas próximas a cada pocillo, sino que se observó en casi todos los puntos de la placa en donde hubo desarrollo fúngico, podría considerarse un efecto provocado por la atmósfera gaseosa presente dentro de cada placa, generada por la volatilización de los compuestos.

La solubilidad de estos CA en etanol, es un parámetro que podría influir en el comportamiento observado en las placas. El coeficiente de reparto, expresado como valor Log P, es un parámetro cuantitativo que representa la solubilidad relativa de una sustancia determinada en un sistema compuesto por dos fases inmiscibles entre sí, a una temperatura específica. Generalmente una de las fases está constituida por un disolvente orgánico (octanol), que es de baja polaridad, y otra generalmente acuosa (agua o buffers) cuya polaridad es alta. Por lo tanto, el Log P es un parámetro que representa el grado de lipofilia de una sustancia (Griffin y col., 1999). En el caso de los CA, los valores de Log P de CAR (3,49), TIM (3,30) y CIN (1,90) indican que CAR y TIM presentan mayor solubilidad en solventes de baja polaridad que el compuesto CIN. Por lo tanto, el efecto observado en las placas para los compuestos CAR y TIM tendría que ver con un efecto de arrastre de los compuestos por parte del etanol generando de ese modo una atmósfera gaseosa dentro de la misma. En cambio el compuesto CIN actuaría mayoritariamente por contacto debido a su menor solubilidad en etanol (Sun y col., 2020).

A partir de los ensayos microbiológicos realizados hasta aquí, se pudo concluir que, la magnitud de actividad antifúngica dependió de la especie fúngica, la naturaleza química y de la concentración de los CA. Como se discutió anteriormente, el compuesto LIM no exhibió actividad antifúngica, mientras que la especie más resistente a los compuestos CAR, TIM y CIN en el rango de concentración de 0 a 5 mg/mL fue *A. niger* y la especie *R. stolonifer* la

más resistente al compuesto CIN. Por consiguiente, para continuar con la obtención de nanocomplejos se seleccionaron los compuestos CAR, TIM y CIN, y para evaluar su eficacia antifúngica fue seleccionado *A. niger*, el cual fue más representativo que *R. stolonifer* en términos de Ab% y Fr% en este estudio. La elección de una de las cepas más resistentes a los CA permitiría suponer que todos los efectos hallados sobre esta aparecerán en igual o mayor medida sobre las otras especies consideradas más sensibles a los CA.

4.5. Caracterización fisicoquímica y morfológica de nanopartículas PCHn

El análisis de las propiedades fisicoquímicas, bajo diferentes condiciones de pH del medio acuoso y concentración de proteínas a las que se realizó el tratamiento térmico para obtener nanopartículas PCHn, se justifica debido a estudios previos realizados en el grupo de trabajo por Sponton y col. (2015a) y Finos y col. (2021). Los mismos, evidenciaron que estos factores influyen significativamente en las propiedades fisicoquímicas de nanopartículas obtenidas a partir de OVA, entre las que se destacan la hidrofobicidad superficial, tamaño, forma, carga, propiedades funcionales, y de unión a ligando.

En la Fig. 22 se muestran los efectos del tratamiento térmico y del pH del medio acuoso sobre la IF-Trp de PCH.

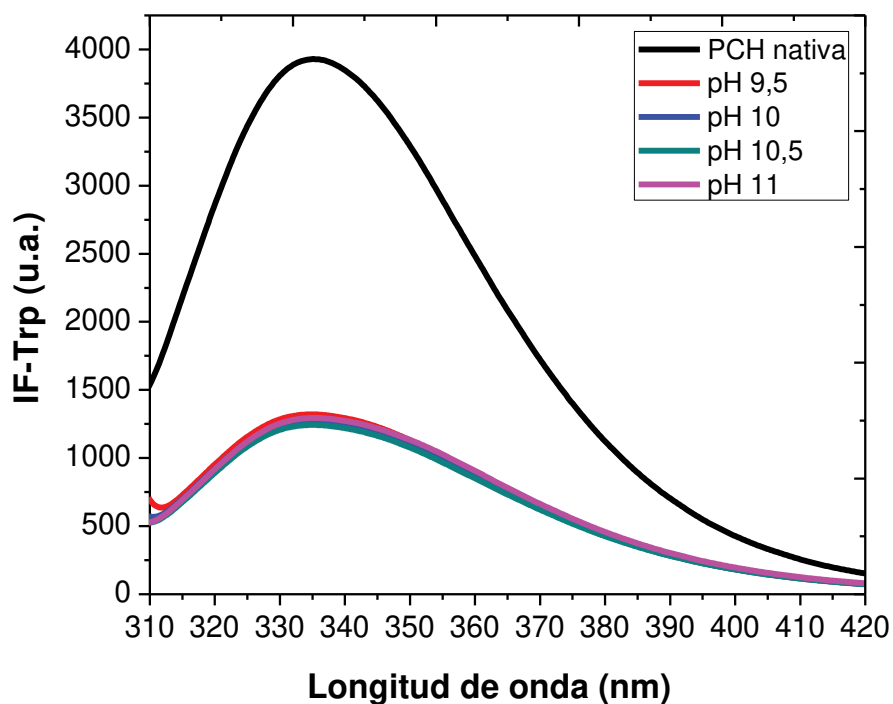


Figura 22. IF-Trp de PCH nativa y sistemas de PCH tratados térmicamente a 85 °C durante 5 min (PCHn), concentración proteica 1% m/v y pH del medio acuoso entre 9,5 y 11.

Como se observa, la IF-Trp de los sistemas a los que se les realizó el tratamiento térmico mostró una notable disminución con respecto a la IF-Trp de PCH nativa. Esto indicaría que, los residuos de Trp estarían menos disponibles para la emisión ya que se encontrarían ocluidos en las estructuras formadas. Este mecanismo, denominado *self-quenching* o apagamiento de la fluorescencia, tiene relación con la agregación que sufren las proteínas globulares debido al tratamiento térmico, y depende del pH del medio acuoso al cual se realiza el mismo (Le Maux y col., 2013; Sponton y col., 2015a).

La IF_{\max} -Trp y la λ_{\max} -Trp correspondiente a cada sistema se muestran en la Fig. 23. Tal como se observa, la magnitud del pH al que se realizó el tratamiento térmico no influyó de manera significativa sobre la IF_{\max} -Trp. Además, la λ_{\max} -Trp obtenida para todos los sistemas tampoco se vio afectada por el pH del medio acuoso.

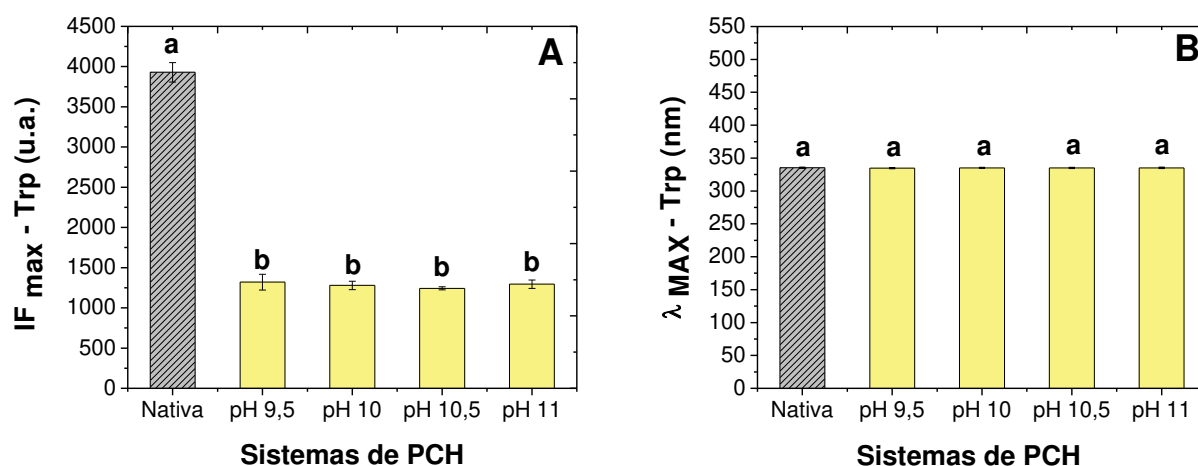


Figura 23. IF_{\max} -Trp (A) y λ_{\max} -Trp (B), de PCH nativa y sistemas de PCH tratados térmicamente a 85 °C durante 5 min (PCHn), concentración proteica 1% m/v y pH del medio acuoso entre 9,5 y 11. Los valores se expresan como media, \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos de medias ($p < 0,05$).

Las variaciones en la λ_{\max} -Trp dan idea de los cambios que acontecen dentro del medioambiente molecular del fluoróforo (Trp) (Sponton y col., 2015a). El espectro de emisión del grupo indol del Trp es altamente sensible a la polaridad del solvente. Su emisión puede ser desplazada hacia el azul (*blue shift*) si el grupo está alojado dentro de la estructura de una proteína nativa o puede desplazarse hacia longitudes de onda mayores (desplazamiento hacia el rojo, *red shift*) cuando la proteína está desplegada (Lakowicz, 2006). El hecho de que los agregados obtenidos tengan sus λ_{\max} -Trp similares a la de la proteína nativa indica que el medioambiente en el cual se encuentran estos residuos de Trp no se modificó con el

tratamiento térmico, es decir, los residuos de Trp en los agregados se encontrarían en un microambiente similar al de los Trp en la proteína nativa.

Luego, con el objetivo de evaluar la hidrofobicidad superficial de los agregados obtenidos, se realizaron experimentos de fluorescencia extrínseca. Los resultados obtenidos se observan en la Fig. 24.

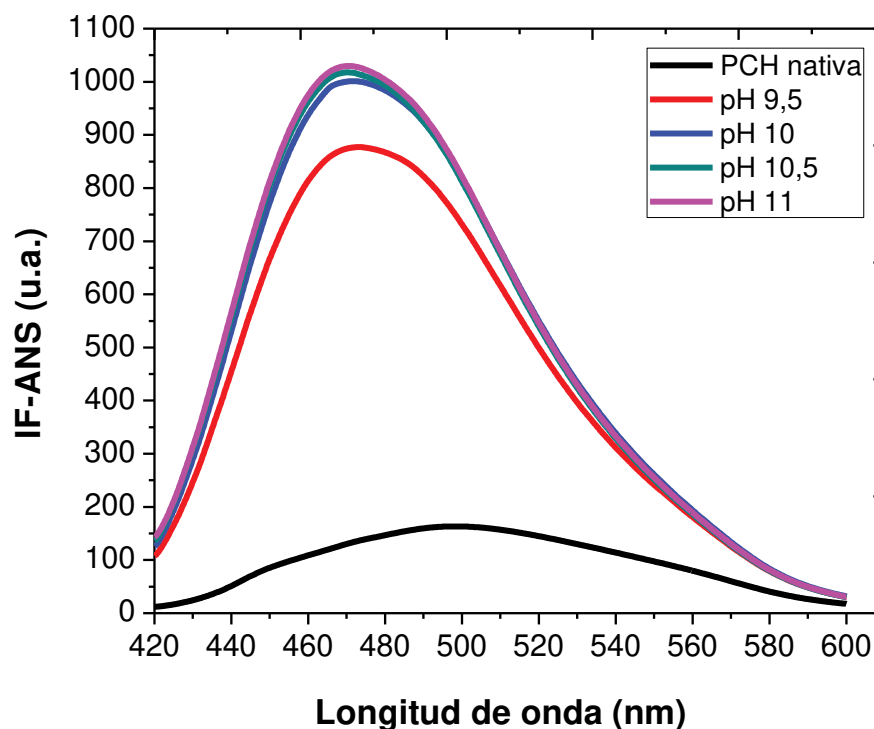


Figura 24. IF-ANS de PCH nativa y sistemas de PCH tratados térmicamente a 85 °C durante 5 min (PCHn), concentración proteica 1 % m/v y pH del medio acuoso entre 9,5 y 11.

La unión de sondas fluorescentes extrínsecas a proteínas es una herramienta para monitorear posibles cambios en la hidrofobicidad superficial de las mismas. El ANS posee afinidad por residuos hidrofóbicos superficiales de las proteínas y se une de manera no covalente, por lo que es adecuado para este tipo de evaluación (Albani, 2004). Como se observa, el tratamiento térmico ocasionó en los sistemas un gran aumento en la IF-ANS con respecto a PCH nativa, lo que indicaría un aumento en la hidrofobicidad superficial de los sistemas tratados térmicamente, posiblemente debido a una mayor exposición de sitios hidrofóbicos inicialmente ocluidos en la proteína nativa. Dicho de otra manera, el aumento de la hidrofobicidad superficial de la proteína podría deberse fundamentalmente a un desplegamiento de la misma y a una mayor exposición de sus grupos hidrofóbicos (Sponton y col., 2015a).

Para una mejor comprensión de este fenómeno, en la Fig. 25 se presenta la IF_{\max} -ANS de PCH nativa y de los sistemas de PCH tratados térmicamente a distintos valores de pH del medio acuoso. Aquí, el aumento registrado para los sistemas tratados mostró depender del pH del medio acuoso al cual se realizó el tratamiento térmico. Los mayores valores de hidrofobicidad superficial se obtuvieron realizando el tratamiento térmico en el rango de pH de medio acuoso de 10 a 11, ya que existe una diferencia significativa entre la IF_{\max} -ANS de la proteína nativa y las de los sistemas tratados térmicamente, para los cuales la IF_{\max} -ANS aumentó casi 5 veces con respecto a PCH nativa.

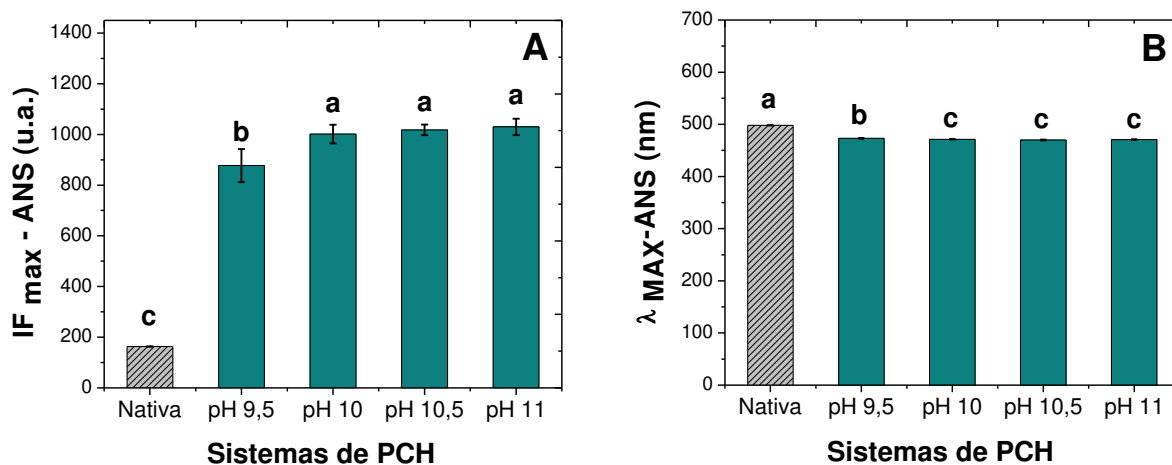


Figura 25. IF_{\max} -ANS (A) y λ_{\max} -ANS (B), de PCH nativa y sistemas de PCH tratados térmicamente a 85 °C durante 5 min (PCHn), concentración proteica 1% m/v y pH del medio acuoso entre 9,5 y 11. Los valores se expresan como media, \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos de medias ($p < 0,05$).

El pH del medio acuoso a partir del que se realiza el tratamiento térmico influyó significativamente en la λ_{\max} -ANS. El tratamiento térmico causó un desplazamiento significativo de la λ_{\max} -ANS hacia valores menores (*blue shift*), lo que indicaría que los sitios de unión al ANS estarían en un microambiente más hidrofóbico tras la agregación de la proteína. Este fenómeno, asociado con el aumento de la IF -ANS (aumento de la hidrofobicidad superficial), es coincidente con el cambio en la IF -Trp (alteración en la estructura tridimensional de la proteína), lo que sugiere que las modificaciones en la estructura de PCH se deben mayormente a una asociación de grupos hidrofóbicos, los cuales fueron expuestos durante el tratamiento térmico.

A continuación, se estudió el efecto de la variación de la concentración de proteína de los sistemas tratados térmicamente (85 °C, 5 minutos), en el rango de pH que manifestó

mayor alteración estructural, es decir, valores de pH entre 10 y 11 (Fig. 26). Cabe destacar que, para la construcción de un nanovehículo con futuras aplicaciones industriales, la concentración a partir de la cual este puede obtenerse es una variable muy importante. Estudios previos realizados por Sponton y col. (2017), evidenciaron que, el incremento del pH muy por encima del punto isoeléctrico de PCH permite incrementar la concentración de proteína para obtener agregados solubles. Sin embargo, observaron que dicha concentración proteica se puede extender hasta cierto límite a partir del cual, si se continúa aumentando la concentración, transcurre la gelificación. Por lo tanto, a partir de la información ya obtenida, se evaluaron sistemas de PCH con concentraciones de proteínas entre 1-3 % m/v.

Tal como se observa en la Fig. 26, para todos los valores de pH del medio acuoso se observó una disminución significativa de la IF-Trp con respecto a la de PCH nativa, lo que estaría relacionado con un efecto de agregación proteica y un mecanismo de *self quenching*, cuyas bases moleculares ya fueron discutidas.

Luego, el efecto de la concentración proteica y pH del medio acuoso sobre la IF_{max}-Trp y la λ_{max} -Trp de cada sistema fueron también analizados (Fig. 27). Se pudo deducir que:

- i. A pH 10 (Fig. 27, A-1), no hubo diferencias significativas entre las IF_{max}-Trp de los distintos sistemas tratados térmicamente, es decir, la concentración de proteínas no ejercería efectos significativos sobre la estructura tridimensional de los agregados a este valor de pH del medio acuoso.
- ii. Cuando los sistemas tratados térmicamente se generaron a un valor de pH del medio acuoso de 10,5 (Fig. 27, B-1), el incremento de la concentración de proteínas de 2 a 3% m/v, produjo un leve pero significativo incremento de la IF_{max}-Trp, con lo cual esto indicaría que ambos sistemas sufrieron una menor variación de la estructura tridimensional.
- iii. A pH 11 (Fig. 27, C-1), la concentración de proteína volvió a mostrar un efecto significativo en la IF_{max}-Trp, obteniéndose una menor variación de la estructura tridimensional cuando la concentración de proteínas fue de 3% m/v.
- iv. La concentración de proteínas no produjo ningún efecto sobre las λ_{max} -Trp de los distintos sistemas (Fig. 27, A-2, B-2 y C-2). Esto indicaría, nuevamente, que el medioambiente en el cual se encuentran los residuos de Trp no se modificó durante el tratamiento térmico, es decir, los residuos de Trp en los agregados se encontrarían en un microambiente similar al de los Trp en la proteína nativa.

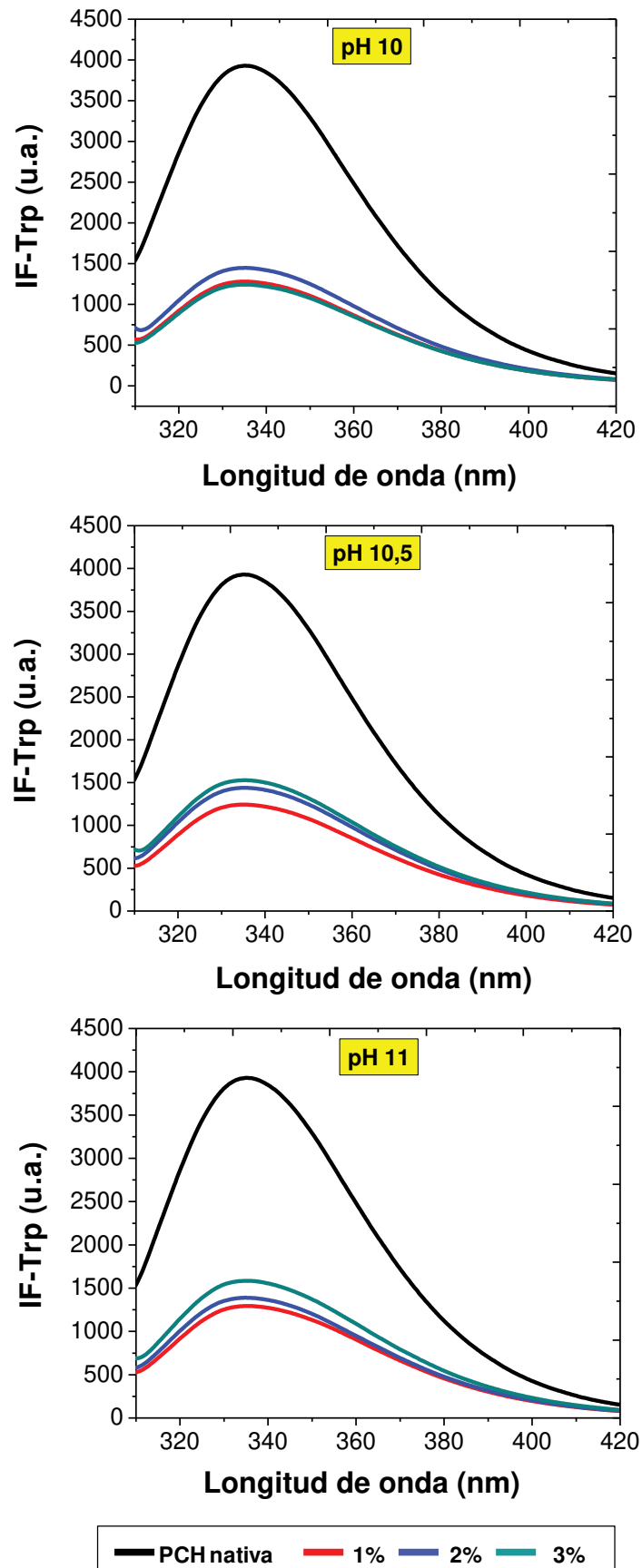


Figura 26. IF-Trp de PCH nativa y sistemas de PCH tratados térmicamente a 85 °C durante 5 minutos (PCHn), a concentraciones de proteína comprendidas entre 1 y 3 % m/v, a pH 10, 10,5 y 11 del medio acuoso.

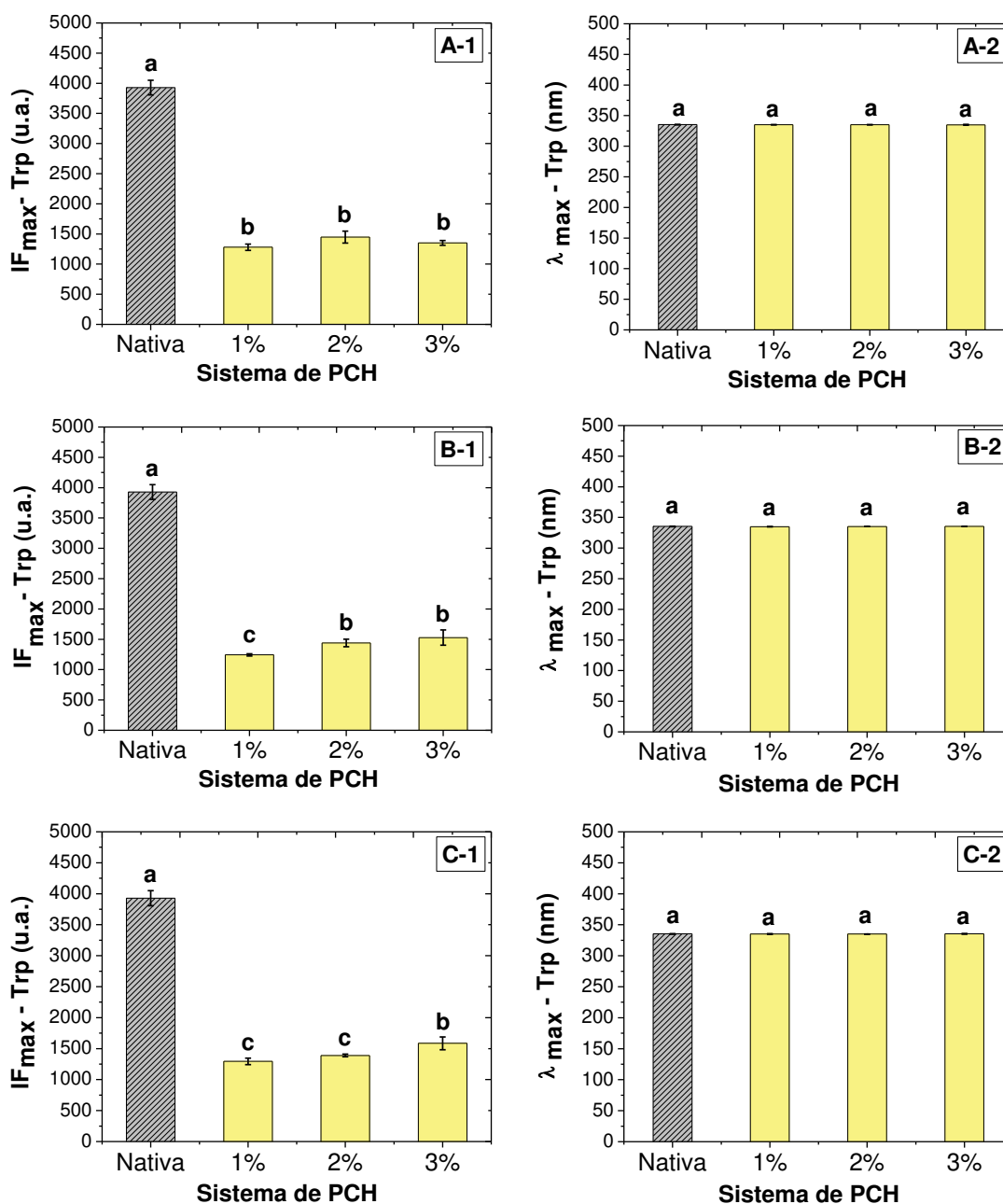


Figura 27. IF_{max}-Trp (A-1, B-1, C-1) y λ_{max}-Trp (A-2, B-2, C-2) de PCH nativa y sistemas de PCH tratados térmicamente a 85 °C durante 5 minutos (PCHn), a concentraciones de proteína comprendidas entre 1 y 3% m/v, a pH 10 (A), 10,5 (B) y 11 (C) del medio acuoso. Los valores se expresan como media, ± desviación estándar.

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos de medias (p<0,05).

Luego, se evaluó el efecto de la concentración de proteínas y pH del medio acuoso sobre la IF-ANS para cada uno de los sistemas de PCH. Los resultados se observan en la Fig. 28.

La modificación en las condiciones de concentración de proteínas y de pH del medio acuoso a las que se realizó el tratamiento térmico provocó variaciones en la IF-ANS, lo que indicaría que los agregados obtenidos presentarían diferencias en su hidrofobicidad superficial.

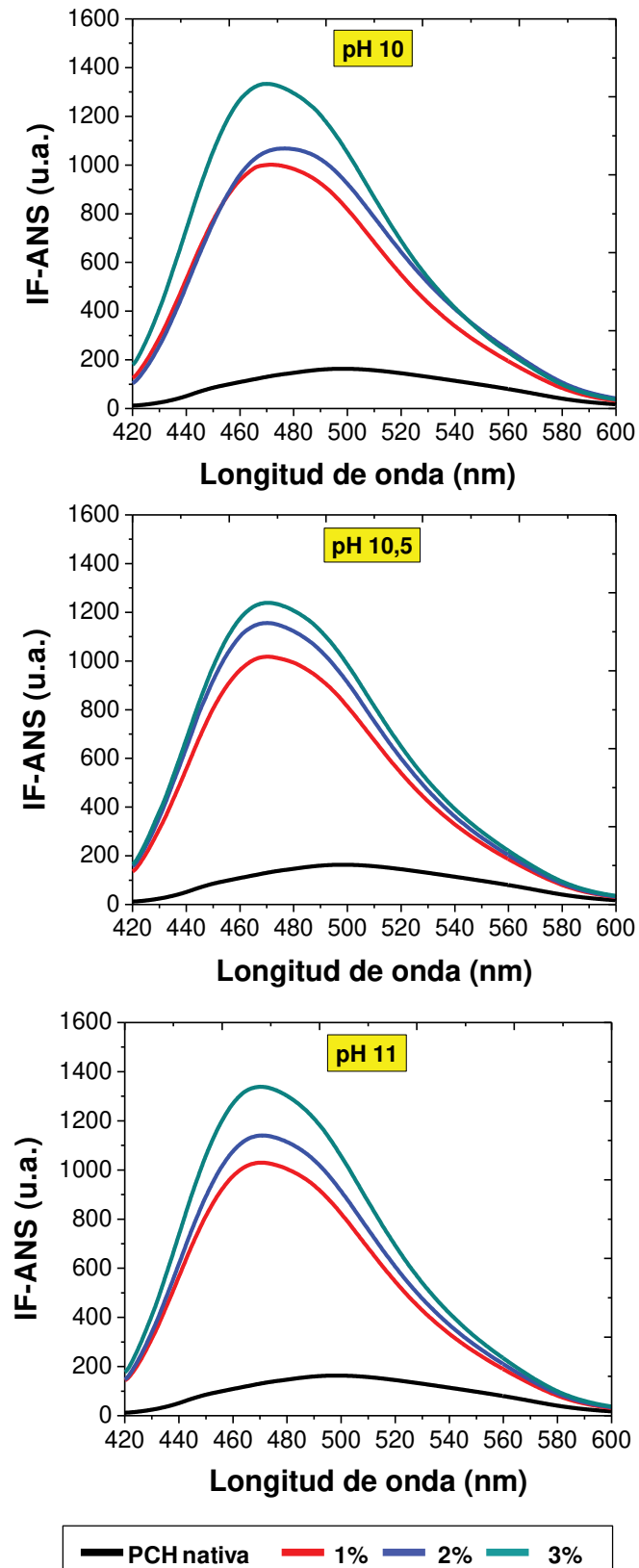


Figura 28. IF-ANS de PCH nativa y sistemas de PCH tratados térmicamente a 85 °C durante 5 minutos, (PCHn) a concentraciones de proteína comprendidas entre 1 y 3 % m/v, a pH 10, 10,5 y 11 del medio acuoso.

Para visualizar mejor estos efectos, los resultados se presentan en la Fig. 29 y se obtuvo que:

- i. A pH 10 (Fig. 29, A-1), el tratamiento térmico provocó un gran aumento de la IF_{\max} -ANS y, por lo tanto, de la hidrofobicidad superficial, con respecto a la de la proteína nativa, obteniéndose el mayor valor a concentración de proteína 3% m/v. La diferencia registrada entre la IF_{\max} -ANS del agregado a concentración 3 % m/v con respecto a los demás sistemas fue claramente significativo, por lo que este poseería una mayor hidrofobicidad superficial.
- ii. Luego, a pH 10,5 (Fig. 29, B-1) y 11 (Fig. 29, C-1) se observó el mismo comportamiento que para los sistemas de PCH a pH 10 del medio acuoso.
- iii. A pH 10 (Fig. 29, A-2), se observó una disminución significativa de la λ_{\max} -ANS de los sistemas tratados térmicamente con respecto a la de PCH nativa (*blue shift*), es decir que los sitios a los cuales se une el ANS se encontrarían en un microambiente más hidrofóbico cuando ocurre la agregación de la proteína. Esta variación en la polaridad de las regiones a las que se une el ANS es dependiente, además, de la concentración de proteína de los sistemas agregados.
- iv. A pH 10,5 (Fig. 29, B-2) y pH 11 (Fig. 29, C-2) se observó que, al producirse la agregación, existió un cambio significativo en el microambiente de los sitios donde se une el ANS similar al que ocurrió en los sistemas generados a pH 10. Sin embargo, estos cambios no dependieron de la concentración de proteína de los sistemas.

Por lo tanto, el análisis global del efecto de la concentración de proteína de los sistemas evaluados sobre la hidrofobicidad superficial de los agregados formados, mostró que estos presentarían mayor hidrofobicidad superficial cuando son generados mediante el tratamiento térmico de soluciones de PCH al 3% m/v a valores de pH 10 y 11.

Estos resultados, hallados por fluorescencia, fueron consistentes con los reportados por Finos y col. (2021) quienes evaluaron también el efecto del pH (en el rango 9,5-11) y concentración proteica (1-3% m/v) sobre las propiedades fisicoquímicas de nanopartículas de OVA obtenidas por tratamiento térmico (85°C, 5 minutos). Se llevó a cabo un análisis de fluorescencia intrínseca y extrínseca en el que se observó el mismo comportamiento para los sistemas obtenidos en el presente trabajo de tesis. Cabe destacar que, tal como se indicó anteriormente, PCH se compone de un grupo heterogéneo de proteínas y, en comparación a los sistemas de OVA, para los de PCH se observó una marcada disminución de la IF_{\max} -Trp respecto a PCH nativa. Este comportamiento indicaría una mayor pérdida de su estructura

nativa. Por otro lado, PCH cuenta con un mayor número de grupos Trp los cuales contribuyen en mayor medida a la IF-Trp global del sistema. Por lo tanto, a partir de estos resultados podría deducirse que el comportamiento observado para los sistemas conformados por PCH estaría conducido principalmente por OVA. Esto quiere decir, que las demás proteínas que componen a PCH no influyeron sobre dicho comportamiento.

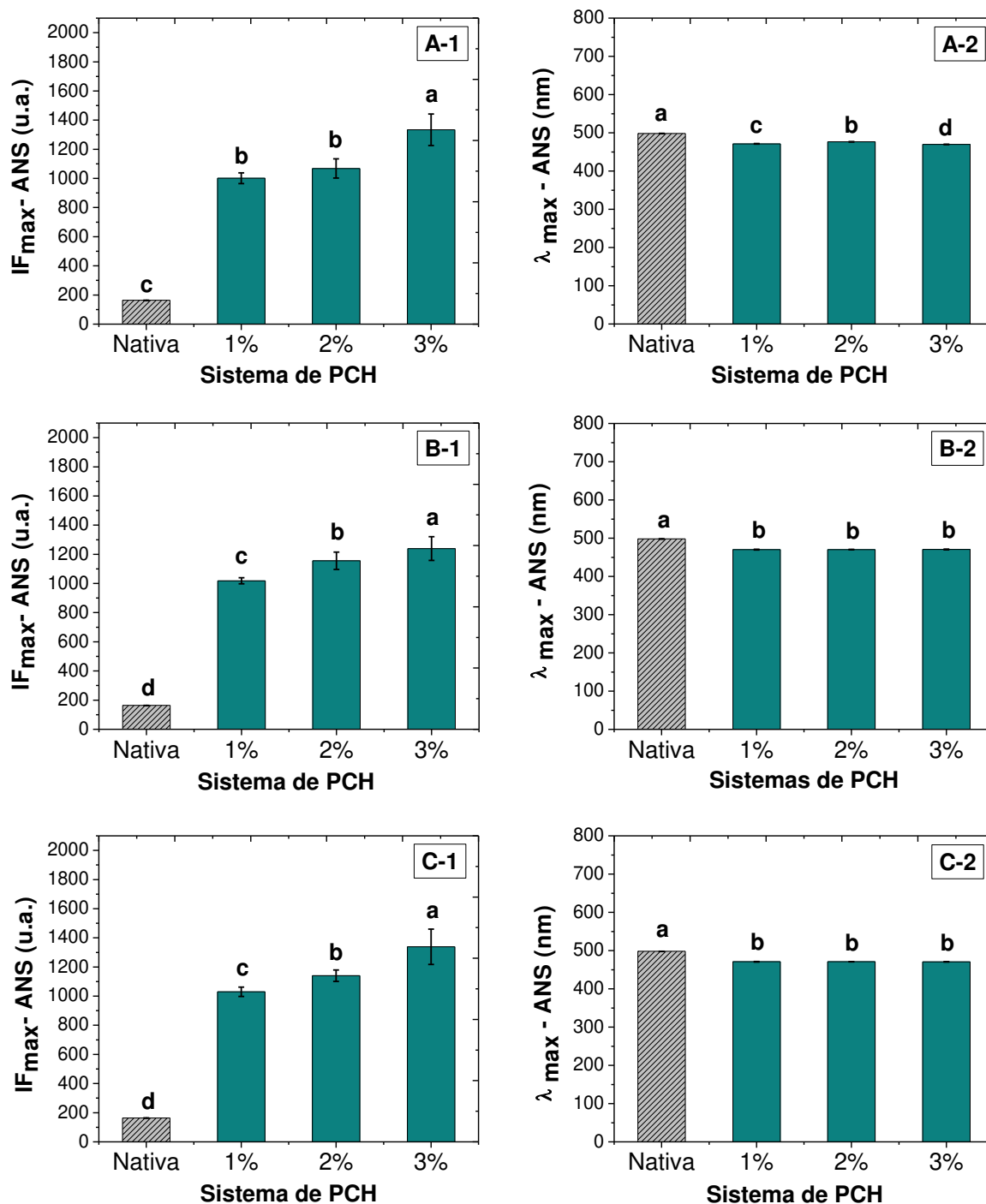


Figura 29. IF_{max}-ANS (A-1, B-1, C-1) y λ_{max}-ANS (A-2, B-2, C-2) correspondientes a PCH nativa y sistemas de PCH tratados térmicamente a 85 °C durante 5 minutos (PCHn), a concentraciones de proteína comprendidas entre 1 y 3 % m/v y a pH 10 (A), 10,5 (B) y 11 (C) del medio acuoso. Los valores se expresan como media, ±

desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos de medias ($p < 0,05$).

Finalmente, considerando los resultados de los análisis de fluorescencia intrínseca y extrínseca, y la necesidad de obtener nanopartículas proteicas que posean gran hidrofobicidad superficial, las condiciones de concentración de proteína y pH del medio acuoso más adecuadas para obtener nanovehículos a partir de un tratamiento térmico son: concentración de proteína 3% m/v y valores de pH 10 y 11. Para identificar a estos sistemas PCHn se empleó la siguiente nomenclatura: PCH₃₋₁₀ y PCH₃₋₁₁. Considerando estas condiciones experimentales, todos los estudios posteriores se realizaron sobre la base de esta selección de sistemas.

4.5.1. Cromatografía de exclusión molecular en FPLC

Con el fin de caracterizar los sistemas PCH nativa, PCH₃₋₁₀ y PCH₃₋₁₁ en términos de su PM, se realizó un ensayo de SEC-FPLC a pH 7,6. A continuación en la Fig. 30 se muestra el perfil cromatográfico obtenido para los sistemas.

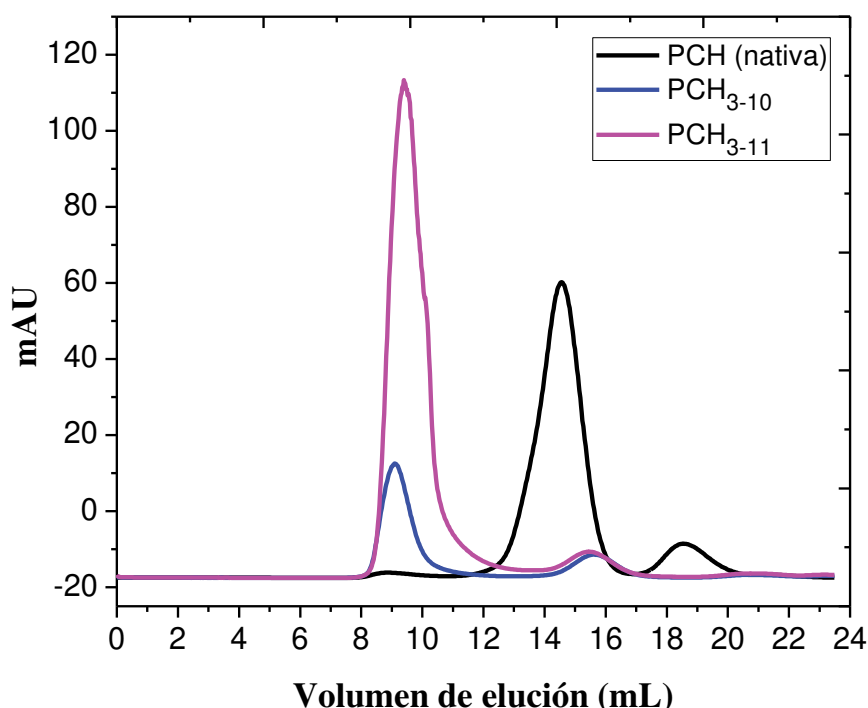


Figura 30. Absorbancia a 280 nm de los sistemas PCH (nativa), PCH₃₋₁₀ y PCH₃₋₁₁ expresada en unidades de miliabsorbancia (mAU), en función del volumen de elución (V_e), expresado en mililitros (ml).

A partir del mismo, se observó que:

- i. El perfil cromatográfico para PCH nativa indico la presencia de dos poblaciones. A menores volúmenes de elución se detectó la presencia de un pico de mayor área con un PM de 48 KDa, mientras que a mayores volúmenes de elución se detectó un pico de menor área. Este tipo de distribución fue coincidente con la hallada por [Awadé y Efsthathiou \(1999\)](#) quienes identificaron poblaciones similares utilizando diferentes técnicas cromatográficas. En dicho trabajo, el cromatograma para PCH nativa obtenido por SEC-HPLC indicó que el pico de mayor área corresponde a la fracción proteica compuesta por proteínas con PM en el rango de OVA (44 kDa). Dicha fracción incluye a ovotransferrina, avidina, ovomucoide, ovoglobulinas y otras proteínas menores. Mientras que, a mayores volúmenes el pico de menor área identificado correspondería la proteína lisozima cuyo PM es 14 KDa.
- ii. Para los sistemas PCH_n, también se registró la presencia de dos poblaciones. El sistema PCH₃₋₁₀ a menores volúmenes de elución presentó un pico de mayor área correspondiente a un valor de PM de 1.200 KDa y otro de menor área a mayores volúmenes de 52 KDa. Mientras que para PCH₃₋₁₁ se observó una distribución similar, con un pico de mayor área a menores volúmenes de elución de 1.100 KDa y otro de menor área y a mayores volúmenes de elución de 56 KDa. Respecto a la curva obtenida para PCH nativa, dicho comportamiento indicaría que ambos picos a menores volúmenes de elución corresponderían a los agregados formados y los picos a mayores volúmenes identificarían una fracción de PCH no agregada. Además, a diferencia de PCH₃₋₁₀, la altura del pico obtenido a menores volúmenes de elución para el sistema PCH₃₋₁₁ fue mucho mayor, lo cual indicaría la formación de un mayor número de agregados con menor PM. Por otro lado, en los sistemas PCH_n no se observó la presencia del pico correspondiente a lisozima indicando que la misma podría formar parte de los sistemas PCH₃₋₁₀ y PCH₃₋₁₁. En síntesis, el comportamiento bimodal observado para los sistemas PCH₃₋₁₀ y PCH₃₋₁₁, sugeriría que la formación de agregados no habría empleado la totalidad de PCH. Un comportamiento similar fue observado por [Weijers y col. \(2003\)](#) con OVA, en donde se observó que, el tratamiento térmico produjo que una parte se desnaturalice sin agregarse.
- iii. El pH del medio acuoso podría influir sobre el porcentaje de agregación y la magnitud de los valores de PM de los sistemas. A partir del cálculo del área bajo la curva normalizada se estimó que el sistema PCH₃₋₁₀ presento ~74 % de proteínas agregadas con un PM de 1200 KDa. Mientras que el sistema PCH₃₋₁₁ presento un 91% de proteínas agregadas con un PM de 1100 KDa.

En todos los casos, la magnitud de los PM obtenidos podrían estar influenciados por el efecto de las fuerzas de atractivas (agregación) y repulsivas (debido al pH del medio acuoso) involucradas en el proceso de agregación (Sponton y col., 2015a). Por lo tanto, este efecto conduciría a una disminución del PM de los agregados proteicos obtenidos a pH 11 respecto a los obtenidos a pH 10 debido al aumento en la magnitud de las fuerzas repulsivas durante el tratamiento térmico.

