

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
Campus Tuxtepec
Ingeniería en Biotecnología



Tesis

**Determinación de características fisicoquímicas y fenoles totales
en biopelículas preparadas con bacteriocinas**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Ingeniero en Biotecnología

Presenta

Juan Norberto Girón Campechano

Directora

Dra. Cynthia Magaly Antonio Cisneros

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México. 2023

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Campus Tuxtepec

Ingeniería en Biotecnología



Tesis

**Determinación de características fisicoquímicas y fenoles totales
en biopelículas preparadas con bacteriocinas**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Ingeniero en Biotecnología

Presenta

Juan Norberto Girón Campechano

Directora

Dra. Cynthia Magaly Antonio Cisneros

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México. 2023



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 24 de abril de 2023 a las 16:15 h, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "**Determinación de características fisicoquímicas y fenoles totales en biopelícula preparadas con bacteriocinas**", presentada por el alumno **Juan Norberto Girón Campechano**, con número de matrícula 15090235, aspirante al título de **Licenciatura**.

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que el aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

Tuxtepec, Oaxaca, a 24 de abril de 2023.

ATENTAMENTE
LA COMISIÓN REVISORA


Dra. Cynthia Magaly Antonio Cisneros
Profesor Investigador Titular "A"
Universidad del Papaloapan
Director de Tesis


Dr. Oscar Núñez Gaona
Profesor Investigador Titular "A"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis


Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia
Investigadora por México CONACyT-UNPA
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

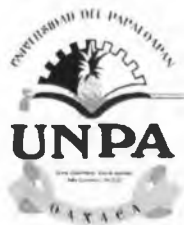

Dra. Alma Xochil Ávila Alejandro
Profesor Investigador Titular "A"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis


Dr. Lucio Abel Vázquez León
Investigador por México CONACyT-UNPA
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

Campus Loma Bonita
Av. Ferrocarril S/N, Col. Ciudad Universitaria, Loma
Bonita, Oaxaca C.P. 68400
Tel/Fax: 01 281 872 92 30

www.unpa.edu.mx

Campus Tuxtepec
Circuito Central N° 200, Col. Parque Industrial,
Tuxtepec, Oaxaca. C.P. 68301
Tel/Fax: 01 287 875 9240



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Tuxtepec, Oaxaca, a 04 de mayo de 2023
Oficio No. JCIB/001/05/2023

M.E. Yesenia Barrientos Arenal
Jefe de Servicios Escolares
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis del alumno **Juan Norberto Girón Campechano** con título definitivo "**Determinación de características fisicoquímicas y fenoles totales en biopelícula preparadas con bacteriocinas**", para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

Dr. Oscar Núñez Gaona (Presidente, Universidad del Papaloapan)
Dra. Alma Xochil Ávila Alejandre (Secretario, Universidad del Papaloapan)
Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia (Vocal, Universidad del Papaloapan)
Dra. Martha Elena Aguilera Morales (Primer Suplente, Universidad del Papaloapan)
Dr. Lucio Abel Vásquez León (Segundo Suplente, Universidad del Papaloapan)

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente
Terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí ji jú



Dra. Jacqueline Capataz Tafur

Jefe de Carrera de Ingeniería en Biotecnología
Universidad del Papaloapan

EFATURA DE INGENIERIA
EN BIOTECNOLOGIA Cynthia Magaly Antonio Cisneros. Director de tesis. Para su conocimiento
CAMPUS TUXTEPEC Juan Norberto Girón Campechano. Alumno. Para su conocimiento
c.c.p. Archivo

Vo.Bo. M.C. Héctor López Arjona
Vice Rector Académico
Universidad del Papaloapan



VICE-RECTORIA
ACADEMICA

Campus Loma Bonita
Av. Ferrocarril S/N, Col. Ciudad Universitaria, Loma
Bonita, Oaxaca C.P. 68400
Tel/Fax: 01 281 872 92 30

www.unpa.edu.mx

Campus Tuxtepec
Circuito Central N° 200, Col. Parque Industrial,
Tuxtepec, Oaxaca, C.P. 68301
Tel/Fax: 01 287 875 9240

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Miguel Ángel Peña Rico encargado del laboratorio de fisiología celular en el Centro de Investigaciones Científicas (CIC) la Universidad del Papaloapan, campus Tuxtepec, por el apoyo brindado en la caracterización morfológica.

Al MC. Manuel Aguilar Franco, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) de la UNAM-Juriquilla. Santiago de Querétaro, Qro. Por el apoyo brindado en la microscopía electrónica de barrido (SEM).

DEDICATORIA

A mis padres, por todo el apoyo, amor, educación y consejos que me dieron desde temprana edad, sin duda alguna los considero lo más importante de mi vida, estaré eternamente agradecido por todo el esfuerzo realizado para que hoy pueda ser un profesional, se los dedico con mucho amor. A mi padre Felipe Girón Laguna, aunque ya no esté con nosotros, con éste acto espero honrar su memoria. A mi madre Guadalupe Campechano Antonino quien es la mayor impulsora de mis objetivos, gracias por sus cuidados y atenciones, sin ella nada de esto sería posible.

A mi hermano el Ing. Juan Antonio Girón Campechano por su apoyo y comprensión que hizo siempre todo lo que estuvo a su alcance para ayudarme en este camino.

A la Dra. Cynthia Magaly Antonio Cisneros que forman parte de este trabajo como directora de tesis, por todo su apoyo y confianza, estaré siempre agradecido por sus recomendaciones y acciones.

A casi todos mis profesores, la mayoría grandes docentes y personas.

A mis amigos por con su compañía que siempre estuvieron a mi lado apoyándome y haciendo menos difícil el camino. Gracias Paola, Ameyalli, Anahí, Eduardo, Fernando, Karla, Angelica, Carlos, Luis A., Abiezer, Ángel, Antonio, Margarita, Max e Iván. Sobre todo, a mi amiga Anahí que fue también mi compañera de laboratorio.

A mi novio Daniel Arturo Escobedo Portilla por todo su apoyo moral, compañía y sobre todo su amor que me impulsa a cumplir mis objetivos.

A mi tía María del Carmen Campechano Marcos por siempre estar presente en mi vida como una madre y hermana.

A la memoria de María Esperanza González Esteban, Lucia Campechano González, Teresa Campechano González y Valentín Campechano González.

ÍNDICE	Página
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
I. INTRODUCCIÓN	13
1.1. MARCO TEÓRICO	15
1.1.1. Generalidades de los polímeros	15
1.1.1.1. Clasificación y aplicaciones	16
1.1.2. Caseína	18
1.1.3. Sistema de defensa antimicrobiano	19
1.1.4. Bacteriocinas y mecanismo de acción	19
1.1.4.1. Natamicina	21
1.1.4.2. Nisina	23
1.1.5. Aditivos alimentarios	24
1.1.5.1. Uso del glicerol como aditivo	25
1.1.6. Actividad oxidante y antioxidante	25
1.2. ANTECEDENTES	29
II. JUSTIFICACIÓN	35
III. HIPOTESIS	37
3.1 OBJETIVOS	37
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	38
4.1. Preparación de las biopelículas	38
4.2. Caracterización fisicoquímica de las biopelículas	39
4.3. Determinación de fenoles totales de las biopelículas	40
4.4. Diseño experimental y análisis estadístico	41
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
5.1. Preparación de las biopelículas	42
5.2. Caracterización fisicoquímica de las biopelículas	44
5.3. Determinación de fenoles totales de las biopelículas	46
VI. CONCLUSIONES	57
VII. PERSPECTIVAS	59
VIII. REFERENCIAS	60
IX. ANEXOS	70

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Descripción general de la metodología empleada	38
Figura 2. Biopelículas obtenidas, A) Control; B) con Nisina; C) con Natamicina	42
Figura 3. Cinética de estabilidad de pH de biopelículas, A) en HCl, B) en NaOH y C) comparación de ambas soluciones	47
Figura 4. Microscopía óptica de biopelículas con nisina, A) NI2525, B) NI5025, C) NI5050 y D) NI2550	49
Figura 5. Microscopía óptica de biopelículas con natamicina, A) NA2525, B) NA5025, C) NA5050 y D) NA2550	50
Figura 6. Imágenes obtenidas por SEM de biopelículas control	51
Figura 7. Imágenes obtenidas por SEM de biopelículas de caseína y nisina, A) NI2525, B) NI5025, C) NI5050 y D) NI2550	52
Figura 8. Imágenes obtenidas por SEM de biopelículas de caseína y natamicina, A) NA2525, B) NA5025, C) NA5050 y D) NA2550	53

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación de bacteriocinas modificado de (Kumariya et al., 2019)	20
Tabla 2. Antecedentes de investigación de biopelículas	29
Tabla 3. Diámetro y grosor de biopelículas de caseína/bacteriocinas	43
Tabla 4. Capacidad de solubilidad de agua de biopelículas	45
Tabla 5. Contenido de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu	55

ABREVIATURAS

ABS	Absorbancia
AG	Acido Gálico
ANDEVA	Análisis de varianza
BS	Bicarbonato de sodio
BTN	Bacteriocina
CAS	Caseína
CSA	Capacidad de solubilidad de agua
EG	Equivalente de Galato
F	Formulación
FC	Folin-Ciocalteu
GLI	Glicerina
GLT	Galato
GRE	Grenetina
HCL	Ácido clorhídrico
N	Normal, Normalidad química
NA	Natamicina
NAOH	Hidróxido de sodio
NI	Nisina
PLA	Ácido poliláctico
PPM	Partes por millón
RNS	Especies Reactivas de Nitrogeno
RPM	Revoluciones por minuto
ROS	Especies Reactivas de Oxigeno
S	Sobrenadante
SAS	Statistic Analysis System
SEM	Microscopia electrónica de Barrido
SFP	Solución formadora de película
SFPF	Solución formadora de película + Formulación
UV-VIS	Ultravioleta-visible

RESUMEN

El uso de bacteriocinas como aditivo alimentario completa la función de tecnología de barrera por su capacidad antimicrobiana ampliamente conocida y estudiada, sin embargo, poco se sabe acerca de su capacidad antioxidante. La caseína como proteína láctea, forma películas a través de interacciones moleculares de polipéptidos, la grenetina forma redes poliméricas que produce geles estables utilizados como alimento o aditivo. En este trabajo se diseñaron soluciones formadoras de películas (agua + grenetina), formulaciones (bacteriocina+proteína+plastificante) utilizando un diseño experimental completamente al azar de tres factores: tipo de bacteriocina (nisina o natamicina, 0.5 g), caseína (2.5 y 5.0 g/10mL) y glicerol (2.5 y 5.0 mL/10mL) con dos niveles por factor. Se realizó caracterización fisicoquímica: capacidad de solubilidad en agua, estabilidad en solución ácido/base, morfología (óptica y SEM) y se determinó el contenido de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu. Los resultados mostraron que la metodología propuesta en este trabajo permitió obtener biopelículas con características fisicoquímicas semejantes entre sí ($p \leq 0.5$), la capacidad de solubilidad en agua se afectó por la concentración de glicerol, en soluciones ácido/base se observó un efecto amortiguador (pH 7) de las biopelículas después de 24 h de exposición y durante los 10 días que se mantuvo la cinética. La morfología óptica mostró superficies heterogéneas en las biopelículas con natamicina que se conservó con las diferentes concentraciones de caseína y glicerol, sin embargo, la heterogeneidad de la superficie cambió cuando se utilizó nisina en la formulación. La técnica empleada en la determinación de fenoles totales mostró una buena linealidad ($R^2=0.99$) y el análisis estadístico demostró que hay diferencia significativa ($p \leq 0.5$) entre las biopelículas preparadas con natamicina con una concentración de 2.97-6.60 (mg EG/g biopelícula), no obstante, este comportamiento no se observó en las biopelículas preparadas con nisina (4.10-4.64 mg EG/g biopelícula), donde no existió diferencia estadística. Estos resultados promueven la aplicación futura de las biopelículas como material de grado alimenticio para la obtención de empaques o recubrimientos comestibles después de observar el estudio en un sistema alimentario compatible para conocer la interacción y la relación como antioxidante y/o conservador.

ABSTRACT

The use of bacteriocins as a food additive completes the role of barrier technology due to antimicrobial capacity, however, little is known about its antioxidant capacity. Casein as a milk protein forms films through molecular interactions of polypeptides, gelatin forms polymeric networks that produce stable gels used as food or additive. In this research work, film-forming solution (water + gelatin), formulation (bacteriocin + protein + plasticizer) was designed using a completely randomized experimental design of three factors: (nisin and natamycin), casein (2.5 and 5.0 g /mL) and glycerol (2.5 and 5.0 mL/mL) with two levels per factor. Physicochemical characterization was carried out: solubility capacity in water, stability in acid/base solution, morphology (optics and SEM) and the total phenol content was determined by the Folin-Ciocalteu method. The results showed that the methodology proposed in this work allows obtaining biofilms with physicochemical characteristics similar to each other ($p \leq 0.5$), the solubility capacity in water was affected by the glycerol concentration, the stability in acid and basic solutions have a buffer effect. (pH 7) after 24 days of exposure and during the 10 days that the kinetics were maintained. The optical morphology shows heterogeneous surfaces in the natamycin biofilms that are preserved with the different concentrations of casein and glycerol; however, the surface heterogeneity changes when nisin is used in the formulation. The technique used in the determination of total phenols showed good linearity ($R^2=0.99$) and the statistical analysis showed that there is a significant difference ($p \leq 0.5$) between the biofilms prepared with natamycin with a concentration of 2.97-6.60 mg gallate/g biofilm, however, this behavior was not observed in the biofilms prepared with nisin 4.10-4.64 mg gallate/g biofilm, where there is no statistical difference. These results promote the future application of biofilms as a food grade material for obtaining edible packaging or coatings after observing the study in a compatible food system to know the interaction and relationship as an antioxidant and/or preservative .

I. INTRODUCCIÓN

La inocuidad de los alimentos es sumamente importante a nivel mundial ya que impacta directamente la salud pública, es por lo que a través de la producción y procesamiento de los alimentos se toman medidas de control para evitar que sean contaminados y se conviertan en un riesgo sanitario por agentes químicos o biológicos. Por ejemplo, los patógenos pueden producir efectos nocivos en el organismo utilizando el tracto intestinal como puerta de entrada al cuerpo humano, donde pueden producir infección en diferentes sitios o sistemas según la patogenia del microorganismo, ([Smith y Fratamico, 2018](#)). Por otro lado los alimentos también pudiesen exponerse a agentes oxidantes en distintos punto de su procesamiento, almacenamiento o transporte solo a traves de un un sistema de regulación redox de apoyo éstos se mantienen estables evitando la descomposición provocada por cambios irreversibles en lípidos y proteínas que comúnmente ocurre a falta de un sistema de regulación redox, ([Estévez M. y Lorenzo J., 2019](#)). Para preservar los alimentos seguros y fuera del alcance de agentes contaminantes químicos o biológicos, muchos alimentos son empaquetados, usando diferentes polímeros como material base. El empaque se refiere a la tecnología y el material para envolver o proteger los productos para su distribución, almacenamiento, venta y uso. Los empaques son esenciales en la cadena de suministro, sin embargo, también plantean desafíos tales como: residuos contaminantes, costo, eficiencia energética y sostenibilidad. Según Plastics Europe, en Europa se utilizaron alrededor de 51.2 millones de toneladas mdt de plásticos y se estimó que el 39.9 % se utilizaba para envases, ([Carina et al., 2021](#)). En América latina y el Caribe se estima que alrededor de 9 mdt de residuos plásticos anualmente terminan en el océano, ([Leon, D. y Cárdenas, C., 2020](#)), por otro lado, en México el consumo de plástico fue mayor que su producción de 6.7 mdt en 2012 pasó a 8.4 mdt en 2017, ([ANIPAC, 2018](#)).

En la actualidad la humanidad se ha vuelto más dependiente del uso de polímeros sintéticos, desafortunadamente este fenómeno está asociado con una gran cantidad de cuestiones ambientales y de salud, ([Qureshi et al., 2020](#)), como respuesta ante esta preocupación existen alternativas menos contaminantes como es el caso de materiales poliméricos a base de fuentes naturales como bioplásticos de celulosa, almidón, fibra y proteínas que son los más comunes,

estos se encuentran en gran abundancia, con bajo costo, son renovables e incluso consumibles con el alimento, ([Azmin et al., 2020](#)).

Las biopelículas comestibles formadas de biopolímeros producidos a partir almidón, caseína y quitosano, poseen características interesantes como son: permeabilidad de oxígeno, resistencia, elasticidad, solubilidad y degradabilidad, dichas características los hacen atractivos para su aplicación en recubrimientos y empaques de alimentos, además pueden transportar agentes activos de tal manera que su función protectora sea potenciada de manera más eficiente, ([Durango et al., 2011](#)).

La incorporación de conservadores soportados en empaques y recubrimientos tienen el propósito de reducir o impedir deterioro en los alimentos y el crecimiento de microorganismos patógenos, ([Resa et al., 2014](#)). La principal alternativa como agentes antimicrobianos naturales en la industria alimentaria son péptidos antimicrobianos; las bacteriocinas comúnmente utilizadas en el procesamiento de cárnicos y lácteos son nisina y natamicina, estas moléculas presentan características de afinidad o polaridad y peso molecular muy distintas, su utilización solas o combinadas han demostrado su eficacia manteniendo alimentos estables y seguros, ([Mondragon, et al., 2013](#)). Sin embargo, estos tipos de envase aún son métodos alternativos por lo cual se necesita mayor investigación para poder desarrollar ampliamente esta tecnología aplicada a gran escala.

1.1. MARCO TEÓRICO

1.1.1. Generalidades de los polímeros

La humanidad a través de la historia ha requerido del uso de los polímeros, en un principio provenientes de fuentes naturales, tal es el caso de las fibras vegetales como la madera, el algodón, fibras animales como las pieles y la seda; la disponibilidad de estos materiales ha contribuido al desarrollo de nuestras civilizaciones en diferentes ámbitos ya que sus aplicaciones van desde las más comunes hasta aquellas mucho más complejas a medida que su estudio se vuelve más profundo, es por esto que se debe entender qué son los polímeros, (Wade, 2011).

Un polímero puede definirse como el ordenamiento molecular repetitivo de unidades monoméricas de forma lineal, ramificada o interconectada de manera tridimensional, estas macromoléculas pueden ser naturales o sintéticas y desde hace muchos años los polímeros son estudiados debido a sus características particulares y su amplia aplicación. Las propiedades de estas macromoléculas están relacionadas principalmente con factores como: la naturaleza química de los monómeros que componen la estructura y la cantidad de repeticiones que posea una cadena polimérica, a su vez, la relación que existe entre estos dos factores ampliamente conocidos son las interacciones moleculares, las cuales permiten en primera instancia la estabilidad de las unidades del polímero; las fuerzas que participan en los enlaces intermoleculares son principalmente los puentes de hidrógeno y la fuerza de van der Waals, ([Billmeyer, 2020](#)).

El grado de polimerización, es decir, la cantidad de repeticiones que posee una cadena polimérica cobra relevancia al seleccionar un polímero para una aplicación específica, al parecer, sus propiedades mecánicas tal como el punto de fusión, resistencia a la ruptura, cristalinidad, se ven comprometidas según sea el grado de polimerización, el cual también es directamente proporcional al peso molecular. Las estructuras poliméricas pueden tener una tendencia a la cristalinidad o por el contrario una tendencia amorfa lo que no determina que alguna sea mejor que otra, ya que las estructuras poliméricas cristalinas poseen mayor rigidez y resistencia mientras que estructuras con tendencia amorfa son más flexibles y tenaces, (Wade, 2011).

