

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIA DE ALIMENTOS**



**“DESARROLLO DE BIOPELÍCULAS ACTIVAS CON ACEITE
ESENCIAL DE CITRAL MICROENCAPSULADO Y SU EFECTO EN
LA CARGA MICROBIANA DEL QUESO FRESCO”**

Presentada por:

IVES JULIAN YOPLAC TAFUR

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
DOCTORIS PHILOSOPHIAE EN CIENCIA DE ALIMENTOS**

Lima – Perú

2019

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIA DE ALIMENTOS

**“DESARROLLO DE BIOPELÍCULAS ACTIVAS CON ACEITE
ESENCIAL DE CITRAL MICROENCAPSULADO Y SU EFECTO EN
LA CARGA MICROBIANA DEL QUESO FRESCO”**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR

Doctoris Philosophiae

Presentada por:

IVES JULIAN YOPLAC TAFUR

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Dra. Rosana Chirinos Gallardo
PRESIDENTE

Ph.D. Luis Fernando Vargas Delgado
ASESOR

Ph.D. Patricia Glorio Paulet
MIEMBRO

Dra. Carmen Velezmoro Sánchez
MIEMBRO

Dr. Fausto Humberto Cisneros Zevallos
MIEMBRO EXTERNO

A mi esposa Yesica

A mi hijo Jeremy Jhamil

AGRADECIMIENTOS

La realización de estudios doctorales ha sido una experiencia positiva en mi desarrollo profesional, que me ha permitido ampliar mis redes personales y profesionales. Es imposible dar valor al cariño y comprensión de todas las personas que me apoyaron en esta etapa, las cuales siempre tendrán un lugar en mis recuerdos y agradecimientos.

En primer lugar agradezco a Dios.

Al programa doctoral de Ciencia de Alimentos y al programa de Becas de Doctorado del Ministerio de Educación (MINEDU) administrado por Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT) por el financiamiento de mis estudios bajo el convenio de subvención 179-2015-FONDECYT.

Mi más sincero agradecimiento a mi asesor de Tesis, el Ph.D. Luis Fernando Vargas Delgado, por su dirección y sabios consejos durante los estudios y ejecución de la presente Tesis.

A la Dra. Paz Robert Canales, docente de la Universidad de Chile, por su asesoramiento y haber brindado las facilidades para la realización de una pasantía en los laboratorios a su cargo, en la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de Chile, donde se ejecutó la primera parte de la tesis.

Al Dr. Wilson Manuel Castro Silupu, por su asesoramiento y guía durante las actividades de ejecución de la Tesis que se realizaron en los laboratorios de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza (UNTRM), Amazonas.

A la UNTRM por brindarme las facilidades en el uso de sus instalaciones y equipos para la ejecución de parte de la presente tesis.

A M.Sc. Alejandrina Sotelo Méndez, Directora Ejecutiva de los laboratorios de La Molina Calidad Total, por proporcionarme las cepas bacterianas usadas en el presente estudio. A los técnicos del laboratorio de la Facultad de Industrias Alimentarias de la UNALM, por su apoyo en la ejecución de la investigación.

A mi esposa Yesica, por estar siempre a mi lado, por su comprensión y apoyo incondicional. A mi hijo Jeremy Jhamil, quien es el motor y motivo para continuar en el camino de la superación.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1.	BIOPELÍCULAS EN EL ENVASADO DE ALIMENTOS	4
2.1.1.	Historia y contextualización de los envases en alimentos	4
2.1.2.	Biopelículas	5
a.	Funciones	5
b.	Requerimientos y ventajas	6
2.1.3.	Componentes para la formulación de biopelículas	6
a.	Biopolímero	6
b.	Lípidos	8
c.	Plastificante.....	9
d.	Solventes	10
e.	Otros aditivos	10
2.1.4.	Técnicas para elaboración de biopelículas.....	10
2.1.5.	Características de las biopelículas	11
a.	Microestructura	11
b.	Interacciones moleculares	11
c.	Propiedades ópticas.....	12
d.	Propiedades mecánicas	12
e.	Propiedades de barrera.....	12
f.	Actividad antimicrobiana.....	12
g.	Biodegradabilidad	13
2.1.6.	Biopelículas activas	13
2.1.7.	Biopelículas activas en alimentos	14
2.2.	MICROENCAPSULACIÓN EN ALIMENTOS.....	15
2.2.1.	Agentes encapsulantes	16
2.2.2.	Sustancias que se encapsulan.....	17
2.2.3.	Técnicas de encapsulación	19
a.	Procesos físicos.....	19
b.	Procesos físico-químicos	19
c.	Procesos químicos.....	20

2.2.4.	Variables que se evalúan en microencapsulación.....	23
a.	Variables independientes	23
b.	Variables dependientes	24
2.3.	ESPECTROSCOPIA EN EL INFRARROJO CERCANO (NIR) EN EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS	24
2.3.1.	Generalidades de la espectroscopía NIR.....	24
2.3.2.	Quimiometría en la espectroscopía NIR.....	25
a.	Métodos quimiométricos cualitativos	25
b.	Métodos quimiométricos cuantitativos	26
2.3.3.	Antecedentes del uso de la espectroscopía NIR en el análisis de alimentos	27
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1.	MICROENCAPSULACIÓN DEL CITRAL MEDIANTE SECADO POR ATOMIZACIÓN: CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	29
3.1.1.	Lugar de estudio.....	29
3.1.2.	Reactivos y microorganismos	29
3.1.3.	Preparación de las micropartículas de citral	30
3.1.4.	Determinación del rendimiento en el proceso de secado.....	30
3.1.5.	Determinación del citral superficial (CS _{Ci}) y eficiencia de encapsulación (EE) ..	31
3.1.6.	Cromatografía de gases.....	31
3.1.7.	Caracterización de las micropartículas de citral óptimas.....	32
3.1.8.	Pruebas microbiológicas	33
3.1.9.	Diseño experimental y análisis estadístico	34
3.2.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO SUPERFICIAL DE CITRAL EN MICROPARTÍCULAS MEDIANTE ESPECTROSCOPIA NIR Y HERRAMIENTAS QUIMIOMÉTRICAS	36
3.2.1.	Lugar de estudio.....	36
3.2.2.	Reactivos.....	36
3.2.3.	Encapsulación	37
3.2.4.	Determinación del contenido superficial de citral (CS _{Ci}).....	37
3.2.5.	Espectroscopía NIR	37
3.2.6.	Pretratamiento de los perfiles espectrales	37
3.2.7.	Construcción del conjunto de datos	38
3.2.8.	Construcción de los modelos	39
3.2.9.	Criterios de comparación de modelos.....	42
3.3.	BIOPELÍCULAS ACTIVAS ELABORADAS CON MICROPARTÍCULAS DE CITRAL PARA PROLONGAR LA VIDA ÚTIL DEL QUESO FRESCO	43

3.3.1.	Lugar de estudio.....	43
3.3.2.	Reactivos.....	43
3.3.3.	Preparación de las biopelículas activas.....	43
3.3.4.	Evaluación de variables respuestas para optimización.....	44
3.3.5.	Caracterización de las biopelículas activas óptimas.....	46
3.3.6.	Envasado del queso fresco.....	48
3.3.7.	Análisis del queso fresco.....	49
3.3.8.	Diseño experimental y análisis estadístico.....	51
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
4.1.	MICROENCAPSULACIÓN DEL CITRAL MEDIANTE SECADO POR ATOMIZACIÓN; CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	53
4.1.1.	Optimización de múltiples variables utilizando metodología superficie de respuesta (MSR) para la microencapsulación.....	53
4.1.2.	Caracterización de las micropartículas obtenidas en condiciones óptimas.....	58
4.1.3.	Actividad antibacteriana del citral mixture puro.....	60
4.1.4.	Actividad antibacteriana de micropartículas de citral.....	62
4.2.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO SUPERFICIAL DE CITRAL EN MICROPARTÍCULAS MEDIANTE ESPECTROSCOPIA NIR Y HERRAMIENTAS QUIMIOMÉTRICAS.....	65
4.2.1.	Análisis de referencia.....	65
4.2.2.	Perfiles espectrales del contenido superficial de citral en micropartículas.....	66
4.2.3.	Modelado.....	67
4.2.4.	Modelo ANN.....	71
4.2.5.	Comparación de modelos.....	71
4.3.	BIOPELÍCULAS ACTIVAS ELABORADAS CON MICROPARTÍCULAS DE CITRAL PARA PROLONGAR LA VIDA ÚTIL DEL QUESO FRESCO.....	74
4.3.1.	Optimización de múltiples variables utilizando metodología superficie de respuesta (MSR) para las biopelículas activas.....	74
4.3.2.	Caracterización de las biopelículas activas obtenidas en condiciones óptimas....	80
4.3.3.	Biopelículas activas para envasado del queso fresco.....	88
4.3.4.	Análisis FTIR.....	89
4.3.5.	Evaluación del queso fresco.....	93
V.	CONCLUSIONES.....	104
VI.	RECOMENDACIONES.....	106
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
VIII.	ANEXOS.....	125

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones del diseño experimental para la elaboración de micropartículas de emulsión de citral y dextrina mediante secado por atomización	35
Tabla 2. Condiciones experimentales del diseño experimental para la elaboración de biopelículas activas con caseinato de sodio (CS), sorbitol (Sb) y micropartícula de citral (MC).....	52
Tabla 3. Diseño experimental y valores de las variables respuestas en la microencapsulación de citral mediante secado por atomización	54
Tabla 4. Análisis de varianza (ANOVA) para la microencapsulación de citral mediante secado por atomización.....	54
Tabla 5. Actividades antibacterianas del citral mixture puro a diferentes diluciones seriadas (diluidas en heptano).....	61
Tabla 6. Medidas estadísticas para modelos quimiométricos usados en la determinación de CS_{Ct}	73
Tabla 7. Diseño experimental y valores de las variables respuestas para la elaboración de biopelículas activas mediante el método de casting	75
Tabla 8. Análisis de varianza (ANOVA) para la elaboración de biopelículas activas con micropartículas de citral, mediante método de casting	76
Tabla 9. Características de las biopelículas activas obtenidas bajo condiciones óptimas	81
Tabla 10. Recuentos de células viables de aerobios mesófilos, psicrotrofos y hongos y levaduras (log UFC g ⁻¹ , medias ± DS) en queso envasado con biopelículas activas en comparación con el queso envasado en bolsa de polietileno (testigo) y almacenados a 6 °C por 14 días.....	96
Tabla 11. Diferencias sensoriales (medias ± DS), evaluados por un grupo de panelistas semi-entrenados utilizando una pauta no estructurada de 0 a 15 cm, entre el queso envasado con biopelículas activas en comparación con el queso envasado en bolsa de polietileno (testigo) y almacenados a 6 °C por 14 días.	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales funciones de las biopelículas.....	7
Figura 2. Principales componentes de las biopelículas.....	7
Figura 3. Estructura química del sorbitol.....	9
Figura 4. Estructura química del citral: (a) geranial (citral A) y (b) neral (citral B).....	18
Figura 5. Esquema del secador por atomización co-corriente y sus etapas.....	21
Figura 6. Diagrama de flujo de la construcción del conjunto de datos.....	39
Figura 7. Ejemplo de red neuronal multicapa.....	42
Figura 8. Gráficos de superficie respuesta para el rendimiento y eficiencia de encapsulación para micropartículas de citral – dextrina.....	56
Figura 9. Gráfico de superficie de respuesta (MSR) para la optimización de la microencapsulación de citral, considerando la maximización del R y EE.....	58
Figura 10. Fotografías de microscopía electrónica de barrido de las micropartículas de citral obtenidas en condiciones óptimas (3000x).....	60
Figura 11. Inhibición del crecimiento de diferentes bacterias por micropartículas de citral (concentración de 300 mg mcp/ mL de heptano diluido en agua destilada).....	62
Figura 12. Efecto inhibitorio de la micropartícula de citral en comparación con la cantidad equivalente de citral libre. Las barras indican el error estándar (n=4).....	64
Figura 13. Perfiles espectrales de las micropartículas de citral.....	66
Figura 14. Componentes principales y modelos PCA-MLR y PCA-ANN.....	68
Figura 15. Modelo PLSR completo y número de variables relevantes (VR): (a) Modelo PLSR completo, y (b) $Rc2$ y $RMSEc$ vs VL.....	68
Figura 16. Variables relevantes (VR) y perfiles espectrales. De arriba abajo: β -coeficientes y VR (puntos negros); perfil espectral de soluciones citral; y perfil espectral de micropartículas.....	70
Figura 17. Modelos PLSR optimizados.....	72
Figura 18. Modelos ANN: (a) completo y (b) optimizado.....	72
Figura 19. Gráficos de superficie respuesta para las biopelículas activas: (a) Opacidad – Op, (b) Valor de transparencia – VT (A_{600}/mm), y (c) Módulo elástico – E.....	78
Figura 20. Gráfico de superficie de respuesta (MSR) para la optimización de las biopelículas activas, considerando la minimización de las variables respuestas.....	80
Figura 21. Fotografía de las biopelículas activas con micropartículas de citral elaboradas en condiciones óptimas y tomadas inmediatamente después de su procesamiento.....	83
Figura 22. Micrográficas SEM (1250 x) de las biopelículas activas obtenidas en condiciones óptimas: (a) vista de la superficie y (b) vista de la sección transversal.....	86
Figura 23. Micrográficas AFM de las biopelículas activas obtenidas en condiciones óptimas, a diferentes tamaños del campo de observación: (a) $2 \times 2 \mu m$, (b) $4 \times 4 \mu m$, y (c) $10 \times 10 \mu m$	87

Figura 24. Fotografía de las biopelículas activas elaboradas en condiciones óptimas para envasado del queso fresco: (a) con micropartículas de citral y (b) con citral libre.	88
Figura 25. Espectros FTIR de las materias primas: (a) citral; (b) dextrina; (c) lecitina de soya; (d) micropartículas de citral; (e) sorbitol; y (f) caseinato de sodio.....	90
Figura 26. Espectros FTIR de las biopelículas activas obtenidas bajo condiciones óptimas.....	94
Figura 27. Fotografía de los quesos envasados con T0: Bolsa de polietileno (PE), T1: Biopelícula con micropartículas de citral (MC), y T2: Biopelículas con citral libre (CL); al día 0 (antes y después de envasar) y día 14 (envasado y retirado el envase) de almacenamiento.	94
Figura 28. Valores (medias \pm DS) de (a) pH, (b) contenido de humedad, (c) pérdida de peso, (d) diferencia de color total, y (e) blancura del queso fresco antes de envasar (día 0) y envasado en bolsa de polietileno (PE), biopelícula con micropartícula de citral (MC) y biopelícula con citral libre (CL), almacenado a 6 °C por 14 días.....	99

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A. Evaluación sensorial con panel semi-entrenado	126
ANEXO B. Tablas auxiliares del ensayo de microencapsulación del citral mediante secado por atomización.....	127
ANEXO C. Tablas auxiliares del ensayo de determinación del contenido superficial de citral en micropartículas mediante espectroscopía NIR y quimiometría	128
ANEXO D. Tablas auxiliares del ensayo de biopelículas activas elaboradas con micropartículas de citral para prolongar la vida útil del queso fresco.....	129
ANEXO E. Artículos científicos publicados y por publicar, derivados de la tesis doctoral	132

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP	Agar para conteo en placa
AE	Aceite esencial
AFM	Microscopía de fuerza atómica (Inglés: <i>Atomic Force Microscopy</i>)
AN	Agar nutritivo
ANN	Redes neuronales artificiales (Inglés: <i>Artificial neural networks</i>)
ANOVA	Análisis de varianza
A _w	Actividad de agua
CCD	Diseño compuesto central (Inglés: <i>Central composite design</i>)
CL	Citral libre no encapsulado
CN	Caldo nutritivo
Ct	Citral
CSct	Contenido superficial de citral
Dx	Dextrina
ΔE^*	Diferencia de color total
EE	Eficiencia de encapsulación
FTIR	Infrarrojo transformada de Fourier (Inglés: <i>Fourier-transform infrared</i>)
GC	Cromatografía de gases (Inglés: <i>Gas chromatography</i>)
GRAS	Generalmente reconocido como seguro (Inglés: <i>Generally recognized as safe</i>)
H	Contenido de humedad
Hg	Higroscopicidad
LS	Lecitina de soya
MC	Micropartículas de citral
mcp/ mL	Micropartícula / mililitro (Unidad de concentración)
MIR	Infrarrojo medio (Inglés: <i>Mid IR</i>)
MLR	Regresión multilínea (Inglés: <i>Multi-linear regression</i>)
MSE	Error cuadrático medio
MSR	Metodología superficie respuesta
NIR	Infrarrojo cercano (Inglés: <i>Near infrared</i>)
PC	Componente principal

PCA	Análisis de componentes principales (Inglés: <i>Principal component analysis</i>)
PE	Polietileno
PLSR	Regresión parcial por mínimos cuadrados (Inglés: <i>Partial least squares regression</i>)
PO	Permeabilidad al oxígeno
PVA	Permeabilidad al vapor de agua
R	Rendimiento del proceso de secado
R^2	Coefficiente de determinación
RMSE	Raíz del error cuadrático medio
Relación Ct:Dx	Relación citral: dextrina
Relación CS:Sb	Relación caseinato de sodio: sorbitol
Relación CS:MC	Relación caseinato de sodio: micropartículas de citral
SEM	Microscopía electrónica de barrido (Inglés: <i>Scanning Electron Microscopy</i>)
TEA	Temperatura del aire de entrada
UFC	Unidades formadoras de colonias

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue desarrollar biopelículas activas con aceite esencial de citral microencapsulado y su efecto en la carga microbiana del queso fresco. La microencapsulación del citral se realizó mediante secado por atomización y se optimizó empleando metodología superficie respuesta (MSR), maximizando el rendimiento y eficiencia de encapsulación (EE) respecto a la relación citral: dextrina (Ct:Dx) entre 1:5 y 1:20 y temperatura del aire de entrada (TEA) al secador entre 120 y 200 °C. Se evaluaron las características físico-químicas y actividad antimicrobiana de las micropartículas de citral (MC) óptimas. La predicción del contenido superficial de citral (CSct) en las micropartículas se realizó utilizando espectroscopía NIR y quimiometría. Las biopelículas activas se elaboraron mediante método de casting y se optimizó con MSR, minimizando el valor de transparencia, opacidad y módulo elástico respecto a la relación caseinato de sodio: sorbitol (CS:Sb) entre 1: 0.5 y 1:1.5 y relación CS:MC entre 1:0.5 y 1:1.5. Se caracterizaron las propiedades de color, mecánicas y micro-estructurales de las biopelículas activas óptimas. Los quesos se envasaron en biopelículas con MC, biopelículas con citral libre y bolsas de polietileno; se evaluó su perfil físico, sensorial y microbiológico durante 14 días a 6°C. Las condiciones óptimas de microencapsulación fueron 1:5 de relación Ct:Dx y 187°C de TEA, mostrando características físico-químicas aceptables y actividad antimicrobiana de amplio espectro. Los modelos quimiométricos empleados en la predicción de CSct presentaron R^2 entre 0.80 y 0.95, siendo las redes neuronales artificiales las que presentaron mejores resultados. Las condiciones óptimas de biopelículas activas se alcanzaron a relación CS:Sb de 1:0.91 y relación CS:MC de 1:0.95; obteniendo propiedades de color, mecánicas y micro-estructurales adecuadas para envasado de alimentos. Los quesos en biopelículas con MC presentaron menores recuentos microbianos y mejor perfil físico y sensorial, prolongando la vida útil del producto hasta 14 días en condiciones aceptables.

Palabras clave: Absorbancia; microencapsulación; optimización; perfil espectral; propiedades mecánicas; propiedades ópticas.

ABSTRACT

The objective of the work was to develop active biofilms with microencapsulated citral essential oil and its effect on the microbial load of fresh cheese. Microencapsulation of citral was performed by spray drying and was optimized using surface response methodology (MSR), maximizing yield and encapsulation efficiency (EE) with respect to the citral: dextrin (Ct:Dx) ratio between 1: 5 and 1: 20 and inlet air temperature (TEA) to the dryer between 120 and 200 °C. The physicochemical characteristics and antimicrobial activity to the optimal citral microparticles (MC) were evaluated. The prediction of the surface content of citral (CSct) in microparticles was performed using NIR spectroscopy and chemometric. The active biofilms were elaborated by casting method and optimized with MSR, minimizing the transparency value, opacity and elastic modulus with respect to the sodium caseinate: sorbitol (CS:Sb) ratio between 1: 0.5 and 1: 1.5 and CS:MC ratio between 1: 0.5 and 1: 1.5. Color, mechanical and microstructural properties of the optimal active biofilms were characterized. The cheeses were packed in biofilms with MC, biofilms with free citral and polyethylene bags; their physical, sensory and microbiological profile was evaluated during 14 days at 6 °C. The optimal microencapsulation conditions were 1: 5 to Ct:Dx and 187 °C to TEA, showing acceptable physicochemical characteristics and broad-spectrum antimicrobial activity. The chemometric models used in the CSct prediction presented R² between 0.80 and 0.95; artificial neural networks showed better results. The optimal conditions of active biofilms were reached at CS:Sb ratio of 1: 0.91 and CS:MC ratio of 1: 0.95; obtaining color, mechanical and microstructural properties adequate for food packaging. The cheeses in biofilms with MC presented lower microbial counts and better physical and sensory profile, prolonging the useful life of the product up to 14 days in acceptable conditions.

Keywords: Absorbance; microencapsulation; optimization; spectral profile; mechanical properties; optical properties.

I. INTRODUCCIÓN

La industria del envase y embalaje es una de las más dinámicas en el mundo por ser clave en las diversas cadenas de valor; este sector en el 2018 alcanzó una producción mundial de US\$ 975 mil millones. Cabe indicar que el Perú a nivel Latinoamérica ocupa el octavo lugar como proveedor de estos materiales, exportando en el 2017 US\$ 367 millones, siendo Bolivia el principal destino, seguido por Colombia, Chile y EE.UU. (García, 2018).

El uso de los envases y embalajes es generalizado en diferentes sectores industriales, dentro de ellos destaca las fábricas alimentarias. En este sector, los materiales de envase primario más usados son el papel, cartón, plásticos, el metal y vidrio (Aguirre-joya *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2014). Entre estos, los envases de plástico han aumentado su participación en los últimos años, ocupando el 45% del total del mercado de envases, debido a su peso ligero, versatilidad y bajo costo (Byun *et al.*, 2014; García, 2018). No obstante, los envases plásticos provienen de derivados del petróleo, que son fuentes no renovables, no biodegradables, tardan más de 100 años para su degradación, causantes de contaminación ambiental; siendo los principales el polietileno, poliestireno y polipropileno (Bucci *et al.*, 2005; MINAM, 2019). Estas evidencias han obligado a los países a regular su uso; como en el Perú con la promulgación de la ley 30884 (Congreso de la República, 2018).

Frente a esta problemática, los biopolímeros son considerados como recursos biotecnológicos con propiedades únicas de ausencia de toxicidad, degradables y biológicamente compatibles; como fuente para desarrollo biopelículas biodegradables (Kim *et al.*, 2014). Los principales biopolímeros utilizados en este propósito son obtenidos a partir del almidón, celulosa, algas marinas, quitosano, escamas de pescados, fuentes proteicas, semillas de frutos, entre otros; a los que se le adicionan otros materiales como lípidos, plastificantes, agentes activos y solventes (Falguera *et al.*, 2011; Menezes y Athmaselvi, 2018; Salgado *et al.*, 2015; Sengupta y Han, 2014). Dentro de los biopolímeros de fuentes proteicas están los obtenidos de productos lácteos como la caseína, que ha sido utilizado en la fabricación de adhesivos, encolados, fibras textiles, acabados del cuero, industria papelera, revestimiento y biopelículas para envasado (Barreto *et al.*, 2003; Pereda *et al.*, 2008).

Las biopelículas de caseína son transparentes, biodegradables, presentan buenas propiedades de barrera al oxígeno; además, pueden usarse como soporte de compuestos antimicrobianos, o antioxidantes (biocompuestos), dándole a la biopelícula una propiedad funcional conocida como biopelícula o envase activo (Arrieta *et al.*, 2014; Arrieta *et al.*, 2013; Audic *et al.*, 2003); la adición de estos biocompuestos se ve potenciado cuando se adiciona protegido, por ejemplo mediante microencapsulación (Alarcón-Moyano *et al.*, 2017; Bustos *et al.*, 2016); siendo estas biopelículas activas de gran utilidad para el envasado de alimentos perecederos como lácteos, cárnicos, hortofrutícolas, alimentos preparados, entre otros; donde en la mayoría de los casos estudiados demuestran beneficios en reducir de la pérdida de agua, permeabilidad al oxígeno, retardar la oxidación de los lípidos, mejorar la textura y el sabor, disminuir el recuento microbiano y en general prolongar la vida útil del alimento a partir de la interacción de los biocompuestos con el envase (Salgado *et al.*, 2015).

La elaboración de biopelículas activas con propiedades antimicrobianas y/o antioxidantes se puede formular con incorporación de sustancias naturales como extractos o aceites esenciales (AE), en forma libre o microencapsulado (Atarés y Chiralt, 2016; Corrales *et al.*, 2014; Lee, 2014; Ribeiro-Santos *et al.*, 2017). Dentro de los AE están el mentol, geraniol, timol, eugenol, carvacrol, citral, entre otros (Bonilla *et al.*, 2018; Caetano *et al.*, 2018; Navikaite-snipaitiene *et al.*, 2018; Stashenko, 2009). El citral (3, 7-Dimetil-2, 6-octadienal) es un aldehído monoterpeneo acíclico; compuesto por dos isómeros geométricos: geranial (citral A en su forma *cis*) y neral (citral B en su forma *trans*) (López *et al.*, 1993; Maswal y Dar, 2014); este AE posee actividades antifúngica, bactericidas, insecticidas, desodorantes, entre otros (Saddiq y Khayyat, 2010).

La principal desventaja de los AE es que, al ser extraídos son afectados por el O₂, humedad relativa, actividad del agua y temperatura; factores que conducen a la pérdida de su funcionalidad, que podrían mejorarse mediante microencapsulación (Bakry *et al.*, 2016; Gharsallaoui *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2018; Maswal y Dar, 2014; Yang *et al.*, 2015); mejorando su manipulación y permitiendo una liberación controlada (Sutaphanit y Chitprasert, 2014; Xing *et al.*, 2006).

Las técnicas para microencapsular citral y derivados de aceites esenciales de cítricos en la industria de alimentos, en su mayoría se basan en sistemas coloidales blandos, siendo los más usados las emulsiones de aceite en agua, nanoemulsiones, coacervación compleja, coacervación simple, extrusión, secado por atomización y secado por lecho fluidizado

(Maswal y Dar, 2014). Entre todas estas técnicas, el secado por atomización es el método más común y económico (Balasubramani *et al.*, 2013).

En una microesfera, es importante el biopolímero utilizado, porque es responsable de la protección del agente activo y de su aplicabilidad. La maltodextrina, almidón modificado y goma arábiga son los biopolímeros más utilizados para la microencapsulación de AE y citral (Bakry *et al.*, 2016; de Barros Fernandes *et al.*, 2014; Huynh *et al.*, 2008; Kha *et al.*, 2014). Dentro de los productos de almidón modificados, se encuentra la dextrina, obtenida mediante un proceso de dextrinización (hidrólisis parcial de almidón) y que cuenta con diversas aplicaciones en la industria alimentaria, como la microencapsulación (Sarifudin y Assiry, 2014). La dextrina se ha usado para encapsular aceite de girasol (Ahn *et al.*, 2008), aceite de pescado (Kagami *et al.*, 2003) y porfirina (Luz *et al.*, 2008) entre otros. Sin embargo, no se ha encontrado evidencia de la microencapsulación de citral en dextrina.

La literatura reporta algunos estudios donde incorporaron el citral microencapsulado en la formulación de biopelículas activas, entre el más reciente destaca los reportados por (Alarcón-Moyano *et al.*, 2017) quienes adicionaron a una matriz de alginato de sodio, obteniendo biopelículas estables y reducción microbiana en ensayos *in vitro*. Por otro lado, existen estudios donde se emplearon caseinato de sodio en la elaboración de biopelículas activas con la incorporación de AE en forma libre, como carvacrol (Arrieta *et al.*, 2014, 2013), AE de germen de maíz (Matsakidou *et al.*, 2019), AE de tung (Pereda *et al.*, 2010); la mayoría de estos trabajos coinciden en la obtención de una biopelícula transparente, incolora, homogénea, dúctil, con buena barrera al O₂, altamente biodegradable en condiciones de compostaje; así como, inhibición de microorganismos en pruebas *in vitro*. Sin embargo, no se ha encontrado evidencia del uso de citral microencapsulados con caseinato de sodio para la elaboración de biopelículas activas; así como, la aplicación y evaluación de biopelículas en el envasado de alimentos perecederos como el queso.

Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivo general desarrollar biopelículas activas con citral microencapsulado y su efecto en la carga microbiana del queso fresco. Como objetivos específicos fueron: (1) optimizar y caracterizar sus propiedades físicas y actividad antimicrobiana de las micropartículas de citral obtenidas mediante secado por atomización; (2) determinar el contenido superficial de citral en micropartículas mediante espectroscopía NIR y herramientas quimiométricas; y (3) desarrollar biopelículas activas elaboradas con micropartículas de citral para prolongar la vida útil del queso fresco.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. BIOPELÍCULAS EN EL ENVASADO DE ALIMENTOS

2.1.1. Historia y contextualización de los envases en alimentos

El origen de los envases data desde hace 8000 a.C., donde se han encontrado evidencias del uso de vasijas de barro, pieles y tejidos de hierbas; desde entonces ha ido evolucionando y diversificándose (Perez, 2012). Dentro de los hechos de mayor relevancia a lo largo de la historia destacan, en 1500 y 100 a.C. el origen del vidrio (Egipto y Roma) y del papel (China), respectivamente. En nuestra era, resaltan en el año 1500 el uso de envases de madera (Europa); en 1809 el desarrollo de conservas en vidrio por Appert (Francia); dos años después, el origen de conservas en lata por Durand (Inglaterra); en 1930, 1950 y 1960 se desarrollaron el polietileno, polipropileno y lata de aluminio, respectivamente; Otro hito importante es el desarrollo de los envases biodegradables en 1997 (Aguirre-Joya *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2014; Perez, 2012). En el presente siglo, esta industria continúa en crecimiento, innovación y desarrollo (Kim *et al.*, 2014).

Los envases son de gran utilidad debido a que brindan protección a los alimentos contra golpes, temperatura, medio que los rodea, sirven de barrera al oxígeno y vapor de agua, lo que permite alargar su vida útil y conservar su sabor; los materiales de envase más utilizados en la industria alimentaria son el papel, el vidrio, el metal y los plásticos (Aguirre-Joya *et al.*, 2018). Los envases plásticos han aumentado su participación en los últimos años, ocupando el 45% del total del mercado de envases, debido a su amplia versatilidad, peso ligero y bajo costo (Byun *et al.*, 2014). Sin embargo, la mayoría de los plásticos provienen de hidrocarburos (petróleo), que son fuentes no renovables y no biodegradables, causantes de generación y acumulación de residuos y problemas ambientales (Atarés y Chiralt, 2016; Bucci *et al.*, 2005).

Cerca del 6% del petróleo del mundo es destinado a la producción de plástico, estimándose que anualmente cerca de 270 millones de toneladas de petróleo y gas, son destinados a la producción de plásticos (Hernández y Guzmán, 2009). Los principales plásticos utilizados en el envasado de alimentos son el polietileno y el polipropileno; de estos envases, el Perú

en el 2018 importó el 98% y exportó el 2% restante, en este mismo año la cantidad importada promedio fue de 340 000 toneladas, siendo Estados Unidos de América y Arabia Saudita los principales proveedores, quienes vendieron el 25% del total (TRADE-MAP, 2019). Datos al 2018, el mundo utiliza 5 billones de bolsas al año, casi 10 millones por minuto; el 50 % de estos son de un solo uso. Por su lado, el Perú registra un consumo per cápita de 30 kg/persona; al año se usan 3 mil millones de bolsas plásticas, casi 6 mil bolsas por minuto (MINAM, 2019).

Debido a que los plásticos derivados de petróleo no son renovables, tardan más de 200 años en degradarse y generan un impacto negativo al ambiente; estas desventajas condicionan su futuro de este tipo de envases. Para enfrentar esta problemática surgen el interés en la investigación y desarrollo de plásticos biodegradables, como las biopelículas (Bucci *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2014).

2.1.2. Biopelículas

Las biopelículas representan una alternativa interesante en lugar de los materiales plásticos convencionales, para este propósito se utilizan materias primas renovables que ofrecen un buen control en el medio ambiente después de diversos usos y que se degradan rápidamente, atenuando así los problemas de contaminación (Atarés y Chiralt, 2016). Una biopelícula se define como una capa delgada de material biodegradable de origen biológico, que una vez formada puede ser utilizada para envasar alimentos (Fabra *et al.*, 2009); son también biodegradables, lo que significa que pueden ser totalmente degradados por microorganismos en un proceso de compostaje, a sólo dióxido de carbono, agua, metano y otros residuos de biomasa (Salgado *et al.*, 2015).

a. Funciones

Las funciones más comunes de las biopelículas se describen en la Figura 1. Estas deben actuar como barreras contra gases o vapores, aceites y solutos, proporcionar protección estructural para evitar daños mecánicos durante el transporte y comercialización, proteger los alimentos contra la oxidación, crecimiento microbiano y otras reacciones químicas. También podrían ser utilizados para mejorar las características visuales y táctiles de los productos alimenticios, así como para llevar sustancias activas como antioxidantes, antimicrobianos, nutraceuticos, colores y sabores (Han y Scanlon, 2014; Salgado *et al.*, 2015).

b. Requerimientos y ventajas

Peelman *et al.* (2013) & Sengupta y Han (2014), mencionan que las biopelículas deben reunir ciertos requisitos como: buena calidad sensorial, alta eficiencia mecánica y de barrera, libres de tóxicos y de tecnología simple. De igual modo, reportan que sus principales ventajas son la reducción de la contaminación ambiental y protección de los alimentos.

2.1.3. Componentes para la formulación de biopelículas

Los principales componentes que se utilizan en la formulación de biopelículas son: (a) biopolímeros (polisacáridos y proteínas), (b) lípidos, (c) plastificantes, (d) solventes y (e) otros aditivos (Figura 2); la combinación de éstos permite la producción de biopelículas con características mejoradas (Atarés y Chiralt, 2016; Salgado *et al.*, 2015).

a. Biopolímero

Son macromoléculas naturales o polímeros de residuos monoméricos derivados de sistemas biológicos u organismos vivos; los polisacáridos y las proteínas son dos clases principales de biopolímeros de alimentos (Niaounakis, 2015; Prameela *et al.*, 2018). Como componente en la obtención de biopelículas se caracterizan por tener una buena barrera al O₂, regulares propiedades mecánicas y mala barrera al vapor de agua, el cual podría mejorarse mediante el uso combinado de estos con lípidos, nanotecnología, modificación mecánica, entre otros (Byun *et al.*, 2014; Han, 2014; Salgado *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2014).

- **Polisacáridos:** Investigaciones reportan que las películas a base de polisacáridos tiene una pobre barrera al vapor de agua y bajas propiedades mecánicas; estas deficiencias impiden su aplicación industrial, que puede ser mejorados al emplear combinaciones de polisacáridos (Zhang *et al.*, 2014). Los polisacáridos utilizados como biopolímeros para la elaboración de envases biodegradables incluyen almidón y derivados, alginato, xantano, pectina, quitina, carragenano, celulosa, gelano y pululano (Grujic *et al.*, 2017; Prameela *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2014).

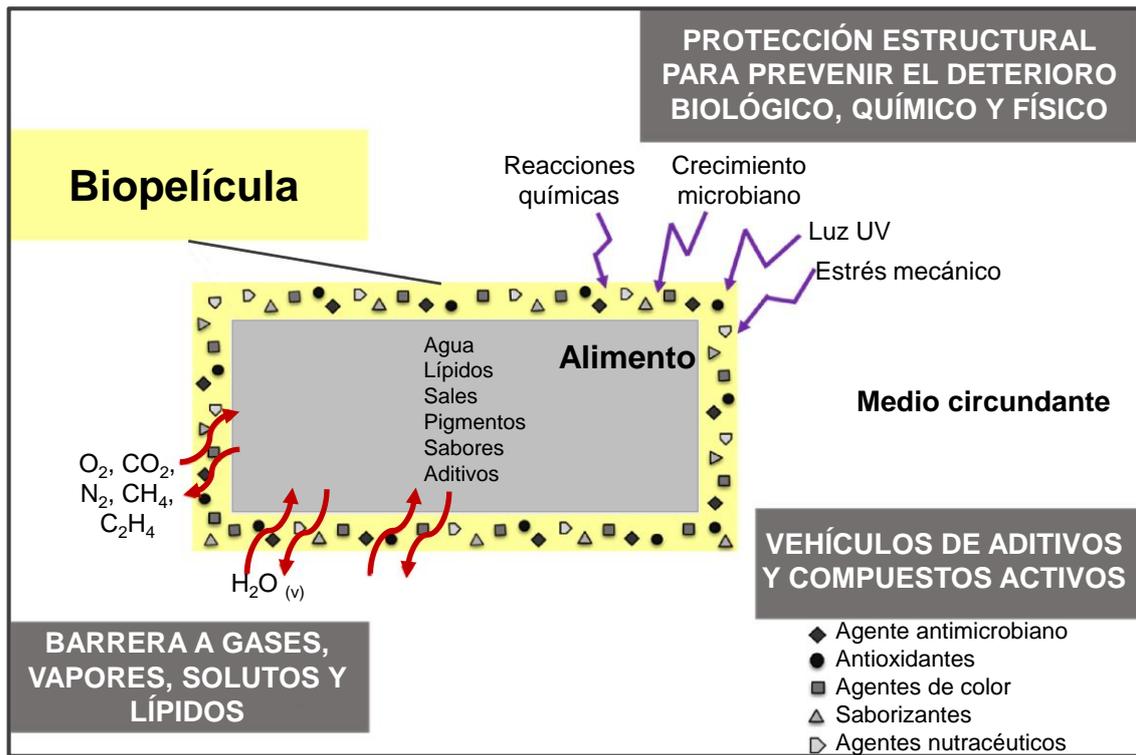


Figura 1. Principales funciones de las biopelículas.

Adaptado de Salgado *et al.* (2015).

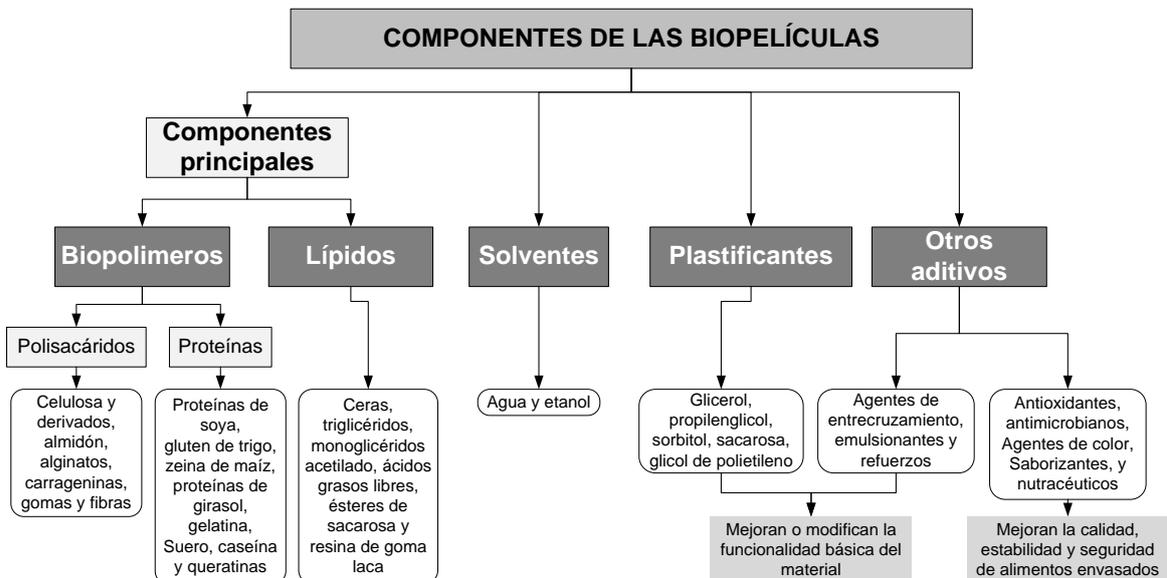


Figura 2. Principales componentes de las biopelículas.

Adaptado de Salgado *et al.* (2015).

- **Proteínas:** Estos al ser usados en la formulación de películas tienen una buena adherencia a superficies hidrófilas y buena barrera a O₂ y CO₂; pero, su fragilidad es alta, el cual podría mejorarse con la adición de plastificantes como glicerol, polietilenglicol o sorbitol; los cuales mejoran su extensibilidad y viscoelasticidad (Lacroix y Vu, 2014). En general sus propiedades físico-químicas podrían mejorarse con la adición de lípidos, reticulación de proteínas por medios químicos (glutaraldehído, formaldehído, gliceraldehído y glioxal), enzimáticos (transglutaminasa), o física (calefacción, irradiación) (Bourtoom, 2009). Los biopolímeros proteicos pueden ser de origen vegetal o animal, como las proteínas de soya, gluten de trigo, zeína de maíz, proteínas de girasol, gelatina, suero de leche, caseína y queratina (Lacroix y Vu, 2014; Salgado *et al.*, 2015).

Dentro de la películas elaboradas con proteínas de leche están las provenientes del suero y los caseinatos, que han sido ampliamente estudiados debido a sus numerosas propiedades funcionales (Arrieta *et al.*, 2014, 2013; Lacroix y Vu, 2014).

Caseína: Su uso en la elaboración de biopelículas son innovadoras debido a que son transparentes, biodegradables, con buenas propiedades de barrera al O₂, preservando así al alimento de procesos oxidantes, y además pueden usarse como soporte de agentes antimicrobianos, antioxidantes o nutrientes (como aceites esenciales y vitaminas); los principales derivados de la caseína son el caseinato de sodio y caseinato de calcio (Arrieta *et al.*, 2014, 2013). Sin embargo, poseen dos desventajas en comparación con otras películas de proteínas: flexibilidad limitada y alta sensibilidad al vapor de agua; los cuales se podrían mejorar con el uso de plastificantes (Arrieta *et al.*, 2013; Audic *et al.*, 2003; Pojanavaraphan *et al.*, 2010); otros autores, para mejorar sus propiedades mecánicas y de barrera, al caseinato de sodio adicionaron cera de abeja (Fabra *et al.*, 2009).

b. Lípidos

Como componente en la obtención de biopelículas poseen características contrarias a los biopolímeros como: son una mala barrera al O₂, muy quebradizos y tienen una buena barrera al vapor de agua. En general, con el fin de mejorar la funcionalidad de las películas, los lípidos se suelen combinar con polisacáridos y proteínas (Pérez-Gago y Rhim, 2014). Dentro de las fuentes lipídicas están la cera de abejas, cera de candelilla, cera de carnauba, triglicéridos (por ejemplo fracciones de grasa de la leche), monoglicéridos acetilados, ácidos

grasos libres, alcoholes grasos, ésteres de sacarosa y resinas de terpeno comestibles tales como resina de goma laca, entre otros (Pérez-Gago y Rhim, 2014; Salgado *et al.*, 2015).

c. Plastificante

Son aditivos que utilizados en la elaboración de biopelículas, pueden mejorar o modificar su funcionalidad básica, como mejorar sus propiedades mecánicas (reducir la fragilidad, aumentar el alargamiento y ductilidad), modificar sus propiedades de barrera y térmicas, reducir las temperaturas de procesamiento; servir como emulsionantes y mejorar la adherencia de los componentes; en general, reducen las fuerzas intermoleculares a lo largo de las cadenas del polímero (Byun *et al.*, 2014). Dentro de estos plastificantes están el glicerol, propilenglicol, sorbitol, sacarosa, glicol de polietileno, ácidos grasos, monoglicéridos (Byun *et al.*, 2014; Han, 2014; Salgado *et al.*, 2015).

Sorbitol: Es un polialcohol que industrialmente se obtiene por la reducción de la glucosa; su estructura química se muestra en la Figura 3, su fórmula química es $C_6H_{14}O_6$, peso molecular de 182.17 g/mol y solubilidad en agua de 2.750 g/L a 30 °C (Byun *et al.*, 2014).