Por otro lado, estos resultados fueron comparados con los sistemas obtenidos con OVA por Finos y col. (2021). Al igual que los sistemas PCHn se obtuvieron curvas bimodales con una distribución de PM similar. Sin embargo, los agregados formados con OVA presentaron valores de PM ligeramente menores. Los volúmenes de elución registrados indicaron que OVA₃₋₁₀ y OVA₃₋₁₁ presentaron valores de PM de 1100 kDa y 1000 kDa, respectivamente. Por lo tanto, estas comparaciones sugerirían que OVA podría conducir la agregación térmica de PCH bajo las condiciones de tratamiento aplicadas.

4.5.2. Análisis de distribución de tamaño de partícula y potencial ζ

El conocimiento del tamaño de partícula y la carga superficial de los nanovehículos proteicos permitiría vislumbrar la aplicación de los mismos como sistemas de transporte de CB. En función de ello, PCH nativa y PCHn fueron caracterizados de acuerdo a su tamaño y potencial ζ a dos valores de pH del medio acuoso, 3 y 7, a fin de examinar su estabilidad coloidal. Los valores de pH fueron seleccionados considerando un pI promedio de 5 para PCHn. Por otro lado, el pH de muchos alimentos se encuentra en ese rango (Sponton y col., 2020).

En la Tabla 20 se presentan los valores de d_H , volumen (%), determinado a partir de la PSDv), PdI y potencial ζ obtenidos para PCH nativa, PCH₃₋₁₀ y PCH₃₋₁₁. Además, en la Fig. 31 se observa la PSDi y PSDv para cada sistema, a pH3 (A-1 y A-2) y pH 7 (B-1 y B-2) del medio acuoso.

Tabla 20. Valores de d_H , volumen (%), PDI y potencial ζ correspondientes a PCH nativa, PCH₃₋₁₀ y PCH₃₋₁₁, a pH 7 y pH 3 del medio acuoso. Los valores se muestran como media (\pm desviación estándar) y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

| | Sistema | d_H (nm) | Volumen (%) | PdI | Potencial ζ (mV) |
|------|---------------------|------------------------------|-------------|--------------------------------|--------------------------------|
| pH 3 | PCH nativa | 6 (\pm 0) ^d | 99,87 | 0,823 (\pm 0) ^a | 12,12 (\pm 0) ^a |
| | PCH ₃₋₁₀ | 181 (\pm 31) ^a | 60,90 | 0,281 (\pm 0) ^b | 12,85 (\pm 2) ^a |
| | | 37 (\pm 14) ^c | 37,20 | | |
| | PCH ₃₋₁₁ | 33 (\pm 6) ^c | 99,80 | 0,245 (\pm 0) ^c | 11,37 (\pm 1) ^a |
| pH 7 | PCH nativa | 6 (\pm 0) ^d | 99,90 | 0,820 (\pm 0) ^a | -6,79 (\pm 0) ^a |
| | PCH ₃₋₁₀ | 135 (\pm 23) ^b | 60,20 | 0,252 (\pm 0) ^{bc} | -13,65 (\pm 1) ^b |
| | | 32 (\pm 4) ^c | 38,10 | | |
| | PCH ₃₋₁₁ | 30 (\pm 4) ^c | 99,9 | 0,250 (\pm 0) ^{bc} | -12,60 (\pm 1) ^b |

A partir de estos resultados, se pudo deducir que:

- i. Para PCH nativa, a pH 3 se obtuvo una PSDi de tipo polidispersa (PdI=0,820). Sin embargo, el pico de menor tamaño (~6 nm) presentó el mayor volumen (99 %). Un comportamiento similar fue observado a pH 7 indicando que el pH del medio acuoso no influiría sobre el tamaño de partícula de PCH nativa. [Finos y col. \(2021\)](#) obtuvieron una PSDi y PSDv similar para OVA nativa, en el cual se obtuvo el predominio en volumen de una población de partículas con d_H de ~6 nm. Por lo tanto, la población de partículas halladas en PCH correspondería a su fracción mayoritaria OVA, mientras que los picos de mayor tamaño, observados en PSDi ([Fig. 31, A-1 y B-1](#)), podrían deberse a la heterogeneidad de la muestra compuesta por diferentes proteínas de diferentes tamaños de partícula o corresponder a trazas de algunos agregados proteicos.
- ii. Luego, respecto a PCH nativa, el tratamiento térmico produjo un incremento significativo del d_H de los sistemas tratados ([Tabla 20](#)). A pH 3, para el sistema PCH₃₋₁₀ se registró una distribución de tipo bimodal tanto en PSDi como en PSDv ([Fig. 31,](#)

A-1 y A-2). Los picos correspondieron a una primera población de partículas con un d_H menor a los 100 nm y una segunda por encima de los 100 nm. Luego, a pH 7 del medio acuoso, la misma distribución fue observada siendo el d_H de la segunda población de partículas significativamente menor que la obtenida a pH 3. Mientras que, para el sistema PCH₃₋₁₁, a pH 3 y 7, se obtuvo una distribución de tipo monomodal sugiriendo que el pH del medio acuoso no influiría sobre el tamaño del sistema. Al comparar los resultados obtenidos por [Finos y col. \(2021\)](#), se observó que el tamaño y estabilidad coloidal de PCH₃₋₁₁ fue similar a la obtenida para OVA₃₋₁₁. Mientras que para PCH₃₋₁₀ el tamaño obtenido fue mayor que el de OVA₃₋₁₀. Este aumento significativo en el tamaño de PCH₃₋₁₀ podría indicar la influencia de las demás proteínas que componen PCH, tales como la lisozima, cuyo pI es de ~10,7 ([Dong y Zhang, 2021](#)). Con lo cual, al utilizar un pH cercano al pI, la precipitación de la lisozima podría influir en el tamaño de los agregados.

Estos resultados ponen en evidencia el efecto del pH en el proceso de agregación térmica de PCH y, en general, se corresponden con los resultados de SEC-FPLC discutidos previamente. Así, los agregados proteicos obtenidos a pH 10 presentaron mayor tamaño de partícula y mayor PM que aquellos obtenidos a pH 11. El tratamiento térmico en condiciones de mayor alcalinidad (pH 11) produjo agregados de menor tamaño (<100 nm) como resultado de un equilibrio entre la atracción hidrofóbica, la formación de enlaces disulfuro (promovidos por el calentamiento) y la repulsión electrostática (favorecida a pH » pI) entre las proteínas ([Wang y col., 2010](#)).

Luego, respecto al análisis de potencial ζ ([Tabla 20](#)), se pudo deducir que:

- i. Como era de esperarse, los sistemas proteicos presentaron valores de potencial ζ positivos a pH 3, mientras que los mismos fueron negativos a pH 7. El cambio de signo en la carga neta indicaría que todos los sistemas atravesaron, efectivamente, el pI de PCH.
- ii. A pH 3, los valores de potencial ζ para los sistemas PCH_n fueron estadísticamente similares al obtenido para PCH nativa. Sin embargo, a pH 7, el tratamiento térmico provocó un aumento en el potencial ζ para los sistemas PCH_n, posiblemente debido a una mayor exposición de residuos de aminoácidos cargados de manera negativa.

Por lo tanto, estos resultados indicaron que las PCH₃₋₁₁ presentaron mayor estabilidad, debido a su menor tamaño tanto a pH 3 como a pH 7.

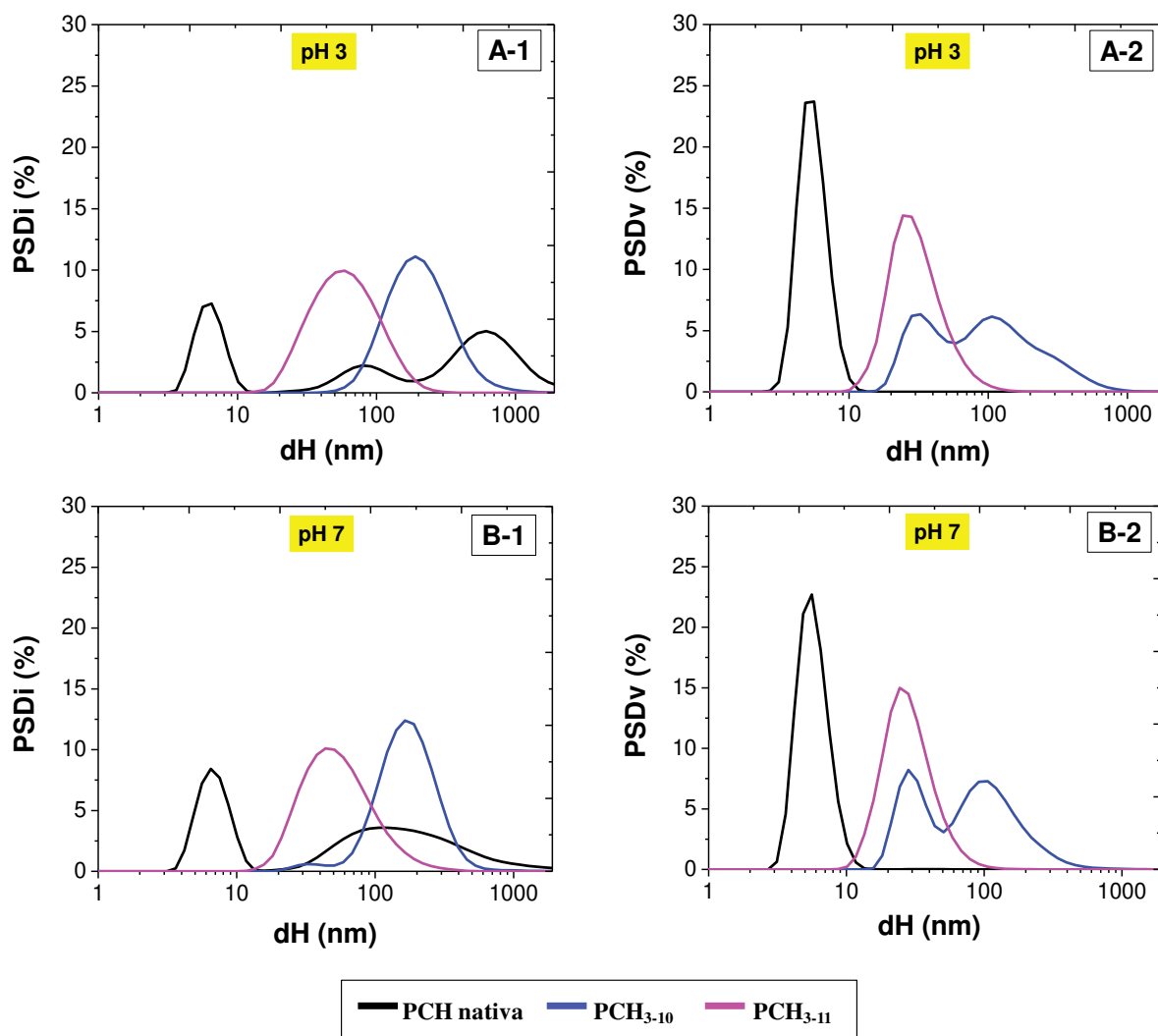


Figura 31. PSDi y PSDv de los sistemas PCH nativa, PCH₃₋₁₀ y PCH₃₋₁₁ a pH 3 (A-1 y A-2) y pH 7 (B-1 y B-2).

4.5.3. Estudio de los aspectos morfológicos de PCHn

Las características morfológicas de los sistemas PCH₃₋₁₀ y PCH₃₋₁₁ fueron determinadas por AFM (Fig. 32). En los paneles principales se presentan imágenes de fase y como insertos se incluyen imágenes topográficas en 3D comparadas con la PSDv obtenida por DLS.

A partir del análisis de las imágenes de fase y topográfica 3D para PCH₃₋₁₀, se pudo determinar la presencia de diferentes poblaciones de partículas con diámetros entre 30 y 100 nm, con formas ovaladas y superficies rugosas (Fig. 32, A).

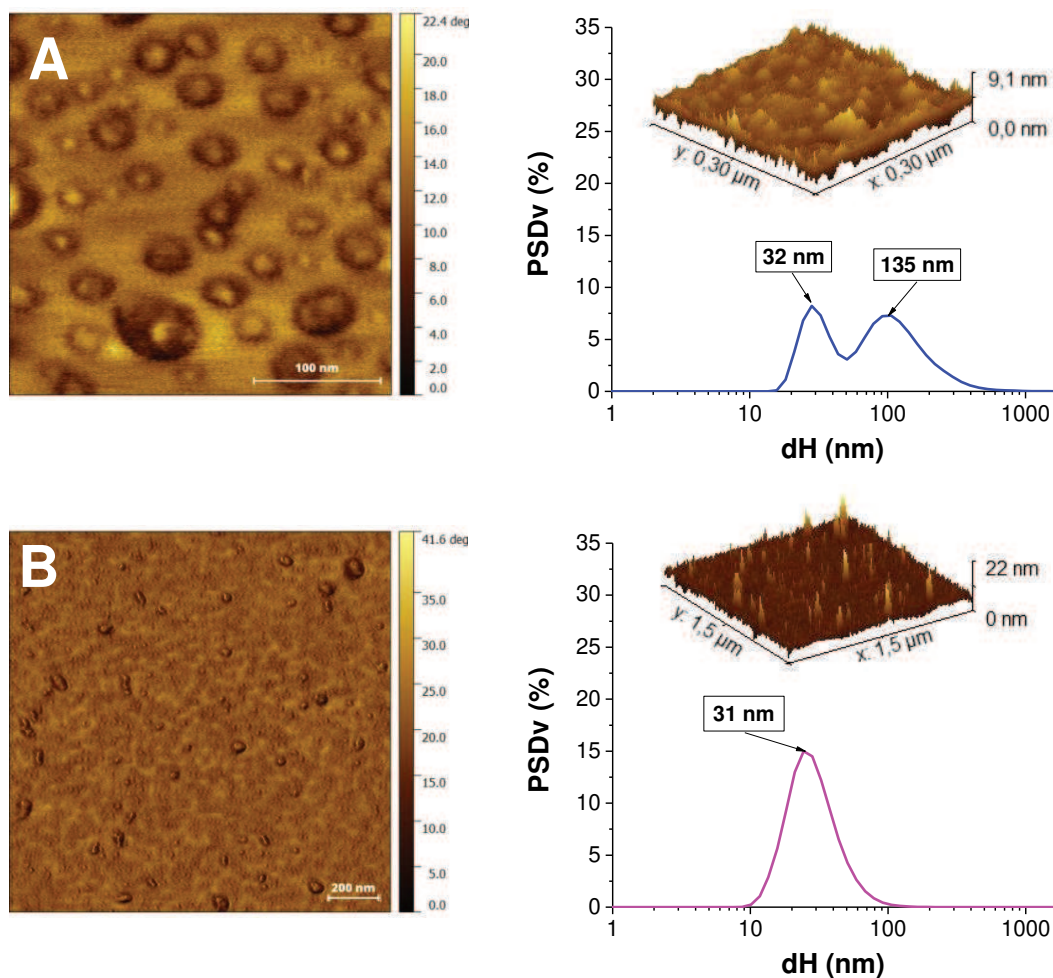


Figura 32. Imágenes de fase obtenidas por AFM y PSDv de los sistemas PCH₃₋₁₀ (A) y PCH₃₋₁₁ (B), a pH 7 del medio acuoso. Los insertos en los paneles PSDv corresponden a las imágenes topográficas en 3D de AFM.

Tal como se observa, las estimaciones de tamaño de partícula registradas por AFM fueron comparables con el resultado arrojado por PSDv obtenida por DLS. Por otro lado, las partículas de PCH₃₋₁₀ presentaron una relación diámetro/altura muy alta. Cabe señalar que lo observado mediante AFM podría deberse a que, durante el paso de secado en la preparación de la muestra, las partículas se aplastan sobre la superficie de mica incrementándose de ese modo la relación diámetro/altura (Arzeni y col., 2015).

Las imágenes de fase y topográfica 3D para PCH₃₋₁₁ (Fig. 32-B) revelaron la presencia de una población mayoritaria con un diámetro de partícula estimado de ~50 nm y una población minoritaria de ~10 nm. Sin embargo, como se observa en la curva PSDv correspondiente al sistema PCH₃₋₁₁, la población de 10 nm observada por AFM no fue detectada por DLS. Ambas poblaciones de partículas presentaron forma redondeada con

ligera rugosidad y con una relación diámetro/altura menor que la observada para el sistema PCH₃₋₁₀.

En base a los resultados obtenidos hasta aquí, el tamaño de los agregados proteicos PCH₃₋₁₀ y PCH₃₋₁₁ fue de alrededor de 100 nm, por lo que podrían ser definidos como “nanopartículas” (Gutiérrez y col., 2013). Sin embargo, la necesidad de obtener partículas y complejos con tamaños en el orden de los nanómetros, estables coloidalmente a valores de pH compatibles con la mayoría de los alimentos, se optó por descartar el sistema PCH₃₋₁₀ debido a su menor estabilidad coloidal. Todos los estudios posteriores fueron realizados con el sistema PCH₃₋₁₁ y PCH nativa. Esta última se incluyó a modo de control con el objetivo de obtener mayor información sobre la influencia de la conformación en la unión de los CA.

4.6. Caracterización de la formación de complejos PCHn-CA

4.6.1. Fluorescencia intrínseca y extrínseca

La fluorescencia intrínseca es una herramienta muy utilizada para estudiar la interacción proteína-ligando. Los espectros de emisión de Trp cambian cuando el entorno de residuos de Trp en la proteína se altera por transiciones conformacionales, asociación de subunidades o unión con otras moléculas (Xie y col., 2017). Por ello, se estudió la formación de nanocomplejos monitoreando los cambios en la intensidad de fluorescencia intrínseca luego de la adición de los CA a las soluciones proteicas de PCH nativa y PCH₃₋₁₁. Para obtener parámetros estequiométricos (K_a y n) y termodinámicos de unión característicos (ΔG° , ΔH° y ΔS°), que permitan comprender la formación de los nanocomplejos, los estudios de fluorescencia intrínseca se realizaron variando la concentración de CA de 0 a 200 μM y en un rango de temperatura comprendido entre 15 y 45 $^\circ\text{C}$. Los espectros obtenidos para cada CA y temperatura se observan en las Fig. A1-A7 del Apéndice. Para una mejor comprensión, se obtuvieron los valores de IFR-Trp (Fig. 33). Se pudo deducir que:

- i. Tal como se observa en las Fig. A1 y A2 del Apéndice, a todas las temperaturas evaluadas, para PCH nativa y PCH₃₋₁₁ el aumento en la concentración de CAR causó un incremento gradual de la IF-Trp y un leve desplazamiento de la $\lambda_{\text{max}}\text{-Trp}$ hacia valores menores (*blue shift*). Los resultados podrían explicarse considerando que CAR se une a dominios de PCH nativa alejados de los residuos de Trp y/o Tyr, lo que podría inducir cambios conformacionales leves en la proteína (Frapin y col., 1993). Resultados similares fueron observados en la unión de ligandos de naturaleza

lipofílica tales como el retinol a OVA (Visentini y col., 2017) y CAR a nanopartículas de PCH obtenidas por gelificación y posterior sonicación (Rao y col., 2020). Este comportamiento se observa mejor considerando los valores de IFR-Trp en la Fig. 33, A y D. Para PCH nativa, se pudo notar que los mayores valores de IFR-Trp fueron obtenidos a 15 y 25°C. Mientras que a mayores temperaturas no se observaron diferencias. Para PCH₃₋₁₁, el aumento de IFR-Trp fue también gradual, pero a diferencia de PCH nativa, se observaron valores más bajos de IFR-Trp y la temperatura no produjo un efecto significativo. Esto indicaría que la unión de CAR no modificaría significativamente la conformación de las nanopartículas PCH₃₋₁₁. La saturación de posibles sitios de unión, determinada por la concentración a partir de la cual, la intensidad de fluorescencia permanece constante, fue >200 μM para PCH-CAR y de 180 μM para PCH₃₋₁₁-CAR.

- ii. Con el compuesto TIM se obtuvo un comportamiento muy similar al de CAR (Fig. A3, A4 del Apéndice y Fig. 33, B y E). Como se indicó anteriormente, estructuralmente ambos compuestos solo difieren en la posición del grupo -OH. Esto indicaría que la posición del -OH no produciría cambios significativos en la conformación de PCH nativa y PCH₃₋₁₁.
- iii. Luego, se evaluó el efecto de la complejación de CIN. En las Fig. A5 y A6 del Apéndice se observan los espectros intrínsecos obtenidos para cada sistema. A todas las temperaturas evaluadas, tanto PCH nativa como las nanopartículas PCH₃₋₁₁ mostraron una disminución de la IF-Trp con el aumento de la concentración de CIN. Para PCH nativa (Fig. A5 del Apéndice), esta disminución transcurrió de manera gradual hasta apagar casi por completo la intensidad de fluorescencia del Trp a concentraciones altas de CIN. La unión de CIN, produjo un corrimiento de la λ_{\max} -Trp hacia valores mayores (*red shift*), lo que indicaría que CIN promovería una localización de residuos de Trp en sitios cada vez más polares, conforme aumenta la concentración (Lakowicz, 2006). La saturación de sitios ocurrió cuando la concentración de CIN fue 200 μM. Luego, para PCH₃₋₁₁ se obtuvo un comportamiento diferente. La unión de CIN produjo un corrimiento *blue shift* en todo el rango de temperatura evaluado (Fig. A6 del Apéndice). Luego, se analizó la IFR-Trp en función de la concentración de CIN a distintas temperaturas para ambos sistemas (Fig. 33, C y F). Como se observa, la disminución de los valores de IFR-Trp con el aumento de la concentración de CIN fue gradual para ambos y, en el rango evaluado, prácticamente no se apreciaron efectos de la temperatura.

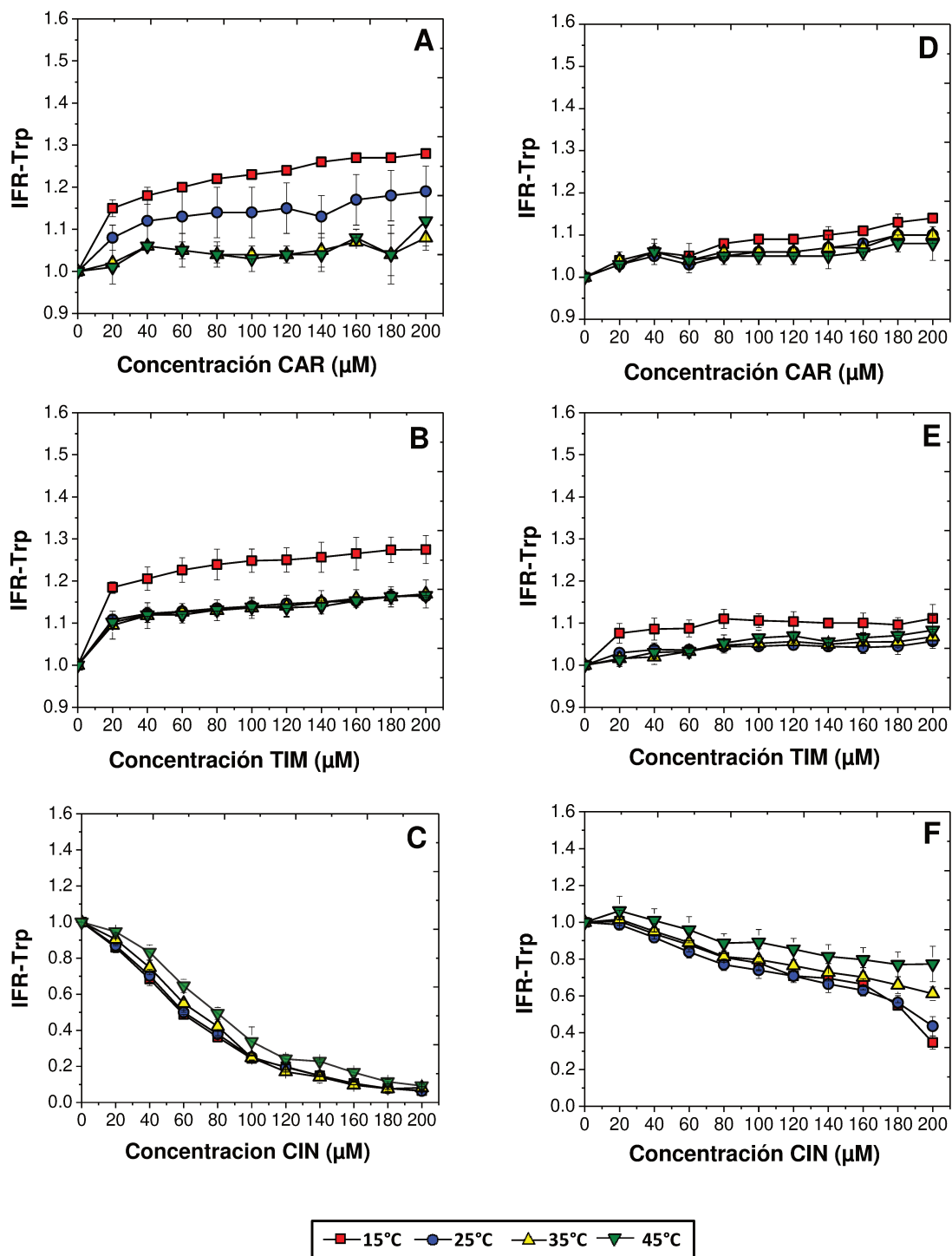


Figura 33. Intensidad de fluorescencia relativa debida al triptófano (IFR-Trp) en función de la concentración de CAR, TIM y CIN a 15, 25, 35 y 45 °C, para sistemas de PCH Nativa (A, B y C), y PCH₃₋₁₁ (D, E y F).

A fin de proporcionar información acerca del modo de unión de los CA a PCH nativa y PCH₃₋₁₁, se realizaron experimentos de fluorescencia extrínseca. La Fig. A7 del Apéndice muestra el efecto de la concentración de los CA (0-200 μM) sobre el comportamiento de emisión de fluorescencia de la sonda ANS para PCH nativa y PCH₃₋₁₁. Para obtener una mejor

comprensión, se calcularon los valores de IFR-ANS los cuales se muestran en la Fig. 34. Se observó que:

- i. Para PCH nativa, el aumento en la concentración de CAR (Fig. A7 del Apéndice) no causó prácticamente ninguna diferencia en IF_{ANS} y, en consecuencia, no hubo cambios significativos en los valores de IFR_{ANS} (Fig. 34, A). Además, no se observaron cambios en la λ_{max} -ANS, lo que sugiere que no habría cambios en la polaridad ambiental de los sitios de unión a ANS. Estos resultados se explican considerando que una cantidad constante de ANS está unida a PCH nativa posiblemente debido a que: (i) la sonda se une a dominios hidrofóbicos particulares en la superficie de la proteína, diferentes a los sitios de unión a CAR, y/o (ii) la adición de ANS provoca el desplazamiento de CAR de la superficie de PCH. Para PCH_{3-11} , el aumento en la concentración de CAR promovió una disminución gradual en IF_{ANS} (Fig. A7 del Apéndice) y en IFR_{ANS} (Fig. 34, A). Este comportamiento puede ser explicado teniendo en cuenta que la fluorescencia del ANS se produce cuando esta molécula se une en forma no covalente a sitios hidrofóbicos en la proteína (Albani, 2004). Sin embargo, CAR también se uniría a dichos sitios, por lo que, cuando se forman los complejos PCH_{3-11} -CAR, habría menor cantidad de sitios hidrofóbicos disponibles para la unión del ANS a la proteína y, consecuentemente la fluorescencia del ANS disminuiría (Gonzalez y Miksovska, 2014). Al igual que PCH nativa, no se observó corrimiento en la λ_{max} -ANS.
- ii. Para el caso de TIM, se observaron dos comportamientos distintos que dependieron fundamentalmente del tipo de sistema proteico evaluado (Fig. A7, C y D del Apéndice). El complejo PCH-TIM evidenció un aumento gradual de los valores de IFR-ANS (Fig. 34, B), lo que podría indicar que el ANS desplazaría a TIM desde sus sitios de unión. Por otra parte, se observó un comportamiento distinto para el complejo PCH_{3-11} -TIM, para el cual se obtuvo una disminución de los valores de IFR-ANS. Al igual que lo que ocurre con CAR, este comportamiento es definido como un modo de unión que podría responder a un mecanismo de formación de complejos “de adentro hacia afuera” (Sponton y col., 2016; Visentini y col., 2017). Los sitios internos se ocuparían primero y a medida que aumenta la concentración de TIM, la unión se daría en sitios cada vez más superficiales y cercanos al solvente acuoso.

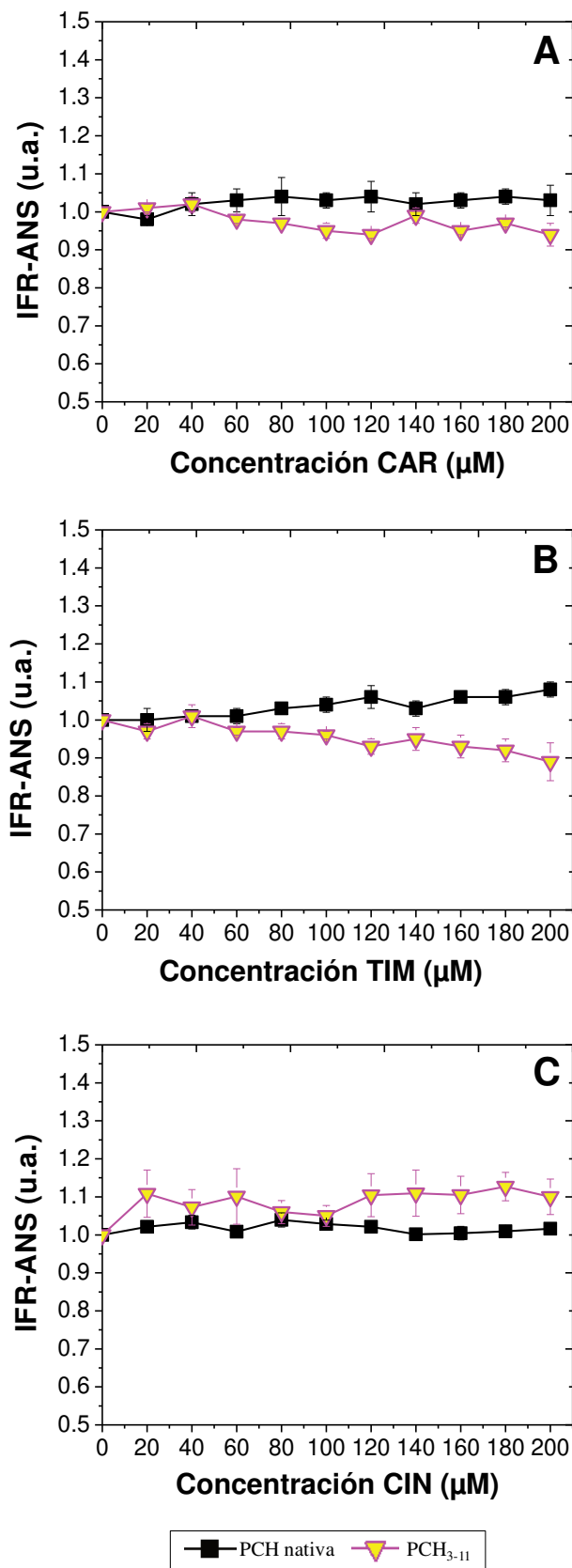


Figura 34. IFR-ANS en función de la concentración de CAR (A), TIM (B) y CIN (C) a 25 °C, para sistemas de PCH nativa y PCH₃₋₁₁.

- iii. La unión de CIN a PCH nativa, en el rango de concentraciones utilizadas, no produjo cambios significativos de la IFR-ANS (Fig. 34, C). Luego, los valores de IFR-ANS de PCH₃₋₁₁-CIN fueron levemente superiores a los de PCH-CIN, con lo cual, ANS podría unirse en sitios o dominios distintos de los sitios de unión de CIN.

Tal como se discutió anteriormente, el proceso de obtención de PCH₃₋₁₁ implicó fenómenos de desnaturalización/agregación debido al tratamiento térmico, lo que dio lugar a cambios conformacionales significativos en la estructura de PCH. Por lo tanto, las diferencias en la formación de los nanocomplejos PCH-CA y PCH₃₋₁₁-CA estarían directamente relacionadas con el estado conformacional de las proteínas. Luego, el modo de unión de los CA a los sistemas proteicos, podría relacionarse con la naturaleza química de los mismos. CAR y TIM al ser isómeros presentarían un modo de unión similar y CIN uno distinto a estos dos, debido a sus diferencias moleculares.

4.6.2. Propiedades estequiométricas y parámetros termodinámicos

Un aspecto importante es el estudio de los parámetros estequiométricos, a modo de predecir el número de moléculas de ligando unidas por monómero de proteína (n), y el conocimiento de la magnitud de interacción intermolecular involucrada en la unión, mediante el cálculo de la constante de asociación (K_a). Con el objetivo de conocer dichos parámetros de unión se consideró el modelo de Scatchard modificado (Le Maux y col., 2013). Además, este modelo de ajuste, a diferencia de otros existentes en bibliografía, contempla la concentración de proteína utilizada por lo que brindaría una mejor estimación de tales parámetros de unión.

Los parámetros n y K_a obtenidos para los complejos PCH-CA y PCH₃₋₁₁-CA en el rango de temperaturas de 15 a 45°C se observan en las Tablas 21 y 22, respectivamente. Se obtuvieron los siguientes resultados:

- i. Para PCH-CAR, la temperatura en el rango de 15 a 35°C no ejerció ningún efecto sobre el parámetro n . Mientras que, a 45°C el valor de n aumentó favoreciendo la unión de CAR. Respecto a PCH nativa, el número de moléculas de CAR unidas a PCH₃₋₁₁ fue significativamente superior. El incremento de la temperatura, en el rango de 15 a 35°C, no ejerció ningún efecto sobre el valor de n . Luego, a 45°C, solo aumentó significativamente respecto al valor de n obtenido a 15°C y no se observaron

- diferencias con las demás temperaturas. Por otro lado, el valor de K_a obtenido para PCH nativa y PCH₃₋₁₁ fue el mismo en todo el rango de temperatura evaluado.
- ii. La unión de TIM a PCH nativa a diferentes temperaturas, no produjo cambios significativos sobre el parámetro n . Luego, el número de moléculas de TIM unidas a PCH₃₋₁₁ fue significativamente mayor y no se observaron diferencias en el rango de temperatura de 15 a 35°C. Mientras que, a 45°C, el valor de n aumentó favoreciendo la unión de TIM. Luego, el grado de afinidad (K_a) de TIM por PCH nativa y PCH₃₋₁₁ fue el mismo en todo el rango de temperaturas evaluado.
 - iii. El número de moléculas de CIN unidas a PCH nativa no varió con la temperatura y la capacidad de carga fue mayor para PCH₃₋₁₁. Por otro lado, a diferencia de lo observado con CAR y TIM, se obtuvo una mayor afinidad para el complejo PCH₃₋₁₁-CIN a 15 °C. Este efecto observado indicó que, a menor temperatura, la accesibilidad de los sitios de unión de PCH₃₋₁₁ habría aumentado, lo que le permitiría asociar una mayor cantidad de moléculas de CIN. Luego, en el rango de 25 a 45°C el valor de n y K_a fueron similares y no se observaron diferencias.

Tabla 21. Valores de n (número de moléculas de CA/monómero de PCH) correspondiente a 15, 25, 35 y 45 °C. Los valores se muestran como media (\pm desviación estándar) y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

| Sistema | Número de moléculas por monómero (n) | | | |
|--------------------------|------------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| | 15°C | 25°C | 35°C | 45°C |
| PCH-CAR | 112 (± 1) ^g | 128 (± 10) ^g | 124 (± 1) ^g | 339 (± 34) ^a |
| PCH ₃₋₁₁ -CAR | 177 (± 2) ^{e,f} | 207 (± 21) ^{d,e} | 207 (± 11) ^{d,e} | 244 (± 6) ^{c,d} |
| PCH-TIM | 115 (± 10) ^g | 139 (± 27) ^{f,g} | 134 (± 8) ^{f,g} | 152 (± 15) ^{f,g} |
| PCH ₃₋₁₁ -TIM | 233 (± 5) ^{c,d} | 264 (± 52) ^{b,c} | 245 (± 95) ^{c,d} | 306 (± 35) ^{a,b} |
| PCH-CIN | 120 (± 8) ^g | 114 (± 3) ^g | 132 (± 4) ^{f,g} | 151 (± 14) ^{f,g} |
| PCH ₃₋₁₁ -CIN | 346 (± 24) ^a | 230 (± 13) ^{c,d} | 224 (± 56) ^{c,d,e} | 222 (± 5) ^{c,d,e} |

Tabla 22. Constante de asociación (K_a) expresada en 1/molar (1/M) correspondiente a 15, 25, 35 y 45 °C, para sistemas de PCH nativa y PCH₃₋₁₁. Los valores se muestran como media, \pm desviación estándar y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

| Sistema | Ka (M ⁻¹) | | | |
|-------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| | 15°C | 25°C | 35°C | 45°C |
| PCH-CAR | $(7,47 \pm 3) \times 10^5$ ^b | $(7,33 \pm 4) \times 10^5$ ^b | $(6,70 \pm 2) \times 10^5$ ^b | $(5,30 \pm 1) \times 10^4$ ^b |
| PCH₃₋₁₁-CAR | $(2,00 \pm 1) \times 10^6$ ^b | $(3,42 \pm 3) \times 10^5$ ^b | $(2,00 \pm 0) \times 10^5$ ^b | $(2,60 \pm 2) \times 10^5$ ^b |
| PCH-TIM | $(2,56 \pm 1) \times 10^6$ ^b | $(1,60 \pm 1) \times 10^6$ ^b | $(8,60 \pm 2) \times 10^5$ ^b | $(1,40 \pm 0) \times 10^6$ ^b |
| PCH₃₋₁₁-TIM | $(1,79 \pm 1) \times 10^5$ ^b | $(8,75 \pm 7) \times 10^4$ ^b | $(3,05 \pm 3) \times 10^5$ ^b | $(5,74 \pm 2) \times 10^4$ ^b |
| PCH-CIN | $(1,36 \pm 1) \times 10^7$ ^a | $(5,82 \pm 2) \times 10^5$ ^b | $(4,61 \pm 6) \times 10^6$ ^b | $(1,67 \pm 0) \times 10^6$ ^b |
| PCH₃₋₁₁-CIN | $(4,19 \pm 1) \times 10^4$ ^b | $(5,22 \pm 3) \times 10^5$ ^b | $(1,65 \pm 1) \times 10^5$ ^b | $(2,85 \pm 2) \times 10^5$ ^b |

Por lo tanto, el tratamiento térmico de PCH nativa permitió obtener nanovehículos con mayor capacidad de carga y sin modificar el grado de afinidad de los CA. Esto podría deberse a que la agregación de la proteína, y las condiciones en que esto ocurre, modificaría el estado conformacional de la nanopartícula, y la estequiometría de los nanocomplejos se vincularía fuertemente con las condiciones estructurales que presentan los nanovehículos empleados.

Por otro lado, para apreciar la capacidad de carga de cada sistema, los valores de n fueron expresados como g de CA/g de proteínas (PCH o PCH₃₋₁₁) utilizando el modelo de Scatchard modificado (Tabla A17 del Apéndice). Los valores de n , obtenidos a 25°C, se observan en la gráfica de la Fig. 35. Tal como se discutió anteriormente, la capacidad de carga de CA fue significativamente mayor para PCH₃₋₁₁, llegando a ser de ~ un 50% más que con PCH nativa. Además, se observó una mayor capacidad de carga por parte de PCH₃₋₁₁ para TIM, mientras que para CAR y CIN fueron similares.

Una vez obtenidas las constantes de asociación de los complejos mediante la aplicación del modelo de Scatchard modificado, se evaluaron los parámetros termodinámicos que rigen su formación a través de la relación existente entre la constante de asociación y la temperatura. El signo y magnitud de los parámetros termodinámicos involucrados en la formación de los complejos PCH-CA y PCH₃₋₁₁-CA se resumen en la Tabla 23. Tal como se

observa, los valores negativos de ΔG° obtenidos a 25°C indicaron que en todos los casos la formación de complejos se llevó a cabo de manera espontánea. Las fuerzas de interacción involucradas en la formación de dichos complejos fueron analizadas a partir de los signos de los parámetros termodinámicos obtenidos de acuerdo a Ross y Subramanian (1981).

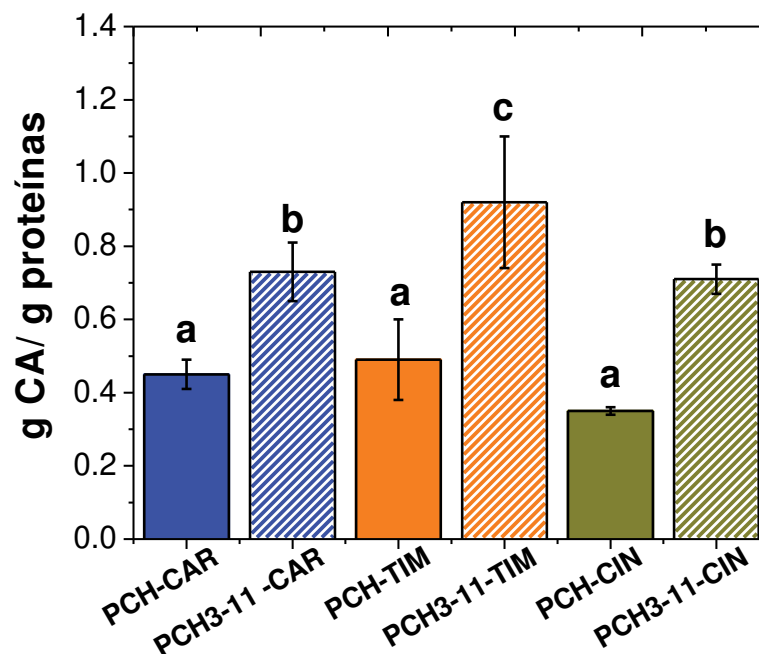


Figura 35. Gramos de CA unidos por gramo de proteínas (PCH o PCH₃₋₁₁) a 25 °C. Los valores se muestran como media, \pm desviación estándar y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Los signos negativos de ΔH° y ΔS° correspondiente a los complejos obtenidos con los compuestos CAR y TIM sugirieron una reacción de naturaleza exotérmica con interacciones de tipo van der Waals y puentes de hidrógeno. En relación a la naturaleza estructural de estos compuestos fenólicos algunos autores han descrito este tipo de interacción con otras proteínas (Abbasi y col., 2018; Chen y col., 2021; Wu y col., 2011). Por otro lado, para los complejos obtenidos con el compuesto CIN los signos positivos de ambos parámetros sugirieron una reacción de tipo endotérmica con asociaciones de tipo hidrofóbicas.

Estos resultados, indicaron que el tipo de interacción o fuerza intermolecular involucrada en la estabilización de los complejos dependieron directamente de la naturaleza química del CA.