Los polímeros sintéticos han revolucionado el mundo gracias a sus múltiples aplicaciones pero la dependencia a estos materiales se han convertido en un problema serio relacionado con generación y acumulación de residuos macroscópicos e incluso microscópicos que afectan ecosistemas y organismos vivos. Las propiedades que en principio fueron apreciadas gradualmente se han convertido en preocupantes pues su alta resistencia y baja degradabilidad han ocasionado distintos niveles de contaminación. En contraste con los polímeros sintéticos existen polímeros de fuentes naturales ya antes mencionados que además de las propiedades deseables como la resistencia, baja opacidad, permeabilidad y flexibilidad también tienen una mayor degradabilidad y biocompatibilidad, a estos materiales también se les llama biopolímeros, [\(Coreño-Alonso y Méndez-Bautista, 2010\)](#).

La definición precisa de un biopolímero puede variar según el enfoque del que se estudie, ya que puede existir más de una forma de interpretar este término. El prefijo bio hace referencia a la vida ya que proceden de organismos vivos. Los biopolímeros son un grupo heterogéneo de materiales sintetizados de origen biológico o de cualquier unidad de construcción tales como aminoácidos, lípidos y azúcares, [\(Verma et al., 2020\)](#). Los biopolímeros microbianos como los poliésteres, poliamidas y polisacáridos se producen con éxito a partir de cultivos puros, mutantes seleccionados del laboratorio u organismos modificados genéticamente. Los biopolímeros van desde soluciones viscosas hasta bioplásticos y su masa molecular y composición deciden sus propiedades físicas, [\(Rehm, 2010\)](#).

1.1.1.1 Clasificación y aplicaciones

Una forma de clasificar a los biopolímeros también puede ser según su procedencia, es decir la fuente natural de la cual se ha obtenido, [\(Wankhade, 2020\)](#). Pueden clasificarse de forma química dependiendo el tipo de molécula que se repita y forme el patrón polimérico, incluyendo poliésteres, proteínas (colágeno, seda, agar), polisacáridos (xantano, almidón, quitina). La clasificación por su capacidad de degradación es otra forma común de agrupar estas macromoléculas como biodegradables y no biodegradables.

Las bacterias pueden sintetizar una amplia gama de biopolímeros que sirven a diversas funciones y tienen propiedades materiales adecuadas para numerosos usos industriales y médicos. Cuatro clases principales de polímeros son producidas por bacterias: polisacáridos, poliésteres, poliamidas y polianhídridos inorgánicos, [\(Rehm, 2010\)](#). El quitosano biopolímero importante producido a partir de la desacetilación de exoesqueletos crustáceos marinos e insectos. Debido a su destino ambiental y biocompatibilidad, [\(Negm et al., 2020\)](#).

Las plantas producen de forma natural biopolímeros como polisacáridos, proteínas, lípidos y otros materiales; las células vegetales son fábricas en miniatura que producen una variedad de materiales bioquímicos necesarios para su crecimiento, reproducción, defensa contra plagas, enfermedades y para monitorear e interactuar con su entorno, por ejemplo, almidón, celulosa, hemicelulosa y lignina que se utilizan ampliamente por los humanos en nuestra vida diaria, [\(Snell et al., 2015\)](#).

Otros representantes de biopolímeros a base de proteínas animales son gelatina, seda, lana, y colágeno; los biopolímeros tienen funciones determinadas en todos los seres vivos que los poseen, sin embargo, pueden aplicarse a diversas tecnologías y sistemas lo que permite ampliar la oportunidad de ser incorporados en distintas áreas de investigación científica, como la Ciencia de materiales, Biomedicina y Nanotecnología. En términos generales, el área principal de aplicaciones incluye dispositivos implantables, productos para el tratamiento de heridas, medicamentos controlados, sistemas de entrega y andamios de ingeniería de tejidos. Recientemente han aparecido trabajos que describen la estructura, propiedades, clasificación y uso potencial de biopolímeros naturales en diferentes campos como la regeneración de tejidos blandos y sistemas de transporte activos, [\(Varma y Gopi, 2021\)](#).

Estos polímeros naturales se utilizan en muchas investigaciones sobre los polisacáridos para comprender su aplicabilidad en los envases comestibles, [\(Grujic et al., 2017\)](#). Debido a la pérdida de tenacidad y calidad de los alimentos es necesario utilizar polímeros biodegradables para aumentar la vida de anaquel. Los materiales poliméricos naturales comestibles y biodegradables se pueden utilizar en alimentos personalizados, [\(Wankhade, 2020\)](#).

1.1.2. Caseína

Las proteínas que existen en la leche se pueden dividir en dos grupos: caseínas y proteínas del suero. Las caseínas pueden considerarse como aquellas proteínas que precipitan cuando la leche se acidifica a pH 4.6 sin calentar, mientras que las proteínas del suero permanecen en solución. La caseína comercial es una mezcla de cuatro caseínas: α_1 , α_2 , β y κ , esta se encuentra como suspensión coloidal de micelas complejas en combinación con calcio, fosfato inorgánico y citrato, ([Southward, 2002](#)).

La caseína puede precipitarse de la leche desnatada y producir caseína ácida, así como caseína renina. La primera se obtiene inoculando la leche con *Lactobacillus lactis spp o cremoris*; estas bacterias convierten parte de la lactosa en ácido láctico (16 a 18 h), por adición directa con HCl o H₂SO₄, por acidificación indirecta con resinas de intercambio iónico, adición de suero acidificado o electrodiálisis. Después de acidificar la leche, la mezcla se calienta para promover la aglomeración de las partículas (sinéresis). El proceso es completado con operaciones unitarias como secado por aspersión o lecho fluidizado, enfriamiento, tamizado y mezclado. La caseína renina se obtiene por precipitación con la quimosina, enzima proteolítica que separa una porción de la κ -caseína de la micela debido a la inestabilidad en presencia de iones de calcio que le impiden formar una red tridimensional. El proceso de obtención involucra la coagulación de la leche desnatada, cocción, deshidratación, lavado y secado, ([Southward, 2002](#)).

La caseína y sus precipitados poseen características fisicoquímicas importantes; son insolubles en agua por lo que debe disolverse usando una base para producir una solución mayor a pH 6.5. Es utilizada en aplicaciones de batido, espumado y emulsiones; al añadir caseína a los sistemas alimentarios puede modificar la textura generando productos mas consistentes por la capacidad de formar matrices como; también se usa para materiales plastificados que funcionen como aditivos en pinturas y recubrimientos,. Exhibe propiedades de fusión únicas entre las proteínas, ya que después de la proteólisis es termo fundible y fluye cuando se calienta; este fenómeno es la base para la fusión de quesos naturales. No puede formar geles térmicos y tiene poca funcionalidad en aplicaciones que requieren un ajuste de temperatura. La alta estabilidad térmica

y la capacidad para fundirse son dos propiedades difíciles de reemplazar en muchas aplicaciones alimentarias. Se utiliza en batidos, cobertura, mezcla para pasteles y helados debido a su propiedad tensoactiva, ([Sarode et al., 2016](#)).

1.1.3. Sistema de defensa microbiano

La conservación de alimentos utilizando microbiota natural y sus metabolitos antimicrobianos se denomina bioprotección o bioconservación. El propósito principal de la bioconservación es la extensión de la vida útil, así como mejorar la seguridad alimentaria. Las bacterias ácido-lácticas (BAL) tienen potencial para su uso en la bioconservación porque pueden ser consumidas de forma segura durante el almacenamiento. El consumo de BAL puede ejercer un efecto bioprotector o inhibitorio contra microorganismos patógenos como resultado de la competencia por los nutrientes. La protección puede ocurrir por la presencia de bacteriocinas u otros compuestos antagonistas como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y enzimas.

Con esta idea en mente, los microorganismos pueden considerarse un sistema de defensa microbiana que incluyen antibióticos clásicos de amplio espectro, subproductos metabólicos, ácido láctico, agentes líticos como la lisozima, tipos de exotoxinas proteicas y desde luego bacteriocinas, cuyas propiedades van desde actividad bactericida hasta coadyuvar con otros métodos de conservación.

1.1.4. Bacteriocinas y mecanismo de acción

Las bacteriocinas se clasifican principalmente en cuatro clases que se muestran mas adelante (Tabla 1), las bacteriocinas de clase I (19 a 50 aminoácidos) por ejemplo, nisina es la bacteriocina de clase I más popular; sin embargo esta primera clase se subdivide en 3 subclases conformadas por lantibióticos, laberintopeptinas y sanctibióticos. La clase II contiene pequeños péptidos termoestables, no modificados postraduccionalmente que se subdividen en 4 subclases que son bacteriocinas de 2 péptidos, las similares a pediocina, iocina circulares e iocina lineales. La clase III bacteriocinas grandes y termolábiles de las que destaca la colicina. Algunos autores clasifican a las bacteriocinas en cuatro clases, que incluyen las anteriormente mencionadas y las bacteriocinas de clase IV consisten en proteínas complejas conjugadas con lípidos o carbohidratos, ([Kumariya et al., 2019](#)), ([Hols et al., 2019](#)).

Tabla 1. Clasificación de bacteriocinas, [\(Kumariya et al., 2019\)](#).

Clase	Subclase	Ejemplo
I	I _A	Nisina
	I _B	Labyrinthopeptin A1
	I _C	Thuricin CD
II	II _A	Pediocin PA-1, Sakacins A y P, Leucocin A.
	II _B	Lactococins G, Plantaricin EF y Plantaricin JK
	II _C	Gassericin A, Enterocin AS-48, Garvicin ML
	II _D	Bactofencin A, LsbB
III	Colicina	Helveticin M, Helveticin J y Enterolisin A
IV	IV	proteínas complejas conjugadas con lípidos o carbohidratos.

Las bacteriocinas que han sido clasificadas según sus modificaciones postraduccionales, se derivan en subgrupos con un criterio basado en la similitud de los residuos de aminoácidos modificados que contengan, por lo tanto, tenemos a los péptidos ribosomales que son sintetizados como precursores mediante genes auto inductores localizados en grupos de operones dentro del genoma bacteriano o incluso en plásmidos; para su transporte y modificación se emplea una regulación a través de grupos de genes cercanos al de la biosíntesis de las bacteriocinas; la eficacia de estos péptidos hace necesaria la autoprotección de la cepa productora, es por esto que existen grupos de genes dedicados a la expresión de proteínas con una función protectora. La activación de estos péptidos está regulada a través de péptidos de señalización, las proteínas de autoinducción al detectar estímulos externos activan la expresión de los genes que codifican para las proteínas de transporte y/o modificación ya que algunos de estos transportadores también tienen un dominio proteolítico para activar a los precursores de las bacteriocinas, por otro lado existen péptidos que no requieren modificaciones por lo tanto una vez sintetizados son transportados de manera funcional, [\(Kumariya et al., 2019\)](#), [\(López et al., 2008\)](#).

Los organismos procariotas han desarrollado estrategias para ajustarse a su nicho ecológico particular, produciendo sustancias antagónicas como bacteriocinas o péptidos citotóxicos, los cuales también resultan muy útiles para la industria alimentaria. Además, pueden complementar o sustituir a los antibióticos y conservantes químicos, ([Montalbán-López *et al.*, 2012](#)). Estas sustancias naturales son péptidos antimicrobianos producidos por bacterias y son bien conocidas por exhibir excelentes propiedades antibacterianas incluso a bajas concentraciones, ([Holcapkova *et al.*, 2018](#)). Las BAL son bacterias productoras de ácido láctico, Gram positivas, catalasas negativas, no formadoras de esporas, ([Daba y Elkhateeb, 2020](#)). BAL ejercen sus efectos conservantes mediante la producción de metabolitos antimicrobianos incluyendo ácidos orgánicos, diacetilo, etanol, peróxido y bacteriocinas, ([O'Connor *et al.*, 2020](#)). Las bacteriocinas como un grupo heterogéneo de péptidos antimicrobianos sintetizados ribosómicamente como método de competencia con la capacidad de inhibir el crecimiento microbiano naturalmente, conforme se ha profundizado el estudio de estos antimicrobianos han cobrado relevancia en diferentes aplicaciones como en la salud humana estrechamente relacionado con los antibióticos de espectro estrecho y aditivos alimentarios, ([Daba, 2020](#)), ([Gálvez *et al.*, 2014](#)), ([Valdés y Susana, 2005](#)).

1.1.4.1. Natamicina

Se produjo por primera vez en la década de los 50's a partir de un filtrado de cultivos de estreptomicetos aislados de una muestra de suelo en Sudáfrica. Existen algunos antecedentes que indican que el nombre Natamicina deriva de la provincia sudafricana de Natal, donde se encontraba originalmente el aislado, después se la adjudicaron otros nombres como pimaracina y tennectina. Es poco soluble en agua por lo que es posible que se acumule en forma de cristales, pero algunas empresas comercializan complejos de natamicina y ciclodextrina soluble en grado alimenticio, ([Delves-Broughton, 2014](#)). No obstante, la poca solubilidad en agua de la natamicina puede aprovecharse en tratamientos superficiales y ya que se utiliza como conservador de alimentos, ésta puede permanecer en la superficie de alimentos embutidos y quesos donde es necesario que no migre a la matriz alimentaria; sin embargo, en la literatura se encuentra que

posee un amplio rango de estabilidad a diferentes pH que va de 3 a 9 por lo que se podría aplicar a diferentes matrices alimentarias como tecnología de barrera.

Al ser un metabolito secundario producido por fermentación de especies de *Streptomyces*, como *S. chattanoogensis*, *S. gilvosporeus*, *S. lydicus*, *S. natalensis*; este agente antifúngico muestra un amplio espectro contra varias especies de mohos y levaduras, ha demostrado ser un compuesto GRAS (generalmente considerado seguro) por la FDA, ([Zeng et al., 2019](#)). La natamicina tiene ventajas como aditivo porque no tiene color, olor ni sabor. Este fungicida del grupo polieno macrólido actúa sobre el ergosterol de la membrana celular, donde se forman canales a través de los que alteran la permeabilidad de la membrana lo que permite una pérdida de proteínas, glúcidos y cationes monovalentes y divalentes, causa de muerte celular, ([Agudelo-Cuartas et al., 2020](#)), ([Gregorí Valdés, 2005](#)). Aunque también el solo hecho de unirse al ergosterol presente en la membrana, compromete el funcionamiento vital de las bacterias sin la necesidad de formar canales que posteriormente puedan crear poros, ([Rivera-Toledo et al., 2020](#)).

Otra teoría sobre el mecanismo de acción de la natamicina es la interacción con ergosterol que da como resultado la prevención de la división celular y la pérdida de las funciones enzimáticas de los hongos. A pesar de que no existen informes contundentes sobre la resistencia a la natamicina *in vivo*, se han realizados estudios en quesos y embutidos fermentados y los resultados mostraron ausencia de crecimiento de mohos y levaduras durante varios meses en comparación con el control, ([Delves-Broughton, 2014](#)). *In vivo* también se ha observado que los canales polares causados por la unión de la natamicina al ergosterol libera iones de potasio que provocan el aumento de la transcripción de interleucina betas, grupo de proteínas encargado de señalar y ayudar a llegar a los macrófagos a la zona de infección, ([Rivera-Toledo et al., 2020](#)). La efectividad de su propiedad antifúngica también reside en sus características a nivel molecular ya que pueden causar daños oxidativos a los ácidos grasos de las membranas de mohos y levaduras, ya que cuenta con enlaces dobles y grupos hidróxido que actúan como especies reactivas de oxígeno las cuales reaccionan y debilitan los ácidos grasos que constituyen la membrana fúngica.

1.1.4.2. Nisina

Esta bacteriocina se descubrió posiblemente a principios del siglo XX, cuando surgieron problemas en la elaboración del queso. Después de varias investigaciones científicas se demostró su actividad antimicrobiana y a finales de siglo la Organización Mundial de la Salud (OMS) la aprobó como aditivo alimenticio, en la actualidad es utilizada en productos lácteos y cárnicos como promotor de conservación. Producida a base de microorganismos, se comercializa en polvo con una apariencia de color blanco, su solubilidad en agua es muy buena y no es soluble en soluciones orgánicas, es estable en valores de pH ácidos. Pertenece a un grupo de bacteriocinas que se conocen colectivamente como lantibióticos, cuyos productores son las bacterias Gram positivas de diferentes géneros como: *Lactococcus* (nisina, lacticina 481), *Lactobacillus* (lactosina S), *Staphylococcus* (Pep 5, epidermina, gallidermina), *Streptococcus* (estreptococo A-FF22, salivaricina A), *Bacillus* (subtilina, mersacidina), *Carnobacteria* (carnocina U149) y *Streptomyces* (duramicina), ([Delves-Broughton J., 2014](#)), ([Małaczewska y Kaczorek-Łukowska, 2021](#)).

Tal como sucede con otros conservadores de esta naturaleza, la acción de la Nisina depende de la concentración aplicada y del nivel de contaminación en los alimentos. La condición de la prueba determinará si la acción de la bacteriocina contra las células vegetativas será bactericida o bacteriostático; esto quiere decir que, si las bacterias se encuentran en una fase de retraso o fase estacionaria de crecimiento e incluso en condiciones no óptimas para su crecimiento como pH, actividad de agua, disponibilidad de nutrientes o temperatura, el efecto de la nisina será bacteriostático y será bactericida cuando las bacterias se encuentren en su mejor condición de crecimiento, es decir en estado energético ideal.

El uso ideal de la nisina es coadyuvando con otros factores de conservación como tecnología de barrera. El objetivo principal de uso es la inserción en la membrana citoplasmática, formando poros transitorios que causan fugas de material celular esencial para las bacterias patógenas Gram positivas. En el caso de bacterias Gram negativas, la nisina tiene dificultad para entrar en contacto con el citoplasma, no obstante, el uso de agentes quelantes como el EDTA mejora la eficiencia de la nisina contra bacterias Gram negativas. Además de conservador, este lantibiótico puede utilizarse como agente terapéutico natural para el control de infecciones bacterianas,

efecto inmunomodulador y actividad inmunotrópica que aún se encuentra bajo investigación, [\(Małaczewska y Kaczorek-Lukowska, 2021\)](#).

1.1.5. Aditivos alimentarios

Los aditivos alimentarios no se consumen como alimentos, tampoco se usan como ingrediente básico en el procesamiento de alimentos. Se pueden agregar en cualquier fase de fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento. El uso de aditivos alimentarios se justifica únicamente si ofrece ventajas, no presenta riesgos para la salud de los consumidores y cumple una o más funciones tecnológicas establecidas por normas oficiales o internacionales, [\(CODEX-192, 2019\)](#).

Los aditivos pueden utilizarse como conservadores químicos, en ausencia de métodos físicos de conservación como la refrigeración, congelación, secado, irradiación, uso de microondas y empaquetado con atmósfera controlada. El conservador químico debe eliminar completamente los microorganismos patógenos, no solo inhibir su crecimiento, debe ser resistente al tratamiento térmico, no debe destruirse por reacciones diversas de los alimentos, ni ser inactivado por los productos metabólicos producidos por los microorganismos, poseer valor práctico y económico, no debe ser irritante y su toxicidad debe ser baja o nula, no debe retardar la actividad enzimática digestiva y no debe descomponerse en sustancias más tóxicas que el propio conservador, [\(Surekha y Reddy, 2014\)](#).