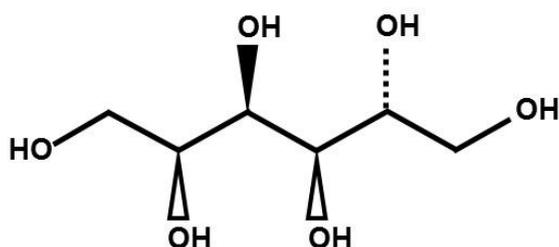


Figura 3. Estructura química del sorbitol.
Adaptado de Byun *et al.* (2014).

El sorbitol es un buen plastificante es generalmente reconocido como seguro - GRAS (del inglés: Generally Recognized as Safe), que aumenta significativamente la resistencia a la perforación; además, comparado con el polietilenglicol y manitol, el sorbitol tiene un efecto plastificante superior (Ressouany *et al.*, 1998).

Tapia-Blácido *et al.* (2011), estudiaron el uso de harina de amaranto (kiwicha) con plastificante sorbitol (26 a 54 g/100g de harina) y glicerol (19.5 a 36.5 g/100g de harina) para la obtención de biopelículas, con temperaturas de proceso entre 73 y 87 °C; donde encontraron que la formulación óptima con sorbitol (29.5 g/100g de harina y 75 °C de temperatura de proceso) presentó biopelículas menos higroscópicas, con mayor resistencia

a la rotura, menos elásticas y menos permeables al oxígeno; debido a la formación de una estructura más homogénea y ordenada.

d. Solventes

Los principales solventes utilizados en la elaboración de biopelículas son el agua y el etanol, su uso va a depender de tipo de componentes principales y aditivos a emplearse, teniendo en cuenta su grado de solubilidad. Además, dependerá del tipo de proceso, si es un proceso húmedo o seco; tan solo se usa en procesos húmedos (Salgado *et al.*, 2015). En investigaciones donde se utilizaron caseinato de sodio, este polímero tuvo una concentración entre 2,5 a 5 por ciento en agua (Arrieta *et al.*, 2013; Grujic *et al.*, 2017).

e. Otros aditivos

Se agrupan en dos: aquellos que mejoran o modifican la funcionalidad básica de la biopelícula, como los agentes de entrecruzamiento (transglutaminasa o genipina para proteínas y ácido cítrico o ácido tánico para polisacáridos), y los refuerzos (fibras y nanorrefuerzos derivados de polisacáridos como nanofibras de celulosa, nanocristales de almidón y nanocilindros de quitosano). En el segundo grupo están aquellos que mejoran la calidad, la estabilidad y brindan seguridad a los alimentos envasados, como los compuestos antioxidantes, antimicrobianos, nutracéuticos, brindan aromas y agentes de color (Atarés y Chiralt, 2016; Corrales *et al.*, 2014; Lee, 2014; Ribeiro-Santos *et al.*, 2017; Salgado *et al.*, 2015).

2.1.4. Técnicas para elaboración de biopelículas

Las formas de procesamiento más comunes para la obtención de películas biodegradables basadas en biopolímeros, a nivel industrial, son el moldeo, la extrusión y el prensado (Enríquez *et al.*, 2012). Para efectuar el moldeo, el almidón y otros componentes como el plastificante y algunos polímeros se dispersan en una cantidad de agua de 5 a 15 veces el peso del almidón y la suspensión resultante se calienta con agitación constante, se moldea como película y se seca de manera adecuada. En la extrusión, el almidón se mezcla con el agua y el plastificante hasta formar una matriz que sea procesable y pueda ser mezclada con otros polímeros; se hace el calentamiento de las diversas zonas del barril y el compuesto es extruido a través de un dado, en forma de ranura, a las temperaturas necesarias para lograr la gelatinización del almidón. En el prensado, una mezcla de los componentes, preferiblemente almidón, plastificante y polímeros, se pasa a través de un molino para

caucho en el cual los rodillos deben estar a temperaturas de plastificación de los materiales, preferiblemente alrededor de 130 °C; la mezcla resultante se lamina en hojas delgadas o películas (Enríquez *et al.*, 2012; Fakhouri *et al.*, 2013; Pereda *et al.*, 2014).

A escala de laboratorio, la técnica más usada es la de vaciado en placa o “casting”, que es una técnica definida como la deshidratación de una solución filmogénica, de volumen específico, sobre una placa petri de diámetro conocido a temperatura y humedad controlada (Arrieta *et al.*, 2014, 2013).

2.1.5. Características de las biopelículas

Las principales características y propiedades que se evalúan en películas biodegradables se describen a continuación.

a. Microestructura

Para estudiar la morfología superficial de las biopelículas se emplea la microscopía electrónica de barrido (SEM: *Scanning Electron Microscopy*). Esta técnica permite el análisis microscópico de los polímeros con una alta resolución mediante un bombardeo de electrones de alta energía que barren la superficie del material (Akyuz *et al.*, 2018; Arrieta *et al.*, 2013; Bonilla y Sobral, 2016). Otra de las técnicas para estudiar la microestructura en biopelículas es la microscopía de fuerza atómica (AFM: *Atomic Force Microscopy*), la cual permite obtener imágenes topográficas tridimensionales de las muestras investigadas (Torres *et al.*, 2008).

b. Interacciones moleculares

Es importante conocer en detalle las modificaciones en la estructura química de los materiales empleados; así como, las interacciones y cambios producidos tras la adición de diferentes componentes o después de las diversas etapas del procesado de las biopelículas; para estos efectos, una de las técnicas empleada es la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) en el infrarrojo medio (MID), que está basada en las vibraciones de átomos y grupos funcionales en las moléculas a causa de su interacción con la radiación emitida en la región infrarroja media del espectro electromagnético (Arrieta *et al.*, 2013). En el presente estudio se utilizó la técnica FTIR-MID para caracterizar los grupos funcionales de la materia prima empleada en la elaboración de las biopelículas activas y de las biopelículas mismas, y poder observar los posibles cambios causados por las interacciones entre los distintos componentes de la mezcla.

c. Propiedades ópticas

El objetivo de la evaluación de esta propiedad es para observar variaciones en su coloración, realizando mediciones de color mediante el uso de un colorímetro en el sistema CIELab (Arrieta *et al.*, 2013). Las demás propiedades ópticas que se miden son: valor de transparencia, porcentaje de opacidad y brillo (Atarés y Chiralt, 2016; Pires *et al.*, 2011).

d. Propiedades mecánicas

Dentro de estas propiedades, se mide la resistencia a la tracción siguiendo la Norma ASTM D882-01. La información aportada por el ensayo de tracción es muy completa, ya que permite medir la respuesta elástica y plástica del material. Así, los parámetros módulo elástico o módulo de Young (E) y porcentaje de deformación en el punto de rotura ($\epsilon_B\%$) permiten obtener conclusiones sobre la resistencia del material y sus propiedades dúctiles, respectivamente (Arrieta *et al.*, 2013; Atarés y Chiralt, 2016).

e. Propiedades de barrera

La permeabilidad a los gases como el vapor de agua (PVA) y O_2 (PO), son de importancia en el diseño de biopelículas; sobre todo el O_2 , debido a que este gas es capaz de participar en reacciones químicas perjudiciales para los alimentos y por ello su presencia debe estar regulada por el material de envase en la mayor parte de los casos (Arrieta *et al.*, 2013). La permeabilidad de las películas a determinados gases depende de la naturaleza polar o no polar de estos gases; también depende de la presencia de micro porosidades y del espesor (Arrieta *et al.*, 2014). La medición de la PVA ($g/Pa \cdot s \cdot m$) puede realizarse utilizando el método gravimétrico ASTM E96-95 (Atarés y Chiralt, 2016; Crizel *et al.*, 2018) y la PO ($cm^3 \cdot cm/m^2 \cdot s \cdot Pa$) utilizando un analizador de permeación al O_2 (Arrieta *et al.*, 2014; Atarés y Chiralt, 2016).

f. Actividad antimicrobiana

Una de las principales formas para evaluar la actividad antimicrobiana de las biopelículas es el método de difusión de disco descrito por el laboratorio internacional de referencia, el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (Arrieta *et al.*, 2014; Leimann *et al.*, 2009). Este método consiste en el contacto directo entre la biopelícula y el medio de cultivo inoculado, con una concentración inicial conocida de microorganismo a una temperatura de 37 °C durante 24 horas y en condiciones de esterilidad; para finalmente medir el halo de inhibición en mm (Akyuz *et al.*, 2018; Bonilla y Sobral, 2016; Jamróz *et al.*, 2018).

g. Biodegradabilidad

Una forma de evaluar la biodegradabilidad de películas son las propuestas por (Arrieta *et al.*, 2014; Martucci *et al.*, 2015; Martucci y Ruseckaite, 2009); que consiste en introducir muestras cortadas en piezas rectangulares (2 x 3 cm²) dentro de mallas de acero inoxidable, para ser enterrados en reactores con compost y posteriormente ser sacados en distintos tiempos de reacción para su evaluación mediante inspección visual.

2.1.6. Biopelículas activas

Con el objetivo de reducir la utilización de aditivos químicos en la industria alimentaria, en la actualidad existe un creciente interés en el uso de aditivos alimentarios naturales con propiedades antimicrobianas y antioxidantes que no tengan efectos negativos sobre la salud humana (Akyuz *et al.*, 2018; Alves-Silva *et al.*, 2013; Jamróz *et al.*, 2018; Moradi *et al.*, 2016). Al incorporar sustancias antimicrobianas y/o antioxidantes, como parte de la formulación para la obtención de estas películas, se les denomina biopelículas activas (Atarés y Chiralt, 2016; Ribeiro-Santos *et al.*, 2017). En este tipo de envase activo, la película, el producto y el medio ambiente interactúan para prolongar la vida útil o mejorar las propiedades de seguridad o sensoriales, con la finalidad de mantener la calidad del producto (Park *et al.*, 2014).

Dentro de los principales agentes antimicrobianos aplicados a sistemas de envases para alimentos están: los nanomateriales metálicos y óxidos metálicos, siendo los más utilizados la plata (Ag), oro (Au), óxido de zinc (ZnO), óxido de sílice (SiO₂), dióxido de titanio (TiO₂), alúmina (Al₂O₃), y óxidos de hierro (Fe₃O₄, Fe₂O₃) (Emamifar *et al.*, 2010); las enzimas como la invertasa y lisozima que han sido aprobadas como aditivos alimentarios; extractos naturales; y aceites esenciales (AES) obtenidos de semillas, té verde, hierbas aromáticas, entre otros (Corrales *et al.*, 2014).

Los AES extraídos de plantas y especias exhiben propiedades antimicrobianas y antioxidantes, siendo interesantes aditivos en la industria alimentaria. Además, la mayoría de ellos son clasificados como aditivos alimenticios seguros (GRAS: *Generally Recognized As Safe*) (Corrales *et al.*, 2014). La (USFDA, 1997) clasifica los AES como GRAS e incluye aceites de clavo de olor, orégano, tomillo, nuez moscada, albahaca, mostaza, canela y extraído de cítricos.

Sin embargo, el uso de los AEs como conservante de alimentos es a menudo limitado debido a su fuerte olor y sabor, dependiendo del tipo de aceite esencial (AE) y su concentración. Con el fin de evitar este problema, los AE se pueden incorporar en las biopelículas activas de forma directa (Atarés y Chiralt, 2016; Corrales *et al.*, 2014); o mediante procesos previos como la microencapsulación, antes de ser incorporados a las biopelículas en la formulación (Crizel *et al.*, 2018; Dammak y Sobral, 2017; Ribeiro-Santos *et al.*, 2017). Estudios demostraron que la capacidad antimicrobiana del AE microencapsulado mejora; al parecer, estar atrapado al interior de la vesícula este AE puede ser liberado lentamente, mejorando por lo tanto la actividad antimicrobiana de la película (Atarés y Chiralt, 2016).

Debido a que los AEs después de ser extraídos de su matriz son susceptibles a degradación frente a condiciones ambientales y de proceso, dando como resultado la pérdida de sus actividades funcionales; razón por la cual, la principal alternativa es la microencapsulación. La literatura reporta diversos trabajos que se han centrado en estudiar la encapsulación de AEs, polifenoles y extractos naturales dentro de una microestructura de nanoemulsión y/o recubiertas con matrices poliméricas, para su uso en la elaboración de envases biodegradables, como AE de ajo, AE de canola, α -tocoferol (Pérez-Córdoba *et al.*, 2018), rutina (Dammak y Sobral, 2017), curcumina (Wang *et al.*, 2009) y otros compuestos como extractos de orujo de oliva (Crizel *et al.*, 2018), AE de canela, romero, hinojo y orégano (Ribeiro-Santos *et al.*, 2017), o aceite de ajo (Wang *et al.*, 2011).

2.1.7. Biopelículas activas en alimentos

Las biopelículas elaboradas en base a biopolímeros proteicos o de polisacáridos, adicionando aceites esenciales y plastificantes, pueden utilizarse como envolturas o envases de alimentos cárnicos, lácteos, productos hortofrutícolas, alimentos preparados, entre otros (Atarés y Chiralt, 2016; Corrales *et al.*, 2014; Han, 2014; Lee, 2014). En productos hortofrutícolas se evaluaron en piña, mango, cerezo, sandía, fresa, mandarina, tomate zanahoria, manzana, guayaba, etc; en frutos secos, maní, nogal y nuez; en cárnicos y pescado, salmón ahumado, salmón congelado, anchoveta, merluza, pollo al horno y trucha arco iris; y en lácteos como el queso (Byun y Kim, 2014; Han, 2014). En la mayoría de los casos estudiados muestran beneficios al reducir la pérdida de agua y la permeabilidad al oxígeno, retardan la oxidación de los lípidos, mejoran la textura y el sabor; así como, disminuyen el recuento microbiano en la superficie del alimento (Corrales *et al.*, 2014; Han, 2014).

Rojas *et al.* (2013) elaboraron biopelículas usando harina de maíz azul, carragenina, glicerol, aceite de coco y glutaraldehído, como agentes antimicrobianos se empleó nisina y natamicina; se evaluaron su efecto en el envasado de queso con humedad intermedia; observaron que estas biopelículas tuvieron un excelente desempeño en cuanto a su acción actividad antimicrobiana mostrando los beneficios de esta tecnología emergente de conservación.

Ramos *et al.* (2012), desarrollaron recubrimientos comestibles activos con aislado proteico de suero lácteo, glicerol, goma guar, Tween 20 y aceite de girasol; como agente antimicrobiano añadieron natamicina y ácido láctico; la aplicación de este recubrimiento sobre el queso durante 60 días de almacenamiento, redujo la pérdida de agua, la dureza, cambio de color, inhibió el crecimiento microbiano, permitió el desarrollo de bacterias ácido lácticas y no alteró su calidad sensorial.

Shin *et al.* (2012), formularon biopelículas activas con algas rojas y extracto de semilla de pomelo, para envasar queso y tocino, después de 15 días de almacenamiento obtuvieron una reducción en las poblaciones de *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*. En los envases de tocino, disminuyó los valores de ácido tiobarbitúrico y peróxidos. En general, estas biopelículas prolongaron la vida en anaquel del queso y tocino.

2.2. MICROENCAPSULACIÓN EN ALIMENTOS

La microencapsulación es una técnica mediante la cual sustancias activas sólidas, líquidas o gaseosas (antioxidantes, antimicrobianos, etc.) se introducen en una matriz o sistema pared de naturaleza polimérica con el fin de proteger los activos del ambiente y de influencias que puedan resultar deletéreas, o bien para liberar en forma gradual los compuestos activos (Bakry *et al.*, 2016; Gharsallaoui *et al.*, 2007; Parra, 2011). Dentro del término microencapsulación, se incluyen a las microcápsulas, las microesferas, nanocápsulas y sustancias activas atrapadas o embebidas (Bustamante *et al.*, 2016; García *et al.*, 2013a).

En general, una microcápsula posee una estructura compuesta por dos elementos; el material encapsulado (material del núcleo o fase interna) y el agente encapsulante (pared) con propiedades hidrofílicas y/o hidrofóbicas; esta pared protege el núcleo contra el deterioro y liberación bajo condiciones deseadas; el tamaño y forma de las micropartículas dependen

del material encapsulante y del método utilizado para su obtención (Bustamante *et al.*, 2016; Sutaphanit y Chitprasert, 2014).

Entre las principales aplicaciones prácticas de la microencapsulación se destaca la industria farmacéutica, médica, textil, alimentos (Parra, 2011; Rai *et al.*, 2009); pesticida, agroquímica, cosmética, química (Fuchs *et al.*, 2006; Paulo y Santos, 2017); fragancias, tintes, antioxidantes, antimicrobianos y biomédica (García *et al.*, 2013a; Leimann *et al.*, 2009; Nogueira *et al.*, 2011).

En el área de alimentos, las aplicaciones de la microencapsulación se han ido incrementando debido a la protección de los materiales encapsulados de factores como calor, humedad, condiciones de procesamiento y empaque; mejorando sabor, aroma, estabilidad, valor nutritivo y apariencia de sus productos; además, permitiendo mantener su estabilidad, viabilidad y prolongando su vida útil (Bakry *et al.*, 2016; Gharsallaoui *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2018). Dentro de la industria de alimentos, una de las alternativas para la protección de los AEs es la microencapsulación; debido a que después de ser extraídos de su matriz son altamente inestables (Lu *et al.*, 2018; Maswal y Dar, 2014; Yang *et al.*, 2015)

2.2.1. Agentes encapsulantes

Existe una amplia variedad de agentes encapsulantes, formadores de pared o cobertura que pueden ser usados para encapsular ingredientes alimentarios y farmacéuticos; la elección de estos agentes depende principalmente del tipo de núcleo a encapsular y el método a emplear (Parra, 2011). En el caso de utilizar el método de secado por atomización, los requisitos para que un material encapsulante sea óptimo incluyen un alto grado de solubilidad, baja viscosidad, buenas propiedades emulsificantes y propiedades de secado, no higroscópico, sabor suave, no reactivo, y bajo costo (Bustamante *et al.*, 2016; García *et al.*, 2013a).

Los agentes encapsulantes más utilizados para microencapsulación mediante secado por atomización son: carbohidratos (almidón y derivados, dextrinas, maltodextrinas, jarabes de maíz, ciclodextrinas, carboximetilcelulosa y derivados); gomas (arábica, mezquite, alginato de sodio); lípidos (ceras, parafinas, grasas) y proteínas (gelatina, proteína de soya, caseinatos, suero de leche, zeína) (Bakry *et al.*, 2016; de Barros Fernandes *et al.*, 2014; Parra, 2011). Los más utilizados en la microencapsulación de AEs mediante atomización son la dextrina, maltodextrina, almidón modificado y derivados (de Barros Fernandes *et al.*, 2014; Huynh *et al.*, 2008; Kha *et al.*, 2014).

Dextrina: La dextrina es uno de los subproductos de almidón modificado más famosos; se obtiene mediante un proceso de dextrinización, que se define como hidrólisis parcial de almidón (Sarifudin y Assiry, 2014). Además, el término dextrina se utiliza para nombrar todos los productos de degradación del almidón independientemente del método que se produzcan (Wen *et al.*, 1990). Básicamente, la dextrina se puede producir usando tres métodos diferentes tales como hidrólisis enzimática, hidrólisis ácida y por la acción del calor, o combinación del calor y ácido, sobre el almidón; su fórmula química básica es $(C_6H_{10}O_5)_n$, donde “n” representa el número de moléculas de glucosa en la cadena, de 50 a 200 eslabones con más o menos ramificaciones (Jin *et al.*, 2018; Sarifudin y Assiry, 2014).

La dextrina tiene diversas aplicaciones en industrias de alimentos, papel y textiles. En la industria alimentaria se puede utilizar para potenciar la cremosidad en el procesamiento de alimentos, tal como en alimentos fritos y cocidos al horno, también puede usarse como relleno en pastas de alimentos y para la microencapsulación de sustancias activas antimicrobianas o antioxidantes (Jin *et al.*, 2018; Sarifudin y Assiry, 2014).

En el campo de la microencapsulación, la dextrina se ha usado para proteger aceite de girasol (Ahn *et al.*, 2008), aceite de pescado (Kagami *et al.*, 2003), porfirina (Luz *et al.*, 2008) entre otros.

2.2.2. Sustancias que se encapsulan

Hoy en día muchas sustancias pueden ser encapsuladas en partículas de polvo sólidos o emulsiones estructuradas. En la industria de alimentos se pueden encapsular aceite de limón, lípidos, sabores volátiles, componentes de aromas y oleorresinas, vitaminas, minerales (Fuchs *et al.*, 2006; Parra, 2011), probióticos, prebióticos, nutraceúticos, colorantes, enzimas, fitoesteroles, luteína, ácidos grasos, pigmentos vegetales, AEs, (Champagne y Fustier, 2007; Maswal y Dar, 2014; Nogueira *et al.*, 2011; Paulo y Santos, 2017), extractos de semillas de frutas como banano, uvas, guayaba, papaya, manzana, mora, granadilla, cítricos, entre otras sustancias (Rai *et al.*, 2009; Shaikh *et al.*, 2006; Timilsena *et al.*, 2016; Vergara *et al.*, 2014).

Dentro de los antes mencionados, la microencapsulación de AEs se constituye en una tecnología interesante en la industria de alimentos, al prevenir su volatilización y extender la vida útil de estos componentes biológicos (Huynh *et al.*, 2008; Leimann *et al.*, 2009; Parra, 2011). Uno de los AEs de gran interés en la industria alimentaria es el citral, debido

principalmente a su actividad antimicrobiana (Fancello *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2018; Saddiq y Khayyat, 2010).

Citral: Como se muestra en la Figura 4; el citral o 3,7-dimetil-2, 6-octadienal ($C_{10}H_{16}O$) es un aldehído monoterpenoide acíclico; compuesto por dos isómeros geométricos: el isómero E también nombrado como geranial (citral A o *cis*-citral) y el isómero Z como neral (citral B o *trans*-citral) (Maswal y Dar, 2014; Saddiq y Khayyat, 2010).

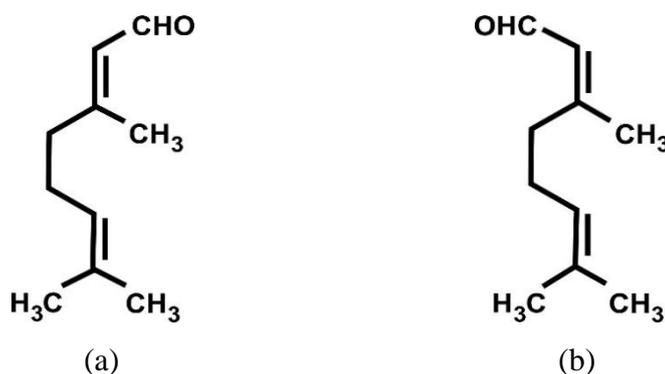


Figura 4. Estructura química del citral: (a) geranial (citral A) y (b) neral (citral B). Adaptado de Maswal y Dar (2014).

El citral es uno de los compuestos aromatizantes más importantes utilizado ampliamente en bebidas, alimentos, productos farmacéuticos, cosméticos, cremas dentales, chicles, cigarrillos y fragancias para su perfil de sabor característico. También se usa comercialmente en la producción de la vitamina A, iononas y metilionas (Gaonkar *et al.*, 2016; Maswal y Dar, 2014). Este AE puede ser extraído principalmente de hierba de limón o hierba luisa (*Cymbopogon citratus*), *Litsea cubeba* (verbena exótica o May Chang) y otras como el jengibre y algunas variedades de albahaca dulce; posee un fuerte sabor a limón (Iijima *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2015); también, se puede extraer de *Citrus aurantiifolia* en Perú es llamado “limón criollo” (Fagodia *et al.*, 2017), *Citrus limón* var. *pompia* (Fancello *et al.*, 2016)

Estudios previos realizados con citral mostraron que tiene capacidad para actuar como antioxidante (Fancello *et al.*, 2016) y un amplio espectro como antimicrobiano contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y hongos en pruebas in vitro (Fancello *et al.*, 2016; Leimann *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2018; Saddiq y Khayyat, 2010; Yang

et al., 2015); también tiene potencial para ser utilizado como un conservante natural en formulaciones de alimentos (Yang *et al.*, 2015).

Una de los principales inconvenientes del citral es su alta susceptibilidad a degradación oxidativa; se descompone rápidamente durante el almacenamiento por una serie de ciclación y reacciones de oxidación que resultan en la formación de una variedad de compuestos indeseables, por consiguiente, la creación de malos sabores que limitan la vida útil de este AE, transmitiéndolos a alimentos y bebidas en las cuales son utilizados; los productos de degradación más potentes de citral son el *p*-cimeno y *p*-metil acetofenona (Maswal y Dar, 2014).

La alternativa para proteger al citral de la oxidación y prevenir su degradación, es a través de la microencapsulación; para ello se debe tener en cuenta: (i) que este AE tiene una solubilidad acuosa muy baja; (ii) debe ser compatible con la matriz del alimento de manera que la apariencia del producto, textura, estabilidad o sabor no se ve alterada de manera adversa; y (iii) debe mantener su sabor y bioactividad potencial dentro del material durante su preparación, almacenamiento, transporte y utilización (Restrepo *et al.*, 2009).

Las técnicas para microencapsular citral y derivados de aceite de cítricos en la industria de alimentos, en su mayoría se basan en sistemas coloidales blandos, siendo los más usados las emulsiones de aceite en agua, nanoemulsiones, coacervación compleja, coacervación simple, extrusión, secado por atomización y secado por lecho fluidizado (Maswal y Dar, 2014). Entre todas estas técnicas, el secado por atomización es el método más común y económico (Balasubramani *et al.*, 2013); siendo el almidón modificado y derivados como la dextrina los más usados como agentes encapsulantes (Sarifudin y Assiry, 2014).

2.2.3. Técnicas de encapsulación

Existen diferentes técnicas para la realización del proceso de microencapsulación. Champagne y Fustier (2007) y Parra (2011), los clasifican en tres grandes grupos:

a. Procesos físicos

Secado por atomización (aspersión o pulverización), extrusión, recubrimiento por lecho fluidizado, y separación por suspensión rotacional.

b. Procesos físico-químicos

Coacervación simple o compleja, liposomas y gelificación iónica.

c. Procesos químicos

Inclusión molecular, polimerización interfacial y cristalización.

Secado por atomización

Dentro de todos los antes mencionados, el secado por atomización es el método más común, económico, antiguo y ampliamente utilizado para encapsular ingredientes alimentarios (Maswal y Dar, 2014). Según Vega (2011), destaca seis razones por las cuales esta técnica es ampliamente aplicada en la industria de alimentos: (1) reduce la reactividad del núcleo (o material encapsulado) en relación con su ambiente externo (luz, oxígeno y agua); (2) disminuye la velocidad de evaporación o transferencia del material encapsulado hacia el exterior; (3) promueve la fácil manipulación del material encapsulado; (4) controla la liberación del material núcleo, de manera tal de lograr un adecuado retraso en la entrega bajo un estímulo adecuado; (5) enmascara sabores u olores del material núcleo; y (6) permite diluir el material núcleo cuando es usado solo en pequeñas cantidades, para así lograr una dispersión uniforme a través de la mezcla.

El principio del secado por atomización se basa en la evaporación del disolvente que tiene lugar durante el contacto del fluido de alimentación con el aire caliente (Figura 5). La rápida evaporación mantiene la temperatura de las gotas relativamente baja, por lo que la calidad del producto no se ve afectada significativamente (Büchi Labortechnik AG, 2015; Estevinho y Rocha, 2016). La mezcla que se pulveriza puede ser un disolvente, emulsión, suspensión o dispersión (Anandharamakrishnan y Ishwarya, 2015).

Anandharamakrishnan y Ishwarya (2015), Estevinho y Rocha (2016) y, Ishwarya y Anandharamakrishnan (2017), mencionan que los cambios en el secado por atomización son debido a la influencia de cada una de las cuatro etapas (Figura 5) que participan en el proceso, que son: (1) atomización de la solución de alimentación; (2) interacción entre las gotas atomizadas y el gas de secado caliente; (3) evaporación de la humedad; y (4) separación de las partículas o producto seco.

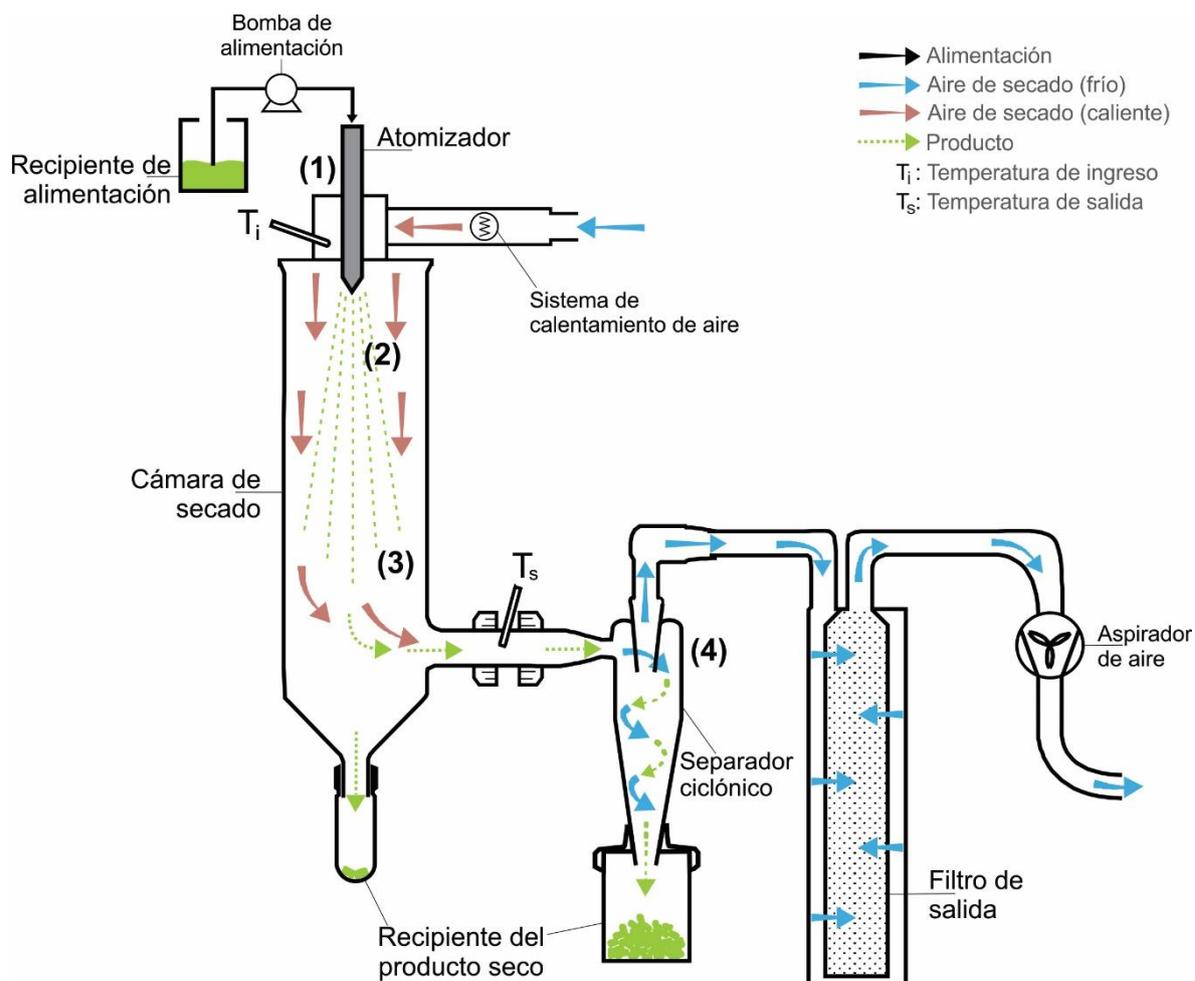


Figura 5. Esquema del secador por atomización co-corriente y sus etapas.

(1) Atomización; (2) Pulverización – contacto con el aire caliente; (3) Evaporación de la humedad; (4) Separación del producto; adaptado de Anandharamakrishnan y Ishwarya (2015), Büchi Labortechnik AG (2015) y, Estevinho y Rocha (2016).

La etapa 1: La atomización es el corazón de esta metodología, y es el primer proceso de transformación que experimenta el fluido de alimentación durante el secado por pulverización; que consiste en llevar las sustancias fluidas a partículas diminutas o gotitas, proceso que ocurre en los atomizadores, cuyo principio se rige por el fenómeno de desintegración del líquido (Anandharamakrishnan y Ishwarya, 2015). Existen diferentes tipos de atomizadores, los principales son los atomizadores rotatorios, atomizadores de boquilla a presión (o hidráulico) y los atomizadores de boquilla de dos fluidos (Anandharamakrishnan y Ishwarya, 2015; Ishwarya y Anandharamakrishnan, 2017).

La elección del uso del tipo de atomizador depende de las características del fluido de alimentación; y estos atomizadores influyen en el tipo de atomización, tamaño de gotas y partícula seca. Los atomizadores rotatorios son usados para materiales de alimentación

abrasivos, se caracterizan por producir tipo de aerosoles desde finos a gruesos y tamaños de gotas entre 30 y 120 μm ; los atomizadores de boquilla a presión son usadas para fluidos de alimentación de baja viscosidad, producen aerosoles gruesos y tamaños de gotas entre 120 y 250 μm ; y los atomizadores de boquilla de dos fluidos pueden manejar fluidos altamente viscosos, producen tipos de aerosoles de medio a grueso y tamaños de gotas entre 30 y 150 μm (Anandharamakrishnan y Ishwarya, 2015; Estevinho y Rocha, 2016; Ishwarya y Anandharamakrishnan, 2017).

Etapa 2: Esta etapa y las subsiguientes del proceso de secado por atomización, constituyen la fase de formación de partículas. Esta etapa se lleva a cabo en la cámara de secado y consiste en el contacto directo del fluido atomizado con el aire caliente, permitiendo una rápida evaporación de la humedad de la superficie de todas las gotas de una manera uniforme. Teniendo en cuenta la dirección del flujo de alimentación y aire, puede ocurrir en flujo co-corriente o flujo contra corriente. En el flujo co-corriente (Figura 5), el fluido de alimentación y el aire de secado pasan a través de la cámara de secado en la misma dirección. En contraste, en la configuración contracorriente, el fluido de alimentación y medio de secado ingresan en los extremos opuestos de la cámara de secado (Anandharamakrishnan y Ishwarya, 2015; Land, 2012)

Etapa 3: Corresponde a la evaporación de la humedad de las gotas, se produce en la cámara de secado. Es el paso más crítico en la formación de partículas, por ende, influye directamente en la morfología del producto final. En el proceso de la cinética de secado ocurren fenómenos de transferencia de calor y de masa en el material de secado. Durante este proceso, las gotas van reduciendo su humedad e incrementado la concentración de solutos, conllevando a la formación de una corteza delgada en la superficie de las gotas, proceso conocido como “formación de costras”. Después de la formación de la corteza, la eliminación de la humedad se convierte en un proceso controlado por difusión, y la velocidad de evaporación depende de la velocidad de difusión del vapor de agua a través de la superficie seca. Es importante destacar que, la temperatura del proceso en esta etapa y las dimensiones de la cámara de secado (largo y diámetro), influyen en el contenido de humedad y tamaño de las partículas (Anandharamakrishnan y Ishwarya, 2015; Ishwarya y Anandharamakrishnan, 2017)

Etapa 4: Corresponde a la separación de partículas, que se llevan a cabo en dos sistemas: separación primaria y secundaria. Teniendo en cuenta que la cámara de secado a menudo

tiene un fondo cónico conectado a un recipiente colector, para facilitar la recolección del producto seco de mayor tamaño y humedad; durante la separación primaria, estas partículas se recogen en este recipiente de la cámara de secado. Las partículas de menor tamaño y menor humedad son conducidas a un separador ciclónico, proceso que corresponde a la separación secundaria; este separador ciclónico, también tiene un fondo cónico conectado a un recipiente donde son depositadas las partículas secas principales utilizables en siguientes procesos. La corriente de aire cargada con la humedad evaporada se extrae desde el centro del separador cónico hacia su parte superior y se descarga a través de una salida lateral accionada por un aspirador de aire, pasando previamente por un filtro, hasta donde pueden llegar partículas de menor tamaño que son arrastrados por el aire de escape (Anandharamakrishnan y Ishwarya, 2015; Ishwarya y Anandharamakrishnan, 2017; Land, 2012).

En general, de lo antes expuesto, el secado por atomización depende de factores como: propiedades del material de alimentación, diseño del equipo y parámetros de operación (presión de atomización; velocidad de flujo, viscosidad y densidad del material de alimentación; temperatura de entrada y salida del aire en el secador; y tiempo de residencia de las partículas en la cámara de secado). Estos factores influyen en la calidad del producto final, como en la: humedad, tamaño y morfología de la partícula (Anandharamakrishnan y Ishwarya, 2015; Estevinho y Rocha, 2016; Ishwarya y Anandharamakrishnan, 2017). Por lo tanto, es necesario principalmente optimizar la composición y velocidad de flujo de la solución de alimentación, así como, la presión y temperatura de entrada y salida del aire (Estevinho y Rocha, 2016). La literatura reporta que para el caso de microencapsulación de AEs la temperaturas de ingreso del aire al secador varían entre 120-200 °C y de salida entre 70 – 95 °C (Maswal y Dar, 2014).

2.2.4. Variables que se evalúan en microencapsulación

Las variables independientes y variables dependientes o respuestas que se evalúan en investigaciones de microencapsulación de alimentos, se describen a continuación:

a. Variables independientes

Las principales variables independientes que se estudian en microencapsulación de alimentos son: (1) el tipo de agente encapsulante; (2) la relación entre el núcleo y el agente encapsulante; y (3) la temperatura de entrada del aire al secador. Los demás parámetros como presión de atomización, flujo del aire en el secador y flujo de alimentación de la emulsión

se mantienen constantes (Ruktanonchai *et al.*, 2011, García *et al.*, 2013a, Bustamante *et al.*, 2016).

b. Variables dependientes

Las principales variables dependientes que se evalúan en microencapsulación de alimentos son: (1) morfología de la microcápsula; (2) eficiencia de encapsulación; (3) estudios de liberación *in vitro*; y (4) cinética de liberación (Ruktanonchai *et al.*, 2011, García *et al.*, 2013a, Bustamante *et al.*, 2016).

2.3. ESPECTROSCOPIA EN EL INFRARROJO CERCANO (NIR) EN EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS

2.3.1. Generalidades de la espectroscopía NIR

La técnica espectroscópica en el infrarrojo cercano (near infrared – NIR), consiste esencialmente en la emisión de un haz de luz monocromática sobre la muestra, la cual, en función de su composición y de la naturaleza de los enlaces presentes en sus moléculas, realizará una absorción selectiva de energía y reflejará otra determinada cantidad, la cual es cuantificada por unos detectores presentes en el instrumento NIR (Wehling, 2010).

La espectroscopía NIR tiene entre sus ventajas: medir varios componentes en forma rápida y simultánea, no es destructiva, de bajo costo, no requiere reactivos y no requiere preparación intensiva de la muestra (Kawano, 2007); en comparación con los métodos químicos de referencia (cromatografía de gases, cromatografía líquida, análisis químicos proximales, entre otros), que demandan tiempos prolongados, uso de reactivos, preparación previa de muestras y altamente costosos (Roggo *et al.*, 2007). La espectroscopía NIR tiene como principio medir la respuesta, principalmente vibraciones de enlaces -CH, -OH, -SH y -NH, de una muestra cuando es sometida a energía electromagnética entre 1100 a 2500 nm conformando así huellas o perfiles espectrales (Roggo *et al.*, 2007; Wehling, 2010).

La correlación entre los perfiles espectrales y la composición analítica o características obtenidas mediante métodos referenciales de las muestras, permite obtener modelos predictivos para el análisis automático e instantáneo de miles de muestras; el cual se realiza con modelos quimiométricos (Benito *et al.*, 2001; Heise y Winzen, 2007; Roggo *et al.*, 2007).

2.3.2. Quimiometría en la espectroscopía NIR

La quimiometría es una disciplina que utiliza la interacción de métodos matemáticos y estadísticos en los procesos de medición química (Kumar *et al.*, 2014). La quimiometría reagrupa varios temas, como el diseño de experimentos, los métodos de extracción de información (modelado, clasificación y prueba de suposiciones) y las técnicas que permiten comprender los mecanismos químicos (Roggo *et al.*, 2007).

Según Castro *et al.* (2018), Roggo *et al.* (2007) y Vásquez *et al.* (2018), los modelos quimiométricos comúnmente utilizados para el análisis de los espectros NIR, se agrupan en tres (3) técnicas principales que son:

- 1) **Pretratamientos matemáticos** para mejorar la información que se busca para el estudio y disminuir la influencia de la información secundaria contenida en los espectros. Los pretratamientos clásicos son normalizaciones, derivados y suavizado. Más detalle, los lectores pueden recurrir a los textos de referencia (Heise y Winzen, 2007; Massart *et al.*, 2003).
- 2) **Métodos de clasificación** para agrupar muestras de acuerdo con sus espectros.
- 3) **Métodos de regresión** para vincular el espectro con propiedades cuantificables de las muestras.

En general los modelos quimiométricos más usados en la espectroscopía NIR, se podrían agrupar en métodos quimiométricos cualitativos y métodos quimiométricos cuantitativos (Roggo *et al.*, 2007).

a. Métodos quimiométricos cualitativos

El análisis cualitativo se refiere a la clasificación de las muestras según sus espectros NIR; los más utilizados:

- **Análisis de componentes principales (principal component analysis - PCA):** es un método de reducción de características que constituye la base para el tratamiento de datos multivariados; la aplicación más importante del PCA es la reducción del número de variables (puntajes), generando nuevas variables (cargas) que son combinaciones de las originales, las cuales se pueden interpretar como espectros (Oliveira-folador *et al.*, 2018; Roggo *et al.*, 2007).
- **Análisis discriminante lineal (linear discriminant analysis - LDA):** es un método lineal y paramétrico con características discriminantes; que se enfoca en encontrar límites óptimos entre las clases (Kumar *et al.*, 2014). LDA y PCA son métodos de

reducción de funciones; la diferencia radica en que, el PCA selecciona una dirección que retiene la estructura máxima en una dimensión inferior entre los datos; mientras que LDA selecciona las direcciones que logran una separación máxima entre las diferentes clases (Massart *et al.*, 2003; Roggo *et al.*, 2007).

- **Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (partial least squares discriminant analysis - PLS-DA):** es un método paramétrico y lineal; estos métodos identifican variables latentes en los espacios presentados que tienen una covarianza máxima dentro de las variables predictoras (Tenenhaus, 1998).
- **Coefficiente de correlación (correlation coefficient - CC):** es un método matemático común en NIR, se define como el coseno del ángulo entre el vector para el espectro de la muestra y el espectro promedio para cada clase de la base de datos (Heise y Winzen, 2007).
- **Redes neuronales artificiales (artificial neural networks - ANN):** son métodos de clasificación no lineal y no paramétrico, inspirados en la arquitectura neuronal del cerebro; se han utilizado ampliamente para la predicción y clasificación (Salchenberger *et al.*, 1998). Se compone de varias capas de neuronas: capas de entrada, ocultas y salidas. Una neurona es una unidad de procesamiento que se transforma mediante una entrada de función de activación en un dato de salida (Castro *et al.*, 2017).

b. Métodos quimiométricos cuantitativos

Una vez que se ha logrado clasificar las muestras, puede ser útil saber con más precisión en qué medida las muestras son diferentes; para ello es necesario el desarrollo del modelo cuantitativo. Los más utilizados en NIR son:

- **Regresión multilineal (Multi-linear regression - MLR):** es el más antiguo entre los métodos presentados y se utiliza cada vez menos en las aplicaciones debido a la mejora de la potencia de cálculo. Esta regresión permite establecer un enlace entre un número reducido de longitudes de onda (o número de onda) y una propiedad de las muestras (Roggo *et al.*, 2007).
- **Regresión de componentes principales (principal component regression - PCR):** se divide en dos pasos; primero, los datos espectrales se tratan con una PCA; luego, se realiza una MLR en las puntuaciones como variables predictivas (Heise y Winzen, 2007; Roggo *et al.*, 2007).

- **Regresión parcial por mínimos cuadrados (Partial least squares regression - PLSR):** en este método las regresiones se calculan con algoritmos de mínimos cuadrados. El objetivo de la PLSR es establecer un enlace lineal entre dos matrices, los datos espectrales X y los valores de referencia Y . Esta técnica modela X e Y a fin de descubrir las variables en la matriz X que mejor describa la matriz Y (Mehmood *et al.*, 2012).
- **Redes neuronales artificiales (Artificial neural networks – ANN):** estos métodos también son considerados para los análisis cuantitativos, cuyo concepto fue descrito anteriormente. La principal ventaja es su capacidad para construir modelos en torno a una relación no lineal entre los datos medidos y las propiedades pronosticadas (Castro *et al.*, 2017; Plumb *et al.*, 2005).