Tabla 23. Entalpía (ΔH°), entropía (ΔS°) y energía libre de Gibbs (ΔG°) para los complejos PCH-CA y PCH₃₋₁₁-CA. Los valores se muestran como media, \pm desviación estándar y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

| Complejo | Parámetros termodinámicos | | |
|--------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| | ΔH° (J mol ⁻¹) | ΔS° (J mol ⁻¹ k ⁻¹) | ΔG° (J mol ⁻¹) |
| PCH-CAR | $(-7,0 \pm 0,9) \times 10^4$ c,d | $(-1,4 \pm 0,0) \times 10^2$ c | $(-3,2 \pm 0,1) \times 10^4$ a,b |
| PCH ₃₋₁₁ -CAR | $(-8,3 \pm 1,3) \times 10^4$ d | $(-1,7 \pm 0,4) \times 10^2$ c | $(-3,2 \pm 0,1) \times 10^4$ a,b |
| PCH-TIM | $(-4,0 \pm 0,8) \times 10^4$ b | $(-0,3 \pm 0,05) \times 10^2$ b | $(-3,1 \pm 0,8) \times 10^4$ a,b |
| PCH ₃₋₁₁ -TIM | $(-6,0 \pm 1,3) \times 10^4$ c | $(-1,3 \pm 0,2) \times 10^2$ c | $(-2,7 \pm 0,0) \times 10^4$ a |
| PCH-CIN | $(4,4 \pm 1,4) \times 10^4$ a | $(2,6 \pm 0,5) \times 10^2$ a | $(-3,3 \pm 0,1) \times 10^4$ b |
| PCH ₃₋₁₁ -CIN | $(6,2 \pm 0,3) \times 10^4$ a | $(3,1 \pm 0,1) \times 10^2$ a | $(-2,9 \pm 0,0) \times 10^4$ a,b |

4.6.3. Análisis de distribución de tamaño de partícula (PSD) y potencial ζ

A fin de evaluar la estabilidad coloidal de los complejos PCH₃₋₁₁-CA fueron caracterizados de acuerdo a su tamaño y carga neta superficial, a pH 3 y 7 del medio acuoso. Como se indicó con anterioridad, la elección de estos valores de pH se debió a que son típicos de muchos alimentos y porque se encuentran alejados del pI de PCH (~ 5). En la [Tabla 24](#) se observa el d_H (obtenido a partir de los picos de la PSDv), volumen de cada pico en la PSDv, PdI y potencial ζ de cada complejo. En la [Fig. A8 del Apéndice](#) se muestran, además, las PSDi y PSDv para PCH₃₋₁₁-CA a pH 3 ([A-1 y A-2](#)) y pH 7 ([B-1 y B-2](#)).

Tal como se discutió anteriormente, el tratamiento térmico a pH alcalino produjo agregados PCH₃₋₁₁ de tamaño nanométrico (<100 nm) y estables coloidalmente. Luego, a pH 3 y 7 del medio acuoso, la unión de los CA a PCH₃₋₁₁ produjo un aumento significativo de los valores de d_H , lo que confirmó la formación de nanocomplejos. Además, tanto PCH₃₋₁₁ como PCH₃₋₁₁-CA evidenciaron un comportamiento monomodal ([Fig. A8 del Apéndice](#)). Se observó que:

- i. A pH 3 del medio acuoso, los complejos presentaron mayor tamaño que a pH 7. Como se indicó anteriormente, la disminución de la repulsión entre las cargas netas superficiales a este valor de pH podría explicar el aumento del tamaño de partícula.
- ii. A pH 7, se obtuvieron complejos con d_H por debajo de los 100 nm. No se observaron diferencias de d_H entre los complejos formados con CAR y TIM, mientras que el complejo de menor tamaño fue el obtenido con CIN.

Tabla 24. Valores de d_H , volumen (%), PDI y potencial ζ correspondientes a PCH_{3-11} y complejos PCH_{3-11} -CA, a pH 3 y pH 7 del medio acuoso. Los valores se muestran como media (\pm desviación estándar) y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

| | Sistema | d_H (nm) | Volumen (%) | PDI | Potencial ζ (mV) |
|-------------|------------------------------------|--------------------------------|----------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| pH 3 | PCH_{3-11} | 33 (\pm 6,2) ^e | 99,80 | 0,25 (\pm 0,0) ^a | 11,4 (\pm 1,3) ^b |
| | PCH_{3-11}-CAR | 253 (\pm 23,6) ^a | 94,50 | 0,24 (\pm 0,0) ^a | 20,3 (\pm 1,6) ^a |
| | PCH_{3-11}-TIM | 200 (\pm 18,5) ^b | 98,60 | 0,20 (\pm 0,0) ^c | 18,4 (\pm 3,7) ^a |
| | PCH_{3-11}-CIN | 198 (\pm 18,7) ^b | 98,10 | 0,23 (\pm 0,0) ^b | 16,3 (\pm 0,8) ^a |
| pH 7 | PCH_{3-11} | 30 (\pm 4,2) ^e | 99,9 | 0,25 (\pm 0,0) ^a | -12,6 (\pm 1,4) ^c |
| | PCH_{3-11}-CAR | 66 (\pm 9,1) ^c | 99,40 | 0,20 (\pm 0,0) ^c | -21,4 (\pm 4,0) ^e |
| | PCH_{3-11}-TIM | 65 (\pm 13,1) ^c | 100,00 | 0,19 (\pm 0,0) ^c | -18,3 (\pm 3,2) ^{d,e} |
| | PCH_{3-11}-CIN | 45 (\pm 6,2) ^d | 99,70 | 0,22 (\pm 0,0) ^b | -16,7 (\pm 0,6) ^{c,d} |

Finalmente, se determinó el potencial ζ de los sistemas y se observó que:

- i. A pH 3 del medio acuoso, el potencial ζ para PCH_{3-11} , presentó signo positivo ($pH < pI$), el cual no fue modificado por la unión de CA, sugiriendo que PCH_{3-11} gobernaría el comportamiento coloidal de los nanocomplejos. Sin embargo, la magnitud de los potenciales ζ para los nanocomplejos PCH_{3-11} -CA fue significativamente mayor que la de PCH_{3-11} , lo que podría estar relacionado con ligeras modificaciones conformacionales en PCH_{3-11} producto de la unión de los CA.

- ii. A pH 7 del medio acuoso, se observó el mismo comportamiento que a pH 3, pero el potencial ζ presentó signo negativo ($\text{pH} > \text{pI}$). La magnitud de los potenciales ζ para los nanocomplejos PCH₃₋₁₁-CA fue significativamente más alta que la de PCH₃₋₁₁, lo que podría estar relacionado con una exposición de residuos cargados negativamente debido a ligeras modificaciones conformacionales en PCH₃₋₁₁. Por otro lado, la unión de CIN a PCH₃₋₁₁ no alteró significativamente la carga neta superficial, lo que indicaría un menor impacto de CIN sobre la conformación de PCH₃₋₁₁.

4.6.4. Estudio de los aspectos morfológicos

Los aspectos morfológicos de PCH₃₋₁₁, antes y luego de la complejación con los CA, se estudiaron utilizando AFM. Las imágenes de fase y topográficas en 3D se muestran en la Fig. 36. Las imágenes de PCH₃₋₁₁ fueron las obtenidas anteriormente en la sección 4.5.3 (Fig. 32, B).

Como ya se discutió en la sección 4.5.3, las imágenes de fase y topográfica 3D para PCH₃₋₁₁ (Fig. 36, A) revelaron la presencia de una población mayoritaria con un diámetro de partícula estimado de ~50 nm y una población minoritaria de ~10 nm. Esta población de menor tamaño podría corresponder a PCH nativa, desnaturalizada y no agregada. Ambas poblaciones de partículas, presentaron formas algunas redondeadas, otras de tipo ovaladas y con un contorno ligeramente rugoso.

Luego, la unión de CA a PCH₃₋₁₁ (Fig. 36, B, C y D) produjo estructuras con morfología similar pero con una mayor relación diámetro/altura en comparación con PCH₃₋₁₁. Esto podría deberse a la etapa de secado en la preparación de la muestra, en la cual las partículas podrían ser aplastadas sobre la superficie de la mica, aumentando la relación diámetro/altura (Arzeni y col., 2015). Las imágenes de las muestras de PCH₃₋₁₁-CA también revelaron la presencia de una población minoritaria de ~10 nm.

En general, el tamaño de partícula estimado por AFM se correspondió con los resultados obtenidos por DLS (PSDv). Sin embargo, la población correspondiente a la de menor diámetro (~10 nm) no fue detectada por DLS, ya que estarían superpuestas con poblaciones de partículas de mayor diámetro (Bhattacharjee, 2016). Respecto a los resultados obtenidos, Rao y col. (2020) observaron una morfología similar para los complejos obtenidos con nanopartículas de PCH (obtenidas por gelificación y sonicación) y CAR.

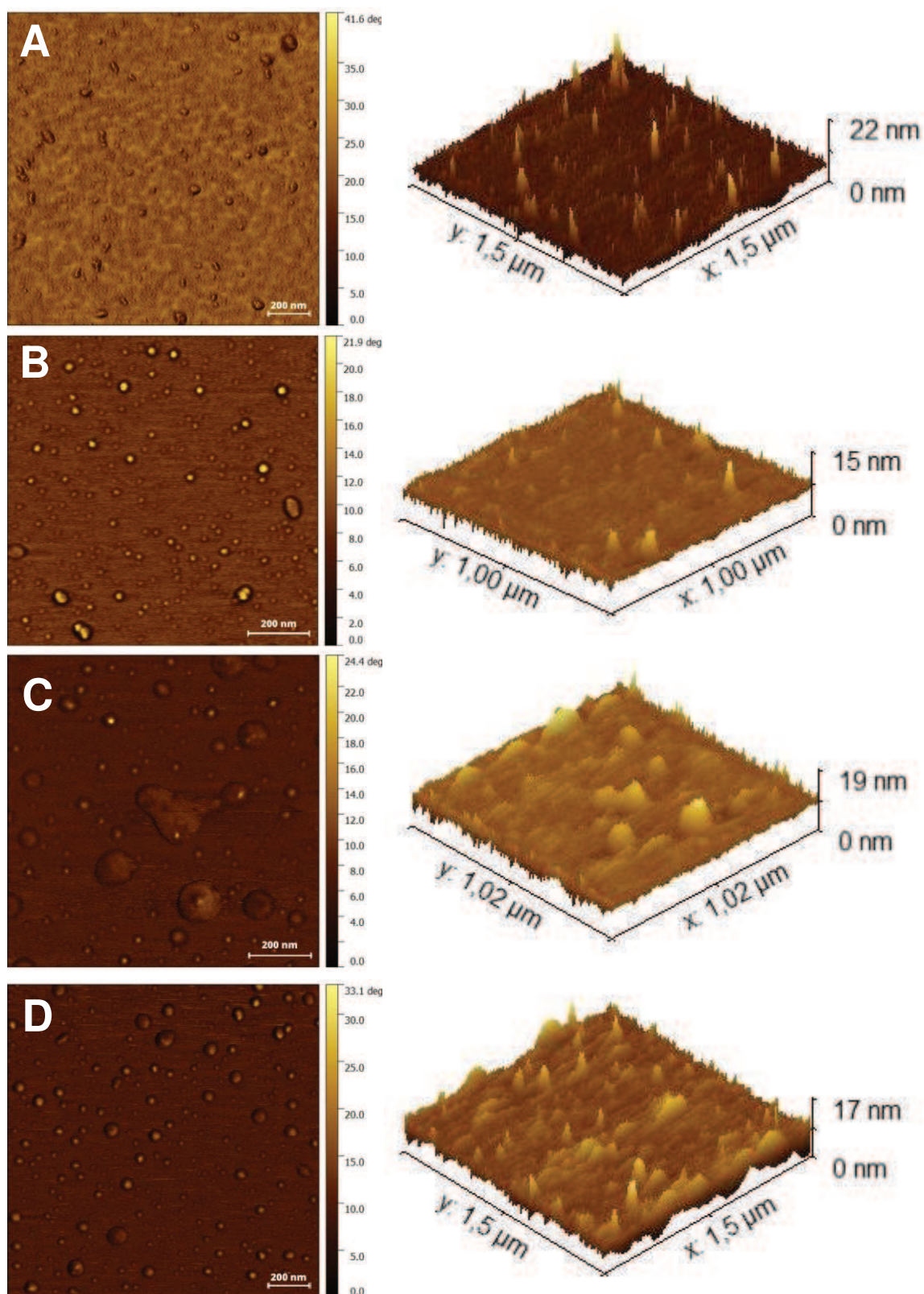


Figura 36. Imágenes de AFM de fase y topográficas en 3D para PCH₃₋₁₁ (A) y PCH₃₋₁₁-CAR (B), PCH₃₋₁₁-TIM (C) y PCH₃₋₁₁-CIN (D).

4.6.5. Eficiencia de encapsulación (EE)

Con el objetivo de conocer la cantidad de CA encapsulado por PCH₃₋₁₁ y su potencial aplicación en matrices alimentarias, se calculó la EE (Tabla 25). Para todos los nanocomplejos PCH₃₋₁₁-CA, los valores de EE fueron superiores al 83%, lo que sugiere que el proceso de encapsulación de CA se desarrolló con éxito. El mayor valor de EE se obtuvo para el nanocomplejo PCH₃₋₁₁-CIN, mientras que para los nanocomplejos PCH₃₋₁₁-CAR y PCH₃₋₁₁-TIM no se observaron diferencias significativas.

Algunos autores han reportado valores de EE para estos CA que fueron encapsulados en distintas matrices biopoliméricas. Por ejemplo, recientemente se ha evaluado la encapsulación de CAR en nanopartículas de PCH (obtenidas por gelificación y sonicación), logrando una EE de 51,41 % (Rao y col., 2020). Pan y col. (2014), encapsularon TIM en caseinato de sodio a través de homogeneización de alto esfuerzo de corte, lo que produjo un 89 % de EE. Wu y col. (2012) evaluaron la encapsulación de TIM y CAR en nanopartículas de zeína alcanzando para ambos un 80% de EE. CIN se encapsuló en nanopartículas biopoliméricas a base de proteína de suero de leche, dextrano y sulfato de condroitina con un 76,57 % de EE (Liu et al., 2020) y en nanopartículas de alginato-quitosano con un 72,92 % de EE (Ji et al., 2019). Las diferencias encontradas entre los valores de EE para estos CA podrían atribuirse al uso de diferentes materiales biopoliméricos y métodos de encapsulación.

Por lo tanto, se puede concluir que el método de encapsulación CA en nanopartículas PCH₃₋₁₁ resultó efectivo en comparación con otros reportados en la literatura.

Tabla 25. EE de nanocomplejos PCH₃₋₁₁-CA. Condiciones: concentración de proteínas 3% m/v, concentración de CA en etanol 4% m/v, relación volumétrica 10:1, pH 7. Los valores se muestran como media (\pm desviación estándar) y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

| Nanocomplejo | EE (%) |
|--------------------------|---------------------------------|
| PCH ₃₋₁₁ -CAR | 83,3 ($\pm 0,3$) ^a |
| PCH ₃₋₁₁ -TIM | 83,2 ($\pm 0,4$) ^a |
| PCH ₃₋₁₁ -CIN | 98,9 ($\pm 0,0$) ^b |

4.6.6. Determinación de actividad antifúngica

4.6.6.1. Ensayo de microdilución en caldo

La susceptibilidad de *A. niger* frente a las soluciones etanólicas de los CA libres y encapsulados en PCH₃₋₁₁ se observa en la [Tabla 26](#). El compuesto libre más eficaz fue CIN, seguido por TIM y CAR. Estos resultados fueron coincidentes con los obtenidos de forma preliminar por el método de pocillo ([sección 4.4](#)). La actividad antifúngica de estos compuestos frente a *A. niger* ha sido demostrada por otros autores, obteniendo resultados similares ([Abbaszadeh y col., 2014](#); [Bouddine y col., 2012](#); [Sun y col., 2020](#)).

Luego, fue evaluada la actividad antifúngica de los CA encapsulados en nanopartículas PCH₃₋₁₁. Cabe destacar que, PCH₃₋₁₁ no tuvo ningún efecto, con lo cual, la actividad observada se debió exclusivamente a los CA. Todos los nanocomplejos PCH₃₋₁₁-CA fueron eficaces frente a *A. niger*. La mayor actividad antifúngica se obtuvo con PCH₃₋₁₁-CIN, seguido por PCH₃₋₁₁-TIM y PCH₃₋₁₁-CAR, siendo este comportamiento similar al observado para los CA libres, disueltos en etanol. Sin embargo, los valores de CIM y CMF fueron mayores para los nanocomplejos. Esta reducción de la actividad antifúngica, podría deberse a que los grupos activos de las moléculas de CA estarían involucrados en la unión con las proteínas ([Ozidal y col., 2013](#)).

Tabla 26. CMI y CMF halladas por la técnica de microdilución en caldo, correspondientes a los compuestos puros CAR, TIM y CIN (en etanol absoluto), nanopartículas PCH₃₋₁₁ y nanocomplejos PCH₃₋₁₁-CA.

| | CMI (µg/mL) | CMF (µg/mL) |
|-------------------------------|-------------|-------------|
| CAR | 175 | 200 |
| TIM | 100 | 125 |
| CIN | 50 | 75 |
| PCH₃₋₁₁ | - | - |
| PCH₃₋₁₁-CAR | 450 | 500 |
| PCH₃₋₁₁-TIM | 400 | 450 |
| PCH₃₋₁₁-CIN | 175 | 200 |

4.6.6.2. Ensayo de dilución en agar

La eficacia antifúngica de los nanocomplejos PCH₃₋₁₁-CA frente a *A.niger* fue determinada también por la técnica de dilución en agar. El objetivo fue evaluar dicha eficacia en medio sólido, debido a que podrían existir diferencias en el modo de acción de los mismos (Inouye y col., 2001; Sun y col., 2020).

En primer lugar, se determinaron los valores de CMI y CMF para las soluciones etanólicas de los CA libres. Los resultados obtenidos se muestran en la [Tabla 27](#). Tal como se observa, TIM y CAR presentaron mayor actividad antifúngica, seguida por CIN. Luego, se evaluó la actividad antifúngica para los nanocomplejos PCH₃₋₁₁-CA ([Tabla 27](#)). También se examinó la actividad antifúngica de PCH₃₋₁₁ pura (sin CA) siendo esta nula. Los valores de CMI y CMF para los nanocomplejos fueron notablemente más bajos que el de los CA libres. Con lo cual, se obtuvo una mejora de las propiedades antifúngicas la cual se podría atribuir al proceso de vehiculización con PCH₃₋₁₁, lo que promovería una mayor solubilización y retención de los CA en medios sólidos y de naturaleza acuosa. Los valores más bajos de CMI y CMF se registraron para los nanocomplejos PCH₃₋₁₁-TIM y PCH₃₋₁₁-CAR, siendo este comportamiento similar al observado para las soluciones etanólicas de CA.

Tabla 27. CMI y CMF halladas por la técnica de dilución en agar, correspondientes a los compuestos puros CAR, TIM y CIN (en etanol absoluto), nanopartículas PCH₃₋₁₁ y nanocomplejos PCH₃₋₁₁-CA.

| | CMI (µg/mL) | CMF (µg/mL) |
|-------------------------------|-------------|-------------|
| CAR | 30 | 40 |
| TIM | 30 | 40 |
| CIN | 40 | 50 |
| PCH₃₋₁₁ | - | - |
| PCH₃₋₁₁-CAR | 10 | 20 |
| PCH₃₋₁₁-TIM | 10 | 20 |
| PCH₃₋₁₁-CIN | 20 | 30 |

A partir de los resultados obtenidos, utilizando ambas técnicas, fue posible comprobar la susceptibilidad de *A. niger* frente a los nanocomplejos PCH₃₋₁₁-CA. La eficacia de los CA disueltos en etanol y de PCH₃₋₁₁-CA dependió del modo de aplicación (medio sólido o líquido) y de la naturaleza química del CA. En medio líquido, el compuesto CIN resultó ser el más eficaz seguido por TIM y CAR. Mientras que en medio sólido, los compuestos CAR y TIM fueron más eficaces que CIN. La aplicación de los CA en un medio sólido, al igual que en los ensayos preliminares (sección 4.4) y como se discutió anteriormente, aumentaría su eficacia antifúngica debido a la atmósfera gaseosa que se genera dentro de la placa. Las diferencias en el modo de acción, de acuerdo a como se apliquen, es un aspecto importante a tener en cuenta posteriormente al ser aplicados como recubrimiento.

4.7. Análisis de las soluciones formadoras de recubrimiento (SFR)

Como se indicó anteriormente, la formación de un recubrimiento sobre la superficie de un alimento implica la formación de una fina película cuya matriz sea cohesiva y continua. Las PCH poseen excelentes propiedades filmogénicas. Mediante la adición de un agente plastificante y un posterior proceso de evaporación del solvente (*casting*) es posible la obtención de películas (Gennadios y col., 1996; Handa y col., 1999a).

Por lo tanto, para la elaboración de RC antifúngicos se continuó con la elaboración de SFR a base de nanocomplejos PCH₃₋₁₁-CA y glicerol (40% m/m total de proteínas). Los nanocomplejos fueron obtenidos tal como se indicó en la sección 3.2.7.5. Es importante remarcar que, la concentración de glicerol fue derivada de la realización de una serie de ensayos preliminares, los que contemplaron el estudio de diferentes concentraciones (30, 40 y 50 % m/m total de proteínas) y que consistió en la distribución de un volumen de SFR sobre un soporte de vidrio y teflón. Luego se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas, para luego realizar una observación visual de las películas obtenidas. El criterio de selección se basó en aspectos relacionados a su apariencia. El objetivo fue obtener un recubrimiento homogéneo, cuya concentración de glicerol asegure la obtención de una matriz que no sea frágil o quebradiza ni presente excesiva pegajosidad debido al carácter higroscópico del glicerol (Lee y col., 2013).

Las SFR obtenidas se observan en la Fig. 37. Además, las Fig. 38 y 39 muestran imágenes de la apariencia visual de los recubrimientos obtenidos a partir de las SFR formuladas con: PCH₃₋₁₁ + glicerol (SFR); PCH₃₋₁₁-CAR + glicerol (SFR-CAR); PCH₃₋₁₁-

TIM + glicerol (SFR-TIM); y PCH₃₋₁₁-CIN + glicerol (SFR-CIN). También fueron evaluadas las soluciones de nanocomplejos PCH₃₋₁₁-CA sin glicerol.

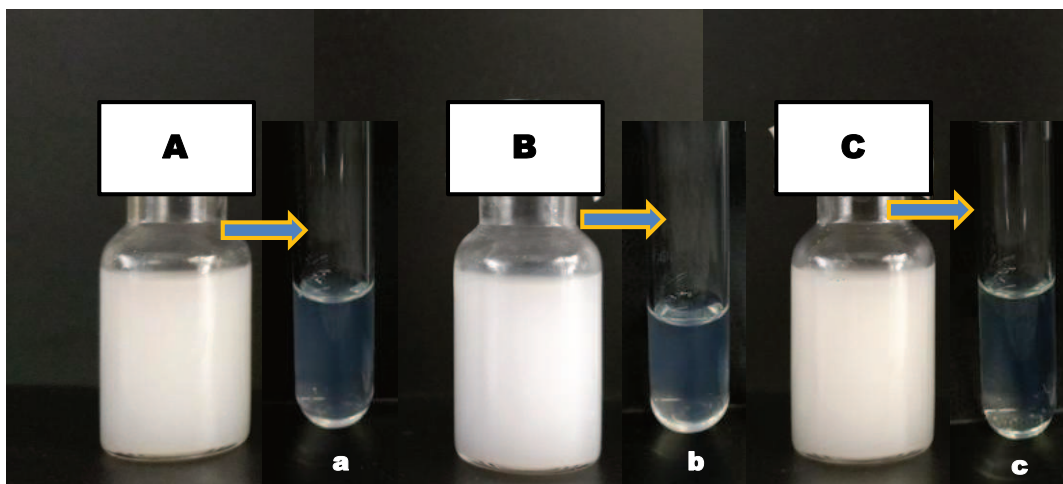


Figura 37. SFR formuladas con PCH₃₋₁₁-CAR (A), PCH₃₋₁₁-TIM (B), PCH₃₋₁₁-CIN (C) y glicerol como aditivo plastificante. Las imágenes referenciadas con letra minúscula corresponden a sus respectivas diluciones (1 mL de SFR en 10mL de buffer fosfato).

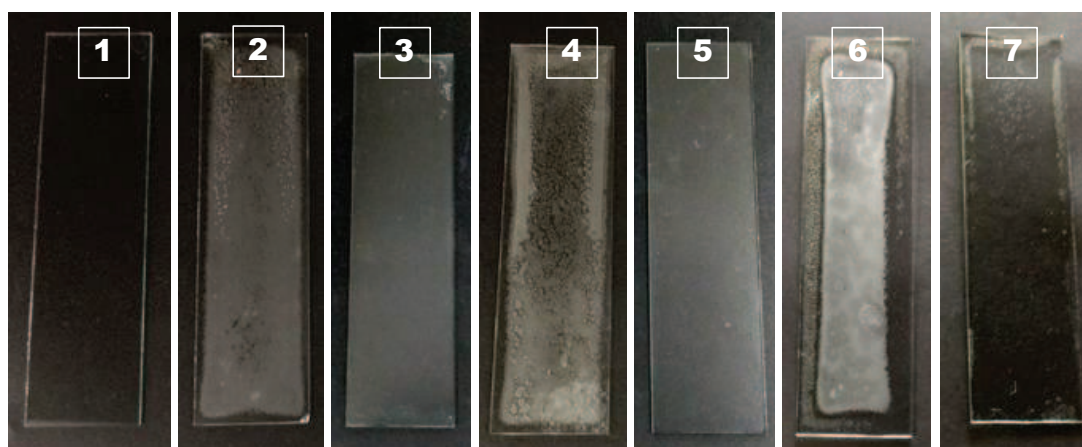


Figura 38. Apariencia visual de las soluciones de nanocomplejos (sin glicerol) y de las SFR luego del secado sobre superficie de vidrio (T° amb., 24 h). Las imágenes corresponden a: superficie de vidrio sin nada (1), con PCH₃₋₁₁-CAR (2), SFR-CAR (3), PCH₃₋₁₁-TIM (4), SFR-TIM (5), PCH₃₋₁₁-CIN (6) y SFR-CIN (7).

En todos los casos, la adición de glicerol aportó homogeneidad y permitió cubrir de manera uniforme toda la superficie. Este último es un requisito importante que deben cumplir los recubrimientos (Suhag y col., 2020). Los recubrimientos obtenidos con SFR-CAR y SFR-TIM resultaron ligeramente opacos (Fig. 38, 3 y 5). Además, los recubrimientos formados sobre las superficies de teflón pudieron despegarse, obteniéndose material con buena plasticidad (Fig. 39, C-1 y C-2). Por otro lado, el recubrimiento obtenido con SFR-CIN

presentó una coloración amarilla, un aspecto más irregular, translúcido y ligeramente quebradizo (Fig. 38, 7). Esta característica pudo evidenciarse al despegarlo de la superficie de teflón (Fig. 39, C-3).

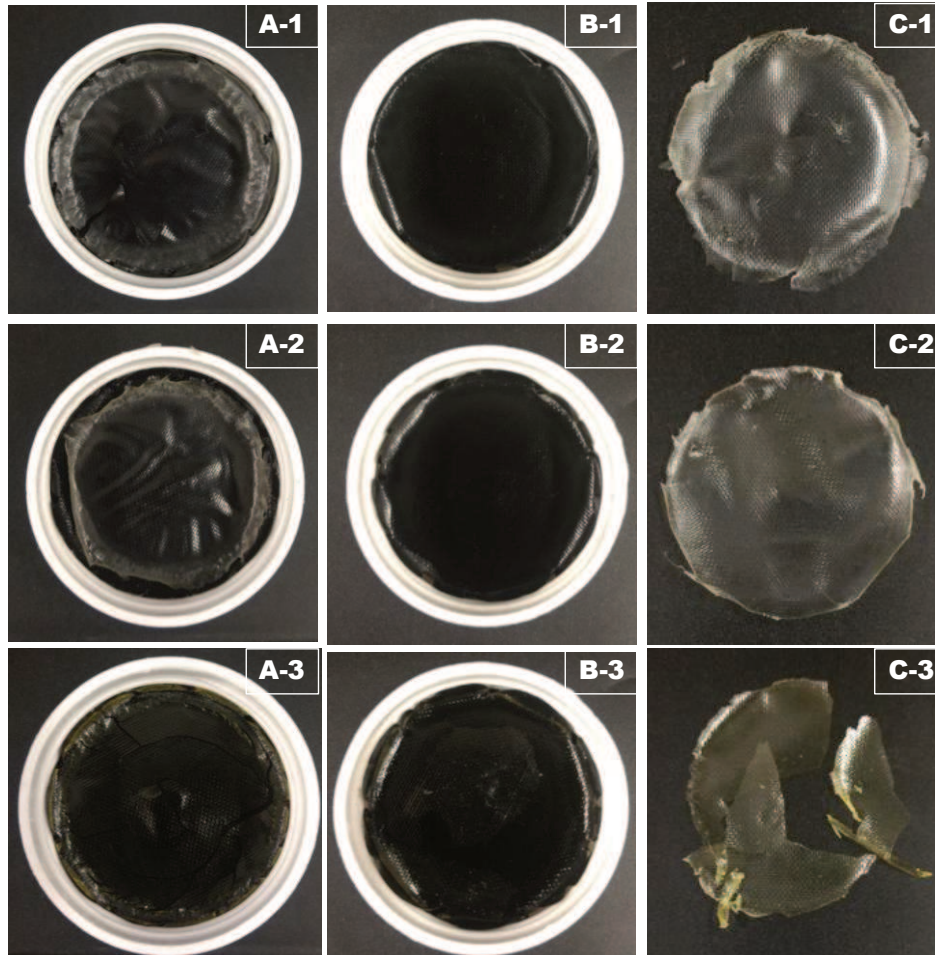


Figura 39. Apariencia visual de de las soluciones de nanocomplejos (sin glicerol) y de las SFR luego del secado sobre superficie de teflón (temperatura ambiente., 24 h). Las imágenes corresponden a: PCH3-11-CAR (A-1), FR-CAR (B-1), película SFR-CAR despegada (C-1); PCH₃₋₁₁-TIM (A-2), SFR-TIM (B-2), película SFR-TIM despegada (C-2); y PCH₃₋₁₁-CIN (A-3), SFR-CIN (B-3), película SFR-CIN despegada (C-3).

Por lo tanto, a partir de estos resultados, en la presente tesis se hipotetizó que el recubrimiento de productos panificados con estas SFR podría conducir a un comportamiento similar.

4.8. Evaluación de los panes luego de la aplicación de las SFR

4.8.1. Humedad y actividad acuosa (a_w)

La evaluación de estos parámetros es relevante ya que la naturaleza acuosa de las SFR podría afectar la calidad microbiológica de los panes sin conservantes. Los resultados de humedad (% m/m) se muestran en la [Tabla 28](#). Como se puede observar, la aplicación de las SFR no produjo un incremento en el porcentaje de humedad el día 0. Por otro lado, luego de 7 días de almacenamiento, todas las muestras presentaron una pérdida significativa de humedad.

Tabla 28. Contenido de humedad de los panes sin SFR (control) y con las SFR el día de elaboración (día 0) y 7 días después del almacenamiento a 25 °C (día 7). Los valores se muestran como media (\pm desviación estándar) y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

| Muestras de pan | Humedad (%) | |
|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | Día 0 | Día 7 |
| Sin SFR | 33,6 ($\pm 0,7$) ^a | 30,4 ($\pm 0,5$) ^e |
| SFR | 33,5 ($\pm 0,4$) ^{a,b} | 30,8 ($\pm 0,1$) ^{d,e} |
| SFR-TIM | 32,2 ($\pm 1,2$) ^{b,c} | 30,5 ($\pm 0,6$) ^e |
| SFR-CAR | 32,8 ($\pm 0,6$) ^{a,b} | 30,1 ($\pm 0,1$) ^e |
| SFR-CIN | 31,6 ($\pm 0,5$) ^{c,d} | 30,2 ($\pm 0,3$) ^e |

Luego, fueron analizados los valores de a_w de la corteza y miga de pan, cuyos resultados se observan en la [Tabla 29](#). La aplicación de las SFR el día 0, produjo un aumento significativo del a_w en la corteza, mientras que el a_w de la miga no sufrió modificaciones. Esto indicaría que el tratamiento superficial de los panes con las SFR, no produjo una migración de agua hacia el interior del mismo. Luego de 7 días de almacenamiento, el a_w de la corteza de los panes sin SFR y con SFR (sin CA), aumentó significativamente. Mientras que, el valor de a_w de la corteza de los panes tratados con SFR-CA se mantuvo sin cambios respecto al día 0 y no se observaron diferencias significativas entre las mismas. Además, no se observaron diferencias significativas en el a_w de la corteza de los panes con y sin SFR. Por otra parte, el

a_w de la miga luego de 7 días de almacenamiento disminuyó significativamente en todas las muestras por igual.

Los cambios observados en el contenido de humedad y a_w de las muestras luego de 7 días de almacenamiento, podrían estar directamente relacionados con el deterioro físico (envejecimiento) que sufren los productos panificados. Principalmente debido a la migración de humedad y retrogradación del almidón. Así, el contenido de agua aumenta gradualmente en la corteza mientras que decrece en la miga (Aguirre y col., 2011; Ding y col., 2019; Gray y Bemiller, 2003). Por lo tanto, a partir de los resultados obtenidos, se dedujo que la aplicación de las SFR no tuvo influencia en el proceso normal de envejecimiento de las piezas de pan.

Tabla 29. Valores de a_w (corteza y miga) de los panes sin SFR (Control) y con las SFR, el día de elaboración (día 0) y 7 días después del almacenamiento a 25 °C (día 7). Los valores se muestran como media (\pm desviación estándar) y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

| Muestras de pan | a_w (corteza) | | a_w (miga) | |
|-----------------|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| | Día 0 | Día 7 | Día 0 | Día 7 |
| Sin SFR | 0,91 ($\pm 0,00$) ^d | 0,92 ($\pm 0,00$) ^{a,b,c} | 0,95 ($\pm 0,00$) ^a | 0,94 ($\pm 0,00$) ^{b,c} |
| SFR | 0,92 ($\pm 0,00$) ^c | 0,93 ($\pm 0,00$) ^a | 0,95 ($\pm 0,00$) ^a | 0,94 ($\pm 0,00$) ^b |
| SFR-TIM | 0,92 ($\pm 0,00$) ^{a,b,c} | 0,92 ($\pm 0,00$) ^{b,c} | 0,95 ($\pm 0,00$) ^a | 0,93 ($\pm 0,00$) ^c |
| SFR-CAR | 0,92 ($\pm 0,00$) ^{a,b,c} | 0,93 ($\pm 0,00$) ^{a,b} | 0,95 ($\pm 0,01$) ^a | 0,94 ($\pm 0,00$) ^{b,c} |
| SFR-CIN | 0,92 ($\pm 0,00$) ^{b,c} | 0,92 ($\pm 0,00$) ^{a,b,c} | 0,95 ($\pm 0,00$) ^a | 0,93 ($\pm 0,00$) ^c |

Por otro lado, es importante señalar que los estudios sobre el efecto de RC de naturaleza biopolimérica sobre las características de productos panificados son escasos. Por ejemplo, Soukoulis y col. (2014), aplicaron RC probióticos a base de alginato de sodio y mezclas de proteína de suero con alginato de sodio sobre la corteza de pan. Luego de 7 días de almacenamiento, observaron que los valores de humedad y a_w de la corteza y la miga no se vieron afectados por los recubrimientos. Sin embargo, Altamirano-Fortoul y col. (2012) encontraron que la aplicación de un RC a base de almidón sobre la corteza del pan, provocó un aumento significativo en la humedad y a_w de la corteza después de 24 h de

almacenamiento. En ambos casos, los recubrimientos fueron aplicados por pincelado, con lo cual, esto indicaría que los cambios en estos parámetros dependerían, en parte, de la composición del recubrimiento utilizado.

4.8.2. Análisis de textura y color

En productos panificados, los atributos de textura son características que los consumidores aprecian. El pan es un alimento que pierde rápidamente su textura deseable y cualidades de sabor asociadas con la frescura. Cuando se almacenan a temperatura ambiente, la mayoría de los panes o productos de panadería con una miga esponjosa sufren un deterioro progresivo y a menudo rápido de la calidad, comúnmente conocido como envejecimiento (Angioloni y Collar, 2009). Por ello, el impacto de las SFR sobre las propiedades texturales de las muestras de pan de molde sin conservantes fue evaluado mediante un análisis TPA. Los valores de dureza, masticabilidad y resiliencia de las muestras de pan fueron analizados y se observan en la Fig. 40. Los demás parámetros (elasticidad, gomosidad y cohesividad) se presentan en la Fig. A9 del Apéndice.

En primer lugar, se evaluó la dureza (Fig. 40-A). En todas las muestras (incluida la muestra control, sin SFR), se evidenció un aumento significativo de la dureza luego de 7 días de almacenamiento a 25 °C, sin encontrar diferencias significativas entre las mismas. Por otro lado, se evaluó la masticabilidad como medida de la energía requerida para masticar el pan, siendo esta directamente proporcional a la dureza, cohesividad y elasticidad (Fig. A9 del Apéndice). Como se puede observar en la Fig. 40-B, la masticabilidad aumentó luego del almacenamiento, registrando el mismo comportamiento que la muestra sin SFR. Finalmente, se evaluó la resiliencia o capacidad de la muestra para su recuperación después de la deformación (Fig. 40-C). Para todas las muestras, disminuyó significativamente como resultado del aumento de la dureza. De acuerdo con los resultados obtenidos, se pudo concluir que las SFR no tuvieron impacto en las propiedades texturales de los panes sin conservantes, cuyos cambios solo podrían atribuirse al proceso de envejecimiento del pan.

Por otro lado, el color de la corteza de los panes con recubrimientos fue determinado. La apariencia de los alimentos determinada principalmente por el color de la superficie es la primera sensación que el consumidor percibe y utiliza como herramienta para aceptar o rechazar los alimentos (Castro y col., 2017).

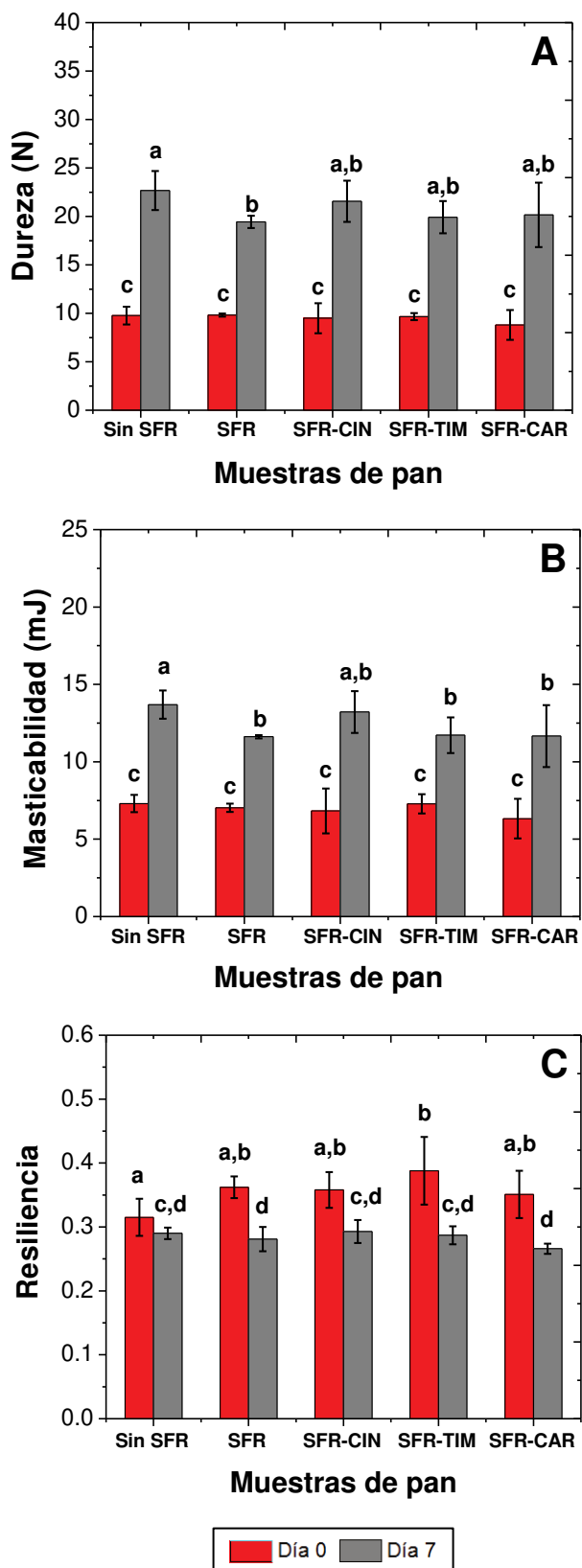


Figura 40. Parámetros de textura de las muestras de pan sin SFR (control) y recubiertas con las SFR correspondientes al día de elaboración (día 0) y 7 días después del almacenamiento a 25 °C (día 7). Los valores se muestran como media, \pm desviación estándar y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

En la [Tabla 30](#) se informan los parámetros CIE L*, a*, b* y ΔE* obtenidos. Como se puede observar, en el día 0 la aplicación de las SFR no modificó la magnitud de los parámetros L*, a*, b*.

Tabla 30. Características de color de la corteza de panes con SFR y sin SFR el día de elaboración (día 0) y luego de 7 días de almacenamiento a 25 °C. Los valores se expresan como media (± desviación estándar) y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05).

| Muestras de pan | L* | | a* | | b* | | ΔE* | |
|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------------------|
| | Día 0 | Día 7 | Día 0 | Día 7 | Día 0 | Día 7 | Día 0 | Día 7 |
| Sin SFR | 49,2 (±1,1) ^e | 51,9 (±3,5) ^{c,d} | 17,0 (±0,2) ⁱ | 15,7 (±0,7) ⁱ | 30,5 (±0,9) ^h | 30,7 (±0,8) ^h | - | - |
| SFR | 50,7 (±2,9) ^{d,e} | 53,3 (±2,6) ^c | 16,4 (±0,3) ⁱ | 15,1 (±0,7) ⁱ | 30,3 (±2,5) ^h | 30,4 (±0,7) ^h | 3,3 (±1,5) ^a | 2,5 (±1,6) ^a |
| SFR-TIM | 50,6 (±1,3) ^{d,e} | 49,2 (±1,6) ^e | 16,6 (±0,2) ⁱ | 16,0 (±0,1) ⁱ | 30,2 (±1,7) ^h | 28,8 (±0,8) ^h | 2,1 (±1,2) ^{a,b} | 3,2 (±1,7) ^a |
| SFR-CAR | 49,8 (±1,0) ^e | 52,8 (±0,3) ^c | 16,7 (±0,5) ⁱ | 15,4 (±0,2) ⁱ | 30,1 (±0,8) ^h | 30,4 (±0,3) ^h | 1,3 (±0,5) ^b | 1,0 (±0,3) ^a |
| SFR-CIN | 50,5 (±0,5) ^{d,e} | 51,8 (±1,1) ^{c,d} | 16,5 (±0,3) ⁱ | 15,7 (±0,2) ⁱ | 30,4 (±0,5) ^h | 30,1 (±0,0) ^h | 1,7 (±0,2) ^{a,b} | 1,1 (±0,3) ^a |

Luego de 7 días de almacenamiento, se observó un aumento significativo del parámetro L* (luminosidad) para el pan sin SFR, con SFR (sin CA) y con SFR-CAR. Sin embargo, los parámetros a* y b* fueron similares para las todas las muestras y no se observaron cambios significativos. Además, las diferencias de color, tanto el día 0 como 7, fueron similares para todos los panes con SFR y estuvo en el rango de 1 a 3,26. Según [Bodart y col. \(2008\)](#), un valor de ΔE* superior a 3 se considera un umbral visual para la detección de cambios de color por parte del ojo humano. Por lo tanto, la presencia de las SFR (sin CA) y SFR-CA no serían detectables a simple vista.

4.8.3. Análisis microbiológico

El recuento total de mohos y levaduras y el aspecto visual de las piezas de pan luego de 7 días de almacenamiento a 25°C se observan en las [Fig. 41 y 42](#), respectivamente.