Con fines prácticos, los conservadores pueden dividirse en naturales y sintéticos. Ejemplo de los primeros son azúcar, sal, vinagre, ácidos orgánicos, humo de leña, alcohol. Los conservadores sintéticos pueden dividirse de acuerdo con su naturaleza química en orgánicos e inorgánicos, de esta forma tenemos acetatos, ácido sórbico, benzoico, bórico, cítrico, fórmico, láctico, propiónico y sus sales correspondientes como ejemplos de orgánicos. En este grupo se consideran el ácido carbónico, sulfuroso, sulfitos, nitratos, nitritos, fosfatos y peróxidos de hidrógeno, [\(Surekha y Reddy, 2014\)](#).

1.1.5.1. Uso del glicerol como aditivo

El glicerol puede usarse en las formulaciones alimenticias, es un triol con estructura de propano sustituido en las posiciones 1, 2 y 3 por grupos hidroxilo, puede participar también como osmolito, disolvente y detergente, ([National center for biotechnology information, 2021](#)). Es incorporado a materiales rígidos para aumentar su propiedades mecánicas, comúnmente utilizados como plastificante en la preparación de películas, mejoran la flexibilidad al reducir los enlaces de hidrógeno entre las moléculas y aumentar el espaciamiento intermolecular tras su intercalación en la red de polímero, ([dos Reis et al., 2014](#), [Lim et al., 2020](#)). Al interactuar con las unidades de glucosa, interrumpe las fuertes interacciones de las cadenas intermoleculares formadas durante la formación de la película, ([Ivanič, et al., 2017](#)). La concentración de este aditivo está estrechamente relacionada con las características mecánicas de la cual dependen para la viabilidad de las biopelículas como empaques biodegradables, ([Farahnaky et al., 2013](#)). Se reconoce al glicerol comúnmente como uno de los plastificantes más adecuados, aunque debe tener una buena compatibilidad con los componentes formadores de película para asegurar su distribución uniforme, ([Gao et al., 2019](#), [Liu et al., 2013](#)).

Durante el procesamiento de alimentos pueden ocurrir cambios deseables o indeseables. Los cambios deseables ayudan a obtener alimentos no solo más palatables sino saludables y con vida de anaquel prolongada. Sin embargo, los cambios indeseables están presentes en los alimentos y disminuyen la calidad fisicoquímica y sensorial del alimento. Uno de los cambios que se pueden generar en los alimentos es la oxidación, debido al contenido de proteínas y lípidos.

1.1.6. Actividad oxidante y antioxidante

Las reacciones de oxidación son fundamentales en todos los sistemas biológicos como parte de las funciones y procesos bioquímicos. La degradación oxidativa produce especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) que, en condiciones fisiológicas adecuadas, el equilibrio entre prooxidantes y defensa oxidante endógena, puede garantizar la homeostasis. Pero el desequilibrio desproporcionado hacia los compuestos prooxidantes conduce al daño oxidativo a componentes celulares, conocido como estrés oxidativo. El impacto es tan dañino como el que

ejercen las especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés), que interactúan cooperativamente para causar oxidación, [\(Siddeeg et al., 2021\)](#).

Las deficiencias inducidas por la oxidación incluyen la aparición de sabores y olores extraños o desagradables, aumento de la firmeza, debido a la oxidación de proteínas, decoloración causada por la oxidación de pigmentos, pérdida de la funcionalidad acuosa en los alimentos con elevado contenido de agua o bien capacidad de retención de agua, emulsificación de grasas y formación de geles, pérdida de vitaminas y minerales, ácidos grasos y aminoácidos esenciales. Es posible la formación de especies tóxicas como malondialdehído (MDA), 4-hidroxi-nonenal (4-HNE), productos avanzados de oxidación de proteínas (APOP, por sus siglas en inglés), ditirosinas, quinureninas, ditirosinas. El consumo de estos compuestos tóxicos puede tener impacto en el intestino porque son absorbidos y distribuidos a través del torrente sanguíneo y afectar funciones biológicas de órganos como el hígado, riñón, páncreas y cerebro, [\(García-García y Searle, 2016\)](#), [\(Estévez & Luna, 2017\)](#).

En otro contexto, después del sacrificio de los animales de abasto, el entorno bioquímico de la carne contiene prooxidantes debido al colapso de las funciones celulares controladas fisiológicamente que provoca la formación de ROS y RNS, liberación de hidrolasas, aparición de mioglobina, hierro no hemo y otros promotores de reacciones oxidativas. Las reacciones entre las especies reactivas y las especies susceptibles (ácidos grasos poliinsaturados, colesterol, residuos de aminoácidos en proteínas sarcoplasmáticas, miofibrilares y vitaminas) se facilita durante las operaciones destinadas a transformar la carne cruda en alimentos procesados. Otros factores indeseables como la exposición a la luz, oxígeno, irradiación, reducción de tamaño y el tratamiento térmico acelera la oxidación de lípidos y proteínas. En este contexto, solo se dispone de cantidades limitadas de defensas antioxidantes endógenas en el sistema cárnico para disminuir la amenaza oxidativa, por ejemplo, tocoferoles de membrana, enzimas: superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GT) y catalasas (CAT), El uso de aditivos antioxidantes en la obtención de alimentos procesados se convierte una práctica para mejorar la protección antioxidante, [\(Estévez y Luna, 2019\)](#).

Existen muchas estrategias para disminuir los efectos negativos debidos al estrés oxidativo en los alimentos, controlar la composición de ácidos grasos y proteínas desde la dieta de los animales, técnicas de proceso que disminuyan la formación de ROS y NOS, cuya alternativa se basa en el mínimo procesamiento de la materia prima, mantener adecuadamente las cadenas de frío y el uso de aditivos permitidos como antioxidantes naturales, sintéticos y de origen microbiano. Ingredientes y aditivos como nitrito, ascorbato, fosfatos, péptidos y proteínas no musculares que se utilizan en la formulación de los alimentos pueden considerarse como compuestos activos redox. El nitrito, por ejemplo, considerado un antioxidante porque al combinarse con oxígeno molecular secuestra metales, sin embargo, también muestra acción prooxidante debido a su capacidad para interactuar con electrones de moléculas sensibles y por lo tanto iniciar reacciones oxidativas. El ascorbato se conoce por su propiedad eficiente de eliminar especies radicales, pero también puede exhibir efecto prooxidante reduciendo las transiciones de metales como el hierro y perpetuando la formación de radical hidroxilo a través de reacciones Fenton. Estos casos han sido estudiados en varios grupos de alimentos procesados como los embutidos fermentados, [\(Berardo et al., 2016\)](#).

El estrés oxidativo, entendido como una alteración en el equilibrio prooxidante/antioxidante a favor del primero, se redefinió como una interrupción de la señalización redox y control y/o daño molecular. El término antioxidante se conoce como cualquier compuesto que es capaz de bloquear o ralentizar la reacción de una sustancia con ROS que a su vez inhibe el proceso de oxidación, [\(Siddeeg et al., 2021\)](#), [\(Pisoschi et. al., 2021\)](#). Bajo las condiciones físicas o biológicas normales, el sistema de defensa antioxidante puede utilizar enzimas (superoxidasa dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) y antioxidantes no enzimáticos (melatonina, vitaminas, glutatión, co-enzimas, cofactores, tocoferol, ácido ascórbico) para eliminar los efectos de ataques moleculares, [\(Wen et al., 2020\)](#).

La funcionalidad de los agentes antioxidantes depende de diferentes factores relacionados principalmente con las características químicas de su estructura, concentración, interacción con el sistema, tipo de sustrato de oxidación así como la presencia de agentes sinérgicos que los complementen, dichos factores son propios del antioxidante, sin embargo también existen otros

factores a tomar en cuenta, como la fase de oxidación del alimento ya que el uso de estos aditivos debe ser en puntos estratégicos del procesamiento de alimentos para prevenir la oxidación temprana, inhibiendo así la formación de las reacciones en cadena donde los ROS generen cada vez más radicales libres. También debe considerarse la procedencia del agente antioxidante, existen fuentes naturales o sintetizadas de manera artificial, [\(Shahidi y Zhong, 2015\)](#).

La Transferencia de Átomos de H^+ (HAT) es una de los mecanismos de la capacidad antioxidante de las moléculas capaces de transferir átomos de hidrogeno de esta forma reducir los electrones desapareados de las moléculas reactivas oxidantes; otro mecanismo es la Transferencia de Electrones Selectivos (SET) que están en función de un potencial de transferencia relacionado a la naturaleza química y fisicoquímica del agente antioxidante para donar un electrón de una molécula y estabilice al agente oxidante, [\(Siddeeg, et al., 2021\)](#).

Los organismos vivos cuentan con un mecanismo de regulación de las ROS y RNS, algunos han sido ampliamente estudiados debido a su potencial aplicación como es el caso de los compuestos fenólicos derivado de los hidroxibencenos biosintetizados por el metabolismo secundario a través de la vía del shikimato. Estos metabolitos de bajo peso molecular tienen una estructura alifática con anillos de benceno, su principal característica son: excelentes donadores de H^+ a electrones desapareados, tienen capacidad de inhibición enzimática (lipooxigenasa) y eficaces captadores de radicales libres, sin embargo, también intervienen en diferentes funciones como la defensa principal contra microorganismos patógenos, virus, insectos y parásitos además participan en procesos el crecimiento, señalización, aportan sabor y color a los frutos, raíces y hojas; estos compuestos tienen su origen en los organismos del reino planta y la presencia específica de compuestos fenólicos en animales se debe a la ingesta a través de la dieta, [\(Kumar y Goel, 2019\)](#), [\(Creus, 2004\)](#). La importancia que poseen los polifenoles es su actividad significativa en beneficio de la salud humana para prevención de diversas enfermedades como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, síndromes metabólicos, enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas, [\(Abarca-Vargas y Petricevich, 2018\)](#), [\(Arruda et al., 2020\)](#).

1.2. ANTECEDENTES

La evaluación de características fisicoquímicas en biopelículas se ha reportado en varias investigaciones. A continuación (Tabla 2), se describen algunos detalles.

Tabla 2. Antecedentes de investigación de biopelículas

Propiedades evaluadas	Método de biopelícula	Referencia
Morfología, fisicoquímicas y agentes antioxidantes.	Biopelícula de PLA agregando palmitato de ascorbilo y α -Tocoferol como agentes antioxidantes	Jamshidian et al., (2012).
Morfología, fisicoquímicas y microestructurales.	Biopelícula comestible de almidón modificado de yuca, plastificante y un agente antimicrobiano oleico	Velasco et al., (2012)
Morfología y fisicoquímicas	Biopelículas de PLA adicionadas con natamicina más un agente retardante sol-gel	Lantano et al., (2014)
Fisicoquímicas, solubilidad, aplicación a un sistema alimentario.	Biopelículas biodegradables de una mezcla de almidón de yuca, caseína, gelatina y sorbitol como plastificante	Pellá et al., (2020)
Fisicoquímicas, microestructurales actividades antioxidantes, antimicrobiana.	Biopelícula comestible de gelatina con fosfopéptidos de caseína	Khedri et al., (2021)
Fisicoquímicas, de barrera, morfología, degradabilidad.	Biopelículas activas de proteínas del suero y α -tocoferol como antioxidante	Granda-Restrepo et al., (2014)
Morfología, fisicoquímicas, microestructurales, solubilidad.	Biopelículas de alginato y natamicina como agente antimicrobiano agregada por diferentes métodos de carga.	Bierhalz et al., (2013)

El trabajo hecho por Jamshidian *et al.*, (2012), tuvo como objetivo evaluar las propiedades físicas, estructurales, mecánicas y de barrera analizadas. Agregando palmitato de ascorbilo y α -tocoferol a una película de ácido poliláctico. La solución formadora de película describe una solución al 3.5% p/v de un solvente orgánico en este caso cloroformo, utiliza palmitato de ascorbilo al 1% p/p y α -tocoferol al 2% p/p a base de materia seca de PLA mezclando durante 1 h a temperatura ambiente, debido a que el palmitato de ascorbilo no es completamente soluble se recurre al etanol puro, el secado en moldes con teflón hasta la evaporación del solvente. El análisis óptico integral con diferentes métodos como microscopía de fuerza atómica y microscopía óptica polarizada. El trabajo de investigación confirmó que la microestructura de la superficie del PLA está influenciada por la adición de antioxidantes, se obtienen superficies diferentes, la superficie en contacto con el molde es homogénea mientras que la superficie en contacto con el aire es heterogénea al parecer por efecto de la recristalización; de igual forma los aspectos físicos y mecánicos ya que los aspectos de resistencia a la rotura y elasticidad son complejos y están relacionados con la concentración de los agentes antioxidantes estudiados en este trabajo de investigación.

Velasco *et al.*, (2012), preparó biopelículas obtenidas por método de extrusión donde varió el porcentaje de plastificante entre 20 y 30 %; el porcentaje de agente antimicrobiano entre 0.1 y 0.2 %, así como los perfiles de temperatura para la extrusión se manejaron en un intervalo entre 110-120 °C (dado) y 100-110 °C (cilindro) y humedad relativa de 50 %. Por medio de la microscopía óptica de alta resolución se evaluó la morfología superficial de almidones termoplásticos (TPS) de tres variedades de almidón modificado de yuca con plastificante y un agente antimicrobiano de naturaleza lipídica, las microfotografías se tomaron con los objetivos 4X y 10X. los resultados obtenidos mostraron una superficie poco homogénea común en biopelículas preparadas por extrusión y la adición del plastificante aunque al aumentar la concentración del plastificante se obtenían zonas más homogéneas en la superficies termoplastificadas. En cuanto a la adición del agente antimicrobiano se pudo visualizar una clara diferencia por el color naranja presente en las biopelículas.

Lantano et al., (2014) preparó cuatro recubrimientos activos sólido-gel obtenidas por una mezcla orgánico-inorgánico con propiedades antimicrobianas sobre biopelículas de PLA. Se prepararon biopelículas con diferentes proporciones orgánico-inorgánico (1:19 y 1:4). A través de la cromatografía se evaluó la cantidad de natamicina liberada. El porcentaje de alcohol polivinílico está relacionado con la hinchazón y modula la liberación del agente antimicrobiano. Se encontró que la presencia de natamicina incorporadas aumentan proporcionalmente a mayor cantidad de componente orgánico empleado entre 0.18 y 0.25 mg/dm². El trabajo concluye que la técnica empleada permite la producción de nuevos envases alimentarios con la capacidad de retener un agente activos como es el caso de antimicrobianos controlando la liberación y sin comprometer la integridad de la red de biopolímero aunque tampoco se descarta el uso de otros agentes bioactivos como marcadores de pH o preservantes. Sin embargo, se necesitan más estudios con diferentes microorganismos y superficies de alimentos.

Pellá et al., (2020) describe que el objetivo de su investigación fue el desarrollo de biopelículas biodegradables a partir de una mezcla de polímeros que consiste en yuca natural almidón, caseína, gelatina y sorbitol como plastificante para la aplicación como recubrimiento de guayabas. Las variables evaluadas fueron la proporción en masa seca de los diferentes polímeros de 2 a 4 g y el plastificante que representó un 30% de la masa total, se llevó a cabo una caracterización fisicoquímica para determinar, espesor, opacidad, humedad relativa y solubilidad en agua. Para la preparación de las biopelículas biodegradables se vertió la solución formadora de biopelículas en placas de teflón y se secaron en un horno a 40° C por 24 h; para el análisis de solubilidad se tomaron muestras de 2 x 2 cm que pasaron por 2 procesos de secado, el primero antes de solubilizar con agua destilada y después de la solubilización; además de la preparación y caracterización fisicoquímica se llevó a cabo la aplicación en frutos de guayaba. Lo observado tras las evaluaciones fue una tendencia con respecto a la concentración de biopolímeros ya que se observaron mayores valores de opacidad y de solubilidad, los investigadores reconocen haber obtenido una biopelícula con características favorables con valores bajos de solubilidad y espesor, retención de agua y opacidad intermedia para las biopelículas constituidas con altas cantidades de almidón y caseína, pero bajo nivel de gelatina.

Khedri et al., (2021), tuvo como objetivo investigar los efectos de los fosfopéptidos de caseína bioactivos (CPPS) (0, 0.1, 0.2, 0.3 y 0.5 % (p/v)) sobre las características físico-mecánicas, estructurales, antimicrobianas y antioxidantes de las biopelículas a base de gelatina. A través del análisis de solubilidad de agua, contenido de humedad. Las características físico-mecánicas; a través de microscopia SEM con un aumento de 1000x y 15 kV se evaluó la transversalidad y superficie de las biopelículas a las cuales se les aplicó un recubrimiento de oro para efectos de conductividad; en cuanto a la determinación de propiedades antioxidantes se realizó un ensayo basado en 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) agente químico orgánico compuesto por moléculas estables de radicales libres funcionando como indicador que al reaccionan con un agente antioxidante cambia la absorbancia de 520 a incoloro. Los resultados demostraron que la adición de fosfopéptidos de caseína bioactivos a las biopelículas de gelatina disminuyó significativamente la solubilidad y la permeabilidad al vapor de agua. El trabajo concluye que la adición de fosfopeptidos de caseína tiene un efecto favorable en las propiedades antimicrobianas y antioxidantes mientras que en la propiedades de película y físico-mecánicas la concentración >0.2% p/v presenta resultados menos favorables como menor resistencia de tracción y superficie transversal menos homogénea.

El objetivo del trabajo de Granda-Restrepo et al., (2014), fue caracterizar las propiedades mecánicas, ópticas, morfológicas y de biodegradación de una película activa, obtenida a partir de las proteínas extraídas de suero y un agente antioxidante natural que fue alfa-tocoferol. Las biopelículas se elaboraron a partir de una solución 10% (w/w) de concentrado de proteínas de lactosuero (WPC) en agua, se adicionó glicerol como plastificante y alfa-tocoferol al 1 y 2% w/w disuelto en etanol. Se evaluaron las propiedades mecánicas de las biopelículas bajo la norma ASTM D882-01; además, se analizaron por espectrofotometría, las propiedades de barrera a la luz ultravioleta y a la luz visible fueron medidas en las biopelículas en un rango entre 300 y 800 nm, microscopía electrónica de barrido (SEM) a un voltaje de 10kV y se realizó un análisis de biodegradación por control de la pérdida de masa. Los investigadores concluyen que las propiedades mecánicas, ópticas, de morfología y biodegradación de las biopelículas fueron directamente afectadas por la cantidad de alfa-tocoferol empleada en la formulación debido a que disminuye la fuerza y aumentando su elasticidad de las películas; el análisis microestructural

a través de SEM muestra la diferencia entre una película sin alfatocoferol que es homogénea mientras que las películas que contienen entre 0.1% y 0.2% de alfatocoferol son menos homogéneas y existe presencia de microgotas y burbujas; las concentraciones del 2% de alfatocoferol favorecen las propiedades ópticas, disminuyendo la transmitancia y presentó mayor protección frente a la luz UV. La incorporación del compuesto natural en las biopelículas de proteína tiene un uso potencial para extender la vida útil de los alimentos grasos.