En los últimos años, la espectroscopía NIR y la quimiometría han demostrado su eficacia para análisis cualitativos y cuantitativos en campos tan diferentes como las ciencias médicas (Heise, 2007), control de procesos industriales (Siesler, 2007), productos químicos (Ozaki, 2007) en la agricultura y alimentos (Kawano, 2007), entre otros.

2.3.3. Antecedentes del uso de la espectroscopía NIR en el análisis de alimentos

La literatura reporta un variado uso de la espectroscopía NIR en las industrias agropecuarias y alimentarias. Esta tecnología se han utilizado para la predicción de componentes bioquímicos de diversas muestras como el trigo (García *et al.*, 2013b), *Lupinus albus* (Miranda, 2011), papa (Arruabarrena, 2012), cacao y derivados (Pons, 2010), sorgo (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2005), grano de maíz (Vásquez *et al.*, 2004; Vásquez y Mayorga, 2005), carne de cerdo (García, 2002), incluso alimentos y pastos destinados a la alimentación animal como ensilaje de maíz, heno, pastos de praderas, pastos tropicales y forrajes (Cozzolino *et al.*, 2003; Cozzolino *et al.*, 2006; Cuevas, 2005; Sandova-Mejía *et al.*, 2008; Valenciaga y Simoes, 2006).

En cuanto al uso del NIR para la determinación del citral y aceites esenciales similares, estudios reportan que esta técnica se usó en el rango de 2000 a 1500 cm^{-1} en aceites esenciales de limón y naranja, siendo los picos 1684 cm^{-1} y 1677 cm^{-1} los más confiables para determinar citral (López *et al.*, 1993). Aceites esenciales de cítricos como naranja (*Citrus sinensis* L.), pomelo (*Citrus × paradisi* MacF.), mandarina (*Citrus deliciosa* Ten.), limón (*Citrus limon* L.) y lima (*Citrus aurantifolia* C.) fueron escaneados con espectroscopía

NIR en el rango de 1100 a 2500 nm, los análisis quimiométricos se realizaron con software comercial NIRS2; obtuvieron que el principal componente de estos aceites fue el limoneno con 85.6%, seguido por el β -pineno con 12% y γ -terpineno con 11.5%; valores similares a los obtenidos con los análisis de referencia realizados con GC-FID; por otro lado, cuando evaluaron el espectro del limoneno puro, observaron sobretonos y bandas de estiramiento y vibraciones para $-CH$, en las áreas de 1634-1766 y 2250-2350 nm (Steuer *et al.*, 2001).

Sin embargo, no se ha encontrado evidencia del uso de la tecnología NIR para la determinación de la eficiencia de encapsulación (EE).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MICROENCAPSULACIÓN DEL CITRAL MEDIANTE SECADO POR ATOMIZACIÓN: CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

3.1.1. Lugar de estudio

El proceso de optimización de la microencapsulación y la caracterización físico-química de las micropartículas de citral se realizaron en el Laboratorio de Investigación del Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago de Chile.

La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó en el Laboratorio de Investigación de agua y suelos, Área de Microbiología, de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), Chachapoyas, Perú.

3.1.2. Reactivos y microorganismos

Los reactivos usados en la producción y análisis de las micropartículas fueron lecitina de soya (LS) (Epikuron® 145 V, Cargill, Alemania), dextrina (Dx) (Amisol® 4810, donado por Ingredion, Perú), citral mixture cis y trans (Ct) $\geq 96\%$ (Sigma - Aldrich, Alemania), citral analytical estándar $\leq 100\%$ (Sigma - Aldrich, Alemania) y n-heptano al 99% (Merck, Alemania).

Los medios de cultivo que se emplearon para la evaluación de la actividad antimicrobiana fueron: Caldo nutritivo (CN), agar para conteo en placa (ACP), agar nutritivo (AN) y peptona bacteriológica. Los medios usados se obtuvieron de Merck (Alemania). Las cepas empleadas para evaluar la actividad antimicrobiana de las micropartículas de citral incluyen *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Salmonella entérica*, subespecie: entérica, serovar: Typhimurium (*S. entérica*) que pertenecen a cepas Gram-negativas (G-) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Bacillus cereus* (*B. cereus*) que son cepas Gram positivas (G+). Estas cepas certificadas procedieron de los laboratorios de La Molina Calidad Total, de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Lima, Perú.

3.1.3. Preparación de las micropartículas de citral

La encapsulación del citral se realizó mediante secado por atomización, usando dextrina como agente encapsulante y lecitina de soya como emulsificante.

Todas las formulaciones se prepararon teniendo en cuenta 100 g de emulsión. En primer lugar se preparó una pre-emulsión, para lo cual se disolvió 1 g de LS en 30 mL de agua destilada a 50°C, se mantuvo en agitación constante (350 rpm) por 15 minutos, manteniendo tapado el recipiente con parafilm para reducir pérdidas del disolvente por evaporación, se enfrió a 30 °C, luego se agregó 1 g de Ct mixture y se homogenizó por 3 minutos a 15000 rpm con un homogeneizador Polytron PT 2100 (Kinematica AG, Suiza). Paralelamente, Dx (5 – 20 g) se disolvió en agua destilada (48 – 63 g) a 50 °C, manteniendo en agitación constante por 3 horas, durante este tiempo el recipiente se tapó con parafilm para reducir pérdidas por evaporación, se enfrió a 30 °C y luego se mezcló con la preemulsión.

La mezcla resultante se homogenizó a 15000 rpm durante 3 minutos y se alimentó a un secador mini Spray-Dryer Büchi modelo B-290 (Suiza), con alimentación y flujo de aire de secado en configuración co-corriente. Las condiciones de proceso en el secador fueron: temperatura de alimentación de la solución de 42 ± 2.5 °C, alimentación de la solución de 5% con un flujo de 5 mL/min, presión de atomización de 50 mbar, porcentaje de aspiración de 100%, flujo de aire de 600 L/h y TEA entre 120 y 200°C. La temperatura de salida del aire del secador varió entre 70 y 135 °C. Las micropartículas se almacenaron a -20 °C en tubos falcón de 45 mL hasta su análisis.

3.1.4. Determinación del rendimiento en el proceso de secado

El rendimiento (R) es la relación entre el sólido (micropartículas) obtenido a la salida (recipiente del producto seco unido al separador ciclónico y parte cónica del separador ciclónico, ver Figura 5) y el que se alimenta al equipo al inicio del proceso de secado; se calculó utilizando la ecuación (1), de acuerdo a la metodología propuesta por García *et al.* (2013a), Sutaphanit y Chitprasert (2014) y, Vergara *et al.* (2014).

$$R (\%) = \frac{W_M(g)}{W_{ST}(g)} \cdot 100 \quad (1)$$

Donde W_M es el peso de las micropartículas después del secado por atomización y W_{ST} corresponde a los sólidos totales en la solución de alimentación (sumatoria de LS, Ct y Dx).

3.1.5. Determinación del citral superficial (CS_{ct}) y eficiencia de encapsulación (EE)

Las micropartículas de citral (0.2 g) se dispersaron manualmente en hexano (2 mL), se agitaron manualmente por 1 min a temperatura ambiente, se centrifugaron a 2000 rpm durante 1 min, luego el sobrenadante se transfirió a viales ámbar de 2 mL para su inyección en el cromatógrafo de gases (GC- Gas Chromatograph) (Bustamante et al., 2016; Vergara et al., 2014). La concentración de citral superficial (S_{ct}), el porcentaje de citral superficial (CS_{ct}) y la EE (porcentaje de citral encapsulado) se calcularon de acuerdo con las ecuaciones (2), (3) y (4), respectivamente (García *et al.*, 2013a).

$$\text{Citral superficial} = \frac{CSS_{ct}}{W_{mcp}} \quad (2)$$

$$CS_{ct} (\%) = \frac{\text{Citral superficial}}{\text{Citral teórico total}} \times 100 \quad (3)$$

$$EE (\%) = 100 - CS_{ct} (\%) \quad (4)$$

Donde citral superficial esta dado en mg citral/ g mcp; CSS_{ct} es la concentración de citral superficial en el solvente (mg citral en 2 mL de hexano), W_{mcp} es el peso de la micropartícula (g); y el citral teórico total (mg citral/ g sólidos totales) se calculó con la ecuación (5) (García *et al.*, 2013a).

$$\text{Citral teórico total} = \frac{C_e (mg)}{ST (g)} \quad (5)$$

Donde C_e es el citral adicionado a la emulsión durante la formulación y ST son los sólidos totales en la solución de alimentación formada por la suma de la lecitina de soya, citral y dextrina.

3.1.6. Cromatografía de gases

El contenido de citral superficial de las micropartículas se determinó en un GC (7890A, Agilent Technologies, USA) equipado con una columna capilar de sílice fundido DB-5MS (30m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μ m film thickness, J&W Scientific, USA) y un detector de ionización de llama (FID- flame ionization detector). La temperatura del inyector y el detector fueron de 250 °C. Como gas transportador se utilizó nitrógeno a un flujo de 1.11 mL/min. El volume de inyección fue de 1 μ L. La temperatura de la columna se programó inicialmente a 60 °C por 5 min, luego se calentó hasta 120 °C a una razón de 5 °C/ min, posteriormente hasta 250°C a un ratio de 10 °C/ min; siguiendo la metodología propuesta

por Ruktanonchai *et al.* (2011). El cromatograma mostró dos (2) picos correspondientes a cada isómero del citral (geranial and neral); la suma de ambos picos se cuantificó como citral utilizando una curva de calibración (1 – 2000 µg/mL, $R^2 = 0.999$). Los análisis se realizaron por duplicado para cada repetición y los resultados se expresaron en mg citral/g de micropartícula (mg ct/ g mcp) (García *et al.*, 2013a).

3.1.7. Caracterización de las micropartículas de citral óptimas

a) Determinación del rendimiento (R) y eficiencia de encapsulación (EE)

A las micropartículas de citral obtenidas en condiciones óptimas se determinó su R y EE de acuerdo a lo descrito en los numerales 3.1.4 y 3.1.5, respectivamente.

b) Contenido de humedad, actividad de agua e higroscopicidad

El contenido de humedad (H) que consiste en determinar la pérdida de peso, medida en mayor parte por la pérdida de agua libre o absorbida de una muestra sometida a condiciones controladas de calor, se determinó de acuerdo al método AOAC 14.004 (AOAC, 1997) y (Nielsen, 2010), empleando una termo-balanza digital (Analizador rápido de humedad con precisión de 0.01%, A&D MX-50, Japón).

La actividad de agua (a_w) que es la medida del estado de energía del agua en un sistema y generalmente se mide equilibrando un producto con su fase de vapor y midiendo la humedad relativa de esta fase de vapor (Bradley, 2010); este parámetro se determinó por el método del punto de rocío usando un HicroLab (Rotronic, Suiza) a 20 ± 0.3 °C, siguiendo la metodología descrita por Bustamante *et al.* (2016).

La higroscopicidad (Hg), que viene a ser la capacidad de las micropartículas para absorber la humedad atmosférica, se determinó de acuerdo a los procedimientos descritos por Cai y Corke (2000).

c) Morfología y tamaño de partícula

La morfología (estructura externa) de las micropartículas de citral obtenidas en condiciones óptimas se estudió mediante microscopía electrónica de barrido (SEM - Scanning Electron Microscope). Las muestras se cubrieron con oro/paladio utilizando un equipo Varian Vacuum Evaporator PS 10E y se analizaron utilizando un microscopio LEO 1420VP (LEO Microscopía Electrónica Ltd., Cambridge, UK) operado a 20 kV. Las imágenes se

obtuvieron digitalmente utilizando un software EDS 7424 (Oxford Instruments, Oxford, UK) (García *et al.*, 2013a; Vergara *et al.*, 2014).

El tamaño de partícula se determinó mediante dispersión de luz láser (DLL) usando un Mastersizer X (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) con una lente de 300 mm; las micropartículas se dispersaron en propilenglicol antes del análisis, siguiendo las metodologías planteadas por Bustamante *et al.* (2016) y Vergara *et al.* (2014).

3.1.8. Pruebas microbiológicas

a) Preparación de suspensiones de microorganismos

Las cepas bacterianas que se emplearon en las pruebas microbiológicas fueron *E. coli*, *S. entérica*, *S. aureus* y *B. cereus*. Se realizó siguiendo la metodología planteada por Wang *et al.* (2009), con algunas modificaciones. Se utilizó CN para la activación de las bacterias. Cada cepa se transfirió de los tubos en posiciones inclinadas almacenadas a 4°C a 100 mL de CN contenidas en un matraz erlenmeyer y se cultivó a 37°C durante 18 h con agitación constante. Luego, para la determinación de las UFC/mL (unidades formadoras de colonias – UFC), se preparó diluciones seriadas hasta 10^{-6} en agua peptonada al 0.1%; de las últimas tres diluciones, mediante siembra por superficie, se transfirió 0.1 mL a placas con ACP y se incubó a 37 °C por 18 h en estufa (Binder, BD 53, Alemania).

Las diluciones 10^{-1} , que tuvieron una concentración celular promedio de 10^7 UFC/mL se usaron para la evaluación de la actividad antimicrobiana.

b) Ensayo de actividad antibacteriana de micropartículas de citral

Para determinar la actividad inhibidora antibacteriana se usó el método de difusión en disco, planteada por Sivropoulou *et al.* (1996) y Wang *et al.* (2009), con modificaciones. Discos de papel de filtro (Whatman #2, con 6 mm de diámetro) que contienen 5 µL de solución de micropartículas (mcp) [300 mg mcp (137.56 mg citral / g mcp) en 1 mL de heptano diluido en 1 mL de agua destilada] y 5 µL de solución de citral mixture puro como control, con concentraciones equivalentes (41 mg de citral en 1 mL de heptano diluido en 1 mL de agua destilada), ambos fueron aplicados sobre la superficie de placas con AN sembradas previamente con las cepas bacterianas de ensayo. Las placas se incubaron durante 18 h a 37°C en estufa (Binder, BD 53, Alemania). Utilizando un vernier manual (Kern, Alemania), se midió el diámetro de la zona de inhibición transparente frente al microorganismo de

ensayo y se calculó la relación de inhibición, comparando el diámetro de inhibición de la micropartícula de citral, con el del citral mixture puro (control) de acuerdo a la ecuación (6) propuesta por Wang *et al.* (2009).

$$\text{Relación de inhibición (\%)} = \frac{M}{C} \times 100 \quad (6)$$

Donde M es el diámetro en mm de la zona de inhibición de las micropartículas en ensayo y C es el diámetro en mm de la zona de inhibición del control.

Para comprobar que el efecto de los agentes antimicrobianos provenía de los aceites esenciales y no del heptano (que se utilizó como disolvente), se utilizó como control una alícuota de heptano puro (5 μL), verificando que este solvente no inhibía el crecimiento de los microorganismos. El experimento se realizó por cuadruplicado.

c) Ensayo de actividad antibacteriana del citral mixture puro

Se preparó diluciones seriadas de citral mixture en heptano (0, 0.08, 0.2, 0.4, 0.8, 2.0, 4.0, 8.0, 40.0 y 80.0 mg/mL), basadas en estudios previos (Guarda *et al.*, 2011; Leimann *et al.*, 2009). Se empleó el método de difusión en disco, siguiendo los mismos procedimientos antes descritos para el ensayo antibacteriano de las micropartículas de citral. Discos de papel filtro con 5 μL de las diluciones seriadas de citral, fueron aplicados sobre la superficie de placas con AN sembradas previamente con los microorganismos de ensayo. Las placas se incubaron durante 18 h a 37°C. Utilizando un vernier manual (Kern, Alemania), la evaluación de la actividad antibacteriana del citral se realizaron midiendo el diámetro (mm) de la zona de inhibición transparente frente al microorganismo de ensayo (Wang *et al.*, 2009).

3.1.9. Diseño experimental y análisis estadístico

a) Para la optimización de las micropartículas de citral

Las variables independientes (relación Ct:Dx y TEA) y variables dependientes (Rendimiento del proceso de secado y eficiencia de encapsulación), para la optimización de las micropartículas de citral, se eligieron en función a investigaciones similares (Balasubramani *et al.*, 2013; Frascareli *et al.*, 2012; García *et al.*, 2013; Huynh *et al.*, 2008; Kha *et al.*, 2014; Urzúa *et al.*, 2017).

La optimización de las micropartículas se realizó empleando un diseño compuesto central (CCD) con arreglo factorial 2^2 más estrella con 12 experimentos: cuatro puntos

experimentales, cuatro puntos axiales y cuatro puntos centrales (empleados para determinar el error experimental) (Sutaphanit y Chitprasert, 2014; Vergara *et al.*, 2014). La relación Ct:Dx (1:5 - 1:20) y temperatura de entrada del aire al secador (TEA) (120 - 200°C) se evaluaron como variables independientes (Tabla 1). El rendimiento del proceso de secado (R) y eficiencia de encapsulación (EE) fueron las variables dependientes. Los datos se ajustaron a un modelo de regresión de segundo orden, de acuerdo a la ecuación (7) (Urzúa *et al.*, 2017). Todos los experimentos se realizaron al azar para evitar el sesgo sistemático.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^1 \sum_{j=i+1}^2 \beta_{ij} X_i X_j \quad (7)$$

Donde Y representa la variable respuesta, los subíndices i y j variaron de uno (1) a la cantidad de variables ($n = 2$); β_0 fue la constante de intersección; los valores de β_i fueron coeficientes de los efectos lineales; los valores de β_{ii} fueron los coeficientes de los efectos cuadráticos; los valores de β_{ij} fue el coeficiente de la interacción entre los factores, y X_i y X_j fueron los niveles de las variables independientes.

Tabla 1. Condiciones del diseño experimental para la elaboración de micropartículas de emulsión de citral y dextrina mediante secado por atomización

Exp ¹ .	TEA (°C)	Relación (Ct:Dx)	Pre-emulsión			Dx (g)	Agua (g)	Total (g)
			Ct (g)	LS (g)	Agua (g)			
1	120 (-1)	1:5 (-1)	1.0	1.0	30.0	5.0	63.0	100
2	120 (-1)	1:12.5 (0)	1.0	1.0	30.0	12.5	55.5	100
3	120 (-1)	1:20 (+1)	1.0	1.0	30.0	20.0	48.0	100
4	160 (0)	1:5 (-1)	1.0	1.0	30.0	5.0	63.0	100
5	160 (0)	1:12.5 (0)	1.0	1.0	30.0	12.5	55.5	100
6	160 (0)	1:12.5 (0)	1.0	1.0	30.0	12.5	55.5	100
7	160 (0)	1:12.5 (0)	1.0	1.0	30.0	12.5	55.5	100
8	160 (0)	1:12.5 (0)	1.0	1.0	30.0	12.5	55.5	100
9	160 (0)	1:20 (+1)	1.0	1.0	30.0	20.0	48.0	100
10	200 (+1)	1:5 (-1)	1.0	1.0	30.0	5.0	63.0	100
11	200 (+1)	1:12.5 (0)	1.0	1.0	30.0	12.5	55.5	100
12	200 (+1)	1:20 (+1)	1.0	1.0	30.0	20.0	48.0	100

¹Número de experimento. TEA: temperatura de entrada del aire al secador. LS: Lecitina de soya. Ct: Citral. Dx: dextrina.

El análisis de varianza (ANOVA), la prueba de falta de ajuste y la determinación de los coeficientes de regresión se realizaron con el software informático estadístico Statgraphics 15.2 (StatPoint Inc., USA, 2015). La metodología superficie de respuesta (MSR) se usó para

determinar las condiciones óptimas para cada variable independiente. La optimización se realizó utilizando la función deseabilidad (FD), que consiste en definir una función en el espacio de factores que estima la deseabilidad global (DG) del producto en cada punto, de esta forma, convierte el problema de optimización multivariado en un problema de optimización univariado (Gutiérrez y De la Vara, 2012). En el presente estudio para la optimización de la FD, todas las variables dependientes fueron maximizadas.

b) Para la caracterización de las micropartículas y pruebas microbiológicas

Los resultados de caracterización de micropartículas y pruebas microbiológicas correspondieron a la media aritmética de tres y cuatros repeticiones, respectivamente \pm desviación estándar o \pm error estándar. Se realizaron ANOVA unidireccional al 5% de significancia, para establecer diferencias significativas entre los valores de la actividad antibacteriana de las micropartículas de citral entre cada bacteria evaluada; en el caso de existir diferencias significativas entre los datos, se empleó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha \leq 5\%$). Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante el programa Minitab Release 17.1.0.0 (Minitab Inc., USA, 2016).

3.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO SUPERFICIAL DE CITRAL EN MICROPARTÍCULAS MEDIANTE ESPECTROSCOPIA NIR Y HERRAMIENTAS QUIMIOMÉTRICAS

3.2.1. Lugar de estudio

La obtención de las micropartículas de citral y la evaluación del contenido superficial de citral en estas micropartículas, mediante cromatografía de gases, se realizaron en el Laboratorio de Investigación del Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago de Chile.

La obtención de los perfiles espectrales de las micropartículas de citral, se realizó en el Laboratorio de Investigación de Nutrición y Bromatología de Alimentos, de la UNTRM, Chachapoyas, Perú.

3.2.2. Reactivos

Los reactivos usados en la producción y análisis de las micropartículas fueron los mismos citados en el numeral 3.1.2.

3.2.3. Encapsulación

La encapsulación de citral mediante secado por atomización se realizó variando la relación citral: dextrina (Ct:Dx) de 1: 5 a 1:20 y la temperatura de entrada de aire (TEA) al secador de 120 a 200 °C, formando así doce tratamientos experimentales, como se presenta en la Tabla 1.

Los procedimientos para la preparación de las micropartículas fueron descritos en el numeral 3.1.3.

3.2.4. Determinación del contenido superficial de citral (CS_{Ct})

La determinación del contenido superficial de citral (CS_{Ct}); así como, el análisis GC empleado para el mismo fin, fueron descritos en los numerales 3.1.5 y 3.1.6.

3.2.5. Espectroscopía NIR

Los espectros de absorbancia se midieron de acuerdo a los trabajos de Escuredo *et al.* (2014) y Steuer *et al.* (2001). Se usó un espectrómetro NIR Unity Scientific (SpectraStar 2500XL, EE.UU), equipado con lámpara halógena de tungsteno como fuente de luz y detector InGaAs (Indio – Galio – Arsénico) en el rango de 1100 a 2500 nm, con una resolución de 3 nm, obteniendo 467 longitudes de ondas. Las mediciones se realizaron en el modo reflectancia aplicado directamente a las micropartículas sin tratamiento ni manipulación previa, utilizando una cubeta de cuarzo de 3.5 cm de diámetro interno y 1.0 cm de espesor, donde se adicionaron 2.3±0.5 g de micropartículas y 1.2 mL para las diferentes concentraciones de citral.

Las diferentes diluciones de citral al 25, 50 y 100%, se prepararon con éter de petróleo a una concentración del 100% (Spectrum Chemical, EE. UU.); se realizaron cuatro repeticiones y se obtuvo sus perfil espectral medio de cada concentración.

3.2.6. Pretratamiento de los perfiles espectrales

Como explican Elmasry y Nakauchi (2016), en la mayoría de los casos, los perfiles espectrales extraídos contienen ruido y variabilidad; esta variabilidad requiere el uso de mejoramiento espectral, como el filtrado espectral, el suavizado, la normalización, el centrado medio y el auto-escalado. En el presente estudio, de manera similar a los trabajos

de Vásquez *et al.* (2018) y Castro *et al.* (2018), los espectros se suavizaron utilizando un filtro de Savitzky-Golay de segundo orden con treinta y uno marcos según la ecuación (8).

$$Y^o = \frac{\sum_{i=-m}^m C_i \cdot y_{j+i}}{N} \quad (8)$$

Donde: Y^o es el perfil suavizado; y_j es el perfil original; C es el coeficiente para el i^{th} perfil; m es el número de marcos; y N es el número de enteros de convolución.

3.2.7. Construcción del conjunto de datos

En la Figura 6 se detalla el procedimiento realizado para obtener el conjunto de datos de modelado y validación, utilizando los CS_{Ct} y los perfiles espectrales. Primero, se determinaron los CS_{Ct} para cada tratamiento; luego, el número de microcápsulas obtenidas para cada tratamiento se dividió en seis partes (cuatro para calibración y dos para validación), y se determinaron sus perfiles espectrales; obteniendo un total de 72 perfiles.

En cada tratamiento se obtuvo una matriz con dimensión [6 x 467]; una muestra para una fila, sus columnas contienen tanto el perfil espectral de absorbancia como el CS_{Ct} . Luego esta matriz se dividió al azar, cuatro para modelación y dos para validación. Finalmente, los dos conjuntos de datos para cada tratamiento se concatenaron en dos conjuntos de datos completos (cuarenta y ocho perfiles para el modelado y veinticuatro perfiles para la validación) que se utilizarán en la construcción, validación y comparación de modelos.

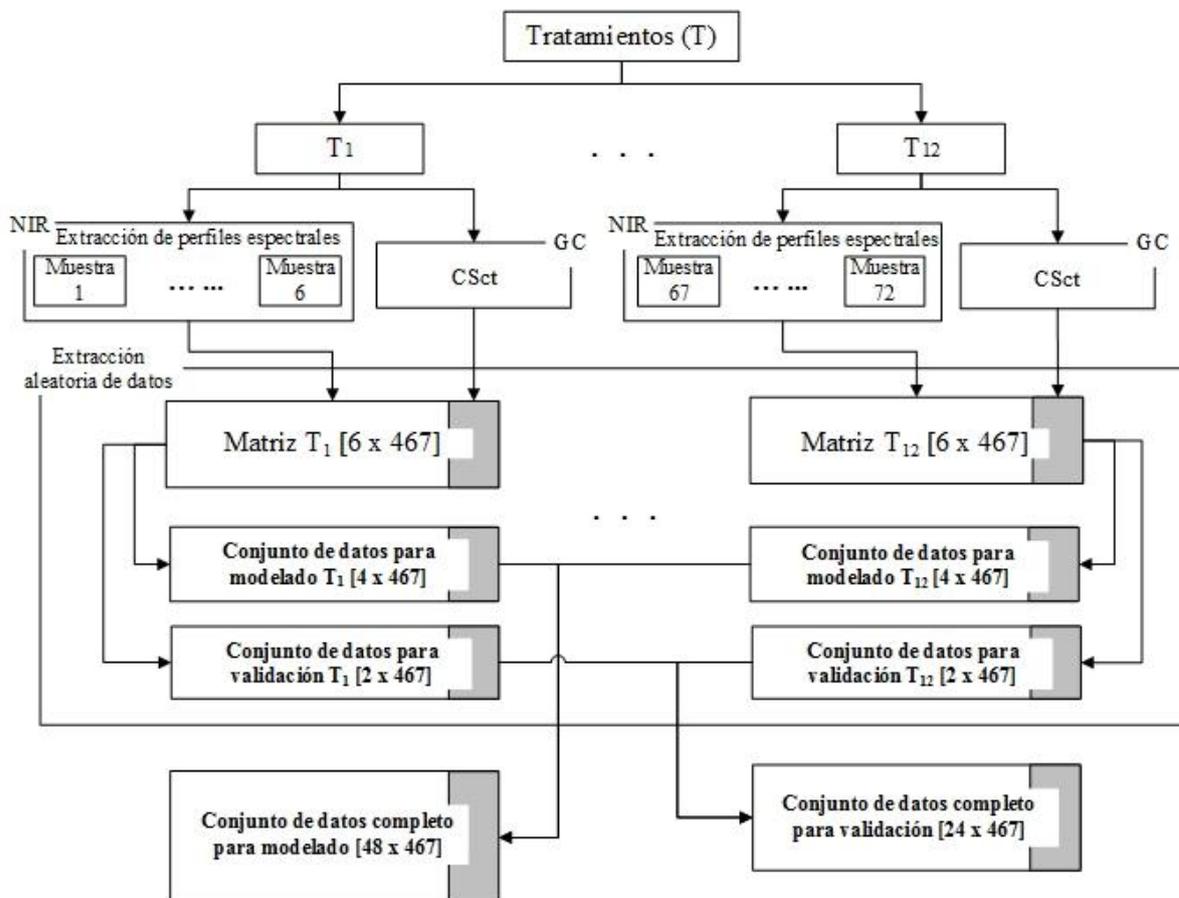


Figura 6. Diagrama de flujo de la construcción del conjunto de datos.

3.2.8. Construcción de los modelos

Para modelar las relaciones entre los perfiles espectrales de absorción NIR y CS_{ct}, se utilizaron diferentes herramientas quimiométricas, como PCA, MLR, PLSR y ANN. Los modelos se implementaron en MATLAB v9.2 (Mathworks, Natick, MA) y se basaron en los trabajos de Heise y Winzen (2007), Roggo *et al.* (2007) y Vásquez *et al.* (2018); en todos los casos se utilizaron datos de calibración y validación.

a) PCA

El algoritmo PCA crea nuevas variables o componentes ordenados según su capacidad para explicar la varianza. En este sentido, el primer componente principal (PC1) tiene la varianza más alta, el segundo componente principal (PC2) tiene la segunda varianza más alta y así sucesivamente hasta superar un porcentaje preestablecido (Oliveri y Simonetti, 2016), que para este caso es 99.5%. Asimismo, para calcular estos componentes, se utilizó la ecuación (9).

$$Z = SP^T + E \quad (9)$$

Donde Z es la matriz de datos original, compuesta por m muestras (filas) descritas por n variables (columnas); P es la matriz ortogonal de carga; S es la llamada matriz de puntuación y T es la función transpuesta. Cuando el número de PCs es menor que el número total de variables originales, los números son parte de la varianza inexplicable que se puede agrupar en la matriz E , también llamada matriz de error.

b) MLR

MLR es el más antiguo de los métodos utilizados, en la actualidad se usa cada vez menos en aplicaciones debido a las mejoras en la potencia de cálculo. Esta regresión permite establecer un vínculo entre un número reducido de predictores (nuestras PCs calculadas previamente) y una propiedad de las muestras (Roggo *et al.*, 2007). La predicción y_i de la propiedad de búsqueda se hizo con la ecuación (10).

$$y_i = b_o + \sum_{i=1}^k b_i x_i + e_{i,j} \tag{10}$$

Donde b_i es el coeficiente calculado, x_i es el valor del predictor (valor de PC) y $e_{i,j}$ es el error.

c) PLSR

PLSR es un método estadístico que transforma variables de entrada X en la salida Y . En este trabajo, X es una matriz de absorbancia [$n \times m$], donde n es la longitud de onda y m es el número de observaciones, e Y son los valores de la variable respuesta (CS_{Ci}) de las micropartículas. PLSR descompone X e Y al proyectarlos en nuevas direcciones con la restricción de que la descomposición describe cómo las variables cambian juntas tanto como sea posible. Después de la descomposición variable, se realiza un paso de regresión en el que las X y las Y descompuestas se usan para calcular un modelo de regresión llamado modelo completo (ver ecuación 11) (Vásquez *et al.*, 2018).

$$\begin{array}{c}
 \left[\begin{array}{c} Y_1 \\ \vdots \\ Y_{n-1} \\ Y_n \end{array} \right] = \left[\begin{array}{c} \beta_1 \\ \vdots \\ \beta_{n-1} \\ \beta_n \end{array} \right] * \overbrace{\left[\begin{array}{cccc} X_{1,1} & \dots & X_{1,m-1} & X_{1,m} \\ \vdots & \ddots & \vdots & \vdots \\ X_{n-1,1} & \dots & \ddots & X_{n-1,m-1} \\ X_{n,1} & \dots & X_{n,m-1} & X_{n,m} \end{array} \right]}^{\text{Perfil de absorbancia de "m" muestras con "n" long. onda}} + \underbrace{e}_{\text{error}} \tag{11}
 \end{array}$$

Contenido CS Coeficientes Beta

Esta ecuación se puede reescribir como en la ecuación (12).

$$Y = \beta \cdot X + e \tag{12}$$

donde Y es el CS_{Ct} , β es la matriz de coeficientes beta (coeficientes- β), X es la matriz de datos de absorbancia, y e es el error del modelo.

Los modelos PLSR completos se construyeron usando todas las longitudes de onda de un perfil espectral, y la relevancia de cada longitud de onda en el modelo se evaluó mediante los coeficientes de regresión o coeficientes- β (Mehmood *et al.*, 2012). Las longitudes de onda se vincularon al valor del coeficiente- β absoluto para el modelo PLSR completo; luego, las longitudes de onda se seleccionaron de acuerdo con su valor, lo que expresa su capacidad para explicar R^2 (coeficiente de determinación) y el error cuadrático medio (RMSE).

Finalmente, los modelos simplificados u optimizados se construyeron utilizando solo las longitudes de onda más relevantes (Liu *et al.*, 2014; Vásquez *et al.*, 2018).

d) ANN

ANN son modelos no lineales inspirados en la arquitectura neuronal del cerebro y se desarrollaron en un intento por modelar la capacidad de aprendizaje de los sistemas neuronales biológicos (Salchenberger *et al.*, 1998) y se han utilizado ampliamente para la predicción con los perceptrón multicapa (MLP - multilayer perceptron) y clasificación con las redes neuronales de base radial (RBN - radial basis neuronal networks). Una neurona artificial puede calcular la suma ponderada de sus entradas y luego aplicar una función de activación para obtener una señal que se transmitirá a la siguiente neurona (Castro *et al.*, 2017; Pan *et al.*, 2016).

Los modelos ANN típicos constan de tres capas, como se muestra en la Figura 7. La primera capa, o la capa de entrada, reciben los valores de entrada y, al emplear una función de transferencia, distribuye los valores de los atributos de entrada a los elementos de procesamiento en las segundas capas. La segunda capa es una capa oculta, en la que los datos se calculan utilizando una función de transferencia sigmoideal no lineal. La tercera capa es la capa de salida, y el número de elementos de procesamiento depende de las categorías de predicción (Dai *et al.*, 2015).

Se construyeron tres modelos diferentes de ANN: a) PCA-ANN, utilizando como entrada los componentes principales (PCs), b) ANN completo, utilizando todas las longitudes de onda de los perfiles espectrales, y c) ANN optimizada, utilizando la longitud de onda relevante según el análisis del coeficiente- β .

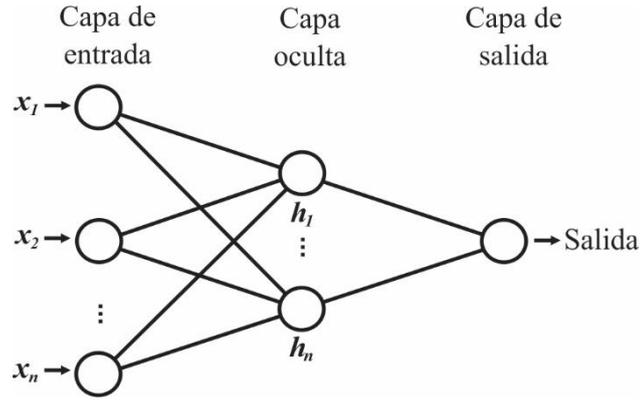


Figura 7. Ejemplo de red neuronal multicapa.

3.2.9. Criterios de comparación de modelos

Los diferentes modelos se compararon en términos de las principales medidas estadísticas, como el coeficiente de determinación (R^2), el coeficiente de determinación ajustado (R_{adj}^2), el error cuadrático medio (MSE - mean square error) y la raíz del error cuadrado medio (RMSE - root mean square error). Estas medidas fueron calculadas para el conjunto de datos de calibración (R_c^2 , $R_{adj,c}^2$, MSE_c y $RMSE_c$) y conjunto de datos de validación (R_v^2 , $R_{adj,v}^2$, MSE_v y $RMSE_v$) usando las ecuaciones (13) al (16) (Castro *et al.*, 2018; Elskens *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2017).

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y)^2} \quad (13)$$

$$R_{adj}^2 = 1 - (1 - R^2) \left(\frac{n-1}{n-p-1} \right) \quad (14)$$

$$MSE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y)^2 \quad (15)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y)^2} \quad (16)$$

Donde \hat{y}_i e y_i son los valores de los atributos de calidad de las $i^{ésima}$ muestras para predicción y referencia, respectivamente; \bar{y} es el valor promedio del conjunto de datos de calibración y validación según corresponda; p es el número de predictores; y n es el número de muestras.

3.3. BIOPELÍCULAS ACTIVAS ELABORADAS CON MICROPARTÍCULAS DE CITRAL PARA PROLONGAR LA VIDA ÚTIL DEL QUESO FRESCO

3.3.1. Lugar de estudio

La elaboración de las biopelículas activas, se realizó en el Laboratorio de Investigación de Nutrición y Bromatología de Alimentos, de la UNTRM, Chachapoyas, Perú.

Las evaluaciones de las propiedades físico-químicas, ópticas, mecánicas y microestructurales de las biopelículas activas, se realizaron en el Laboratorio de Investigación de Ingeniería de Alimentos de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM), Lima, Perú.

3.3.2. Reactivos

Para la elaboración de la biopelícula activa se emplearon: caseinato de sodio, sorbitol (Sigma - Aldrich, Alemania) y micropartículas de citral.

Los quesos frescos fueron adquiridos de la empresa Agroindustrial Ingeniería e Inversiones Tilacancha E.I.R.L., ubicada en la ciudad de Chachapoyas.

Los medios de cultivo que se utilizaron para la evaluación de la actividad antimicrobiana de las biopelículas activas fueron: agar para conteo en placa (ACP), agar papa dextrosa (APD) y peptona bacteriológica; todos fueron obtenidos de Merck (Alemania).

3.3.3. Preparación de las biopelículas activas

Las biopelículas se prepararon siguiendo la metodología planteada por (Arrieta *et al.*, 2013), con modificaciones. Las soluciones se prepararon en agua destilada con 5% en peso de caseinato de sodio (proteína – Pt). Se añadió sorbitol obteniendo proporciones de Caseinato de sodio: sorbitol (CS: Sb) que varió entre 1: 0.5 y 1: 1.5. Las soluciones se calentaron luego a 50°C durante 10 minutos bajo agitación continua a 1000 rpm en un agitador magnético (Thermo Scientific, SP131015 Cimarec, USA) y luego se enfriaron a temperatura ambiente. El pH promedio de las soluciones de caseinato de sodio y sorbitol fueron de 6.48 ± 0.01 . Posteriormente, se añadió las micropartículas de citral en una proporción de caseinato de sodio: micropartícula de citral (CS: MC) que varió entre 1: 0.5 y 1: 1.5, se homogeneizaron a 35°C durante 5 minutos a 1000 rpm. El pH promedio de las soluciones finales fueron de 6.39 ± 0.04 . Finalmente, a todas las soluciones se realizó una desgasificación ultrasónica

(QSonica, Q55, Newtown CT, USA) a 35% de intensidad digital, durante 10 minutos y temperatura ambiente, para eliminar las espumas y las burbujas de aire.

Para la optimización y caracterización, las biopelículas se obtuvieron mediante el método de casting vertiendo entre 9 mL de estas soluciones en recipientes de placas Petri de vidrio de 9 cm de diámetro (EULab, Alemania); obteniendo un total de 4 placas petri por solución. Se acondicionaron durante 24 horas a 25 ± 0.5 °C y $55 \pm 2.0\%$ de humedad relativa (HR) en una cámara de secado con aire forzado Venticell-VC222 (MMM Group, Alemania), acondicionada con un higrómetro Traceable® (Thermo Scientific, USA). Para el envasado de queso fresco, las biopelículas se elaboraron vertiendo 480 mL en recipientes de vidrio 11x20 cm, a los mismos equipos y parámetros de tiempo, temperatura y HR, antes descrito.

3.3.4. Evaluación de variables respuestas para optimización

a) Opacidad

La opacidad se midió siguiendo las indicaciones de HunterLab Method (2008) y metodología propuesta por Pires *et al.* (2011), utilizando un colorímetro CR-400 (Konica Minolta Co., Ltd., Osaka, Japón). La opacidad (%) de las muestras se calculó con la ecuación (17) a partir de las mediciones de reflectancia de cada muestra con una base o fondo negro ($Y_{Fondo\ negro}$, $L^* = 21.84$, $a^* = 0.29$, $b^* = 1.70$) y cada muestra con una base o fondo blanco ($Y_{Fondo\ blanco}$, $L^* = 93.12$; $a^* = -0.65$, $b^* = 3.99$).

$$Opacidad = \frac{Y_{Fondo\ negro}}{Y_{Fondo\ blanco}} \cdot 100 \quad (17)$$

donde Y es el valor triestímulo Y ; considerando que el concepto de valores triestímulo (X , Y , Z), se basa en la teoría de los tres componentes de la visión del color, que establece que el ojo posee receptores para tres colores primarios (rojo, verde, azul) y que todos los colores se ven como mezclas de estos tres colores primarios; estos valores triestímulos XYZ forman la base para definir el sistema de color CIELab* (Alonso, 2016; Wold y Valberg, 2001). Se realizaron pruebas de opacidad en cuatro posiciones diferentes de tres biopelículas por experimento.

b) Transparencia

La transparencia de las biopelículas se calculó mediante la ecuación (18) según lo informado por Hamaguchi *et al.* (2007), Pires *et al.* (2011) y Shiku *et al.* (2003), utilizando un espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, EE.UU), para lo cual se

cortaron tiras de 10x80 mm (ancho x largo) y se colocaron en cubetas de cuarzo para su medición. Como blanco se midieron cubetas vacías.

$$\text{Valor de transparencia} = \frac{A_{600}}{x} \quad (18)$$

donde A es la absorbancia a 600 nm y x es el espesor de la película (mm). De acuerdo con esta ecuación, los valores de transparencia más altos indican una menor transparencia; siendo el valor de transparencia inversamente proporcional a la transparencia real. La transparencia se midió a los 14 días después del proceso de obtención, en tres biopelículas diferentes por experimento.

c) Módulo elástico - E (propiedad mecánica)

El módulo elástico o módulo de Young de un material se define como la relación que se da entre la tensión o esfuerzo que es aplicada al material a lo largo del eje longitudinal de la muestra y la deformación medida en ese mismo eje (Arrieta *et al.*, 2013). En el presente estudio los ensayos de tracción se llevaron a cabo a temperatura ambiente y 50% de HR utilizando un Instron Instrument 3365 (Fareham Hants, Reino Unido) según el estándar ASTM D882-01 (ASTM, 2001) y metodologías propuestas por Arrieta *et al.* (2013) con modificaciones. Las pruebas se realizaron en tiras rectangulares (10 × 80 mm), separación de agarre inicial de 40 mm y velocidad de la cruceta de 25 mm/min. El promedio del módulo elástico (E) medido en MPa se calculó mediante la ecuación (19), a partir de las curvas de fuerza (N) – extensión (mm) resultantes como el promedio de tres biopelículas de cada experimento.

$$E = \frac{\sigma_{elástico}}{\varepsilon_{elástica}} \quad (19)$$

Donde σ es el esfuerzo en MPa, calculado mediante la ecuación (20) y ε es la deformación calculada mediante la ecuación (21). Con estos valores se construye una gráfica en el plano cartesiano, donde σ se ubica en el eje Y y ε en el X . Los valores de $\sigma_{elástico}$ y $\varepsilon_{elástica}$ corresponden al punto (par ordenado) hasta donde aumenta la gráfica en forma lineal. El valor de $\sigma_{elástico}$ generalmente menor al esfuerzo máximo ($\sigma_{máximo}$).

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (20)$$

Donde F es la fuerza en N y A es el área en mm². El área se obtuvo del producto del espesor por el ancho de la muestra.

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_o} \quad (21)$$

Donde Δl es la diferencia entre la longitud final (l_f) y longitud inicial (l_o) de la muestra en mm y l_o es la longitud inicial de la misma muestra en mm

3.3.5. Caracterización de las biopelículas activas óptimas

A las biopelículas obtenidas en condiciones óptimas, se realizaron las siguientes mediciones:

a) Espesor

El espesor promedio de las películas se midió con un Digimatic Micrometer IP-65 Serie 293-240 (Mitutoyo, Japón) ± 0.001 mm en cinco posiciones aleatorias sobre la superficie de cuatro biopelículas por repetición, de un total de tres repeticiones.

b) Propiedades de color

La medición de color de las biopelículas se realizaron según lo descrito por Pires *et al.* (2011) y se aplicaron sobre la superficie de un respaldo blanco estándar ($L^* = 93.11$; $a^* = -0.63$, $b^* = 3.82$). Los parámetros de color (L^* , a^* y b^*) se midieron con un colorímetro CR-400 (Konica Minolta Co., Ltd., Osaka, Japón). Chroma (C^*), hue (h^*), así como la blancura (W) de las biopelículas se calcularon usando las ecuaciones (22), (23) y (24):

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (22)$$

$$h^* = \arctg(b^*/a^*) \quad (23)$$

$$W = 100 - ((100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (24)$$

El color de las películas se expresó como la diferencia de color (ΔE^*), que viene a ser la comparación numérica de los valores de color de una muestra con respecto a un estándar conocido, la que se calculó con la ecuación (25) (Pires *et al.*, 2011).