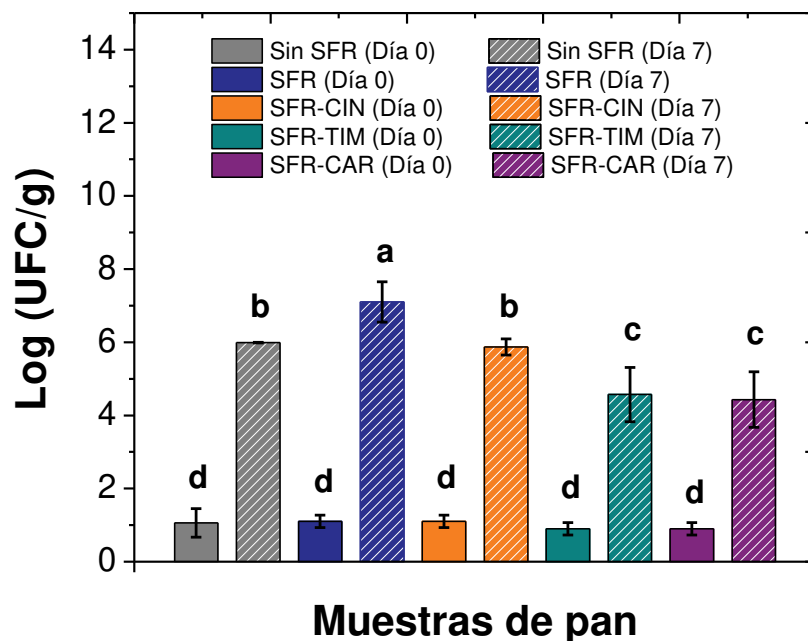


Figura 41. Recuento de mohos y levaduras (UFC/g) para panes sin SFR (control) y panes recubiertos con las SFR el día de elaboración (día 0) y 7 días después del almacenamiento a 25 °C (día 7). Los valores se expresan como media, ± desviación estándar y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

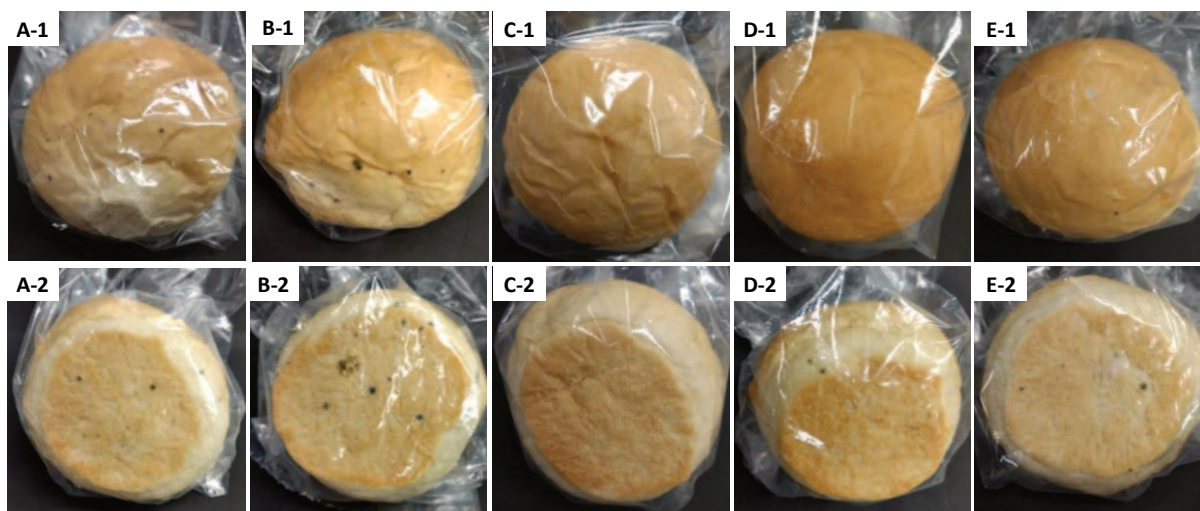


Figura 42. Aspecto visual de los panes envasados tras 7 días de almacenamiento a 25 °C. Las imágenes corresponden a las secciones superior (1) y posterior (2) de las piezas de pan sin SFR (A-1 y 2) y recubiertas con SFR (B-1 y 2), SFR-TIM (C-1 y 2), SFR-CAR (D-1 y 2), y SFR-CIN (E-1 y 2).

Como se observa en la Fig. 41, los valores de recuento el día 0 para todos los panes fueron similares. Sin embargo, después de 7 días de almacenamiento, se observó un aumento

significativo del mismo. Como se indicó anteriormente, el desarrollo fúngico en panes sin conservantes almacenados a temperatura ambiente normalmente se hace visible a los 3 o 4 días (Axel y col., 2017; Magan y col., 2012). La aplicación de la SFR (sin CA) produjo un recuento significativamente mayor que la muestra control, demostrando no tener eficacia antifúngica (Fig. 42, B). Sin embargo, los panes recubiertos con SFR-TIM y SFR-CAR mostraron los recuentos más bajos, pudiendo retrasar significativamente el desarrollo de hongos luego de 7 días de almacenamiento. Además, la apariencia visual de ambas muestras de pan fue similar (Fig. 42, C y D).

Por otro lado, los panes recubiertos con SFR-CIN mostraron un recuento similar al control, mostrando una baja eficacia antifúngica (Fig. 42, E). Estos resultados fueron consistentes con los hallados en el ensayo microbiológico de dilución en agar (sección 4.6.6.2.), destacando que la actividad antifúngica dependió de la naturaleza química del CA, siendo esta mayor para los nanocomplejos PCH₃₋₁₁-TIM y PCH₃₋₁₁-CAR y menor para PCH₃₋₁₁-CIN.

4.8.4. Análisis sensorial

Debido a la naturaleza aromática de los CA y su posible impacto en las características organolépticas de los panes con SFR, se realizó una prueba de aceptabilidad con consumidores. La evaluación sensorial juega un papel importante en el control de calidad y la comercialización de los productos alimenticios (Amerine y col., 2013; Sharif y col., 2017), por ende, el principal objetivo de la prueba hedónica aplicada fue identificar las posibles tendencias y el atractivo de los panes con SFR.

Los puntajes de la evaluación sensorial para los panes con SFR se muestran en la Tabla 31. Como puede verse, las SFR aplicadas sobre la corteza de los panes no tuvieron impacto sobre el olor, el sabor y la aceptabilidad general. Además, se consultó a los consumidores si tenían preferencia por alguna de las muestras de pan. De acuerdo a las respuestas obtenidas, el 27% de los consumidores prefirió el pan con SFR-CAR, el 22% el pan con SFR-TIM, el 20% eligió el control (sin SFR) y solo el 12% el pan con SFR-CIN. El porcentaje restante (19%) de los consumidores no indicaron preferencia por ninguna muestra en particular. En general, la mayoría de los consumidores percibieron que las muestras tenían un aroma especiado y un sabor picante residual, particularmente aquellas con SFR-CAR y SFR-TIM. Por otro lado, no se detectó el olor y sabor que aporta la clara de huevo.

Tabla 31. Puntuación obtenida para las muestras de pan con y sin SFR. Los valores se expresan como media (\pm desviación estándar) y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

| Muestras de pan | Olor | Sabor | Aceptabilidad global |
|-----------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Sin SFR | 6,7 ($\pm 1,4$) ^a | 6,4 ($\pm 1,7$) ^a | 6,6 ($\pm 1,4$) ^a |
| SFR-CAR | 6,8 ($\pm 1,6$) ^a | 6,6 ($\pm 1,6$) ^a | 6,6 ($\pm 1,5$) ^a |
| SFR-TIM | 6,8 ($\pm 1,5$) ^a | 6,7 ($\pm 1,6$) ^a | 6,8 ($\pm 1,6$) ^a |
| SFR-CIN | 6,6 ($\pm 1,5$) ^a | 6,7 ($\pm 1,2$) ^a | 6,7 ($\pm 1,4$) ^a |

4.9. Obtención y caracterización de PA

En base a los resultados obtenidos con las SFR en la [sección 4.7](#), se continuó con el desarrollo y caracterización de PA a partir de soluciones filmogénicas (SF) formuladas a base de nanocomplejos y glicerol.

Para la obtención de PA se realizaron algunas modificaciones. En primer lugar, fueron utilizadas nanopartículas producidas por tratamiento térmico (85°C, 5min) en un reactor discontinuo. Para ello se utilizó 1 L de solución de PCH con mayor concentración proteica (5% m/m) y a pH 11,4 (PCH_{5-11,4}). Cabe destacar, que no fue posible utilizar concentraciones proteicas mayores debido a que el tratamiento térmico de soluciones de PCH con una concentración proteica por encima del 5% m/m produce la gelificación del sistema ([Sponton y col., 2020](#)). Por otro lado, solo fueron empleados los compuestos TIM y CAR, debido a que las SFR formuladas con CIN formaron películas frágiles y quebradizas ([Fig. 39](#)). Luego, los nanocomplejos fueron obtenidos a pH 11,5 y la relación de volúmenes de solución de PCH_{5-11,4} y solución etanólica de CA utilizada fue 10:1,5, respectivamente. Estas condiciones, fueron seleccionadas por los siguientes motivos:

- ✓ El cambio de escala en la producción de nanopartículas permitió disponer de un mayor volumen de nanopartículas producidas en menor tiempo. A diferencia de los RC, la obtención de PA requiere de mayores volúmenes.

- ✓ El aumento de la concentración proteica (PCH₃₋₁₁ versus PCH_{5-11,4}) promovería la formación de una matriz más reforzada o con mejores propiedades mecánicas, debido a un mayor número de grupos SH (Gennadios y col., 1996; Handa y col., 1999a).
- ✓ El pH al cual se obtuvieron los nanocomplejos, fue seleccionado en base a la bibliografía existente sobre producción de películas de PCH por *casting* (sección 1.5.3). De acuerdo a Handa y col. (1999a), a pH 11,5 se expone un número mayor de grupos SH y se obtiene como consecuencia, una mejora de las propiedades mecánicas de películas de PCH.

Por otro lado, las condiciones de secado para la obtención de las PA por *casting* (40°C, 48 h) fueron seleccionadas, en base a pruebas preliminares, con el objetivo de acelerar el proceso de secado.

4.9.1. Obtención y caracterización de complejos PCH_{5-11,4}-CA

Los nanocomplejos PCH_{5-11,4}-CA fueron preparados utilizando el mismo procedimiento que para los nanocomplejos PCH₃₋₁₁-CA, pero, se incrementó la carga de los CA utilizando una relación volumétrica 10:1,5 (120 mg de CA/g de proteínas) (Fig. 43).

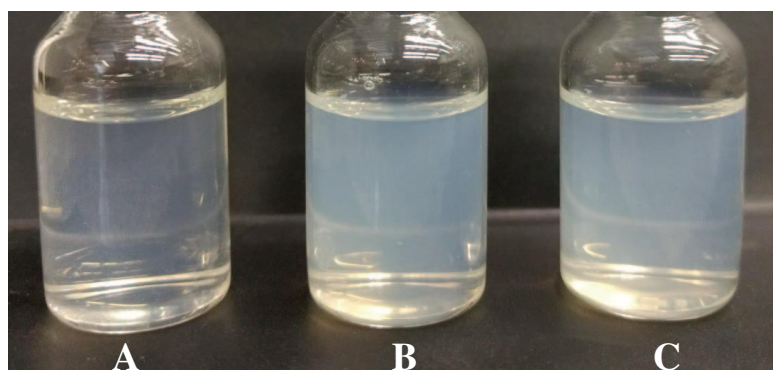


Figura 43. Soluciones de nanopartículas PCH_{5-11,4} (A), nanocomplejos PCH_{5-11,4}-CAR (B) y PCH_{5-11,4}-TIM (C).

4.9.1.1. Espectroscopia de fluorescencia intrínseca

La Fig. 44-A muestra los espectros de emisión para los sistemas PCH_{5-11,4} (control) y PCH_{5-11,4}-CA a pH 11,5. La adición de los CA promovió una disminución en la intensidad de fluorescencia de PCH_{5-11,4} sin ningún cambio en la $\lambda_{\text{max}}-\text{Trp}$ (340 nm). Como se indicó anteriormente, este fenómeno se conoce como apagamiento de la fluorescencia. Las

moléculas de CA se unirían a sitios cercanos a los residuos de Trp y la emisión de fluorescencia se reduciría gradualmente, destacando la formación del complejo proteína-ligando (Lakowicz, 2006).

4.9.1.2. Análisis de distribución de tamaño de partícula (PSD) y potencial ζ

La PSDv y el potencial ζ obtenidos se informan en la Tabla 32 y Fig. 44-B, respectivamente.

Tabla 32. Valores de diámetro hidrodinámico (d_H), potencial ζ y eficiencia de encapsulación (EE) para PCH_{5-11,4} y los complejos PCH_{5-11,4}-CA. Concentración mínima inhibitoria y fungicida (CMI y CMF) de los CA puros (en solución etanólica), PCH_{5-11,4} y complejos PCH_{5-11,4}-CA. Los valores se expresan como media (\pm desviación estándar) y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

| Sistema | d_H (nm) | Potencial ζ (mV) | EE (%) | MIC (mg/mL) | MFC (mg/mL) |
|----------------------------|-------------------------|------------------------------|-----------------------------|-------------|-------------|
| TIM | - | - | - | 0,030 | 0,040 |
| CAR | - | - | - | 0,030 | 0,040 |
| PCH _{5-11,4} | 23 \pm 4 ^b | -27,9 \pm 2,1 ^a | - | - | - |
| PCH _{5-11,4} -TIM | 31 \pm 6 ^a | -28,1 \pm 1,5 ^a | 81,0 \pm 2,8 ^a | 0,300 | 0,400 |
| PCH _{5-11,4} -CAR | 18 \pm 3 ^b | -27,9 \pm 1,9 ^a | 83,1 \pm 3,3 ^a | 0,300 | 0,400 |

En general, se obtuvieron nanocomplejos coloidalmente estables. Como se puede observar en la Fig. 44-B, para todos los sistemas se registró un comportamiento monomodal en PSDv con picos a 23 \pm 4 nm (PCH_{5-11,4}), 31 \pm 6 nm (PCH_{5-11,4}-CAR) y 18 \pm 3 nm (PCH_{5-11,4}-TIM). De acuerdo con la Tabla 32, respecto al control (PCH_{5-11,4}), la adición de TIM no produjo cambios significativos en el tamaño del nanocomplejo. Mientras que, el tamaño del nanocomplejo PCH_{5-11,4}-CAR fue significativamente mayor. Además, como era de esperar, tanto PCH_{5-11,4} como los nanocomplejos obtenidos, mostraron valores de potencial ζ negativos a pH 11,5 (pH > pI), y la adición de los CA no produjo cambios significativos en el potencial ζ del control, lo que sugiere que el comportamiento coloidal de los nanocomplejos se vería gobernado por PCH_{5-11,4}.

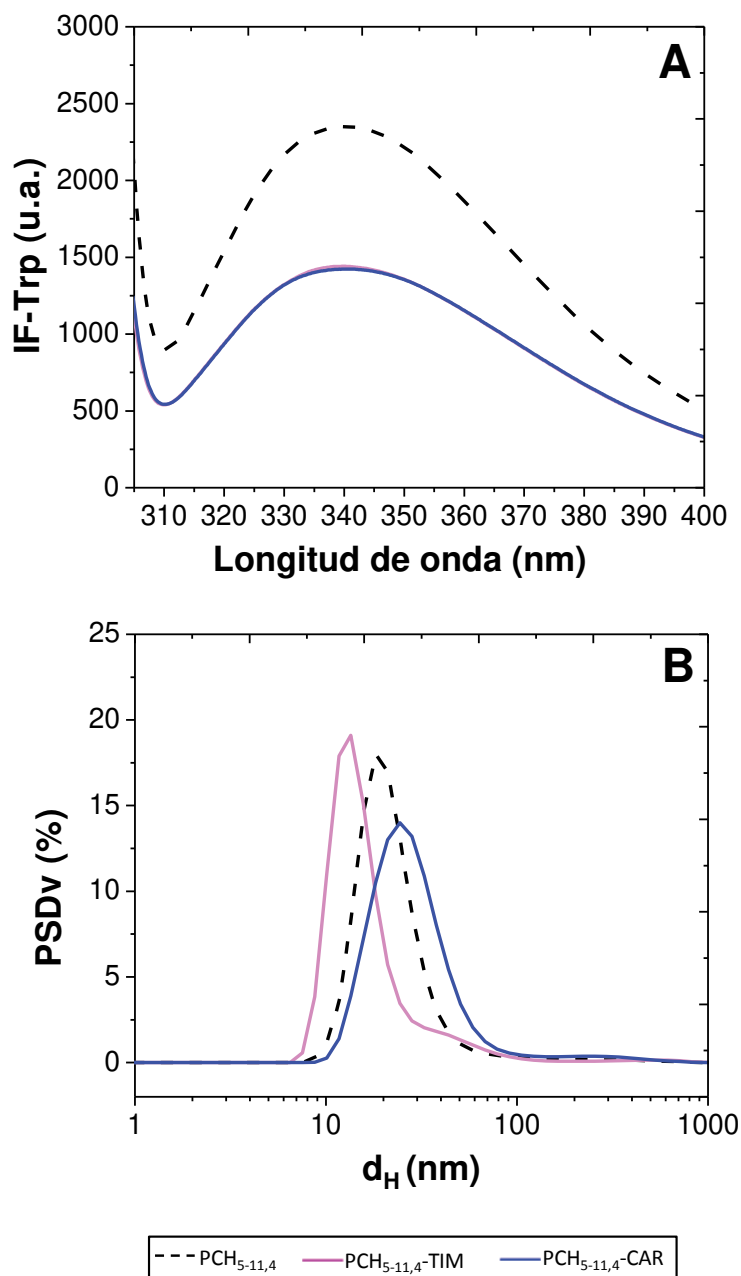


Figura 44. Espectros de fluorescencia intrínseca (A) y PSDv (B) de PCH_{5-11,4}, PCH_{5-11,4}-CAR y PCH_{5-11,4}-TIM. Condiciones: concentración proteica y de CA (0,043 y 0,00516 mg/mL para análisis de fluorescencia; 1 mg/mL y 0,12 mg/mL para análisis de tamaño de partículas), pH 11,5 y temperatura 25°C.

4.9.1.3. Eficiencia de encapsulación (EE)

Para conocer la cantidad de CA encapsulados por las nanopartículas PCH_{5-11,4} se determinó la EE (Tabla 32). Para ambos nanocomplejos PCH_{5-11,4}-CA, los valores de EE fueron superiores al 80%, lo que sugiere que el proceso de encapsulación de CA fue exitoso.

No se observaron diferencias significativas entre los valores de EE para los sistemas PCH_{5-11,4}-TIM y PCH_{5-11,4}-CAR.

Por otra parte, los resultados obtenidos fueron similares a los hallados para los complejos PCH₃₋₁₁-CA (sección 4.6.5). Esto podría sugerir que las condiciones de obtención de PCH_{5-11,4} con respecto a las de PCH₃₋₁₁, tales como la concentración proteica (5% versus 3% m/m) y el pH al cual se obtuvieron los nanocomplejos (11,5 versus 7) no produjeron cambios estadísticamente significativos ($p < 0,05$) en la EE. Además, el contenido de CA en los nanocomplejos formados con PCH₃₋₁₁ (133 mg/g proteínas) y PCH_{5-11,4} (120 mg/g de proteínas) no tuvo influencia en los resultados de EE.

4.9.1.4. Determinación de la actividad antifúngica

Las propiedades antifúngicas de los nanocomplejos PCH_{5-11,4}-CA se evaluaron contra *A. niger* mediante la prueba de dilución en agar. Los CA puros disueltos en etanol y solución acuosa de PCH_{5-11,4} (sin CA) se incluyeron como controles. Los resultados se muestran en la Tabla 32. Para los CA puros disueltos en etanol absoluto, se registraron valores iguales de CMI y CMF. Además, la posterior encapsulación en nanopartículas PCH_{5-11,4} promovió la obtención de nanocomplejos con actividad antifúngica, mientras que PCH_{5-11,4} no tuvo ningún efecto. La eficacia antifúngica frente a *A. niger* fue igual para ambos nanocomplejos.

A diferencia de los CA puros disueltos en etanol, se requirió una mayor concentración de PCH_{5-11,4}-CA. Este comportamiento podría deberse a la forma en que difunden los CA en forma libre o encapsulados en PCH_{5-11,4}. Tal como se discutió anteriormente en la sección 4.4, la disolución en etanol facilita la volatilización de CA, generando una atmósfera inhibitoria dentro de la placa. Sin embargo, el proceso de encapsulación en nanopartículas PCH_{5-11,4} reduciría significativamente la volatilidad y, en consecuencia, la eficacia antifúngica de los CA encapsulados en PCH_{5-11,4}. Se ha demostrado que se requieren mayores concentraciones de compuestos activos para inhibir el crecimiento micelial por contacto directo con respecto al producido en fase vapor (Suwanamornlert y col., 2018).

Por otro lado, la actividad antifúngica de los nanocomplejos formados con PCH₃₋₁₁ a pH 7 fue mayor. En primer lugar, el contenido de CA para cada tipo de nanocomplejo fue diferente (133 mg/g para PCH₃₋₁₁-CA y 120 mg/g para PCH_{5-11,4}-CA). Esto indicaría que, al incrementar la concentración de proteínas y disminuir el contenido de CA podría haber una mayor retención de los CA por parte de las mismas. Por ende se necesitaría una mayor concentración de nanocomplejo para inhibir el desarrollo de *A. niger*. Luego, de acuerdo a los

resultados de fluorescencia, el modo o sitio de unión de los CA a cada tipo de nanopartícula y pH es diferente. Con lo cual, los grupos que ejercen actividad antifúngica, tales como el grupo $-OH$, podrían estar unidos en sitios diferentes, modificando de esta forma su eficacia antifúngica.

En conclusión, si bien se requirió un mayor volumen de nanocomplejo para lograr actividad antifúngica, el proceso de vehiculización de CA en PCH_{5-11,4} no implicó la pérdida de su actividad antifúngica. Con lo cual estos nanocomplejos podrían utilizarse para la obtención de películas con actividad antifúngica.

4.9.2. Caracterización de las PA

La adición de glicerol a las soluciones de nanopartículas y nanocomplejos PCH_{5-11,4}-CA y posterior secado permitió la obtención de películas con apariencia muy similar, las cuales se observan en la Fig. 45.

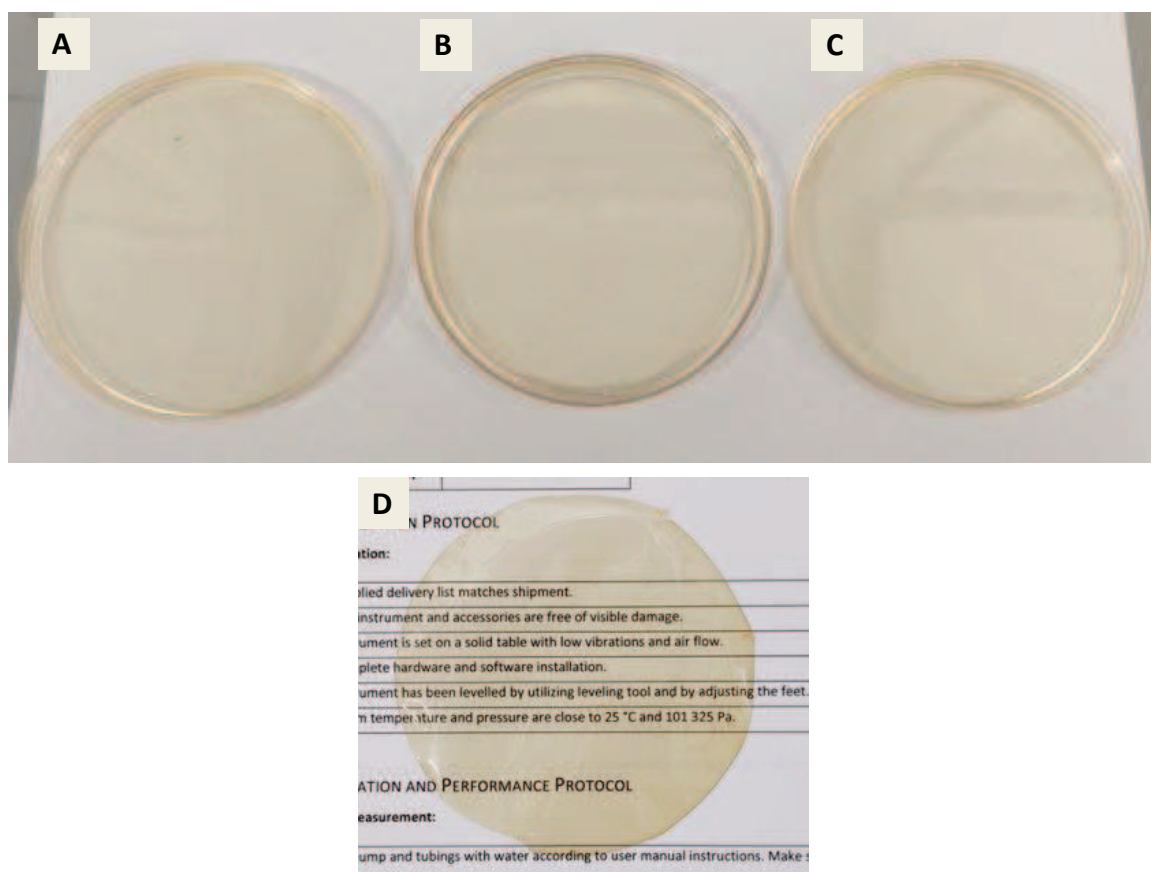


Figura 45. Aspecto visual de las películas control (A) y las PA formadas por PCH_{5-11,4}-TIM (B) y PCH_{5-11,4}-CAR (C). En la parte inferior se observa una de las películas despegadas sobre una superficie escrita para apreciar su transparencia (D).

4.9.2.1. Propiedades ópticas

El espesor y los parámetros de color obtenidos se muestran en la [Tabla 33](#). Respecto al espesor obtenido, el de la película control (PCH_{5-11,4}-Glicerol, sin CA) fue significativamente mayor que el de las PA formadas por PCH_{5-11,4}-CA. Esta diferencia podría atribuirse a un mayor contenido de agua en la película control a diferencia de las PA PCH_{5-11,4}-CA las cuales además, poseen etanol en su composición. Luego, los valores L*, a* y b* de las películas no presentaron diferencias significativas entre sí. Todas las películas mostraron una coloración amarilla como lo indica el valor b* positivo y el índice de amarillez (IA). Con respecto a la película control (PCH_{5-11,4}-Glicerol, sin CA), la diferencia de color total (ΔE^*) de las PA PCH_{5-11,4}-CAR y PCH_{5-11,4}-TIM fue < a 3, por lo tanto no sería detectada a simple vista ([Bodart y col., 2008](#)).

Tabla 33. Parámetros de color y transparencia de la película control (PCH_{5-11,4}) y las PA formadas por PCH_{5-11,4}-TIM y PCH_{5-11,4}-CAR. Los valores se expresan como media (\pm desviación estándar) y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

| Parámetro | Película | | |
|---------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| | PCH _{5-11,4} | PCH _{5-11,4} -TIM | PCH _{5-11,4} -CAR |
| Espesor (mm) | 0,3 (\pm 0,0) ^a | 0,2 (\pm 0,0) ^b | 0,2 (\pm 0,0) ^b |
| Color | | | |
| L* | 84,8 (\pm 0,9) ^a | 84,6 (\pm 1,0) ^a | 84,7 (\pm 0,8) ^a |
| a* | 0,1 (\pm 0,1) ^a | -0,04 (\pm 0,0) ^a | -0,0 (\pm 0,1) ^a |
| b* | 11,6 (\pm 1,3) ^a | 12,4 (\pm 0,4) ^a | 12,5 (\pm 0,3) ^a |
| ΔE^* | - | 1,34 (\pm 0,1) ^a | 1,1 (\pm 0,2) ^a |
| IA | 19,6 (\pm 2,4) ^a | 21,1 (\pm 0,8) ^a | 21,1 (\pm 0,8) ^a |
| Transparencia | 2,5 (\pm 0,0) ^a | 2,65 (\pm 0,0) ^b | 2,70 (\pm 0,0) ^c |

Tal como se indicó anteriormente, algunos autores han reportado la obtención de películas a partir de PCH con características ópticas similares a las obtenidas en la presente tesis. [Gennadios y col. \(1996\)](#) y [Handa y col. \(1999b\)](#) obtuvieron películas de PCH con características similares, destacando que la elaboración a partir de soluciones filmogénicas fuertemente alcalinas da como resultado la obtención de materiales biopoliméricos con coloración amarilla. En otro trabajo, [Taqi y col. \(2011\)](#) produjeron películas de PCH por

casting a 25 °C y obtuvieron valores de b^* (4.79) y de IA (7.16) inferiores a los encontrados en este trabajo. Las diferencias podrían deberse al uso de temperaturas más altas, el tiempo de secado y las condiciones alcalinas (40°C, 48 h, pH 11,5), las cuales promoverían reacciones de Maillard entre azúcares reductores y grupos amino libres presentes naturalmente en la clara de huevo (Campbell y col., 2003; Tan y col., 2021).

Luego, fue evaluada la transparencia de las películas obtenidas. En primer lugar, se registraron los valores T_{600} . Para la película control, fue de 89,20% (± 1), mientras que para las PA PCH_{5-11,4}-CAR y PCH_{5-11,4}-TIM se registraron valores de 89,64% (± 1) y 88,92% (± 1), respectivamente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las mismas. Estos resultados fueron similares a los encontrados por otros autores que estudiaron las propiedades ópticas de películas de PCH obtenidas por diferentes métodos. Lee y col. (2013) reportaron valores de transmitancia del 89% para películas de PCH obtenidas por compresión. Por otro lado, Pranata y col. (2019) informaron valores de transmitancia para películas de PCH producidas por extrusión y calandrado, superiores al 90%. Esta información indicaría que el tipo de tratamiento térmico aplicado a PCH y el método de obtención de las películas utilizado en el presente trabajo no influirían en las propiedades ópticas de las mismas.

A continuación, a partir de los valores de T_{600} y el espesor de las películas (Tabla 33), se calcularon los valores de transparencia. La película control (PCH_{5-11,4} + Glicerol) presentó mayor transparencia, seguida por la PA PCH_{5-11,4}-TIM y, por último por PCH_{5-11,4}-CAR. Esto podría relacionarse con la microestructura de las PA formadas por nanocomplejos, la cual se analiza a continuación en la siguiente sección. Los resultados de transparencia obtenidos, fueron consistentes con los encontrados por López-Mata y col. (2016), quienes reportaron valores de 2,57 (± 0) para películas de PCH obtenidas por *casting* (secado al vacío).

4.9.2.2. Microestructura

La caracterización microestructural de películas biopoliméricas es una herramienta para comprender el comportamiento y las propiedades de las mismas (Huang y col., 2020). Las imágenes de la superficie y la sección transversal de las películas obtenidas se muestran en la Fig. 46.

El proceso de formación de la película PCH_{5-11,4} (control), produjo una estructura agregada, caracterizada por una red densa y porosa (Fig. 46, A1). La imagen transversal también mostró una estructura en capas, de apariencia heterogénea, rugosa y con escasos

espacios vacíos (Fig. 46, B1). El tipo de estructura formada podría estar asociado con la naturaleza de las nanopartículas PCH_{5-11,4}. El tratamiento térmico de proteínas globulares provoca la exposición de residuos hidrofóbicos ocluidos, que son responsables del fenómeno de agregación (Sponton y col., 2015a). Luego, la eliminación del agua durante el secado provoca una mayor agregación. Se encontraron estructuras similares en películas hechas por *casting* a partir de proteínas de suero de leche tratadas térmicamente (Anker y col., 2000).

Luego, la superficie de las PA basadas en nanocomplejos PCH_{5-11,4}-CA (Fig. 46, A2 y A3) mostró una estructura con apariencia más agregada, densa y compacta. La PA PCH_{5-11,4}-CAR (Fig. 46, A3) exhibió una superficie más compacta y agrietada, lo que podría ser consistente con el tamaño de partícula encontrado para este nanocomplejo (Tabla 32). El tipo de microestructura obtenida para la PA PCH_{5-11,4}-CAR podría ser el motivo por el cual se redujo el valor de transparencia (sección 4.9.2.1.). Finalmente, en las PA formadas por PCH_{5-11,4}-CA se observó una sección transversal con características similares a las de la película control (Fig. 46, B2 y B3).

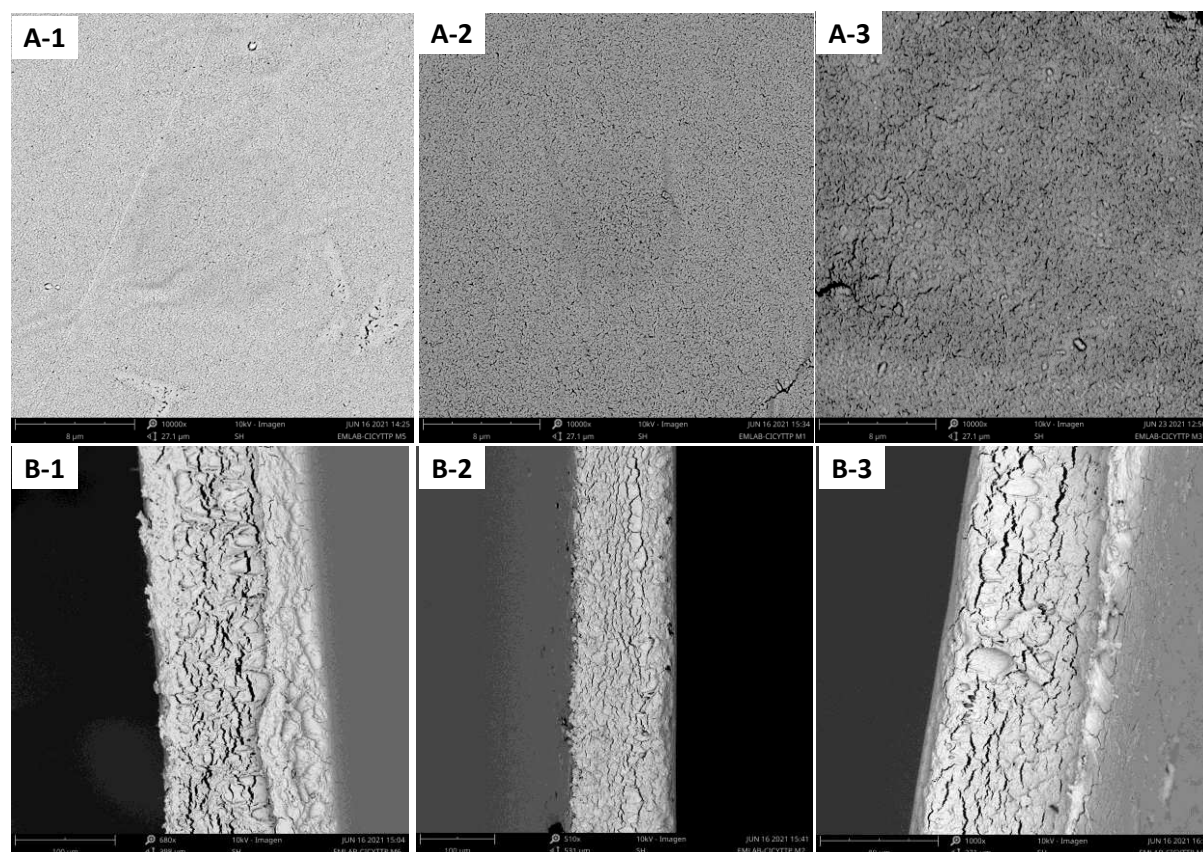


Figura 46. Imágenes de SEM de la superficie (A) y la sección transversal (B) de la película control PCH_{5-11,4} (1) y las PA formadas por PCH_{5-11,4}-TIM (2) y PCH_{5-11,4}-CAR (3).

4.9.2.3. Propiedades mecánicas

Los parámetros TS (MPa), EB (%) y EM (MPa) son los indicadores comúnmente utilizados para describir las propiedades mecánicas de películas (Nordin y col., 2020). Los valores de estos parámetros mecánicos se muestran a continuación en la Tabla 34.

Los resultados para la película control fueron consistentes con los reportados por otros autores para películas de PCH obtenidas por *casting* (Handa y col., 1999a; Handa y col., 1999b; Taqi y col., 2011). La formación de las películas de PCH se debe principalmente a los grupos SH superficiales capaces de formar enlaces SS. Handa y col. (1999a) encontraron que el tratamiento térmico de PCH en condiciones alcalinas (9% m/m, pH 11,5) promueve una mayor exposición de los grupos SH y permite la formación de enlaces SS intermoleculares por intercambio tiol-disulfuro y reacciones de oxidación tiol, impactando directamente en las propiedades mecánicas de la película. Los mismos, obtuvieron películas de PCH por *casting*, reportando valores de TS y EB de 5,28 MPa y 55,1%, respectivamente.

Tabla 34. Propiedades mecánicas de la película control (PCH_{5-11,4}) y las PA formadas por PCH_{5-11,4}-TIM y PCH_{5-11,4}-CAR. Los valores se expresan como media (\pm desviación estándar) y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

| Propiedades mecánicas | Película | | |
|-----------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | PCH _{5-11,4} | PCH _{5-11,4} -TIM | PCH _{5-11,4} -CAR |
| TS (MPa) | 5,6 (\pm 0,6) ^a | 7,6 (\pm 1,1) ^b | 8,0 (\pm 1,2) ^b |
| EB (%) | 55,9 (\pm 12,8) ^a | 32,6 (\pm 7,0) ^b | 48,0 (\pm 7,2) ^a |
| EM (MPa) | 4,2 (\pm 0,6) ^a | 7,7 (\pm 1,3) ^b | 7,3 (\pm 1,5) ^b |

Luego, con respecto a la película control (PCH_{5-11,4}), la presencia de los CA produjo cambios en sus propiedades mecánicas. Las PA formadas por PCH_{5-11,4}-CA resultaron menos flexibles (<EB), menos quebradizas (>TS) y menos rígidas (>EM). Los cambios conformacionales de las nanopartículas PCH_{5-11,4} debido a la formación de nanocomplejos y la posterior agregación tras la evaporación de agua durante el proceso de *casting* podrían producir modificaciones en la microestructura y propiedades mecánicas. En un trabajo realizado por Anker y col. (2000), se propuso una relación entre la microestructura y las propiedades mecánicas de las películas de proteína aislada de suero (WPI). Las películas se obtuvieron por *casting* a diferentes concentraciones de WPI y pH, y se observó que el modo

de agregación durante la formación de la película influyeron directamente en los parámetros TS (MPa) y EB (%). Por tanto, los resultados obtenidos podrían explicarse por los cambios conformacionales sufridos por PCH_{5-11,4} durante la complejación.

4.9.2.4. Análisis termogravimétrico (TGA)

La estabilidad térmica de la película control (PCH_{5-11,4}) y de las PA formadas por PCH_{5-11,4}-CA fue evaluada por TGA. Los resultados se muestran en la Fig. 47-A y B.

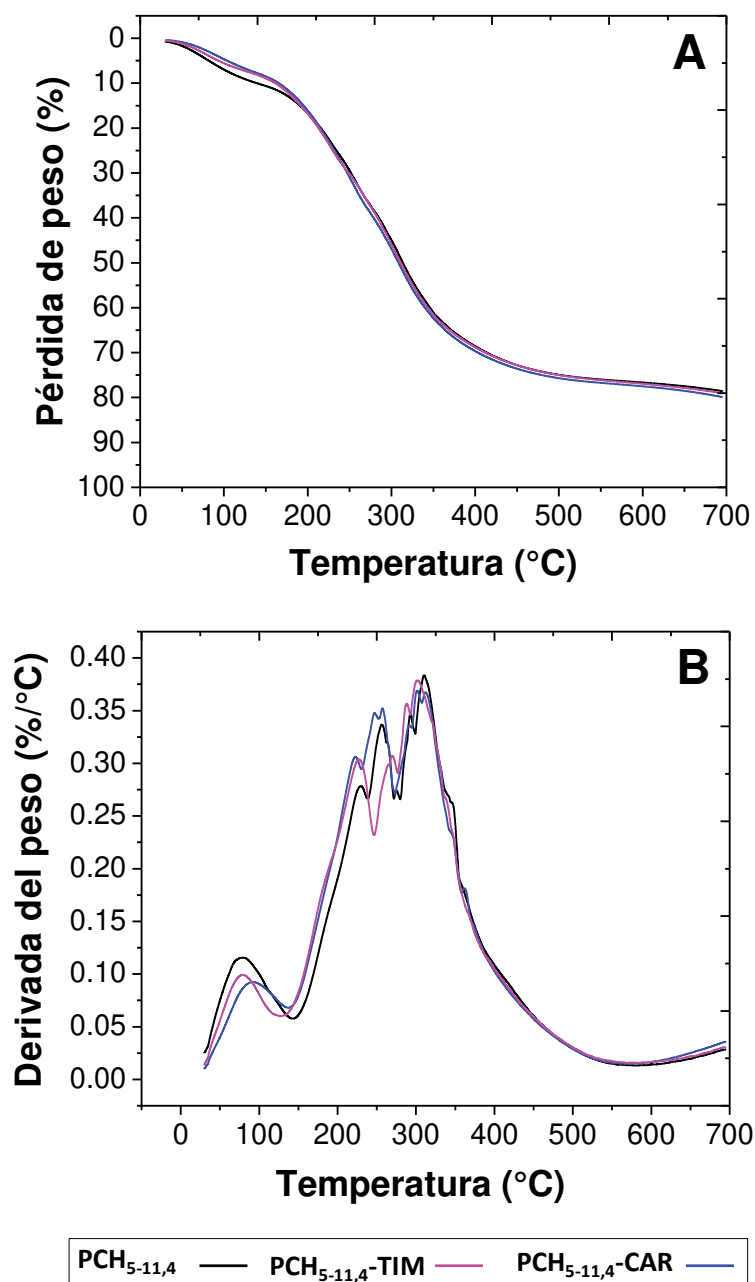


Figura 47. Termogramas TGA (A) y sus correspondientes señales derivadas de TGA (B) obtenidas para la película control (PCH_{5-11,4}) y las PA formadas por PCH_{5-11,4}-CAR y PCH_{5-11,4}-TIM.

Como puede observarse, el perfil térmico de todas las películas fue similar y la presencia de los CA no produjo cambios en la estabilidad térmica de la película PCH_{5-11,4}. Luego, a partir del análisis de la derivada, se registró un perfil con etapas de pérdida de peso durante el calentamiento (Fig. 47-B). En la primera etapa, la pérdida de peso fue relativamente pequeña hasta los 130 °C. Posteriormente, se produjo una pérdida de peso moderada durante la segunda etapa, desde los 130 °C hasta los 275 °C. Finalmente, a temperaturas más altas, la tercera etapa se caracterizó por una pérdida máxima de peso alrededor de los 310 °C. Estos cambios de peso podrían deberse a la pérdida de agua, evaporación de glicerol y degradación de proteínas, respectivamente (Fernández-Espada y col., 2016; Jones y col., 2013; Lee y col., 2013; Sharma y Luzinov, 2012). Por otro lado, según Altan y col. (2018) y Parolin y col. (2021), los compuestos CAR y TIM puros se evaporan completamente a los 170 °C. De acuerdo con la Fig. 47-B, estos eventos térmicos no se pudieron distinguir en las curvas, debido a que podrían superponerse con el evento de evaporación de agua.

4.9.2.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los eventos térmicos de las PA también fueron evaluados por DSC (Fig. 48).