Fematt-Flores *et al.*, (2022) comparó las propiedades mecánicas (espesor, resistencia a la tracción, alargamiento a la rotura), hidrodinámicas (contenido de humedad, solubilidad en agua, relación de hinchamiento, tasa de transmisión de vapor de agua), color y propiedades antioxidantes (DPPH) de biopelículas comestibles a base de dos de las principales proteínas de la leche: caseína y aislado de proteína de suero (dos tipos: WPI1 y WPI2). Para la formación de biopelículas se preparó una solución formadora de películas se añadió a agua destilada una solución que contenía 5% de proteína de leche (caseína, WPI1 o WPI2). Luego, el pH se ajustó a 9.0 con NaOH 0.1 N y la mezcla se calentó a 90 °C durante 30 min; se analizaron las características físico-mecánicas a través de los ensayos de solubilidad en agua, espesor, contenido de humedad, resistencia al estiramiento, color y propiedades ópticas, usando técnicas estandarizadas donde la masa es el factor determinante con ligeras modificaciones especialmente en la temperatura de secado, concretamente en el análisis de solubilidad donde las biopelículas una vez formadas se secaron a 60 °C previo a la inmersión en agua destilada que posteriormente se filtró y secó finalmente a 105 °C; La tasa de transmisión de vapor de agua se realizó con base en el método gravimétrico, se colocó CaCl₂ seco (9 g) dentro de un recipiente (0% HR) y se selló con una película (8.86 cm²).

A través de la formulación de biopelículas de alginato y natamicina como agente antimicrobiano Bierhalz *et al.*, (2013), evaluó diferentes métodos de carga del agente antimicrobiano. Las biopelículas se formularon por reticulación en 2 etapas, la primera se preparó una solución filmógena del biopolímero (1.5 g/100 mL) en 400 mL de agua destilada que ya contenía 0.6 g de glicerol/g de biopolímero a temperatura ambiente, agitada a 900 rpm, la temperatura del sistema se elevó a 70 °C y se agregó lentamente una solución acuosa diluida de cloruro de calcio, se

vertieron alícuotas de la solución (50 mL) en marcos cuadrados y secadas a horno a 40 °C por 20 horas. Para la carga de la natamicina se usaron 3 métodos diferentes, el primero convencional donde se agrega el agente antimicrobiano a la solución filogénica, el siguiente método fue la inmersión de biopelículas de alginato en soluciones con agua-etano para mejorar la solubilidad, el ultimo método empleado un fluido super crítico a partir de CO₂. Para la evaluación de propiedades fisicoquímicas este estudio reporta el uso de microscopía electrónica de barrido, espectroscopía, permeabilidad de vapor y solubilidad. Los resultados mostraron que las biopelículas de alginato cargadas con natamicina con potencial para empaques antimicrobianos, debido a sus propiedades y la obtención por diferentes métodos de carga sin pérdida de sus principales propiedades.

II. JUSTIFICACIÓN

Los productos alimentarios son susceptibles a múltiples factores que afectan sus propiedades y calidad desde su obtención, durante su proceso de transformación y hasta su destino final para el consumo humano, ([García-García y Searle 2016](#)). La oxidación es uno de los principales factores que coadyuva al deterioro de los alimentos por efecto de los radicales libres presentes en el ambiente o bien como resultado de interacciones químicas o físicas del propio alimento con el ambiente. La degradación oxidativa ocasiona daño a nivel molecular en productos cárnicos, lácteos, frutas y verduras; favoreciendo la presencia de malos olores y sabores, ([Hadidi et al., 2022](#)). La acumulación de estos componentes por la degradación pueden ser una fuente de agentes oxidantes que podría impactar de forma negativa en los consumidores. La barrera física es un método comúnmente utilizado para la protección de alimentos frescos y sobre todo alimentos procesados con la generación de empaques a base de polímeros sintéticos. Los materiales plásticos provenientes de combustibles fósiles los cuales han sido los mayores representantes de estos polímeros sintéticos desde el siglo pasado, utilizados para la manufactura de envases y empaques. Sin embargo, la dependencia de estos materiales aumenta cada año y se prevé que alcance los 33 mil millones de toneladas en el año 2050, su acumulación en el ambiente se ha vuelto un tema muy preocupante, ([Manikandan et al., 2020](#)). Los polímeros biodegradables como nuevos materiales de envasado son cada vez más explorados, formulados de bases biológicas, extraídos directamente de plantas o microorganismos, éstos pueden ser polisacáridos, proteínas o productos derivados de procesos fermentativos, como poliésteres, ([Nešić, 2019](#)). Estos materiales alternativos surgen como propuesta para sustituir gradualmente los empaques convencionales, además, en combinación con nuevas tecnologías, ingredientes o técnicas de formulación se pueden hacer empaques activos, inteligentes y comestibles. Las propiedades antioxidantes de diferentes compuestos son cada vez más estudiadas, ayudan a mejorar la estabilidad de los sistemas alimentarios y de esta manera asegurar una mayor durabilidad con las mínimas alteraciones causadas por los agentes oxidantes, ([Lukic, 2020](#)). La nisina y natamicina, son las bacteriocinas más utilizadas y estudiadas como conservantes de alimentos por su espectro de acción contra bacterias patógenas y mohos respectivamente, se consideran como aditivos GRAS permitidos por el Codex Alimentarius. Los biopolímeros proteicos como la grenetina y la

caseína tienen la capacidad de formar geles y películas respectivamente, esto los hace adecuados para la incorporación de aditivos soportados en su estructura, ([Rather et al., 2022](#)).

Los materiales utilizados para empaques activos y recubrimientos comestibles no solo deben satisfacer las necesidades de protección multifactorial, también se caracterizan por ser amigables con el ambiente y biocompatibles debido a su naturaleza biológica, por lo tanto la caracterización de algunas propiedades fisicoquímicas son importantes para predecir su integración con el ambiente o un entorno biológico, una vez que haya cumplido con su función como protector de alimentos, ([Daniloski et al., 2021](#)).

La investigación de películas adicionadas con bacteriocinas por su conocido efecto antimicrobiano ha sido ampliamente estudiada, sin embargo, la presencia de compuestos con actividad antioxidante de estos péptidos no ha sido profundizada, este trabajo pretende obtener información sobre la presencia de compuestos fenólicos totales con función antioxidante con bacteriocinas soportadas en películas comestibles de biopolímeros formuladas a través del método de suspensión en placa o *casting* con diferentes proporciones de biopolímeros, plastificante y bacteriocinas; además de analizar propiedades de la película como la morfología y su capacidad de solubilidad en agua y estabilidad en soluciones ácido/base con la finalidad de aportar información para el potencial desarrollo de envases comestibles, biodegradables y funcionales en alimentos.

III. HIPÓTESIS

Las biopelículas preparadas mezclando solución formadora de película (SFP) y formulaciones (F) con un tipo de bacteriocina y diferentes proporciones de biopolímero y plastificante presentan propiedades fisicoquímicas y contenido de fenoles totales específicas relacionadas con la proporción de sus componentes.

3.1. OBJETIVOS

General

Determinar características fisicoquímicas y compuestos fenólicos en biopelículas preparadas con caseína, plastificante y bacteriocina.

Específicos

- Preparar biopelículas de caseína, glicerol y bacteriocina por el método de suspensión en placa.
- Evaluar las características fisicoquímicas de las biopelículas: capacidad de solubilidad en agua, estabilidad en soluciones ácido/base y morfología.
- Cuantificar compuestos fenólicos totales en biopelículas preparadas por medio de método de reacción Folin-Ciocalteu.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Métodos

La metodología se dividió en tres etapas (Figura 1), la primera fue la preparación de las biopelículas; donde se utilizó una solución formadora de película (SFP) y una formulación (F), la segunda etapa, comprendió la caracterización fisicoquímica de las biopelículas: solubilidad en agua, estudio de la estabilidad de las biopelículas en solución ácida y básica; la tercera etapa donde se determinó el contenido de fenoles totales de las biopelículas. A continuación, se describe cada etapa.

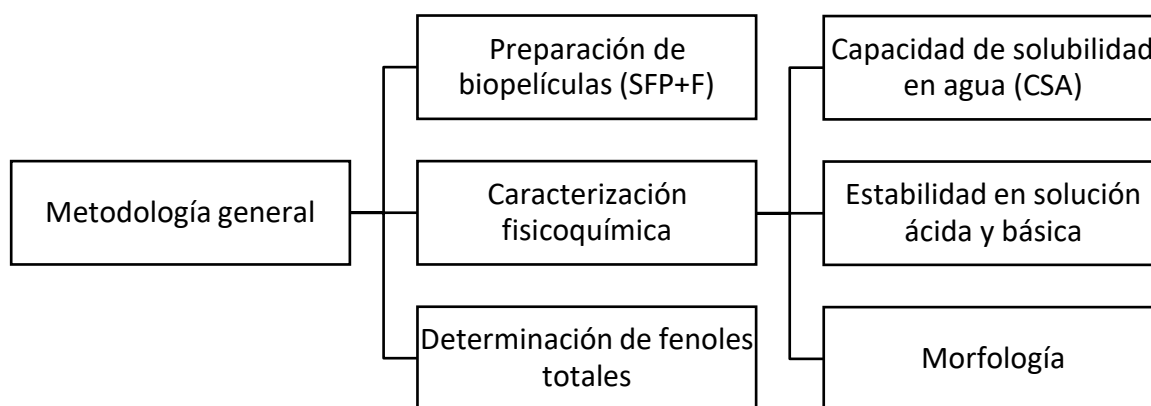


Figura 1. Descripción general de la metodología empleada.

4.1. Preparación de las biopelículas

La metodología descrita por [Akhter et al., \(2019\)](#) fue tomada como referencia con modificaciones necesarias de acuerdo a los componentes base de las biopelículas conservando el método de casting, se preparó una solución formadora de película (SFP) conformada por una base de 100 mL donde el 3 % en peso fue grenetina (GRE) (Additius, México) de grado alimenticio y 97 % de agua destilada, los componentes fueron mezclados en una placa térmica con agitación (Arsa, Mexico), con velocidad media y un intervalo de temperatura de 40-45 °C durante 30 min. Independientemente se preparó una solución con la formulación (F) usando una base de 10 mL en la cual se mezclaron en diferentes proporciones Caseína ácida (CAS) de grado alimenticio

(Glanbia Ingredients Plc., Ballyragget, Co. Kilkenny, Irlanda), Glicerol (GLI), bacteriocina (BTN), (Weiri, Biotech Co., Shandong, China) y agua destilada. Para el caso de la CAS se usó una proporción de 25 y 50 % (p/v), para GLI se usó el mismo criterio 25 y 50 % (v/v), para las BTN se usó 0.5 % en peso para todos los tratamientos. Para completar la base de 10 mL se utilizó agua destilada. Después de la dispersión completa de ambas suspensiones SFP y F se mezclaron en un mismo recipiente hasta obtener una solución formadora de película con formulación SFPF que se homogeneizó con ayuda de una placa con agitación marca (Arsa, México) AR-311 a velocidad media y a temperatura ambiente por 10 min. Finalmente se obtuvo la mezcla SFPF la cual se vertió sobre placas de vidrio que se secaron en un horno de convección forzada (BINDER, Alemania), FD-53 a 35°C durante 24 h. Las biopelículas secas se despegaron cuidadosamente de las placas de vidrio al interior de una campana de flujo laminar (EMILAB, México), se almacenaron etiquetadas y de forma individual a temperatura ambiente en un desecador (Thermo Scientific, U.S.A.) con sílice.

4.2. Caracterización fisicoquímica de las biopelículas

Los reactivos empleados en las técnicas de caracterización fueron grado analítico. El grosor y el diámetro de las biopelículas se determinaron usando un vernier digital en cinco posiciones aleatorias.

Capacidad de solubilidad en agua (CSA), las biopelículas se pesaron hasta alcanzar 300 mg y fueron sumergidas en 10 mL de agua destilada a 25 °C por 24 h en un baño de agua con agitación periódica (Jeiotech, Daejeon, Corea) para asegurar el contacto uniforme con el agua. El contenido de masa inicial y masa final se obtuvo en una balanza analítica (ADAM, U.S.A.), después de secar las muestras a 80 °C por 24 h en un horno de convección forzada (BINDER, Alemania), FD-53 hasta obtener masa constante, el porcentaje de solubilidad en agua se determinó con la expresión (1).

$$\text{Solubilidad en agua (\%)} = \frac{\text{masa seca inicial} - \text{masa seca final}}{\text{masa seca inicial}} * 100 \quad (1)$$

Donde la masa seca inicial fue el peso de la muestra antes de sumergir en agua y la masa seca final, fue la masa de la muestra después del secado.

Estabilidad en soluciones alcalinas y ácidas: Se pesaron muestras de biopelículas (300 mg), para posteriormente sumergirlas en recipientes con una solución de 10 mL de HCl 0.01 mol L⁻¹ (estabilidad en solución ácida) y la misma cantidad de muestra en 10 mL de NaOH 0.01 mol L⁻¹ (estabilidad en solución básica). Para asegurar el valor de pH de la solución ácido-base, se ajustó a pH 4 y 9 respectivamente. Los recipientes con muestra de biopelículas en contacto con las soluciones ácido-base, se almacenaron en la oscuridad a temperatura ambiente. Los recipientes se agitaron periódica y ligeramente durante las 240 h. La estabilidad de las biopelículas se evaluó mediante la apariencia física además de hacer mediciones diarias de pH con un medidor de pH (Thermo Scientific, Orion Star A211, U.S.A.), se obtuvo una cinética de pH usando un blanco en cada experimento realizado.

Morfología. Se dividió en dos partes: microscopía óptica (MO) y microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés). Para cada técnica se utilizó una muestra de biopelícula de 1 x 1 cm aproximadamente, se utilizó un microscopio óptico invertido (Motic, Xiamen, China), con 3 objetivos (4x, 10x y 20x) respectivamente. Para la técnica de SEM, se utilizó un equipo marca Hitachi modelo SU8230 de emisión de campo y cátodo frío. Las condiciones utilizadas fueron modo SEM, voltaje de aceleración 1 kV y WD de 5 mm. El análisis se realizó en el Laboratorio Nacional de Caracterización de Materiales (LaNCaM) del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) de la Universidad Nacional Autónoma de México-Juriquilla, Queretaro.

4.3. Determinación de fenoles totales de biopelículas

Se utilizó 300 mg de muestra de biopelícula de 1 x 1 cm aproximadamente. La muestra se colocó en tubos de fondo cónico de 15 mL con 10 mL de etanol al 50 % v/v y agitación continua 50 rpm durante 24 h a temperatura ambiente. Se prepararon soluciones (FC) al 1 % v/v y (BS) al 7.5 % p/v. Después la muestra se retiró del tubo cónico y se trabajó en tubos limpios con 0.5 mL de sobrenadante (S) mezclado con 2.5 mL de Folin-Ciocalteu (FC) y 2 mL de (BS). Las muestras se incubaron en un baño con agitación 50 rpm y 40 °C por 30 min. Se prepararon curvas de calibración de Ácido Galico (AG) 1000-50 ppm (Anexo E) para cada muestra de tratamiento y sus repeticiones, se agregó 0.5 mL. Finalmente, se obtuvo la lectura el espectro de absorción de la muestra, a la máxima absorbancia (640 nm) con un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific®

GENESYS 10S, U.S.A.), el factor de correlación R^2 en la curva de calibración fue el parámetro de calidad en la medición. Los resultados se expresaron en mg de equivalente de EGCG/g de muestra, [\(Tessaro et al., 2021\)](#), [\(Najwa et al., 2020\)](#).

4.4. Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial 2^3 , los factores fueron: tipo de bacteriocina (nisina y natamicina), fracción en peso de caseína 25 y 50 % y fracción en volumen del plastificante 25 y 50 %, con cinco repeticiones por interacción (Anexo A). Los datos se analizaron empleando un análisis de varianza (ANDEVA), seguido de una prueba de Tukey (95 % de significancia), el software empleado fue SAS (Statistic Analysis System, versión 2004).

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. Preparación de biopelículas

La apariencia de estas se muestra en la Figura 2, se observa una transparencia diferente para cada formulación, la biopelícula control preparada únicamente con la mezcla de biopolímeros CAS-GRE y GLI (Figura 2A) diferente a las preparadas con BTN, nisina (Figura 2B) y natamicina (Figura 2C). Las formulaciones preparadas con nisina son transparentes con una tendencia al color amarillo, a diferencia de las preparadas con natamicina, ya que presentan un color blanquecino. Otra diferencia es la adherencia de la biopelícula preparada con nisina se observó en los límites de la circunferencia, limitando la facilidad de manipulación.

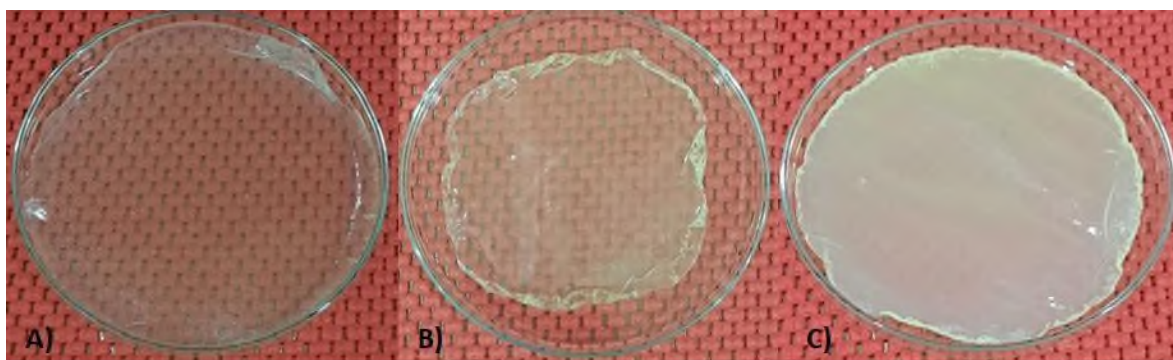


Figura 2. Biopelículas obtenidas, A) Control; B) con Nisina; C) con Natamicina.

Los resultados de la medición del diámetro y espesor de las biopelículas se encuentran concentrados en la Tabla 3. La apariencia general de estas biopelículas puede observarse en el Anexo B. Se obtuvieron valores muy variados en las dimensiones de las biopelículas, por una parte existe una similitud para los tratamientos de natamicina donde el intervalo es entre 89.30 mm y 94.11 mm, valores cercanos en comparación con las biopelículas de nisina que van desde 66.90 mm hasta 83.05 mm, se relaciona esta variación con las propiedades e interacción de sus componentes pues al desmoldar las biopelículas de nisina se observó mayor dificultad por la consistencia más adhesiva y humectada que presentaba. Con base en el análisis estadístico todas las biopelículas preparadas con natamicina NA2525, NA5050, NA2550 y NA5025 no muestran diferencia estadística ($P \leq 0.05$) en el diámetro.

Tabla 3. Diámetro y grosor de biopelículas de caseína/bacteriocinas

Tratamiento	Diámetro, (mm)	Espesor (mm)
Control	92.11 ^{de}	0.250 ^c
NA2525	94.04 ^{de}	0.165 ^a
NA2550	87.36 ^{cd}	0.225 ^{bc}
NA5025	86.44 ^{cd}	0.201 ^{ab}
NA5050	89.30 ^{de}	0.192 ^{ab}
NI2525	73.39 ^b	0.256 ^c
NI2550	82.99 ^c	0.255 ^c
NI5025	66.90 ^a	0.265 ^c
NI5050	83.05 ^c	0.312 ^d
EEM	2.315	0.018

abcde, Letras distintas en columna indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$). EEM: error estándar de la media.

En trabajos como el de [Pella et al., \(2020\)](#) aporta que las características como el espesor de la película y la longitud son difíciles de controlar en el método de *casting*, también [Enchundia et al., \(2016\)](#) al elaborar biopelículas a base de harina de cascara de plátano por el método de *casting* usando como molde cajas de Petri de 9 cm al igual que las utilizadas en este trabajo de investigación en cuanto al espesor, los valores obtenidos son mucho menores con un intervalo entre 0.11 mm a 0.17 mm, esta diferencia puede estar relacionada con el tipo de biopolímero ya que la grenetina conserva en su estructura más cantidad de agua mientras que las harinas tienden a resecarse y esto pudiera ocasionar un menor espesor.