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (25)$$

donde ΔL^* , Δa^* , Δb^* son los diferenciales entre el parámetro de color de las muestras y el parámetro de color de una cartulina blanca estándar utilizado como fondo o respaldo de la película. Se realizaron pruebas de color en cuatro posiciones diferentes de cuatro biopelículas diferentes por repetición, de un total de tres repeticiones.

c) Opacidad y transparencia

Las mediciones de opacidad (%) y valor de transparencia se determinaron de acuerdo a lo descrito en el numeral 3.3.4 (sección a y b, respectivamente). Para el caso de la opacidad, se obtuvieron nuevos valores del fondo negro ($Y_{Fondo\ negro}$, $L^* = 26.12$, $a^* = 2.13$, $b^* = -1.03$) y fondo blanco ($Y_{Fondo\ blanco}$, $L^* = 93.11$; $a^* = -0.63$, $b^* = 3.82$); además, se midió en cuatro posiciones diferentes de cuatro biopelículas por repetición, de un total de tres repeticiones. Por su lado, la transparencia se midió a los 3, 7 y 14 días después del proceso de obtención, en tres biopelículas diferentes por repetición, de un total de tres repeticiones.

d) Propiedades mecánicas

La determinación de las propiedades mecánicas de las biopelículas se realizó de acuerdo a lo descrito el numeral 3.3.4 (sección c). Adicionalmente al promedio del módulo elástico (E) que se calculó con la ecuación (19), se determinó el porcentaje de deformación a la rotura (ε_B %) calculado con la ecuación (26) y resistencia a la tracción (RT) en MPa que es el esfuerzo máximo calculado con la ecuación (20), todos resultantes como el promedio de tres biopelículas por repetición, de un total de tres repeticiones.

$$\varepsilon_B \% = (\varepsilon_{m\acute{a}xima} - \varepsilon_{el\acute{a}stica}) \cdot 100 \quad (26)$$

Donde $\varepsilon_{m\acute{a}xima}$ es la deformación máxima de la muestra y $\varepsilon_{el\acute{a}stica}$ es la deformación elástica de la muestra; este último se obtuvo de la gráfica σ Vs ε en un punto donde la pendiente deja de tener una tendencia lineal ascendente.

e) Microscopía de las biopelículas activas

Las pruebas de microscopía electrónica de barrido (en inglés Scanning Electron Microscope - SEM) de la superficie y de sección transversal se llevaron a cabo con un microscopio Thermo Scientific (Q250 Analytical SEM, Checoslovaquia). Para el caso de la evaluación superficial las muestras se cortaron en cuadrados de 10x10 mm; para las evaluaciones de sección transversal, los cortes se realizaron en una superficie de vidrio y con la ayuda de un microscopio estereoscopio Olympus (SZ51, Pensilvania, EE.UU.). En un soporte de aluminio se colocaron una cinta de carbono con adhesivo doble, seguidamente se llevaron a la superficie del soporte, donde en su parte superior se colocaron las muestras y se llevaron a la cámara del microscopio para proceder a la observación. Las imágenes se registraron a 1200x de magnificación.

La microscopía de fuerza atómica (en inglés Atomic Force Microscope - AFM) se realizó utilizando un microscopio Easyscan 2 (AFM) de Nanosurf en modo dinámico. Se utilizó un voladizo con una constante de resorte nominal de 42 Nm^{-1} , frecuencia de resonancia de 179 kHz y un radio de punta inferior a 10 nm (Ccorahua *et al.*, 2017; Torres *et al.*, 2010).

f) Análisis FTIR de materia prima y biopelículas activas

Las pruebas de espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR) en el infrarrojo medio (MID), se realizaron con fines cualitativos para evaluar las interacciones moleculares en las mezclas durante la formulación de las biopelículas activas y se llevaron a cabo utilizando un espectrómetro infrarrojo TruDefender-FT (AhuraScientific, Wilmington, EE.UU.), siguiendo la metodología propuesta por (Arrieta *et al.*, 2013), con modificaciones. Las muestras de las biopelículas activas se cortaron en círculos de 0.6 cm de diámetro, con grosores promedio de $150 \pm 5 \mu\text{m}$; para las muestras en forma de polvo (caseinato de sodio, dextrina, sorbitol y micropartículas de citral), se añadieron $100 \pm 5 \text{ mg}$; y para muestras líquidas (citral mixtura), se añadieron $0.4 \pm 0.05 \text{ mL}$; todos ellos se añadieron directamente en la zona de la porta muestra del equipo y se analizaron a temperatura ambiente y 50% de HR. Los espectros de reflectancia total atenuada (ATR) se obtuvieron en la región de $4000\text{-}600 \text{ cm}^{-1}$ de frecuencia, utilizando 10 exploraciones por cada muestra y una resolución de 3 cm^{-1} . Se obtuvo un espectro en blanco antes de cada prueba para compensar el efecto de humedad y la presencia de dióxido de carbono en el aire por sustracción de espectros.

3.3.6. Envasado del queso fresco

Se utilizaron 30 quesos frescos en forma cilíndrica con $5.03 \pm 0.15 \text{ cm}$ de diámetro, $2.10 \pm 0.10 \text{ cm}$ de espesor y $38.60 \pm 1.95 \text{ g}$ de peso; los cuales fueron suministrados dentro de las 4 h después de su producción en un recipiente plástico termoformado de polipropileno y herméticamente cerrado. Los quesos se secaron a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h para reducir el agua libre.

De los treinta quesos, antes de ser envasados, al azar se eligieron 3 quesos para sus evaluaciones iniciales (Día 0). Los quesos restantes se asignaron aleatoriamente a tres tratamientos incluido el tratamiento control cada uno con tres repeticiones: (T0) quesos envasados en bolsa de polietileno de $50 \mu\text{m}$ de espesor (Santa Martha®, Perú); (T1) quesos envasados en biopelículas activas con MC; y (T2) quesos envasados en biopelículas activas con citral puro. Todos los quesos se envasaron al vacío y se almacenaron en refrigeración a $6 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ y 85% HR en una incubadora VELD Científica (FOC 225, Italia). Las evaluaciones se realizaron los días 0, 4, 8 y 14; utilizando muestras diferentes.

3.3.7. Análisis del queso fresco

Para todos los análisis y días de evaluación, las muestras de los quesos frescos se obtuvieron de la parte superficial a una profundidad de 0.5 ± 0.1 cm. Se realizaron los análisis siguientes:

a) Análisis microbiológico

Las muestras se analizaron para detectar bacterias aerobias mesófilas y psicrótrofas utilizando agar conteo en placa (ACP); así como, mohos y levaduras utilizando agar papa dextrosa (APD). Para ello se pesaron 10 g de queso por cada repetición de los días 0, 4, 8 y 14. Cada muestra se mezclaron con 90 mL de agua peptonada estéril al 0.1%, se trituró y se homogenizó manualmente. Se realizaron diluciones seriadas en solución de agua peptonada estéril al 0.1%, se inocularon alícuotas de 0.1 mL en ACP y APD, las placas se incubaron a 37 ± 2 °C durante 2 días, 5 ± 2 °C durante 7 días y 25 ± 2 °C durante 5 – 7 días para el recuento de aerobios mesófilos, psicrótrofas, y mohos y levaduras, respectivamente. Los recuentos microbiológicos se expresaron como el logaritmo de unidad formadora de colonia por gramo (log UFC·g⁻¹).

b) Valor de pH

El valor de pH se determinó utilizando un medidor de pH Oakton (Modelo 450, Singapur) después de la homogenización manual de las muestras utilizadas para el análisis microbiológico (10 g de queso fresco diluido en 90 mL de agua peptonada esteril al 0.1%). Estas evaluaciones se realizaron a los 0, 4, 8 y 14 días de almacenamiento. En cada tiempo se realizó 3 repeticiones por tratamiento.

c) Pérdida de peso

Los quesos fueron pesados individualmente en una balanza analítica Ohaus (Modelo PA224C, EE.UU.) con una precisión de ± 0.0001 g, al inicio antes de ser envasados y durante el periodo de almacenamiento, en los días 4, 8 y 14. La pérdida de peso relativo (ΔP), se calculó con la ecuación (27) (Ramos *et al.*, 2012).

$$\Delta P = (I_{w0} - F_{wi}) / I_{w0} \quad (27)$$

Donde I_{w0} es el peso inicial antes del envasado al día 0 y F_{wi} es el peso final al tiempo i de evaluación. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento.

d) Contenido de humedad

El contenido de humedad se determinó en un analizador de humedad A&D (MX-50, Japón), con una resolución de $\pm 0.01\%$; para lo cual se pesaron 0.5 g de muestra. Esta evaluación se realizó los días 0, 4, 8 y 14.

e) Color

El color del queso se evaluó utilizando un colorímetro CR-400 (Konica Minolta Co., Ltd., Osaka, Japón). Los cambios en el color de la superficie del queso fueron medidos usando una escala de color CIELab (donde L = luminosidad, a = color rojo – amarillo, y b = color azul – verde) bajo iluminante C . La diferencia de color total (ΔE) y la blancura (W) fueron calculadas con las ecuaciones (28) y (29) (Pires *et al.*, 2011; Ramos *et al.*, 2012).

$$\Delta E^* = \left[(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2 \right]^{1/2} \quad (28)$$

$$W = 100 - ((100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (29)$$

Donde L_0^* , a_0^* y b_0^* fueron los valores iniciales (día 0 antes de ser envasados) y L^* , a^* y b^* son los valores medidos durante los días 4, 8 y 14 de almacenamiento. Por cada muestra de queso se hicieron 3 lecturas, considerando tres repeticiones por tratamiento.

f) Análisis sensorial

Se realizaron evaluaciones de calidad sensorial a partir de muestras antes del envasado (día 0) y obtenidas de las muestras envasadas, en los días 4, 8 y 14 de almacenamiento. Para estas evaluaciones se siguió la metodología propuesta por Char *et al.* (2016) y Di Pierro *et al.* (2011) con modificaciones. Se utilizó un método de análisis descriptivo-cuantitativo, aplicado a un panel de 10 jueces semi-entrenados, usando una pauta no estructurada de 0 a 15 cm (Anexo 1), donde se evaluó color, olor, textura, sabor y aceptabilidad general.

El grupo de 10 panelistas estuvo conformado por estudiantes de los últimos ciclos y profesionales de las ciencias pecuarias, en un 60% de hombres y 40% de mujeres; en edades comprendidas entre 18 y 24 años (67.5%), 25 y 34 años (20%) y mayores de 35 años (12.5%); quienes en su mayoría, participaron en todos los días de evaluación.

Por cada tratamiento a cada juez se le proporcionó un queso entero para la evaluación del color y tajadas de 10 ± 2 g para la evaluación del olor, textura, sabor y aceptabilidad general, identificada con un código de tres dígitos seleccionada al azar. Para el color, olor y textura, se consideró una puntuación inferior a 7.5 como media aceptable; y para el sabor y aceptabilidad general, se consideró una puntuación sobre 7.5 como media aceptable. Las evaluaciones se realizaron los días 0, 4, 8 y 14.

3.3.8. Diseño experimental y análisis estadístico

a) Para la optimización de las biopelículas activas

Las variables independientes (relación CS:Sb y relación CS:MC) y variables dependientes (opacidad, valor de transparencia y módulo elástico) para la optimización de las biopelículas activas, se eligieron teniendo en cuenta estudios similares (Araújo *et al.*, 2018; Davidović *et al.*, 2018; García y Sobral, 2005).

La optimización de las biopelículas activas se realizó utilizando un diseño compuesto central (CCD) frontal con un arreglo factorial 2^2 más estrella, haciendo un total de 12 experimentos: cuatro puntos experimentales, cuatro puntos axiales y cuatro puntos centrales (empleados para determinar el error experimental). Se evaluó los efectos de dos variables independientes: relación caseinato de sodio: sorbitol (X_1 : 1:0.5 - 1:1.5) y relación caseinato de sodio: micropartícula de citral (X_2 : 1:0.5 - 1:1.5); en tres variables respuestas: opacidad (Y_1), valor de transparencia (Y_2) y módulo elástico-E (Y_3). Los factores y sus niveles utilizados en el diseño se muestran en la Tabla 2.

Los efectos de las variables independientes X_1 y X_2 , sobre las respuestas Y_n se evaluó utilizando el modelo de regresión polinómica de segundo orden (Ecuación 30). Todos los experimentos se realizaron al azar para evitar el sesgo sistemático.

$$Y_n = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 \quad (30)$$

Donde Y_n representa la variable respuesta ($n=1,2,3$), β_0 es una constante, β_1 y β_2 son los coeficientes de los efectos lineales, β_{12} es el coeficiente de la interacción entre los factores, y β_{11} y β_{22} son los coeficientes del efecto cuadrático. El análisis de optimización se realizó utilizando el software informático estadístico Statgraphics 15.2 (StatPoint Inc., 2015).

En la optimización de las biopelículas activas con MC, para el análisis de varianza (ANOVA), la prueba de falta de ajuste y la determinación de los coeficientes de regresión se realizaron con el software informático estadístico Statgraphics 15.2 (StatPoint Inc., USA, 2015). La metodología superficie de respuesta (MSR) se usó para determinar las condiciones óptimas para cada variable independiente. La optimización se realizó utilizando la función deseabilidad (FD), donde todas las variables dependientes se minimizaron.

Tabla 2. Condiciones del diseño experimental para la elaboración de biopelículas activas con caseinato de sodio (CS), sorbitol (Sb) y micropartícula de citral (MC)

Exp ¹ .	Relación CS: Sb	Relación CS: MC	Soluciones				Total (g)
			CS (g)	Agua (g)	Sb (g)	MC (g)	
1	1:0.5	1:0.5	2	38	1	1	42
2	1:0.5	1:1	2	38	1	2	43
3	1:0.5	1:1.5	2	38	1	3	44
4	1:1	1:0.5	2	38	2	1	43
5	1:1	1:1	2	38	2	2	44
6	1:1	1:1	2	38	2	2	44
7	1:1	1:1	2	38	2	2	44
8	1:1	1:1	2	38	2	2	44
9	1:1	1:1.5	2	38	2	3	45
10	1:1.5	1:0.5	2	38	3	1	44
11	1:1.5	1:1	2	38	3	2	45
12	1:1.5	1:1.5	2	38	3	3	46

¹Número de experimento; CS: Caseinato de sodio; Sb: Sorbitol; MC: micropartícula de citral.

b) Para la caracterización de las biopelículas activas

Para la caracterización de las biopelículas óptimas se emplearon estadígrafos descriptivos como promedio y desviación estándar. Para el valor de transparencia evaluado en diferentes tiempos (3, 7 y 14 días), se evaluó con análisis de varianza (ANOVA) al 5% de significancia; en el caso de existir diferencias significativas entre los datos, se emplearon la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha \leq 5\%$).

c) Para la evaluación de los quesos frescos envasados

Para los resultados del análisis del queso fresco se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con tres tratamientos incluido el control y tres repeticiones cada uno; los tratamientos fueron: quesos envasados en bolsas de polietileno (T0), quesos envasados en biopelículas activas con MC (T1), y quesos envasados en biopelículas activas con citral puro (T2). La unidad experimental correspondió al queso fresco con las características iniciales antes indicadas. Los resultados obtenidos de pérdida de peso, contenido de humedad, recuento microbiológico, valor de pH, color y calidad sensorial se evaluaron con un análisis de varianza (ANOVA) al 5% de significancia. Cuando se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, se aplicó la prueba de comparación múltiple de Dunnett ($\alpha \leq 0.05$). Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante el programa Minitab Release 17.1.0.0 (Minitab Inc., USA, 2016).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. MICROENCAPSULACIÓN DEL CITRAL MEDIANTE SECADO POR ATOMIZACIÓN: CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

4.1.1. Optimización de múltiples variables utilizando metodología superficie de respuesta (MSR) para la microencapsulación

La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos en rendimiento (R) y eficiencia de encapsulación (EE) de las micropartículas de citral obtenidos mediante secado por atomización. El rendimiento varió entre 35.4 % y 70.1 % y la EE de citral varió de 97.1 % a 99.9 %. Resultados que se encuentran dentro de los rangos reportados por (Sutaphanit & Chitprasert, 2014) para micropartículas de aceite esencial (AE) de albahaca en gelatina, quienes obtuvieron un Y entre 60 y 98% y EE superiores a 85%.

La Tabla 4 muestra el análisis de varianza (ANOVA) para la superficie de respuesta de las variables estudiadas en la microencapsulación de citral mediante secado por atomización. En las variables respuestas evaluadas, solo en la EE, la forma cuadrática de la temperatura del aire de entrada no fue significativa, pero si se consideró en la ecuación cuadrática debido a la importancia para el modelo matemático (Urzúa *et al.*, 2017).

Tabla 3. Diseño experimental y valores de las variables respuestas en la microencapsulación de citral mediante secado por atomización

Exp ¹ .	TEA (°C)	Relación Ct:Dx	R (%) X±DE	EE (%) X±DE
1	120 (-1)	1:5 (-1)	42.65 ± 0.92	99.63 ± 0.04
2	120 (-1)	1:12.5 (0)	35.41 ± 2.50	99.37 ± 0.01
3	120 (-1)	1:20 (+1)	49.66 ± 1.74	97.97 ± 0.03
4	160 (0)	1:5 (-1)	70.07 ± 1.12	99.75 ± 0.02
5	160 (0)	1:12.5 (0)	58.30 ± 1.67	99.22 ± 0.05
6	160 (0)	1:12.5 (0)	59.16 ± 1.70	99.19 ± 0.05
7	160 (0)	1:12.5 (0)	61.47 ± 1.68	99.14 ± 0.01
8	160 (0)	1:12.5 (0)	57.64 ± 1.64	99.12 ± 0.07
9	160 (0)	1:20 (+1)	59.30 ± 1.22	97.70 ± 0.35
10	200 (+1)	1:5 (-1)	65.53 ± 2.21	99.87 ± 0.01
11	200 (+1)	1:12.5 (0)	50.43 ± 1.06	99.25 ± 0.20
12	200 (+1)	1:20 (+1)	55.96 ± 1.90	97.07 ± 0.02

¹Número de experimento. TEA: temperatura de entrada del aire al secador. Ct: Citral. Dx: dextrina. R: Rendimiento del proceso de secado (%). EE: eficiencia de encapsulación (%). X: promedio y DE: desviación estándar (n = 3)

Tabla 4. Análisis de varianza (ANOVA) para la microencapsulación de citral mediante secado por atomización

Fuente	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	Razón - F	Valor-P	R ²	R ² ajust. g.l.
Rendimiento (R)							
A:Relación ^a	29.6148	1	29.6148	10.60	0.0473*	94.6	90.1
B:TEA ^b	325.6070	1	325.6070	116.50	0.0017*		
AA	172.2170	1	172.2170	61.62	0.0043*		
AB	68.7241	1	68.7241	24.59	0.0157*		
BB	502.6100	1	502.6100	179.83	0.0009*		
Falta de ajuste	46.6651	3	15.5550	5.57	0.0962		
Error puro	8.3849	3	2.7950				
Total (corr.)	1017.5200	11					
Eficiencia de encapsulación (EE)							
A:Relación ^a	7.0634	1	7.0634	3376.90	0.0000*	99.2	98.5
B:TEA ^b	0.1014	1	0.1014	48.48	0.0061*		
AA	0.8325	1	0.8325	398.03	0.0003*		
AB	0.3249	1	0.3249	155.33	0.0011*		
BB	0.0018	1	0.0018	0.88	0.4178		
Falta de ajuste	0.0615	3	0.0205	9.81	0.0464*		
Error puro	0.0063	3	0.0021				
Total (corr.)	8.4668	11					

^a Relación: Citral:Dextrina (Ct:Dx).

^b TEA: Temperatura de entrada del aire al secador (°C)

g.l.: grados de libertad

* Significante a un nivel de confianza de 5%

El rendimiento corresponde a la relación entre el contenido de sólidos en la solución de alimentación antes del secado por atomización y el contenido de sólidos obtenidos después del secado por atomización. El ANOVA mostró que en la relación Ct:Dx y TEA, tanto los componentes lineales, cuadráticas e interacción entre ambas fueron significativos para el rendimiento. El modelo explicó un 90.1 % de la variabilidad (R^2 ajustada por g.l.) para el rendimiento del proceso (Tabla 4). La ecuación de regresión cuadrática que describe el efecto de las variables independientes en el rendimiento es la siguiente:

$$R = -192.423 - 1.65722 \times \text{Relación} + 3.10262 \times \text{TEA} + 0.142867 \times \text{Relación}^2 - 0.0138167 \times \text{Relación} \times \text{TEA} - 0.00858047 \times \text{TEA}^2$$

El gráfico de superficie respuesta (Figura 8) muestra que el rendimiento fue mayor para micropartículas con menor contenido de Dx en la relación Ct:Dx (cerca de 1:5) y TEA intermedia (cerca de 160°C). Cuanto menor es la Dx en la relación Ct:Dx, mayor es el rendimiento de micropartículas en polvo, lo que podría atribuirse a una mejor pulverización y menor tamaño y peso de la gota dentro del secador, cuando la solución está más diluida, favoreciendo una mejor transferencia de calor y evitando que el polvo precipite rápidamente a la cámara de secado (Robert *et al.*, 2017; Vergara *et al.*, 2014). Además, los mejores rendimientos se obtuvieron a TEA intermedias, debido probablemente a que por un lado, las bajas temperaturas producen micropartículas con mayor humedad, contribuyendo a que el polvo se adhiera a la cámara de secado y se incrementen las pérdidas (Urzúa *et al.*, 2017); por otro lado, las altas temperaturas podrían volatilizar el agua más rápidamente y dar como resultado una muestra adherida a la parte inferior de la pared de la cámara de secado y se precipiten al primer recipiente del producto seco, dando por consiguiente una reducción del rendimiento (Cao *et al.*, 2018); similares resultados obtuvieron cuando mediante secado por atomización encapsularon extracto de jambul en maltodextrina (Santhalakshmy *et al.*, 2015). Los resultados del presente estudio fueron mucho menores a los reportados por Bhandari *et al.* (1992) quienes cuando microencapsularon citral en maltodextrina y goma arábiga a TEA entre 300 y 400 °C, obtuvieron mejores rendimientos a 400 °C sin ningún efecto adverso sobre las propiedades químicas del AE, debido probablemente al tipo de agente encapsulante; por lo cual, se podría afirmar que las bajas temperaturas del presente estudio (entre 120 y 200 °C), no afectaron sus propiedades antimicrobianas del citral.

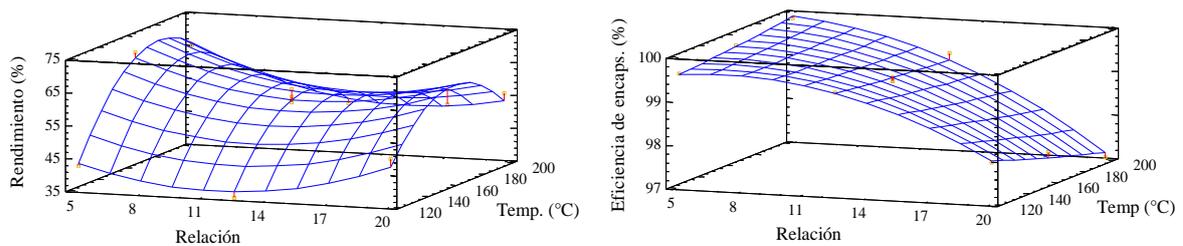


Figura 8. Gráficos de superficie respuesta para el rendimiento y eficiencia de encapsulación para micropartículas de citral – dextrina.

La eficiencia de encapsulación del citral representa la retención de la emulsión (Ct-LS), que varió de 97.1 % a 99.9 % (Tabla 3). El ANOVA indicó que en la relación Ct:Dx en su componente lineal y cuadrática, la TEA del proceso en su componente lineal, y la interacción de la relación Ct:Dx con TEA, fueron significativas sobre la EE de citral. Aunque la temperatura del aire de entrada en su componente cuadrática no fue significativa se consideró en la ecuación cuadrática porque es fundamental en el modelo matemático y porque otros investigadores como Urzúa *et al.* (2017), también lo consideraron en sus resultados reportados. El modelo explicó un 98.5 % de la variabilidad (R^2 ajustada por g.l.) en la EE del Ct (Tabla 4). La ecuación de regresión cuadrática que describe el efecto de las variables independientes en la EE es la siguiente:

$$EE = 98.5025 + 0.255667 \times \text{Relación} + 0.003375 \times \text{TEA} - 0.00993333 \times \text{Relación}^2 - 0.00095 \times \text{Relación} \times \text{TEA} + 0.0000164063 \times \text{TEA}^2$$

Como se puede observar en el gráfico de superficie (Figura 8), la EE se incrementó con el aumento de la TEA, lo que podría explicarse porque las altas temperaturas conducen a una rápida formación de la costra sobre la gota, que permite una mayor retención de la emulsión y la difusión del agua hacia el aire caliente. Al mismo tiempo, la EE de citral fue más alta para micropartículas con menor contenido de Dx, lo que significa que cuanto menor fue el contenido de Dx, mayor fue la retención de la emulsión de citral en la micropartícula, debido probablemente a que en soluciones más diluidas el tamaño de gota de la emulsión al momento de la aspersión es menor, favoreciendo el incremento de la EE; una posible explicación de este fenómeno podría deberse al efecto de cizallamiento de la atomización en las gotas de emulsión más grandes; aunado a la alta gradiente de velocidad y estado de turbulencia en la “boca” del atomizador podrían permitir que gotas de emulsión grandes se disgreguen en gotas más pequeñas, provocando una mayor pérdida del material núcleo de

las gotas de emulsión más grandes durante el secado por atomización (García *et al.*, 2013a; Huynh *et al.*, 2008). Similares resultados se reportaron en micropartículas de aceite esencial de ajo con maltodextrina como agente encapsulante (Balasubramani *et al.*, 2013) donde la mayor EE obtuvieron a proporciones de 1:6 de AE:maltodextrina.

Para la optimización múltiple, se aplicó la función deseabilidad, considerando la maximización del R y EE. Todas las variables respuestas tuvieron coeficientes de determinación superiores a 90% (R^2 ajustada por grados de libertad-g.l.) y residuales inferior a 1.0; por lo tanto, fueron considerados en el modelo. Además, la falta de ajuste para el rendimiento no fue significativa, lo cual indicó que el modelo matemático se ajusta a los datos experimentales dentro del dominio experimental; sin embargo la falta de ajuste para la EE fue significativa, indicando la inclusión de todos los términos en el modelo (principalmente el componente cuadrático de la TEA) (Bezerra *et al.*, 2008; Urzúa *et al.*, 2017).

La Figura 9, muestra el gráfico de superficie respuesta del CCD para la microencapsulación del citral. Como se observó, las variables respuestas se maximizaron a valores bajos de relación Ct:Dx y a intermedios de TEA. Se obtuvo un valor óptimo de deseabilidad de 0.99 para una relación Ct:Dx óptima de 1:5, en el límite inferior del rango estudiado y una TEA de 187 °C dentro del rango estudiado. Es importante hacer notar que las condiciones óptimas obtenidas para micropartículas Ct:Dx según el diseño estadístico son específicas para este sistema y esto no se podría aplicar cuando se emplean otros biopolímeros como agentes encapsulantes (Vergara *et al.*, 2014). En este contexto, las propiedades de los biopolímeros cumplen un papel fundamental en los parámetros de encapsulación (principalmente la TEA) y la estabilidad de los compuestos activos (Urzúa *et al.*, 2017). Cuando encapsularon AE de ajo en maltodextrina (Balasubramani *et al.*, 2013), AE de arilos rojos de Gac (*Momordica conchinchinensis*) en proteína de suero de leche y goma arábica (Kha *et al.*, 2014) y AE de café en goma arábica (Frascareli *et al.*, 2012); en todos estos estudios, la TEA varió entre 160 y 200 °C; rango dentro del cual se encuentra el resultado del presente estudio.

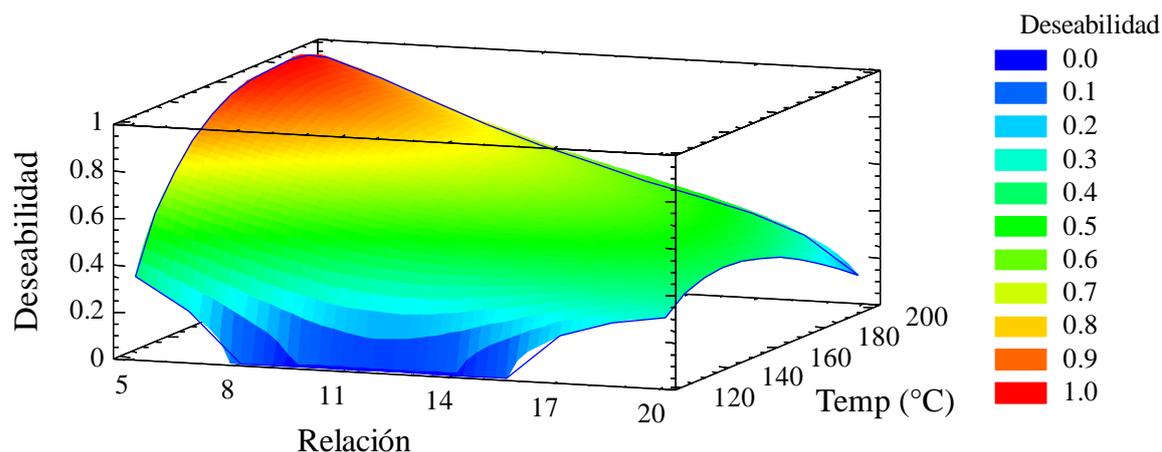


Figura 9. Gráfico de superficie de respuesta (MSR) para la optimización de la microencapsulación de citral, considerando la maximización del R y EE.

4.1.2. Caracterización de las micropartículas obtenidas en condiciones óptimas

Las micropartículas de citral fueron elaborados bajo condiciones óptimas de relación Ct:Dx (1:5) y temperatura del aire de entrada al secador (187 °C). Se encontraron altos valores de rendimiento (71.9%) y EE (99.9%); similares a los valores predichos por la MSR que presentó 70.1% de rendimiento y 99.9% de EE.

Estos resultados concuerdan con estudios en los que encapsularon AE de ajo, arilos rojos de Gac y café, utilizado agentes encapsulados de diferentes naturalezas (almidón modificado de maíz, maltodextrina, gelatina y goma arábica) (Balasubramani *et al.*, 2013; Frascareli *et al.*, 2012; Kha *et al.*, 2014). Por otro lado, la EE fueron superiores a estudios donde utilizaron dextrina, aislado proteico de leche e inulina (Ahn *et al.*, 2008; García *et al.*, 2013a), quienes obtuvieron 96% y 86% de EE, respectivamente. La alta EE se podría atribuir a la estabilidad de la emulsión de alimentación (Ct-LS-Dx) en el proceso de secado por atomización, que desempeñan un papel importante en la retención de moléculas hidrofóbicas, y al efecto de la lecitina de soya como emulsificante; además, la alta retención en los sistemas de dextrina se atribuyó a la mayor hidrofobicidad del polímero (García *et al.*, 2013a)

Estudios previos mencionan que la EE del citral en secado por atomización está influenciada principalmente por las propiedades del agente encapsulante (viscosidad, solubilidad), relación citral:agente encapsulante y temperatura (Maswal y Dar, 2014; Sosa *et al.*, 2014). La temperatura es uno de los factores relevantes en la degradación del citral (Sosa *et al.*, 2014), no obstante puede tolerar hasta 400 °C sin ningún efecto negativo sobre sus propiedades químicas (Bhandari *et al.*, 1992). En el presente estudio, a pesar de las altas temperaturas se secado, la EE del citral fue alta (99.9%) lo que podría atribuirse a tiempos

de secado cortos y/o a la formación rápida de la costra en la superficie de la gota, que permite la difusión del agua, reteniendo el AE (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Vergara *et al.*, 2014).

Las micropartículas de citral obtenidas en condiciones óptimas presentaron 5.3 ± 1.3 % de humedad, 0.2 ± 0.02 de actividad de agua, 29.7 ± 0.01 g/100g de higroscopicidad y $7.08 \mu\text{m}$ de tamaño de partícula ($D_{4,3}$). La humedad, actividad del agua y tamaño de partícula se encontraron dentro del rango descrito para las micropartículas obtenidas por secado por atomización (Cai y Corke, 2000; Gharsallaoui *et al.*, 2007). La higroscopicidad fue inferior a los reportados por Frascareli *et al.* (2012) y Kha *et al.* (2014); lo cual se debería a las características físico-químicas propias de los insumos empleado en la formulación de las micropartículas, principalmente del agente encapsulante (Bakry *et al.*, 2016).

La Figura 10 muestra las micrografías SEM de las micropartículas obtenidas en condiciones óptimas. Todas las micropartículas presentaron forma esférica con superficies externas irregulares, rugosas y depresiones, con indentaciones o concavidades, observándose una tendencia a la aglomeración. La aparición de depresiones podría atribuirse a la falta de propiedades plastificantes del agente encapsulante y a la contracción de las micropartículas durante el proceso de secado, debido las altas temperaturas del aire entrada al secador, como en este trabajo, principalmente en las etapas iniciales de secado, donde la rápida evaporación y la alta presión de las partículas producen contracción (Alamilla-Beltrán *et al.*, 2005; Frascareli *et al.*, 2012). Se observó una morfología similar cuando microencapsularon AE de mirto limón en maltodextrina y almidón modificado (Huynh *et al.*, 2008); AE de linaza y romero en maltodextrina (Carneiro *et al.*, 2013; de Barros Fernandes *et al.*, 2014), oleorresina de cardamomo en maltodextrina y almidón modificado (Krishnan *et al.*, 2005); oleorresinas de *Haematococcus pluvialis* en capsul (Bustamante *et al.*, 2016) y AE de café en goma arábica (Frascareli *et al.*, 2012); todos ello producidos por secado por atomización utilizando polisacáridos como material de pared (maltodextrina, almidón modificado y maltodextrina). Mientras que cuando microencapsularon AE de girasol en aislado proteico de leche y dextrina (Ahn *et al.*, 2008), AE de limón en mezcla de proteína de suero y maltodextrina (Campelo *et al.*, 2018) fueron esféricas, con una superficie homogénea, lisa, libre de hendiduras y poros, debido probablemente a que la dextrina o maltodextrina estuvo combinado con polímero de naturaleza proteica, además, del efecto de la temperatura de entrada.

Adicionalmente, si las micropartículas de citral fueran elaboradas bajo condiciones óptimas de relación Ct:Dx (1:5) y TEA al secador (187 °C), obtenidas en la presente investigación, se escalarían a mayores volúmenes, como a nivel de escala piloto o industrial, se podría esperar que no varíen significativamente los resultados de EE, características físicas y microestructura; en cambio, se esperaría un incremento significativo en el rendimiento, debido a que a mayores volúmenes de producción, las pérdidas en el proceso son menores (Balasubramani *et al.*, 2013; García *et al.*, 2013; Gutiérrez y De la Vara, 2012; Paulo y Santos, 2017; Sutaphanit y Chitprasert, 2014).

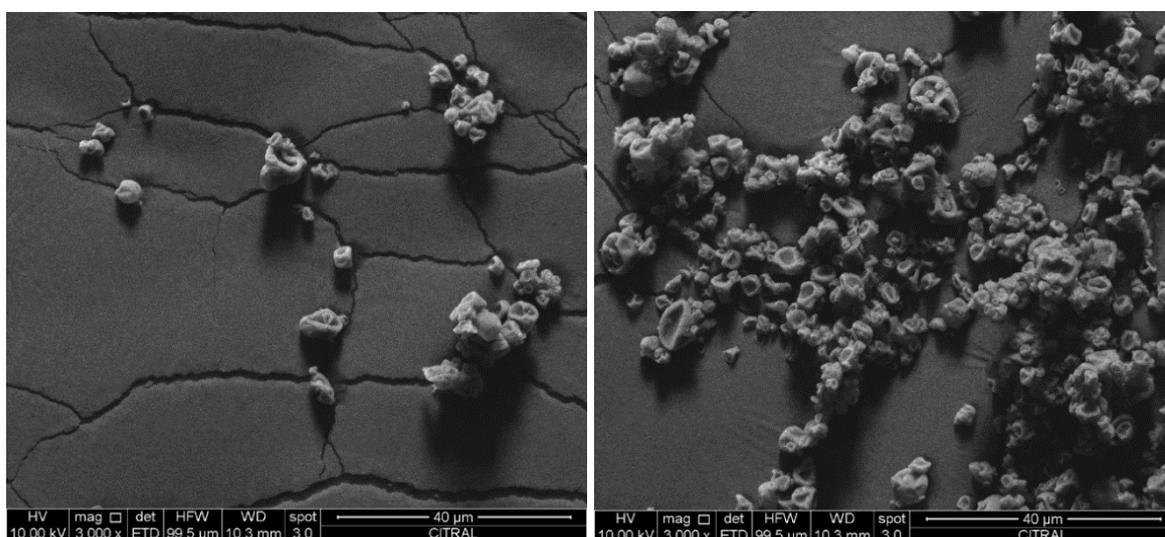


Figura 10. Fotografías de microscopía electrónica de barrido de las micropartículas de citral obtenidas en condiciones óptimas (3000x).

4.1.3. Actividad antibacteriana del citral mixture puro

Las concentraciones más bajas de citral que inhibieron el crecimiento de las bacterias estudiadas se muestran en el Tabla 5. El menor valor de concentración (0,80 mg/mL) se obtuvo para *B. cereus*, y el más alto (4 mg/mL) para *S. entérica*.

Las cepas bacterianas estudiadas, exhibieron una alta sensibilidad a bajas concentraciones del citral, donde los resultados obtenidos fueron mejores a los reportados por otros autores. Por ejemplo, el D-Limoneno puro inhibió el crecimiento de *E. coli* a concentraciones mínima de 25 mg/mL (Donsì *et al.*, 2011); el eugenol puro inhibió *E. coli* y *S. aureus* a concentración mínima de 10 mg/mL (Piletti *et al.*, 2017). Los resultados del presente estudio concuerdan con otros autores (Fancello *et al.*, 2016; Guarda *et al.*, 2011), quienes

encontraron que agentes antimicrobianos como timol, carvacrol y EO de citrus, tienen una potente actividad antimicrobiana a bajas concentraciones, sobre el *S. aureus*, *S. entérica*, *L. innocua* y *E. coli*. Según (Saddiq y Khayyat, 2010), informaron que el citral mostró mayor actividad antibacteriana comparado con antibióticos industriales como el ácido nalidíxico, ampicilina y nitrofurantoína.

Tabla 5. Actividades antibacterianas del citral mixture puro a diferentes diluciones seriadas (diluidas en heptano)

Concentración de citral (mg/mL) ¹	Diámetro de la zona de inhibición (mm) según microorganismo			
	<i>E. coli</i>	<i>S. entérica</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>
0.00	- ²	-	-	-
0.08	-	-	-	-
0.20	-	-	-	-
0.40	-	-	-	-
0.80	-	-	-	7.78 ± 0.61
2.00	8.68 ³ ± 0.50	-	6.73 ± 0.43	8.73 ± 0.62
4.00	10.00 ± 0.81	6.65 ± 0.26	7.08 ± 0.53	9.88 ± 0.83
8.00	14.33 ± 1.22	7.73 ± 1.19	7.25 ± 0.33	10.28 ± 0.36
40.00	14.70 ± 1.43	12.93 ± 0.92	10.03 ± 1.23	13.88 ± 0.29
80.00	15.25 ± 1.79	14.05 ± 0.96	15.03 ± 0.64	14.30 ± 1.41

¹Concentración de las diluciones seriadas de citral mixture en heptano (mg/mL)

²Guiones indican que no existió efecto inhibitorio de dilución de citral sobre bacterias en estudio

³Los valores indican el promedio (n=4) y ± indica su desviación estándar.

El efecto inhibitor del citral contra microorganismos también podría explicarse por las características estructurales del citral (compuesto por dos isómeros: geranial y neral), que es un miembro de la clase de α , β -aldehído insaturado, donde el grupo carbonilo es adyacente a los carbonos α y β . Debido a su posición, los carbonos α y β se conjugan con el grupo carbonilo, permitiendo que el β -carbono se polarice positivamente y pueda reaccionar fácilmente con nucleófilos (ataque nucleofílico) (Wuryatmo *et al.*, 2003). Según Witz (1989), la acción química de los α , β - aldehídos insaturados y algunos de sus efectos toxicológicos se basa en su capacidad para funcionar como agentes alquilantes directos. Estos agentes alquilantes son capaces de unirse covalentemente a grupos nucleófilos celulares, lo que significa que son capaces de modificar procesos celulares y son potencialmente tóxicos para los microorganismos.

4.1.4. Actividad antibacteriana de micropartículas de citral

Los estudios realizados con soluciones de heptano puro no mostraron actividad frente a las cepas bacterianas en estudio, mostrando que el disolvente no tiene efecto inhibitorio sobre dichas cepas.

La evaluación del efecto de las micropartículas de citral sobre el crecimiento de diferentes bacterias estudiadas, *E. coli* y *B. cereus*, *S. aureus* y *S. entérica*, se presenta en la Figura 11. Al nivel de 0.05 de significancia; $p < 0.05$, el diámetro de la zona de inhibición de las diferentes cepas bacterianas fue significativamente diferente, indistintamente entre bacterias Gram-positivas y Gram-Negativas. Siendo *E. coli* y *B. cereus* las más sensibles a las micropartículas de citral con 9.98 y 9.05 mm, respectivamente; mientras que *S. aureus* y *S. entérica* las más resistentes con 7.38 y 6.88 mm, respectivamente.

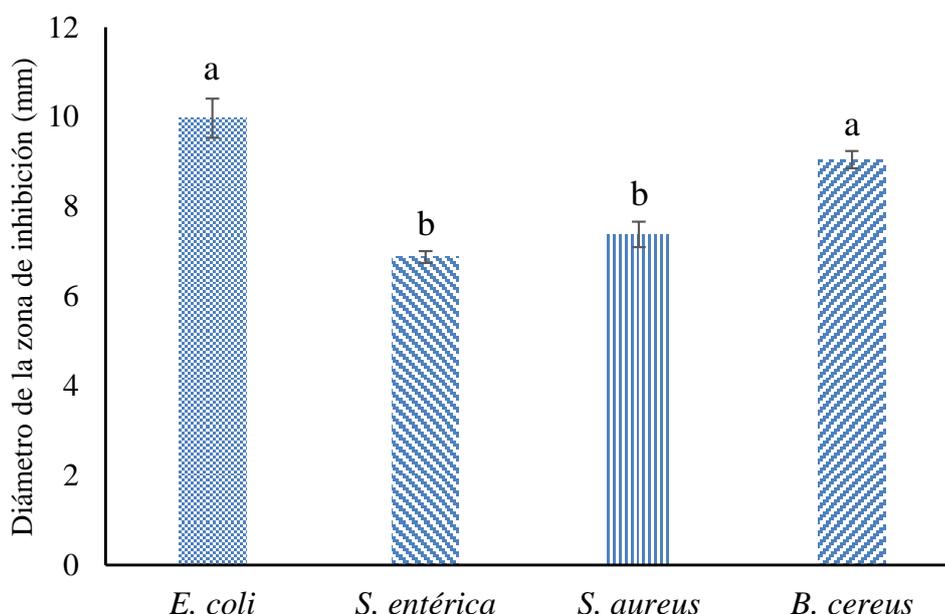


Figura 11. Inhibición del crecimiento de diferentes bacterias por micropartículas de citral (concentración de 300 mg mcp/ mL de heptano diluido en agua destilada; equivalente a 41 mg de citral/ mL de heptano diluido en agua destilada). Las barras indican el error estándar (n=4). Letras diferentes sobre cada barra, indican diferencias estadísticamente significativa según la prueba Tukey ($p < 0.05$), para cada microorganismo.