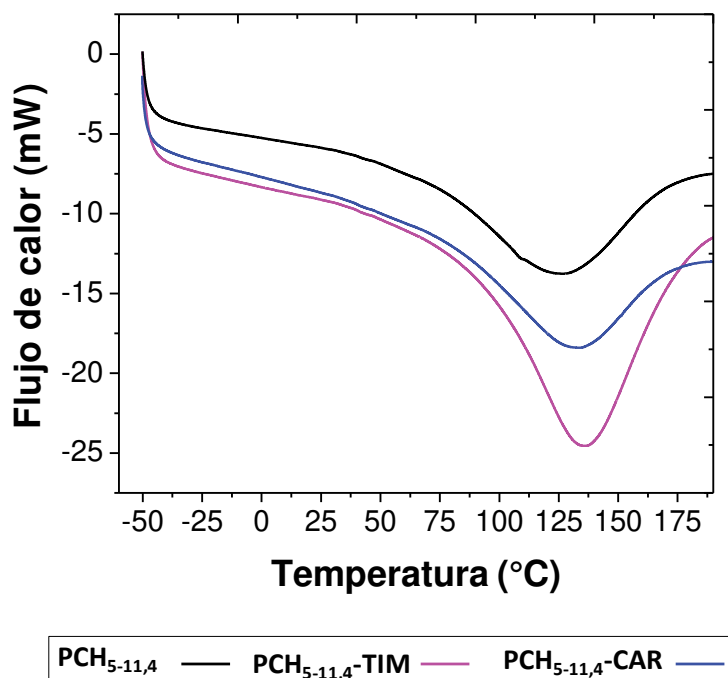


Figura 48. Termogramas DSC obtenidos para la película control (PCH_{5-11,4}) y las PA formadas por PCH_{5-11,4}-CAR y PCH_{5-11,4}-TIM.

Para todas las películas se observó el mismo comportamiento. Los termogramas mostraron un único pico endotérmico entre 112 y 150 °C. Además, las películas resultaron amorfas, como lo demuestra la ausencia de picos cristalinos. Sharma y Luzinov (2012) analizaron PCH en polvo por DSC y registraron un pico endotérmico similar alrededor de los 130-150 °C. El mismo fue atribuido a un proceso de desnaturalización que ocurrió a mayor temperatura debido al bajo contenido de agua en los polvos (5,2-7,9% m/m). Del mismo modo, Lee y col. (2013), Jones y col. (2013) y Pranata y col. (2019) informaron termogramas similares con picos endotérmicos entre los 130-150°C para películas de PCH obtenidas mediante tecnologías de compresión-moldeado y extrusión-calandrado. Por lo tanto, los picos endotérmicos observados en los termogramas de las películas obtenidas estarían relacionados un proceso de desnaturalización de las PCH.

En base a los resultados obtenidos, estas PA podrían ser adecuadas para ser utilizadas en operaciones como esterilización, procesamiento y cocción a temperaturas de hasta 140-150 °C.

4.9.2.5. Adsorción de agua (AA)

La adsorción de agua en las películas está directamente relacionada con la naturaleza de la matriz biopolimérica, su estructura y principalmente el agente plastificante utilizado (Lee y col., 2013; Lim y col., 1998).

Para evaluar la dinámica de adsorción de agua de las películas, se registraron los valores de AA (%) a diferentes HR (60, 75 y 85%) en función del tiempo (Fig. 49-A, B y C). Como se puede observar, la velocidad a la que las películas adsorbieron agua fue mayor durante las primeras horas. Luego, la AA alcanzó una meseta, lo que indicó que los sistemas se equilibraron con la HR de almacenamiento. El tiempo requerido para alcanzar el equilibrio dependió de la HR de almacenamiento, siendo mayor a HR más altas. Finalmente, luego de 72 h de almacenamiento, todas las películas alcanzaron el equilibrio.

La Fig. 49-D y la Tabla 36 muestran los valores de AA en función de la HR, los cuales se correlacionaron linealmente con la HR de almacenamiento ($R^2=0,963-0,985$). Para todas las películas, el aumento en AA fue proporcional al aumento en la HR de almacenamiento. Las PA formadas por PCH_{5-11,4}-CA, almacenadas al 60% de HR, no se vieron afectadas por el comportamiento de adsorción de agua y no se encontraron diferencias significativas entre ellas. Luego, el aumento de la HR de almacenamiento de 75 a 85% provocó una leve pero significativa disminución en la adsorción de agua de las PA de PCH_{5-11,4}-CA. Estos resultados

podrían deberse a la naturaleza hidrofóbica de los CA, lo que afectaría el balance hidrofílico/hidrofóbico de las películas (Li y col., 2020).

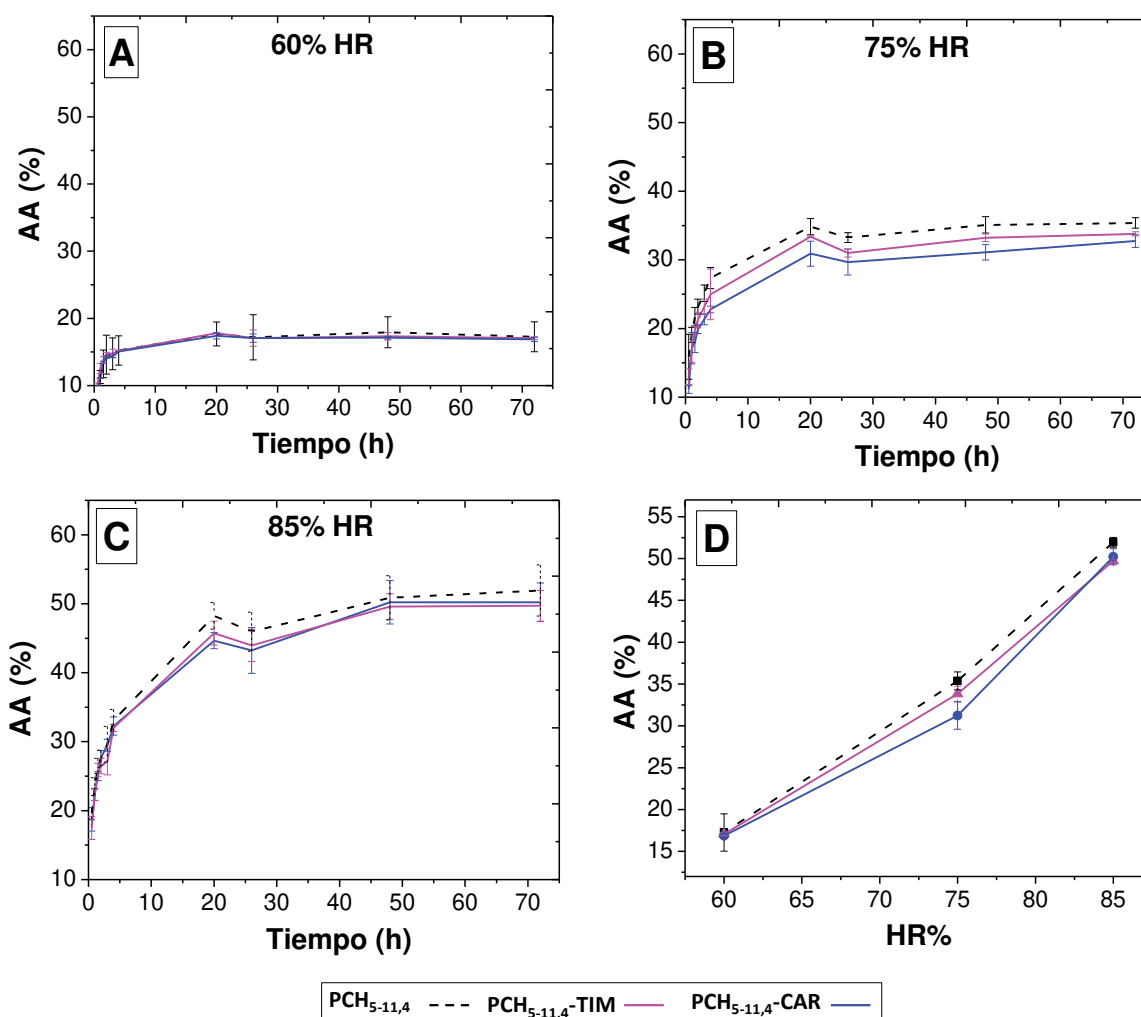


Figura 49. Curvas de AA al 60, 75 y 85 % de HR en función del tiempo (A-B-C) e isotermas de absorción de humedad (D) de la película control ($PCH_{5-11,4}$) y las PA formadas por $PCH_{5-11,4}$ -TIM y $PCH_{5-11,4}$ -CAR. Las barras de error representan una desviación estándar. Condiciones de prueba: 25°C, 1 atm, durante 72 h.

4.9.2.6. Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

La permeabilidad al vapor de agua de una película es una medida esencial para su aplicación en alimentos (Din y col., 2020). El valor de WVP refleja la capacidad de intercambio de agua entre los alimentos y la atmósfera que lo rodea (Huang y col., 2020).

La **Tabla 35** muestra los valores de WVP obtenidos para las películas. El valor de WVP para la película control fue menor que el informado por **Handa y col. (1999a)** ($8,3\pm 0,5$ g mm/m² h KPa) y **López-Mata y col. (2013)** (5.37 ± 0.70 g mm/m² h KPa) para películas de

PCH. Las diferencias encontradas podrían deberse al tipo de plastificante utilizado, concentración de proteína y método de obtención de la película. La presencia de los CA produjo una disminución significativa en WVP con respecto al control, y no se encontraron diferencias entre las PA formadas por PCH_{5-11,4}-CAR y PCH_{5-11,4}-TIM. Este resultado podría deberse a las diferencias microestructurales de PCH_{5-11,4}-CA y la naturaleza hidrofóbica de los CA (Li y col., 2020; Zhong y col., 2017).

Tabla 35. AA y WVP de la película control (PCH_{5-11,4}) y de las PA formadas por PCH_{5-11,4}-TIM y PCH_{5-11,4}-CAR. Los valores se expresan como media (\pm desviación estándar) y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

| Parámetro | Película | | |
|---------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | PCH _{5-11,4} | PCH _{5-11,4} -TIM | PCH _{5-11,4} -CAR |
| AA (%) – 72 horas | | | |
| 60% HR | 17,3 (\pm 2,2) ^e | 17,1 (\pm 0,2) ^e | 16,9 (\pm 0,3) ^e |
| 75% HR | 35,4 (\pm 1,1) ^c | 33,8 (\pm 0,9) ^d | 32,7 (\pm 0,3) ^d |
| 85% HR | 51,9 (\pm 0,4) ^a | 49,7 (\pm 0,1) ^b | 50,2 (\pm 0,7) ^b |
| WVP (g mm/m² h KPa) | 3,1 (\pm 0,2) ^a | 2,5 (\pm 0,3) ^b | 2,3 (\pm 0,4) ^b |

4.9.2.7. Evaluación de la actividad antifúngica de las PA en pan de molde



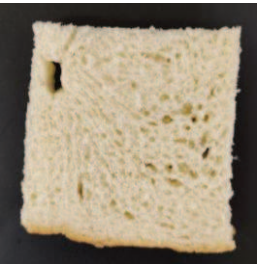
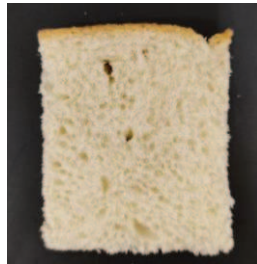
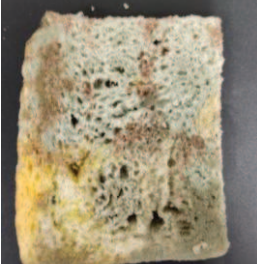




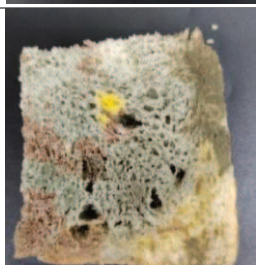
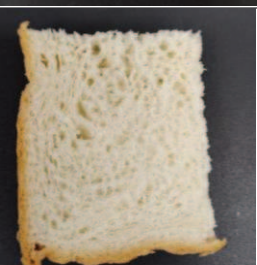

Para evaluar la eficacia antifúngica de las PA obtenidas se utilizó pan de molde sin conservantes elaborado por una panificadora de la ciudad de Santa Fe. Rodajas de pan de 4,5x5 cm fueron colocadas entre dos placas de Petri que contenían las PA en su superficie (Fig. 50) y luego se empaquetaron en bolsas de polietileno para su posterior almacenamiento.



Figura 50. Muestra de pan de molde sin conservantes colocada entre cajas de Petri conteniendo PA.

El aspecto visual de las rodajas de pan en el día cero se observa en la Fig. 50, y el aspecto luego de 7, 15 y 30 días de almacenamiento se presentan en la Tabla 36. Por otro lado, el recuento de mohos y levaduras se muestra en la Fig. 51.

Tabla 36. Aspecto visual de las rodajas de pan de molde almacenadas sin y con películas luego de 7, 15 y 30 días de almacenamiento a 25 °C.

| MUESTRAS DE PAN | | | | |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| DÍAS | Sin película | Con película control (PCH _{5-11,4}) | Con película PCH _{5-11,4} -CAR | Con película PCH _{5-11,4} -TIM |
| 7 |  |  |  |  |
| 15 |  |  |  |  |
| 30 |  |  |  |  |

Luego de 7 días de almacenamiento a 25 °C, el crecimiento fúngico se hizo visible en las rodajas de pan almacenadas sin películas y en menor medida en las rodajas con películas PCH_{5-11,4} (control). Este resultado fue coincidente con los valores de recuento obtenidos (Fig. 51). En general, el crecimiento fúngico en panes sin conservantes, se hace visible al tercer o cuarto día (García et al., 2019; Magan et al., 2012). Por otro lado, las muestras almacenadas con PA formadas por PCH_{5-11,4}-CA no presentaron crecimiento fúngico visible. Sin embargo, los valores de recuento para las muestras almacenadas con PA de PCH_{5-11,4}-TIM fueron similares al control, mientras que las almacenadas con PCH_{5-11,4}-CAR fueron

significativamente menores a todas las muestras (Fig. 51). Es importante destacar que el crecimiento de mohos y levaduras se hace visible cuando los valores de recuento son superiores a 3 y 4 log UFC/g, respectivamente (Fernandez y col., 2006; Latou y col., 2010).

A los 15 días de almacenamiento, se observó un crecimiento fúngico considerable en las muestras sin películas y en las muestras control. Respecto al día 7, en las muestras control se observó un mayor crecimiento fúngico y un recuento mayor similar a las muestras sin películas. Estos resultados indicarían que las películas control no tienen actividad antifúngica y que los efectos observados se deben exclusivamente a los CA. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en las pruebas in vitro contra *A. niger* (sección 4.9.1.4). Por otro lado, las muestras almacenadas con PA de PCH_{5-11,4}-CA se mantuvieron sin crecimiento fúngico visible, mientras que los valores de recuento fueron significativamente menores a los obtenidos con las muestras sin películas y control. Finalmente, luego de 30 días de almacenamiento se obtuvo el mismo resultado.

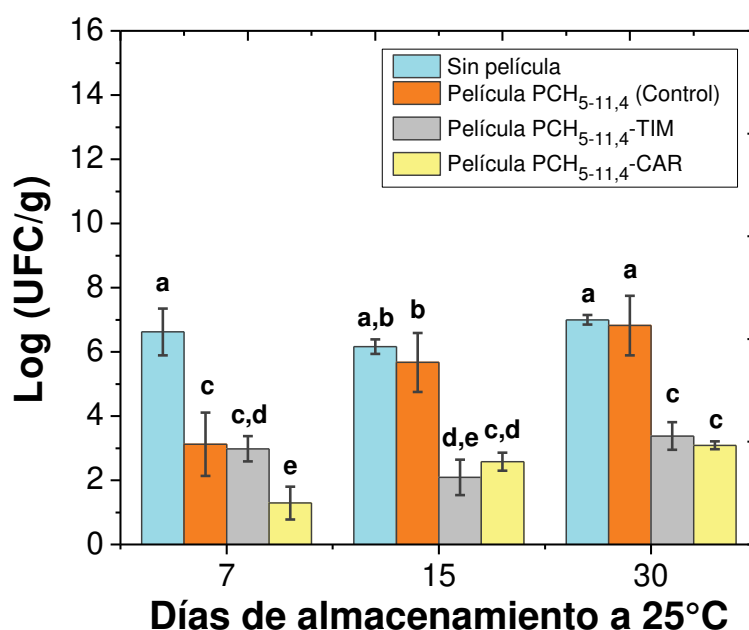


Figura 51. Recuento de mohos y levaduras (UFC/g) de las rodajas de pan de molde almacenadas sin y con películas luego de 7, 15 y 30 días de almacenamiento a 25 °C. El recuento correspondiente al día 0 no fue detectado. Los valores se expresan como media, \pm desviación estándar y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Actualmente, en la bibliografía solo se ha reportado un tipo de película antifúngica elaborada con CAR para conservación de pan. La misma se obtuvo a partir de nanofibras electrohiladas de almidón y CAR. Su aplicación en pan sin conservantes, logró inhibir el

crecimiento fúngico durante 7 días a 25°C (Fonseca y col., 2021). Luego, se ha explorado la obtención de películas con CAR y TIM. Entre ellos, Altan y col. (2018) ensayaron de forma preliminar la efectividad de películas a base de fibras electrohiladas de zeína y de PLA, agregando CAR en diferentes concentraciones (5, 10, 20% m/m). Para ello, se colocaron rodajas de pan sin conservantes entre dos cajas de Petri que contenían ambos tipos de películas y se almacenaron durante 7 días a 25 °C. Las películas de fibras de zeína y de PLA con 20 % m/m de CAR lograron una inhibición del crecimiento fúngico superior al 90%. Por otro lado, Suwanamornlert y col. (2020) produjeron películas a base de mezclas de PLA/PBSA que contenían 3 y 6 % m/m de TIM. Luego, envasaron pan sin conservantes con las películas y evaluaron su vida útil durante 15 días a 25 °C. Se incluyeron como controles panes envasados con dos tipos de películas comerciales (polipropileno y PLA puro). Las películas obtenidas con 3 y 6 % m/m de TIM retrasaron el crecimiento fúngico visible durante 7 y 9 días, respectivamente. Además, los valores de recuento de mohos y levaduras luego de 14 días de almacenamiento a 25 °C respecto a las películas control (7,62 log UFC/g) fueron menores para el pan envasado en películas PLA/PBSA con 6 % m/m (3,69 log UFC/g), seguido de 3 % m/m de TIM (6,67 log UFC/g). Por último, en otro trabajo realizado por Klinmalai y col. (2021), se obtuvieron películas a partir de PLA y PBAT con 2 y 5 % m/m de CAR, las cuales lograron extender la vida útil de pan hasta 6 y 8 días, respectivamente.

Por lo tanto, y a diferencia de los trabajos citados anteriormente, las PA elaboradas con PCH_{5-11,4}-CA con un contenido de CA menor (<1% m/m) lograron mayor eficacia antifúngica y prolongaron la vida útil de muestras de pan de molde por más tiempo.

4.9.2.8. Análisis del contenido de CA en las PA

La liberación controlada de un compuesto antimicrobiano es un factor crítico para mantener la calidad y seguridad de los alimentos. Es necesaria una liberación inicial relativamente mayor del agente antimicrobiano seguida de una liberación sostenida más lenta para mantener su concentración inhibitoria mínima en las superficies de los alimentos (Altan y col., 2018). Por lo tanto, para complementar la prueba anterior (sección 4.9.2.7), se cuantificó la cantidad de CA liberado por gramo de película al inicio del experimento de vida útil (día 0) y luego de 7, 15, 30 días de almacenamiento a 25°C (Tabla 37).

Tabla 37. Contenido de CA liberado por g de PA correspondientes al día 0 y a los 7, 15 y 30 días de almacenamiento del pan a 25°C. Los valores se expresan como media (\pm desviación estándar) y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

| Contenido de CA liberado (mg CA/g de película) | PA | |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | PCH _{5-11,4} -TIM | PCH _{5-11,4} -CAR |
| 0 días | 0,79 (\pm 0,20) ^c | 0,68 (\pm 0,67) ^{c,d} |
| 7 días | 1,20 (\pm 0,06) ^b | 1,43 (\pm 0,25) ^a |
| 15 días | 1,26 (\pm 0,03) ^{a,b} | 1,37 (\pm 0,02) ^{a,b} |
| 30 días | 0,43 (\pm 0,05) ^e | 0,52 (\pm 0,22) ^{d,e} |

Respecto al día 0, luego de 7 días de almacenamiento se observó un aumento significativo del contenido de CA liberado por gramo de PA. Por otro lado, el contenido de CAR fue significativamente mayor que el observado para TIM. A los 15 días, el contenido de CA liberado se mantuvo constante y ambas PA liberaron la misma cantidad de CAR y TIM. Cabe señalar que las películas evaluadas luego de 7 y 15 días de almacenamiento, incrementaron su peso por adsorción de humedad provenientes de las rodajas de pan. El peso de las películas luego del período de almacenamiento se indica en la [Tabla 38](#). Finalmente, a los 30 días de almacenamiento, la masa de CA liberado por gramo de película disminuyó y no se observaron diferencias significativas. El peso de las PA fue similar al inicial, indicando pérdida de humedad. Por lo tanto, esta interacción con el agua podría promover un posible mecanismo de liberación de CA. Algunos autores han señalado que los biopolímeros pueden retener compuestos volátiles, pero también promover su liberación debido a cambios en las condiciones de humedad relativa y temperatura ([Balaguer y col., 2013](#); [Wicochea-Rodríguez y col., 2019](#)). [Kurek y col. \(2014\)](#) estudiaron el efecto de la HR (0, 75 y 96 %) y la temperatura (4, 20 y 37 °C) en el contenido de CAR liberado de películas a base de quitosano. Descubrieron que el aumento de la HR y la temperatura aceleraron significativamente el proceso de liberación de CAR. La adsorción de agua condujo a la hidratación y plastificación de la matriz de quitosano. Debido a su naturaleza hidrofílica, la interacción entre el agua y el quitosano promovió la liberación de CAR.

A partir de estos resultados, se puede concluir que las PA formadas por nanocomplejos PCH_{5-11,4}-CA constituyen un material activo capaz de retener y liberar CAR y TIM en función de la humedad del producto alimenticio. Además, la cantidad de CA liberada fue suficiente para inhibir y mantener las rodajas de pan libres del crecimiento de hongos durante al menos 30 días.

Tabla 38. Peso de las PA correspondientes al día 0 y a los 7, 15 y 30 días de almacenamiento del pan a 25°C. Los valores se expresan como media (\pm desviación estándar) y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

| PA | Peso (g) | | | |
|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| | Día 0 | Día 7 | Día 15 | Día 30 |
| PCH _{5-11,4} -TIM | 1,7 (\pm 0,2) ^c | 2,2 (\pm 0,1) ^a | 2,2 (\pm 0,1) ^a | 1,8 (\pm 0,1) ^{b,c} |
| PCH _{5-11,4} -CAR | 1,7 (\pm 0,1) ^c | 1,9 (\pm 0,4) ^b | 2,1 (\pm 0,0) ^a | 1,7 (\pm 0,2) ^{b,c} |

4.9.2.9. Análisis sensorial de los panes almacenados con PA

Debido a la naturaleza fuertemente aromática de estos CA (Du y col., 2012; Joshi y col., 2021; Moshe Dvir y col., 2019), se consideró importante evaluar la aceptabilidad global de las muestras de pan de molde luego de su almacenamiento con las películas.

Las puntuaciones obtenidas para cada muestra se muestran en la Fig. 52. Tal como se observa, las puntuaciones generales de gusto fueron 6,24 (\pm 1), 5,54 (\pm 2) y 5,60 (\pm 2) para las muestras de pan sin película (control), con PA formadas por PCH_{5-11,4}-CAR y PCH_{5-11,4}-TIM, respectivamente. Estos resultados indicaron que la muestra control fue la de mayor aceptación en comparación con las almacenadas con PA. Mientras que no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras almacenadas con PCH_{5-11,4}-CAR y PCH_{5-11,4}-TIM. Sin embargo, en los tres casos, las puntuaciones del gusto general estuvieron por encima del umbral de indiferencia (>5), lo que indica que todos los panes fueron considerados aceptables (Lawless y Heymann, 2010).

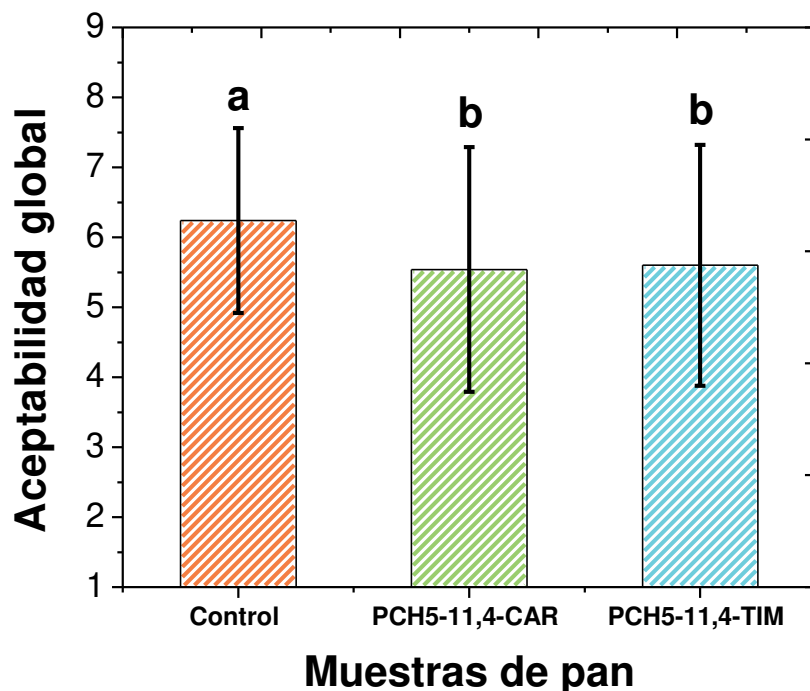


Figura 52. Aceptabilidad global de las muestras de pan almacenadas sin película (control), con PA formadas por PCH_{5-11,4}-CAR y PCH_{5-11,4}-TIM. Los valores se expresan como media, \pm desviación estándar y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

De manera similar, [Passarinho et al. \(2014\)](#), verificaron efectos notables en el olor y sabor de pan de molde almacenado con sobres conteniendo AE de orégano (fuente natural de CAR y TIM). Evaluaron la impresión global de panes envasados junto con sobres que contenían diferentes concentraciones de AE de orégano (5, 10 y 15 %) utilizando una escala hedónica de 9 puntos. Como control, evaluaron muestras de pan envasadas sin sobres. Después de 10 días de almacenamiento a temperatura ambiente, la aceptabilidad de los panes almacenados junto con los sobres que contenían AE de orégano fue menor que la muestra de pan sin tratar (control). Obtuvieron valores promedio de 6.73 para la muestra control y 5.57 para las muestras almacenadas con sobres que contenían 15% de AE de orégano.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

En la presente tesis doctoral, se logró reunir conocimientos, desde un punto de vista básico y aplicado, sobre la obtención de nanopartículas biopoliméricas de PCH para la vehiculización de CA en forma de nanocomplejos y su aplicación como RC y PA antifúngicas en pan de molde sin conservantes.

En primer lugar, se caracterizó la flora fúngica contaminante presente naturalmente en los panes de molde elaborados sin conservantes. Luego, a partir de un análisis de Ab y Fr, pudieron seleccionarse 5 de las 13 especies identificadas, con las cuales se verificó la eficacia de los CA. En el rango de concentraciones evaluadas, se obtuvo que el compuesto CIN fue el que produjo mayor inhibición, seguido por CAR y TIM cuya actividad fue similar y por último LIM, el cual no tuvo actividad antifúngica. Estos resultados permitieron seleccionar la especie *A. niger*, para ensayos posteriores, debido a su mayor resistencia a los CA, Ab y Fr en las muestras de pan de molde.

Luego, se desarrollaron nanopartículas a partir de una proteína de gran disponibilidad local y bajo costo como PCH mediante tratamiento térmico controlado. Utilizando condiciones de pH y diferentes concentraciones de proteínas se obtuvieron nanopartículas de diferentes tamaños, entre las cuales fueron seleccionadas las PCH₃₋₁₁. Los resultados obtenidos, permitieron evaluar su aptitud como nanovehículo para la encapsulación de los CA. Se encontró que la capacidad de PCH₃₋₁₁ para unir CA, a través de la formación de complejos, fue considerablemente mayor que la de PCH nativa. Esto se explicó por la exposición de los grupos hidrofóbicos ocluidos en la estructura globular de la proteína. La formación de nanocomplejos PCHn-CA se describió en términos moleculares, estequiométricos y morfológicos.

Además, la vehiculización de los CA en PCH₃₋₁₁ permitió la obtención de nanocomplejos con actividad antifúngica la cual fue evidenciada *in vitro* contra *A. niger*.

Por otro lado, se obtuvieron SFR basadas en nanocomplejos PCH₃₋₁₁-CA y glicerol que se aplicaron adecuadamente sobre la corteza de panes de molde, sin alterar su aspecto visual ni modificar sus propiedades fisicoquímicas. Los RC basados en nanocomplejos PCHn-TIM y PCHn-CAR lograron inhibir eficazmente el crecimiento fúngico extendiendo la vida útil del pan sin conservantes por hasta 7 días. Mientras que, el RC formulado con PCHn-CIN no tuvo eficacia antifúngica. El período de conservación logrado, fue adecuado teniendo en cuenta que los panes sin conservantes tienen una vida útil más corta (alrededor de 3 o 4 días). Además, la aplicación del RC permitió incorporar compuestos, que por motivos ya expuestos

presentan serias limitaciones en su uso directo, sin producir un impacto negativo en la aceptabilidad de los panes.

Finalmente, a partir de los resultados obtenidos con las SFR, se obtuvieron PA a partir de nanocomplejos y glicerol utilizando el método de *casting*. Para ello, se utilizaron nanocomplejos formados por PCH_{5-11,4} producidas en reactor tipo batch y los compuestos CAR y TIM. Los mismos, fueron encapsulados de manera eficiente por PCH_{5-11,4}, formando nanocomplejos coloidalmente estables y con actividad antifúngica contra *A. niger*. Las PA obtenidas resultaron transparentes con una ligera coloración amarilla. Las imágenes de SEM revelaron una microestructura formada por agregados, de naturaleza compacta y porosa. Las propiedades mecánicas de las PA elaboradas con nanocomplejos mejoraron respecto al control (PCH_{5-11,4}+glicerol), presentando mayor elasticidad (>EM) y resistencia a la rotura (>TS). La naturaleza hidrofóbica y lipofílica de los CA disminuyeron significativamente los valores de AA y WVP de las películas. Además, según los resultados obtenidos por TGA y DSC, las PA demostraron ser térmicamente estables (hasta ~150°C). Luego, por aplicación sobre rodajas de panes de molde sin conservantes, se logró inhibir el crecimiento fúngico, extendiendo la vida útil de los panes por hasta 30 días. Además, se pudo evidenciar que las PA fueron capaces de retener y liberar CAR y TIM durante su almacenamiento con las muestras de pan. Por último, por evaluación sensorial realizada con consumidores, se determinó que los panes almacenados con las PA fueron considerados sensorialmente “aceptables”. Por lo tanto, estas PA podrían ser alternativas prometedoras para aumentar la vida útil de panes sin conservantes.

A modo de conclusión global, las tecnologías de RC y PA desarrolladas en la presente tesis doctoral, constituyen un avance como estrategias nanotecnológicas dirigidas a la conservación de productos panificados, garantizando la seguridad y ayudando a reducir las pérdidas económicas en este sector de la industria alimentaria.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral, permitirían en un futuro avanzar sobre:

- ✚ La aplicación de los RC por aspersión, método mayormente utilizado en la industria.
- ✚ La aplicación de los RC en otros productos alimenticios susceptibles al deterioro fúngico tales como otros productos panificados (galletitas, prepizzas), frutas, quesos, carnes y frutos secos, entre otros.
- ✚ El estudio sobre otras propiedades bioactivas de los RC. Como ya se indicó, estos compuestos poseen adicionalmente otras propiedades relevantes (antibacterianas, antioxidantes, antidiabéticas, anticancerígenas, entre otras), con lo cual esta tecnología de recubrimiento podría dar lugar a nuevos productos alimenticios funcionalizados, los cuales son actualmente muy demandados por parte de los consumidores modernos.
- ✚ El estudio sobre el mecanismo de liberación de los CA para poder determinar el modo de acción de las PA y de esa forma diseñar el formato de aplicación (como por ejemplo, en forma de sobre o *sticker*). De forma preliminar, en la presente tesis doctoral, se realizó un ensayo modificando la cantidad de muestra y el modo de aplicación de las PA formadas por PCH_{5,11,4}-CAR y PCH_{5,11,4}-TIM (Fig. A10-A del Apéndice). Luego, se almacenaron a temperatura ambiente durante 30 días y los resultados se registraron de forma visual (Fig. A10-B y C del Apéndice). Se pudo observar que, las PA produjeron un efecto antifúngico de tipo localizado. Por lo tanto, estos ensayos justifican la necesidad de estudiar en detalle el mecanismo por el cual se liberan los CA y ejercen su acción antifúngica.
- ✚ El uso de AE en reemplazo de los CA, materia prima más económica y de mayor disponibilidad. Tal como se indicó anteriormente, los AE son mezclas de CB, por ende se podría potenciar la eficacia antifúngica de los RC o PA, incluso posibilitaría el uso de menores concentraciones. De forma preliminar, en la presente tesis, también se realizaron ensayos experimentales en donde se obtuvieron PA elaboradas con diferentes concentraciones de AE de orégano (adquirido en Sigma Aldrich). Para ello, se utilizaron nanocomplejos obtenidos con PCH_{5,11,4}, y distintas concentraciones de solución etanólica de AE de orégano (0,5, 1 y 2 % v/v) en relación 10:1,5 y a pH 11,5 (Fig. A11 del Apéndice). Luego, las PA fueron obtenidas utilizando la metodología citada en la sección 3.2.11.3. Su eficacia antifúngica fue evaluada de forma visual, colocando rodajas de pan de molde sin conservante entre dos placas conteniendo PA y

se almacenaron durante 30 días a temperatura ambiente. Los resultados obtenidos se muestran en la [Fig. A11 del Apéndice](#). Las PA resultaron similares a las obtenidas con CAR y TIM ([Fig. 55-B,C y D](#)). Por otro lado, la PA con menor concentración de AE de orégano (0,5%) logró inhibir por completo el crecimiento fúngico. Estos resultados indicaron una mayor eficacia del AE de orégano respecto a sus CB aislados (CAR y TIM). Por lo que, a partir de estos resultados, sería conveniente continuar con la caracterización de este tipo de PA y la formulación de PA con distintos tipos de AE (tomillo, clavo de olor, etc.).

- ✚ El estudio sobre posibles aplicaciones de las PA en otros productos alimenticios (con humedad baja o intermedia) susceptibles al deterioro fúngico tales como: otros productos panificados (galletitas, prepizzas), frutas, quesos, carnes, frutos secos, entre otros.
- ✚ La evaluación del escalado para la producción de las PA. Esto sería beneficioso debido a que, a diferencia del proceso de extrusión, el *casting* permite preservar la bioactividad de los AE o sus CB. Actualmente se ha estudiado el diseño de prototipos para obtención de películas por *casting* que podrían utilizarse para la obtención de estas PC ([Munhoz y col., 2018](#); [Ortiz y col., 2017](#)).

7. APÉNDICE

7. APÉNDICE

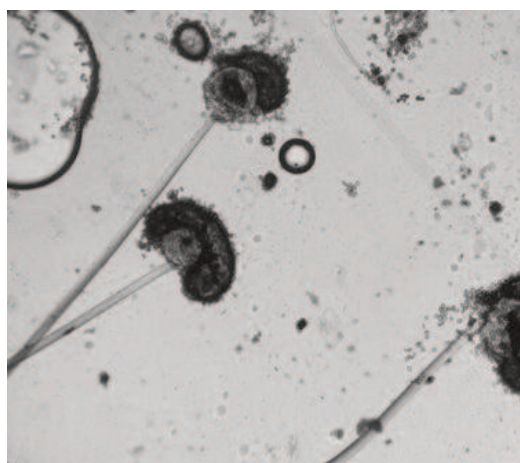
7.1. Figuras y tablas

Tabla A1. Características macro y microscópicas de la especie fúngica *Rhizophus stolonifer*, aislada a partir de las muestras de pan de molde contaminadas.

| Características macroscópicas | MEA (25 °C) |
|-------------------------------|--------------|
| Color de los conidios | Negro |
| Color del micelio | Blanco |
| Aspecto | Flocosa |
| Reverso | No coloreado |
| Exudado | Ausente |
| Pigmentos solubles | Ausente |
| Diámetro promedio (mm) | 45 |

Características microscópicas

Esporangióforos con crecimiento en grupos de 3 rizoides.
 Estipes robustas y no ramificadas, con paredes de color marrón. Esporangio esférico. Columela esférica con colapso hacia abajo y hacia afuera en forma de paragua.
 Esporangiosporos color marrón pálido con paredes estriadas.



Esporangio y esporangióforo de *R. stolonifer*
 (aislado de las muestras de pan)

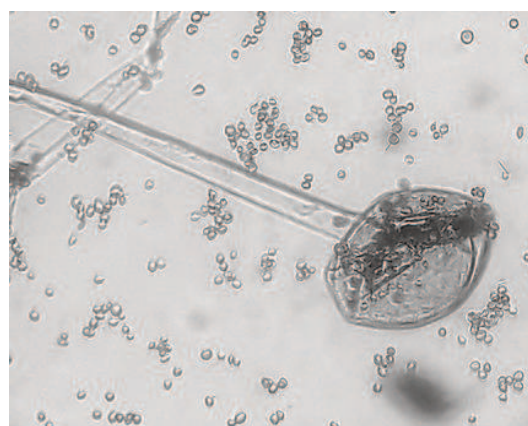
* Observación: no hubo desarrollo en MEA a 37 °C.

Tabla A2. Características macro y microscópicas de la especie fúngica *Rhizopus oryzae*, aislada a partir de las muestras de pan de molde contaminadas.

| Características macroscópicas | MEA (25 °C) |
|-------------------------------|-------------|
| Color de los conidios | Negro |
| Color del micelio | Grisáceo |
| Aspecto | Flocosa |
| Reverso | Pálido |
| Exudado | Ausente |
| Pigmentos solubles | Ausente |
| Diámetro promedio (mm) | 45 |

Características microscópicas

Esporangióforos con crecimiento en grupos de 2 rizoides y estipes no ramificadas. Esporangio esférico. Columela esférica de color marrón pálido y colapsaba hacia abajo en forma de paraguas. Esporangiosporos marrones y fusiformes con paredes estriadas.



Esporangio y esporangióforo de *R. oryzae* (aislado de las muestras de pan)

* Observación: no hubo desarrollo en MEA a 37 °C.

Tabla A3. Características macro y microscópicas de la especie fúngica *Fusarium oxysporum*, aislada a partir de las muestras de pan de molde contaminadas.

| Características macroscópicas | MEA (25 °C) | PDA (25 °C) |
|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| Color de los conidios | Rosado pálido | Blanco |
| Color del micelio | Blanco | Blanco |
| Aspecto | Densa y flocosa | Baja, densa y flocosa |
| Reverso | Violeta a pálido en los bordes | Salmón pálido |
| Exudado | Ausente | Ausente |
| Pigmentos solubles | Ausente | Ausente |
| Diámetro promedio (mm) | 65 | 45 |

Características microscópicas

Macroconidios levemente curvos, con tres septos y paredes delgadas. Microconidios abundantes y fusiformes, producidos partir de falsas cabezas de monofiálides voluminosas y cortas. Clamidoconidios producidos de a pares.



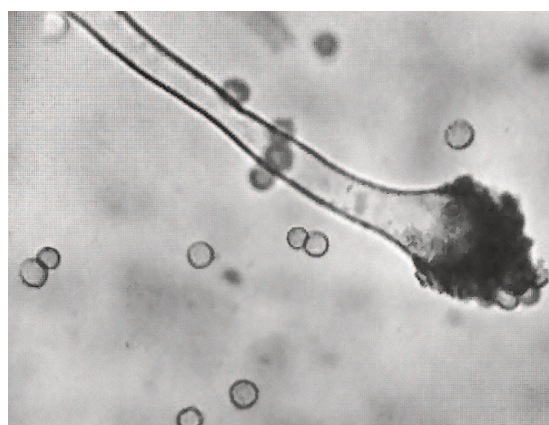
Fiálides y microconidios de *F. oxysporum* (aislado de las muestras de pan)

Tabla A4. Características macro y microscópicas de la especie fúngica *Aspergillus parasiticus*, aislada a partir de las muestras de pan de molde contaminadas.

| Características macroscópicas | MEA (25 °C) | CYA (25 °C) | G25N (25 °C) |
|-------------------------------|-----------------------|---------------------|------------------|
| Color de los conidios | Gris amarillento | Gris amarillento | Gris amarillento |
| Color del micelio | Blanco | Blanco | Blanco |
| Aspecto | Plana, baja y flocosa | Plana, baja y densa | Plana y baja |
| Reverso | Pálido | Marrón | Amarillo |
| Exudado | Ausente | Ausente | Ausente |
| Pigmentos solubles | Ausente | Ausente | Ausente |
| Diámetro promedio (mm) | 60 | 50 | 20 |

Características microscópicas

Conidióforos con paredes lisas e incoloras. Vesículas esféricas, mayormente sólo con fiálides sobre tres cuartos de la superficie. Conidios esféricos con paredes rugosas.



Cabeza conidial de *A. parasiticus* (aislado de las muestras de pan)

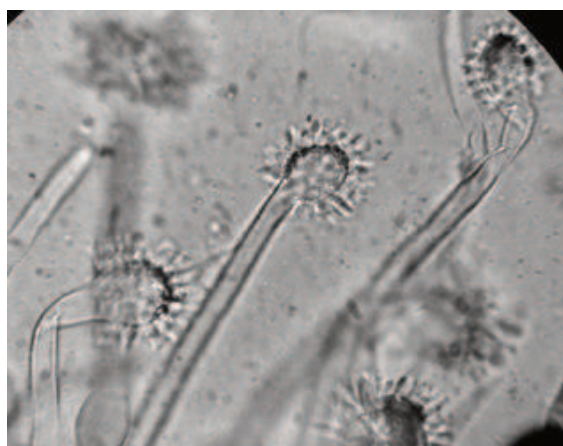
Tabla A5. Características macro y microscópicas de la especie fúngica *Aspergillus candidus*, aislada a partir de las muestras de pan de molde contaminadas.

| Características macroscópicas | MEA (25 °C) | CYA (25 °C) | G25N (25 °C) |
|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------|
| Color de los conidios | Blanco | Blanco | Blanco |
| Color del micelio | Blanco | Blanco | Blanco |
| Aspecto | Plana, textura granular | Plana, textura granular | Plana |
| Reverso | Marrón pálido | Pálido | Pálido |
| Exudado | Ausente | Ausente | Ausente |
| Pigmentos solubles | Ausente | Ausente | Ausente |
| Diámetro promedio (mm) | 16 | 20 | 14 |

Características microscópicas

Conidióforos con paredes levemente rugosas e incoloras. Las vesículas con métulas y fiálides en toda la superficie. En las cabezas más pequeñas el número de métulas era limitado.

Conidios esféricos con paredes lisas.