Por otro lado, la biopelícula de mayor espesor fue NI5050 con 0.312 mm, mientras la de menor espesor fue NA2525 con 0.165 mm. El análisis estadístico demostró que el espesor es similar en las biopelículas preparadas con caseína y natamicina NA5050 y NA2550. El espesor de las biopelículas preparadas con caseína y nisina son estadísticamente entre sí (NI2550, y NI5050), el

espesor de estas biopelículas fue muy aproximado al de la biopelícula control mientras que NI2525 y NI5025 fueron estadísticamente diferentes alejándose del espesor del control.

La disminución en la incidencia de radiación electromagnética directa en alimentos ayuda a mantener la estabilidad del sistema alimentario esta característica fue observada en las biopelículas obtenidas; la opacidad y el grosor están relacionadas con el impedimento de la radiación directa, los tratamientos que muestran opacidad fueron diferenciables de las biopelículas control, aunque en este trabajo de investigación no se analizaron cuantitativamente estas características se asume que pueden tener un comportamiento complementario a la actividad antioxidante por la naturaleza química de las BTN que pueda ser comprobada en futuras investigaciones sobre alimentos específicos, también se entiende que esta opacidad está relacionada con la dispersión de las BTN en la SFP. Algunos trabajos como los de [Carvajal-Larenas et al., \(2021\)](#) proponen biopelículas de grenetina y concentrado de extractos de subproductos de mango como grasa, almidón, extractos fenólicos de este fruto junto con diferentes mezclas de gelatina de pescado, nano cristales, alcohol polivinilo, ciclodextrinas y proteína aislada de soja, a partir de estos subproductos y biopolímeros se obtuvieron biopelículas delgadas que a mayor concentración de β -caroteno como era de esperarse tuvieron un color amarillo más intenso, es decir la opacidad aumenta en relación con el aumento en la concentración de los extractos obtenidos. Por otra parte el trabajo de [Pandía-Estrada et al., \(2021\)](#) describió que en la formulación de biopelículas por el método de *casting* usando grenetina como principal biopolímero y aceite de orégano como agente activo antimicrobiano, se reportan biopelículas opacas a partir de un 5% de la formulación, en el caso de este trabajo de investigación sólo fue necesario 0.5% (p/v) para generar opacidad.

5.2. Caracterización fisicoquímica de biopelículas

Capacidad de solubilidad en agua

Propiedades como capacidad de absorción de agua, textura y capacidad de solubilidad en agua (CSA) son importantes en alimentos de origen animal. Estas propiedades afectan e influyen en la sensación en la boca, masticabilidad y rendimiento. Tanto la (CSA) como otras propiedades funcionales dependen del contenido de proteínas. Los resultados de la (CSA) en las biopelículas de caseína y bacteriocinas se muestran en la Tabla 4. En general se observa que la biopelícula

NA2525 tiene menor CSA 48.82 % en comparación con la biopelícula NA2550 con 67.57 % de capacidad. Esto indicó que la presencia de glicerol y caseína en la biopelícula puede afectar la (CSA).

Tabla 4. Capacidad de solubilidad en agua de biopelículas

Tratamiento	Solubilidad, %
Control	66.44 ^{de}
NA2525	48.82 ^a
NA2550	67.57 ^e
NA5025	59.04 ^{bcd}
NA5050	64.92 ^{de}
NI2525	56.07 ^{bc}
NI2550	65.66 ^{de}
NI5025	53.12 ^{ab}
NI5050	62.13 ^{cde}
EEM	2.75

abcde, Letras distintas en columna indican diferencia ($P \leq 0.05$). EEM: error estándar de la media.

Se observa que entre estas biopelículas (NA2525 y NA2550) existe diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$) y que el cambio de proporción de GLI en F cuando es preparada la biopelícula puede tener un efecto en esta variable. Se observó que, en todas las biopelículas con mayor proporción de glicerol, NI5050, NI2550, NA5050 y NA2550 la CSA aumentó progresivamente (62.13, 64.92, 65.66 y 67.57 % respectivamente). Además, estas biopelículas mostraron la misma CSA que la biopelícula control. En la matriz de la biopelícula las atracciones moleculares poliméricas pueden ser muy estables ocasionando rigidez, lo que significa biopelículas más quebradizas. La naturaleza química del glicerol es hidrofílica debido a sus grupos hidróxido (OH), al funcionar como plastificante se sitúa entre la red de polimerización, posterior al cambio de fase del disolvente, a través del secado el glicerol disminuye la interacción molecular de los polímeros por lo que aumenta la flexibilidad, entonces se entiende que la continuidad de la

película puede verse afectada por la interacción de puentes de hidrógeno del glicerol con el agua si la biopelícula es sumergida en un medio líquido, [Pellá M. et al. \(2020\)](#). Por lo tanto la fracción de plastificante de la F influye negativamente en términos de integridad. No se descarta que los altos valores de (CSA) de las biopelículas también estén relacionados con la disociación de las moléculas del agua destilada que interaccionan con los grupos funcionales de la red de polipéptidos por efecto de la hidrólisis de la caseína.

Los valores de solubilidad obtenidos fueron diferentes al porcentaje de CSA de otros trabajos; [Pellá M. et al. \(2020\)](#) reportaron valores entre 27% y 45% al evaluar biopelículas de almidón adicionadas con grenetina y caseína usando glicerol como plastificante al 30% de la masa total por el método de *casting*, además se observó que a mayor concentración de ambos polipéptidos presentó mayores valores de CSA teniendo en cuenta que 1.5 % p/v fue la proporción más alta para la formulación la proporción de caseína usada en F influye con el porcentaje CSA. Por otro lado [Khedri et al. \(2021\)](#) evaluó biopelículas a base de gelatina adicionadas con fosfopéptidos de caseína, obteniendo el menor valor de solubilidad para el tratamiento con 0.1 g de fosfopéptidos de caseína con 43% de CSA, valor cercano con los datos obtenidos en este trabajo (NA2525 48.82%).

[Escobar et al., \(2011\)](#) comparó dos métodos convencionales que fueron extrusión y *casting* para la obtención de películas comestibles a base de proteína de suero de leche y un agente conservador, el valor de solubilidad obtenido para el método de *casting* fue 59.5 % de CSA el cual fue superior con los resultados de esta investigación, también [Ochoa-Yepez et al., \(2019\)](#) al caracterizar biopelículas obtenidas de almidón de yuca adicionadas con proteína de lenteja comparando los métodos de *casting* y extrusión reportaron que los valores más altos de CSA fueron por el método de *casting* 30 %, comparado con otros métodos de formación de películas como la extrusión, valor inferior al tratamiento NA2525.

Estabilidad en soluciones ácidas y básicas

Es bien conocido que la estabilidad al pH se puede examinar como parte de un proceso de rendimiento para varias propiedades fisicoquímicas con el fin de obtener una visión general de un compuesto nuevo o que ha sido incorporado a un producto alimenticio. En ocasiones, el

monitoreo del pH se realiza tomando en cuenta la aplicación. Por ejemplo, algunos antibióticos se prueban a pH ácido 1-2 que indica la capacidad de resistir las condiciones en el estómago, pH entre 5-6 muestra la estabilidad en el intestino delgado, pH neutro capacidad para resistir condiciones ambientales o almacenamiento y ensayos a pH básico asegura que todos los casos estén cubiertos. Los resultados de la estabilidad a soluciones ácidas y básicas en las biopelículas preparadas con caseína y bacteriocinas se muestran en la Figura 3. En general, se observó que cuando las biopelículas se expusieron a una solución con pH ácido éste cambió a las 24 h de exposición hasta haber alcanzado un valor aproximadamente neutro.

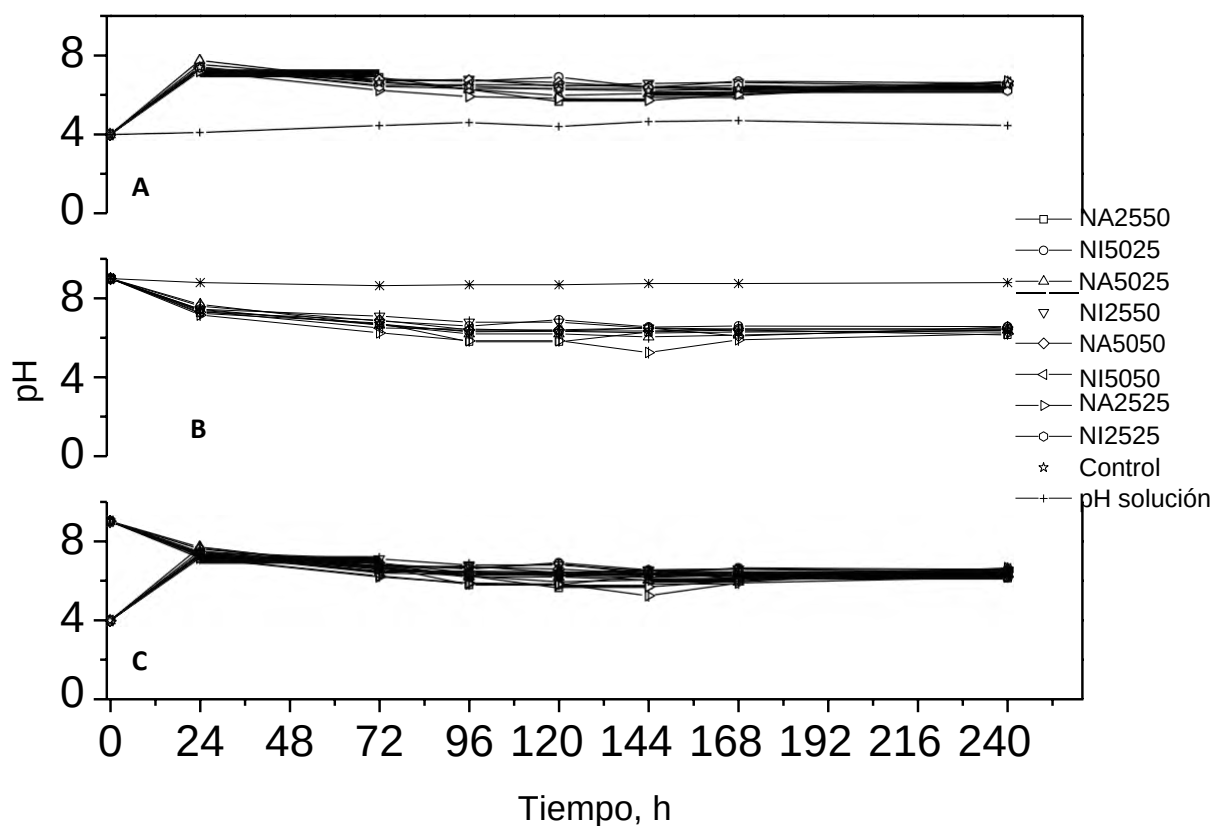


Figura 3. Cinética de pH de biopelículas, A) NaOH, en B) en HCl y C) comparación de ambas soluciones.

Se observó que cuando las biopelículas se exponen a pH básico el valor 9 cambia a 7.5 después de las 24 h de exposición. Ambos comportamientos se mantuvieron durante las 240 h de

exposición, este comportamiento pudo apreciarse cuando se abrió la escala de la ordenada, tal como se muestra en el Anexo C y Anexo D.

Por lo tanto, esta característica resistente a ambientes con pH acidificado o alcalinizado resulta interesante. El comportamiento amortiguador hacia un pH neutro observado puede estar relacionado con las propiedades anfóteras de los aminoácidos que contiene la caseína, al igual que la gelatina que deriva del colágeno, ambas proteínas de origen animal. Sin embargo, no se descarta la influencia de la actividad antioxidante de las bacteriocinas como donadores o aceptores de electrones, al interactuar con los iones provenientes de los reguladores de pH (HCl y NaOH), utilizados para la preparación de ambos medios. Los valores de pH obtenidos son similares a lo reportado por [Niño et al. \(2018\)](#); como resultado de la evaluación se notó un efecto amortiguador para medios acuosos en extremos de pH 2 (ácido) y 12 (básico), al caracterizar biopelículas fotoactivas con agentes antioxidantes naturales para el recubrimiento de carne (alimentos sensibles a la oxidación); con una duración de 21 días las mediciones finales reportadas para ambos medios fueron valores cercanos a pH 7. La integridad de las biopelículas en el medio ácido y básico no se registró, sin embargo, al observar el experimento se destaca que la desintegración no fue uniforme, probablemente por la diferencia entre tratamientos.

Morfología

Los resultados de la morfología de las biopelículas preparadas se muestran en las Figuras 4 y 5, se pudo observar que las biopelículas control presentan una apariencia heterogénea, con la formación de algunas estructuras cristalinas, los objetivos 4X y 10X permitieron visualizar mejor este tipo de estructuras, también se observaron grietas que aportaron un relieve irregular en la superficie de la película al utilizar el objetivo 20X se distinguieron con mayor detalle.

En cuanto a los tratamientos de biopelículas adicionadas con nisina para NI2525, NI5025 y NI5050 se observó una superficie heterogénea con estructuras amorfas similar al Control, mientras que en NI5025 se observó una superficie ausente de estructuras amorfas, la heterogeneidad de la superficie estuvo relacionada con la presencia de grietas marcadas capaces de distinguirse con todos los objetivos empleados. La presencia de cristales podría estar relacionada con una zona de aglomeración de caseína o incluso algún efecto de agregación de moléculas de GLI, fenómeno

analizado por [Xu y Gowen., \(2019\)](#). Por lo tanto, las proporciones de la formulación determinaron significativamente las propiedades microestructurales de la superficie de la biopelícula.

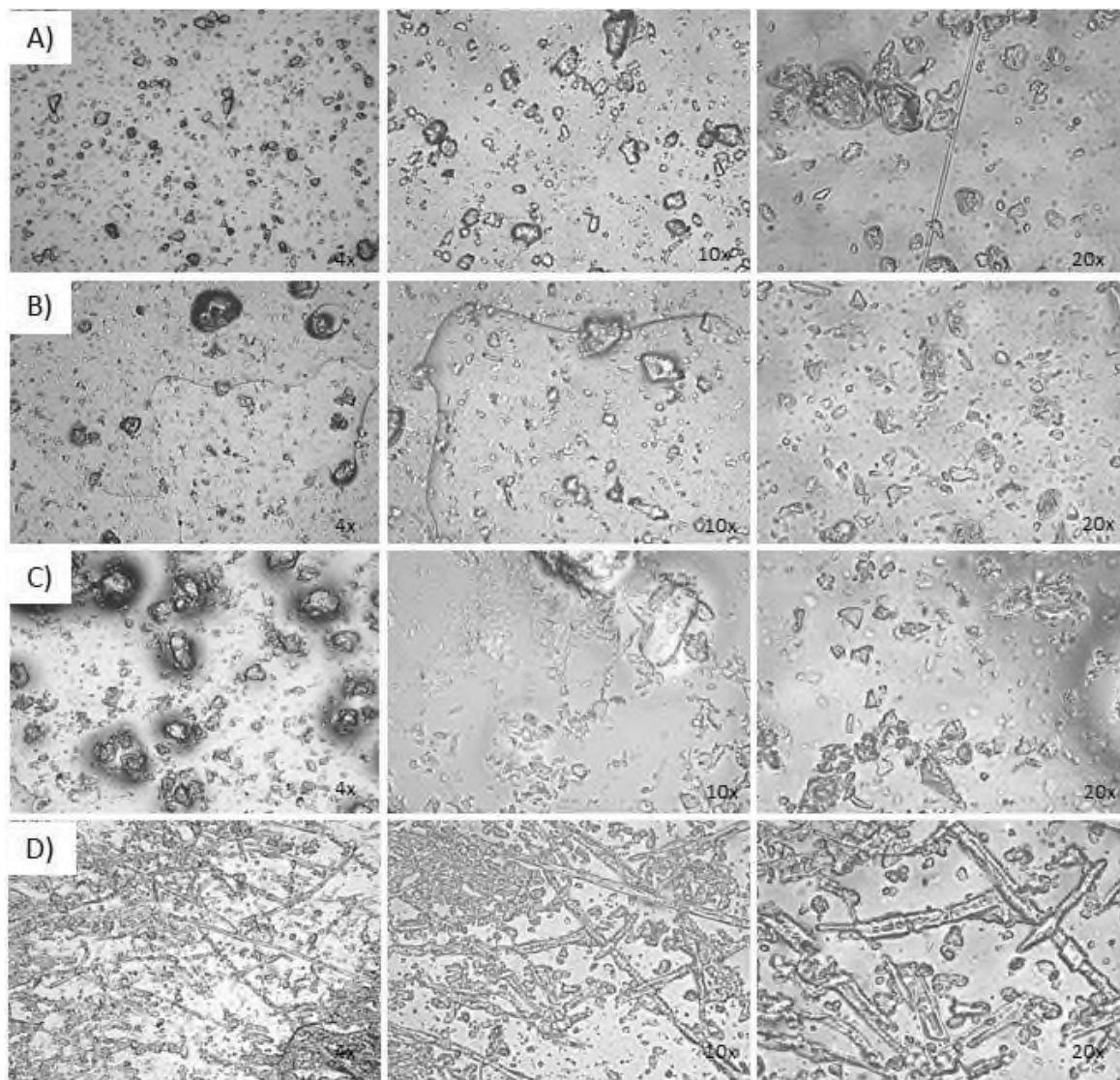


Figura 4. Microscopías de biopelículas de caseína y nisina, A) NI2525, B) NI5025, C) NI5050 y D) NI2550.