El efecto antimicrobiano se puede atribuir a la capacidad de citral de alterar y penetrar en la estructura lipídica y proteica de la pared celular de las bacterias, como lo propuso recientemente Lu *et al.* (2018). Esto lleva a la desnaturalización de la proteína y la destrucción de la membrana celular, seguida por la filtración citoplásmica, la lisis y la muerte

celular (Saddiq y Khayyat, 2010). Los sistemas de micropartículas con citral promoverían una interacción potenciada con las membranas celulares microbianas principalmente por las rutas siguientes: el aumento del área de superficie de contacto mejora la difusión pasiva a través de la membrana celular externa y la interacción con la membrana citoplasmática (Donsì *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2018); liberación sostenida en el tiempo del citral de las micropartículas, impulsada por la liberación del aceite esencial entre el material de pared y la fase acuosa, prolongando su bioactividad (Majeed *et al.*, 2016); y la interacción electrostática de las micropartículas de AE cargadas positivamente (por intermedio del polímero) con las paredes celulares microbianas cargadas negativamente, aumentando la concentración de éstos aceites en el sitio de acción (Chang *et al.*, 2015). El uso de sistemas de administración a microescala, como los sistemas basados en micropartículas, microemulsiones y liposomas, pueden aumentar los mecanismos pasivos de absorción celular, reduciendo la resistencia a la transferencia de masa y aumentando la actividad antimicrobiana (Bakry *et al.*, 2016; Donsì y Ferrari, 2016).

Además, concuerda con estudios previos de micropartículas basadas en AE de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*), clavo de olor, tomillo, palmarosa, orégano, timol y carvacrol, que mostraron propiedades bactericidas contra *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Vibrio cholerae* (Anaya-Castro *et al.*, 2017; Guarda *et al.*, 2011; Salvia-Trujillo *et al.*, 2015).

Por otro lado, estudios donde compararon la actividad antimicrobiana de micropartículas de carvacrol, limoneno y cinamaldehído encapsulados con lecitina de soya, proteína de soya y palmitato de sacarosa, contra bacterias Gram positivas y negativas no encontraron diferencias significativas (Donsì y Ferrari, 2016), resultados similares al presente estudio. Por el contrario, otros investigadores han informado que las bacterias Gram-positivas son más sensibles que las Gram-negativas al usar diferentes aceites esenciales; algunos de ellos son cuando evaluaron micropartículas de AE de hierba luisa (Leimann *et al.*, 2009); AE de citrus limón (Fancello *et al.*, 2016); y nanoemulsiones de citral (Lu *et al.*, 2018). Esta diferencia en los resultados podrían atribuirse a que la actividad antimicrobiana son dependientes principalmente del sistema de las micropartículas, tipo y concentración de los activos microencapsulados (Donsì *et al.*, 2012; Salvia-Trujillo *et al.*, 2015). En el presente estudio se utilizó citral con una pureza superior al 96%, microencapsulado con dextrina.

La relación de inhibición antibacteriano está dado por la relación porcentual del diámetro de inhibición transparente de las micropartículas de citral, entre el diámetro de inhibición de concentraciones similares de citral libre, ambos medidos en las bacterias de estudio. Cuando se evaluó el efecto inhibitorio (relación de inhibición) entre las bacterias estudiadas, no se obtuvieron diferencias significativas, los valores variaron entre 55.6% para *S. entérica* y 74.5% para *S. aureus* (Figura 12).

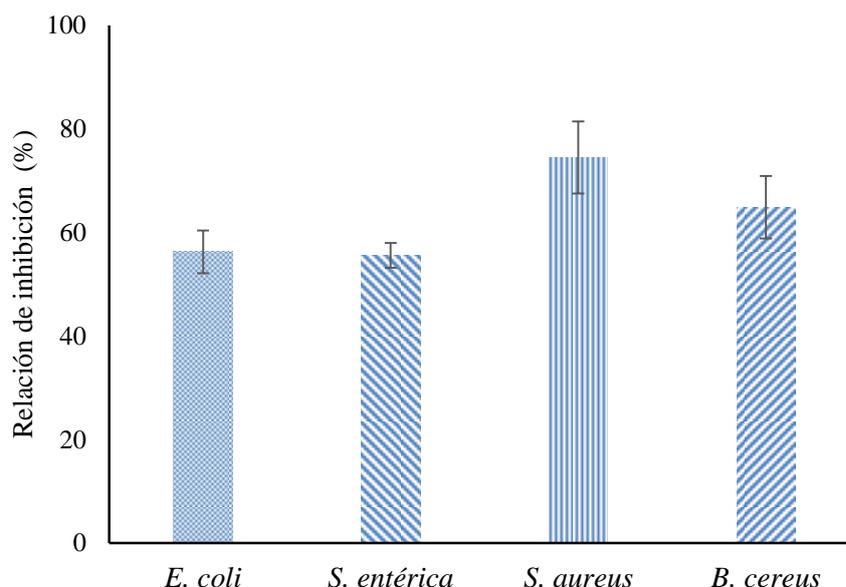


Figura 12. Efecto inhibitorio de la micropartícula de citral en comparación con la cantidad equivalente de citral libre. Las barras indican el error estándar (n=4).

Los resultados muestran que después del proceso de microencapsulación y secado por atomización a alta temperatura, el citral mantuvo su bioactividad. La relación de inhibición de la micropartícula de citral fue inferior a 100%, lo que podría deberse a la menor masa libre del citral en comparación con las cantidades equivalentes de citral libre usado en la prueba de inhibición; durante el proceso de microencapsulación al citral, se añadió dextrina y lecitina de soya, por lo que la actividad del citral no es la misma comparada con el citral libre. Estos resultados son inferiores a los reportados por Leimann *et al.* (2009) que obtuvieron ratios cercanos a 100% para micropartículas de AE de hierba luisa formulado con poli-vinílico-alcohol (PVA), sulfato de sodio y glutaraldehído; y a los reportados por Wang *et al.* (2009), con ratios entre 80 y 90% cuando evaluaron micropartículas de curcumina formulado con gelatina y almidón. En ambos estudios no utilizaron emulsificante como lecitina de soya (LS). Es por ello que, también los valores bajos de relación de

inhibición del presente estudio, podría atribuirse al uso de la lecitina de soya como emulsificante, la cual dificulta la rápida liberación del citral (Donsi *et al.*, 2011, 2012).

Cuando microencapsularon AE de carvacrol, D-limoneno y *trans*-cinamaldehído con LS y proteína de soya, la LS fue la responsable de una liberación lenta del AE en la fase acuosa, causando una actividad antimicrobiana en un tiempo largo de 24 h; en comparación de estos AE microencapsulados con ésteres de azúcar, Tween 20 y monooleato de glicerol, donde la disponibilidad del AE en fase acuosa fue inmediata y la actividad bactericida en un tiempo corto de 2 h (Donsi *et al.*, 2012). En estudios *in vitro*, donde se requiere una rápida liberación del agente activo para evitar el rápido crecimiento microbiano, en estos casos el uso de emulsificantes en la formulación de micropartículas, como LS, reduce la bioactividad de los antimicrobianos; sin embargo, si se desea una acción bacteriostática durante un periodo de tiempo prolongado para asegurar una vida útil determinada para un producto alimenticio, la mejor opción es probablemente el uso de LS, para favorecer una liberación lenta y asegurar una concentración menor en la fase acuosa del antimicrobiano, por lo tanto, prolongar su acción por más tiempo (Donsi *et al.*, 2011, 2012; Donsi y Ferrari, 2016). Las micropartículas óptimas obtenidas en el presente estudio, posteriormente podrían ser utilizadas en la elaboración de biopelículas activas destinadas al envasado de alimentos altamente perecibles.

En general, las micropartículas de citral demostraron tener una buena actividad antimicrobiana, pudiendo ser una nueva alternativa para prolongar la vida útil y garantizar la seguridad de los alimentos.

4.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO SUPERFICIAL DE CITRAL EN MICROPARTÍCULAS MEDIANTE ESPECTROSCOPIA NIR Y HERRAMIENTAS QUIMIOMÉTRICAS

4.2.1. Análisis de referencia

De acuerdo con los análisis de referencia hechas por GC de las micropartículas, el CS_{Ct} varió entre 0.17 y 1.28 mg ct/ g mcp.

4.2.2. Perfiles espectrales del contenido superficial de citral en micropartículas

La Figura 13 presenta los perfiles espectrales promedio de las micropartículas de citral que ilustran la evolución de la absorbancia. Esta medida muestra picos relacionados con las bandas de absorbancia en la región de sobretonos de 1206 a 1761 nm y la región de combinación de 1934 a 2490 nm. Los picos de absorción a 2096 y 2312 nm están dentro de los rangos correspondientes a las interacciones *C-H flexión-extensión* y *C=O extensión*, posiblemente debido a la presencia de un grupo aldehído (Steuer *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2002). Los picos a 1206, 1710 y 1761 nm corresponden a interacciones *C-H extensión*, probablemente por la presencia de dextrina, polímero utilizado como encapsulante en este estudio. Los resultados obtenidos son consistentes con los reportados por Magwaza *et al.* (2012) y Shenk *et al.* (2008).

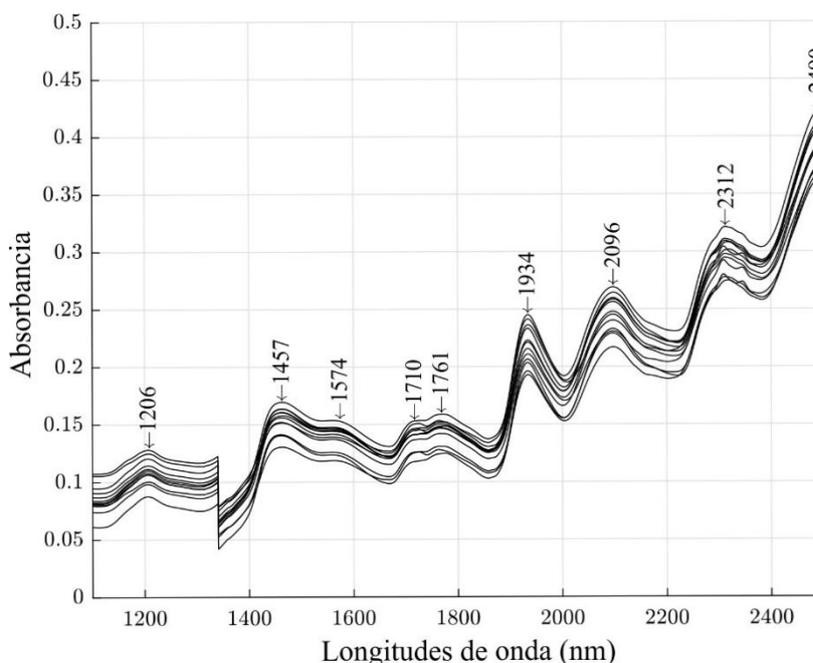


Figura 13. Perfiles espectrales de las micropartículas de citral.

Del mismo modo, los picos en 1457 y 1934 corresponden a bandas de vibración de *O-H extensión* y *O-H combinación*, respectivamente, principalmente debido a la presencia de agua, y se observa un pequeño pico a 1574 nm, que está dentro de la banda vibratoria de *C-H extensión*, asociada con lípidos, probablemente debido a la presencia de lecitina de soja utilizada como emulsionante en la preparación de las micropartículas (Kawano, 2007).

Estos perfiles indicaron una correspondencia entre los cambios de los espectros y el CS_{Ct} en las micropartículas, lo que permite el análisis de patrones y la implementación de modelos de predicción.

4.2.3. Modelado

En las siguientes subsecciones, se muestran los principales resultados de la etapa de modelado.

a) Modelos PCA-MLR y PCA-ANN

La Figura 14a muestra que cuatro componentes principales (PCs) pueden explicar más del 99.5% de la varianza; los dos primeros componentes representan 85.4 y 11.9% de la varianza espectral, respectivamente. Estos resultados son similares a los proporcionados por Munera *et al.* (2017), con 88.9 a 94.4%, o Shafiee y Minaei (2018) con 98% cuando se evaluaron los cítricos y sus jugos. Luego, con la matriz de PCs, se construyeron los modelos PCA-MLR y PCA-ANN (ver Figura 14b y Figura 14c). En ambos modelos, con los conjuntos de datos de calibración y validación, el R^2 varió entre 0.81 y 0.83.

b) Modelo PLSR

La construcción de modelos PLSR podría dividirse en dos etapas. En la primera etapa, todas las longitudes de onda se utilizan como entradas para el modelo. En este caso, utilizando los datos de calibración y validación, el R^2 varió entre 1.0 y 0.839 (Figura 15a). De acuerdo con estos resultados, la validación del modelo PLSR completo mostró una mayor dispersión con respecto a la calibración del modelo PLSR completo. En este caso, según Esposito *et al.* (2010), Van der Maaten *et al.* (2009) y, Vega-Vilca y Guzmán, (2011), el resultado puede deberse a la alta colinealidad y la superposición de los perfiles espectrales, que introducen ruido en el modelo, por lo que es necesario determinar la relevancia de cada longitud de onda utilizada previamente en el modelo.

Luego, en un enfoque similar al de Liu *et al.* (2014) a través de la validación cruzada del modelo PLSR, se estableció el número de VL o longitudes de onda relevantes (VR) que fueron diecisiete (17), obtenidos a través de la minimización de RMSE y la maximización de R^2 y se representaron en la Figura 15b.

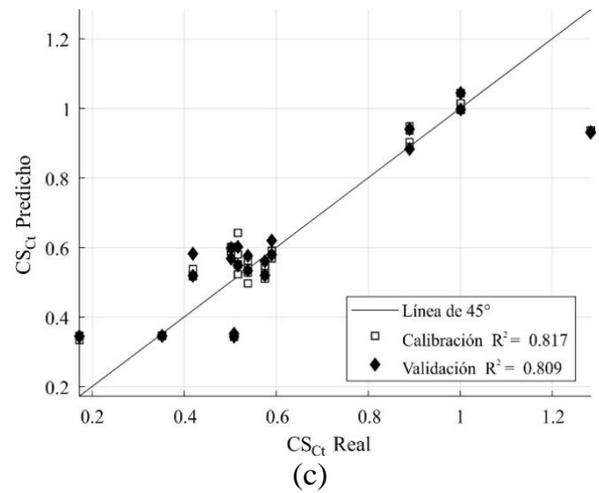
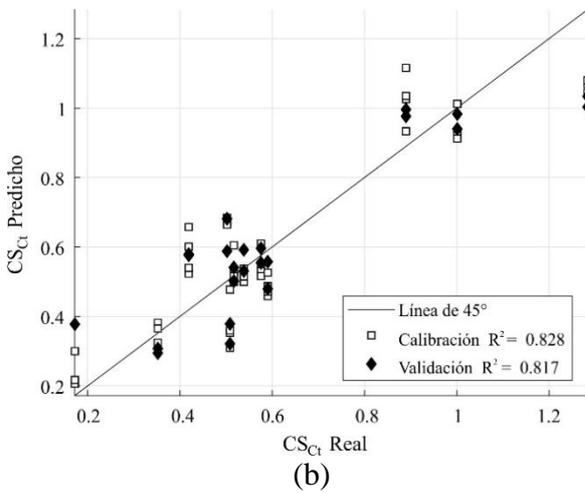
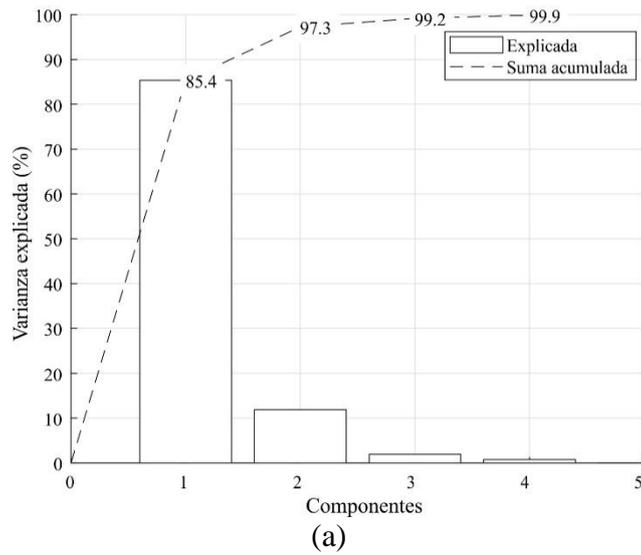


Figura 14. Componentes principales y modelos PCA-MLR y PCA-ANN. (a) Varianza explicada vs PCs, (b) Modelo PCA-MLR, y (c) Modelo PCA-ANN.

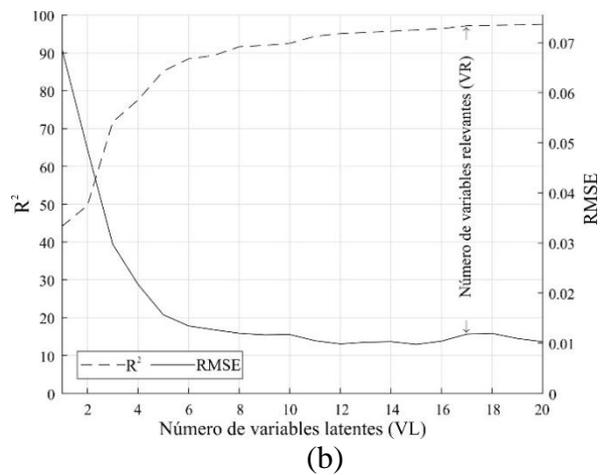
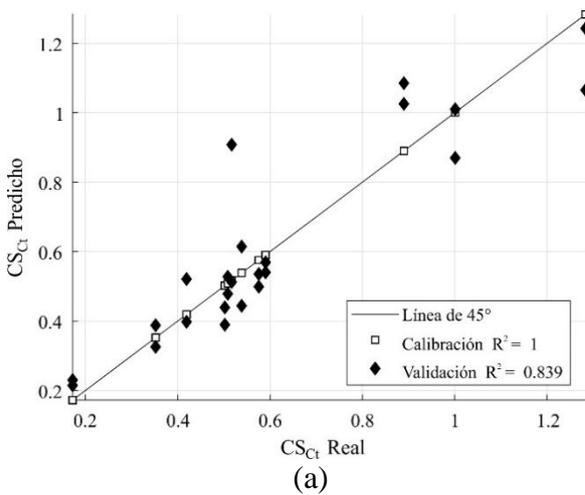


Figura 15. Modelo PLSR completo y número de variables relevantes (VR): (a) Modelo PLSR completo, y (b) R^2_c y $RMSE_c$ vs VL.

La Figura 16 muestra la longitud de onda más relevante según su valor del β -coeficiente absoluto, los perfiles medios de soluciones de citral a diferentes concentraciones y los perfiles medios de las micropartículas. Como se muestra, las longitudes de onda relevantes (VR) se distribuyeron principalmente en el rango [2251 - 2491] nm y en otros dos intervalos [1287 - 1544] nm y [1827 - 2100] nm. Los β -coeficientes resultantes del procedimiento de calibración para el CS_{Ct} muestran una similitud entre los perfiles de soluciones de citral y micropartículas, con un mayor predominio de sobretonos y bandas de *C-H flexión-extensión* en el rango de 2251 a 2380 nm.

Igualmente, se observó un mayor β -coeficiente a 2306 nm para citral causado por la combinación de las frecuencias de *C=O* y *C-H extensión* del grupo aldehído que está presente en citral. Los picos negativos (2251 y 2322 nm) podría deberse a que los picos de absorbancia se invierten en el cálculo del β -coeficiente (Wilson *et al.*, 2002). Estos resultados están dentro de los rangos obtenidos por Steuer *et al.* (2001) en la evaluación del espectro NIR del limoneno puro, en la que obtuvieron picos predominantes entre las áreas 2250 y 2360 nm. Por otro lado, los resultados del presente estudio fueron ligeramente superiores a los reportados por Wilson *et al.* (2002) obtenidos en la evaluación del espectro NIR de citral aceites esenciales de hierba luisa o limoncillo (*Cymbopogon citratus*) y limón (*Citrus limon*), observaron que el grupo funcional aldehídico *C-H* (contenido en el citral) exhibía bandas características de combinación entre 2210 nm y 2250 nm; además, un incremento en la absorbancia alrededor de 2212 nm con el incremento del contenido de citral; esta diferencia en los resultados podría deberse a la presencia de dextrina y lecitina de soja como parte de la formulación de las micropartículas.

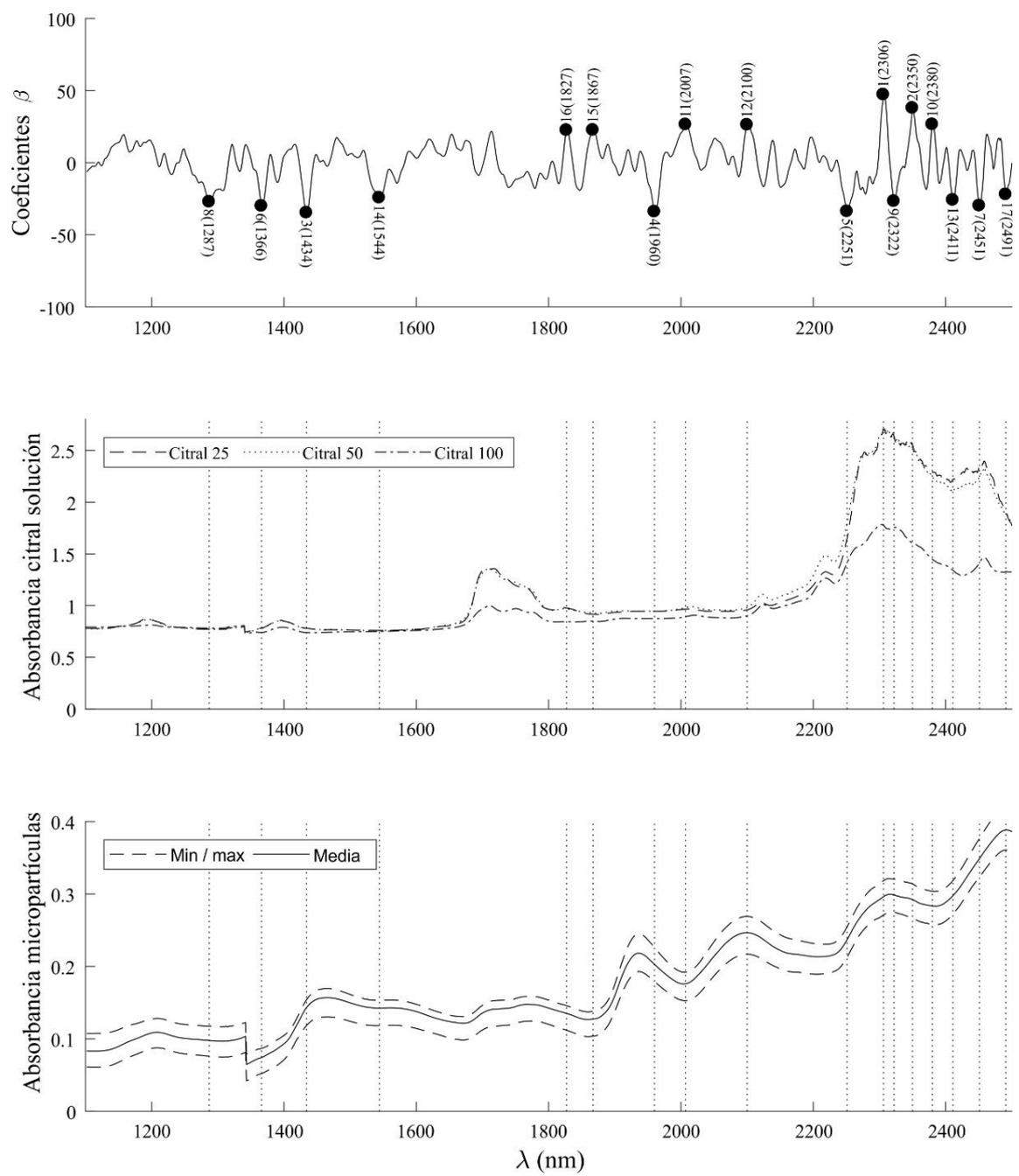


Figura 16. Variables relevantes (VR) y perfiles espectrales. De arriba abajo: β -coeficientes y VR (puntos negros); perfil espectral de soluciones citral; y perfil espectral de micropartículas.

Finalmente, las longitudes de onda relevantes se usaron para construir los modelos PLSR optimizados (ver Figura 17). Como se muestra en esta figura, los valores de R^2 son 0.95 y 0.90 para calibración y validación, respectivamente. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Juliani *et al.* (2006) en la evaluación de las estadísticas de correlación NIR para la composición de aldehído en los aceites esenciales de hoja de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), hojas y brotes de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*). Además, estos resultados fueron similares a los obtenidos por Steuer *et al.* (2001) y Schulz *et al.* (2002), para limoneno en aceite de cítricos; y a los reportados por Wilson *et al.* (2002) y López *et al.* (1993), quienes cuantificaron citral en aceites de limoncillo y limón. Finalmente, los resultados del presente estudio estuvieron dentro de los rangos obtenidos por Schulz, *et al.* (2003), quienes evaluaron las composiciones químicas de los aceites esenciales de tomillo, orégano y manzanilla, en todos estos estudios reportaron valores de R^2 mayores a 0.90.

4.2.4. Modelo ANN

La Figura 18 resume los resultados de esta etapa. La Figura 18a muestra el modelo ANN completo, donde los valores de R^2 para calibración y validación con 0.95 y 0.93, respectivamente, fueron similares. La Figura 18b muestra el modelo ANN optimizado, que se construyó a partir de las VR seleccionadas, donde los valores de R^2 para la calibración y validación fueron iguales a 0.95. De acuerdo con estos resultados, en ambas figuras, se observó poca dispersión de datos. En este caso, similar a Vásquez *et al.* (2018), los modelos ANN se muestran más estables.

4.2.5. Comparación de modelos

Las medidas estadísticas de los modelos quimiométricos (completos y optimizados) usando los conjuntos de datos de calibración y validación se muestran en la Tabla 6. Estas medidas mostraron que los modelos PCA-MLR, PCA-ANN, PLSR y ANN produjeron resultados aceptables con un alto R^2 sobre 0.80. Excepto por el modelo PLSR completo, el modelo ANN logró un mejor ajuste que los otros modelos. El rendimiento superior del modelo ANN podría atribuirse parcialmente a su capacidad para ajustarse a funciones no lineales, una capacidad que los otros modelos no poseen. Estos resultados están de acuerdo con los reportados por Santos *et al.* (2014), Kuang *et al.* (2015) y Vásquez *et al.* (2018).

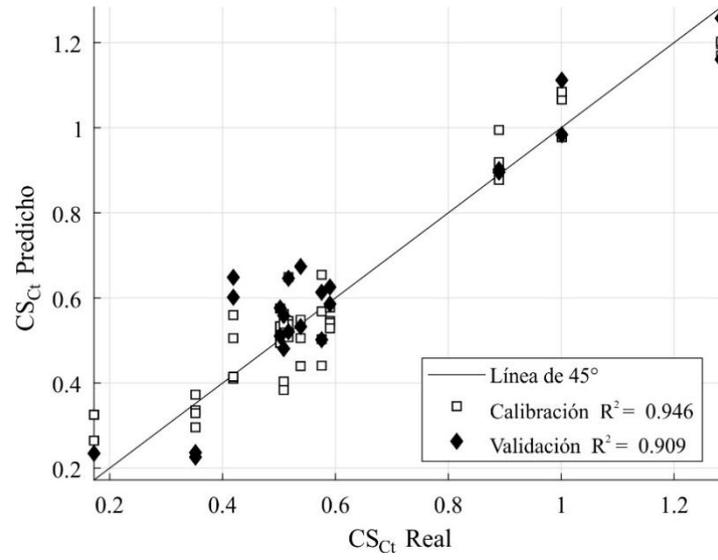


Figura 17. Modelos PLSR optimizados.

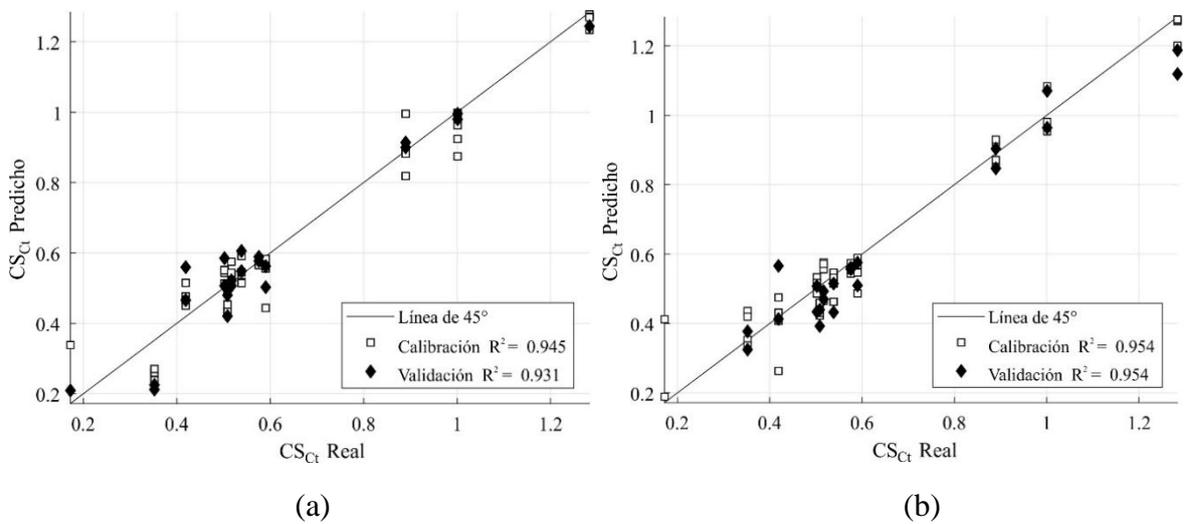


Figura 18. Modelos ANN: (a) completo y (b) optimizado.

Tabla 6. Medidas estadísticas para modelos quimiométricos usados en la determinación de CS_{ct}

Conjunto de datos de calibración

Parámetro	PCA		PLSR		ANN	
	MLR	ANN	Completo	Optimizado	Completo	Optimizado
R^2	0.828	0.817	1.000	0.946	0.945	0.954
R^2_{ajust}	0.825	0.813	1.000	0.944	0.944	0.953
MSE	0.013	0.010	0.000	0.005	0.005	0.004
RMSE	0.112	0.098	0.000	0.067	0.072	0.064

Conjunto de datos de validación

Parámetro	PCA		PLSR		ANN	
	MLR	ANN	Completo	Optimizado	Completo	Optimizado
R^2	0.817	0.809	0.839	0.909	0.931	0.954
R^2_{ajust}	0.808	0.800	0.832	0.904	0.928	0.952
MSE	0.013	0.010	0.014	0.008	0.008	0.004
RMSE	0.114	0.101	0.120	0.090	0.090	0.063

4.3. BIOPELÍCULAS ACTIVAS ELABORADAS CON MICROPARTÍCULAS DE CITRAL PARA PROLONGAR LA VIDA ÚTIL DEL QUESO FRESCO

4.3.1. Optimización de múltiples variables utilizando metodología superficie de respuesta (MSR) para las biopelículas activas

La Tabla 7 muestra los resultados de las variables evaluadas en las biopelículas activas obtenidas mediante el método de casting. El porcentaje de opacidad varió entre 14.8 y 33.7%, el valor de transparencia entre 1.4 y 8.3 (A_{600}/mm), y el módulo elástico (E) entre 52.7 y 493.0 MPa. Estos resultados estuvieron dentro de los rangos reportados por (Pires et al., 2011) para biopelículas elaboradas con proteínas de merluza, glicerol y aceite de tomillo, quienes obtuvieron una opacidad entre 13 y 20%, y valor de transparencia entre 1.5 y 4. Del mismo modo, el E estuvo dentro de los rangos reportados por (Arrieta et al., 2013) para biopelículas con CS, glicerol y carvacrol, quienes observaron E entre 10 y 200 MPa.

La Tabla 8 muestra el análisis de varianza (ANOVA) para biopelículas activas con micropartículas de citral elaboradas mediante el método de casting. En las variables respuestas evaluadas, solo la interacción de las variables independientes para el valor de transparencia, y el componente cuadrático de la relación CS:MC para el módulo elástico, fueron no significativas, pero si se consideraron en la ecuación cuadrática debido a la importancia para los modelos matemáticos (Urzúa *et al.*, 2017).

Tabla 7. Diseño experimental y valores de las variables respuestas para la elaboración de biopelículas activas mediante el método de casting

Exp ¹ .	Relación CS: Sb	Relación CS: MC	Opacidad (%) X±DE	Valor de transparencia a 14 días (A_{600}/mm) X±DE	Módulo elástico – <i>E</i> (MPa) X±DE
1	1:0.5 (-1)	1:0.5 (-1)	14.82 ±0.73	2.40 ±0.30	239.48 ±17.56
2	1:0.5 (-1)	1:1 (0)	17.38 ±0.60	1.36 ±0.39	407.46 ±34.09
3	1:0.5 (-1)	1:1.5 (+1)	19.99 ±0.27	1.99 ±0.10	492.96 ±44.06
4	1:1 (0)	1:0.5 (-1)	16.34 ±0.88	5.80 ±1.07	72.91 ±7.09
5	1:1 (0)	1:1 (0)	15.87 ±0.39	2.70 ±0.64	90.46 ±6.97
6	1:1 (0)	1:1 (0)	15.91 ±0.14	2.38 ±0.66	104.45 ±11.88
7	1:1 (0)	1:1 (0)	15.72 ±0.16	2.31 ±0.28	120.35 ±7.64
8	1:1 (0)	1:1 (0)	15.35 ±0.61	2.80 ±0.85	105.81 ±9.53
9	1:1 (0)	1:1.5 (+1)	16.20 ±0.49	3.32 ±0.57	163.24 ±12.05
10	1:1.5 (+1)	1:0.5 (-1)	33.66 ±0.85	8.29 ±0.45	52.72 ±3.10
11	1:1.5 (+1)	1:1 (0)	25.37 ±1.76	7.11 ±0.57	55.32 ±2.57
12	1:1.5 (+1)	1:1.5 (+1)	19.21 ±0.24	6.83 ±0.78	68.04 ±4.32

¹Número de experimento. CS: Caseinato de sodio; Sb: Sorbitol; MC: micropartícula de citral; X: promedio; y DE: Desviación estándar (n=3).

Tabla 8. Análisis de varianza (ANOVA) para la elaboración de biopelículas activas con micropartículas de citral, mediante método de casting

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	R2	R2 ajust. g.l.
Opacidad (Op)						97.82	96.00
A: Relación CS:Sb ^a	113.1000	1	113.1000	1737.56	0.0000*		
B: Relación CS:MC ^b	14.7894	1	14.7894	227.21	0.0006*		
AA	85.3151	1	85.3151	1310.69	0.0000*		
AB	96.2361	1	96.2361	1478.47	0.0000*		
BB	0.8103	1	0.8103	12.45	0.0387*		
Falta de ajuste	7.1106	3	2.3702	36.41	0.0074*		
Error puro	0.1953	3	0.0651				
Total (corr.)	334.5590	11					
Valor de transparencia (VT)						96.34	93.29
A: Relación CS:Sb ^a	45.2651	1	45.2651	791.92	0.0001*		
B: Relación CS:MC ^b	3.1538	1	3.1538	55.18	0.0050*		
AA	2.6800	1	2.6800	46.89	0.0064*		
AB	0.2756	1	0.2756	4.82	0.1156		
BB	4.6994	1	4.6994	82.22	0.0028*		
Falta de ajuste	2.0964	3	0.6988	12.23	0.0345*		
Error puro	0.1715	3	0.0572				
Total (corr.)	61.9257	11					
Módulo elástico (E)						98.93	98.04
A: Relación CS:Sb ^a	154825.0000	1	154825.0000	1037.45	0.0001*		
B: Relación CS:MC ^b	21495.7000	1	21495.7000	144.04	0.0012*		
AA	32663.1000	1	32663.1000	218.87	0.0007*		
AB	14180.0000	1	14180.0000	95.02	0.0023*		
BB	18.6032	1	18.6032	0.12	0.7474		
Falta de ajuste	1998.3900	3	666.1300	4.46	0.1254		
Error puro	447.7060	3	149.2350				
Total (corr.)	229129.0000	11					

^a Relación carbonato de sodio: sorbitol (CS:Sb).

^b Relación carbonato de sodio: micropartícula de citral (CS:MC).

g.l.: grados de libertad.

* Significante a un nivel de confianza de 5%

La opacidad de un material es una indicación de cuánta luz pasa a través del éste. Cuanto mayor sea la opacidad, menor será la cantidad de luz que puede pasar a través del material (HunterLab Method, 2008). El ANOVA mostró que la relación CS:Sb y relación CS:MC, tanto es sus componentes lineales, cuadráticas e interacción entre ambas fueron significativas para la opacidad. El modelo explicó un 96.0% de la variabilidad (R^2 ajustada por g.l.) para la opacidad de la biopelícula (Tabla 8). La ecuación de regresión cuadrática que describe el efecto de las variables independientes en la opacidad (Op) es la siguiente:

$$Op = 15.3812 - 16.9467 \times CS:Sb + 12.07 \times CS:MC + 22.625 \times CS:Sb^2 - 19.62 \times CS:Sb \times CS:MC + 2.205 \times CS:MC^2$$

El gráfico de superficie respuesta (Figura 19a) muestra que la opacidad fue menor para biopelículas tanto con menor Sb en la relación CS:Sb y menor MC en la relación CS:MC. Cuanto menor son el Sb y MC en ambas relaciones, las biopelículas son menos opacas; como era de esperarse, se observó una relación directa entre el aumento de los sólidos en la solución con el aumento de la opacidad; probablemente debido al efecto de la concentración de los sólidos en la solución (García y Sobral, 2005). Se observó que las películas producidas en este trabajo fueron más opacas que las películas con CS, glicerol y aceite de germen de maíz (Matsakidou *et al.*, 2019) y películas con proteína de tilapia y glicerol (< 18%) (García y Sobral, 2005; Sobral, 2000); resultados que podrían atribuirse a que en el presente estudio adicionalmente se incorporó micropartículas de citral, cuyos insumos empleados en su elaboración (dextrina, lecitina de soya y citral), además de incrementar los solutos en la solución, influyó en la opacidad.

El valor de transparencia (A_{600}/mm) representa la capacidad de las biopelículas de retener o no el paso de los rayos de luz que inciden sobre éste; valores de transparencia más altos indican una menor transparencia (Pires *et al.*, 2011). El ANOVA indicó que la relación CS:Sb y la relación CS:MC en sus componentes lineales y cuadráticas, fueron significativas sobre el VT. Aunque la interacción de ambas variables no fue significativa se consideró en la ecuación cuadrática porque es fundamental en el modelo matemático y porque otros autores como Urzúa *et al.* (2017), también lo consideraron. El modelo explicó un 93.29% de la variabilidad (R^2 ajustada por g.l.) en el VT (Tabla 8). La ecuación de regresión cuadrática que describe el efecto de las variables independientes en el VT es la siguiente:

$$VT = 7.0025 - 1.47667 \times CS:Sb - 11.02 \times CS:MC + 4.01 \times CS:Sb^2 - 1.05 \times CS:Sb \times CS:MC + 5.31 \times CS:MC^2$$

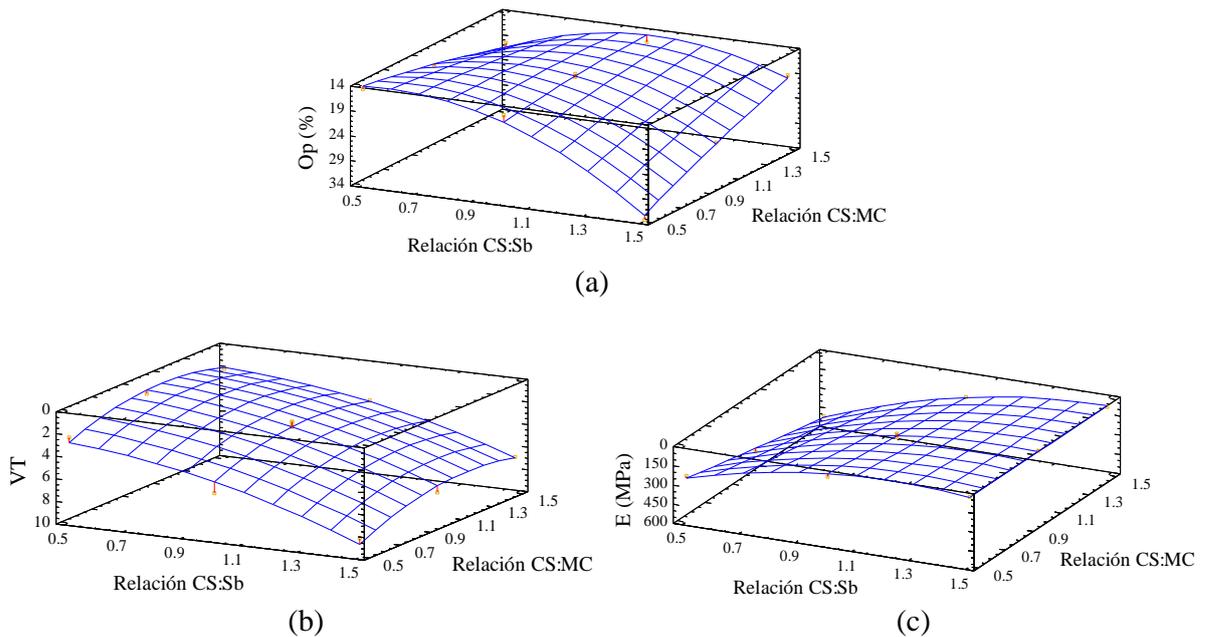


Figura 19. Gráficos de superficie respuesta para las biopelículas activas: (a) Opacidad – Op, (b) Valor de transparencia – VT (A_{600}/mm), y (c) Módulo elástico – E.

Como se puede observar en el gráfico de superficie (Figura 19b), el VT se redujo con menor Sb en la relación CS:Sb y se redujo ligeramente MC intermedios en la relación CS:MC. Cuanto menor es el Sb, menor es el VT de las biopelículas, contribuyendo a una mejor transparencia, comportamiento similar cuando se evaluó la opacidad. Al mismo tiempo, el VT de las biopelículas disminuyó ligeramente a concentraciones intermedias de MC; lo que indicó que la transparencia podría no estar influenciado significativamente con la adición de MC, pero si con el plastificante (Sb), similar a lo encontrado por Pires *et al.* (2011) que observaron una reducción de la transparencia en biopelículas de proteína de merluza con glicerol y AE de timol. Sin embargo, Limpisophon *et al.* (2010) informaron una transparencia creciente con niveles crecientes de ácido esteárico u oleico en biopelículas de proteínas de tiburón.

El módulo elástico (E) está asociado directamente con los cambios de longitud que experimenta la biopelícula cuando está sometido a una tracción. El ANOVA mostró que la relación CS:Sb en su componente lineal y cuadrático, la relación CS:MC en su componente lineal, y interacción entre ambas variables independientes fueron significativas para E . Aunque la relación CS:MC en su componente cuadrático no fue significativa se consideró en la ecuación cuadrática porque es fundamental en el modelo matemático y porque otros investigadores como Urzúa *et al.* (2017) también lo consideraron. El modelo explicó un

98.04% de la variabilidad (R^2 ajustada por g.l.) para E de la biopelícula (Tabla 8). La ecuación de regresión cuadrática que describe el efecto de las variables independientes en E es la siguiente:

$$E = 505.95 - 968.503 \times \text{CS:Sb} + 379.0 \times \text{CS:MC} + 442.695 \times \text{CS:Sb}^2 - 238.16 \times \text{CS:Sb} \times \text{CS:MC} - 10.565 \times \text{CS:MC}^2$$

El gráfico de superficie respuesta (Figura 19c) muestra que E fue menor para biopelículas con mayor contenido de Sb en la relación CS:Sb y menor MC en la relación CS:MC. Por lo tanto, el aumento del plastificante (Sb) en la formulación mostró menores valores de E , por consiguiente ofreció biopelículas más flexibles. Estos resultados están de acuerdo con Arrieta *et al.* (2013), quienes afirmaron la influencia directa del aumento del plastificante en la flexibilidad de biopelículas de caseinato. Por el contrario, el aumento de las MC en la formulación influyó en la rigidez de las biopelículas; similar a lo reportado por Alarcón-Moyano *et al.* (2017) que observaron mayor rigidez en biopelículas de alginato con el incremento de microcápsulas de citral.

Para la optimización múltiple, se aplicó la función deseabilidad, considerando la minimización del porcentaje de opacidad, valor de transparencia y módulo elástico. Todas las variables respuesta tuvieron coeficientes de determinación superiores a 90% (R^2 ajustada por g.l.) y residuales inferior a 1.0; por lo tanto, fueron considerados en el modelo. Además, la falta de ajuste para el módulo elástico fue no significativa, lo cual indicó que el modelo matemático se ajusta a los datos experimentales dentro del dominio experimental; sin embargo la falta de ajuste para la opacidad y VT fueron significativas, indicando la inclusión de todos los términos en el modelo (Bezerra *et al.*, 2008; Urzúa *et al.*, 2017).