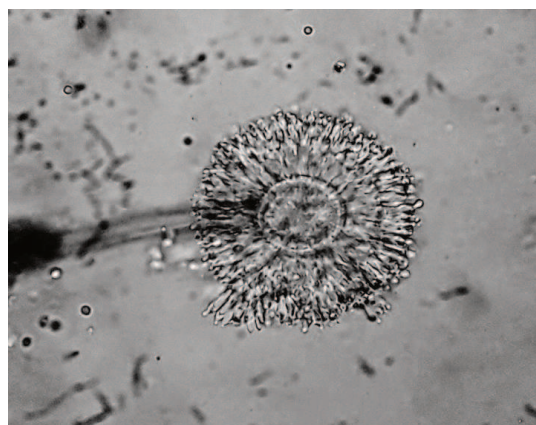
Cabezas conidiales en desarrollo de *A. candidus*
(aislado de las muestras de pan)

Tabla A6. Características macro y microscópicas de la especie fúngica *Aspergillus ochraceus*, aislada a partir de las muestras de pan de molde contaminadas.

| Características macroscópicas | MEA (25 °C) | CYA (25 °C) | G25N (25 °C) |
|-------------------------------|-------------|---------------------|-----------------------|
| Color de los conidios | Amarillo | Amarillo dorado | Amarillo |
| Color del micelio | Blanco | Blanco | Blanco |
| Aspecto | Plana | Plana y baja | Baja, densa y flocosa |
| Reverso | Amarillo | Anaranjado grisáceo | Amarillo pálido |
| Exudado | Ausente | Ausente | Ausente |
| Pigmentos solubles | Ausente | Ausente | Ausente |
| Diámetro promedio (mm) | 50 | 40 | 20 |

Características microscópicas

Conidióforos con paredes amarillentas y finamente rugosas. Vesículas esféricas con su superficie cubierta completamente por métulas y fiálides. Conidios esféricos con paredes rugosas.



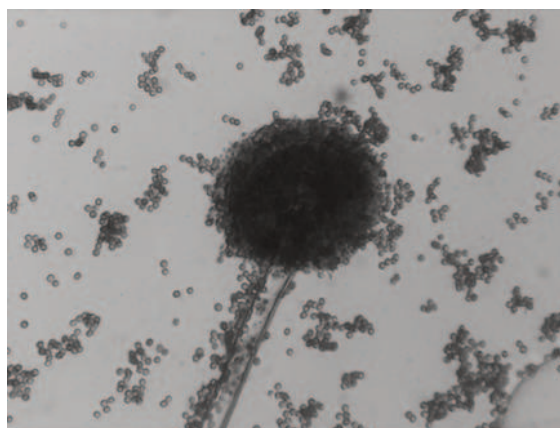
Cabeza conidial de *A. ochraceus*
(aislado de las muestras de pan)

Tabla A7. Características macro y microscópicas de la especie fúngica *Aspergillus niger*, aislada a partir de las muestras de pan de molde contaminadas.

| Características macroscópicas | MEA (25 °C) | CYA (25 °C) | G25N (25 °C) |
|-------------------------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| Color de los conidios | Negro | Negro | Marrón |
| Color del micelio | Blanco | Blanco | Amarillo pálido |
| Aspecto | Plana | Plana | Plana |
| Reverso | Amarillo pálido | Amarillo brillante | Pálido |
| Exudado | Ausente | Transparente | Ausente |
| Pigmentos solubles | Ausente | Ausente | Ausente |
| Diámetro promedio (mm) | 44 | 60 | 30 |

Características microscópicas

Conidióforos con paredes gruesas, hialinas, lisas y célula pie. Vesículas esféricas, con métulas y fiálides cubriendo la totalidad de su superficie. Conidios esféricos y marrones, con paredes rugosas.



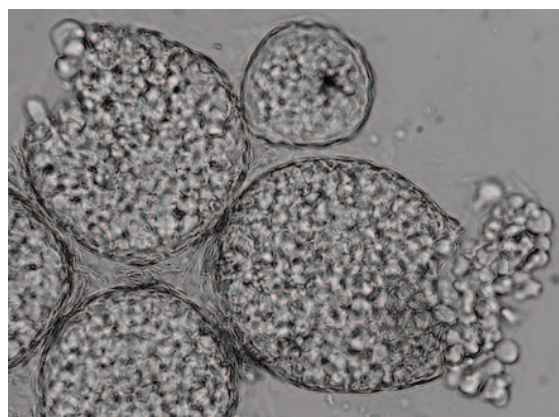
Cabeza conidial de *A. niger*
(aislado de las muestras de pan)

Tabla A8. Características macro y microscópicas de la especie fúngica *Eurotium chevalieri*, aislada a partir de las muestras de pan de molde contaminadas.

| Características macroscópicas | MEA (25 °C) |
|-------------------------------|---------------|
| Color de los conidios | Marrón oscuro |
| Color del micelio | Blanco |
| Aspecto | Plana y densa |
| Reverso | Anaranjado |
| Exudado | Ausente |
| Pigmentos solubles | Amarillo |
| Diámetro promedio (mm) | 16 |

Características microscópicas

Cleistotecios de color amarillo brillante, esféricos, envueltos en hifas vegetativas amarillas. Ascosporas amarillas, elipsoidales y poseían forma de polea. Paredes lisas con un doble borde paralelo longitudinal. Conidióforos con paredes delgadas. Solo presentaban vesículas con fiálides ampuliformes. Conidios elipsoidales.



Cleistotecios de *E. chevalieri*
(aislado de las muestras de pan)

Tabla A9. Características macro y microscópicas de la especie fúngica *Penicillium chrysogenum*, aislada a partir de las muestras de pan de molde contaminadas.

| Características macroscópicas | MEA (25 °C) | CYA (25 °C) | G25N (25 °C) |
|-------------------------------|----------------|---------------------------|---------------|
| Color de los conidios | Verde azulado | Verde azulado | Marrón pálido |
| Color del micelio | Blanco | Blanco | Blanco |
| Aspecto | Plana granular | Baja, surcada radialmente | Densa |
| Reverso | Amarillento | Pálido | Marrón rojizo |
| Exudado | Ausente | Amarillo brillante | Ausente |
| Pigmentos solubles | Ausente | Ausente | Ausente |
| Diámetro promedio (mm) | 25 | 38 | 22 |

Características microscópicas

Conidióforos con estipes de paredes lisas. Pincel terverticilado, fiálides ampuliformes. Conidios subsféricos de paredes lisas con crecimiento en forma de largas cadenas irregulares.



Pincel de *P. chrysogenum*
(aislado de las muestras de pan)

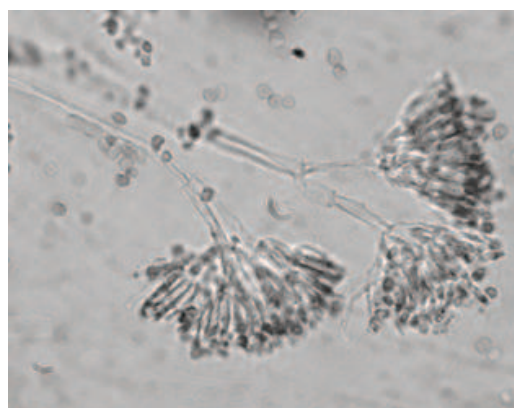
* Observación: se obtuvieron microcolonias en CYA a 5 °C. No hubo desarrollo en CYA a 37 °C. Se obtuvieron colonias de 18 mm de diámetro en CSN a 25 °C y el medio resultó levemente ácido.

Tabla A10. Características macro y microscópicas de la especie fúngica *Penicillium brevicompactum*, aislada a partir de las muestras de pan de molde contaminadas.

| Características macroscópicas | MEA (25 °C) | CYA (25 °C) | G25N (25 °C) |
|-------------------------------|--------------|----------------------------|-------------------------|
| Color de los conidios | Verde oscuro | Verde azulado | Marrón |
| Color del micelio | Blanco | Blanco | Verde musgo |
| Aspecto | Plana | Radialmente surcada, densa | Plana, textura granular |
| Reverso | Pálido | Amarillento | Marrón rojizo |
| Exudado | Ausente | Pálido | Ausente |
| Pigmentos solubles | Ausente | Ausente | Ausente |
| Diámetro promedio (mm) | 22 | 26 | 22 |

Características microscópicas

Estipes anchas de paredes lisas y sosteniendo pinceles terverticilados anchos y compactos. Ramas cortas y anchas. Métulas en grupos divergentes, cortas y anchas. Fiálides ampuliformes en verticilos divergentes. Conidios elipsoidales con paredes lisas, con crecimiento en forma de cadenas divergentes y desordenadas.



Pincel de *P. brevicompactum* (aislado de las muestras de pan)

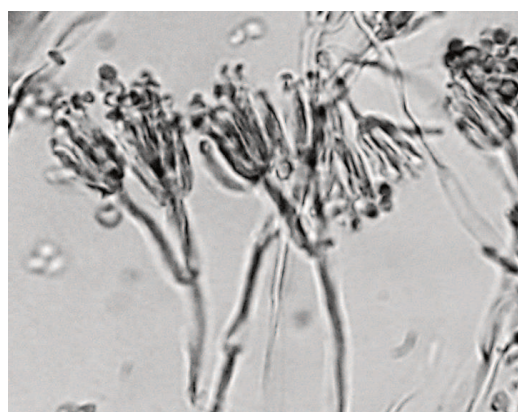
* Observación: se obtuvieron microcolonias en CYA a 5 °C. No hubo desarrollo en CYA a 37 °C. Las colonias en CSN presentaron una reacción débilmente ácida.

Tabla A11. Características macro y microscópicas de la especie fúngica *Penicillium corylophilum*, aislada a partir de las muestras de pan de molde contaminadas.

| Características macroscópicas | MEA (25 °C) | CYA (25 °C) | G25N (25 °C) |
|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------|
| Color de los conidios | Verde azulado | Verde azulado | Blanco |
| Color del micelio | Blanco | Blanco | Blanco |
| Aspecto | Plana, moderadamente densa | Plana, radialmente surcada | Plana |
| Reverso | Pálido | Marrón claro | Pálido |
| Exudado | Ausente | Transparente | Ausente |
| Pigmentos solubles | Ausente | Ausente | Ausente |
| Diámetro promedio (mm) | 40 | 25 | 16 |

Características microscópicas

Pincel biverticilado de paredes lisas con 2 a 3 métulas. Fiálides ampuliformes. Conidios subsféricos de paredes lisas. Número de conidios moderado con crecimiento en forma de largas cadenas.



Pincel de *P. corylophilum* (aislado de las muestras de pan)

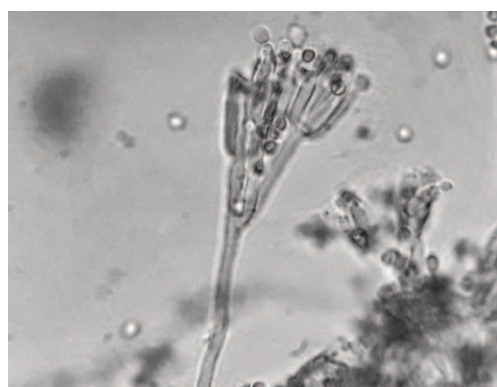
* Observación: se obtuvieron microcolonias en CYA a 5 °C. No hubo desarrollo en CYA a 37 °C.

Tabla A12. Características macro y microscópicas de la especie fúngica *Penicillium citrinum* slada a partir de las muestras de pan de molde contaminadas.

| Características macroscópicas | MEA (25 °C) | CYA (25 °C) | G25N (25 °C) |
|-------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------|---------------|
| Color de los conidios | Verde azulado y azul grisáceo en los bordes | Turquesa grisáceo | Verde pálido |
| Color del micelio | Blanco | Blanco | Blanco |
| Aspecto | Plana | Radialmente surcada, flocosa | Flocosa |
| Reverso | Marrón pálido | Oliva | Marrón pálido |
| Exudado | Ausente | Claro | Ausente |
| Pigmentos solubles | Ausente | Ausente | Ausente |
| Diámetro promedio (mm) | 22 | 25 | 18 |

Características microscópicas

Pincel biverticilado, estipes con paredes lisas que terminan en verticilos bien definidos de 3 a 5 méntulas divergentes. Fiálides ampuliformes. Conidios esféricos de paredes lisas que surgen a partir de columnas largas bien definidas.



Pincel de *P. citrinum*
(aislado de las muestras de pan)

* Observación: no hubo desarrollo en CYA a 5 °C. Se obtuvieron colonias de 10 mm de diámetro en CYA a 37 °C.

Tabla A13. Características macro y microscópicas de la especie fúngica *Cladosporium cladosporioides* aislada a partir de las muestras de pan de molde contaminadas.

| Características macroscópicas | MEA (25 °C) |
|-------------------------------|------------------------------|
| Color de los conidios | Oliva |
| Color del micelio | Oscuro |
| Aspecto | Plana, baja, densa y flocosa |
| Reverso | Gris azulado |
| Exudado | Ausente |
| Pigmentos solubles | Ausente |
| Diámetro promedio (mm) | 35 |

Características microscópicas

Conidióforos dendríticos, estrechamente agrupados, con estipes soportando estructuras derivadas de células producidas acropétalmente. Conidios con paredes lisas, gruesas y de color marrón oliva pálido.



Conidióforos y conidios de *C. cladosporioides* (aislado de las muestras de pan)

Tabla A14. Diámetro promedio y desviación estándar en milímetros (mm) de los halos de inhibición correspondientes a concentraciones de CAR en el rango de 0 a 5 mg/mL, frente a 5 especies de hongos filamentosos.

| Concentración CAR (mg/mL) | Especies de hongos filamentosos | | | | |
|---------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| | <i>A. niger</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>P. chrysogenum</i> | <i>P. corylophilum</i> | <i>R. stolonifer</i> |
| | Diámetro promedio del halo de inhibición (mm) | | | | |
| 0,00 | 0,0 ± 0,0 ^s | 0,0 ± 0,0 ^s | 0,0 ± 0,0 ^s | 0,0 ± 0,0 ^s | 0,0 ± 0,0 ^s |
| 2,50 | 2,3 ± 0,5 ^{q,r} | 2,4 ± 0,5 ^{q,r} | 3,3 ± 0,8 ^{m,no,p} | 0,0 ± 0,0 ^s | 0,0 ± 0,0 ^s |
| 3,00 | 2,0 ± 0,0 ^{q,r} | 2,4 ± 0,5 ^{q,r} | 4,7 ± 1,5 ^{i,j,k} | 2,5 ± 0,6 ^{p,q,r} | 0,0 ± 0,0 ^s |
| 3,25 | 2,0 ± 0,0 ^r | 3,5 ± 0,6 ^{m,n,o} | 4,2 ± 1,3 ^{j,k,l,m} | 3,7 ± 0,8 ^{l,m,n} | 0,0 ± 0,0 ^s |
| 3,50 | 2,0 ± 0,0 ^r | 4,0 ± 1,1 ^{k,l,m} | 4,0 ± 0,9 ^{k,l,m} | 3,0 ± 0,9 ^{n,o,p,q,r} | 0,0 ± 0,0 ^s |
| 4,00 | 3,0 ± 0,0 ^{n,o,p,q,r} | 4,5 ± 0,6 ^{i,j,k,l} | 6,2 ± 1,0 ^{f,g,h} | 5,5 ± 1,7 ^{h,i} | 10,0 ± 2,8 ^{a,b} |
| 4,25 | 2,5 ± 0,6 ^{p,q,r} | 6,2 ± 1,5 ^{f,g,h} | 8,3 ± 0,5 ^{c,d} | 4,5 ± 0,7 ^{i,j,k,l} | 7,0 ± 2,7 ^{e,f,g} |
| 4,50 | 2,8 ± 0,6 ^{o,p,q,r} | 6,2 ± 1,2 ^{f,g,h} | 8,8 ± 0,4 ^{b,c} | 5,0 ± 0,0 ^{ij} | 7,5 ± 0,7 ^{d,e,f} |
| 4,75 | 3,3 ± 0,6 ^{m,n,o,p,q} | 6,0 ± 0,9 ^{g,h} | 7,5 ± 0,8 ^{d,e} | 6,2 ± 0,8 ^{f,g,h} | 10,0 ± 2,7 ^{a,b} |
| 5,00 | 4,3 ± 0,5 ^{j,k,l,m} | 6,4 ± 1,5 ^{f,g,h} | 7,0 ± 1,3 ^{e,f} | 6,8 ± 0,4 ^{e,f,g} | 11,0 ± 2,1 ^a |

* El diámetro promedio de los halos de inhibición fue calculado sin considerar el diámetro del pocillo (8 mm)

* Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Tabla A15. Diámetro promedio y desviación estándar en milímetros (mm) de los halos de inhibición correspondientes a concentraciones de TIM en el rango de 0 a 5 mg/mL, frente a 5 especies de hongos filamentosos.

| Concentración TIM (mg/mL) | Especies de hongos filamentosos | | | | |
|---------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------|----------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| | <i>A. niger</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>P. chrysogenum</i> | <i>P. corylophilum</i> | <i>R. stolonifer</i> |
| | Diámetro promedio del halo de inhibición (mm) | | | | |
| 0,00 | 0,0 ± 0,0 ^u | 0,0 ± 0,0 ^u | 0,0 ± 0,0 ^u | 0,0 ± 0,0 ^u | 0,0 ± 0,0 ^u |
| 2,50 | 1,8 ± 0,5 ^t | 3,0 ± 0,6 ^{p,q,r,s} | 4,0 ± 1,1 ^{m,n,o} | 0,0 ± 0,0 ^u | 6,0 ± 1,0 ^{g,h,i,j} |
| 3,00 | 2,5 ± 0,6 ^{r,s,t} | 2,8 ± 0,4 ^{q,r,s} | 5,7 ± 1,5 ^{ij,k} | 3,2 ± 0,4 ^{o,p,q,r,s} | 5,5 ± 0,8 ^{g,h,i,j} |
| 3,25 | 2,5 ± 0,6 ^{r,s,t} | 2,3 ± 0,5 ^{s,t} | 5,8 ± 1,0 ^{h,i,j} | 3,8 ± 0,8 ^{n,o,p} | 5,5 ± 0,7 ^{ij,k,l} |
| 3,50 | 3,0 ± 0,0 ^{p,q,r,s} | 4,8 ± 0,8 ^{k,l,m} | 5,2 ± 1,0 ^{j,k,l} | 4,7 ± 0,8 ^{l,m,n} | 6,0 ± 0,0 ^{g,h,i,j} |
| 4,00 | 3,4 ± 0,9 ^{o,p,q,r} | 5,5 ± 1,5 ^{ij,k,l} | 7,5 ± 0,6 ^{d,e,f} | 6,8 ± 0,4 ^{e,f,g} | 8,0 ± 1,4 ^{b,c,d} |
| 4,25 | 3,8 ± 0,5 ^{n,o,p,q} | 5,0 ± 1,5 ^{j,k,l} | 9,0 ± 0,6 ^{b,c} | 6,8 ± 0,4 ^{e,f,g} | 9,5 ± 1,3 ^b |
| 4,50 | 3,8 ± 0,5 ^{n,o,p,q} | 6,2 ± 0,4 ^{g,h,i} | 8,2 ± 0,8 ^{c,d} | 7,7 ± 0,5 ^{d,e} | 13,5 ± 2,1 ^a |
| 4,75 | 4,0 ± 0,0 ^{m,n,o,p} | 5,5 ± 1,6 ^{ij,k,l} | 7,5 ± 0,6 ^{d,e,f} | 7,3 ± 0,8 ^{d,e,f} | 13,5 ± 2,1 ^a |
| 5,00 | 4,5 ± 0,6 ^{l,m,n} | 6,7 ± 0,5 ^{f,g,h} | 7,3 ± 0,5 ^{d,e,f} | 7,8 ± 1,0 ^d | 13,5 ± 2,1 ^a |

* El diámetro promedio de los halos de inhibición fue calculado sin considerar el diámetro del pocillo (8 mm)

* Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0,05)

Tabla A16. Diámetro promedio y desviación estándar en milímetros (mm) de los halos de inhibición correspondientes a concentraciones de CIN en el rango de 0 a 5 mg/mL, frente a 5 especies de hongos filamentosos.

| Concentración CIN (mg/mL) | Especies de hongos filamentosos | | | | |
|---------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | <i>A. niger</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>P. chrysogenum</i> | <i>P. corylophilum</i> | <i>R. stolonifer</i> |
| | Diámetro promedio del halo de inhibición (mm) | | | | |
| 0,00 | 0,0 ± 0,0 ^a | 0,0 ± 0,0 ^a | 0,0 ± 0,0 ^a | 0,0 ± 0,0 ^a | 0,0 ± 0,0 ^a |
| 2,50 | 2,3 ± 0,4 ^b | 6,0 ± 1,1 ^b | 6,5 ± 0,6 ^b | 9,3 ± 0,8 ^b | 0,0 ± 0,0 ^a |
| 3,00 | 3,0 ± 0,7 ^c | 13,3 ± 3,9 ^{d,e,f} | 10,2 ± 1,7 ^{c,d} | 12,8 ± 1,3 ^c | 4,3 ± 4,0 ^b |
| 3,25 | 4,5 ± 0,5 ^d | 17,0 ± 4,5 ^{d,e,f,g} | 8,0 ± 3,7 ^{b,c} | 13,2 ± 1,3 ^{c,d} | 5,3 ± 0,5 ^{b,c} |
| 3,50 | 5,0 ± 0,7 ^d | 12,3 ± 3,0 ^{c,d} | 6,7 ± 0,5 ^b | 15,7 ± 1,5 ^d | 4,8 ± 0,5 ^{b,c} |
| 4,00 | 6,0 ± 0,7 ^e | 18,3 ± 9,0 ^{f,g} | 11,0 ± 0,9 ^{d,e} | 25,2 ± 1,6 ^{g,h} | 5,5 ± 0,6 ^{b,c} |
| 4,25 | 6,3 ± 0,9 ^{e,f} | 13,5 ± 7,3 ^{d,e,f} | 13,5 ± 1,2 ^f | 20,0 ± 2,8 ^e | 5,3 ± 0,5 ^{b,c} |
| 4,50 | 6,0 ± 0,6 ^e | 11,7 ± 2,3 ^{b,c} | 13,2 ± 1,3 ^{e,f} | 20,5 ± 3,6 ^{e,f} | 5,8 ± 1,0 ^{c,d} |
| 4,75 | 6,3 ± 0,8 ^{e,f} | 18,0 ± 8,0 ^{e,f,g} | 16,2 ± 1,0 ^g | 23,0 ± 1,7 ^{f,g} | 6,8 ± 0,5 ^{c,d} |
| 5,00 | 6,8 ± 0,8 ^f | 19,8 ± 7,1 ^g | 15,3 ± 1,9 ^{f,g} | 27,0 ± 3,3 ^h | 7,5 ± 0,6 ^d |

* El diámetro promedio de los halos de inhibición fue calculado sin considerar el diámetro del pocillo (8 mm)

* Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Tabla A17. Valores de n (g CA/g de proteínas) correspondiente a 15, 25, 35 y 45 °C obtenidos a partir del modelo de Scatchard modificado. Los valores se muestran como media (\pm desviación estándar) y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

| Sistema | g CA/g proteínas | | | |
|-------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | 15°C | 25°C | 35°C | 45°C |
| PCH-CAR | 0,4 ($\pm 0,0$) ^{ij} | 0,5 ($\pm 0,0$) ^{ij} | 0,4 ($\pm 0,0$) ^{ij} | 1,3 ($\pm 0,1$) ^a |
| PCH₃₋₁₁-CAR | 0,6 ($\pm 0,0$) ^{f,g,h} | 0,7 ($\pm 0,1$) ^{d,e,f} | 0,7 ($\pm 0,0$) ^{d,e,f} | 0,9 ($\pm 0,0$) ^{c,d,e} |
| PCH-TIM | 0,4 ($\pm 0,0$) ^{ij} | 0,5 ($\pm 0,1$) ^{h,i,j} | 0,5 ($\pm 0,0$) ^{h,i,j} | 0,5 ($\pm 0,1$) ^{g,h,i} |
| PCH₃₋₁₁-TIM | 0,8 ($\pm 0,0$) ^{c,d,e} | 0,9 ($\pm 0,2$) ^{b,c} | 0,9 ($\pm 0,3$) ^{c,d} | 1,1 ($\pm 0,1$) ^b |
| PCH-CIN | 0,4 ($\pm 0,0$) ^j | 0,4 ($\pm 0,0$) ^j | 0,4 ($\pm 0,0$) ^{ij} | 0,5 ($\pm 0,0$) ^{h,i,j} |
| PCH₃₋₁₁-CIN | 1,1 ($\pm 0,1$) ^b | 0,7 ($\pm 0,0$) ^{d,e,f} | 0,7 ($\pm 0,2$) ^{e,f,g} | 0,7 ($\pm 0,0$) ^{e,f,g} |

Figura A1. Efecto de la concentración de CAR (en el rango 0-200 μM) en la IF-Trp para PCH nativa a 15 (A), 25 (B), 35 (C) y 45 $^{\circ}\text{C}$ (D). Condiciones: concentración de proteínas 0,0043% m/v en buffer fosfato (pH 7, 50 mM) y temperatura 25 $^{\circ}\text{C}$.

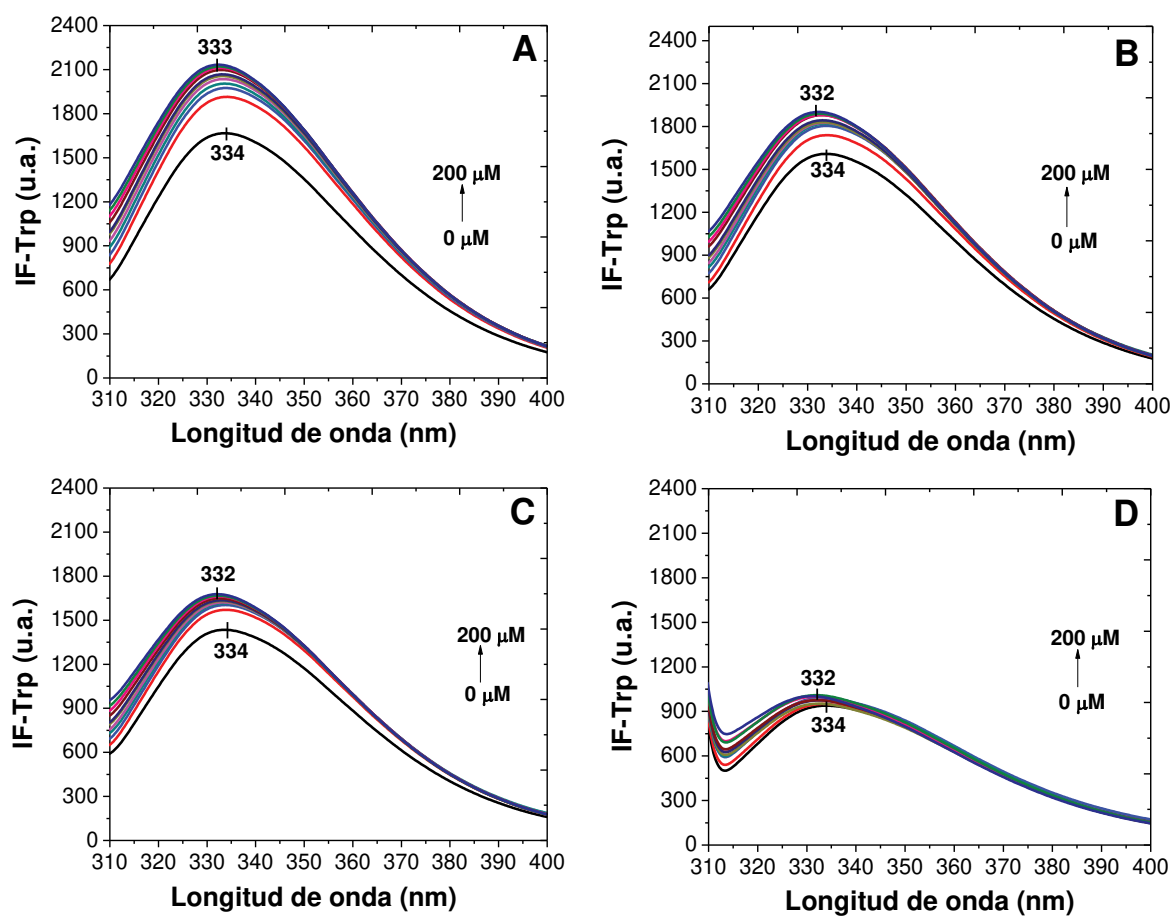


Figura A2. Efecto de la concentración de CAR (en el rango 0-200 μM) en la IF-Trp para PCH₃₋₁₁ a 15 (A), 25 (B), 35 (C) y 45 °C (D). Condiciones: concentración de proteínas 0,0043% m/v en buffer fosfato (pH 7, 50 mM) y temperatura 25°C.

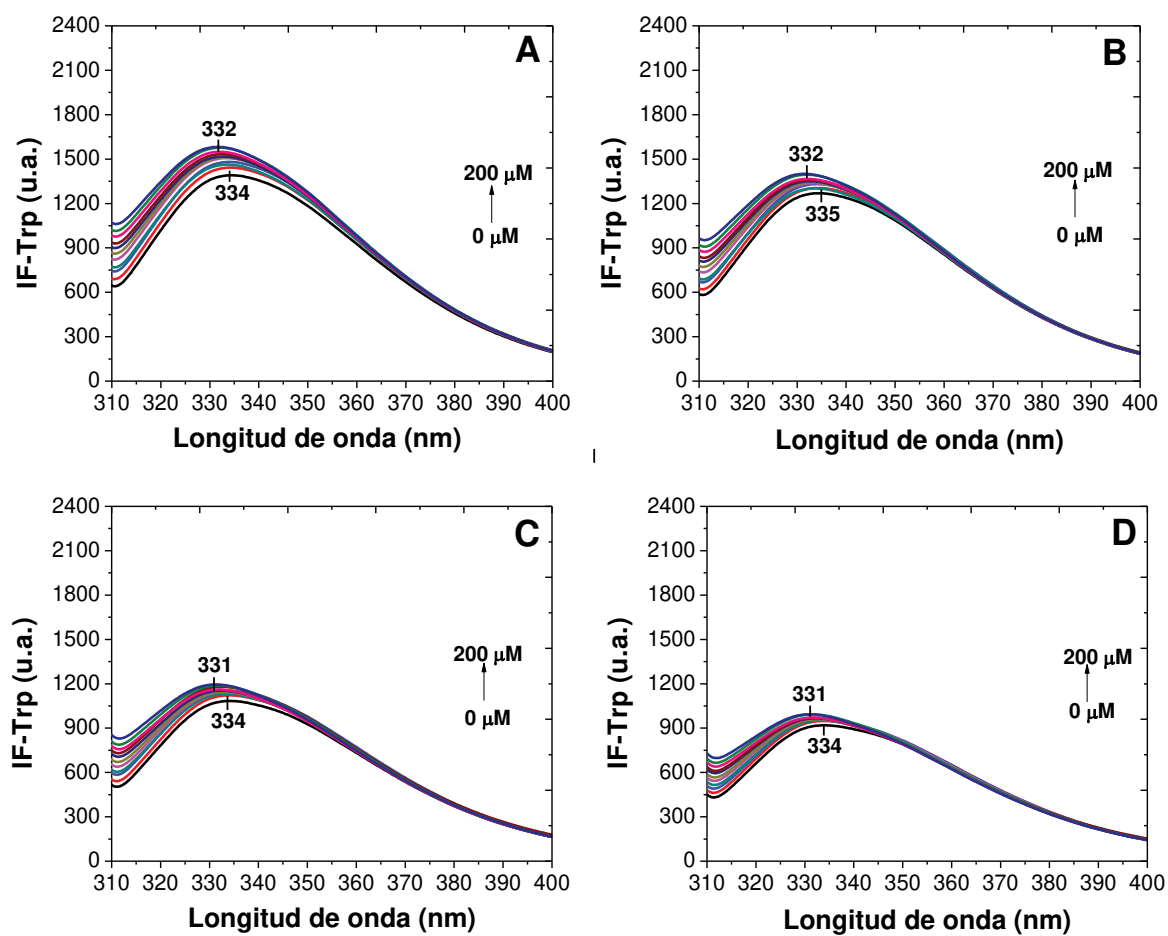


Figura A3. Efecto de la concentración de TIM (en el rango 0-200 μM) en IF-Trp para PCH nativa a 15 (A), 25 (B), 35 (C) y 45 $^{\circ}\text{C}$ (D). Condiciones: concentración de proteínas 0,0043% m/v en buffer fosfato (pH 7, 50 mM) y temperatura 25 $^{\circ}\text{C}$.

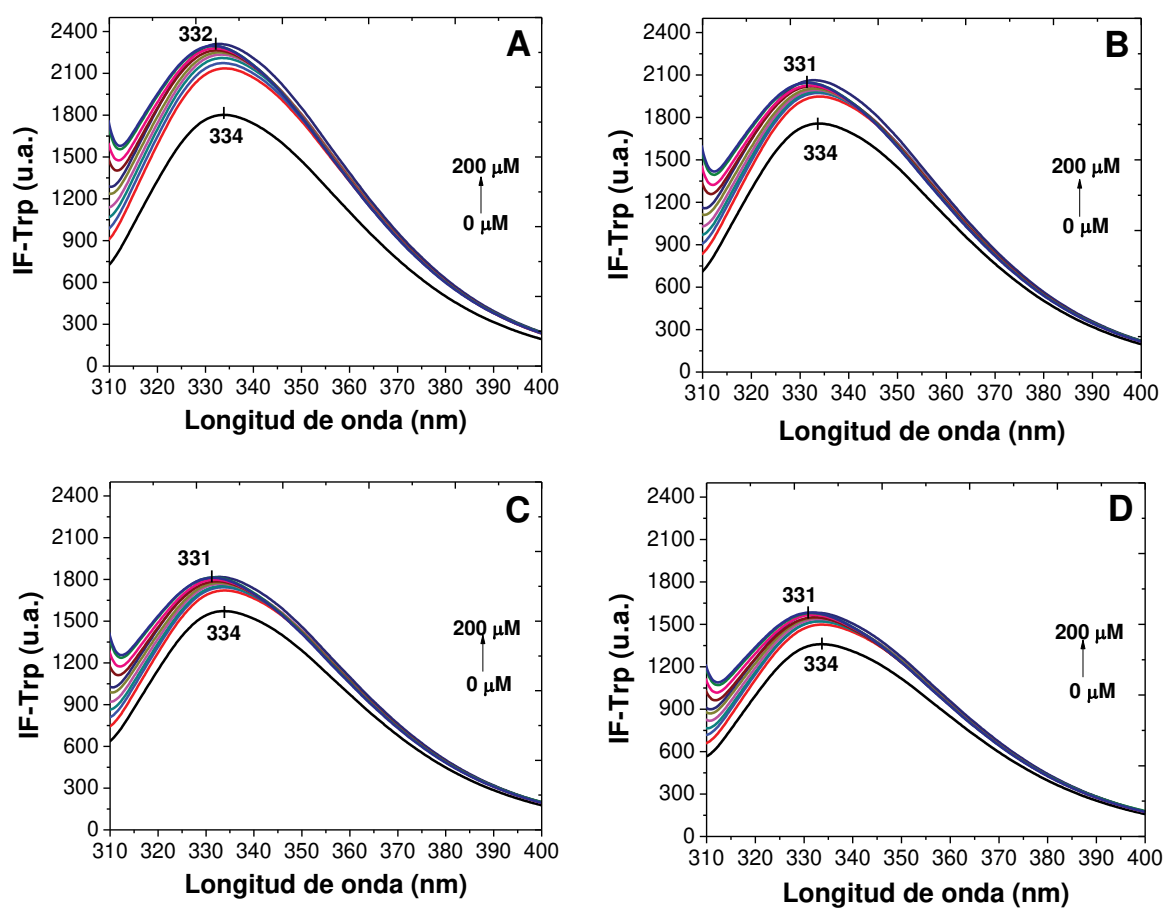


Figura A4. Efecto de la concentración de TIM (en el rango 0-200 μM) en la IF-Trp para PCH₃₋₁₁ a 15 (A), 25 (B), 35 (C) y 45 °C (D). Condiciones: concentración de proteínas 0,0043% m/v en buffer fosfato (pH 7, 50 mM) y temperatura 25°C.

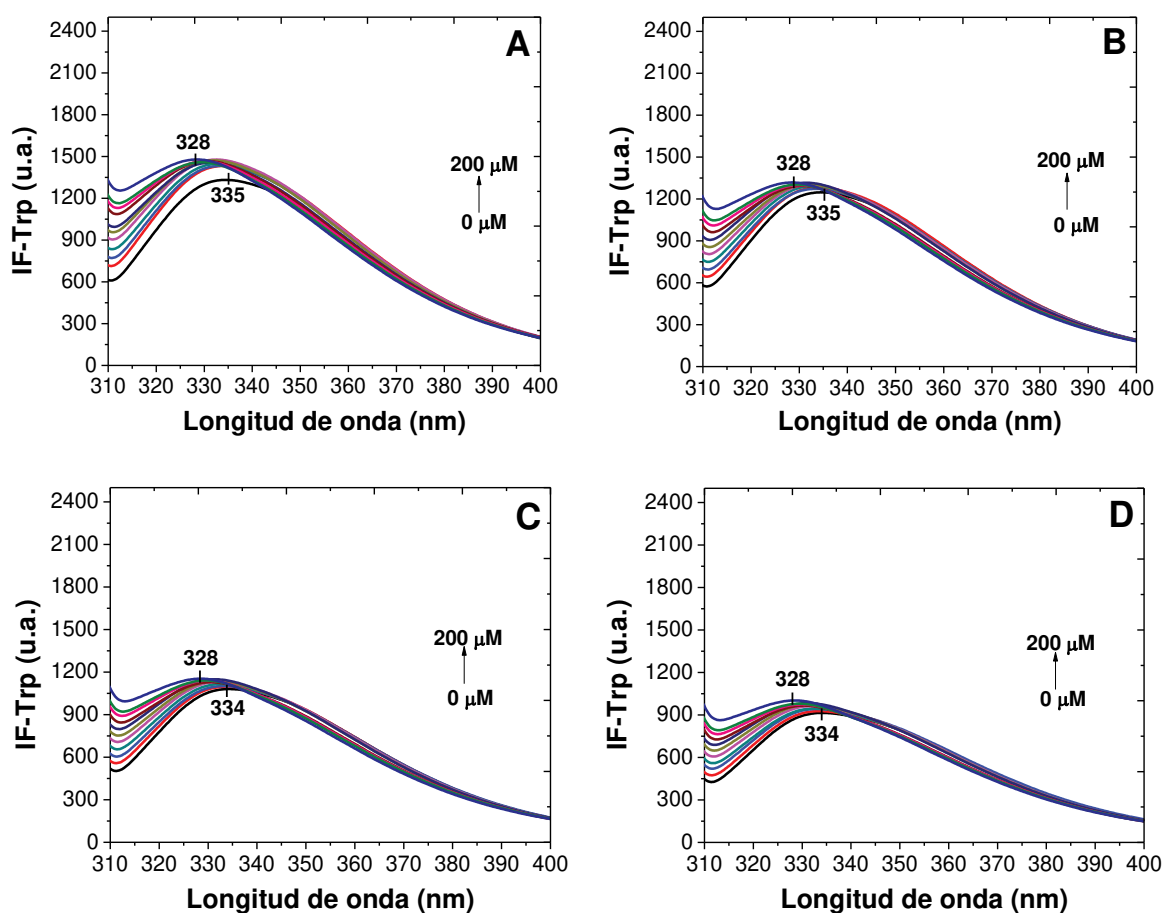


Figura A5. Efecto de la concentración de CIN (en el rango 0-200 μM) en la IF-Trp para PCH nativa a 15 (A), 25 (B), 35 (C) y 45 $^{\circ}\text{C}$ (D). Condiciones: concentración de proteínas 0,0043% m/v en buffer fosfato (pH 7, 50 mM) y temperatura 25 $^{\circ}\text{C}$.

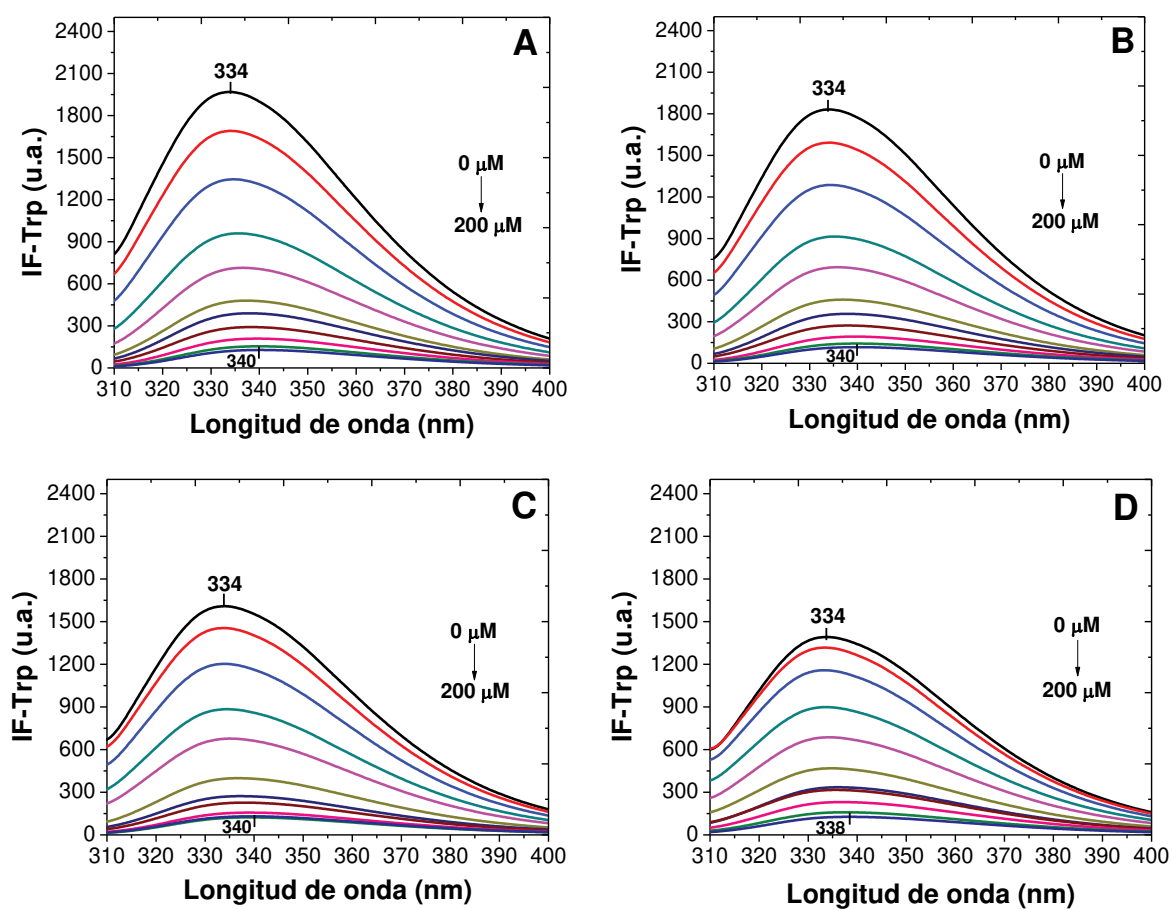


Figura A6. Efecto de la concentración de CIN (en el rango 0-200 μM) en la IF-Trp para PCH₃₋₁₁ a 15 (A), 25 (B), 35 (C) y 45 °C (D). Condiciones: concentración de proteínas 0,0043% m/v en buffer fosfato (pH 7, 50 mM) y temperatura 25°C.