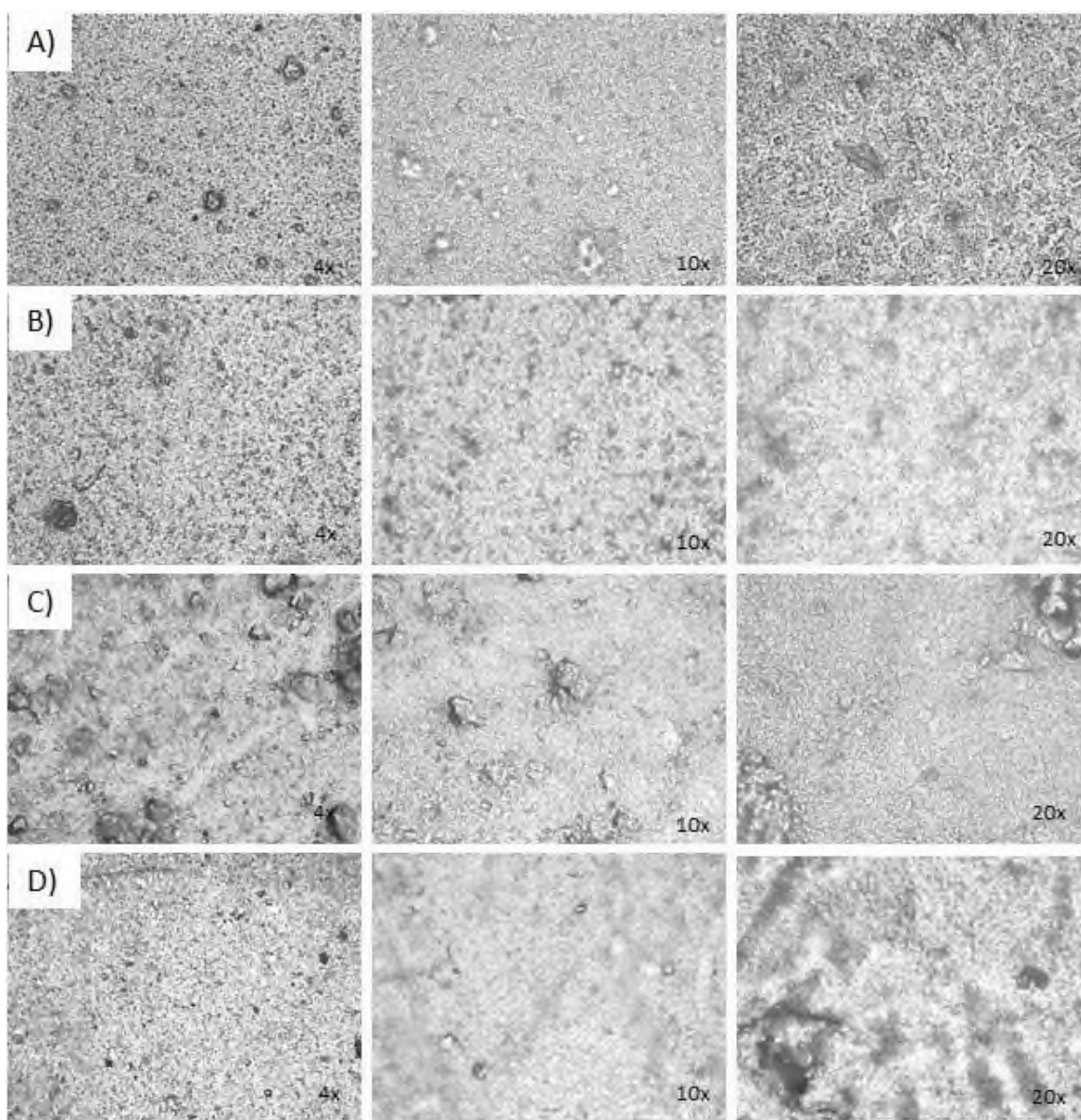


Figura 5. Microscopías de biopelículas de caseína y natamicina, A) NA2525, B) NA5025, C) NA5050 y D) NA2550.

Para los tratamientos NA252, NA5025, NA5050 y NA2550 se observó al microscopio un campo visual saturado de microestructuras amorfas lo que provocó una superficie irregular, en comparación con los tratamientos de NI. Aunque en menor proporción se pudo detectar agregados menos sobresalientes pero muy similares con las biopelículas con Nisina y el Control (sin bacteriocina).

Los resultados de las imágenes obtenidas por SEM se muestran en la Figura 6. Se observó que las biopelículas control tuvieron un aspecto semi-homogéneo y suave, aunque con la presencia de grietas profundas y largas con algunas grietas secundarias de menor tamaño. Esto pudo estar relacionado a las propiedades de los polipéptidos con capacidad formadora de película, así como gelificante de la caseína y la gelatina respectivamente sin ningún otro agente que intervenga entre sus redes de polimerización se obtiene una morfología menos homogéneo.

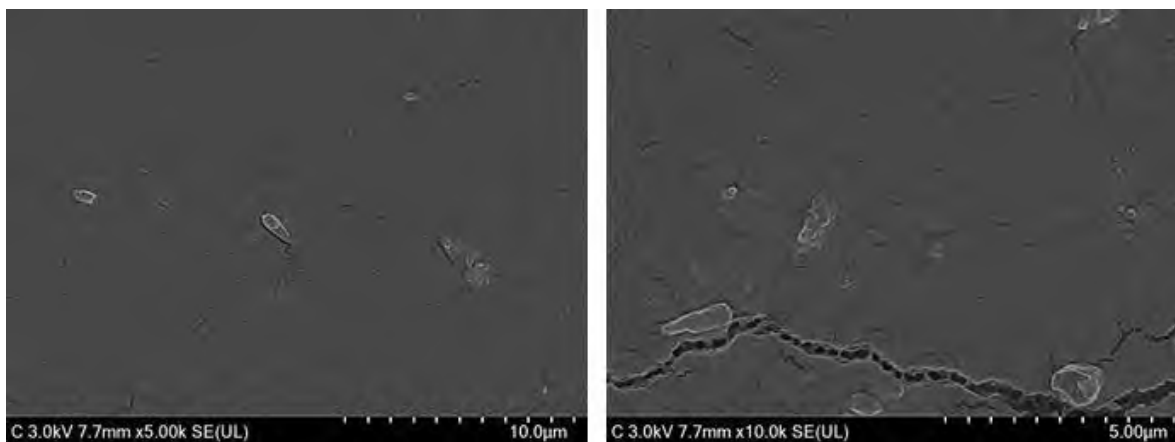


Figura 6. biopelícula control.

Los resultados de las imágenes obtenidas por SEM se muestran en la Figura 7. Se observó que la superficie difiere con el control, en la figura 7.A resaltó la formación de capas de fibras al azar como resultado de la reticulación de la solución coloidal SFP, fue notable una superficie con algunos agregados, sin embargo la presencia de poros o grietas aleatorias son mínimas, en la figura 7.C se pudo visualizar el entrecruzamiento de las fibras de polimerización en capas alternadas lo que permitió visualizar la altura de la biopelícula así como la integridad que pudiese

tiene algún efecto significativo en la solubilidad y estabilidad a distintos pH; en la figura 7.D se observó microestructuras esféricas que pudieron ser esferas de gelatina o microgotas.

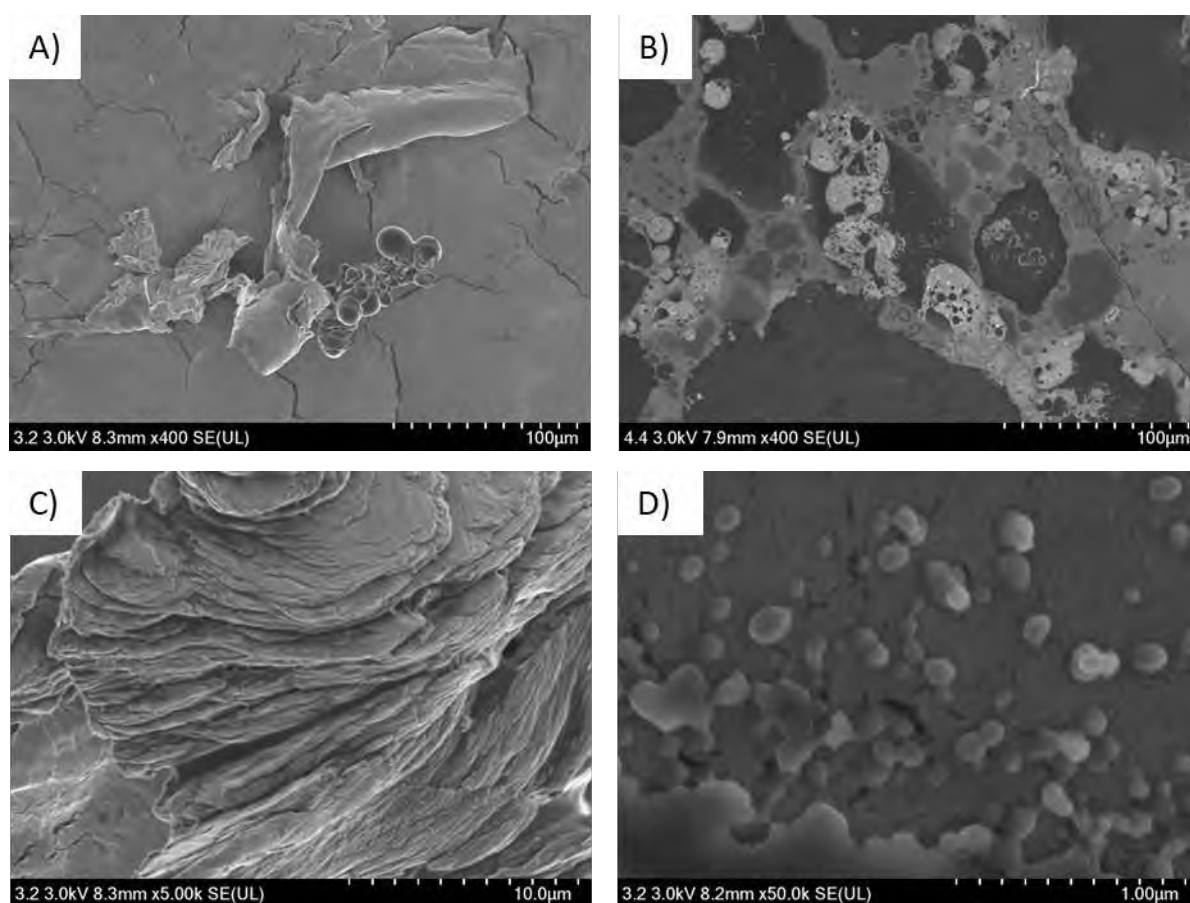


Figura 7. Imágenes obtenidas por SEM de biopelículas de caseína y nisina, A) NI2525, B) NI5025, C) NI5050 y D) NI2550.

Los resultados de las imágenes obtenidas por SEM se muestran en la Figura 8. Se observó que las biopelículas de Natamicina presentaron aspectos de superficies rugosas y superficies más lisas; NA2525 y NA5025 mostraron una superficie saturada de microestructuras de polimerización con aspecto de vellosidades de pertenecientes alguno de los polipéptidos presente en la formulación, fue interesante como existe una similitud entre ambos tratamientos tomando en cuenta que la

formulación fue completamente contraria, por otra parte NA5025 y NA2550 con una tendencia a fibras interconectadas de forma aleatoria con algunas grietas muy marcadas.

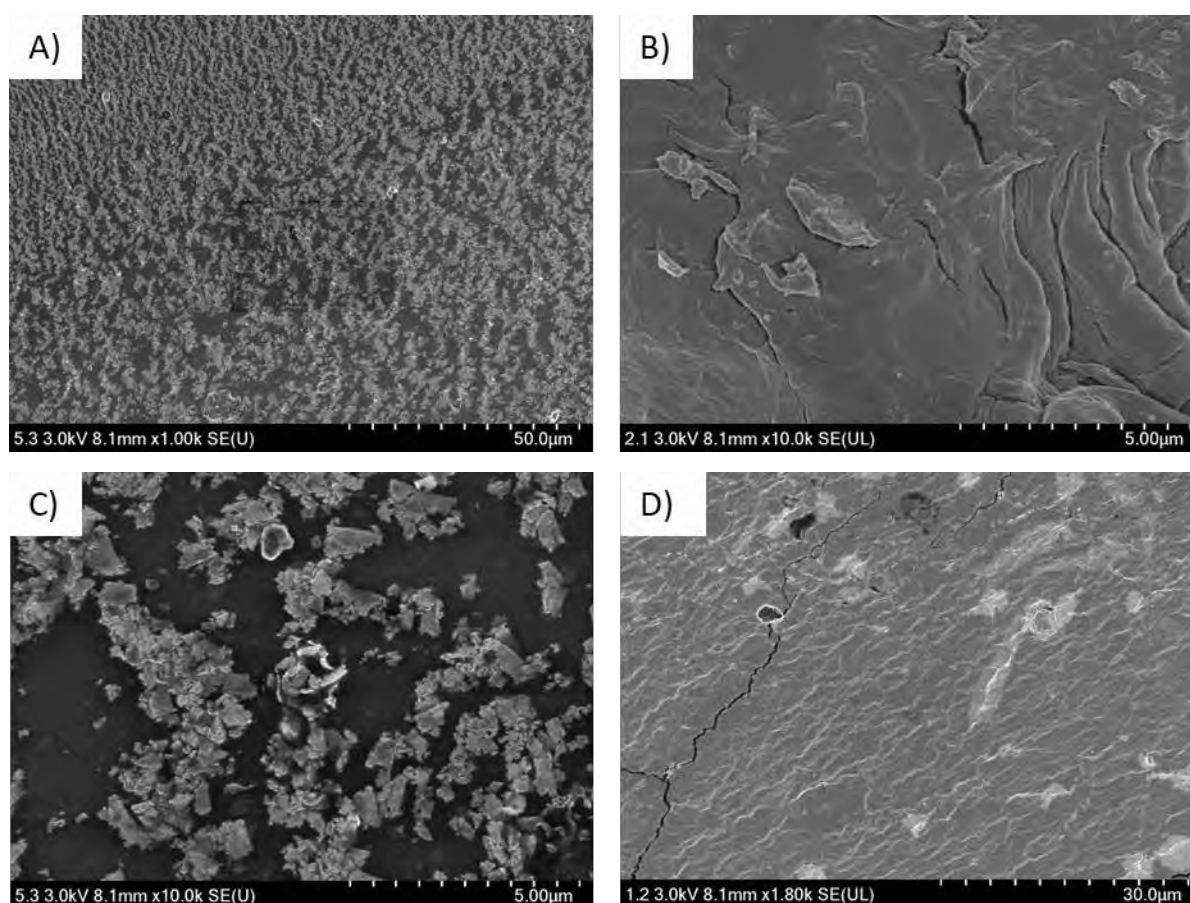


Figura 8. Imágenes obtenidas por SEM de biopelículas de caseína y natamicina, A) NA2525, B) NA5025, C) NA5050 y D) NA2550.

Para los todos los tratamientos sin importar la BTN (nisina o natamicina) se observaron diferencias significativas y claras con respecto al control al igual que otros trabajos similares de caracterización de biopelículas comestibles. Por ejemplo, [Arrieta et al., \(2011\)](#), usando caseinato de sodio, glicerol y carvacrol obtuvieron películas con un aspecto más transparente y homogéneas a simple vista, a través de SEM con un acercamiento 1000X usando una aceleración electrónica

de 10kV obtuvieron imágenes con una superficie de película homogénea para el control y solo con algunas grietas para los tratamientos, sin embargo a medida que la concentración de plastificante aumenta se hicieron más visibles y pronunciadas las grietas siendo 15% de glicerol la de menor proporción usada en la formulación y 35% la máxima. En comparación con el presente estudio el porcentaje de plastificante pareciera ser una influencia importante a nivel microestructural ya que se usó una proporción de 25 y 50 % sobre una formulación con base 10 ml de la (SF).

5.3. Determinación de fenoles totales en biopelículas

La capacidad antioxidante es un indicador de la respuesta de un sistema vivo o alimentos al estrés oxidativo, generalmente causado por especies reactivas con electrones desapareados. Además de la importancia como indicador los compuestos antioxidantes aportan diferentes propiedades a los alimentos. Como resultado del metabolismo secundario estas moléculas capaces de donar o aceptar electrones también son responsables de otras funciones metabólicas. Los fenoles derivados de benceno (anillo aromático) con un grupo (OH^-), especies químicas capaces de reducir agentes oxidantes y prevenir el daño a nivel molecular, por lo tanto, la determinación indirecta a través de una reacción química redox por medio de la concentración entre un agente oxidante y compuestos con actividad antioxidante como los compuestos fenólicos nos permite verificar la aplicación como sistema protector en alimentos.

En la Tabla 5 se observan valores para todos los tratamientos, cuando los resultados se analizaron por tipo de bacteriocina, se observó que las biopelículas preparadas con nisina, NI2525, NI2550 y NI5050 no mostraron diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$) en la concentración de galato por L de muestra analizada (216.87, 227.94, y 205.0 mg/L respectivamente). Además, se observó que solo NI5025 con un valor de 232.04 mg/L es ligeramente diferente al control (166.86 mg/L). Por otro lado, cuando se analizaron los resultados obtenidos en las biopelículas preparadas con natamicina, éstos fueron diferentes en los cuatro tratamientos mostrando una relación en la composición de galato/L de la siguiente forma: NA2550 < NA5050 $\leq$ NA5025 y NA2525 (148.49, 263.41, 314.37 y 330.13 respectivamente). Solo las biopelículas NA5025 y NA2525 son las que presentan una cantidad mayor de galato/L comparadas con la biopelícula control. La biopelícula

NA2550 (148.49 mg galato/L) mostró menor concentración de EG/L comparada a la película control (166.86 mg galato/L).

Este comportamiento también se observó cuando la composición de galato se analiza por g de biopelícula (Tabla 5), ya que la composición que se reportaron en este trabajo fueron de 6.60 y 6.29 mg EG/g de biopelícula.

Tabla 5. Contenido de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu.

Tratamiento	Equivalente Galato, mgEG/L	mg Equivalente de galato/g de biopelícula
Control	166.86 ^{ab}	3.34 ^{ab}
NA2525	330.13 ^e	6.60 ^e
NA2550	148.49 ^a	2.97 ^a
NA5025	314.37 ^{de}	6.29 ^{de}
NA5050	263.41 ^{cde}	5.27 ^{cde}
NI2525	216.87 ^{abc}	4.34 ^{abc}
NI2550	227.94 ^{abc}	4.56 ^{abc}
NI5025	232.04 ^{bcd}	4.64 ^{bcd}
NI5050	205.00 ^{abc}	4.10 ^{abc}
EEM	29.88	1.18

abcde, Letras distintas en columna indican diferencia ($P \leq 0.05$). EEM: error estándar de la media.

Con estos resultados es posible indicar a la caseína como la responsable de la variación de la composición de mgEG /L o g de biopelícula (NA2550 < NA5050) con base en el comportamiento de NA2525 y NA5025 se muestra el intervalo entre el valor mas bajo y mas alto de EG. La técnica para la identificación de fenoles totales (Folin-Ciocalteu) aplicada en este trabajo de investigación presentó una linealidad aceptable ($R^2=0.9946$) para las biopelículas preparadas con natamicina (Anexo E) y ($R^2=0.9954$) para las biopelículas preparadas con nisina (Anexo E) y es completamente recomendable para cuantificar compuestos fenólicos en leche y productos lácteos, [Velázquez et al., \(2015\)](#).

La leche puede contener antioxidantes endógenos (glutación peroxidasa, catalasas, superóxido dismutasa, lactoferrina y Coenzima Q10) y exógenos (vitaminas A, E y C) con actividad biológica importante: antiinflamatoria, inhibición de agregación plaquetaria, protección directa del ADN, promoción de apoptosis y funciones inmunológicas. Esta información permite pensar en la existencia de compuestos fenólicos en diversos fluidos (sangre, suero y plasma), tejidos, orina y lipoproteínas; por lo que la técnica de Folin-Ciocalteu ha permitido cuantificar los fenoles en este tipo de muestras mostrando detección, repetibilidad, reproducibilidad y un límite de detección aceptable ($R^2=0.9998$) en muestras de leche bovina, caprina, ovina y humana, [Velázquez et al., \(2015\)](#), el cual al ser comparada con el valor de detección reportado en este trabajo de investigación ($R^2=0.9954$) permite reconocer dicho método como un análisis de rutina.