La Figura 20, muestra el gráfico de superficie respuesta del CCD para la elaboración de biopelículas activas con micropartículas de citral. Como se observó, las variables respuestas se minimizaron a valores intermedios tanto de relación CS:Sb y relación CS:MC. Se obtuvo un valor óptimo de deseabilidad de 0.87 para una relación CS:Sb óptima de 1:0.91 y una relación CS:MC óptima de 1:0.95, ambos en el intermedio del rango estudiado. Es importante hacer notar que las condiciones óptimas obtenidas para las biopelículas según el diseño estadístico son específicas para este sistema y esto no se podría aplicar cuando se emplean otros plastificantes e insumos en la formulación (Davidović *et al.*, 2018). En este contexto, especialmente los plastificantes, cumplen un papel fundamental en las propiedades mecánicas (elasticidad) de las biopelículas (Tapia-Blácido *et al.*, 2011).

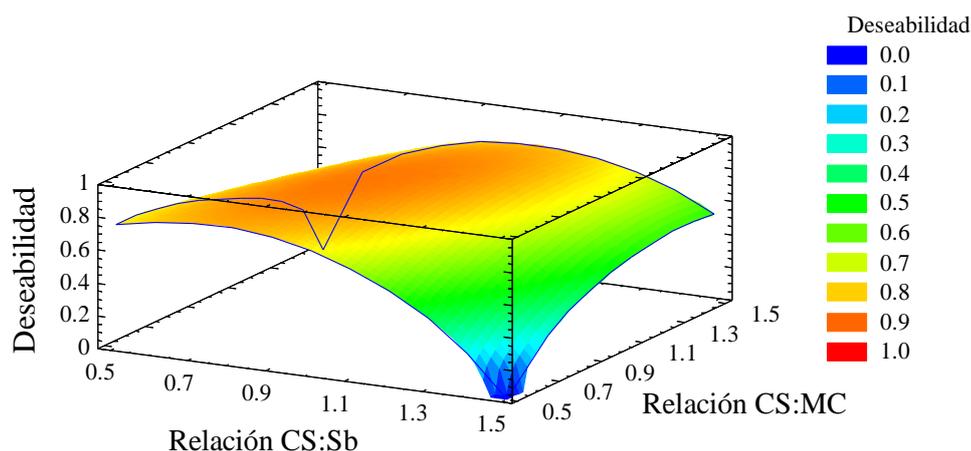


Figura 20. Gráfico de superficie de respuesta (MSR) para la optimización de las biopelículas activas, considerando la minimización de las variables respuestas.

4.3.2. Caracterización de las biopelículas activas obtenidas en condiciones óptimas

Las biopelículas activas fueron elaboradas bajo condiciones óptimas de relación CS:Sb (1:0.91) y relación CS:MC (1:0.95). Se encontraron bajos valores de opacidad (16.6%), valor de transparencia a los 14 días [3.9 (A_{600}/mm)] y módulo elástico (74.6 MPa); similares a los valores predichos por el modelo que presentó una opacidad de 15.2%, valor de transparencia de 2.4 (A_{600}/mm) y módulo elástico de 137.3 MPa.

La Tabla 9 muestra los valores de las características de espesor, opacidad, transparencia, propiedades de color y mecánicas de las biopelículas activas obtenidas en condiciones óptimas.

a) Espesor de las biopelículas activas óptimas

Las biopelículas activas obtenidas en condiciones óptimas presentaron $150 \pm 1.21 \mu\text{m}$ de espesor (Tabla 9), superior a los reportados por Arrieta *et al.* (2014, 2013), para biopelículas de CS con AE de carvacrol libre ($88 \pm 16 \mu\text{m}$); debido probablemente a que en el presente estudio se incorporó el AE de citral microencapsulado con dextrina y lecitina de soya, solutos que influyeron en el incremento del espesor.

Tabla 9. Características de las biopelículas activas obtenidas bajo condiciones óptimas

Parámetros		Óptimo	
		X ± DE	
Espesor (µm)		150.00 ¹	±1.21
Propiedades de color (ópticas)	<i>L</i> *	88.95	±0.26
	<i>a</i> *	-1.81	±0.14
	<i>b</i> *	15.40	±0.27
	<i>C</i> *	15.51	±0.26
	<i>h</i> *	96.77	±0.59
	<i>W</i>	80.96	±0.35
	ΔE^*	12.36	±0.32
	Opacidad (%)	16.57	±0.13
Propiedades mecánicas	<i>E</i> (MPa)	74.55	±6.39
	ϵ_B (%)	17.66	±2.91
	RT (MPa)	3.16	±0.18
Valor de transparencia (A_{600}/mm)	3 días	1.44 ¹ b	±0.16
	7 días	1.61 b	±0.11
	14 días	3.97 a	±1.45

¹Los valores indican promedio (n=3). X: promedio; DE: desviación estándar.

Letras diferentes en sentido vertical, indican diferencias estadísticamente significativa según la prueba Tukey ($p < 0,05$), para el valor de transparencia.

b) Propiedades de color (ópticas) de las biopelículas activas óptimas

Las propiedades de color de las biopelículas activas representadas por sus coordenadas CIELab se muestran en la Tabla 9. Al comparar los resultados del presente estudio con los reportados por Arrieta *et al.* (2014), para biopelículas de CS con glicerol y carvacrol; se observó que los valores de luminosidad (L^*) y coordenadas a^* fueron similares; con valores de L^* cercanos al 100 indicativo de desviación hacia el color blanco y valores negativos de la coordenada a^* con desviación hacia el color verde. Por otro lado, los valores de las coordenadas b^* y ΔE , fueron superiores. Los valores positivos para b^* son indicativos de una desviación hacia el amarillo (Figura 21), que podría atribuirse a la incorporación del citral y lecitina de soya, este último empleado como emulsificante en la microencapsulación.

La variación en las propiedades ópticas de las biopelículas con CS también fue investigada por otros autores quienes propusieron que la presencia de AE en las formulaciones, más aun si son microencapsulados, reduce su transparencia (Arrieta *et al.*, 2014; Fabra *et al.*, 2009; Pereda *et al.*, 2010). Biopelículas elaboradas con proteína de merluza y AE de tomillo (Pires *et al.*, 2011), al compararlos con el presente estudio, presentaron valores de L^* y a^* similares; los valores de b^* , C^* y ΔE inferiores; por el contrario, los valores de h^* y W fueron superiores. En general las biopelículas de CS y MC fueron menos blancas que las preparadas con CS y AE de canela y jengibre libres (Atarés *et al.*, 2010), proteínas de merluza (Pires *et al.*, 2011), proteína de trigo (Irissin-mangata *et al.*, 2001) y proteína de soya (Jensen *et al.*, 2015); estas diferencias podría deberse al tipo de proteína, origen y forma de incorporación del AE, que influyen en sus propiedades físicas, en particular en la transparencia y color (Irissin-mangata *et al.*, 2001; Quintavalla y Vicini, 2002).

La opacidad (Tabla 9) presentó valores similares a los trabajos de Pires *et al.* (2011) en biopelículas con proteínas de merluza, glicerol y AE de tomillo (15 y 16%); y se observó valores superiores a los reportados por García y Sobral (2005) en biopelículas de proteína de tilapia y glicerol (4 y 10%), más transparentes que las biopelículas del presente estudio. Esto podría deberse principalmente a la adición de AE en la formulación; al igual que en otros estudios donde la opacidad de las biopelículas se vio influenciado principalmente por el AE, confiriéndole un aspecto más opaco (Matsakidou *et al.*, 2019).

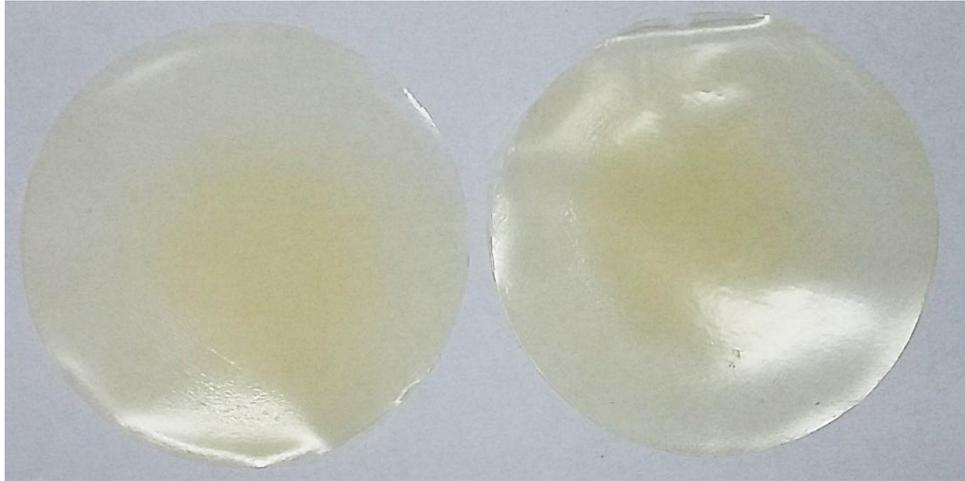


Figura 21. Fotografía de las biopelículas activas con micropartículas de citral elaboradas en condiciones óptimas y tomadas inmediatamente después de su procesamiento.

c) Valor de transparencia de las biopelículas activas óptimas

Los valores de transparencia ($A_{600/\text{mm}}$), 3 días después del procesamiento, de las biopelículas en condiciones óptimas fue alrededor de 1.5 (Tabla 9) y similar a lo reportado para otras biopelículas elaboradas con CS y péptidos de camarón encapsulados (Montero *et al.*, 2019) y ligeramente superior (menos transparentes) en comparación a las biopelículas con proteínas de peces (Araújo *et al.*, 2018; Pires *et al.*, 2011). El comportamiento del VT fue similar a la opacidad, que se vio influenciado por la incorporación de solutos y AE en la formulación. Por otro lado, como era de esperarse, el VT de las biopelículas del presente estudio aumentó con el tiempo de almacenamiento en más de un 100%, luego de 14 días; obteniendo, al final de este periodo, biopelículas menos transparentes; similar a los reportados para biopelículas con CS y aceite de germen de maíz (Matsakidou *et al.*, 2019); y con proteína de soja (Ciannamea *et al.*, 2015).

d) Propiedades mecánicas de las biopelículas activas óptimas

Las propiedades mecánicas como el módulo elástico (E), alargamiento a la rotura (ϵ_B) y resistencia a la tracción (RT), de las biopelículas obtenidas en condiciones óptimas se muestran en la Tabla 9; resultados que estuvieron dentro de los rango reportados para biopelículas con CS, glicerol y carvacrol (Arrieta *et al.*, 2014, 2013); del mismo modo, el porcentaje de ϵ_B y RT, estuvieron dentro de los intervalos para biopelículas de CS, glicerol y AE de germen de maíz; a excepción que su E (200 – 800 MPa) reportados fue mucho mayor (Matsakidou *et al.*, 2019). Por el contrario, los resultados del presente estudio fueron inferiores a los reportados para biopelículas de CS y AE de tung (Pereda *et al.*, 2010). La

diferencia en los resultados podría atribuirse principalmente al tipo, forma y concentración de los aditivos empleados en la formulación.

Por otro lado, estudios reportan que los AE, como el citral, carvacrol, timol, etc., afectan de alguna manera las interacciones entre las cadenas macromoleculares en la matriz del polímero; este efecto puede estar relacionado con interacciones electrostáticas entre el CS y el AE debido a las diferentes distribuciones de carga en las cadenas de proteína. Se puede afirmar que los caseinatos actúan como macroaniones en el pH experimental (6.3 – 6.6); mientras que los AE como el citral por ser un aldehído acíclico, con grupo funcional formilo (-CHO), podría ser portador de protones, intercambiando su protón por otro catión, como el sodio con carga positiva (Arrieta *et al.*, 2013). Otra forma de como la incorporación del AE afecta las propiedades mecánicas de las biopelículas, podría atribuirse a que los AE incrustados en la matriz de CS pueden actuar como partículas de relleno deformables, mejorando las propiedades de tracción de las biopelículas (Matsakidou *et al.*, 2019). Los efectos positivos de los AE en la elasticidad de las biopelículas son mayores cuando se incorpora en forma libre; pero se ven significativamente reducidos cuando se adiciona microencapsulado (Alarcón-Moyano *et al.*, 2017).

La mayoría de las investigaciones donde evaluaron CS, plastificantes y AE, coinciden que las propiedades mecánicas de las biopelículas son influenciadas positivamente por la incorporación de plastificante; las películas no plastificadas presentan un E y RT elevados a expensas de un ϵ_B reducido; comportamiento opuesto (E y RT inferior, y mayor ϵ_B), se registra para muestras con glicerol (Arrieta *et al.*, 2013; Matsakidou *et al.*, 2019; Montero *et al.*, 2019; Pereda *et al.*, 2010) y sorbitol (Tapia-Blácido *et al.*, 2011); lo que confirma el papel del plastificante.

En términos generales, se sabe que las películas para envase de alimentos requieren una gran flexibilidad a temperatura ambiente para evitar roturas innecesarias durante su uso (Martino *et al.*, 2006); en este sentido, se demostró que las biopelículas del presente estudio tuvieron respuestas mecánicas adecuadas para envasado de alimentos.

e) Microestructura de las biopelículas activas óptimas

La estructura resultante de las biopelículas se ve afectada por la disposición de los diferentes componentes en la emulsión, y las interacciones que tienen lugar entre ellas mientras se secan. El análisis microestructural de las películas proporciona información relevante sobre la disposición de dichos componentes y ayuda a comprender los mecanismos de

transferencia de vapor de agua a través de las biopelículas, así como su interacción con la luz que determina las propiedades ópticas (Fabra *et al.*, 2009). La microestructura de las biopelículas se estudió cualitativamente utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM). La Figura 22a muestra la micrografía SEM de la superficie de las biopelículas obtenidas en condiciones óptimas, en las que se observó micropartículas blanquecinas externas a la muestra, adheridas durante su acondicionamiento para su evaluación en el SEM; además, se observó discontinuidades superficiales en forma de agujeros pequeños. La Figura 22b muestra micrografías SEM tomadas de la sección transversal, al igual que en las vistas de la superficie se observó microagujeros. En ambos casos podría deberse a las burbujas de aire presentes en la solución, que explotaron en la superficie y en el interior de la biopelícula durante el proceso de secado cuando se produjo la vaporización del agua (Chalier *et al.*, 2007). Las biopelículas del presente estudio presentaron mayor cantidad de microagujeros comparados a otros trabajos con CS y AE libre o microencapsulado (Arrieta *et al.*, 2014, 2013; Fabra *et al.*, 2009; Pereda *et al.*, 2010), debido probablemente a que en todos estos trabajos para eliminar burbujas de la solución emplearon equipos de baños de ultrasonido, en cambio en el presente trabajo se empleó ultrasonido con sondas sonicadoras; siendo probablemente estas últimas menos eficientes en el procesos de des-aireado de la solución. Además, estudios reportan la influencia de los componentes en la microestructura de las biopelículas; trabajos donde evaluaron muestras de CS con y sin AE, observaron un incremento de pequeños agujeros en muestras con AE (Fabra *et al.*, 2009; Pereda *et al.*, 2010). Por otro lado, con la micrografía SEM, por ser cualitativa no se podría evidenciar la integridad de las MC en las biopelículas, pero probablemente el material encapsulante por ser hidrosoluble se habría disuelto en la solución, mantenido intacta la emulsión LS – Ct.

Adicionalmente, las estructuras superficiales de las biopelículas fueron analizadas a través de AFM. La Figura 23 muestra las micrografías AFM de las biopelículas obtenidas en condiciones óptimas, a diferentes tamaños del campo de observación, entre 2 x 2 μm y 10 x 10 μm ; la escala Z varió entre 0.12 y 0.43 μm . El espesor promedio de las muestras fue de 150 μm . Las biopelículas presentaron una rugosidad cuadrática media de 90 ± 5 nm. En todos los casos se observaron topografías irregulares, con presencia de picos y asperidades, similar a otros estudios con CS, plastificante y AE libres o encapsulados; donde la presencia de AE, dependiendo de la forma de adición (libre o encapsulado) y tipo dan lugar a topografías más irregulares, en comparación a aquellas que solo tienen CS y plastificante las cuales presentan una superficie más lisa (Fabra *et al.*, 2009).

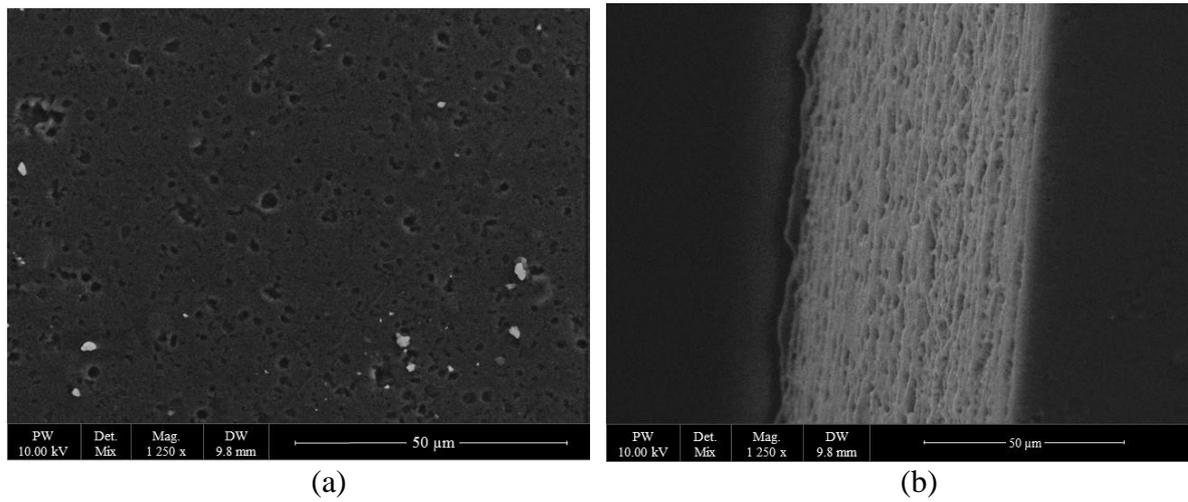
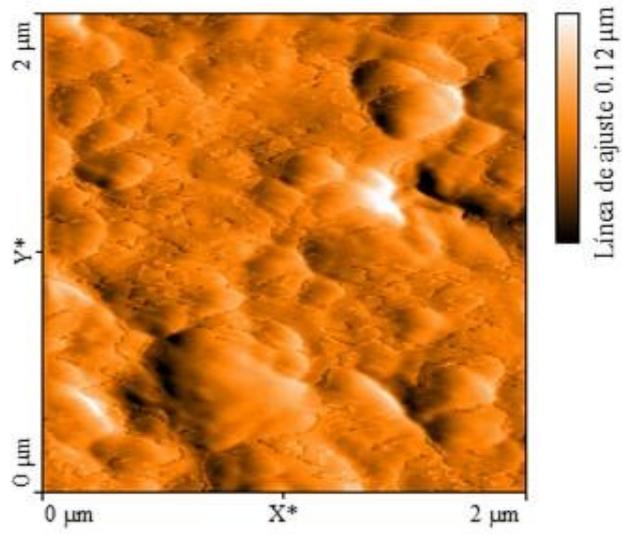
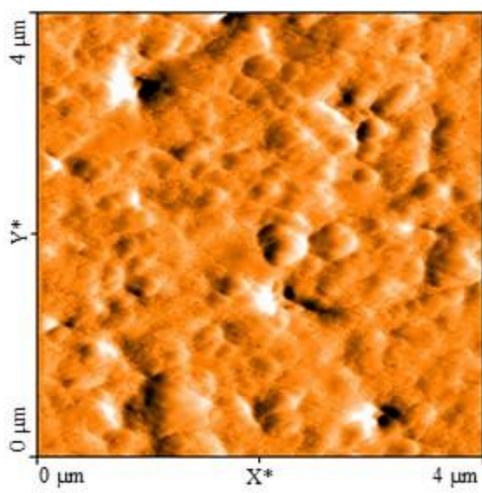


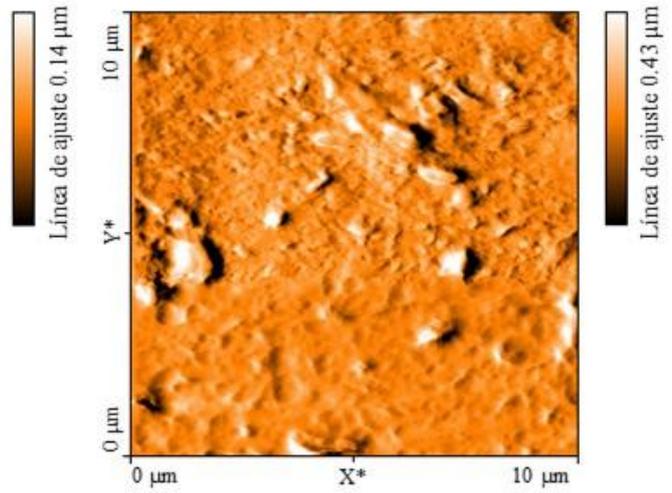
Figura 22. Micrografías SEM (1250 x) de las biopelículas activas obtenidas en condiciones óptimas: (a) vista de la superficie y (b) vista de la sección transversal. Donde: PW: potencia de trabajo; Det. Mix: detector mixto con detector de electrones retrodispersados (BSED - Back Scattered Electron Detector) y detector con electrones secundarios de campo grande (LFD - Large Field Detector); Mag.: magnificación o aumento; y DW: distancia de trabajo.



(a)



(b)



(c)

Figura 23. Micrografías AFM de las biopelículas activas obtenidas en condiciones óptimas, a diferentes tamaños del campo de observación: (a) 2 x 2 μm , (b) 4 x 4 μm , y (c) 10 x 10 μm .

4.3.3. Biopelículas activas para envasado del queso fresco

Para el envasado del queso fresco, las biopelículas activas fueron elaboradas bajo condiciones óptimas y método de casting, siguiendo los procedimientos descritos en el numeral 3.3.3. Las biopelículas con micropartículas de citral - MC (Figura 24a) se formuló con una relación CS:Sb (1:0.91) y relación CS:MC (1:0.95); las que fueron secadas en placas Petri de vidrio de 9 cm de diámetro (EULab, Alemania). Las biopelículas con citral libre - CL (Figura 24b) se elaboró con similar relación CS:Sb (1:0.91) y concentraciones equivalentes para relación CS:MC (1:0.13), considerando que la concentración de citral en la micropartícula fueron de 137.56 mg citral / g polvo; estas biopelículas fueron secadas en recipientes de vidrio 11x20 cm.

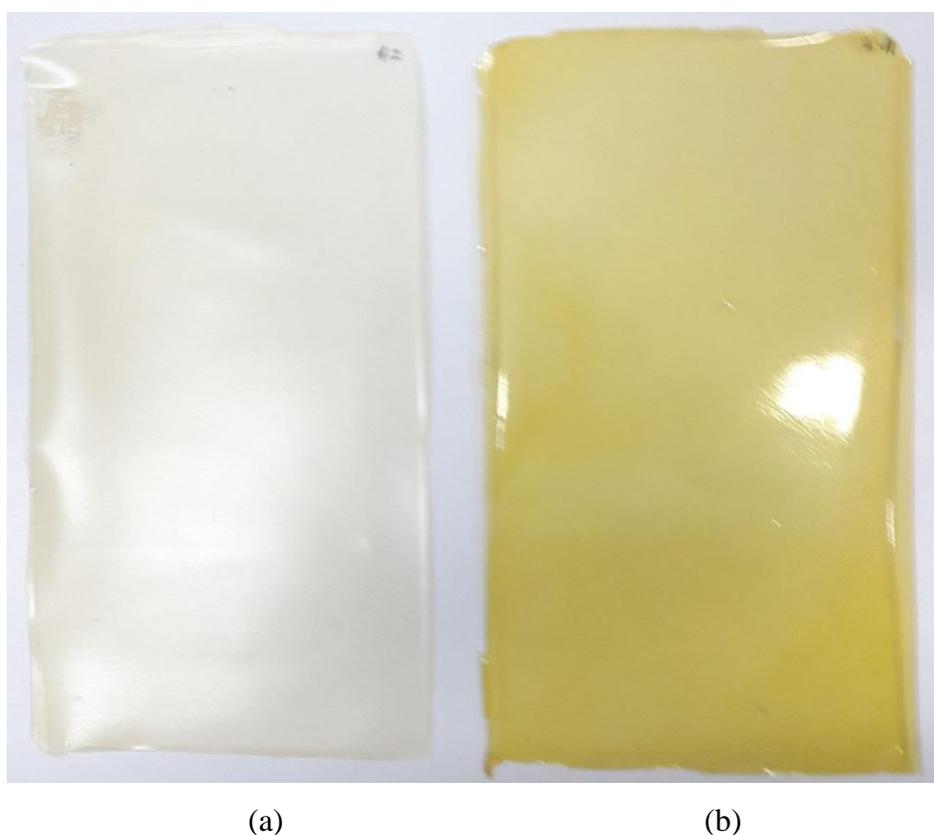


Figura 24. Fotografía de las biopelículas activas elaboradas en condiciones óptimas para envasado del queso fresco: (a) con micropartículas de citral y (b) con citral libre.

Se observó un color más amarillo en las biopelículas formuladas con citral libre en comparación a las con micropartículas de citral. Esto se debería a que el citral al ser adicionado en forma libre (sin microencapsular), estuvo más expuesto a la degradación oxidativa, causando su descomposición mediante una serie de reacciones de ciclación y oxidación; los cuales además de influir en el color de las biopelículas, también redujo su

intensidad del olor a limón fresco (Maswal y Dar, 2014; Tian *et al.*, 2018). Se evidenció mayor estabilidad del citral cuando se adicionó microencapsulado, similar a lo reportado por Bakry *et al.* (2016) y Tian *et al.* (2018).

4.3.4. Análisis FTIR

a) Materias primas

Las interacciones moleculares en mezclas se estudiaron obteniendo sus espectros FTIR.

El análisis de las materias primas empleadas para la obtención de las micropartículas de citral (citral, dextrina y lecitina de soya) y biopelículas activas (micropartículas de citral, glicerol y caseína de sodio) se muestran en la Figura 25.

El espectro del citral (Figura 25a) mostró un perfil FTIR similar a lo reportado por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST- National Institute of Standards and Technology) (NIST, 2018a); se observó bandas típicas para aldehídos, con picos de absorbancia asociados a la interacción *CH-flexión – extensión* en el rango 2800 – 3000 cm^{-1} y asociados a la interacción *CHO-extensión*, del grupo funcional formilo presentes en el citral, en el rango 1100-1300 cm^{-1} (Wehling, 2010).

El espectro de la dextrina (Figura 25b) también mostró un perfil FTIR típico del polímero y similar a lo reportado por Garcia *et al.* (2008); con bandas de absorbancia asociados a *OH-extensión* y *CH-flexión – extensión*, en los rangos 3150 – 3600 cm^{-1} y 2800 – 3000 cm^{-1} , respectivamente; adicionalmente se observó otras bandas entre 995 y 1640 cm^{-1} (Garcia *et al.*, 2008; Wehling, 2010).

En la Figura 25c, se muestra el espectro de la lecitina de soya, donde se observó un perfil FTIR típico de fosfolípidos, con bandas de absorbancia asociadas a la región *OH-extensión* de 3150 – 3600 cm^{-1} y región *CH-flexión – extensión* de 2800 – 3000 cm^{-1} . Los picos observados en los rangos de 1400 – 1750 y 900 – 1100 cm^{-1} , corresponden a la región *COO-extensión*, grupo carboxilato presente en los fosfolípidos. Se observaron picos de vibración en 1237 y 1167 cm^{-1} en la región *CHO-extensión (CO-extensión)*, típicos en fosfolípidos de soya (Nzai y Proctor, 1999; Wehling, 2010).

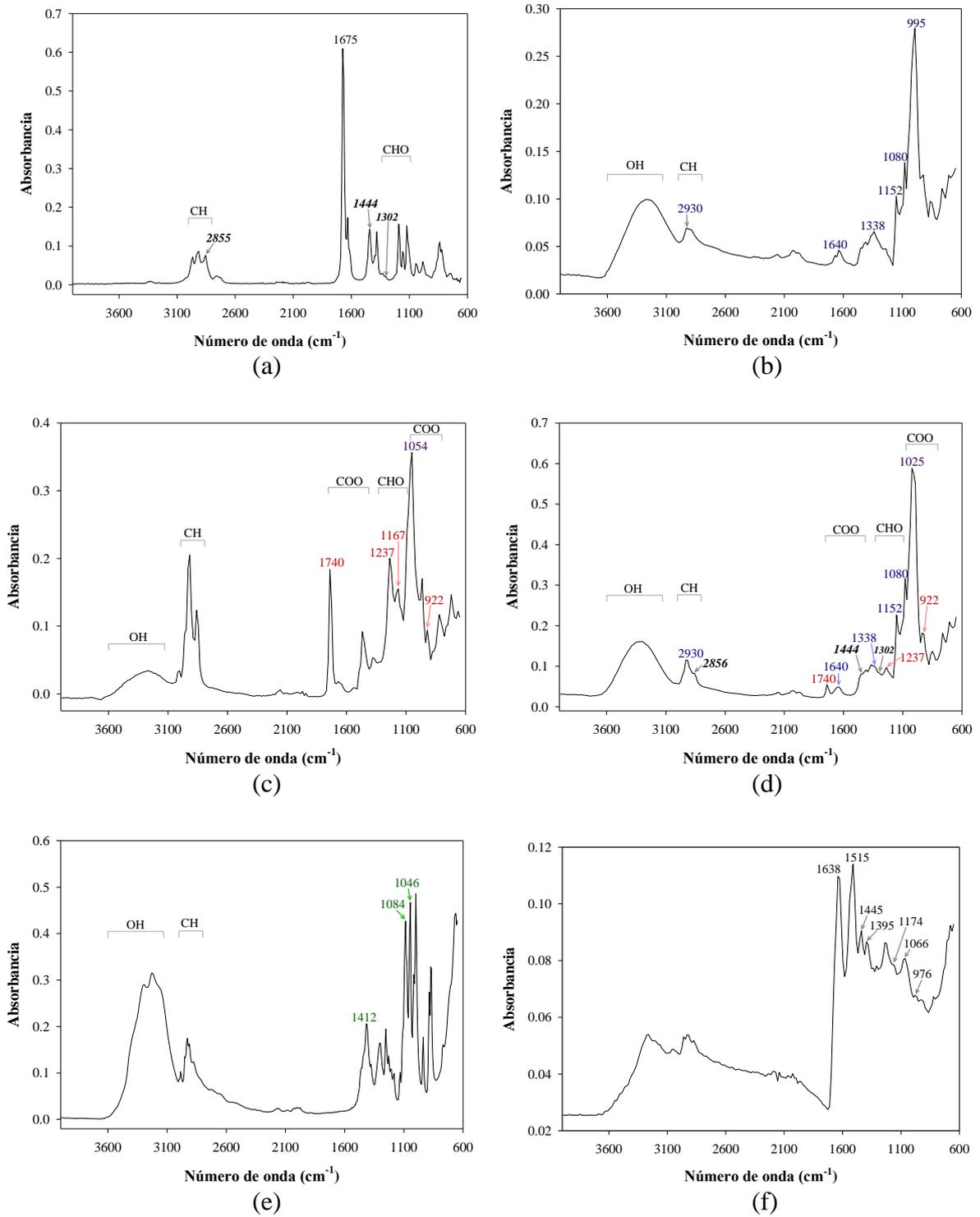


Figura 25. Espectros FTIR de las materias primas: (a) citral; (b) dextrina; (c) lecitina de soya; (d) micropartículas de citral; (e) sorbitol; y (f) caseinato de sodio.

El espectro de las micropartículas de citral, elaboradas en condiciones óptimas con dextrina, lecitina de soya y citral mediante secado por atomización se muestra en la Figura 25d. Se observaron tres zonas espectrales diferentes: 3600–3150 cm^{-1} , 2800–3000 cm^{-1} y 900–1750 cm^{-1} , los dos primeros corresponden a la región *OH-extensión* y región *CH-flexión – extensión*, respectivamente; presentes en la estructura de la dextrina (Figura 25b) y lecitina de soya (Figura 25c); la última región corresponde a la extensión de los enlaces de grupos *CHO* y *COO* (Wehling, 2010). Se observó coincidencias entre algunos picos de absorbancia de insumos empleados en la formulación con los picos de las micropartículas de citral. Al evaluar el perfil de la dextrina y las micropartículas se observó coincidencias en los picos 2930, 1240, 1338, 1152, 1080 cm^{-1} ; con lecitina de soya la coincidencias fueron en 1740, 1237 y 992 cm^{-1} ; con citral en 2856, 1444 y 1302 cm^{-1} . Al evaluar el espectro de la LS pura (Figura 25c) se observó un mayor pico a 1054 cm^{-1} , y al evaluar las micropartículas el pico de mayor intensidad se obtuvo a 1025 cm^{-1} , debido probablemente al reordenamiento molecular por la interacción de los componentes empleados en la formulación (Barreto *et al.*, 2003). El perfil espectral del presente estudio fue similar con estudios donde microencapsularon AE de hierba luisa con capsul (Alarcón-Moyano *et al.*, 2017).

Se observó un espectro del sorbitol (Figura 25e) similar a lo reportado por (NIST, 2018b); muestro bandas típicas para alcoholes, con picos de absorbancia asociadas a los grupos hidroxilo (*OH-extensión*) en el rango 3150 – 3600 cm^{-1} , mientras que los picos *CO-extensión* característicos de los alcoholes primarios y secundarios se observaron a 1046 y 1084 cm^{-1} , respectivamente. Las bandas en el rango 1150 – 1420 cm^{-1} se podría asignar a la interacción *OH-flexión*. Adicionalmente, se identificaron vibraciones asimétricas y simétricas asociadas con los enlaces *CH-flexión-extensión* en el rango 2800 y 3000 cm^{-1} (Wehling, 2010).

El espectro para el caseinato de sodio (CS) (Figura 25f) mostró un perfil similar a lo reportado por Arrieta *et al.* (2013). Se observaron mayores picos de absorbancia asociado a amida I y amida II entre 1500 - 1650 cm^{-1} ; así como, al grupo *NH-extensión* entre 2850 y 3400 cm^{-1} característico de aminoácidos, como se reportaron en otros trabajos (Arrieta *et al.*, 2013; Oliver *et al.*, 2009; Pereda *et al.*, 2008). Los picos a 1638 cm^{-1} en la región amida I y 1515 cm^{-1} en la región amida II, podrían estar asociados al grupo carbonilo (*C=O-extensión*) y a las vibraciones simétricas de los enlaces *N-C=O-extensión*, respectivamente. Las bandas alrededor de 1395 y 1445 cm^{-1} podrían asignarse al grupo carboxilato (*O-C-O*) (Abu Diak *et al.*, 2007). Las bandas 1174 y 1066 cm^{-1} corresponden a *CO-extensión* en los enlaces C-

OH (Pelissari *et al.*, 2009). La banda a 976 cm^{-1} podría deberse a interacciones monocatónicas con el Na^+ (Arrieta *et al.*, 2013).

b) Biopelículas activas en condiciones óptimas

Los espectros FTIR correspondientes a las biopelículas activas elaboradas con micropartículas de citral, caseinato de sodio y sorbitol se muestran en la Figura 26. Debido a la naturaleza de los caseinatos de fuente bobina y su capacidad de formar enlaces de hidrógenos intermoleculares extensos, su mezcla con el sorbitol y almidones modificados, dio como resultado un incremento en la cohesión de las macromoléculas (Pereda *et al.*, 2008). En tal sentido, la amplia banda de absorbancia observada entre el rango 3000 y 3600 cm^{-1} podría atribuirse a los enlaces de hidrógeno formados entre el CS y los grupos hidroxilos de la dextrina, lecitina de soya y sorbitol (Barreto *et al.*, 2003; Pelissari *et al.*, 2009), así como la presencia de grupos *N-H* no agrupados (Barreto *et al.*, 2003). Comportamiento similar se observó en la región de vibraciones asimétricas y asimétricas de los enlaces *CH-extensión* entre 2800 y 3000 cm^{-1} , a la que se añadió la interacción del citral. En contraposición al espectro del CS puro, en la biopelícula se observó un mayor pico de absorbancia de amida I (1638 cm^{-1}) respecto a amida II. Este último cambió de 1515 a 1540 cm^{-1} ; estos cambios podrían estar asociados a la existencia de reordenamiento conformacionales en la proteína causados por la adición del sorbitol y componentes de la micropartícula de citral, dando como resultado la disminución de los enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares. Se observaron cambios espectrales similares para banda de amidas I y II en películas de caseinato/sorbitol (Barreto *et al.*, 2003).

Algunos picos de absorbancia correspondientes al sorbitol (Figura 25e) se mantuvieron en el espectro de las biopelículas, como la banda característica de alcoholes secundarios (1084 cm^{-1}) y un pico de absorbancia en la región del grupo carboxilato, que se trasladó de 1412 a 1410 cm^{-1} , sin embargo, no se observó el pico de alcoholes primarios (1046 cm^{-1}). Respecto a las bandas de absorbancia del citral (Figura 25a), con menor intensidad se observaron en el espectro de las biopelículas, en las regiones del grupo carboxilato (1444 cm^{-1}) y del grupo formilo (1302 cm^{-1}); este último, típico para aldehídos. La mayoría de los picos presentes en el espectro de LS (Figura 25c), aunque con menor intensidad, se observaron en el espectro de las biopelículas (1740 , 1237 y 922 cm^{-1}). El pico de absorbancia observado en la micropartícula de citral en la región del grupo carboxilato, al evaluar en el espectro de la biopelícula, éste mantuvo su intensidad, pero se trasladó ligeramente de 1025 a 1024 cm^{-1} . Las variaciones observadas en intensidad y desplazamientos en el número de onda se debería

principalmente a cambios en las concentraciones y superposición de interacciones moleculares presentes en los insumos de la formulación; así como, al reordenamiento molecular (Arrieta *et al.*, 2013; Barreto *et al.*, 2003).

4.3.5. Evaluación del queso fresco

En la Figura 27 se muestra los quesos frescos en el día 0 y 14 de almacenamiento con y sin envases empleados en la investigación (tratamientos). A la evaluación visual, en el día 8 y 14 de almacenamiento, se observó un ligero desprendimiento entre las biopelículas y la superficie del queso fresco (leve pérdida de vacío) en los quesos envasados en biopelículas con MC (T1) y biopelículas con CL (T2), mientras que los quesos envasados en bolsa de PE (T0) mantuvo el envasado al vacío, debido probablemente a una mayor permeabilidad al oxígeno de las biopelículas con MC y CL en comparación a la bolsa de PE con menor permeabilidad a este gas (Cerqueira *et al.*, 2009).

De igual manera, a la evaluación visual durante el almacenamiento en todos los tratamientos no se observaron formación de exudados la superficie del queso fresco al interior del envase; también, a la comparación visual de los quesos frescos envasados en el día 0 y 14, no se observaron variaciones en el color. El día 14, al evaluar el queso fresco después de retirado el envase, se observó una mayor coloración de amarillo para los quesos en biopelículas con CL (T2), amarillo suave para biopelículas con MC (T1) y blanquecino para los envasados con bolsa de PE (T0). Resultados que se deberían principalmente al efecto del color de los envases en el queso fresco envasado; resultado similar con trabajos donde emplearon biopelículas de caseinato de sodio con y sin natamicina para envasar queso saloio (Ramos *et al.*, 2012).

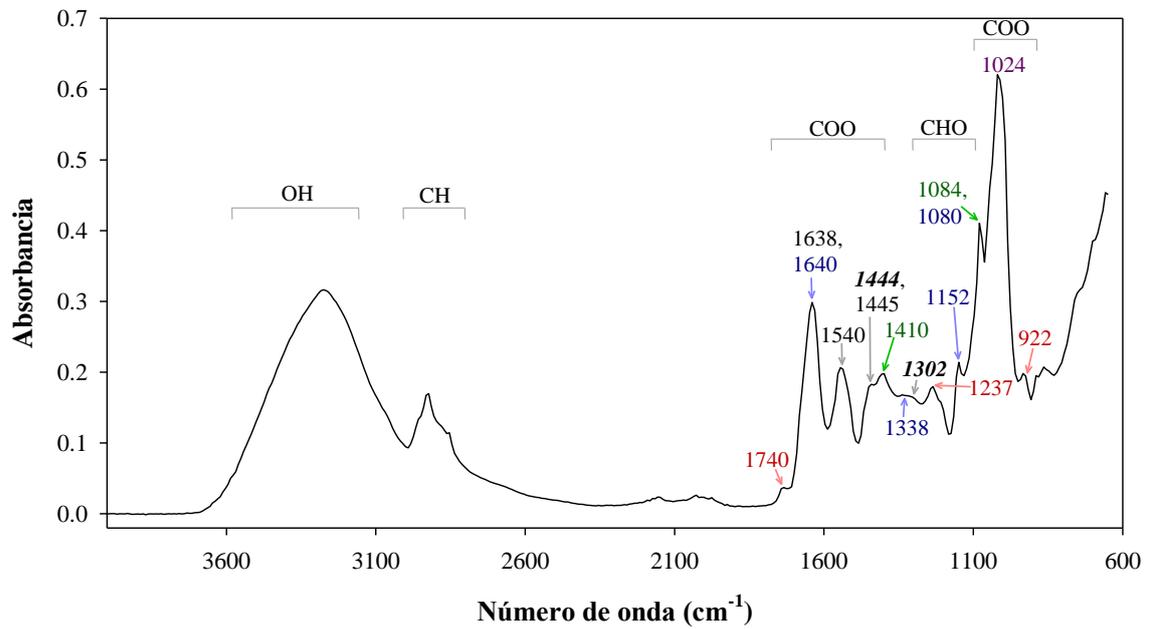


Figura 26. Espectros FTIR de las biopelículas activas obtenidas bajo condiciones óptimas.

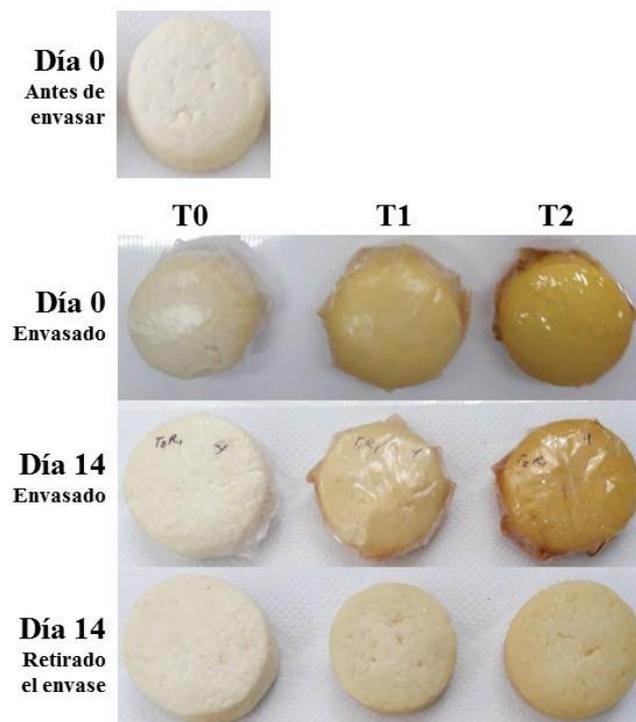


Figura 27. Fotografía de los quesos envasados con T0: Bolsa de polietileno (PE), T1: Biopelícula con micropartículas de citral (MC), y T2: Biopelículas con citral libre (CL); al día 0 (antes y después de envasar) y día 14 (envasado y retirado el envase) de almacenamiento.

a) Evaluación microbiológica del queso fresco

La evaluación microbiológica se muestra en la Tabla 10. El recuento de bacterias aerobias mesófilas (RAM) pueden ser utilizadas como un indicador de contaminación durante la producción y maduración del queso (Fajardo *et al.*, 2010). Durante los días de evaluación el RAM variaron entre 5.9 y 6.9 log UFC g⁻¹. El día 4, el RAM no mostró diferencias estadísticamente significativas a $p < 0.05$. El día 8, el queso envasado con biopelícula de CL fue significativamente más bajo ($p < 0.05$) que el testigo (reducción de 0.8 log). El día 14, el queso en biopelícula con MC fue significativamente menor ($p < 0.05$) que el testigo (reducción de 1 log). Entre el día 0 y 14, el único tratamiento que mostró una disminución en el RAM fue los quesos en biopelículas con MC, con una reducción de 0.2 log. Resultados similares a los reportados para quesos con biopelículas de quitosano y proteína de suero de leche (Di Pierro *et al.*, 2011) y quesos con biopelículas de caseinato de sodio y quitosano (Moreira *et al.*, 2011). Sin embargo, comparando a similares condiciones de tiempo y temperatura de almacenamiento, el RAM del presente estudio fue más bajo que los quesos envasados con quitosano y natamicina (Fajardo *et al.*, 2010), y quesos con proteína de suero lácteo, namicina y ácido láctico (Ramos *et al.*, 2012).