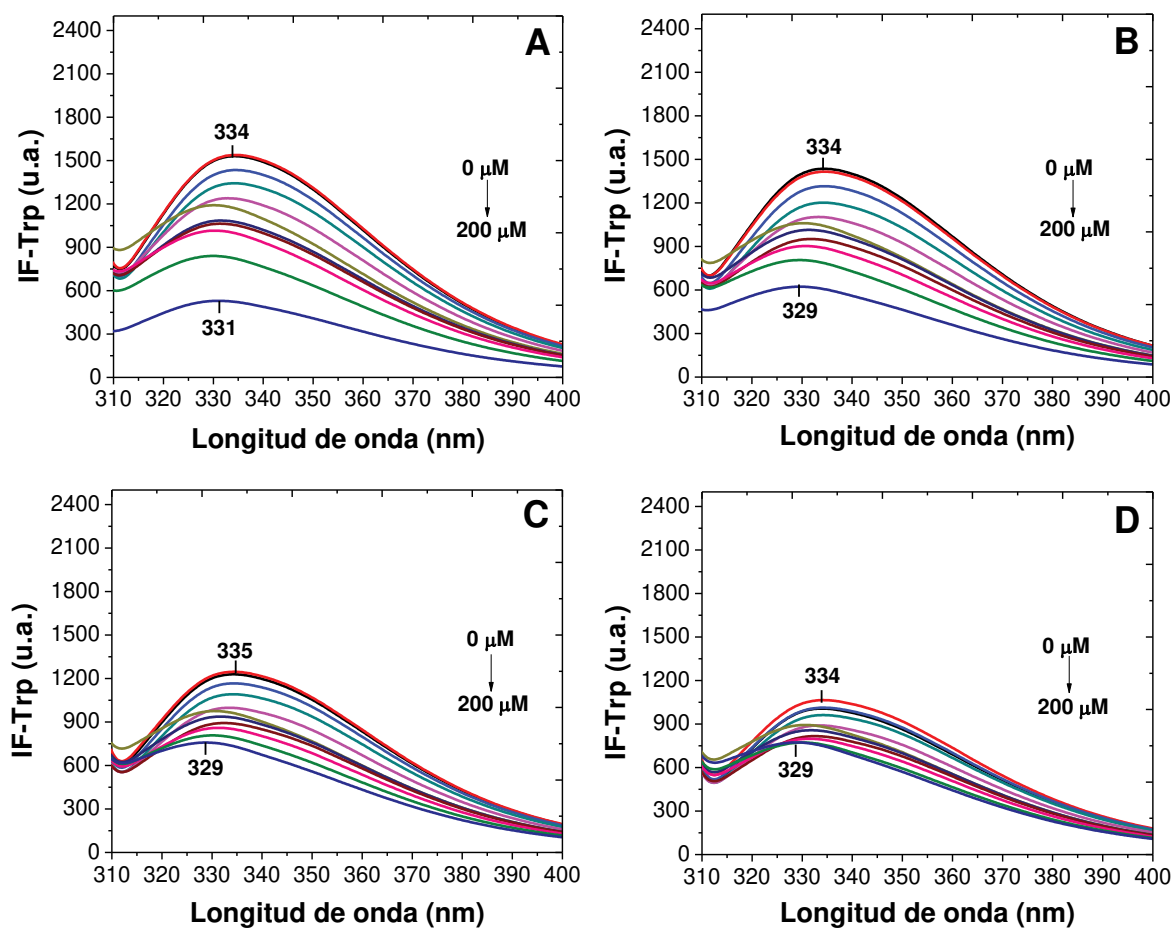


Figura A7. Efecto de la concentración de los CA (en el rango 0-200 μM) en la IF-ANS para PCH-CAR (A), PCH₃₋₁₁-CAR (B), PCH-TIM (C), PCH₃₋₁₁-TIM (D), PCH-CIN (E) y PCH₃₋₁₁-CIN (F). Condiciones: concentración de proteínas 0,0043% m/v en buffer fosfato (pH 7, 50 mM), concentración de ANS 15 mM y temperatura 25°C.

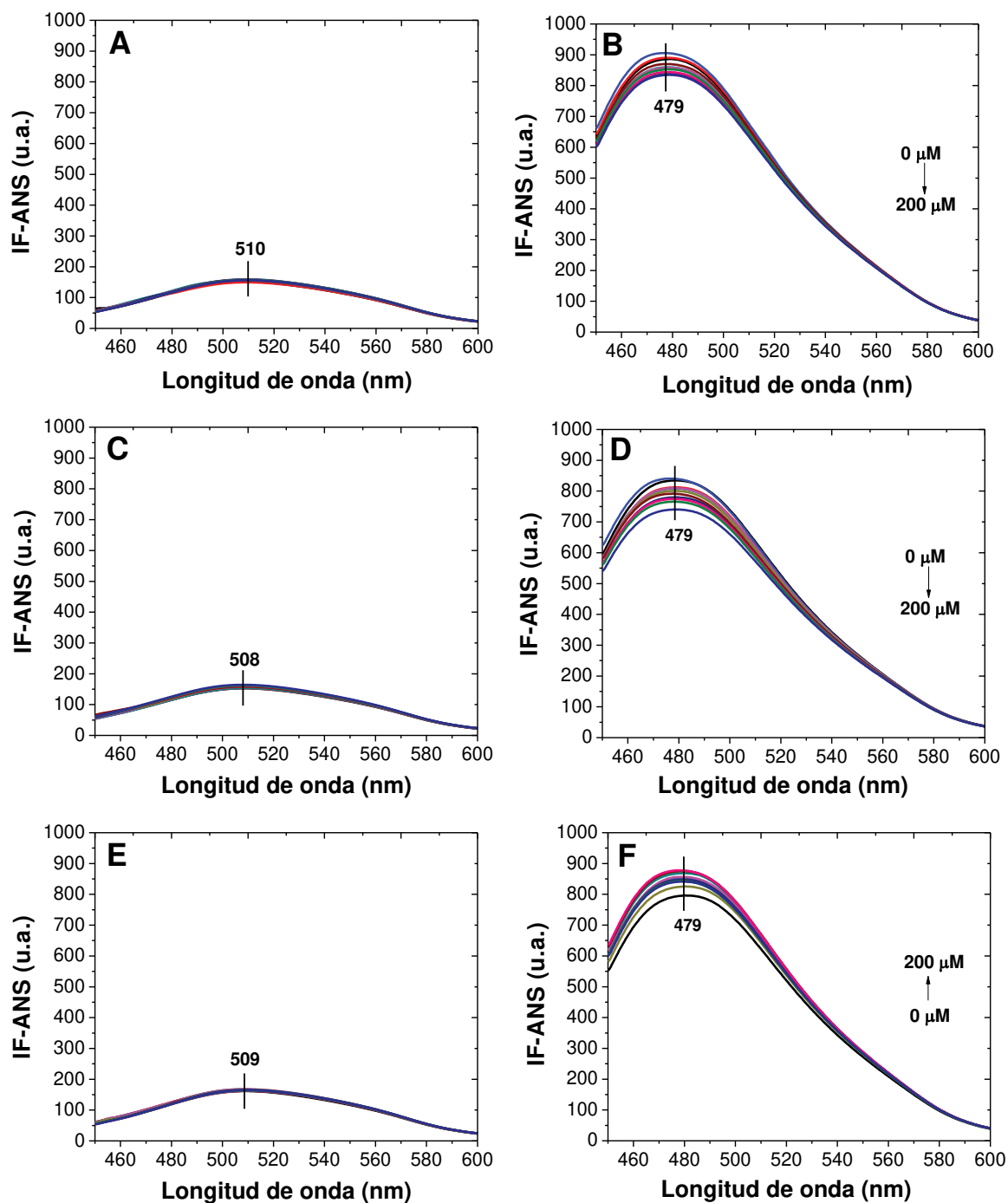


Figura A8. PSDi y PSDv de los sistemas PCH₃₋₁₁-CA a pH 3 (A-1 y A-2) y pH 7 (B-1 y B-2) del medio acuoso.

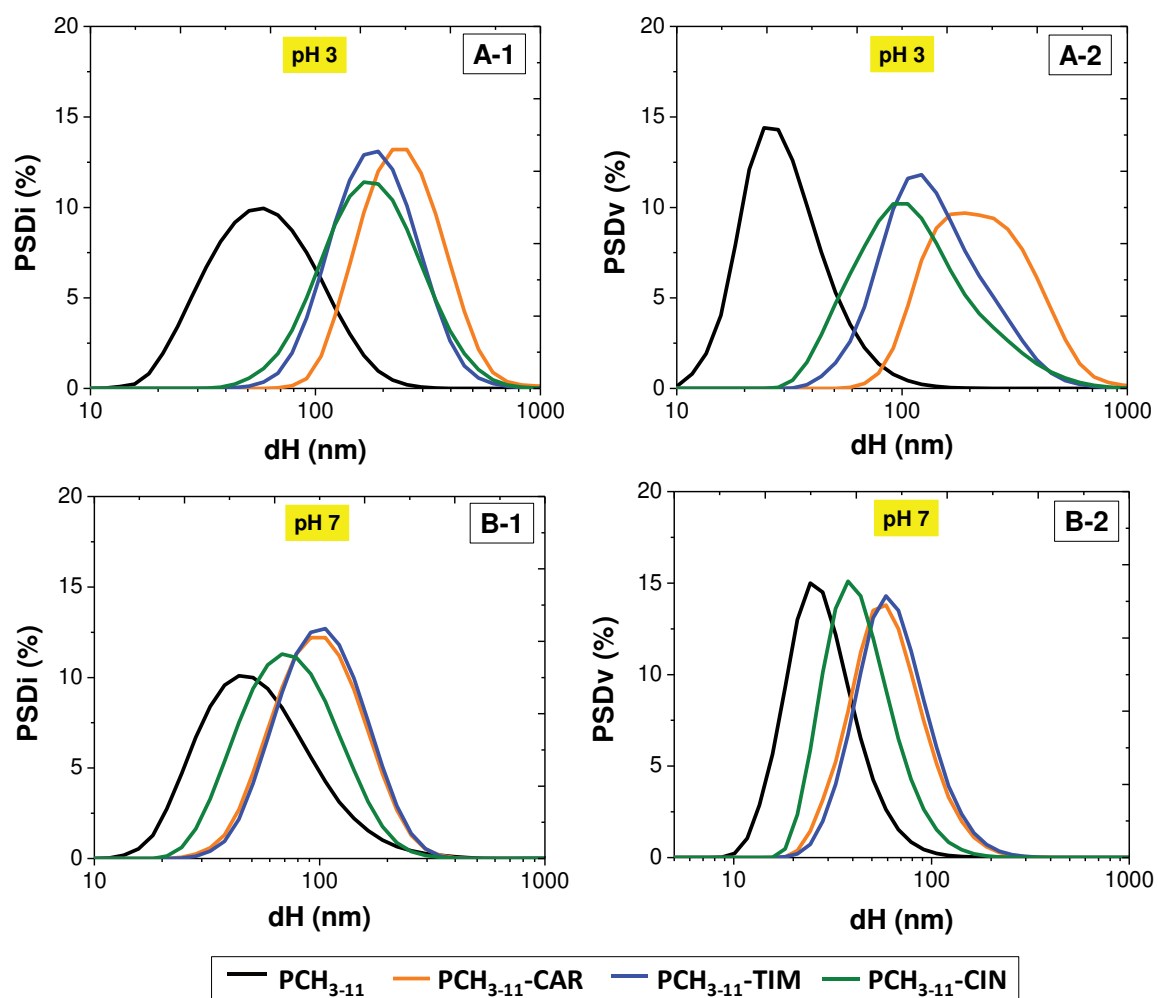


Figura A9. Parámetros de textura de las muestras de pan sin SFR (control) y recubiertas con las SFR correspondientes al día 0 y luego de 7 días de almacenamiento a 25°C. Los valores se muestran como media, \pm desviación estándar y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

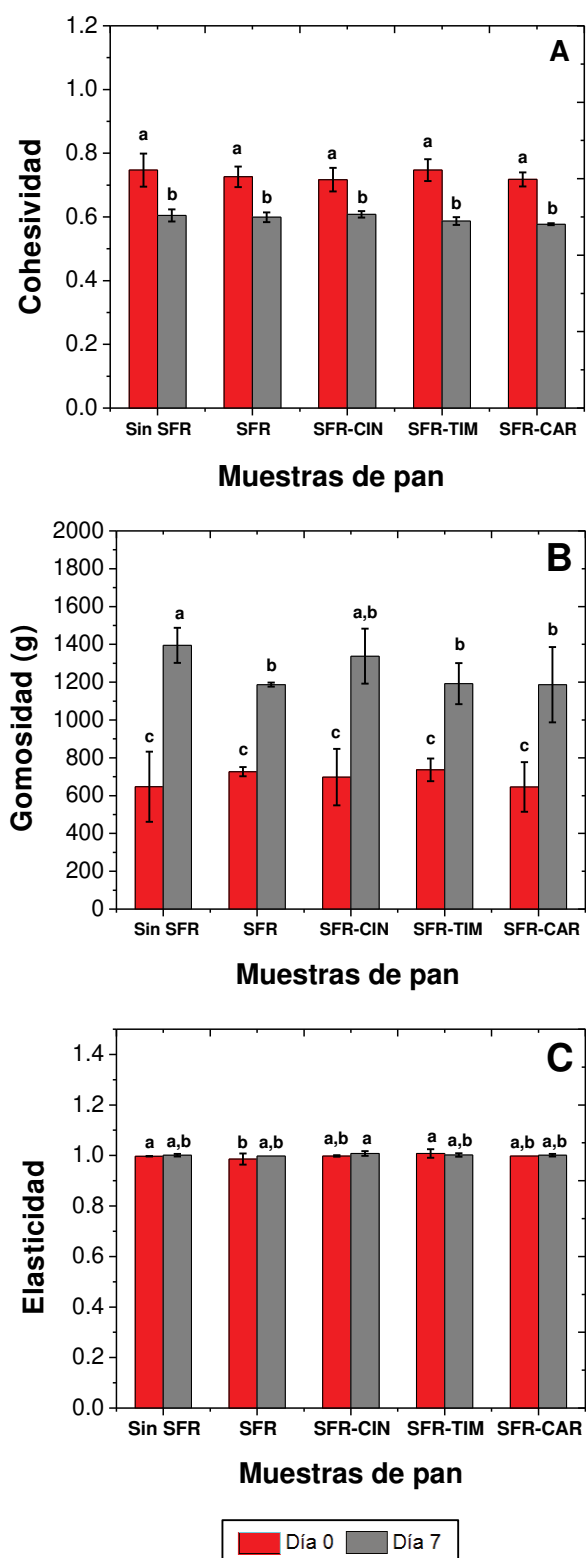


Figura A10. Aspecto visual de las rodajas de pan de molde sin conservantes almacenados a temperatura ambiente, luego de 30 días. (A) Envase conteniendo muestras de pan y placa con PA; (B) Muestras de pan almacenadas con placa conteniendo PA de PCH_{5-11,4}-CAR; (C) Muestras de pan almacenadas con placa conteniendo PA de PCH_{5-11,4}-TIM.

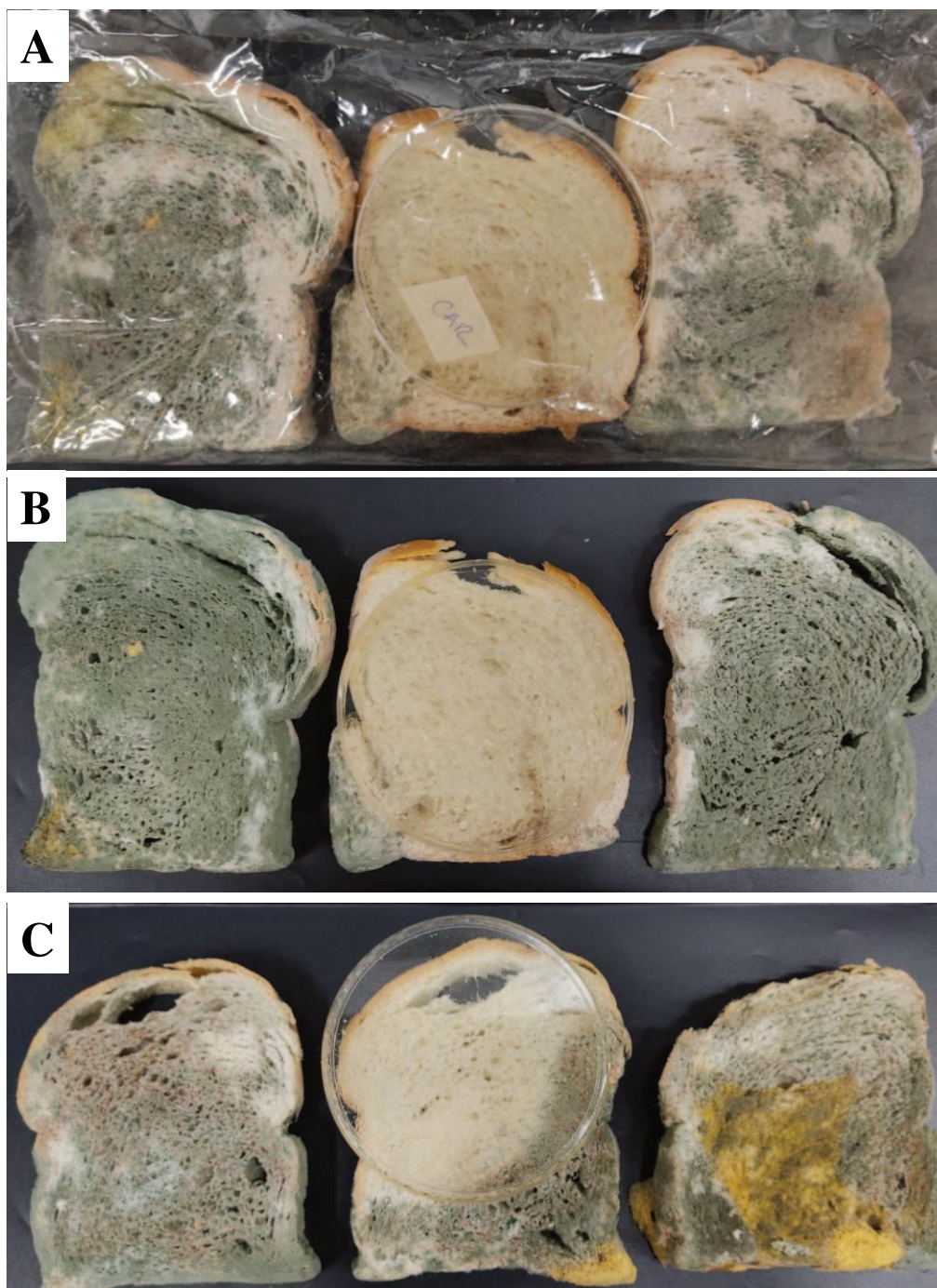


Figura A11. Soluciones de PCH_{5-11,4}-AE de orégano: (a) Control: PCH_{5-11,4} sin AE de orégano; (b) Nanocomplejo formulado con solución de AE de orégano al 0,5%; (c) Nanocomplejo formulado con solución de AE de orégano al 1%; (d) Nanocomplejo formulado con solución de AE de orégano al 2%.

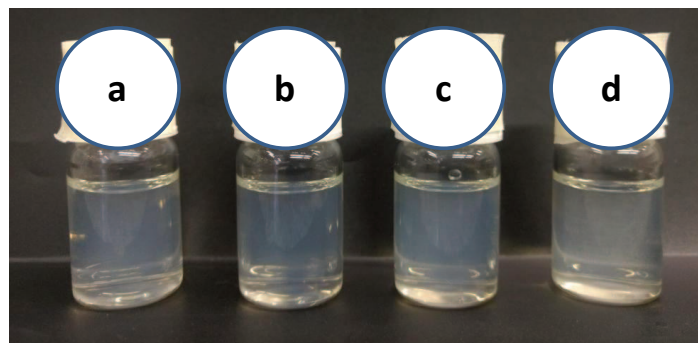
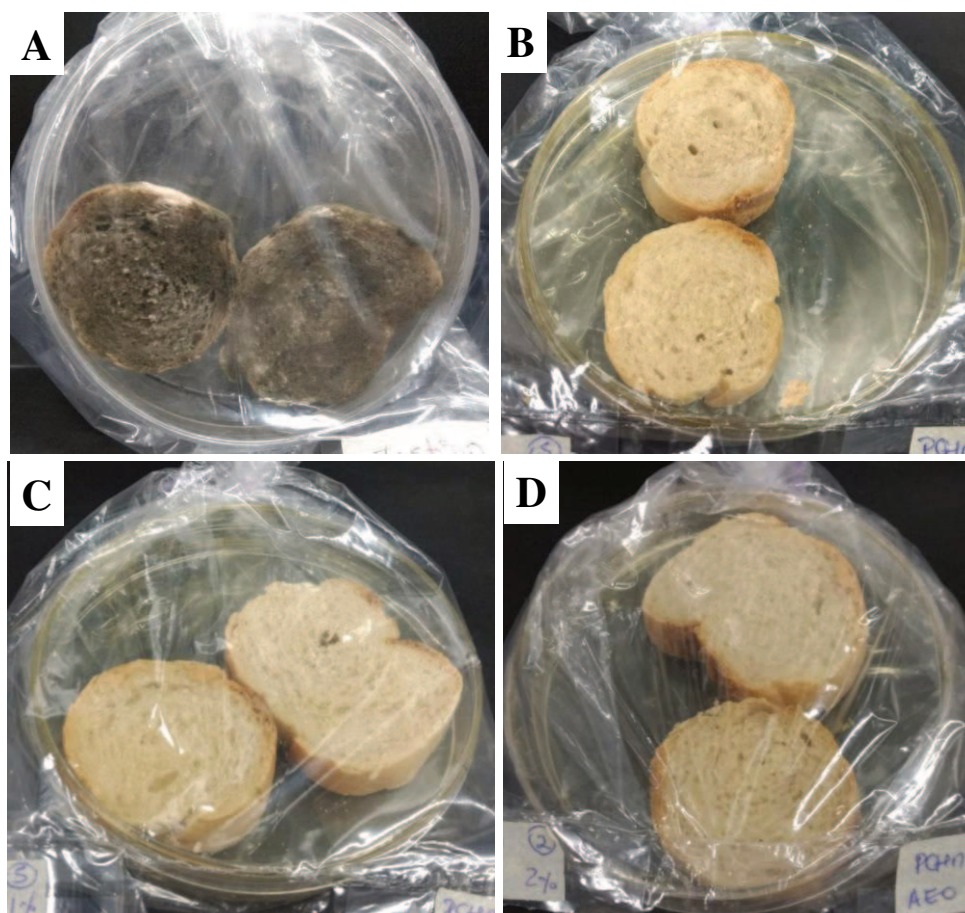


Figura A12. Aspecto visual de las rodajas de pan de molde sin conservantes almacenados durante 30 días a temperatura ambiente. (A) Muestra de pan control almacenadas sin PA; (B) Muestras de pan almacenados con PA de PCH_{5-11,4}-AE de orégano (nanocomplejo formulado con solución de AE de orégano al 0,5%); (C) Muestras de pan almacenados con PA de PCH_{5-11,4}-AE de orégano (nanocomplejo formulado con solución de AE de orégano al 1%); (D) Muestras de pan almacenados con PA de PCH_{5-11,4}-AE de orégano (nanocomplejo formulado con solución de AE de orégano al 2%).



8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasi, S., Benvidi, A., Gharaghani, S., Rezaeinasab, M. (2018). Chemometric studies of thymol binding with bovine serum albumin: A developing strategy for the successful investigation of pharmacological activity. *Bioelectrochemistry*, 124, 172-184.<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.07.017>
- Abbaszadeh, S., Sharifzadeh, A., Shokri, H., Khosravi, A. R., Abbaszadeh, A. (2014). Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de mycologie medicale*, 24(2), 51-56.<https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.01.063>
- Aguilar-Pérez, K. M., Avilés-Castrillo, J. I., Medina, D. I., Parra-Saldivar, R., Iqbal, H. (2020). Insight into nanoliposomes as smart nanocarriers for greening the twenty-first century biomedical settings. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 1441.<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.579536>
- Aguirre-Joya, J. A., De Leon-Zapata, M. A., Alvarez-Perez, O. B., Torres-León, C., Nieto-Oropeza, D. E., Ventura-Sobrevilla, J. M., Aguilar, M. A., Ruelas-Chacón, X., Rojas, R., Ramos-Aguiñaga, M. E. (2018). Basic and applied concepts of edible packaging for foods *Food packaging and preservation* (pp. 1-61): Elsevier.
- Aguirre, J. F., Osella, C. A., Carrara, C. R., Sánchez, H. D., Buera, M. P. (2011). Effect of storage temperature on starch retrogradation of bread staling. *Starch-Stärke*, 63(9), 587-593.<https://doi.org/10.1002/star.201100023>
- Albani, J. R. (2004). *Structure and Dynamics of Macromolecules: Absorption and Fluorescence Studies* (Science, E. Ed.). Amsterdam: Elsevier Science.
- Altamirano-Fortoul, R., Moreno-Terrazas, R., Quezada-Gallo, A., Rosell, C. M. (2012). Viability of some probiotic coatings in bread and its effect on the crust mechanical properties. *Food Hydrocolloids*, 29(1), 166-174.<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.02.015>
- Altan, A., Aytac, Z., Uyar, T. (2018). Carvacrol loaded electrospun fibrous films from zein and poly (lactic acid) for active food packaging. *Food Hydrocolloids*, 81, 48-59.<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.028>
- Amerine, M. A., Pangborn, R. M., Roessler, E. B. (2013). *Principles of sensory evaluation of food*: Elsevier.
- Angioloni, A., Collar, C. (2009). Bread crumb quality assessment: a plural physical approach. *European Food Research and Technology*, 229(1), 21-30

- Anker, M., Stading, M., Hermansson, A. M. (2000). Relationship between the microstructure and the mechanical and barrier properties of whey protein films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3806-3816.<https://doi.org/10.1021/jf000040m>
- Ares, G., Alcaire, F., Antúnez, L., Vidal, L., Giménez, A., Castura, J. C. (2017). Identification of drivers of (dis) liking based on dynamic sensory profiles: Comparison of Temporal Dominance of Sensations and Temporal Check-all-that-apply. *Food Research International*, 92, 79-87.<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.016>
- Arroyo, M. (2003). *Natural antifungal systems for prevention of mould spoilage in bakery products*. (PhD Thesis), Cranfield University, Cranfield, Bedford, UK.
- Arroyo, M., Aldred, D., Magan, N. (2005). Environmental factors and weak organic acid interactions have differential effects on control of growth and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* isolates in bread. *International Journal of Food Microbiology*, 98(3), 223-231.<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.07.004>
- Arzeni, C., Pérez, O. E., LeBlanc, J. G., Pilosof, A. M. R. (2015). Egg albumin–folic acid nanocomplexes: Performance as a functional ingredient and biological activity. *Journal of functional foods*, 18, 379-386. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.07.018>
- Arzenšek, D., Podgornik, R., Kuzman, D. (2010). *Dynamic light scattering and application to proteins in solutions*. Paper presented at the Seminar; University of Ljubljana; Ljubljana, Slovenia
- ASTM. (2003a). D 882-03: Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics. In: American Society for Testing and Materials, ASTM Book of Standards, PA, USA.
- ASTM. (2003b). E 398 - 03: Standard Test Method for Water Vapor Transmission Rate of Sheet Materials Using Dynamic Relative Humidity Measurement. In: American Society for Testing and Materials, ASTM Book of Standards, PA, USA.
- Awadé, A. C., Efstathiou, T. (1999). Comparison of three liquid chromatographic methods for egg-white protein analysis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 723(1-2), 69-74.[https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(98\)00538-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00538-6)
- Axel, C., Brosnan, B., Zannini, E., Furey, A., Coffey, A., Arendt, E. K. (2016). Antifungal sourdough lactic acid bacteria as biopreservation tool in quinoa and rice bread. *International Journal of Food Microbiology*, 239, 86-94.<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.006>
- Axel, C., Rocker, B., Brosnan, B., Zannini, E., Furey, A., Coffey, A., Arendt, E. K. (2015). Application of *Lactobacillus amylovorus* DSM19280 in gluten-free sourdough bread

- to improve the microbial shelf life. *Food microbiology*, 47, 36-44.<https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.10.005>
- Axel, C., Zannini, E., Arendt, E. K. (2017). Mold spoilage of bread and its biopreservation: A review of current strategies for bread shelf life extension. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(16), 3528-3542.<https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1147417>
- Azarakhsh, N., Osman, A., Ghazali, H. M., Tan, C. P., Adzahan, N. M. (2014). Lemongrass essential oil incorporated into alginate-based edible coating for shelf-life extension and quality retention of fresh-cut pineapple. *Postharvest Biology and Technology*, 88, 1-7.<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.09.004>
- Babili, F. E., Bouajila, J., Souchard, J. P., Bertrand, C., Bellvert, F., Fouraste, I., Moulis, C., Valentin, A. (2011). Oregano: chemical analysis and evaluation of its antimalarial, antioxidant, and cytotoxic activities. *Journal of food science*, 76(3), C512-C518. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02109.x>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.<https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Balaguer, M. P., Lopez-Carballo, G., Catala, R., Gavara, R., Hernandez-Munoz, P. (2013). Antifungal properties of gliadin films incorporating cinnamaldehyde and application in active food packaging of bread and cheese spread foodstuffs. *International Journal of Food Microbiology*, 166(3), 369-377.<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.012>
- Bansod, S., Rai, M. (2008). Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. *World Journal of Medical Sciences*, 3(2), 81-88
- Banwart, G. (2012). *Basic food microbiology*: Springer Science & Business Media.
- Bartkiene, E., Bartkevics, V., Lele, V., Pugajeva, I., Zavistanaviciute, P., Zadeike, D., Juodeikiene, G. (2019). Application of antifungal lactobacilli in combination with coatings based on apple processing by-products as a bio-preservative in wheat bread production. *Journal of food science and technology*, 56(6), 2989-3000.<https://doi.org/10.1007/s13197-019-03775-w>
- Beuchat, L. R., Cousin, M. A. (2001). Yeasts and molds. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 4, 209-215

- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337-351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Bodart, M., de Peñaranda, R., Deneyer, A., Flamant, G. (2008). Photometry and colorimetry characterisation of materials in daylighting evaluation tools. *Building and Environment*, 43(12), 2046-2058. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2007.12.006>
- Bora, H., Kamle, M., Mahato, D. K., Tiwari, P., Kumar, P. (2020). Citrus essential oils (CEOs) and their applications in food: An overview. *Plants*, 9(3), 357. <https://doi.org/10.3390/plants9030357>
- Bottalico, A., Perrone, G. (2002). Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe *Mycotoxins in plant disease* (pp. 611-624): Springer.
- Bouddine, L., Louaste, B., Achahbar, S., Chami, N., Chami, F., Remmal, A. (2012). Comparative study of the antifungal activity of some essential oils and their major phenolic components against *Aspergillus niger* using three different methods. *African Journal of Biotechnology*, 11(76), 14083-14087. <https://10.5897/AJB11.3293>
- Bourne, M. (2002). *Food texture and viscosity: concept and measurement*: Elsevier.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Calderón-Castro, A., Vega-García, M. O., de Jesús Zazueta-Morales, J., Fitch-Vargas, P. R., Carrillo-López, A., Gutiérrez-Dorado, R., Limón-Valenzuela, V., Aguilar-Palazuelos, E. (2018). Effect of extrusion process on the functional properties of high amylose corn starch edible films and its application in mango (*Mangifera indica* L.) cv. Tommy Atkins. *Journal of food science and technology*, 55(3), 905-914. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2997-6>
- Callejo González, M. J. (2002). *Industrias de cereales y derivados*: Ediciones Mundi-Prensa.
- Campbell, L., Raikos, V., Euston, S. R. (2003). Modification of functional properties of egg-white proteins. *Food/Nahrung*, 47(6), 369-376. <https://doi.org/10.1002/food.200390084>
- Carmichael, J. W., Kendrick, W. B., Connors, I. L., Sigler, L. (1980). *Genera of Hyphomycetes*: Univ. Alberta Press.

- Castro, W., Oblitas, J., Chuquizuta, T., Avila-George, H. (2017). Application of image analysis to optimization of the bread-making process based on the acceptability of the crust color. *Journal of Cereal Science*, 74, 194-199
- Cauvain, S. P. (2015). *Technology of breadmaking* (Springer Ed. Third Edition ed.).
- Cauvain, S. P., Young, L. S. (2007). *Technology of breadmaking*.
- Chakre, D. S., Patil, P. L., Patil, B. C. (1984). study on bread spoilage and its control. *Journal of Maharashtra agricultural universities*
- Chandel, T. I., Zaman, M., Khan, M. V., Ali, M., Rabbani, G., Ishtikhar, M., Khan, R. H. (2018). A mechanistic insight into protein-ligand interaction, folding, misfolding, aggregation and inhibition of protein aggregates: An overview. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 1115-1129. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.185>
- Chaudhari, A. K., Singh, V. K., Das, S., Dubey, N. K. (2021). Nanoencapsulation of essential oils and their bioactive constituents: A novel strategy to control mycotoxin contamination in food system. *Food and Chemical Toxicology*, 149, 112019. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112019>
- Chavan, P. S., Tupe, S. G. (2014). Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. *Food Control*, 46, 115-120. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.007>
- Chen, F., Kong, N., Wang, L., Luo, Z., Yin, J., Chen, Y. (2021). Nanocomplexation between thymol and soy protein isolate and its improvements on stability and antibacterial properties of thymol. *Food chemistry*, 334, 127594. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127594>
- Cheng, M., Wang, J., Zhang, R., Kong, R., Lu, W., Wang, X. (2019). Characterization and application of the microencapsulated carvacrol/sodium alginate films as food packaging materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 141, 259-267. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.215>
- Cheng, S., Liu, J., Chang, E., Chang, S. (2008). Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. *Bioresource technology*, 99(11), 5145-5149. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.013>
- Císarová, M., Hleba, L., Tančinová, D., Florková, M., Foltinová, D., Charousová, I., Vrbová, K., Božik, M., Klouček, P. (2021). Inhibitory effect of essential oils from some Lamiaceae species on growth of Eurotium Spp. Isolated From Bread. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 857-862

- Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskevicius, A., Bartkiene, E. (2013). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food Control*, 31(2), 539-545.<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.004>
- Coda, R., Cassone, A., Rizzello, C. G., Nionelli, L., Cardinali, G., Gobbetti, M. (2011). Antifungal activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during sourdough fermentation: identification of novel compounds and long-term effect during storage of wheat bread. *Applied and environmental microbiology*, 77(10), 3484-3492.<https://doi.org/10.1128/AEM.02669-10>
- Coda, R., Rizzello, C. G., Nigro, F., De Angelis, M., Arnault, P., Gobbetti, M. (2008). Long-term fungal inhibitory activity of water-soluble extracts of *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto and sourdough lactic acid bacteria during bread storage. *Applied and environmental microbiology*, 74(23), 7391-7398.<https://doi.org/10.1128/AEM.01420-08>
- Cogan, U., Kopelman, M., Mokady, S., Shinitzky, M. (1976). Binding affinities of retinol and related compounds to retinol binding proteins. *European journal of biochemistry*, 65(1), 71-78. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1976.tb10390.x>
- Corsetti, A., Gobbetti, M., De Marco, B., Balestrieri, F., Paoletti, F., Russi, L., Rossi, J. (2000). Combined effect of sourdough lactic acid bacteria and additives on bread firmness and staling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 3044-3051.
<https://doi.org/10.1021/jf990853e>
- Corsetti, A., Perpetuini, G., Tofalo, R. (2015). Biopreservation effects in fermented foods *Advances in fermented foods and beverages* (pp. 311-332): Elsevier.
- Cristani, M. T., D'Arrigo, M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Micieli, D., Venuti, V., Bisignano, G., Saija, A., Trombetta, D. (2007). Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), 6300-6308.<https://doi.org/10.1021/jf070094x>
- Croguennec, T., Renault, A., Beaufils, S., Dubois, J. J., Pezennec, S. (2007). Interfacial properties of heat-treated ovalbumin. *J Colloid Interface Sci*, 315(2), 627-636.<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.07.041>
- Dambolena, J. S., López, A. G., Cánepa, M. C., Theumer, M. G., Zygadlo, J. A., Rubinstein, H. R. (2008). Inhibitory effect of cyclic terpenes (limonene, menthol, menthone and

- thymol) on *Fusarium verticillioides* MRC 826 growth and fumonisin B1 biosynthesis. *Toxicon*, 51(1), 37-44.<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.07.005>
- Dao, T., Dantigny, P. (2011). Control of food spoilage fungi by ethanol. *Food Control*, 22(3-4), 360-368.<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.019>
- de Jesus, F. F. S., Coelho, A. G., de Assis Pallos, L., da Silva, J. A. F., Daniel, D., de Jesus, D. P. (2018). Simple and fast method for simultaneous determination of propionate and sorbate in bread by capillary electrophoresis with UV spectrophotometric detection. *Journal of Food Composition and Analysis*, 72, 93-96.<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.06.010>
- De Koe, W. J., Juodeikiene, G. (2012). Mycotoxin contamination of wheat, flour and bread *Breadmaking* (pp. 614-658): Elsevier.
- de Oliveira Filho, J. G., Miranda, M., Ferreira, M. D., Plotto, A. (2021). Nanoemulsions as edible coatings: a potential strategy for fresh fruits and vegetables preservation. *Foods*, 10(10), 2438. <https://doi.org/10.3390/foods10102438>
- De Ruyck, K., De Boevre, M., Huybrechts, I., De Saeger, S. (2015). Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: Short review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 766, 32-41.<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.07.003>
- Deans, S. G., Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 5(2), 165-180
- Debonne, E., Van Bockstaele, F., Samapundo, S., Eeckhout, M., Devlieghere, F. (2018). The use of essential oils as natural antifungal preservatives in bread products. *Journal of essential oil research*, 30(5), 309-318.<https://doi.org/10.1080/10412905.2018.1486239>
- Dehghan, P., Mohammadi, A., Mohammadzadeh-Aghdash, H., Dolatabadi, J. E. N. (2018). Pharmacokinetic and toxicological aspects of potassium sorbate food additive and its constituents. *Trends in Food Science & Technology*, 80, 123-130.<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.012>
- Delshadi, R., Bahrami, A., Tafti, A. G., Barba, F. J., Williams, L. L. (2020). Micro and nano-encapsulation of vegetable and essential oils to develop functional food products with improved nutritional profiles. *Trends in Food Science & Technology*, 104, 72-83.<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.004>
- Dengate, S., Ruben, A. (2002). Controlled trial of cumulative behavioural effects of a common bread preservative. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 38(4), 373-376. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1754.2002.00009.x>

- Din, M. I., Ghaffar, T., Najeeb, J., Hussain, Z., Khalid, R., Zahid, H. (2020). Potential perspectives of biodegradable plastics for food packaging application-review of properties and recent developments. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 37(4), 665-680.<https://doi.org/10.1080/19440049.2020.1718219>
- Ding, S., Peng, B., Li, Y., Yang, J. (2019). Evaluation of specific volume, texture, thermal features, water mobility, and inhibitory effect of staling in wheat bread affected by maltitol. *Food chemistry*, 283, 123-130.<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.045>
- Dong, X., Zhang, Y. Q. (2021). An insight on egg white: From most common functional food to biomaterial application. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 109(7), 1045-1058
- Dos Santos, J. L. P., Bernardi, A. O., Morassi, L. L. P., Silva, B. S., Copetti, M. V., Sant'Ana, A. S. (2016). Incidence, populations and diversity of fungi from raw materials, final products and air of processing environment of multigrain whole meal bread. *Food Research International*, 87, 103-108
- Doyle, A. A., Stephens, J. C. (2019). A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents. *Fitoterapia*, 139, 104405
- Du, W.-X., Avena-Bustillos, R. J., Woods, R., Breksa, A. P., McHugh, T. H., Friedman, M., Levin, C. E., Mandrell, R. (2012). Sensory evaluation of baked chicken wrapped with antimicrobial apple and tomato edible films formulated with cinnamaldehyde and carvacrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(32), 7799-7804.<https://doi.org/10.1021/jf301281a>
- El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., El Mousadik, A., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F. N. R. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International journal of pharmaceutics*, 483(1-2), 220-243.<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>
- Erben, M., Pérez, A. A., Osella, C. A., Alvarez, V. A., Santiago, L. G. (2019). Impact of gum arabic and sodium alginate and their interactions with whey protein aggregates on bio-based films characteristics. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 999-1007.<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.131>
- Fadda, C., Sanguinetti, A. M., Del Caro, A., Collar, C., Piga, A. (2014). Bread staling: updating the view. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 473-492.<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12064>

- Falke, S., Betzel, C. (2019). Dynamic Light Scattering (DLS). En Pereira, A. S., Tavares, P., y Limão-Vieira, P. (Eds.), *Radiation in Bioanalysis: Spectroscopic Techniques and Theoretical Methods* (pp. 173-193). Cham: Springer International Publishing.
- Faraji, M., Dastmalchi, F. (2016). Determination of propionates and propionic acid in bread samples using high performance liquid chromatography. *Int. J. Eng. Sci.*, 5, 7-12
- Fekete, S., Beck, A., Veuthey, J. L., Guillaume, D. (2014). Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 101, 161-173. [10.1016/j.jpba.2014.04.011](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.04.011)
- Fernández-Espada, L., Bengoechea, C., Cordobés, F., Guerrero, A. (2016). Protein/glycerol blends and injection-molded bioplastic matrices: Soybean versus egg albumen. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(6). <https://doi.org/10.1002/app.42980>
- Fernandez, U., Vodovotz, Y., Courtney, P., Pascall, M. A. (2006). Extended shelf life of soy bread using modified atmosphere packaging. *Journal of Food Protection*, 69(3), 693-698. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.3.693>
- Finos, M. B., Deseta, M. L., Sponton, O. E., Frisón, L. N., Musumeci, M. A., Santiago, L. G., Perez, A. A. (2021). Evaluation of ovalbumin nanocarriers to promote the vehiculization and antifungal properties of cinnamaldehyde in aqueous media. *LWT*, 151, 112224. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112224>
- Fonseca, L. M., Souza, E. J. D., Radünz, M., Gandra, E. A., da Rosa Zavareze, E., Dias, A. R. G. (2021). Suitability of starch/carvacrol nanofibers as biopreservatives for minimizing the fungal spoilage of bread. *Carbohydrate polymers*, 252, 117166. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117166>
- Foroud, N. A., Eudes, F. (2009). Trichothecenes in cereal grains. *International journal of molecular sciences*, 10(1), 147-173. <https://doi.org/10.3390/ijms10010147>
- Frapin, D., Dufour, E., Haertle, T. (1993). Probing the fatty acid binding site of β -lactoglobulins. *Journal of protein chemistry*, 12(4), 443-449. <https://doi.org/10.1007/BF01025044>
- Frisón, L. N., Sobrero, S., Fernandez, V., Basílico Zapata, L. M. (2015). Susceptibility of black aspergilli conidia to industrial sanitizers. *International Research Journal of Public and Environmental Health*. <http://dx.doi.org/10.15739/irjpeh.022>
- Gámbaro, A., Fiszman, S., Giménez, A., Varela, P., Salvador, A. (2004). Consumer acceptability compared with sensory and instrumental measures of white pan bread: Sensory shelf-life estimation by survival analysis. *Journal of food science*, 69(9), S401-S405. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb09957.x>

- García-Estrada, C., Ullán, R. V., Albillos, S. M., Fernández-Bodega, M. A., Durek, P., von Döhren, H., Martín, J. F. (2011). A single cluster of coregulated genes encodes the biosynthesis of the mycotoxins roquefortine C and meleagrín in *Penicillium chrysogenum*. *Chemistry & biology*, 18(11), 1499-1512.<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.08.012>
- García, M. V., Bernardi, A. O., Copetti, M. V. (2019a). The fungal problem in bread production: Insights of causes, consequences, and control methods. *Current Opinion in Food Science*, 29, 1-6.<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.06.010>
- García, M. V., Bregao, A. S., Parussolo, G., Bernardi, A. O., Stefanello, A., Copetti, M. V. (2019b). Incidence of spoilage fungi in the air of bakeries with different hygienic status. *International Journal of Food Microbiology*, 290, 254-261.<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.022>
- García, M. V., Copetti, M. V. (2019). Alternative methods for mould spoilage control in bread and bakery products. *International Food Research Journal*, 26(3), 737-749
- Gennadios, A., Weller, C. L., Hanna, M. A., Froning, G. W. (1996). Mechanical and barrier properties of egg albumen films. *Journal of food science*, 61(3), 585-589.<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb13164.x>
- Giménez, A., Varela, P., Salvador, A., Ares, G., Fiszman, S., Garitta, L. (2007). Shelf life estimation of brown pan bread: A consumer approach. *Food Quality and Preference*, 18(2), 196-204.<https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2005.09.017>
- Girardin, H. (1997). Detection of filamentous fungi in foods (immunoassay). *Sciences des aliments*, 17(11), 3-19.<https://hal.inrae.fr/hal-02684820>
- Göçmen, D., Sahin, I. (1997). Investigations of moulds in microflora of bread and similar bakery products. *Advances in food sciences*, 19(3-4), 100-103
- González-Mas, M. C., Rambla, J. L., López-Gresa, M. P., Blázquez, M. A., Granell, A. (2019). Volatile compounds in citrus essential oils: A comprehensive review. *Frontiers in Plant Science*, 10, 12.<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00012>
- Gonzalez, W. G., Miksovska, J. (2014). Application of ANS fluorescent probes to identify hydrophobic sites on the surface of DREAM. *Biochim Biophys Acta*, 1844(9), 1472-1480.<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.05.004>
- Gould, G. W. (1996). Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *Journal of Food Protection*, 59(13), 82-86.<https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.13.82>

- Gray, J. A., Bemiller, J. N. (2003). Bread staling: molecular basis and control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1), 1-21.<https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00011.x>
- Gregirchak, N., Stabnikova, O., Stabnikov, V. (2020). Application of lactic acid bacteria for coating of wheat bread to protect it from microbial spoilage. *Plant Foods for Human Nutrition*, 75(2), 223-229.<https://doi.org/10.1007/s11130-020-00803-5>
- Griffin, S., Wyllie, S. G., Markham, J. (1999). Determination of octanol–water partition coefficient for terpenoids using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 864(2), 221-228
- Gutiérrez, F. J., Albillos, S. M., Casas-Sanz, E., Cruz, Z., García-Estrada, C., García-Guerra, A., García-Reverter, J., García-Suárez, M., Gatón, P., González-Ferrero, C. (2013). Methods for the nanoencapsulation of β -carotene in the food sector. *Trends in Food Science & Technology*, 32(2), 73-83.<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.05.007>
- Gutierrez, L., Sánchez, C., Batlle, R., Nerín, C. (2009). New antimicrobial active package for bakery products. *Trends in Food Science & Technology*, 20(2), 92-99.<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.11.003>
- Han, K., Liu, Y., Liu, Y., Huang, X., Sheng, L. (2020). Characterization and film-forming mechanism of egg white/pullulan blend film. *Food chemistry*, 315, 126201
- Handa, A., Gennadios, A., Froning, G. W., Kuroda, N., Hanna, M. A. (1999a). Tensile, solubility, and electrophoretic properties of egg white films as affected by surface sulfhydryl groups. *Journal of food science*, 64(1), 82-85.<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1999.tb09865.x>
- Handa, A., Gennadios, A., Hanna, M. A., Weller, C. L., Kuroda, N. (1999b). Physical and molecular properties of egg-white lipid films. *Journal of food science*, 64(5), 860-864.<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1999.tb15928.x>
- Hanif, M. A., Nisar, S., Khan, G. S., Mushtaq, Z., Zubair, M. (2019). Essential oils *Essential oil research* (pp. 3-17): Springer.
- Hassan, B., Chatha, S. A. S., Hussain, A. I., Zia, K. M., Akhtar, N. (2018). Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 1095-1107.<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.097>
- Hauzoukim, S. S., Mohanty, B. (2020). Functionality of protein-Based edible coating. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 8(4), 1432-1440
- Healthcare, G. (2012). *Size exclusion chromatography: Principles and Methods* (Vol. 139).