VI. CONCLUSIONES

- El método empleado para la preparación de biopelículas de caseína permitió obtener evidencias cualitativas como la adherencia a la caja Petri (molde y soporte físico de la biopelícula), adherencia a la superficie del soporte de la biopelícula resultante.
- La SFP complementa a F de tal forma que, esta técnica de preparación (vaciado en placa o *casting*) permitió apreciar las diferencias en las características fisicoquímicas de las biopelículas.
- Se demostró que las variables medibles: espesor y diámetro fueron diferentes cuando se cambia el tipo de antimicrobiano en F y esta diferencia no se ve influenciada por el plastificante.
- Las biopelículas preparadas presentaron solubilidad en agua y este comportamiento se ve afectado por la presencia de caseína, plastificante y tipo de bacteriocina, ya que al compararse con el control solo NA2550, NA5050 y NI2550 no presentan diferencia. Estas concentraciones podrían omitirse en la toma de decisiones cuando se desea una biopelícula más o menos soluble.
- Se demostró que las biopelículas se comportan de la misma forma en solución ácida o básica después de las 24 h de exposición, es decir, amortigua el pH hasta llevarlo a la neutralidad. Se demostró que en el intervalo de pH 4-9 este comportamiento es constante hasta las 240 h de exposición. Una buena aproximación a la realidad permite visualizar que un alimento de naturaleza química semejante, conservado a temperatura ambiente y expuesto a este tipo de envolturas naturales y comestible mantendría el pH en la neutralidad.
- El estudio morfológico demostró superficies heterogéneas en todas las biopelículas preparadas, presencia de cápsulas con posible humedad, formas irregulares y posibles cristales de composición desconocida (biopelículas preparadas con natamicina) sin embargo, esta morfología es visiblemente diferente en las biopelículas preparadas con nisina, donde la superficie es menos rugosa, con presencia de relieve y zonas densas, lo que motiva a complementar la exploración de las características morfológicas.

- Los aspectos morfológicos de las biopelículas fueron parcialmente complementados con las microscopías de SEM donde se observa que la superficie de éstas son diferentes entre sí por la presencia de cristales. Es probable que la razón de estos cristales se deba a la caseína que no se logra solubilizar completamente en la mezcla preparada en F.
- La superficie de la biopelícula NA2550, con una composición de 25 % (peso/volumen) es aparente más homogénea que su biopelícula análoga.
- Se demostró que no existe diferencia en la composición de galato entre las biopelículas empleando nisina ya que la presencia de fenoles totales fue muy similar estadísticamente, por otra parte es evidente que cuando se emplea natamicina en la formulación existe una diferencia significativa entre los tratamientos NA y su proporción de mgEG. Para efecto práctico, si se desea optimizar la biopelícula y usarla como recubrimiento en un alimento de origen animal o vegetal la elección demuestra que la nisina es la mejor opción. Pero, si se desea potencializar o enriquecer la composición de antioxidantes en un alimento, entonces la elección sería un recubrimiento con natamicina soportado en biopelículas de caseína (NA2525, NA5025).
- La evidencia comprueba que la proporción de los componentes provoca diferencias en las propiedades fisicoquímicas tales como solubilidad en agua, estabilidad en soluciones ácidas/alcalinas y morfológicas, al igual que la presencia de fenoles totales entre el uso de un tipo específico de bacteriocina usadas para la formulación de biopelículas.

VII. PERSPECTIVAS

- Los requerimientos de materiales biodegradables con ingredientes bioactivos generan cada vez más interés en su estudio y aplicación como propuesta para obtener el mejor beneficio disminuyendo los efectos secundarios de acumulación de residuos y evitando el uso de aditivos artificiales.
- Este trabajo de investigación puede enriquecerse con análisis de distinta naturaleza como los que describen su comportamiento mecánico, naturaleza química y fenómenos ópticos.
- La estabilidad e inocuidad de los alimentos son factores determinantes para una alimentación aprovechable través de la ciencia y tecnología este trabajo busca implementar ingredientes bioactivos que sustituyan a los aditivos químicos.
- Aumentar el tiempo de exposición a soluciones ácidas y básicas podría aportar información interesante, así como incluir o sustituir ácidos y bases de origen orgánico con el fin de comparar si existe una diferencia significativa con los datos obtenidos de esta investigación.
- La comparación a través de distintas técnicas de microscopía ópticas para complementar los resultados obtenidos ya que la superficie no es homogénea, mapear y analizar la morfología de las microestructuras podrían ayudar a su eficiente aplicación o incluso a mejorar la formulación si es necesario.
- Complementar la determinación de fenoles totales a través de un análisis más sensible como HPLC, de tal manera que pudiera comprobarse de forma más exacta las propiedades antioxidantes de las biopelículas y de los ingredientes si fuera necesario para observar la influencia que existe entre esta propiedad y las bacteriocinas.
- Esta investigación se complementa horizontalmente con otro trabajo de investigación publicado por (Leyva, A., 2022) donde se analizó, contenido de humedad, análisis estructural IR-TF y actividad antimicrobiana.

VIII. REFERENCIAS

- Abarca-Vargas, R., & Petricevich, V. (2018). Importancia biológica de los compuestos fenólicos. *Inventio*, 14(34). <https://doi.org/10.30973/inventio/2018.14.34/4>
- Agudelo-Cuartas, C., Granda-Restrepo, D., Sobral, P. J. A., Hernández, H., & Castro, W. (2020). Characterization of whey protein-based films incorporated with natamycin and nanoemulsion of α -tocopherol. *Heliyon*, 6(4), e03809. DOI: [10.1016/j.heliyon.2020.e03809](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03809)
- Akhter, R., Masoodi, F. A., Wani, T. A., & Rather, S. A. (2019). Functional characterization of biopolymer based composite film: Incorporation of natural essential oils and antimicrobial agents. *International Journal of Biological Macromolecules*, 137, 1245–1255. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2019.06.214](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.214)
- Anchundia, K., Santacruz, S., & Coloma, J. (2016). Caracterización física DE películas comestibles a base DE cáscara DE plátano (*Musa paradisiaca*). *Revista Chilena de Nutricion: Organo Oficial de La Sociedad Chilena de Nutricion, Bromatologia y Toxicologia*, 43(4), 9–9. <https://doi.org/10.4067/s0717-75182016000400009>
- Arruda, H. S., Neri-Numa, I. A., Kido, L. A., Maróstica Júnior, M. R., & Pastore, G. M. (2020). Recent advances and possibilities for the use of plant phenolic compounds to manage ageing-related diseases. *Journal of Functional Foods*, 75(104203), 104203. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104203>
- Azmin, S. N. H. M., Hayat, N. A. B. M., & Nor, M. S. M. (2020). Development and characterization of food packaging bioplastic film from cocoa pod husk cellulose incorporated with sugarcane bagasse fibre. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 5(4), 248–255. DOI: [10.1016/j.jobab.2020.10.003](https://doi.org/10.1016/j.jobab.2020.10.003)
- Berardo, A., De Maere, H., Stavropoulou, D.A., Rysman, T., Leroy, F., & De Smet, S., (2016). Effect of sodium ascorbate and sodium nitrite on protein and lipid oxidation in dry fermented sausages. *Meat Sci.* 121, 359–364. doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.07.003.
- Bierhalz, A. C. K., da Silva, M. A., de Sousa, H. C., Braga, M. E. M., & Kieckbusch, T. G. (2013). Influence of natamycin loading methods on the physical characteristics of alginate active films. *The Journal of Supercritical Fluids*, 76, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.01.014>

- Billmeyer, F. W. (2020). *Ciencia de los polímeros*. Reverté. ISBN: 978-84-291-91-62-2
- Carina, D., Sharma, S., Jaiswal, A. K., & Jaiswal, S. (2021). Seaweeds polysaccharides in active food packaging: A review of recent progress. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 559–572. DOI: [10.1016/j.tifs.2021.02.022](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.022)
- Carvajal-Larenas, F. E., Sánchez-Montoya, A., Criollo-Criollo, G., Garcés-López, C., Martínez-Ochoa, N., Terán-Maldonado, P., Reyes-Jácome, C., & Andrade-Cruz, J. (2021). Biopolímeros de cáscaras de mango y su importancia en la soberanía alimentaria. *Avances En Ciencias e Ingeniería*, 13(1), 7. <https://doi.org/10.18272/aci.v13i1.1775>
- Codex Stan 192-(2019). Norma general para los aditivos alimentarios. <https://www.fao.org>
- Coreño-Alonso, Juan, & Méndez-Bautista, María Teresa. (2010). Relación estructura-propiedades de polímeros. *Educación química*, 21(4), 291-299. Recuperado en 17 de julio de 2022, http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-893X2010000400006
- Creus, E. G. (2004). Compuestos fenólicos. *Offarm*, 23(6), 80-84. ISSN: 0212-047X <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-compuestos-fenolicos-un-analisis-sus-13063508>
- Daba, G. M., & Elkhateeb, W. A. (2020). Bacteriocins of lactic acid bacteria as biotechnological tools in food and pharmaceuticals: Current applications and future prospects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28(101750), 101750. DOI: [10.1016/j.bcab.2020.101750](https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101750)
- Daniloski, D., Petkoska, A. T., Lee, N. A., Bekhit, A. E.-D., Carne, A., Vaskoska, R., & Vasiljevic, T. (2021). Active edible packaging based on milk proteins: A route to carry and deliver nutraceuticals. *Trends in Food Science & Technology*, 111, 688–705. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.024>
- Delves-Broughton, J. (2014). PRESERVATIVES. Permitted Preservatives: Natamycin. *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition), Academic Press, Pages 87-91. doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00269-X
- Delves-Broughton, J. (2014). BACTERIA. Nisin. *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition), Academic Press, Pages 187-193. doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00030-6
- dos Reis, R. C., Devilla, I. A., Oliveira, G. H. H., Côrrea, P. C., Ascheri, D. P. R., Souza, A. B. M., & Servulo, A. C. O. (2014). Mechanical properties, permeability and solubility of films composed

- of yam starch and glycerol. *Interciencia*, 39(6), 410–415. Disponible en <https://www.redalyc.org/comocitar.oa?id=33931213009>
- Durango, A. M., Soares, N. D. E. F., & Arteaga, M. R. (2011). FILMES Y REVESTIMIENTOS COMESTIBLES COMO EMPAQUES ACTIVOS BIODEGRADABLES EN LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 9(1), 112–118. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612011000100014
- Estévez M. y Lorenzo J.M. (2019). Impact of Antioxidants on Oxidized Proteins and Lipids in Processed Meat, *Encyclopedia of Food Chemistry*, Academic Press, Pages 600-608. doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21501-1
- Estévez, M., Luna, C., 2017. Dietary protein oxidation: a silent threat to human health? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57, 3781–3793. [doi: 10.1080 / 10408398.2016.1165182](https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1165182)
- Farahnaky, A., Saberi, B., & Majzoobi, M. (2013). Effect of glycerol on physical and mechanical properties of wheat starch edible films: Glycerol on properties of wheat starch films. *Journal of Texture Studies*, 44(3), 176–186. DOI: [10.1111/jtxs.12007](https://doi.org/10.1111/jtxs.12007)
- Gálvez, A., López, R. L., Pulido, R. P., & Burgos, M. J. G. (2014). Natural Antimicrobials for Food Biopreservation. In *Food Biopreservation* (pp. 3–14). Springer New York. DOI: [10.1007/978-1-4939-2029-7_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2029-7_2)
- Gao, W., Liu, P., Li, X., Qiu, L., Hou, H., & Cui, B. (2019). The co-plasticization effects of glycerol and small molecular sugars on starch-based nanocomposite films prepared by extrusion blowing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 133, 1175–1181. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2019.04.193](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.193)
- García-García R. y Searle S.S. (2016). Preservatives: Food Use. *Encyclopedia of Food and Health*, Academic Press, Pages 505-509. doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00568-7
- Granda-Restrepo, D., Medina-Pineda, Y., Culebras-Rubio, M., & Gómez-Clari, C. (2014). Desarrollo y caracterización de una película activa biodegradable con antioxidantes (alfa-tocoferol) a partir de las proteínas del lactosuero. *Revista Vitae*, 21(1), 11–19. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169831207002>
- Gregorí Valdés, B. S. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista cubana de farmacia*, 39(2), 1–1. [ISSN 1561-2988](https://doi.org/10.1561-2988)

- Grujic, R., Vukic, M., & Gojkovic, V. (2017). Application of biopolymers in the food industry. In *Advances in Applications of Industrial Biomaterials* (pp. 103–119). Springer International Publishing. DOI: [10.1007/978-3-319-62767-0_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-62767-0_6)
- Hadidi, M., Orellana-Palacios, J. C., Aghababaei, F., Gonzalez-Serrano, D. J., Moreno, A., & Lorenzo, J. M. (2022). Plant by-product antioxidants: Control of protein-lipid oxidation in meat and meat products. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]*, 169(114003), 114003. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114003>
- Holcapkova, P., Hurajova, A., Bazant, P., Pummerova, M., & Sedlarik, V. (2018). Thermal stability of bacteriocin nisin in polylactide-based films. *Polymer Degradation and Stability*, 158, 31–39 DOI: [10.1016/j.polymdegradstab.2018.10.019](https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2018.10.019)
- Hols, P., Ledesma-García, L., Gabant, P., & Mignolet, J. (2019). Mobilization of Microbiota commensals and their bacteriocins for therapeutics. *Trends in Microbiology*, 27(8), 690–702. DOI: [10.1016/j.tim.2019.03.007](https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.03.007)
- Ivanič, F., Jochec-Mošková, D., Janigová, I., & Chodák, I. (2017). Physical properties of starch plasticized by a mixture of plasticizers. *European Polymer Journal*, 93, 843–849. DOI: [10.1016/j.eurpolymj.2017.04.006](https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.04.006)
- Jamshidian, M., Tehrany, E. A., Imran, M., Akhtar, M. J., Cleymand, F., & Desobry, S. (2012). Structural, mechanical and barrier properties of active PLA–antioxidant films. *Journal of Food Engineering*, 110(3), 380–389. DOI: [1016/j.jfoodeng.2011.12.034](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.12.034)
- Khedri, S., Sadeghi, E., Rouhi, M., Delshadian, Z., Mortazavian, A. M., de Toledo Guimarães, J., Fallah, M., & Mohammadi, R. (2021). Bioactive edible films: Development and characterization of gelatin edible films incorporated with casein phosphopeptides. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]*, 138(110649), 110649. DOI: [10.1016/j.lwt.2020.110649](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110649)
- Kumar, N., & Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports (Amsterdam, Netherlands)*, 24(e00370), e00370. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>

- Kumariya, R., Garsa, A. K., Rajput, Y. S., Sood, S. K., Akhtar, N., & Patel, S. (2019). Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 128, 171–177; DOI: [10.1016/j.micpath.2019.01.002](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.002)
- Lantano, C., Alfieri, I., Cavazza, A., Corradini, C., Lorenzi, A., Zucchetto, N., & Montenero, A. (2014). Natamycin based sol-gel antimicrobial coatings on polylactic acid films for food packaging. *Food Chemistry*, 165, 342–347. DOI: [10.1016/j.foodchem.2014.05.066](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.066)
- Leon, D., & Cárdenas, C. (2020). Latinoamérica y el Caribe: Riqueza natural y degradación ambiental en siglo XXI. *Covid19/ Serie De Documentos De Política Pública Pnud*, 14, 1-35. <https://www.undp.org/sites/g/files/zskgke326/files/migration/latinamerica/undp-rblac-CD19-PDS-Number14B.pdf>
- Lim, W. S., Ock, S. Y., Park, G. D., Lee, I. W., Lee, M. H., & Park, H. J. (2020). Heat-sealing property of cassava starch film plasticized with glycerol and sorbitol. *Food Packaging and Shelf Life*, 26(100556), 100556. DOI: [10.1016/j.fpsl.2020.100556](https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100556)
- Liu, H., Adhikari, R., Guo, Q., & Adhikari, B. (2013). Preparation and characterization of glycerol plasticized (high-amylose) starch–chitosan films. *Journal of Food Engineering*, 116(2), 588–597. DOI: [10.1016/j.jfoodeng.2012.12.037](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.12.037)
- López M., J. E., Ochoa Z., A., Loeza L., P. D., Santoyo P., G., Medina M., E., Martínez T., M., & Anaya L., J. L. (2008). Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 39(3), 49–57. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57911110007>
- Lukic, I., Vulic, J., & Ivanovic, J. (2020). Antioxidant activity of PLA/PCL films loaded with thymol and/or carvacrol using scCO₂ for active food packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 26(100578), 100578. DOI: [10.1016/j.fpsl.2020.100578](https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100578)
- Manikandan, N. A., Pakshirajan, K., & Pugazhenth, G. (2020). Preparation and characterization of environmentally safe and highly biodegradable microbial polyhydroxybutyrate (PHB) based graphene nanocomposites for potential food packaging applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 154, 866–877. ISBN: [9789251082355](https://doi.org/9789251082355)

- Małaczewska Joanna, Kaczorek-Łukowska, Edyta. (2021). Nisin A lantibiotic with immunomodulatory properties: A review. *Peptides*, Volume 137, 170479. doi.org/10.1016/j.peptides.2020.170479
- Mondragón Preciado, G., EscalanteMinakata, P., Osuna Castro, J. A., Ibarra Junquera, V., Morlett Chávez, J. A., Aguilar González, C. N., & Rodríguez Herrera, R. (2013). Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia*, 21(59), 64–70. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67430113008>
- Montalbán-López, M., Sánchez-Hidalgo, M., Cebrián, R., & Maqueda, M. (2012). Discovering the bacterial circular proteins: bacteriocins, cyanobactins, and pilins. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(32), 27007–27013. DOI: [10.1074/jbc.R112.354688](https://doi.org/10.1074/jbc.R112.354688)
- National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID753, Glycerol. Retrieved October 20, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/753#section=2D-Structure>
- Negm, N. A., Kana, M. T. H. A., Abubshait, S. A., & Betiha, M. A. (2020). Effectuality of chitosan biopolymer and its derivatives during antioxidant applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 1342–1369. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2020.07.197](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.197)
- Nešić, A., Cabrera-Barjas, G., Dimitrijević-Branković, S., Davidović, S., Radovanović, N., & Delattre, C. (2019). Prospect of polysaccharide-based materials as advanced food packaging. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(1), 135. DOI: [10.3390/molecules25010135](https://doi.org/10.3390/molecules25010135)
- O'Connor, P. M., Kuniyoshi, T. M., Oliveira, R. P., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2020). Antimicrobials for food and feed; a bacteriocin perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, 61, 160–167. DOI: [10.1016/j.copbio.2019.12.023](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.023)
- Pandia-Estrada, S., Romero-Santivañez, R., Céspedes-Chombo, R., & Solari-Godiño, A. (2021). Edible films gelatin-based obtained from mahi-mahi skin (*Coryphaena hippurus*) and oregano extract: Physicochemical, antimicrobial, structural and surface characteristics. *Scientia Agropecuaria*, 12(2), 229–237. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.026>
- Pedrosa Silva Clerici, M. T., Sampaio, U. M., & Schmiele, M. (2019). Identification and analysis of starch. In *Starches for Food Application* (pp. 23–69). Elsevier. DOI: [10.1016/b978-0-12-809440-2.00002-2](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809440-2.00002-2)