Adicionalmente, se observó que la leve pérdida de vacío debido probablemente a la permeabilidad al oxígeno, sobre todo en los quesos envasados en biopelículas con MC, no fue significativo para influir en el crecimiento microbiano; siendo estos quesos envasados en biopelículas con MC los que presentaron menor recuento microbiano para todos los microorganismos evaluados.

Tabla 10. Recuentos de células viables de aerobios mesófilos, psicrótrofos y hongos y levaduras (log UFC g⁻¹, medias ± DS) en queso envasado con biopelículas activas en comparación con el queso envasado en bolsa de polietileno (testigo) y almacenados a 6 °C por 14 días.

Microorganismo (log UFC g-1)	Tratamiento (T)	Tiempo de almacenamiento (Días)			
		0	4	8	14
Aerobios mesófilos	Bolsa PE (Testigo) ¹	- ²	6.06 ± 0.23	6.75 ± 0.06	6.88 ± 0.10
	Bioplástico con MC	-	6.15 ± 0.22	6.55 ± 0.06	5.93 ± 0.10 *
	Bioplástico con CL	-	6.48 ± 0.23	6.00 ± 0.22 *	6.53 ± 0.22
	MP a/e	6.08 ³ ± 0.05	-	-	-
Aerobios psicrótrofos	Bolsa PE (Testigo) ¹	- ²	6.20 ± 0.11	6.23 ± 0.06	6.83 ± 0.06
	Bioplástico con MC	-	6.22 ± 0.20	6.32 ± 0.09	5.86 ± 0.25 *
	Bioplástico con CL	-	6.31 ± 0.07	5.99 ± 0.15	6.42 ± 0.21
	MP a/e	6.39 ³ ± 0.17	-	-	-
Hongos y levaduras	Bolsa PE (Testigo) ¹	- ²	5.17 ± 0.19	5.58 ± 0.06	5.94 ± 0.13
	Bioplástico con MC	-	5.34 ± 0.16	5.47 ± 0.15	5.01 ± 0.14 *
	Bioplástico con CL	-	5.24 ± 0.05	5.18 ± 0.14 *	5.43 ± 0.20 *
	MP a/e	5.20 ³ ± 0.20	-	-	-

PE: polietileno. MC: micropartícula de citral. CL: citral libre. MP a/e: Materia prima (queso fresco) antes de envasar.

¹Testigo: envasado en bolsa de polietileno.

²Guiones indican evaluación microbiológica no realizada.

³Los valores indican el promedio (n=3) y ± indica su desviación estándar.

*/ Indica tratamientos estadísticamente diferentes al testigo para cada microorganismo y día de evaluación, según la prueba Dunnett (p < 0.05).

La literatura reporta que los microorganismos psicrófilos causan importantes pérdidas económicas como resultado de sus actividades lipolíticas y proteolíticas y pueden estar presentes hasta un nivel de 6.5 log UFC g⁻¹ (nivel máximo) en la leche y derivados lácteos (Var *et al.*, 2006). En el presente estudio los recuentos de bacterias psicrótrofas (Tabla 10), en todos los tratamientos, fueron inferiores al nivel antes citado en los primeros 8 días de almacenamiento. Los días 4 y 8 no se observaron diferencias significativas, los recuentos de psicrótrofos variaron entre 6.0 y 6.3 log UFC g⁻¹. Entre el día 0 y 14, solo los quesos envasados en biopelículas con MC mostraron una reducción de 0.5 log UFC g⁻¹; siendo este tratamiento, en el día 14, significativamente más bajo ($p < 0.05$), con una reducción de 1 log respecto al testigo. Estos resultados estuvieron dentro de los rangos reportados para quesos ricota envasados con biopelículas de quitosano y proteína de suero de leche (Di Pierro *et al.*, 2011); fueron superiores a estudios donde envasaron quesos con quitosano y natamicina (Fajardo *et al.*, 2010). Por otro lado, comparando en similares condiciones de tiempo y temperatura de almacenamiento, las biopelículas con MC del presente estudio obtuvieron mayores reducciones de psicrótrofos respecto a estudios en quesos con biopelículas de caseinato de sodio y quitosano (reducciones de 0.2 log UFC g⁻¹) (Moreira *et al.*, 2011).

Los recuentos obtenidos para hongos y levaduras variaron entre 5.0 y 5.9 log UFC g⁻¹ (Tabla 10). El día 4, no se observaron diferencias significativas a $p < 0.05$. El día 8, los quesos envasados en biopelículas con CL fueron significativamente inferior al testigo ($p < 0.05$). El día 14; tanto los quesos envasados en biopelículas con MC y CL mostraron recuentos significativos más bajos que el testigo ($p < 0.05$). Al comparar los resultados entre el día 0 y 14, tal como se observó para RAM y psicrótrofos, el único tratamiento que logró reducir los recuentos de hongos y levaduras fue el queso envasado en biopelículas con MC, logrando una reducción de 0.2 log. Resultados del presente estudio estuvieron dentro de los intervalos para quesos envasados con proteína de suero de leche y quitosano (Di Pierro *et al.*, 2011). Fueron superiores comparados con quesos envasados en biopelículas con proteína de suero de leche y natamicina, donde obtuvieron recuentos menores a 2 log UFC g⁻¹ (Ramos *et al.*, 2012). Por el contrario, a los 14 días de evaluación, los quesos envasados en biopelículas con MC del presente estudio, mostraron menores recuentos que los envasados con biopelículas de quitosano y natamicina (> 5.6 log UFC g⁻¹) (Fajardo *et al.*, 2010).

Según ICMSF (1986), el límite microbiológico de aceptabilidad para recuento de aerobios mesófilos en leche y derivados es 6 log UFC g⁻¹; este límite no se alcanzó en los quesos envasados en biopelículas con MC, durante los 14 días de almacenamiento. Además, en el

presente estudio se observó que al final de 14 días, los quesos en biopelículas con MC mostraron recuentos menores a $6.0 \log \text{ UFC g}^{-1}$ para todos los microorganismos evaluados. Es importante señalar que la vida útil para el queso fresco convencional (envasado en bolsas de polietileno) y almacenados en refrigeración es de 7 días, pero en el presente estudio se obtuvo valores microbiológicos aceptable al día 14 de evaluación, con recuentos significativamente más bajos ($p < 0.05$) en todos los microorganismos evaluados para los quesos envasados en biopelículas de MC. Por lo tanto, la biopelícula con MC podría ser un envase efectivo para prolongar la vida útil del queso fresco.

b) Evaluación de pH, humedad, pérdida de peso y color del queso fresco

El valor de pH de las muestras de queso fresco (dilución 10^{-1}) varió entre 6.4 y 6.6 (Figura 28a). El pH del queso envasado en biopelícula con MC se mantuvo constante durante los 14 días de almacenamiento; siendo este tratamiento, al día 14, significativamente mayor ($p < 0.05$) a los demás tratamientos. La reducción del pH en el testigo y biopelículas con CL podría deberse a la actividad de las bacterias nativas ácido lácticas presentes en el queso, que metabolizaron la lactosa a lactato, lo que condujo a la producción de ácido (Fathollahi *et al.*, 2010). También sería debido a la síntesis de aminoácidos y formación ácidos grasos libres producto de proteólisis y lipólisis, causados por recuentos de psicrótrofos superiores a $6.5 \log \text{ UFC g}^{-1}$, concordante con los resultados de la evaluación microbiológica (Tabla 10) (Fathollahi *et al.*, 2010; Var *et al.*, 2006). Además, la disolución del CO_2 presentes en la atmosfera modificada del envase y queso, producto de la actividad respiratoria de microorganismos presentes en el queso, podría haber contribuido a la disminución del pH (Di Pierro *et al.*, 2011). Resultados similares a los reportados para quesos en biopelículas de proteína de suero de leche con natamicina (Ramos *et al.*, 2012) y proteína de suero de leche con quitosano (Di Pierro *et al.*, 2011).

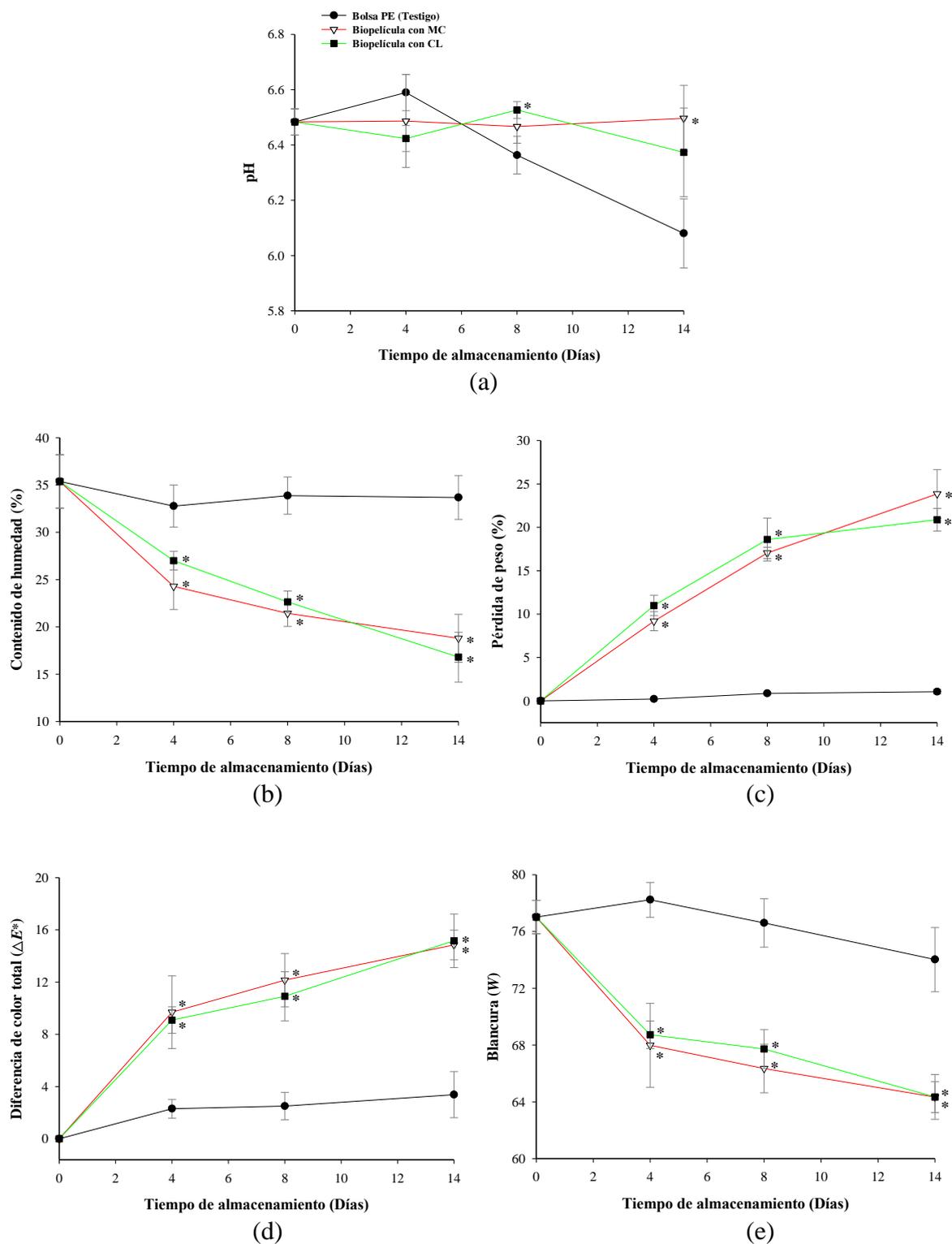


Figura 28. Valores (medias \pm DS) de (a) pH, (b) contenido de humedad, (c) pérdida de peso, (d) diferencia de color total (ΔE^*), y (e) blancura del queso fresco antes de envasar (día 0) y envasado en bolsa de polietileno (PE), biopelícula con micropartícula de citral (MC) y biopelícula con citral libre (CL), almacenado a 6 °C por 14 días. Las barras indican desviación estándar (n=3). Los (*) Indica tratamientos estadísticamente diferentes al testigo para cada tipo de envase y día de evaluación, según la prueba Dunnett ($p < 0.05$).

El contenido de humedad de los quesos frescos al día 0, antes de ser envasados a diferentes tratamientos, fueron de $35.4 \pm 2.8\%$ (Figura 28b); esta baja humedad, al inicio de la evaluación, comparado con otros estudios que para el mismo producto reportaron entre 53 y 63% (Benjamin *et al.*, 2018; Brown *et al.*, 2018; Okpala *et al.*, 2010), se debería al prensado durante el proceso, secado previo ($30\text{ }^{\circ}\text{C} \times 24\text{ h}$) antes del día 0 de evaluación y al muestreo superficial para los análisis (profundidad de $0.5 \pm 0.1\text{ cm}$).

Por otro lado, se observó que el contenido de humedad del queso en bolsa de PE (testigo), al día 14 días de almacenamiento experimentó una ligera reducción en menos del 2% ($33.7 \pm 2.3\%$). Además, el contenido de humedad de este tratamiento en los días 4, 8 y 14 de almacenamiento, fueron significativamente mayor ($p < 0.05$) respecto a los quesos envasados en biopelículas con MC y biopelículas con CL; estos últimos, al día 14 alcanzaron un contenido de humedad de $18.8 \pm 2.5\%$ y $16.7 \pm 2.6\%$, respectivamente. Estos resultados están de acuerdo con los valores de pérdida de peso (Figura 28c), ya que durante el tiempo de almacenamiento (día 4, 8 y 14), los quesos en biopelículas con MC y CL perdieron significativamente más peso ($p < 0.05$), con un incremento lineal, respecto del queso en bolsa de PE. Este último, durante el tiempo de almacenamiento, experimentó un ligero aumento, llegando al día 14 con tan solo 1% de pérdida de peso. Sin embargo, quesos en biopelículas con MC y CL, al día 14, mostraron una pérdida de peso de $23.95 \pm 2.8\%$ y $20.9 \pm 1.3\%$, respectivamente. Estos resultados estarían directamente relacionado con la permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las bolsas PE y biopelículas activas empleadas en la investigación. Según literatura las bolsas de PE de baja densidad presentan una PVA promedio de $0.091\text{ g}\cdot\text{mm}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$ (Robson, 2000), valor muy bajo comparado a biopelículas elaborados con biopolímeros (proteínas y polisacáridos), que tienen una pobre barrera al vapor de agua (Byun *et al.*, 2014; Salgado *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2014), estudios similares reportaron PVA entre 0.9 y $1.3\text{ g}\cdot\text{mm}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$ para biopelículas de caseinato de sodio con aceite de tung (Pereda *et al.*, 2010) y biopelículas de proteína de suero de leche con quitosano (Di Pierro *et al.*, 2011). El contenido de humedad y pérdida de peso del presente estudio, fueron similares a los reportados por Ramos *et al.* (2012) en queso saloio utilizando biopelículas con proteína de suero de leche y natamicina.

El color de los quesos frescos antes y después de su envasado en los sistemas estudiados se midió mediante la diferencia de color total (ΔE^*) mostrado en la Figura 28d y se midió mediante la blancura (W) en la Figura 28e. Los quesos en biopelículas con MC y CL, cambiaron de color a lo largo del almacenamiento; en los días 4, 8 y 14 de almacenamiento,

se registraron valores de ΔE^* significativamente superiores ($p < 0.05$) que los quesos en bolsas de PE (testigo). Al día 14, los quesos en ambas biopelículas alcanzaron altos valores de ΔE^* entre 14.8 y 15.2; mientras el queso en bolsa de PE presentó un ligero aumento con 3.4 de ΔE^* . Por el contrario, la blancura de los quesos mostraron un comportamiento inverso a ΔE^* ; en biopelículas con MC y CL durante los días de almacenamiento evaluados (día 4, 8 y 14) presentaron valores significativamente menores en comparación a los quesos envasados en bolsa de PE. Al día 14, los quesos en las biopelículas con MC y CL obtuvieron valores inferiores de blancura con 64.3 para ambos; sin embargo el testigo alcanzó una mayor blancura de 74.

Las diferencias en el color podrían ser, al menos en parte, atribuido a la oxidación del componente lipídico de los quesos, que fue menor en quesos con bolsa de PE debido a su menor permeabilidad al oxígeno; probablemente a la migración, en el tiempo, de los lípidos del queso del centro hacia la corteza, causando su oxidación al entrar en contacto con el oxígeno y por ende causando variación del color (Cerqueira *et al.*, 2009). El cambio de color también podría estar asociado con la pérdida de peso del queso (Figura 28c), que fue más alta en los quesos en biopelículas con MC y CL, produciendo una corteza más seca y por tanto un queso más oscuro; similares resultados obtuvieron en quesos envasados en biopelículas de proteína de suero de leche y natamicina (Ramos *et al.*, 2012).

c) Evaluación sensorial

Los resultados del análisis sensorial de las muestras de queso fresco se muestran en la Tabla 11. Para el color, olor y textura, se consideró una puntuación aceptable inferior a 7.5; y para el sabor y aceptabilidad general, una puntuación aceptable superior a 7.5. Los quesos empleados iniciaron en el día 0 con puntuación aceptable para todos los parámetros sensoriales evaluados. Durante los días 4, 8 y 14 de almacenamiento, el color y textura del queso en bolsa de PE (testigo) presentaron puntuaciones significativamente inferiores a un $p < 0.05$, con 5.3 ± 1.8 y 6.58 ± 1.3 , respectivamente, respecto a los demás tratamientos, siendo estas puntuaciones consideradas aceptables, con color más cercano a crema y textura más suave; resultados coherentes con los valores del contenido de humedad (Figura 28b), pérdida de peso (Figura 28c) y color (Figura 28d y Figura 28e). Estos resultados podrían deberse a la permeabilidad de los envases a la permeabilidad al vapor de agua (textura) y al O_2 (color) (Cerqueira *et al.*, 2009; Robson, 2000); similar a resultados obtenidos para quesos en biopelículas de proteína de suero de leche con natamicina (Ramos *et al.*, 2012) y en biopelículas de proteína de suero de leche y quitosano (Di Pierro *et al.*, 2011).

Tabla 11. Diferencias sensoriales (medias \pm DS), evaluados por un grupo de panelistas semi-entrenados utilizando una pauta no estructurada de 0 a 15 cm, entre el queso envasado con biopelículas activas en comparación con el queso envasado en bolsa de polietileno (testigo) y almacenados a 6 °C por 14 días.

Atributo	Tratamiento (T)	Tiempo de almacenamiento (Días)			
		0	4	8	14
Color	Bolsa PE (Testigo) ¹	- ²	4.61 \pm 1.47	4.52 \pm 1.94	5.30 \pm 1.79
	Bioplástico con MC	-	8.71 \pm 1.83*	9.29 \pm 1.83*	9.10 \pm 1.08*
	Bioplástico con CL	-	8.37 \pm 1.29*	9.86 \pm 2.22*	10.26 \pm 1.18*
	MP a/e	1.76 ³ \pm 1.33	-	-	-
Olor	Bolsa PE (Testigo) ¹	- ²	4.83 \pm 1.82	8.28 \pm 1.89	9.74 \pm 1.40
	Bioplástico con MC	-	7.16 \pm 1.30*	7.79 \pm 1.52	7.27 \pm 1.76*
	Bioplástico con CL	-	6.78 \pm 1.86*	6.60 \pm 1.90	7.66 \pm 1.57*
	MP a/e	2.05 ³ \pm 1.14	-	-	-
Textura	Bolsa PE (Testigo) ¹	- ²	6.26 \pm 1.70	5.86 \pm 1.68	6.58 \pm 1.31
	Bioplástico con MC	-	8.04 \pm 1.31*	8.31 \pm 1.80*	9.34 \pm 1.78*
	Bioplástico con CL	-	8.85 \pm 1.32*	8.96 \pm 1.87*	10.64 \pm 1.89*
	MP a/e	2.83 ³ \pm 1.18	-	-	-
Sabor	Bolsa PE (Testigo) ¹	- ²	8.78 \pm 1.24	8.26 \pm 1.43	7.06 \pm 0.84
	Bioplástico con MC	-	8.66 \pm 1.59	8.92 \pm 1.45	8.55 \pm 1.49*
	Bioplástico con CL	-	8.33 \pm 1.48	8.93 \pm 1.40	8.48 \pm 1.46*
	MP a/e	11.23 ³ \pm 1.38	-	-	-
Aceptabilidad general	Bolsa PE (Testigo) ¹	- ²	9.14 \pm 1.45	8.72 \pm 1.53	7.62 \pm 1.02
	Bioplástico con MC	-	9.21 \pm 1.44	9.06 \pm 1.37	8.91 \pm 1.36*
	Bioplástico con CL	-	8.88 \pm 1.38	8.63 \pm 1.21	8.48 \pm 1.13
	MP a/e	12.10 ³ \pm 1.36	-	-	-

PE: polietileno. MC: micropartícula de citral. CL: citral libre. MP a/e: Materia prima (queso fresco) antes de envasar.

¹Testigo: envasado en bolsa de polietileno.

²Guiones indican evaluación microbiológica no realizada.

³Los valores indican el promedio (n=3) y \pm indica su desviación estándar.

*/ Indica tratamientos estadísticamente diferentes al testigo para cada microorganismo y día de evaluación, según la prueba Dunnett ($p < 0.05$).

Respecto del sabor, los días 4 y 8 de almacenamiento no se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$), no obstante al día 14 de almacenamiento, los quesos en biopelículas con MC y CL presentaron sabor agradable (puntuación aceptable), con 8.6 ± 1.5 y 8.5 ± 1.5 , respectivamente, y significativamente superior ($p < 0.05$) en relación al testigo. Al evaluar el olor, al día 14 los quesos en biopelículas con MC y CL presentaron olores menos intensos con valores estadísticamente inferiores ($p < 0.05$) respecto del testigo; sin embargo, el queso en biopelícula con MC fue el único que presentó puntuación aceptable con 7.3 ± 1.8 . Por último, en términos de aceptabilidad general, los días 4 y 8 de almacenamiento no se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$); pero el día 14, el queso en biopelículas con MC presentó puntuación aceptable (8.9 ± 1.4) y significativamente superior ($p < 0.05$), en relación a los demás tratamientos.

En términos generales, el queso en biopelículas con MC mostró mejores resultados con puntuaciones aceptables para la mayoría de los parámetros del análisis sensorial como olor, sabor y aceptabilidad general; a éstos parámetros se sumó los menores recuentos microbiológicos obtenidos. Resultados con los que se confirmaría que las biopelículas con MC podrían ser un envase activo eficiente para prolongar la vida útil del queso fresco en el doble del tiempo respecto a los quesos comerciales envasados en bolsa de PE.

V. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en las se desarrollaron el presente estudio, se arribaron a las siguientes conclusiones:

- Mediante secado por atomización, el citral fue microencapsulado con éxito en una matriz de dextrina y lecitina de soya como emulsificante, obteniéndose una alta eficiencia de encapsulación, mostrando una alta retención de la emulsión (citral y LS) en el proceso de secado, favoreciendo la retención de moléculas citral, evaluado por la eficiencia de encapsulación. Usando RSM se determinaron las condiciones óptimas de microencapsulación de citral con un alto rendimiento superior a 70% y eficiencia de encapsulación superior a 99%.
- La actividad inhibitoria de las micropartículas óptimas de citral contra patógenos transmitidos por alimentos, tales como *E. coli*, *S. entérica*, *S. aureus* y *B. cereus*; demostró una actividad inhibitoria de amplio espectro. La actividad bactericida no fue afectada significativamente después del proceso de secado por atomización a alta temperatura, siendo su relación de inhibición superior al 55%. Además, los resultados del ensayo *in vitro* de concentraciones inhibitorias mínimas del citral puro (> 0.8 mg/mL), indicaron que fue eficaz en las bacterias estudiadas, indistintamente de su clasificación Gram-positivas o Gram-negativas. Por tanto, las micropartículas de citral descritas en este estudio, podrían representar un potencial antimicrobiano natural para su uso en el diseño de sistemas de alimentos y/o diseño de envases activos alimentarios.
- Los resultados de la aplicación NIR y herramientas quimiométricas indicaron que todos los modelos estudiados fueron capaces de predecir el contenido superficial de citral en las micropartículas, con un coeficiente de determinación de más de 0.80. Los modelos ANN tuvieron un desempeño ligeramente mejor que los otros modelos, con $R^2 = 0.954$ y $MSE = 0.004$. En consecuencia, esta técnica mostró un potencial para ser utilizado como un método para predecir el contenido superficial de citral en micropartículas y por inferencia poder calcular la eficiencia de encapsulación. Por tanto, la tecnología de espectroscopia NIR combinada con herramientas quimiométricas, debido al no

requerimiento de reactivos químicos, velocidad, y bajo costo, se convierte en una alternativa para esta aplicación y reemplazar a métodos químicos de referencia como la cromatografía de gases.

- Las biopelículas activas elaboradas con caseinato de sodio (CS), sorbitol (Sb) y micropartículas de citral (MC), mediante el método de casting, que proporcionaron valores óptimos de transparencia, módulo elástico y opacidad, se alcanzaron usando la MSR, donde las condiciones óptimas fueron una relación CS:Sb de 1:0.91 y una relación CS:MC de 1:0.95, obteniendo una deseabilidad óptima de 0.87.
- En envasado del queso fresco en biopelículas con MC, envasado a 6 °C durante 14 días, redujo el crecimiento de microorganismos contaminantes y mostró puntuaciones aceptables para la mayoría de los parámetros sensoriales evaluados; extendiendo la vida útil del producto en el doble del tiempo, en comparación al queso fresco envasado en bolsa de PE. Adicionalmente, es posible que los beneficios de las biopelículas activas con MC también puedan ser empleados para extender la vida útil de otros productos altamente perecibles.

VI. RECOMENDACIONES

Bajo las condiciones en las que se desarrolló el presente trabajo de investigación, se realizan las siguientes recomendaciones:

1. Ampliar el tamaño de muestra para los estudios de predicción del contenido superficial en micropartículas de citral usando NIR y quimiometría.
2. Evaluar el efecto de uso de ultrasonido con baño maría u otras metodologías, sobre la eliminación de burbujas de aire en las soluciones formuladas para la elaboración de biopelículas activas con MC.
3. Realizar estudios de permeabilidad al vapor de agua, O₂ y CO₂ y biodegradabilidad de las biopelículas con MC.
4. Evaluar las propiedades ópticas, mecánicas, de barrera y micro-estructurales de biopelículas con CL y compararlas con las biopelículas con MC.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu Diak, O; Bani-Jaber, A; Amro, B; Jones, D; Andrews, GP. (2007). The manufacture and characterization of casein films as novel tablet coatings. *Food and Bioproducts Processing*, 85(C3): 284–290. <https://doi.org/10.1205/fbp07030>
- Aguirre-Joya, JA; Leon-Zapata, MA; Alvarez-Perez, OB; Torres-León, C; Nieto-Oropeza, DE; Ventura-Sobrevilla, JM; ... Aguilar, CN. (2018). Chapter 1 - Basic and applied concepts of edible packaging for foods. In A. M. Grumezescu & A. M. Holban (Eds.), *Food Packaging and Preservation* (pp. 1–61). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811516-9.00001-4>
- Ahn, JH; Kim, YP; Lee, YM; Seo, EM; Lee, KW; Kim, HS. (2008). Optimization of microencapsulation of seed oil by response surface methodology. *Food Chemistry*, 107(1): 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.067>
- Akyuz, L; Kaya, M; Mujtaba, M; Ilk, S; Sargin, I; Salaberria, AM; ... Islek, C. (2018). Supplementing capsaicin with chitosan-based films enhanced the anti-quorum sensing, antimicrobial, antioxidant, transparency, elasticity and hydrophobicity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115: 438–446. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.040>
- Alamilla-Beltrán, L; Chanona-Pérez, JJ; Jiménez-Aparicio, AR; Gutiérrez-Lopez, GF. (2005). Description of morphological changes of particles along spray drying. *Journal of Food Engineering*, 67(1–2): 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.063>
- Alarcón-Moyano, JK; Bustos, RO; Herrera, ML; Matiacevich, SB. (2017). Alginate edible films containing microencapsulated lemongrass oil or citral: effect of encapsulating agent and storage time on physical and antimicrobial properties. *Journal of Food Science and Technology*, 54(9): 2878–2889. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2726-1>
- Alonso, JV. (2016). Taller sobre el color y su medición. (Alonso, JV. Ed.). Madrid, España. Retrieved from http://oa.upm.es/42855/1/Taller_color_JVAlonsoFelipe.pdf
- Alves-Silva, JM; Dias dos Santos, SM; Pintado, ME; Pérez-álvarez, JÁ; Fernández-López, J; Viuda-Martos, M. (2013). Chemical composition and in vitro antimicrobial, antifungal and antioxidant properties of essential oils obtained from some herbs widely used in Portugal. *Food Control*, 32(2): 371–378. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.022>
- Anandharamkrishnan, C; Ishwarya, SP. (2015). Introduction to spray drying. In C. Anandharamkrishnan & S. P. Ishwarya (Eds.), *Spray Drying Techniques for Food Ingredient Encapsulation* (pp. 1–36). Chicago, USA.: Willey Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118863985.ch1>
- Anaya-Castro, MA; Ayala-Zavala, JF; Muñoz-Castellanos, L; Hernández-Ochoa, L; Peydecastaing, J; Durrieu, V. (2017). β -Cyclodextrin inclusion complexes containing clove (*Eugenia caryophyllata*) and Mexican oregano (*Lippia berlandieri*) essential oils: Preparation, physicochemical and antimicrobial characterization. *Food Packaging and Shelf Life*, 14: 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.09.002>
- AOAC. (1997). Official methods of analysis of AOAC international (16th ed). Washington DC,

USA: Association of Analytical Chemists.

- Araújo, CS; Rodrigues, AMC; Peixoto Joele, MRS; Araújo, EAF; Lourenço, LFH (2018). Optimizing process parameters to obtain a bioplastic using proteins from fish byproducts through the response surface methodology. *Food Packaging and Shelf Life*, 16: 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.01.009>
- Arrieta, MP; Peltzer, MA; Garrigós, MDC; Jiménez, A. (2013). Structure and mechanical properties of sodium and calcium caseinate edible active films with carvacrol. *Journal of Food Engineering*, 114(4), 486–494. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.09.002>
- Arrieta, MP; Peltzer, MA; López, J; Garrigós, MDC; Valente, AJM; Jiménez, A. (2014). Functional properties of sodium and calcium caseinate antimicrobial active films containing carvacrol. *Journal of Food Engineering*, 121(1): 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.08.015>
- Arruabarrena, IA. (2012). Evaluación de calidad de la patata mediante tecnología NIRS y la influencia del sistema productivo convencional y ecológico. Universidad publica de Navarra.
- ASTM. (2001). Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. Standards Designation: D882-01 Annual Book of ASTM Standards. ASTM. Philadelphia, USA., 10.
- Atarés, L; Bonilla, J; Chiralt, A. (2010). Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*, 100(4): 678–687. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.05.018>
- Atarés, L; Chiralt, A. (2016). Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 48: 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.12.001>
- Audic, JL; Chaufer, B; Daufin, G. (2003). Non-food applications of milk components and dairy co-products: A review. *Lait*, 83: 417–438. <https://doi.org/10.1051/lait:2003027>
- Bakry, AM; Abbas, S; Ali, B; Majeed, H; Abouelwafa, MY; Mousa, A; Liang, L. (2016). Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1): 143–182. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12179>
- Balasubramani, P; Viswanathan, R; Vairamani, M. (2013). Response surface optimisation of process variables for microencapsulation of garlic (*Allium sativum* L.) oleoresin by spray drying. *Biosystems Engineering*, 114(3): 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2012.12.008>
- Barreto, PLM; Pires, ATN; Soldi, V. (2003). Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. *Polymer Degradation and Stability*, 79(1): 147–152. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(02\)00267-7](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(02)00267-7)
- Benito, MR; Olmo, JG; De Pedro, E; Garrido, A. (2001). Ibérico: evaluación de la alimentación por NIRS. *Mundo Ganadero*, 1: 30–34.
- Benjamin, O; Davidovich-pinhas, M; Shpigelman, A; Rytwo, G. (2018). Food hydrocolloids utilization of polysaccharides to modify salt release and texture of a fresh semi hard model cheese. *Food Hydrocolloids*, 75: 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.033>
- Bezerra, MA; Santelli, RE; Oliveira, EP; Villar, LS; Escalera, LA. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5): 965–977. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>

- Bhandari, BR; Dumoulin, ED; Richard, HMJ; Noleau, I; Lebert, AM. (1992). Flavor Encapsulation by spray drying: Application to citral and linalyl acetate. *Journal of Food Science*, 57(1): 217–221. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb05459.x>
- Bonilla, J; Poloni, T; Lourenço, RV; Sobral, PJ. (2018). Antioxidant potential of eugenol and ginger essential oils with gelatin/chitosan films. *Food Bioscience*, 23: 107–114. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2018.03.007>
- Bonilla, J; Sobral, PJ. (2016). Investigation of the physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of gelatin-chitosan edible film mixed with plant ethanolic extracts. *Food Bioscience*, 16: 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.07.003>
- Bourtoom, T. (2009). Edible protein films: properties enhancement. *International Food Research Journal*, 16: 1–9.
- Bradley, RL. (2010). Moisture and total solids analysis. In S. S. Nielsen (Ed.), *Food Analysis* (4th ed., pp. 85–104). United States of America: Springer International Publishing.
- Brown, SRB; Forauer, EC; Amico, DJD. (2018). Effect of modified atmosphere packaging on the growth of spoilage microorganisms and *Listeria monocytogenes* on fresh cheese. *Journal of Dairy Science*, 101(9): 7768–7779. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14217>
- Bucci, DZ; Tavares, LB; Sell, I. (2005). PHB packaging for the storage of food products. *Polymer Testing*, 24(5): 564–571. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2005.02.008>
- Büchi Labortechnik AG. (2015). Spray Drying & Encapsulation Solutions: Particle formation for lab scale. Retrieved May 29, 2019, from <https://www.buchi.com/en/products/spray-drying-and-encapsulation/mini-spray-dryer-b-290>
- Bustamante, A; Masson, L; Velasco, J; Del Valle, JM; Robert, P. (2016). Microencapsulation of *H. pluvialis* oleoresins with different fatty acid composition: Kinetic stability of astaxanthin and alpha-tocopherol. *Food Chemistry*, 190: 1013–1021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.062>
- Bustos, CRO; Alberti, FV; Matiacevich, S B. (2016). Edible antimicrobial films based on microencapsulated lemongrass oil. *Journal of Food Science and Technology*, 53(1): 832–839. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2027-5>
- Byun, Y; Kim, YT. (2014). Chapter 15 - Utilization of Bioplastics for Food Packaging Industry. In: Han, JH. (Ed.), *Innovations in Food Packaging* (2th ed., pp. 369–390). Texas, USA: Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00015-1>
- Byun, Y; Zhang, Y; Geng, X. (2014). Chapter 5 - Plasticization and Polymer Morphology. (J. H. Han, Ed.), *Innovations in Food Packaging* (2th. ed.). Texas, USA: Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00005-9>
- Caetano, KS; Lopes, NA; Costa, TM; Brandelli, A; Rodrigues, E; Flôres, SH; Cladera-Olivera, F. (2018). Characterization of active biodegradable films based on cassava starch and natural compounds. *Food Packaging and Shelf Life*, 16: 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.03.006>
- Cai, YZ; Corke, H. (2000). Production and Properties of Spray - dried *Amaranthus* Betacyanin Pigments. *Journal of Food Science*, 65(6): 1248–1252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10273.x>
- Campelo, PH; Sanches, EA; de Barros, FRV; Botrel, DA; Borges, SV. (2018). Stability of lime

- essential oil microparticles produced with protein-carbohydrate blends. *Food Research International*, 105: 936–944. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.034>
- Cao, X; Li, N; Qi, G; Sun, XS; Wang, D. (2018). Effect of spray drying on the properties of camelina gum isolated from camelina seeds. *Industrial Crops and Products*, 117: 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.03.017>
- Carneiro, HC; Tonon, RV; Grosso, CRF; Hubinger, MD. (2013). Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *Journal of Food Engineering*, 115(4): 443–451. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.03.033>
- Castro, W; Oblitas, J; Santa-cruz, R; Avila-george, H. (2017). Multilayer perceptron architecture optimization using parallel computing techniques. *PLOS ONE*, 12(12): 1–17. <https://doi.org/doi.org/10.1371/journal.pone.0189369>
- Castro, W; Prieto, JM; Guerra, R; Chuquizuta, T; Medina, WT; Acevedo-Juárez, B; Avila-George, H. (2018). Feasibility of using spectral profiles for modeling water activity in five varieties of white quinoa grains. *Journal of Food Engineering*, 238: 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.06.012>
- Ccorahua, R; Troncoso, OP; Rodriguez, S; Lopez, D; Torres, FG. (2017). Hydrazine treatment improves conductivity of bacterial cellulose/graphene nanocomposites obtained by a novel processing method. *Carbohydrate Polymers*, 171: 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.05.005>
- Cerqueira, MA; Lima, ÁM; Souza, BW; Teixeira, JÁ; Moreira, RA; Vicente, AA. (2009). Functional Polysaccharides as Edible Coatings for Cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 1456–1462. <https://doi.org/10.1021/jf802726d>
- Chalier, P; Arfa, AB; Preziosi-Belloy, L; Gontard, N. (2007). Carvacrol losses from soy protein coated papers as a function of drying conditions. *Journal of Applied Polymer Science*, 106(1): 611–620. <https://doi.org/10.1002/app.26662>
- Champagne, CP; Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2): 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.03.001>
- Chang, Y; McLandsborough, L; McClements, DJ. (2015). Fabrication, stability and efficacy of dual-component antimicrobial nanoemulsions: Essential oil (thyme oil) and cationic surfactant (lauric arginate). *Food Chemistry*, 172: 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.081>
- Char, C; Yoplac, I; Escalona, VH. (2016). Microbiological and Functional Quality of Ready-to-Eat Arugula as Treated by Combinations of UV-C and Nonconventional Modified Atmospheres. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(3): 1–10. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12978>
- Ciannamea, EM; Stefani, PM; Ruseckaite, RA. (2015). Storage-induced changes in functional properties of glycerol plasticized e Soybean protein concentrate fi lms produced by casting. *Food Hydrocolloids*, 45: 247–255. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.11.012>
- Congreso de la República. (2018, December 19). Ley N° 30884, Ley que regula el plásticos de un solo uso y los recipientes o envases descartables. *El Peruano*, pp. 5–9. Retrieved from <https://busquedas.elperuano.pe/download/url/ley-que-regula-el-plastico-de-un-solo-uso-y-los-recipientes-ley-n-30884-1724734-1>

- Corrales, M; Fernández, A; Han, JH. (2014). Chapter 7 - Antimicrobial Packaging Systems. (Han, JH. Ed.), *Innovations in Food Packaging* (2th. ed.). Texas, USA: Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00007-2>
- Cozzolino, D; Fassio, A; Fernández, E. (2003). Uso de la Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano para el análisis de calidad de ensilaje de maíz. *Agricultura Técnica*, 63(4): 387–393.
- Cozzolino, D; Fernández, E; Restaino, EA; La Manna, A. (2006). Determinación de la composición química de heno mediante la espectrofotometría en el infrarrojo cercano (NIRS). *Revista Argentina de Producción Animal*, 26(1): 203–209.
- Crizel, T de M; Rios, A. de O; Alves, VD; Bandarra, N; Moldão-Martins, M; Flôres, SH. (2018). Active food packaging prepared with chitosan and olive pomace. *Food Hydrocolloids*, 74: 139–150. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.007>
- Cuevas, J. (2005). Calibración de espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) para medición de la composición química de praderas (muestras secas) en la Décima Región. Universidad Austral de Chile. Universidad Austral de Chile.
- Dai, Q; Cheng, J; Sun, D; Pu, H; Zeng, X; Xiong, Z. (2015). Potential of visible / near-infrared hyperspectral imaging for rapid detection of freshness in unfrozen and frozen prawns. *Journal of Food Engineering*, 149: 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.10.001>
- Dammak, I; Sobral, PJ do A. (2017). Formulation and Stability Characterization of Rutin-Loaded Oil-in-Water Emulsions. *Food and Bioprocess Technology*, 10(5): 926–939. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1876-5>
- Davidović, S; Miljković, M; Tomić, M; Gordić, M; Nešić, A; Dimitrijević, S. (2018). Response surface methodology for optimisation of edible coatings based on dextran from *Leuconostoc mesenteroides* T3. *Carbohydrate Polymers*, 184: 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.061>
- de Barros Fernandes, RV; Reginaldo, G; Vilela, S; Alvarenga, D. (2014). Effect of solids content and oil load on the microencapsulation process of rosemary essential oil. *Industrial Crops & Products*, 58: 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.04.025>
- Di Pierro, P; Sorrentino, A; Mariniello, L; Giosafatto, CVL; Porta, R. (2011). Chitosan/whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 2324–2327. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.031>
- Donsì, F; Annunziata, M; Sessa, M; Ferrari, G. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT - Food Science and Technology*, 44(9): 1908–1914. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.03.003>
- Donsì, F; Annunziata, M; Vincensi, M; Ferrari, G. (2012). Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: Effect of the emulsifier. *Journal of Biotechnology*, 159(4): 342–350. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.07.001>
- Donsì, F; Ferrari, G. (2016). Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *Journal of Biotechnology*, 233: 106–120. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.07.005>
- Elmasry, GM; Nakauchi, S. (2016). Image analysis operations applied to hyperspectral images for non-invasive sensing of food quality-A comprehensive review. *Biosystems Engineering*, 142: 53–82. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2015.11.009>

- Elskens, M; Vloeberghs, D; Elsen, LV; Baeyens, W; Goeyens, L. (2012). Multiple testing of food contact materials: A predictive algorithm for assessing the global migration from silicone moulds. *Talanta*, 99: 161–166. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.05.034>
- Emamifar, A; Kadivar, M; Shahedi, M; Soleimani-Zad, S. (2010). Evaluation of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on shelf life of fresh orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(4): 742–748. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.06.003>
- Enrriquez, MC; Velasco, RM; Ortiz, VG. (2012). Composición y procesamiento de películas biodegradables basadas en almidón. *Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 10(1): 182–192.
- Escuredo, O; Martín, MI; Moncada, G; Fischer, S; Hierro, JM. (2014). Amino acid profile of the quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) using near infrared spectroscopy and chemometric techniques. *Journal of Cereal Science*, 60(1): 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2014.01.016>
- Esposito, VV; Chin, WW; Henseler, J; Wang, H. (2010). *Handbook of partial least squares: Concepts, methods and applications.* (V. V. Esposito, W. W. Chin, J. Henseler, & H. Wang, Eds.), Springer International Publishing. Berlin, Germany: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-32827-8>
- Estevinho, BN; Rocha, F. (2016). Microencapsulation in Food Biotechnology by a Spray-Drying Process. In Rai, R. (Ed.), *Advances in Food Biotechnology* (pp. 593–606). Mysore, India: Willey Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118864463.ch36>
- Fabra, MJ; Jiménez, A; Atarés, L; Talens, P; Chiralt, A. (2009). Effect of fatty acids and beeswax addition on properties of sodium caseinate dispersions and films. *Biomacromolecules*, 10(6), 1500–1507. <https://doi.org/10.1021/bm900098p>
- Fagodia, SK; Singh, HP; Batish, DR; Kohli, RK. (2017). Phytotoxicity and cytotoxicity of Citrus aurantiifolia essential oil and its major constituents: Limonene and citral. *Industrial Crops and Products*, 108: 708–715. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.07.005>
- Fajardo, P; Martins, JT; Fuciños, C; Pastrana, L; Teixeira, JÁ; Vicente, AA. (2010). Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. *Journal of Food Engineering*, 101(4): 349–356. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.06.029>
- Fakhouri, FM; Costa, D; Yamashita, F; Martelli, SM; Jesus, RC; Alganer, K; ... Innocentini-Mei, LH. (2013). Comparative study of processing methods for starch/gelatin films. *Carbohydrate Polymers*, 95(2): 681–689. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.027>
- Falguera, V; Quintero, JP; Jiménez, A; Muñoz, JA; Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science and Technology*, 22(6): 292–303. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.02.004>
- Fancello, F; Petretto, GL; Zara, S; Sanna, ML; Addis, R; Maldini, M; ... Pintore, G. (2016). Chemical characterization, antioxidant capacity and antimicrobial activity against food related microorganisms of Citrus limon var. pompia leaf essential oil. *LWT - Food Science and Technology*, 69: 579–585. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.018>
- Fathollahi, I; Hesari, J; Azadmard, S; Oustan, S. (2010). Influence of proteolysis and soluble calcium levels on textural changes in the interior and exterior of Iranian UF white cheese during ripening. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 4(6): 399–404. Retrieved from <http://www.waset.org/publications/11029>