- Hempel, A. W., O'Sullivan, M. G., Papkovsky, D. B., Kerry, J. P. (2013). Use of smart packaging technologies for monitoring and extending the shelf-life quality of modified atmosphere packaged (MAP) bread: Application of intelligent oxygen sensors and active ethanol emitters. *European Food Research and Technology*, 237(2), 117-124. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-1968-z>
- Hernandez-Izquierdo, V. M., Krochta, J. M. (2008). Thermoplastic processing of proteins for film formation—a review. *Journal of food science*, 73(2), R30-R39. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00636.x>
- Houmani, Z., Azzoudj, S., Naxakis, G., Skoula, M. (2002). The Essential Oil Composition of Algerian Zaâtar: *Origanum* spp. and *Thymus* spp. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 9(4), 275-280
- Huang, X., Luo, X., Liu, L., Dong, K., Yang, R., Lin, C., Song, H., Li, S., Huang, Q. (2020). Formation mechanism of egg white protein/ κ -Carrageenan composite film and its application to oil packaging. *Food Hydrocolloids*, 105, 105780. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105780>
- Hyltdgaard, M., Mygind, T., Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in microbiology*, 3, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>
- Ibáñez, M. D., Sanchez-Ballester, N. M., Blázquez, M. A. (2020). Encapsulated limonene: A pleasant lemon-like aroma with promising application in the agri-food industry. A review. *Molecules*, 25(11), 2598. <https://doi.org/10.3390/molecules25112598>
- Inouye, S., Tsuruoka, T., Uchida, K., Yamaguchi, H. (2001). Effect of sealing and Tween 80 on the antifungal susceptibility testing of essential oils. *Microbiology and Immunology*, 45(3), 201-208. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2001.tb02608.x>
- Jing, L., Lei, Z., Li, L., Xie, R., Xi, W., Guan, Y., Sumner, L. W., Zhou, Z. (2014). Antifungal activity of citrus essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(14), 3011-3033. <https://doi.org/10.1021/jf5006148>
- Jones, A., Zeller, M. A., Sharma, S. (2013). Thermal, mechanical, and moisture absorption properties of egg white protein bioplastics with natural rubber and glycerol. *Progress in biomaterials*, 2(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/2194-0517-2-12>
- Joshi, K., Sparks, P., Friedman, M., Olsen, C., McHugh, T., Ravishankar, S. (2021). Effect of antimicrobial edible films on the sensory and physical properties of organic spinach in salad bags. *Food and Nutrition Sciences*, 12(02), 176. <https://doi.org/10.4236/fns.2021.122015>

- Joye, I. J., McClements, D. J. (2014). Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 19(5), 417-427. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2014.07.002>
- Katsinis, G., Rigas, F., Doulia, D. (2008). Synergistic effect of chemical preservatives with ethanol on the microbial shelf life of bread by factorial design. *International journal of food science & technology*, 43(2), 208-215. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01386.x>
- Kavitha, K. S., Satish, S. (2013). Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities from *Toona ciliata* Roemer. *Journal of Analytical Science and Technology*, 4(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/2093-3371-4-23>
- Khan, M. S., Rahman, M. S. (2021). *Techniques to Measure Food Safety and Quality* (Khan, M. S. y Rahman, M. S. Eds. First Edition ed.). Switzerland: Springer.
- Klich, M. A., Pitt, J. I. (1994). A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. . *New South Wales, Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization*
- Klinmalai, P., Srisa, A., Laurenza, Y., Katekhong, W., Harnkarnsujarit, N. (2021). Antifungal and plasticization effects of carvacrol in biodegradable poly (lactic acid) and poly (butylene adipate terephthalate) blend films for bakery packaging. *LWT*, 152, 112356. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112356>
- Konuk, H. B., Ergüden, B. (2020). Phenolic–OH group is crucial for the antifungal activity of terpenoids via disruption of cell membrane integrity. *Folia Microbiologica*, 65(4), 775-783. <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00787-4>
- Kosseva, M., Webb, C. (2020). *Food industry wastes: assessment and recuperation of commodities*: Academic Press.
- Kurek, M., Guinault, A., Voilley, A., Galić, K., Debeaufort, F. (2014). Effect of relative humidity on carvacrol release and permeation properties of chitosan based films and coatings. *Food chemistry*, 144, 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.132>
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Media, S. S. B. Ed.). Singapore: Springer Science & Business Media.
- Lammari, N., Louaer, O., Meniai, A. H., Elaissari, A. (2020). Encapsulation of essential oils via nanoprecipitation process: Overview, progress, challenges and prospects. *Pharmaceutics*, 12(5), 431. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12050431>
- Latou, E., Mexis, S. F., Badeka, A. V., Kontominas, M. G. (2010). Shelf life extension of sliced wheat bread using either an ethanol emitter or an ethanol emitter combined with

- an oxygen absorber as alternatives to chemical preservatives. *Journal of Cereal Science*, 52(3), 457-465. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.07.011>
- Lavermicocca, P., Valerio, F., De Bellis, P., Sisto, A., Leguérinel, I. (2016). Sporeforming bacteria associated with bread production: spoilage and toxigenic potential *Food hygiene and toxicology in ready-to-eat foods* (pp. 275-293): Elsevier.
- Lawless, H. T., Heymann, H. (2010). *Sensory evaluation of food: principles and practices* (Vol. 2): Springer.
- Le Maux, S., Bouhallab, S., Giblin, L., Brodkorb, A., Croguennec, T. (2013). Complexes between linoleate and native or aggregated β -lactoglobulin: interaction parameters and in vitro cytotoxic effect. *Food chemistry*, 141(3), 2305-2313
- Lee, R., Pranata, M., Ustunol, Z., Almenar, E. (2013). Influence of glycerol and water activity on the properties of compressed egg white-based bioplastics. *Journal of Food Engineering*, 118(1), 132-140. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.03.031>
- Legan, J. D. (1993). Mould spoilage of bread: the problem and some solutions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 32(1-3), 33-53
- Legan, J. D., Voysey, P. A. (1991). Yeast spoilage of bakery products and ingredients. *Journal of applied bacteriology. Oxford*, 70(5), 361-371
- Levinskaite, L. (2012). Susceptibility of food-contaminating Penicillium genus fungi to some preservatives and disinfectants. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 19(1)
- Li, X., Yang, X., Deng, H., Guo, Y., Xue, J. (2020). Gelatin films incorporated with thymol nanoemulsions: Physical properties and antimicrobial activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150, 161-168. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.066>
- Liewen, M. B., Marth, E. H. (1985). Growth and inhibition of microorganisms in the presence of sorbic acid: a review. *Journal of Food Protection*, 48(4), 364-375
- Lim, L., Mine, Y., Tung, M. A. (1998). Transglutaminase cross-linked egg white protein films: tensile properties and oxygen permeability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4022-4029. <https://doi.org/10.1021/jf980567n>
- Lopes, F. A., de Fátima Ferreira Soares, N., de Cássia Pires Lopes, C., da Silva, W. A., Júnior, J. C. B., Medeiros, E. A. A. (2014). Conservation of bakery products through cinnamaldehyde antimicrobial films. *Packaging technology and science*, 27(4), 293-302. <https://doi.org/10.1002/pts.2033>

- López-Mata, M. A., Ruiz-Cruz, S., Silva-Beltrán, N. P., Ornelas-Paz, J. J., Zamudio-Flores, P. B., Burruel-Ibarra, S. E. (2013). Physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with carvacrol. *Molecules*, 18(11), 13735-13753
- López-Mata, M. A., García-González, G., Valbuena-Gregorio, E., Ruiz-Cruz, S., Zamudio-Flores, P. B., Burruel-Ibarra, S. E., Morales-Figueroa, G. G., Quihui-Cota, L. (2016). Development and characteristics of biodegradable Aloe-gel/egg white films. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(40).<https://doi.org/10.1002/app.44067>
- López, P., Sanchez, C., Batlle, R., Nerín, C. (2007). Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4348-4356.<https://doi.org/10.1021/jf063295u>
- Lund, F., Filtenbory, O., Westall, S., Frisvad, J. C. (1996). Associated mycoflora of rye bread. *Letters in applied microbiology*, 23(4), 213-217. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1996.tb00068.x>
- Magan, N. (2007). Fungi in extreme environments *The Mycota* (Vol. 4, pp. 85-103).
- Magan, N., Aldred, D., Arroyo, M. (2012). Mould prevention in bread. En Cauvain, S. P. (Ed.), *Breadmaking* (pp. 597-613): Elsevier.
- Mahdavi Omran, S., Moodi, M. A., Norozian Amiri, S. M. B., Mosavi, S. J., Ghazi Mir Saeed, S. A. M., Jabbari Shiade, S. M., Kheradi, E., Salehi, M. (2011). The effects of limonene and orange peel extracts on some spoilage fungi. *International Journal of Molecular and Clinical Microbiology*, 1(2), 82-86
- Malvern Instruments. (2013). *Zetasizer Nano User Manual English MAN0485-1.1*. United Kingdom.
- Manso, S., Becerril, R., Nerín, C., Gómez-Lus, R. (2015). Influence of pH and temperature variations on vapor phase action of an antifungal food packaging against five mold strains. *Food Control*, 47, 20-26.<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.014>
- 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.<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.111>
- Marei, G. I. K., Rasoul, M. A. A., Abdelgaleil, S. A. M. (2012). Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi.

- Pesticide biochemistry and physiology*, 103(1), 56-61.<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.03.004>
- Marin, S., Guynot, M. E., Sanchis, V., Arbonés, J., Ramos, A. J. (2002). *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, and *Penicillium corylophilum* spoilage prevention of bakery products by means of weak-acid preservatives. *Journal of food science*, 67(6), 2271-2277. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb09539.x>
- McClements, D. J., Li, Y. (2010). Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Advances in colloid and interface science*, 159(2), 213-228.<https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.06.010>
- Mele, E. (2020). Electrospinning of essential oils. *Polymers*, 12(4), 908
- Melini, V., Melini, F. (2018). Strategies to extend bread and GF bread shelf-life: From sourdough to antimicrobial active packaging and nanotechnology. *Fermentation*, 4(1), 9
- Mendes, J. F., Martins, J. T., Manrich, A., Neto, A. R. S., Pinheiro, A. C. M., Mattoso, L. H. C., Martins, M. A. (2019). Development and physical-chemical properties of pectin film reinforced with spent coffee grounds by continuous casting. *Carbohydrate polymers*, 210, 92-99.<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.058>
- Mihalca, V., Kerezsi, A. D., Weber, A., Gruber-Traub, C., Schmucker, J., Vodnar, D. C., Dulf, F. V., Socaci, S. A., Fărcaș, A., Mureșan, C. I. (2021). Protein-based films and coatings for food industry applications. *Polymers*, 13(5), 769.<https://doi.org/10.3390/polym13050769>
- Mishra, P. K., Singh, P., Prakash, B., Kedia, A., Dubey, N. K., Chanotiya, C. S. (2013). Assessing essential oil components as plant-based preservatives against fungi that deteriorate herbal raw materials. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 80, 16-21.<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.12.017>
- Mo, E. K., Sung, C. K. (2014). Production of white pan bread leavened by *Pichia anomala* SKM-T. *Food Science and Biotechnology*, 23(2), 431-437.<https://doi.org/10.1007/s10068-014-0059-7>
- Mohamed, S. A. A., El-Sakhawy, M., El-Sakhawy, M. A. M. (2020). Polysaccharides, protein and lipid-based natural edible films in food packaging: A review. *Carbohydrate polymers*, 238, 116178.<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116178>
- Morcia, C., Tumino, G., Ghizzoni, R., Bara, A., Salhi, N., Terzi, V. (2017). In vitro evaluation of sub-lethal concentrations of plant-derived antifungal compounds on

- FUSARIA growth and mycotoxin production. *Molecules*, 22(8), 1271.<https://doi.org/10.3390/molecules22081271>
- Moreira, M. R., Roura, S. I., Ponce, A. (2011). Effectiveness of chitosan edible coatings to improve microbiological and sensory quality of fresh cut broccoli. *LWT-Food Science and Technology*, 44(10), 2335-2341.<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.04.009>
- Mori, S., Barth, H. G. (2013). *Size exclusion chromatography*: Springer Science & Business Media.
- Moroni, A. V., Dal Bello, F., Arendt, E. K. (2009). Sourdough in gluten-free bread-making: an ancient technology to solve a novel issue? *Food microbiology*, 26(7), 676-684.<https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.07.001>
- Moshe Dvir, I., Weizman, O., Lewitus, D., Weintraub, S., Ophir, A., Dotan, A. (2019). Antimicrobial active packaging combining essential oils mixture: Migration and odor control study. *Polymers for Advanced Technologies*, 30(10), 2558-2566. <https://doi.org/10.1002/pat.4642>.
- Munhoz, D. R., Moreira, F. K. V., Bresolin, J. D., Bernardo, M. P., De Sousa, C. P., Mattoso, L. H. C. (2018). Sustainable production and in vitro biodegradability of edible films from yellow passion fruit coproducts via continuous casting. *ACS sustainable chemistry & engineering*, 6(8), 9883-9892.<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b01101>
- Munteanu, B. S., Vasile, C. (2021). Encapsulation of natural bioactive compounds by electrospinning—applications in food storage and safety. *Polymers*, 13(21), 3771. <https://doi.org/10.3390/polym13213771>
- Mutlu-Ingok, A., Devecioglu, D., Dikmetas, D. N., Karbancioglu-Guler, F., Capanoglu, E. (2020). Antibacterial, antifungal, antimycotoxigenic, and antioxidant activities of essential oils: An updated review. *Molecules*, 25(20), 4711.<https://doi.org/10.3390/molecules25204711>
- Nielsen, P. V., Rios, R. (2000). Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *International Journal of Food Microbiology*, 60(2-3), 219-229.[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00343-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00343-3)
- Niu, A., Wu, H., Ma, F., Tan, S., Wang, G., Qiu, W. (2022). The antifungal activity of cinnamaldehyde in vapor phase against *Aspergillus niger* isolated from spoiled paddy. *LWT*, 159, 113181.<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113181>

- Nordin, N., Othman, S. H., Rashid, S. A., Basha, R. K. (2020). Effects of glycerol and thymol on physical, mechanical, and thermal properties of corn starch films. *Food Hydrocolloids*, 106, 105884. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105884>
- Ortiz, C. M., de Moraes, J. O., Vicente, A. R., Laurindo, J. B., Mauri, A. N. (2017). Scale-up of the production of soy (*Glycine max* L.) protein films using tape casting: Formulation of film-forming suspension and drying conditions. *Food Hydrocolloids*, 66, 110-117. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.12.029>
- Otoni, C. G., Espitia, P. J. P., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H. (2016). Trends in antimicrobial food packaging systems: Emitting sachets and absorbent pads. *Food Research International*, 83, 60-73. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.02.018>
- Otoni, C. G., Pontes, S. F. O., Medeiros, E. A. A., Soares, N. d. F. F. (2014). Edible films from methylcellulose and nanoemulsions of clove bud (*Syzygium aromaticum*) and oregano (*Origanum vulgare*) essential oils as shelf life extenders for sliced bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(22), 5214-5219. <https://doi.org/10.1021/jf501055f>
- Oyom, W., Zhang, Z., Bi, Y., Tahergorabi, R. (2022). Application of starch-based coatings incorporated with antimicrobial agents for preservation of fruits and vegetables: A review. *Progress in Organic Coatings*, 166, 106800. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2022.106800>
- Ozdal, T., Capanoglu, E., Altay, F. (2013). A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, 51(2), 954-970. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.009>
- 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. <https://doi.org/10.1021/jf4055402>
- Panahirad, S., Dadpour, M., Peighambaroust, S. H., Soltanzadeh, M., Gullón, B., Alirezalu, K., Lorenzo, J. M. (2021). Applications of carboxymethyl cellulose-and pectin-based active edible coatings in preservation of fruits and vegetables: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 663-673. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.025>
- Paolilli, M. C., Cabrini, S. M., Fillat, F. A., Pagliaricci, L. O. (2021). *La cadena del trigo en Argentina* (2718-6210). Retrieved from
- Paramasivan, P., Kalyanasundaram, I. (1986). Sources of fungal contamination of bread. *Journal of food science and technology*, 23(3), 135-139

- Pareyt, B., Finnie, S. M., Putseys, J. A., Delcour, J. A. (2011). Lipids in bread making: Sources, interactions, and impact on bread quality. *Journal of Cereal Science*, 54(3), 266-279.<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2011.08.011>
- Parolin, G. A., Passero, L. F. D., Lago, J. H. G., Péres, L. O. (2021). Antileishmanial activity evaluation of poly (thymolformaldehyde)—A biobased material from thymol. *Industrial Crops and Products*, 171, 113935.<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113935>
- Parris, N., Cooke, P. H., Hicks, K. B. (2005). Encapsulation of essential oils in zein nanospherical particles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(12), 4788-4792
- Passarinho, A. T. P., Dias, N. F., Camilloto, G. P., Cruz, R. S., Otoni, C. G., Moraes, A. R. F., Soares, N. d. F. (2014). Sliced bread preservation through oregano essential oil-containing sachet. *Journal of Food Process Engineering*, 37(1), 53-62.<https://doi.org/10.1111/jfpe.12059>
- Pathare, P. B., Opara, U. L., Al-Said, F. A. J. (2013). Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(1), 36-60
- Pauli, A., Kubeczka, K.-H. (2010). Antimicrobial properties of volatile phenylpropanes. *Natural product communications*, 5(9), 1934578X1000500910.<https://doi.org/10.1177/1934578X1000500910>
- Pena, L., Burton, B. K. (2012). Survey of health status and complications among propionic acidemia patients. *American journal of medical genetics Part A*, 158(7), 1641-1646.<https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35387>
- Phechkrajang, C. M., Yooyong, S. (2017). Fast and simple method for semiquantitative determination of calcium propionate in bread samples. *journal of food and drug analysis*, 25(2), 254-259.<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.03.013>
- Pirozzi, A., Ferrari, G., Donsì, F. (2021). The use of nanocellulose in edible coatings for the preservation of perishable fruits and vegetables. *Coatings*, 11(8), 990.<https://doi.org/10.3390/coatings11080990>
- Pitt, J. I., Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage* (Vol. 519): Springer.
- Prakash, B., Kujur, A., Yadav, A., Kumar, A., Singh, P. P., Dubey, N. K. (2018). Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. *Food Control*, 89, 1-11.<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.01.018>

- Pranata, M. P., González-Buesa, J., Chopra, S., Kim, K., Pietri, Y., Ng, P. K. W., Matuana, L. M., Almenar, E. (2019). Egg white protein film production through extrusion and calendering processes and its suitability for food packaging applications. *Food and Bioprocess Technology*, 12(4), 714-727. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-2248-0>
- Qu, C., Li, Z., Wang, X. (2021). UHPLC-HRMS-Based Untargeted Lipidomics Reveal Mechanism of Antifungal Activity of Carvacrol against *Aspergillus flavus*. *Foods*, 11(1), 93. <https://doi.org/10.3390/foods11010093>
- Quirós-Sauceda, A. E., Ayala-Zavala, J. F., Olivas, G. I., González-Aguilar, G. A. (2014). Edible coatings as encapsulating matrices for bioactive compounds: a review. *Journal of food science and technology*, 51(9), 1674-1685. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1246-x>
- Rahman, M., Islam, R., Hasan, S., Zzaman, W., Rana, M. R., Ahmed, S., Roy, M., Sayem, A., Matin, A., Raposo, A. (2022). A Comprehensive Review on Bio-Preservation of Bread: An Approach to Adopt Wholesome Strategies. *Foods*, 11(3), 319. <https://doi.org/10.3390/foods11030319>
- Rammanee, K., Hongpattarakere, T. (2011). Effects of tropical citrus essential oils on growth, aflatoxin production, and ultrastructure alterations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 1050-1059. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0507-1>
- Rao, S., Xu, G., Lu, X., Zhang, R., Gao, L., Wang, Q., Yang, Z., Jiao, X. (2020). Characterization of ovalbumin-carvacrol inclusion complexes as delivery systems with antibacterial application. *Food Hydrocolloids*, 105, 105753. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105753>
- Rathod, N. B., Kulawik, P., Ozogul, F., Regenstein, J. M., Ozogul, Y. (2021). Biological activity of plant-based carvacrol and thymol and their impact on human health and food quality. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 733-748. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.08.023>
- Rehman, A., Jafari, S. M., Aadil, R. M., Assadpour, E., Randhawa, M., Mahmood, S. (2020). Development of active food packaging via incorporation of biopolymeric nanocarriers containing essential oils. *Trends in Food Science & Technology*, 101, 106-121. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.05.001>
- Reiss, J. (1977). Mycotoxins in foodstuffs. X. Production of citrinin by *Penicillium chrysogenum* in bread. *Food and cosmetics toxicology*, 15(4), 303-307. [https://doi.org/10.1016/S0015-6264\(77\)80201-0](https://doi.org/10.1016/S0015-6264(77)80201-0)

- Rezaei, A., Fathi, M., Jafari, S. M. (2019). Nanoencapsulation of hydrophobic and low-soluble food bioactive compounds within different nanocarriers. *Food Hydrocolloids*, 88, 146-162. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.003>
- Ribeiro, A. M., Estevinho, B. N., Rocha, F. (2021). Preparation and incorporation of functional ingredients in edible films and coatings. *Food and Bioprocess Technology*, 14(2), 209-231. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02528-4>
- Rizzello, C. G., Cassone, A., Coda, R., Gobbetti, M. (2011). Antifungal activity of sourdough fermented wheat germ used as an ingredient for bread making. *Food chemistry*, 127(3), 952-959. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.063>
- Rodríguez-Arzuaga, M., Piagentini, A. M. (2018). New antioxidant treatment with yerba mate (*Ilex paraguariensis*) infusion for fresh-cut apples: Modeling, optimization, and acceptability. *Food Science and Technology International*, 24(3), 223-231
- Rodriguez, M., Medina, L. M., Jordano, R. (2000). Effect of modified atmosphere packaging on the shelf life of sliced wheat flour bread. *Food/Nahrung*, 44(4), 247-252. [https://doi.org/10.1002/1521-3803\(20000701\)44:4<247::AID-FOOD247>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1521-3803(20000701)44:4<247::AID-FOOD247>3.0.CO;2-I)
- Rosell, C. M., Bajerska, J., El Sheikha, A. F. (2015). *Bread and its fortification: Nutrition and health benefits*: CRC Press.
- Ross, P. D., Subramanian, S. (1981). Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*, 20(11), 3096-3102. <https://doi.org/10.1021/bi00514a017>
- Rybak, K., Wiktor, A., Pobiega, K., Witrowa-Rajchert, D., Nowacka, M. (2021). Impact of pulsed light treatment on the quality properties and microbiological aspects of red bell pepper fresh-cuts. *LWT*, 149, 111906
- Salgado, P. R., Ortiz, C. M., Musso, Y. S., Di Giorgio, L., Mauri, A. N. (2015). Edible films and coatings containing bioactives. *Current Opinion in Food Science*, 5, 86-92. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.09.004>
- Salim-ur-Rehman, S. H., Nawaz, H., Ahmad, M. M., Murtaza, M. A., Rizvi, A. J. (2007). Inhibitory effect of citrus peel essential oils on the microbial growth of bread. *Pakistan Journal of Nutrition*, 6(6), 558-561. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.049>
- Samapundo, S., Devlieghere, F., Vroman, A., Eeckhout, M. (2017). Antifungal activity of fermentates and their potential to replace propionate in bread. *LWT-Food Science and Technology*, 76, 101-107. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.043>

- Sanchez Maldonado, A. F., Schieber, A., Gänzle, M. G. (2015). Plant defence mechanisms and enzymatic transformation products and their potential applications in food preservation: Advantages and limitations. *Trends in Food Science & Technology*, 46(1), 49-59.<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.013>
- Saranraj, P., Geetha, M. (2012). Microbial spoilage of bakery products and its control by preservatives. *International Journal of Pharmaceutical & biological archives*, 3(1), 38-48
- Schlösser, I., Prange, A. (2019). Effects of selected natural preservatives on the mycelial growth and ochratoxin A production of the food-related moulds *Aspergillus westerdijkiae* and *Penicillium verrucosum*. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 36(9), 1411-1418.<https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1640397>
- Schreiber, J., Chapman, K. A., Summar, M. L., Mew, N. A., Sutton, V. R., MacLeod, E., Stagni, K., Ueda, K., Franks, J., Island, E. (2012). Neurologic considerations in propionic acidemia. *Molecular genetics and metabolism*, 105(1), 10-15.<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.10.003>
- Sedayu, B. B., Cran, M. J., Bigger, S. W. (2019). A review of property enhancement techniques for carrageenan-based films and coatings. *Carbohydrate polymers*, 216, 287-302.<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.021>
- Sharif, M. K., Butt, M. S., Sharif, H. R., Nasir, M. (2017). Sensory evaluation and consumer acceptability. *Handbook of food science and technology*, 361-386
- Sharma, P., Ahuja, A., Izrayeel, A. M. D., Samyn, P., Rastogi, V. K. (2022). Physicochemical and thermal characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) films incorporating thyme essential oil for active packaging of white bread. *Food Control*, 133, 108688.<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108688>
- Sharma, S., Barkauskaite, S., Jaiswal, A. K., Jaiswal, S. (2021). Essential oils as additives in active food packaging. *Food chemistry*, 343, 128403.<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128403>
- Sharma, S., Luzinov, I. (2012). Water aided fabrication of whey and albumin plastics. *Journal of Polymers and the Environment*, 20(3), 681-689.<https://doi.org/10.1007/s10924-012-0504-8>
- Siemann, U. (2005). Solvent cast technology—a versatile tool for thin film production *Scattering methods and the properties of polymer materials* (pp. 1-14): Springer.
- Skovholt, O., Bailey, C. H. (1933). The influence of humidity and carbon dioxide upon the development of molds in bread. *Cereal Chem*, 101, 446-451

- Skurtys, O. (2010). *Food hydrocolloid edible films and coatings*: Nova Sciences Publishers, Inc.
- Smith, J. P., Daifas, D. P., El-Khoury, W., Koukoutsis, J., El-Khoury, A. (2004). Shelf life and safety concerns of bakery products—a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44(1), 19-55.<https://doi.org/10.1080/10408690490263774>
- Song, Y., Liu, L., Shen, H., You, J., Luo, Y. (2011). Effect of sodium alginate-based edible coating containing different anti-oxidants on quality and shelf life of refrigerated bream (*Megalobrama amblycephala*). *Food Control*, 22(3-4), 608-615.<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.10.012>
- Soukoulis, C., Yonekura, L., Gan, H. H., Behboudi-Jobbehdar, S., Parmenter, C., Fisk, I. (2014). Probiotic edible films as a new strategy for developing functional bakery products: The case of pan bread. *Food Hydrocolloids*, 39, 231-242.<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.023>
- Sperling, L. H. (2005). *Introduction to physical polymer science*: John Wiley & Sons.
- Sponton, O. E., Perez, A. A., Carrara, C. R., Santiago, L. G. (2015a). Impact of environment conditions on physicochemical characteristics of ovalbumin heat-induced nanoparticles and on their ability to bind PUFAs. *Food Hydrocolloids*, 48, 165-173.<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.011>
- Sponton, O. E., Perez, A. A., Carrara, C. R., Santiago, L. G. (2015b). Linoleic acid binding properties of ovalbumin nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 128, 219-226.[10.1016/j.colsurfb.2015.01.037](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.01.037)
- Sponton, O. E., Perez, A. A., Carrara, C. R., Santiago, L. G. (2016). Complexes between ovalbumin nanoparticles and linoleic acid: Stoichiometric, kinetic and thermodynamic aspects. *Food Chem*, 211, 819-826.<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.137>
- Sponton, O. E., Perez, A. A., Ramel, J. V., Santiago, L. G. (2017). Protein nanovehicles produced from egg white. Part 1: Effect of pH and heat treatment time on particle size and binding capacity. *Food Hydrocolloids*, 73, 67-73.<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.11.030>
- Sponton, O. E., Perez, A. A., Stechina, M. F., Santiago, L. G. (2020). Production of protein nanovehicles by heat treatment of industrial egg white in a batch reactor. *Journal of Food Engineering*, 268, 109740.<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109740>
- Srisa, A., Harnkarnsujarit, N. (2020). Antifungal films from trans-cinnamaldehyde incorporated poly (lactic acid) and poly (butylene adipate-co-terephthalate) for bread

- packaging. *Food chemistry*, 333, 127537.<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127537>
- Stević, T., Berić, T., Šavikin, K., Soković, M., Gođevac, D., Dimkić, I., Stanković, S. (2014). Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. *Industrial Crops and Products*, 55, 116-122.<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.011>
- Suhag, R., Kumar, N., Petkoska, A. T., Upadhyay, A. (2020). Film formation and deposition methods of edible coating on food products: A review. *Food Research International*, 136, 109582.<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109582>
- Suhr, K. I., Nielsen, P. V. (2003). Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal of applied microbiology*, 94(4), 665-674. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01896.x>
- Suhr, K. I., Nielsen, P. V. (2004). Effect of weak acid preservatives on growth of bakery product spoilage fungi at different water activities and pH values. *International Journal of Food Microbiology*, 95(1), 67-78.<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.02.004>
- Sun, Q., Li, J., Sun, Y., Chen, Q., Zhang, L., Le, T. (2020). The antifungal effects of cinnamaldehyde against *Aspergillus niger* and its application in bread preservation. *Food chemistry*, 317, 126405.<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126405>
- Sun, Q., Shang, B., Wang, L., Lu, Z., Liu, Y. (2016). Cinnamaldehyde inhibits fungal growth and aflatoxin B1 biosynthesis by modulating the oxidative stress response of *Aspergillus flavus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(3), 1355-1364.<https://doi.org/10.1007/s00253-015-7159-z>
- Sunwoo, H. H., Gujral, N. (2015). Chemical composition of eggs and egg products *Handbook of food chemistry* (pp. 331-363).
- Suwanamornlert, P., Kerddonfag, N., Sane, A., Chinsirikul, W., Zhou, W., Chonhenchob, V. (2020). Poly (lactic acid)/poly (butylene-succinate-co-adipate)(PLA/PBSA) blend films containing thymol as alternative to synthetic preservatives for active packaging of bread. *Food Packaging and Shelf Life*, 25, 100515. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100515>
- Suwanamornlert, P., Sangchote, S., Chinsirikul, W., Sane, A., Chonhenchob, V. (2018). Antifungal activity of plant-derived compounds and their synergism against major postharvest pathogens of longan fruit in vitro. *International Journal of Food Microbiology*, 271, 8-14.<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.009>

- Szczesniak, A. S. (1963). Classification of textural characteristics a. *Journal of food science*, 28(4), 385-389
- Tahir, H. E., Xiaobo, Z., Mahunu, G. K., Arslan, M., Abdalhai, M., Zhihua, L. (2019). Recent developments in gum edible coating applications for fruits and vegetables preservation: A review. *Carbohydrate polymers*, 224, 115141. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115141>
- Tan, J., Liu, T., Yao, Y., Wu, N., Du, H., Xu, M., Liao, M., Zhao, Y., Tu, Y. (2021). Changes in physicochemical and antioxidant properties of egg white during the Maillard reaction induced by alkali. *LWT*, 143, 111151. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111151>
- Tančinová, D., Barboráková, Z., Mašková, Z., Cíсарová, M., Bojňanská, T. (2021). The occurrence of micromycetes in the bread samples and their potential ability produce mycotoxins. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 813-818. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2015.4.special1.69-73>
- Tannous, M., Caldera, F., Hoti, G., Dianzani, U., Cavalli, R., Trotta, F. (2021). Drug-Encapsulated Cyclodextrin Nanosponges. *Supramolecules in drug discovery and drug delivery*, 247-283
- Tao, N., Liu, Y., Zhang, M. (2009). Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil from the peel of bingtang sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *International journal of food science & technology*, 44(7), 1281-1285. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.01947.x>
- Taqi, A., Askar, K. A., Nagy, K., Mutihac, L., Stamatina, L. (2011). Effect of different concentrations of olive oil and oleic acid on the mechanical properties of albumen (egg white) edible films. *African Journal of Biotechnology*, 10(60), 12963-12972. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1971>
- Tebben, L., Shen, Y., Li, Y. (2018). Improvers and functional ingredients in whole wheat bread: A review of their effects on dough properties and bread quality. *Trends in Food Science & Technology*, 81, 10-24. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.015>
- Trotta, F., Zanetti, M., Cavalli, R. (2012). Cyclodextrin-based nanosponges as drug carriers. *Beilstein journal of organic chemistry*, 8(1), 2091-2099
- Valenzuela, K., Quitral, V., Villanueva, B., Zavala, F., Atalah, E. (2013). Evaluación del programa piloto de reducción de sal/sodio en el pan en Santiago de Chile. *Revista chilena de nutrición*, 40(2), 119-122. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182013000200004>

- van Duin, M., Machado, A. V., Covas, J. (2001). *A look inside the extruder: Evolution of chemistry, morphology and rheology along the extruder axis during reactive processing and blending*. Paper presented at the Macromolecular Symposia.
- Van Hung, P., Chi, P. T. L., Phi, N. T. L. (2013). Comparison of antifungal activities of Vietnamese citrus essential oils. *Natural product research*, 27(4-5), 506-508.<https://doi.org/10.1080/14786419.2012.706293>
- Vargas, M. C. A., Simsek, S. (2021). Clean Label in Bread. *Foods*, 10(9), 2054.<https://doi.org/10.3390/foods10092054>
- Velázquez-Nuñez, M. J., Avila-Sosa, R., Palou, E., López-Malo, A. (2013). Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. Valencia) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact. *Food Control*, 31(1), 1-4.<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.029>
- Vieira, A. J., Beserra, F. P., Souza, M. C., Totti, B. M., Rozza, A. L. (2018). Limonene: Aroma of innovation in health and disease. *Chemico-Biological Interactions*, 283, 97-106.<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.02.007>
- Viljoen, C. R., von Holy, A. (1997). Microbial populations associated with commercial bread production. *Journal of Basic Microbiology*, 37(6), 439-444.
<https://doi.org/10.1002/jobm.3620370612>
- Visentín, A. N., Drago, S. R., Osella, C. A., De la Torre, M. A., Sánchez, H. D., González, R. J. (2009). Efecto de la adición de harina de soja y concentrado proteico de suero de queso sobre la calidad del pan y la dializabilidad de minerales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 59(3), 325-331
- Visentini, F. F., Perez, A. A., Santiago, L. G. (2019). Self-assembled nanoparticles from heat treated ovalbumin as nanocarriers for polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocolloids*, 93, 242-252
- Visentini, F. F., Sponton, O. E., Perez, A. A., Santiago, L. G. (2017). Formation and colloidal stability of ovalbumin-retinol nanocomplexes. *Food Hydrocolloids*, 67, 130-138.<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.12.027>
- Wajner, M., Goodman, S. I. (2011). Disruption of mitochondrial homeostasis in organic acidurias: insights from human and animal studies. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 43(1), 31-38.<https://doi.org/10.1007/s10863-011-9324-0>
- Wajner, M., Santos, K. D., Schlottfeldt, J. L., Rocha, M. P., Wannmacher, C. M. D. (1999). Inhibition of mitogen-activated proliferation of human peripheral lymphocytes in vitro by propionic acid. *Clinical Science*, 96(1), 99-103.<https://doi.org/10.1042/cs0960099>

- Wang, L., Jin, J., Liu, X., Wang, Y., Liu, Y., Zhao, Y., Xing, F. (2018a). Effect of cinnamaldehyde on morphological alterations of *Aspergillus ochraceus* and expression of key genes involved in ochratoxin A biosynthesis. *Toxins*, 10(9), 340.<https://doi.org/10.3390/toxins10090340>
- Wang, M., Zhang, J., Zhang, Z., Liu, X., Fan, J., Liu, W., Zhang, X. (2020). Simultaneous ultraviolet spectrophotometric determination of sodium benzoate and potassium sorbate by BP-neural network algorithm and partial least squares. *Optik*, 201, 163529.<https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2019.163529>
- Wang, W., Nema, S., Teagarden, D. (2010). Protein aggregation—pathways and influencing factors. *International journal of pharmaceutics*, 390(2), 89-99.<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.02.025>
- Wang, Y., Feng, K., Yang, H., Yuan, Y., Yue, T. (2018b). Antifungal mechanism of cinnamaldehyde and citral combination against *Penicillium expansum* based on FT-IR fingerprint, plasma membrane, oxidative stress and volatile profile. *RSC advances*, 8(11), 5806-5815.10.1039/C7RA12191A
- Wang, Y., Feng, K., Yang, H., Zhang, Z., Yuan, Y., Yue, T. (2018c). Effect of cinnamaldehyde and citral combination on transcriptional profile, growth, oxidative damage and patulin biosynthesis of *Penicillium expansum*. *Frontiers in microbiology*, 9, 597.<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00597>
- Weijers, M., Barneveld, P. A., Cohen Stuart, M. A., Visschers, R. W. (2003). Heat-induced denaturation and aggregation of ovalbumin at neutral pH described by irreversible first-order kinetics. *Protein Science*, 12(12), 2693-2703
- Wicochea-Rodríguez, J. D., Chalier, P., Ruiz, T., Gastaldi, E. (2019). Active food packaging based on biopolymers and aroma compounds: how to design and control the release. *Frontiers in chemistry*, 7, 398.<https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00398>
- Wu, X., Wu, H., Liu, M., Liu, Z., Xu, H., Lai, F. (2011). Analysis of binding interaction between (–)-epigallocatechin (EGC) and β -lactoglobulin by multi-spectroscopic method. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 82(1), 164-168
- Wu, Y., Luo, Y., Wang, Q. (2012). Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid–liquid dispersion method. *LWT-Food Science and Technology*, 48(2), 283-290.<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.03.027>

- Xie, L., Wehling, R. L., Ciftci, O., Zhang, Y. (2017). Formation of complexes between tannic acid with bovine serum albumin, egg ovalbumin and bovine beta-lactoglobulin. *Food Research International*, 102, 195-202. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.007>
- Xing, F., Hua, H., Selvaraj, J. N., Zhao, Y., Zhou, L., Liu, X., Liu, Y. (2014). Growth inhibition and morphological alterations of *Fusarium verticillioides* by cinnamon oil and cinnamaldehyde. *Food Control*, 46, 343-350. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.037>
- Yao, L., Jiang, A., Chen, L. (2020). Characterization of ethanol-induced egg white gel and transportation of active nutraceuticals. *LWT*, 130, 109530
- Yousif, A. I., Nhepera, D., Johnson, S. (2012). Influence of sorghum flour addition on flat bread in vitro starch digestibility, antioxidant capacity and consumer acceptability. *Food chemistry*, 134(2), 880-887
- Yu, H., Lin, Z.-X., Xiang, W.-L., Huang, M., Tang, J., Lu, Y., Zhao, Q.-H., Zhang, Q., Rao, Y., Liu, L. (2022). Antifungal activity and mechanism of d-limonene against foodborne opportunistic pathogen *Candida tropicalis*. *LWT*, 159, 113144. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113144>
- Zambrano-Zaragoza, M. L., González-Reza, R., Mendoza-Muñoz, N., Miranda-Linares, V., Bernal-Couoh, T. F., Mendoza-Elvira, S., Quintanar-Guerrero, D. (2018). Nanosystems in edible coatings: A novel strategy for food preservation. *International journal of molecular sciences*, 19(3), 705. <https://doi.org/10.3390/ijms19030705>
- Zengin, N., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S., Aksoy, H. (2011). The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: sodium benzoate and potassium benzoate. *Food and Chemical Toxicology*, 49(4), 763-769. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.11.040>
- Zhang, J., Ma, S., Du, S., Chen, S., Sun, H. (2019). Antifungal activity of thymol and carvacrol against postharvest pathogens *Botrytis cinerea*. *Journal of food science and technology*, 56(5), 2611-2620. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03747-0>
- Zhang, W., Jiang, H., Rhim, J.-W., Cao, J., Jiang, W. (2021). Effective strategies of sustained release and retention enhancement of essential oils in active food packaging films/coatings. *Food chemistry*, 130671. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130671>
- Zhong, T., Liang, Y., Jiang, S., Yang, L., Shi, Y., Guo, S., Zhang, C. (2017). Physical, antioxidant and antimicrobial properties of modified peanut protein isolate based films

- incorporating thymol. *RSC advances*, 7(66), 41610-41618. <https://doi.org/10.1039/C7RA07444A>
- Zhong, Y., Godwin, P., Jin, Y., Xiao, H. (2020). Biodegradable polymers and green-based antimicrobial packaging materials: A mini-review. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*, 3(1), 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.aiepr.2019.11.002>
- Zimet, P., Livney, Y. D. (2009). Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for ω -3 polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocolloids*, 23(4), 1120-1126