- Pellá, M. C. G., Silva, O. A., Pellá, M. G., Beneton, A. G., Caetano, J., Simões, M. R., & Dragunski, D. C. (2020). Effect of gelatin and casein additions on starch edible biodegradable films for fruit surface coating. *Food Chemistry*, 309(125764), 125764. DOI: [10.1016/j.foodchem.2019.125764](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125764)
- Pérez-Vergara, L. D., Cifuentes, M. T., Franco, A. P., Pérez-Cervera, C. E., & Andrade-Pizarro, R. D. (2020). Development and characterization of edible films based on native cassava starch, beeswax, and propolis. *NFS Journal*, 21, 39–49. DOI: [10.1016/j.nfs.2020.09.002](https://doi.org/10.1016/j.nfs.2020.09.002)
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Iordache, F., Stanca, L., Predoi, G., & Serban, A. I. (2021). Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 209(112891), 112891. DOI: [10.1016/j.ejmech.2020.112891](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112891)
- Qureshi, D., Nayak, S. K., Anis, A., Ray, S. S., Kim, D., Hanh Nguyen, T. T., & Pal, K. (2020). Introduction of biopolymers. In *Biopolymer-Based Formulations* (pp. 1–45). Elsevier. DOI: [10.1016/b978-0-12-816897-4.00001-1](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816897-4.00001-1)
- Rather, J. A., Akhter, N., Ashraf, Q. S., Mir, S. A., Makroo, H. A., Majid, D., Barba, F. J., Khaneghah, A. M., & Dar, B. N. (2022). A comprehensive review on gelatin: Understanding impact of the sources, extraction methods, and modifications on potential packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*, 34(100945), 100945. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100945>
- Rehm, B. H. A. (2010). Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(8), 578–592 DOI: [10.1038/nrmicro2354](https://doi.org/10.1038/nrmicro2354)
- Resa, C. P. O., Jagus, R. J., & Gerschenson, L. N. (2014). Effect of natamycin, nisin and glycerol on the physicochemical properties, roughness and hydrophobicity of tapioca starch edible films. *Materials Science and Engineering: C*, 40, 281-287. <https://bit.ly/3a00O61>
- Rivas, M., & Ornela, G. Impacto de la contaminación por plásticos en la biodiversidad y patrimonio biocultural de México. *Heinrich Böll Stiftung (ING, México)*. <https://mx.boell.org/es/2021/03/10/impacto-de-la-contaminacion-porplasticos-en-la-biodiversidad-y-patrimonio-biocultural> (Activo Febrero de 2022)
- Rivera-Toledo, E., Jiménez-Delgadillo, A. U., & Manzano-Gayosso, P. (2020). Antifúngicos poliénicos. Mecanismo de acción y aplicaciones. *Revista de la Facultad de Medicina*,

Universidad Nacional Autónoma de México, 63(2), 7–17. DOI: [10.22201/fm.24484865e.2020.63.2.02](https://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2020.63.2.02)

- Sarode A.R., Sawale P.D., Khedkar C.D., Kalyankar S.D., Pawshe, R.D. (2016). Casein and Caseinate: Methods of Manufacture. Encyclopedia of Food and Health, Academic Press, Pages 676-682. doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00122-7
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757–781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
- Siddeeg, A., AlKehayez, N. M., Abu-Hiamed, H. A., Al-Sanea, E. A., & Al-Farga, A. M. (2021). Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources: An overview. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(3), 1633–1644. DOI: [10.1016/j.sjbs.2020.11.064](https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.064)
- Smith, J. L., & Fratamico, P. M. (2018). Emerging and re-emerging foodborne pathogens. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(12), 737–757. DOI: [10.1089/fpd.2018.2493](https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2493)
- Snell, K. D., Singh, V., & Brumbley, S. M. (2015). Production of novel biopolymers in plants: recent technological advances and future prospects. *Current Opinion in Biotechnology*, 32, 68–75. DOI: [10.1016/j.copbio.2014.11.005](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.11.005)
- Southward, C.R. (2002). MILK PROTEINS. Caseins, Industrial Production and Compositional Standards. Encyclopedia of Dairy Sciences. Elsevier, (Pages 1915-1924). doi.org/10.1016/B0-12-227235-8/00731-8
- Surekha M. y Reddy S.M., (2014). PRESERVATIVES. Classification and Properties. Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), Academic Press, Pages 69-75, doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00257-3
- Sun, X., Wang, J., Dong, M., Zhang, H., Li, L. y Wang, L. (2022). Deterioro de alimentos, películas de conservación de alimentos bioactivos y recubrimientos comestibles funcionales: estado de investigación, problemas existentes y tendencia de desarrollo. *Tendencias en ciencia y tecnología de los alimentos*, 119, 122–132. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.004>
- Tkaczewska, J. (2020). Péptidos e hidrolizados de proteínas como conservantes de alimentos y componentes bioactivos de películas y recubrimientos comestibles: una revisión. *Tendencias en ciencia y tecnología de los alimentos*, 106, 298–311. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.10.022>

- Valdés G., & Susana. B. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista cubana de farmacia*, 39(2), 1–1. Recuperado: <https://bit.ly/3yC8aX7>
- Varma, K., & Gopi, S. (2021). Biopolymers and their role in medicinal and pharmaceutical applications. In *Biopolymers and their Industrial Applications* (pp. 175–191). Elsevier. DOI: [10.1016/b978-0-12-819240-5.00007-9](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819240-5.00007-9)
- Velasco, R., Enriquez, M., Torres, A., Palacios, L., & Ruales, J. (2012). Caracterización morfológica de películas biodegradables a partir de almidón modificado de yuca, agente antimicrobiano y plastificante. *Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 10(2), 152–159. Recuperado: <https://bit.ly/3nqfChs>
- Velázquez-Vázquez, C, Villa-Rojas, M.G, Álvarez-Ramírez. C., Chávez-Servín, J.L., García-Gasca T., Ferriz-Martínez R.A., García O.P., Rosado J.L., López-Sabater C.M., Castellone A.I., Andrade-Motemayor H.M., de la Torre-Carbot K., (2015). Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin-Ciocalteu method. *Food Chemistry* 176; 480–486. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.03.010>
- Verma, M. L., Kumar, S., Jeslin, J., & Dubey, N. K. (2020). Microbial production of biopolymers with potential biotechnological applications. In *Biopolymer-Based Formulations*. (105–137). Elsevier. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816897-4.00005-9>
- Wade, L. (2011). *Química orgánica* (7a ed.). Pearson Education. ISBN: 9786073207935
- Wankhade, V. (2020). Animal-derived biopolymers in food and biomedical technology. In *Biopolymer-Based Formulations* (pp. 139–152). Elsevier. DOI: [10.1016/b978-0-12-816897-4.00006-0](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816897-4.00006-0)
- Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Duan, Y., & Ma, H. (2020). Plant protein-derived antioxidant peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application in food systems: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 308–322. DOI: [10.1016/j.tifs.2020.09.019](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.019)
- Yusuf, M. (2018). Natural antimicrobial agents for food biopreservation. *Food Packaging and Preservation* (pp. 409–438). Elsevier. [10.1016/b978-0-12-811516-9.00012-9](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811516-9.00012-9)
- Zeng, X., Miao, W., Zeng, H., Zhao, K., Zhou, Y., Zhang, J., Zhao, Q., Tursun, D., Xu, D., & Li, F. (2019). Production of natamycin by *Streptomyces gilvosporeus* Z28 through solid-state fermentation using agro-industrial residues. *Bioresource Technology*, 273, 377–385. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.009>

Zhao, L., Liu, Y., Zhao, L., & Wang, Y. (2022). Anthocyanin-based pH-sensitive smart packaging films for monitoring food freshness. *Journal of Agriculture and Food Research*, 9(100340), 100340. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100340>

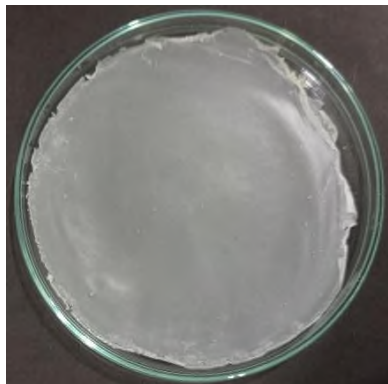
IX. ANEXOS

Anexo A. Diseño experimental con arreglo factorial 2^3 de diferentes formulaciones para la preparación de biopelículas.

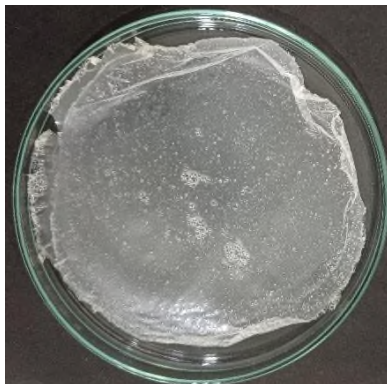
Factores			Código
Bacteriocinas	Caseína	Glicerol	
Natamicina	25	25	NA2525
Natamicina	25	50	NA2550
Natamicina	50	25	NA5025
Natamicina	50	50	NA5050
Nisina	25	25	NI2525
Nisina	25	50	NI2550
Nisina	50	25	NI5025
Nisina	50	50	NI5050

*Tratamientos a los que se les añadió agua destilada (csp) para completar el 10 % p/v. El 25 y 50 % p/v o v/v corresponden a 2.5 y 5 g/mL o mL/mL, la bacteriocina es 2.5 % p/v (0.25 g/mL).

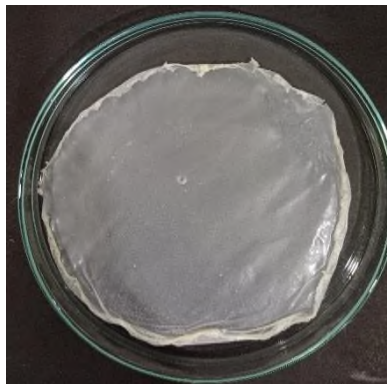
Anexo B. Biopelículas preparadas con natamicina y nisina.



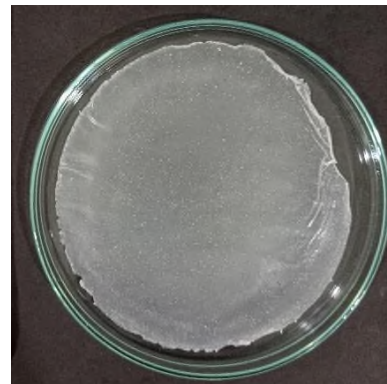
NA2525



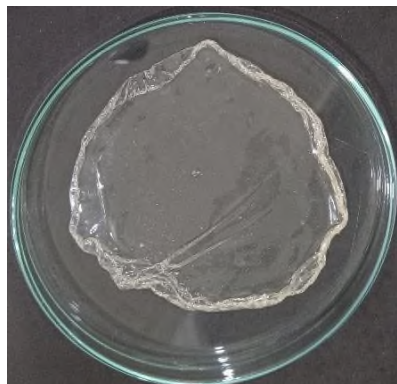
NA2550



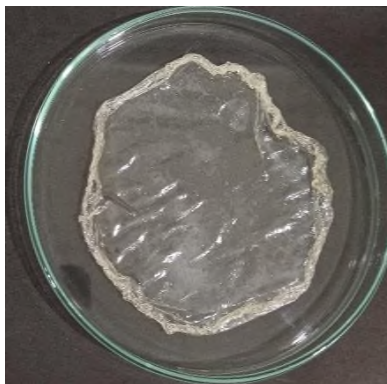
NA5025



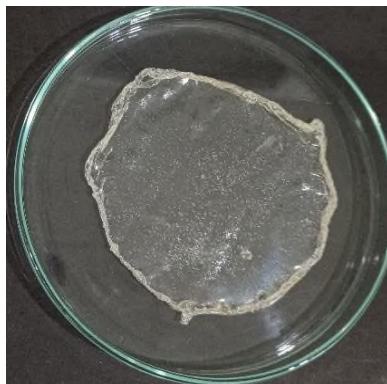
NA5050



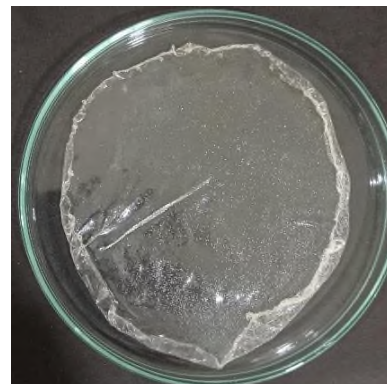
NI2525



NI2550

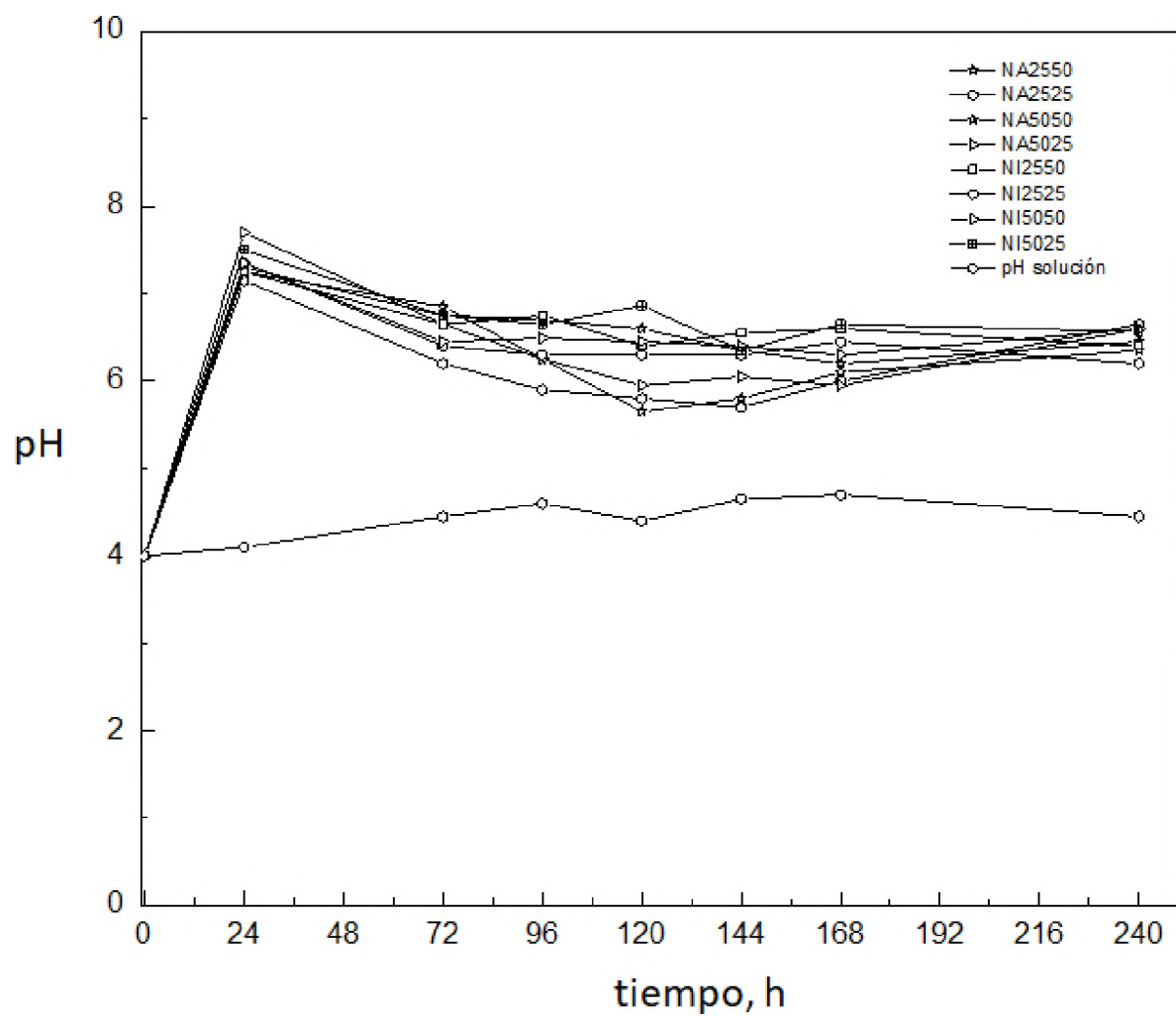


NI5025

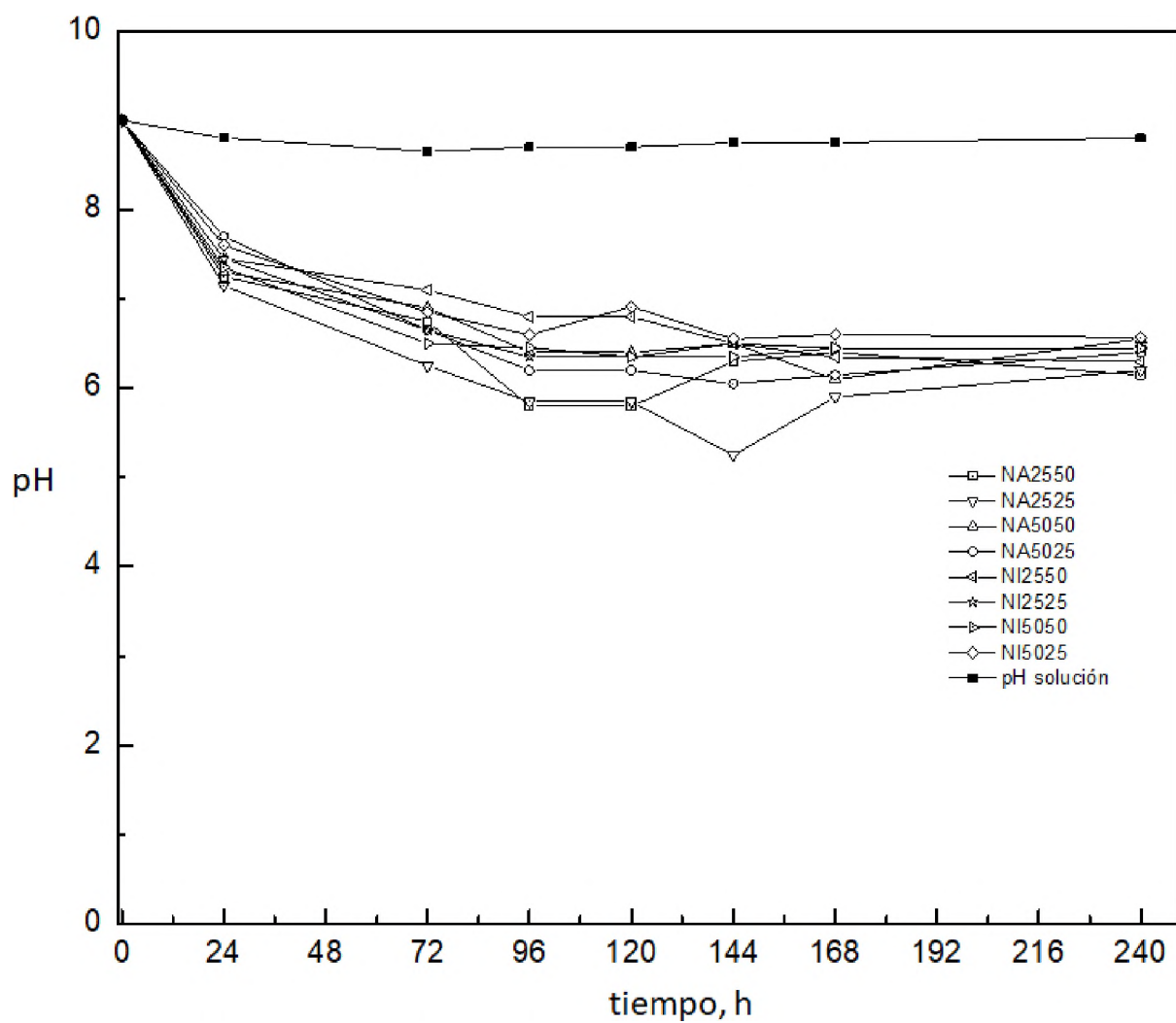


NI5050

Anexo C. Cinética de pH de biopelículas en contacto con solución ácida.



Anexo D. Cinética de pH de biopelículas en contacto con solución básica.



Anexo E. Curvas de calibración: A), B), C) y D) Biopelículas con natamicina, E), F), G), H) Biopelículas con nisina. Eje x: ppm galato, eje y: absorbancia 640 nm.