- Frascareli, EC.; Silva, VM.; Tonon, RV; Hubinger, MD. (2012). Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. *Food and Bioproducts Processing*, 90(3), 413–424. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.12.002>
- Fuchs, M; Turchiuli, C; Bohin, M; Cuvelier, ME; Ordonnaud, C; Peyrat-Maillard, MN; Dumoulin, E. (2006). Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidised bed agglomeration. *Journal of Food Engineering*, 75(1): 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.03.047>
- Gaonkar, R; Yallappa, S; Dhananjaya, BL; Hegde, G. (2016). Development and validation of reverse phase high performance liquid chromatography for citral analysis from essential oils. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1036–1037: 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.10.001>
- García, CJ. (2018). Conozca las oportunidades para el sector envases y embalajes en Latinoamérica. Lima, Perú. Retrieved from https://www.camaralima.org.pe/repositorioaps/0/0/par/r827_3/comercio exterior.pdf
- García, FT; Sobral, PJD. (2005). Effect of the thermal treatment of the filmogenic solution on the mechanical properties, color and opacity of films based on muscle proteins of two varieties of Tilapia. *LWT - Food Science and Technology*, 38(3): 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.06.002>
- García, H; Barros, AS; Gonçalves, C; Gama, FM; Gil, AM. (2008). Characterization of dextrin hydrogels by FTIR spectroscopy and solid state NMR spectroscopy. *European Polymer Journal*, 44(7): 2318–2329. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2008.05.013>
- García, J. (2002). Clasificación y autenticación de canales de cerdo ibérico mediante espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS). Universidad de Córdoba, Cordoba, España.
- García, P; Vega, J; Jimenez, P; Santos, J; Robert, P. (2013a). Alpha-tocopherol microspheres with cross-linked and acetylated inulin and their release profile in a hydrophilic model. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(7); 811–819. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201200109>
- García, MD; García, J; Barro, F. (2013b). Determinación de parámetros de calidad de variedades de trigo con muy bajo contenido en epítomos de celiacía mediante NIR. In X Reunión de la Sociedad Española de Cultivo in Vitro de Tejidos Vegetales (Vol. III.17, p. 87). Zaragoza, España: Organizado por EEAD-CSIC, UNIZAR y SECIVTV.
- Gharsallaoui, A; Roudaut, G; Chambin, O; Voilley, A; Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9): 1107–1121. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>
- Grujic, R; Vujadinovic, D; Savanovic, D. (2017). Biopolymers as food packaging materials. In E. Pellicer, E; Nikolic, D; Sort, J; Baró, MD; Zivic, F; Grujovic, N; ... Pelemis, S. (Eds.), *Advances in applications of industrial biomaterials* (pp. 139–160). Cham, Switzerland: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-62767-0_8
- Grujic, R; Vukic, M; Gojkovic, V. (2017). Application of biopolymers in the food industry. In E. Pellicer, E; Nikolic, D; Sort, J; Baró, MD; Zivic, F; Grujovic, N; ... Pelemis, S. (Eds.), *Advances in applications of industrial biomaterials* (pp. 103–119). Cham, Switzerland: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-62767-0_6
- Guarda, A; Rubilar, JF; Miltz, J; Galotto, MJ. (2011). The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology*, 146(2):

144–150. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.011>

- Gutiérrez, H; De la Vara, R. (2012). *Análisis y diseño de experimentos*. (Gutiérrez, H; y De la Vara, R. Eds.) (3da. Ed.). México D.F.: McGraw-Hill Interamericana.
- Hamaguchi, PY; Wu Yin, W; Tanaka, M. (2007). Effect of pH on the formation of edible films made from the muscle proteins of Blue marlin (*Makaira mazara*). *Food Chemistry*, 100(3): 914–920. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.045>
- Han, JH. (2014). Chapter 9 - Edible Films and Coatings: A Review. (Han, JH. Ed.), *Innovations in Food Packaging* (2th. ed.). Texas, USA: Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00009-6>
- Han, JH; Scanlon, MG. (2014). Chapter 3 - Mass Transfer of Gas and Solute Through Packaging Materials. (Han, JH. Ed.), *Innovations in Food Packaging* (2th. ed.). Texas, USA: Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00003-5>
- Heise, HM. (2007). Chapter 13: Applications of Near-infrared Spectroscopy in Medical Sciences. In Siesler, HW; Ozaki, Y; Kawata, S; Heise, HM. (Eds.), *Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Application* (3rd. ed., pp. 289–333). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH. <https://doi.org/10.1002/9783527612666.ch13>
- Heise, HM; Winzen, R. (2007). Chapter 7: Chemometrics in near-infrared spectroscopy. In Siesler, HW; Ozaki, Y; Kawata, S; Heise, HM. (Eds.), *Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Application* (3rd. ed., pp. 125–162). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH. <https://doi.org/10.1002/9783527612666.ch07>
- Hernández, ML; Guzmán, B. (2009). Biopolímeros empleados en la fabricación de envases para alimentos. *Publicaciones E Investigación*, 3(1): 103–129. Retrieved from <http://hemeroteca.unad.edu.co/entrenamiento/index.php/pi/article/view/572/1324>
- HunterLab Method. (2008). Applications Note: Opacity. Retrieved July 27, 2018, from <https://www.hunterlab.se/wp-content/uploads/2012/11/Opacity.pdf>
- Huynh, TV; Caffin, N; Dykes, GA; Bhandari, B. (2008). Optimization of the Microencapsulation of Lemon Myrtle Oil Using Response Surface Methodology. *Drying Technology*, 26: 357–368. <https://doi.org/10.1080/07373930801898182>
- ICMSF. (1986). *Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications*. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (2nd ed.). Toronto, Canada.
- Iijima, Y; Wang, G; Fridman, E; Pichersky, E. (2006). Analysis of the enzymatic formation of citral in the glands of sweet basil. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 448(1–2): 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.07.026>
- Irissin-mangata, J; Bauduin, G; Boutevin, B; Gontard, N. (2001). New plasticizers for wheat gluten films. *European Polymer Journal*, 37: 1533–1541. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-3057\(01\)00039-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-3057(01)00039-8)
- Ishwarya, SP; Anandharamakrishnan, C. (2017). Spray drying. In Anandharamakrishnan, C. (Ed.), *Handbook of Drying for Dairy Products* (pp. 57–94). Chennai, India: Willey Blackwell.
- Jamróz, E; Juszczak, L; Kucharek, M. (2018). Investigation of the physical properties, antioxidant and antimicrobial activity of ternary potato starch-furcellaran-gelatin films incorporated with lavender essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114: 1094–1101.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.014>

- Jensen, A; Lim, LT; Barbut, S; Marcone, M. (2015). Development and characterization of soy protein films incorporated with cellulose fibers using a hot surface casting technique. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1): 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.027>
- Jin, Y; Li, JZ; Nik, AM. (2018). Chapter 17: Starch-Based Microencapsulation. In Sjöö, M; Nilsson, L. (Eds.), *Starch in Food* (2nd editio, pp. 661–690). United States: Starch in Food. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100868-3.00017-2>
- Juliani, HR; Kapteyn, J; Jones, D; Koroch, AR; Wang, M; Charles, D; Simon, JE. (2006). Application of near-infrared spectroscopy in quality control and determination of adulteration of african essential oils. *Phytochemical Analysis*, 17(2): 121–128. <https://doi.org/10.1002/pca.895>
- Kagami, Y; Sugimura, S; Fujishima, N; Matsusa, K; Kometani, T; Matsumura, Y. (2003). Oxidative Stability , Structure , and Physical Characteristics of Microcapsules Formed by Spray Drying of Fish Oil with Protein and Dextrin Wall Materials. *Food Engineering and Physical Properties*, 68(7): 2248–2255. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05755.x>
- Kawano, S. (2007). Chapter 12: Application to Agricultural Products and Foodstuff. In Siesler, HW; Ozaki, Y; Kawata, S; Heise, HM. (Eds.), *Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Application* (3rd. ed., pp. 269–287). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH. <https://doi.org/10.1002/9783527612666.ch12>
- Kha, TC; Nguyen, MH; Roach, PD; Stathopoulos, CE. (2014). Microencapsulation of Gac oil : Optimisation of spray drying conditions using response surface methodology. *Powder Technology*, 264, 298–309. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.05.053>
- Kim, YT; Min, B; Kim, KW. (2014). Chapter 2 - General Characteristics of Packaging Materials for Food System. (Han, JH. Ed.), *Innovations in Food Packaging* (2th. ed.). Texas, USA: Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00002-3>
- Krishnan, S; Bhosale, R; Singhal, RS. (2005). Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. *Carbohydrate Polymers*, 61(1): 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.02.020>
- Kuang, B; Tekin, Y; Mouazen, AM. (2015). Comparison between artificial neural network and partial least squares for on-line visible and near infrared spectroscopy measurement of soil organic carbon, pH and clay content. *Soil and Tillage Research*, 146: 243–252. <https://doi.org/10.1016/j.still.2014.11.002>
- Kumar, N; Bansal, A; Sarma, GS; Rawal, RK. (2014). Chemometrics tools used in analytical chemistry : An overview. *Talanta*, 123:186–199. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.02.003>
- Lacroix, M; Vu, KD. (2014). Chaptes 11 - Edible coating and lilm materials: Proteins. (Han, JH. Ed.), *Innovations in Food Packaging* (2th. ed.). Texas, USA: Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00011-4>
- Land, CM. (2012). Chapter 8. Spray Drying. In Land, CM. (Ed.), *Drying in the Process Industry* (pp. 133–162). New Jersey, USA.: John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/0471743984.vse6665>
- Lee, DS. (2014). Chapter 6 - Antioxidative Packaging System. (Han, JH. Ed.), *Innovations in Food Packaging* (2th. ed.). Texas, USA: Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0)

0.00006-0

- Leimann, FV; Gonçalves, OH; Machado, RAF; Bolzan, A. (2009). Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on microcapsules size and morphology. *Materials Science and Engineering C*, 29(2): 430–436. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.08.025>
- Li, F; Cheng, T; Dong, X; Li, P; Yang, H. (2016). Global analysis of chemical constituents in Shengmai injection using high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 117: 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.08.022>
- Limpisophon, K; Tanaka, M; Osako, K. (2010). Characterisation of gelatin-fatty acid emulsion films based on blue shark (*Prionace glauca*) skin gelatin. *Food Chemistry*, 122(4): 1095–1101. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.090>
- Liu, D; Sun, D. W; Zeng, XA. (2014). Recent advances in wavelength selection techniques for Hyperspectral Image processing in the food industry. *Food Bioprocess Technology*, 7: 307–323. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1193-6>
- López, P; Gándara, J; Losada, P. (1993). Infrared spectrophotometric determination of citral corrected for limonene interference in lemon and orange essential oils. *Food Chemistry*, 46(2): 193–197.
- Lu, WC; Huang, DW; Wang, CCR; Yeh, CH; Tsai, JC; Huang, YT; Li, PH. (2018). Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(1): 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.12.018>
- Luz, PP; Neri, CR; Serra, OA. (2008). Dextrin-Microencapsulated Porphyrin Luminescent Properties. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1130: 91–96. <https://doi.org/10.1196/annals.1430.017>
- Magwaza, LS; Opara, UL; Nieuwoudt, H; Cronje, PJR; Saeys, W; Nicolai, B. (2012). NIR Spectroscopy applications for internal and external quality analysis of citrus fruit-A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2): 425–444. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0697-1>
- Majeed, H; Liu, F; Hategekimana, J; Sharif, HR; Qi, J; Ali, B; ... Zhong, F. (2016). Bactericidal action mechanism of negatively charged food grade clove oil nanoemulsions. *Food Chemistry*, 197: 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.015>
- Martino, VP; Ruseckaite, RA; Jiménez, A. (2006). Thermal and mechanical characterization of plasticized poly (L-lactide-co-D,L-lactide) films for food packaging. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 86(3): 707–712. <https://doi.org/10.1007/s10973-006-7897-3>
- Martucci, JF; Gende, LB; Neira, LM; Ruseckaite, RA. (2015). Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. *Industrial Crops and Products*, 71: 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.079>
- Martucci, JF; Ruseckaite, RA. (2009). Biodegradation of three-layer laminate films based on gelatin under indoor soil conditions. *Polymer Degradation and Stability*, 94(8): 1307–1313. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2009.03.018>
- Massart, DL; Vandeginste, BG; Deming, SM; Michotte, Y; Kaufman, L. (2003). *Chemometrics: a textbook*. Amsterdam: Elsevier.
- Maswal, M; Dar, AA. (2014). Formulation challenges in encapsulation and delivery of citral for

- improved food quality. *Food Hydrocolloids*, 37: 182–195. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.035>
- Matsakidou, A; Tsimidou, MZ; Kiosseoglou, V. (2019). Storage behavior of caseinate-based films incorporating maize germ oil bodies. *Food Research International*, 116: 1031–1040. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.042>
- Mehmood, T; Liland, KH; Snipen, L; Sæbø, S. (2012). A review of variable selection methods in Partial Least Squares Regression. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 118: 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2012.07.010>
- Menezes, J; Athmaselvi, KA. (2018). Chapter 5 - Report on edible films and coatings. (Grumezescu, AM; Holban, AM. Eds.), *Food Packaging and Preservation*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811516-9.00005-1>
- MINAM. (2019). Menos plástico más vida: Cifras del mundo y el Perú. Retrieved January 9, 2019, from <http://www.minam.gob.pe/menos-plastico-mas-vida/cifras-del-mundo-y-el-peru/>
- Miranda, KA. (2011). Predicción del contenido de cubierta seminal (cáscara) del grano de *Lupinus albus* mediante NIRS. Universidad Austral de Chile. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/myaccess.library.utoronto.ca/pubmed/11720961>
- Montero, P; Mosquera, M; Marín-peñalver, D; Alemán, A; Martínez-álvarez, Ó; Gómez-guillén, MC. (2019). Changes in structural integrity of sodium caseinate films by the addition of nanoliposomes encapsulating an active shrimp peptide fraction. *Journal of Food Engineering*, 244: 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.09.024>
- Moradi, M; Tajik, H; Rohani, SMR; Mahmoudian, A. (2016). Antioxidant and antimicrobial effects of zein edible film impregnated with *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and monolaurin. *LWT - Food Science and Technology*, 72: 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.026>
- Moreira, M. del R; Pereda, M; Marcovich, NE; Roura, SI. (2011). Antimicrobial Effectiveness of Bioactive Packaging Materials from Edible Chitosan and Casein Polymers: Assessment on Carrot, Cheese, and Salami. *Journal of Food Science*, 76(1): 54–63. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01910.x>
- Munera, S; Amigo, JM; Blasco, J; Cubero, S; Talens, P; Aleixos, N. (2017). Ripeness monitoring of two cultivars of nectarine using VIS-NIR hyperspectral reflectance imaging. *Journal of Food Engineering*, 214: 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.06.031>
- Navikaite-snipaitiene, V; Ivanauskas, L; Jakstas, V; Rüegg, N; Rutkaite, R; Wolfram, E; Yildirim, S. (2018). Development of antioxidant food packaging materials containing eugenol for extending display life of fresh beef. *Meat Science*, 145: 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.05.015>
- Niaounakis, M. (2015). Chapter 5 - Compounding and Additives. (Niaounakis, M. Ed.), *Biopolymers: Processing and Products*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-26698-7.00005-2>
- Nielsen, SS. (2010). *Food analysis laboratory manual*. (Nielsen, S. Ed.) (2nd. Ed.). United States of America: Springer International Publishing.
- NIST. (2018a). Citral: 2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl. Retrieved March 11, 2019, from <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C5392405&Type=IR-SPEC&Index=1#Refs>
- NIST. (2018b). Sorbitol. Retrieved March 11, 2019, from

<https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C50704&Mask=80#IR-Spec>

- Nogueira, RI; Santiago, MC; Gomes, FD; Pontes, SM; Lopes, PR; Freitas, SP. (2011). Microencapsulation of Bioactive Compounds From Pomegranate (*Punica granatum* L) Juice Using Spray Drying. In Presentado en European Drying Conference-EuroDrying, 26 al 28 Octubre 2011. Islas Baleares, España.
- Nzai, JM; Proctor, A. (1999). Soy Lecithin Phospholipid Determination by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and the Acid Digest/Arseno-Molybdate Method: A Comparative Study. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(1): 61–66. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11746-999-0048-9>
- Okpala, COR; Piggott, JR; Schaschke, CJ. (2010). Influence of high-pressure processing (HPP) on physico-chemical properties of fresh cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(1): 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.10.003>
- Oliveira-folador, G; Bicudo, M. De O; de Andrade, EF; Renard, CM; Bureau, S; Castilhos, F. (2018). Quality traits prediction of the passion fruit pulp using NIR and MIR spectroscopy. *LWT - Food Science and Technology*, 95: 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.078>
- Oliver, CM; Kher, A; McNaughton, D; Augustin, MA. (2009). Use of FTIR and mass spectrometry for characterization of glycosylated caseins. *Journal of Dairy Research*, 76(1): 105–110. <https://doi.org/10.1017/S002202990800383X>
- Oliveri, P; Simonetti, R. (2016). Chapter 25 - Chemometrics for Food Authenticity Applications. In *Advances in Food Authenticity Testing* (pp. 701–728). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100220-9.00025-4>
- Ozaki, Y. (2007). Chapter 9: Applications in Chemistry. In Siesler, HW; Ozaki, Y; Kawata, S. Heise, HM. (Eds.), *Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Application* (3rd. ed., pp. 179–211). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH. <https://doi.org/10.1002/9783527612666.ch09>
- Pan, L; Zhang, Q; Zhang, W; Sun, Y; Hu, P; Tu, K. (2016). Detection of cold injury in peaches by hyperspectral reflectance imaging and artificial neural network. *Food Chemistry*, 192: 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.106>
- Park, HJ; Byun, YJ; Kim, YT; Whiteside, WS; Bae, HJ. (2014). Chapter 10 - Processes and applications for edible coating and film materials from agropolymers. In Han, JH. (Ed.), *Innovations in Food Packaging* (2th ed., pp. 257–275). Texas, USA: Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00010-2>
- Parra, RA. (2011). Food microencapsulation: A review. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 63(2): 5669–5684. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472010000200020&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Paulo, F; Santos, L. (2017). Design of experiments for microencapsulation applications : A review. *Materials Science & Engineering C*, 77: 1327–1340. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.219>
- Peelman, N; Ragaert, P; De Meulenaer, B; Roos-Peeters, DA; Cardon, L; Van-Impe, F; Devlieghere, F. (2013). Application of bioplastic for food packaging. *Food Science & Technology*, 32: 128–141. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.06.003>
- Pelissari, FM; Grossmann, MVE; Yamashita, F; Pineda, EAG. (2009). Antimicrobial, mechanical,

- and barrier properties of cassava Starch-Chitosan films incorporated with oregano essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 7499–7504. <https://doi.org/10.1021/jf9002363>
- Pereda, M; Aranguren, MI; Marcovich, NE. (2008). Characterization of Chitosan/Caseinate Films. *Journal of Applied Polymer Science*, 107: 1080–1090. <https://doi.org/10.1002/app.27052>
- Pereda, M; Aranguren, MI; Marcovich, NE. (2010). Caseinate films modified with tung oil. *Food Hydrocolloids*, 24(8): 800–808. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.04.007>
- Pereda, M; Moreira, M. del R; Roura, SI.; Marcovich, N; Aranguren, MI. (2014). Bio-Películas para el envasado de alimentos: proteínas y carbohidratos. *Ciencia E Investigación*, 64(2): 35–50. Retrieved from http://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/7796/CONICET_Digital_Nro.6729_A.pdf?sequence=11&isAllowed=y
- Pérez-Córdoba, LJ; Norton, IT; Batchelor, HK; Gkatzionis, K; Spyropoulos, F; Sobral, PJA. (2018). Physico-chemical, antimicrobial and antioxidant properties of gelatin-chitosan based films loaded with nanoemulsions encapsulating active compounds. *Food Hydrocolloids*, 79: 544–559. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.12.012>
- Pérez-Gago, MB; Rhim, JW. (2014). Chapter 13 - Edible coating and film materials: lipid bilayers and lipid emulsions. In Han, JH. (Ed.), *Innovations in Food Packaging* (2th. ed., pp. 325–350). Texas, USA: Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00013-8>
- Perez, CK. (2012). *Empaques y embalajes*. (Perez, CK. Ed.), *Modern healthcare* (Vol. 30). México: Milenio, Red Tercer. <https://doi.org/10.21037/tau.2016.03.12>
- Piletti, R; Bugiereck, AM; Pereira, AT; Gussati, E; Dal Magro, J; Mello, JM; ... Fiori, MA. (2017). Microencapsulation of eugenol molecules by β -cyclodextrine as a thermal protection method of antibacterial action. *Materials Science and Engineering C*, 75: 259–271. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.075>
- Pires, C; Ramos, C; Teixeira, G; Batista, I; Mendes, R; Nunes, L; Marques, A. (2011). Characterization of biodegradable films prepared with hake proteins and thyme oil. *Journal of Food Engineering*, 105(3): 422–428. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.02.036>
- Plumb, AP; Rowe, RC; York, P; Brown, M. (2005). Optimisation of the predictive ability of artificial neural network (ANN) models: A comparison of three ANN programs and four classes of training algorithm. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25: 395–405. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.04.010>
- Pojanavaraphan, T; Magaraphan, R; Chiou, BS; Schiraldi, DA. (2010). Development of biodegradable foamlite materials based on casein and sodium montmorillonite clay. *Biomacromolecules*, 11(10): 2640–2646. <https://doi.org/10.1021/bm100615a>
- Pons, CI. (2010). Evaluación mediante la tecnología NIRS de los insumos, su transformación y el chocolate elaborado con cacao (*Theobroma cacao* L.) de Tabasco. *Colegio de Postgraduados de Tabasco*.
- Prameela, K; Mohan, CM; Ramakrishna, C. (2018). Chapter 1 - Biopolymers for food design: Consumer-friendly natural ingredients. (Grumezescu, AM; Holban, AM. Eds.), *Biopolymers for Food Design*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811449-0/00001-3>
- Quintavalla, S; Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*, 62: 373–380.
- Rai, MK; Asthana, P; Singh, SK; Jaiswal, VS; Jaiswal, U. (2009). The encapsulation technology in

- fruit plants-A review. *Biotechnology Advances*, 27(6): 671–679. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.025>
- Ramírez-Rodríguez, E; Anaya-Escalera, A; Mariscal-Landín, G. (2005). Predicción de la composición química del grano de sorgo mediante espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS). *Técnica Pecuaria En México*, 43(1): 1–11. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61343101>
- Ramos, ÓL; Pereira, JO; Silva, SI; Fernandes, JC; Franco, MI; Lopes-da-Silva, JÁ; ... Malcata, FX. (2012). Evaluation of antimicrobial edible coatings from a whey protein isolate base to improve the shelf life of cheese. *Journal of Dairy Science*, 95(11): 6282–6292. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5478>
- Ressouany, M; Vachon, C; Lacroix, M. (1998). Irradiation dose and calcium effect on the mechanical properties of Cross-Linked caseinate Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(4): 1618–1623. <https://doi.org/10.1021/jf970805z>
- Restrepo, J; Vinasco, LE; Jaramillo, LP; Colmenares, AJ. (2009). Encapsulamiento de los aceites esenciales de citral (*Cymbopogon citratus*) en β -ciclodextrinas usando CO₂ supercrítico. *Revista Ingeniería Y Competitividad*, 11(2): 9–19.
- Ribeiro-Santos, R; Andrade, M; Sanches-Silva, A. (2017). Application of encapsulated essential oils as antimicrobial agents in food packaging. *Current Opinion in Food Science*, 14: 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.01.012>
- Robert, P; García, P; Fredes, C. (2017). Chapter 9: Drying and Preservation of Polyphenols. In J. Cuevas-Valenzuela, J; Vergara-Salinas, JR; Pérez-Correa, JR. (Eds.), *Advances in technologies for producing food-relevant polyphenols* (p. 22). USA: CRC Press/Taylor and Francis Group.
- Robson, N. (2000). Principales materiales plasticos para la manufactura de envases y embalajes. Sena CDT-ASTIN.
- Roggo, Y; Chalus, P; Maurer, L; Lema-Martinez, C; Edmond, A; Jent, N. (2007). A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44: 683–700. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.03.023>
- Rojas, C; Trujillo, G; Saénz, CP; Valderrama, A. (2013). Performance o fa blue maize film in the packaging of an intermediate moisture cheese. *Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 2(2): 49–58.
- Ruktanonchai, U; Srinuanchai, W; Saesoo, S; Sramala, I; Puttipipatkachorn, S; Soottitantawat, A. (2011). Encapsulation of Citral Isomers in Extracted Lemongrass Oil with Cyclodextrins: Molecular Modeling and Physicochemical Characterizations. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(12): 2340–2345. <https://doi.org/10.1271/bbb.110523>
- Saddiq, AA; Khayyat, SA. (2010). Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 98(1): 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.05.004>
- Salchenberger, LM; Cinar, EM; Lash, NA. (1998). Neural Networks : A New Tool for Predicting Thrift Failures. *Decision Sciences*, 23: 899–916. <https://doi.org/doi.org/10.1111/j.1540-5915.1992.tb00425.x>
- Salgado, PR; Ortiz, CM; Musso, YS; Giorgio, LD; Mauri, AN. (2015). Edible films and coatings

- containing bioactives. *Food Science*, 5: 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.09.004>
- Salvia-Trujillo, L; Rojas-Graü, A; Soliva-Fortuny, R; Martín-Belloso, O. (2015). Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. *Food Hydrocolloids*, 43: 547–556. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.07.012>
- Sandova-Mejía, LA; Bueso-Uclés, FJ; Vélez-Nauer, M. (2008). Predicción nutricional para pastos tropicales por Espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano. *Agronomía Mesoamericana*, 19(2): 221–225. [https://doi.org/1021-7444](https://doi.org/10.1016/j.fohyd.2014.07.012)
- Santhalakshmy, S; Don Bosco, SJ; Francis, S; Sabeena, M. (2015). Effect of inlet temperature on physicochemical properties of spray-dried jamun fruit juice powder. *Powder Technology*, 274: 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.01.016>
- Santos, G; Fernández-olmo, I; Irabien, Á; Ledoux, F; Courcot, D. (2014). PLSR and ANN estimation models for PM10-bound heavy metals in Dunkerque (Northern France). *ProScience*, 1, 100–105. <https://doi.org/10.14644/dust.2014.016>
- Sarifudin, A; Assiry, AM. (2014). Some physicochemical properties of dextrin produced by extrusion process. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 13(2): 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2013.02.001>
- Schulz, H; Quilitzsch, R; Krüger, H. (2003). Rapid evaluation and quantitative analysis of thyme, origano and chamomile essential oils by ATR-IR and NIR spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 661–662: 299–306. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(03\)00517-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(03)00517-9)
- Schulz, H; Schrader, B; Quilitzsch, R; Steuer, B. (2002). Quantitative analysis of various citrus oils by ATR/FT-IR and NIR-FT Raman spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 56(1): 117–124. <https://doi.org/10.1366/0003702021954296>
- Sengupta, T; Han, JH. (2014). Chapter 4 - Surface Chemistry of Food, Packaging, and Biopolymer Materials. In Han, JH. (Ed.), *Innovations in Food Packaging* (2th. ed., pp. 51–86). Texas, USA: Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00004-7>
- Shafiee, S; Minaei, S. (2018). Combined data mining/NIR spectroscopy for purity assessment of lime juice. *Infrared Physics and Technology*, 91: 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.infrared.2018.04.012>
- Shaikh, J; Bhosale, R; Singhal, R. (2006). Microencapsulation of black pepper oleoresin. *Food Chemistry*, 94(1): 105–110. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.056>
- Shenk, J. S; Workman, JJ; Weterhaus, MO. (2008). Chapter 16 - Application of NIR Spectroscopy to agricultural products. In Burns, DA; Ciurczak, EW. (Eds.), *Handbook of Near-Infrared Analysis* (2th. editi, pp. 347–386). New York, USA: Taylor & Francis Group, LLC.
- Shiku, Y; Hamaguchi, PY; Tanaka, M. (2003). Effect of pH on the preparation of edible films based on fish myofibrillar proteins. *Fisheries Science*, 69: 1026–1032. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2003.00722.x>
- Shin, YJ; Song, HY; Seo, YB; Song, KB. (2012). Preparation of red algae film containing grapefruit seed extract and application for the packaging of cheese and bacon. *Food Science and Biotechnology*, 21(1): 225–231. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0029-x>
- Siesler, HW. (2007). Chapter 11: Application to Industrial Process Control. In Siesler, HW; Ozaki, Y; Kawata, S; Heise, HM. (Eds.), *Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments,*

- Application (3rd. ed., pp. 247–268). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH. <https://doi.org/10.1002/9783527612666.ch11>
- Sivropoulou, A; Papanikolaou, E; Nikolaou, C; Kokkini, S; Lanaras, T; Arsenakis, M. (1996). Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Origanum* Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(5): 1202–1205. <https://doi.org/10.1021/jf950540t>
- Sobral, P. do A. (2000). Influência da espessura sobre certas propriedades de biofilmes à base de proteínas miofibrilares. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35(6): 1251–1259.
- Sosa, N; Schebor, C; Pérez, OE. (2014). Encapsulation of citral in formulations containing sucrose or trehalose: Emulsions properties and stability. *Food and Bioproducts Processing*, 92(3): 266–274. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.08.001>
- Stashenko, EE. (2009). Aceites Esenciales. División de Publicaciones UIS.
- Steuer, B; Schulz, H; Läger, E. (2001). Classification and analysis of citrus oils by NIR spectroscopy. *Food Chemistry*, 72(1): 113–117. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00209-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00209-0)
- Sun, Y; Liu, Y; Yu, H; Xie, A; Li, X; Yin, Y; Duan, X. (2017). Non-destructive prediction of moisture content and freezable water content of purple-fleshed sweet potato slices during drying process using Hyperspectral Imaging Technique. *Food Analytical Methods*, 10(5): 1535–1546. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0722-0>
- Sutaphanit, P; Chitprasert, P. (2014). Optimisation of microencapsulation of holy basil essential oil in gelatin by response surface methodology. *Food Chemistry*, 150: 313–320. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.159>
- Tapia-Blácido, DR; do Amaral Sobral, PJ; Menegalli, FC. (2011). Optimization of amaranth flour films plasticized with glycerol and sorbitol by multi-response analysis. *LWT - Food Science and Technology*, 44(8): 1731–1738. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.04.004>
- Tenenhaus, M. (1998). La régression PLS: théorie et pratique. Paris: Editions technip.
- Tian, H; Lu, Z; Li, D; Hu, J. (2018). Preparation and characterization of citral-loaded solid lipid nanoparticles. *Food Chemistry*, 248: 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.091>
- Timilsena, YP; Adhikari, R; Barrow, CJ; Adhikari, B. (2016). Microencapsulation of chia seed oil using chia seed protein isolate-chia seed gum complex coacervates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91: 347–357. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.058>
- Torres, FG; Troncoso, OP; Nakamatsu, J; Grande, CJ; Gómez, CM. (2008). Characterization of the nanocomposite laminate structure occurring in fish scales from *Arapaima Gigas*. *Materials Science and Engineering C*, 28(8): 1276–1283. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2007.12.001>
- Torres, FG; Troncoso, OP; Piaggio, F; Hijar, A. (2010). Structure-property relationships of a biopolymer network: The eggshell membrane. *Acta Biomaterialia*, 6(9): 3687–3693. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.03.014>
- TRADE-MAP. (2019). Datos comerciales mensuales, trimestrales y anuales. Retrieved January 9, 2019, from <http://www.trademap.org>
- Urzúa, C; González, E; Dueik, V; Bouchon, P; Giménez, B; Robert, P. (2017). Olive leaves extract encapsulated by spray-drying in vacuum fried starch–gluten doughs. *Food and Bioproducts Processing*, 106: 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.10.001>
- USFDA. (1997). Grape Seed Extract GSE Notification Generally Recognized As Safe Exemption

- Claim from the Requirement for Premarket Approval Pursuant to Proposed, 21 CFR 170.36. Washington, D.C.
- Valenciaga, D; Simoes, E. (2006). La espectroscopia de reflectancia en el infrarojo cercano (NIRS) y sus potencialidades para la evaluación de forrajes. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 40(3): 259–267. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/1930/193017723001.pdf>
- Van der Maaten, L; Postma, E; Herik, J. van der. (2009). Dimensionality Reduction: A Comparative - Review. *Tilburg Centre for Creative Computing*, 1–36. <https://doi.org/10.1016/j.compmedimag.2015.11.004>
- Var, I; Erginkaya, Z; Güven, M; Kabak, B. (2006). Effects of antifungal agent and packaging material on microflora of Kashar cheese during storage period. *Food Control*, 17: 132–136. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.09.012>
- Vásquez, DR; Abadía, B; Arreaza, LC. (2004). Aplicación de la Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS) para la caracterización nutricional del pasto Guinea y del grano de maíz. *Revista Corpoica*, 5(1): 49–55.
- Vásquez, DR; Mayorga, OL. (2005). Uso de la Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS) para la cuantificación rápida y precisa de triptófano en maíces colombianos. *Revista Corpoica*, 6(1): 48–51. Retrieved from <http://revista.corpoica.org.co/index.php/revista/article/view/36>
- Vásquez, N; Magán, C; Oblitas, J; Chuquizuta, T; Avila-George, H; Castro, W. (2018). Comparison between artificial neural network and partial least squares regression models for hardness modeling during the ripening process of Swiss-type cheese using spectral profiles. *Journal of Food Engineering*, 219: 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.09.008>
- Vega-Vilca, JC; Guzmán, J. (2011). Regresión PLS y PCA como solución al problema de multicolinealidad en regresión múltiple. *Revista de Matemática: Teoría Y Aplicaciones*, 18(1): 9–20.
- Vega, J A. (2011). Obtención y caracterización de inulina entrecruzada como agente encapsulante de α -tocoferol. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Retrieved from http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2011/qf-vega_ja/pdfAmont/qf-vega_ja.pdf
- Vergara, C; Saavedra, J; Sáenz, C; García, P; Robert, P. (2014). Microencapsulation of pulp and ultrafiltered cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) extracts and betanin stability during storage. *Food Chemistry*, 157: 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.037>
- Wang, J; Cao, Y; Sun, B; Wang, C. (2011). Physicochemical and release characterisation of garlic oil- β - cyclodextrin inclusion complexes. *Food Chemistry*, 127(4): 1680–1685. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.036>
- Wang, Y; Lu, Z; Wu, H; Lv, F. (2009). Study on the antibiotic activity of microcapsule curcumin against foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 136(1): 71–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.001>
- Wehling, RL. (2010). Chapter 23: Infrared Spectroscopy. In Nielsen, SS. (Ed.), *Food Analysis* (4th.ed., pp. 407–419). New York, USA. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1478-1_23
- Wen, L; Rodis, P; Wasserman, B. (1990). Starch fragmentation and protein insolubilization during twin-screw extrusion of corn meal. *Cereal Chemistry*, 67(3): 268–275.

- Wilson, ND; Ivanova, MS; Watt, RA; Moffat, AC. (2002). The quantification of citral in lemongrass and lemon oils by near-infrared spectroscopy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 54(9): 1257–1263. <https://doi.org/10.1211/002235702320402107>
- Witz, G. (1989). Biological interactions of α,β -unsaturated aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, 7(3): 333–349. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(89\)90137-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(89)90137-8)
- Wold, JH; Valberg, A. (2001). The derivation of XYZ tristimulus spaces: A comparison of two alternative methods. *Color Research & Application*, 26(S1): S222–S224. [https://doi.org/10.1002/1520-6378\(2001\)26:1+<::AID-COL47>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1520-6378(2001)26:1+<::AID-COL47>3.0.CO;2-4)
- Wuryatmo, E; Klieber, A; Scott, ES. (2003). Inhibition of citrus postharvest pathogens by vapor of citral and related compounds in culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9): 2637–2640. <https://doi.org/10.1021/jf0261831>
- Xing, F; Cheng, G; Yi, K. (2006). Study on the antimicrobial activities of the capsaicin microcapsules. *Journal of Applied Polymer Science*, 102(2): 1318–1321. <https://doi.org/10.1002/app.23766>
- Yang, Y; Cui, S; Gong, J; Miller, SS; Wang, Q; Hua, Y. (2015). Stability of citral in oil-in-water emulsions protected by a soy protein-polysaccharide Maillard reaction product. *Food Research International*, 69: 357–363. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.006>
- Zhang, Y; Rempel, C; McLaren, D. (2014). Chapter 12 - Edible coating and film materials: carbohydrates. (Han, JH. Ed.), *Innovations in Food Packaging* (2th. ed.). Texas, USA: Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00012-6>

VIII. ANEXOS

ANEXO A. Evaluación sensorial con panel semi-entrenado

Fecha:.....

Nombre:..... Sexo:.....

Edad (años):

Menor de 20 entre 20 y 25 entre 25 y 30 entre 30 y 35 Mayor de 35

Instrucciones:

Por favor, indique con una línea vertical la intensidad de su sensación para cada una de ellas.

Muestra N° _____

1. Color

0	15
Crema	Amarillo intenso

2. Olor

0	15
Imperceptible	Intenso

3. Textura

0	15
Muy suave	Muy duro

4. Sabor

0	15
Muy desagradable	Muy agradable

5. Aceptabilidad general

0	15
Inaceptable	Muy aceptable

Comentarios: _____

ANEXO B. Tablas auxiliares del ensayo de microencapsulación del citral mediante secado por atomización

Tabla B.1. Diámetro de la zona de inhibición del crecimiento de diferentes bacterias por micropartículas de citral y efecto inhibitorio de la micropartícula de citral en comparación con la cantidad equivalente de citral libre.

Microorganismo (Mcg)	Diámetro de la zona de inhibición (mm) X ± ES	Relación de inhibición (%) X ± ES
<i>E. coli</i> (G-)	9.98 ¹ ± 0.44 a	56.23 ¹ ± 4.11
<i>S. entérica</i> (G-)	6.88 ± 0.13 b	55.55 ± 2.41
<i>S. aureus</i> (G+)	7.38 ± 0.28 b	74.47 ± 6.97
<i>B. cereus</i> (G+)	9.05 ± 0.19 a	64.87 ± 6.06
Nivel de significancia		
Mcg	S	NS

¹Los valores indican el promedio (n=4). X: promedio; ES: error estándar.

Letras diferentes en sentido vertical, indican diferencias estadísticamente significativa según la prueba Tukey (p<0,05), para cada microorganismo.

NS: No significativo. S: Significativo para p<0,05.

ANEXO C. Tablas auxiliares del ensayo de determinación del contenido superficial de citral en micropartículas mediante espectroscopía NIR y quimiometría

Tabla C.1. Contenido superficial de citral de las micropartículas de emulsión de citral, lecitina de soya y dextrina mediante secado por atomización, según condiciones del diseño experimental.

Exp ¹ .	TEA (°C)	Relación (Ct:Dx)	Contenido superficial de citral (mg Citral /g mcp)	
			X	± DE
1	120 (-1)	1:5 (-1)	0.51 ²	± 0.062
2	120 (-1)	1:12.5 (0)	0.42	± 0.003
3	120 (-1)	1:20 (+1)	0.89	± 0.015
4	160 (0)	1:5 (-1)	0.35	± 0.021
5	160 (0)	1:12.5 (0)	0.52	± 0.036
6	160 (0)	1:12.5 (0)	0.54	± 0.030
7	160 (0)	1:12.5 (0)	0.58	± 0.006
8	160 (0)	1:12.5 (0)	0.59	± 0.046
9	160 (0)	1:20 (+1)	1.00	± 0.154
10	200 (+1)	1:5 (-1)	0.17	± 0.004
11	200 (+1)	1:12.5 (0)	0.50	± 0.135
12	200 (+1)	1:20 (+1)	1.28	± 0.007

¹Número de experimento. TEA: temperatura de entrada del aire al secador. Ct: Citral. Dx: dextrina. mcp: micropartícula

²Los valores indican el promedio (n=4). X: promedio; ES: error estándar.

ANEXO D. Tablas auxiliares del ensayo de biopelículas activas elaboradas con micropartículas de citral para prolongar la vida útil del queso fresco

Tabla D.1. Análisis comparativo entre los tratamientos con diferentes biopelículas y el testigo, según el valor de pH de la dilución 10^{-1} en queso fresco almacenado a 6 °C por 14 días.

Tratamiento (T)	pH de la dilución 10^{-1} del queso fresco			
	Día 0	Día 4	Día 8	Día 14
Bolsa PE (Testigo) ¹	- ²	6.59 ³ ± 0.07	6.36 ± 0.07	6.08 ± 0.13
Bioplástico con MC	-	6.49 ± 0.17	6.47 ± 0.06	6.50 ± 0.12 *
Bioplástico con CL	-	6.42 ± 0.05	6.53 ± 0.03 *	6.37 ± 0.16
MP a/e	6.48 ± 0.05	-	-	-
Nivel de significancia				
T	-	NS	S	S

PE: polietileno. MC: micropartícula de citral. CL: citral libre. MP a/e: Materia prima (queso fresco) antes de envasar.

¹Testigo: envasado en bolsa de polietileno.

²Guiones indican evaluación no realizada.

³Los valores indican el promedio (n=3) y ± indica su desviación estándar.

*/ Indica tratamientos estadísticamente diferentes al testigo para cada microorganismo y día de evaluación, según la prueba Dunnett (p < 0,05).

NS: No significativo. S: Significativo para p<0,05.

Tabla D.2. Análisis comparativo entre los tratamientos con diferentes biopelículas y el testigo, según el contenido de humedad en queso fresco almacenado a 6 °C por 14 días.

Tratamiento (T)	Contenido de humedad del queso fresco (%)			
	Día 0	Día 4	Día 8	Día 14
Bolsa PE (Testigo) ¹	- ²	32.76 ³ ± 2.23	33.87 ± 1.97	33.67 ± 2.32
Bioplástico con MC	-	24.28 ± 2.44*	21.43 ± 1.37*	18.79 ± 2.54*
Bioplástico con CL	-	27.00 ± 0.99*	22.64 ± 1.15*	16.80 ± 2.63*
MP a/e	35.37 ± 2.82	-	-	-
Nivel de significancia				
T	-	S	S	S

PE: polietileno. MC: micropartícula de citral. CL: citral libre. MP a/e: Materia prima (queso fresco) antes de envasar.

¹Testigo: envasado en bolsa de polietileno.

²Guiones indican evaluación no realizada.

³Los valores indican el promedio (n=3) y ± indica su desviación estándar.

*/ Indica tratamientos estadísticamente diferentes al testigo para cada microorganismo y día de evaluación, según la prueba Dunnett (p < 0,05).

S: Significativo para p<0,05.

Tabla D.3. Análisis comparativo entre los tratamientos con diferentes biopelículas y el testigo, según la pérdida de peso en queso fresco almacenado a 6 °C por 14 días.

Tratamiento (T)	Pérdida de peso del queso fresco (%)			
	Día 0	Día 4	Día 8	Día 14
Bolsa PE (Testigo) ¹	- ²	0.21 ³ ± 0.02	0.86 ± 0.16	1.06 ± 0.26
Bioplástico con MC	-	9.19 ± 1.10 *	17.04 ± 0.65 *	23.85 ± 2.79 *
Bioplástico con CL	-	10.99 ± 1.17 *	18.60 ± 2.47 *	20.88 ± 1.30 *
MP a/e	0.00 ± 0.00	-	-	-
Nivel de significancia				
T	-	S	S	S

PE: polietileno. MC: micropartícula de citral. CL: citral libre. MP a/e: Materia prima (queso fresco) antes de envasar.

¹Testigo: envasado en bolsa de polietileno.

²Guiones indican evaluación no realizada.

³Los valores indican el promedio (n=3) y ± indica su desviación estándar.

*/ Indica tratamientos estadísticamente diferentes al testigo para cada microorganismo y día de evaluación, según la prueba Dunnett (p < 0,05). S: Significativo para p<0,05.

Tabla D.4. Análisis comparativo entre los tratamientos con diferentes biopelículas y el testigo, según la diferencia de color total en queso fresco almacenado a 6 °C por 14 días.

Tratamiento (T)	Diferencia de color total (ΔE^*) del queso fresco			
	Día 0	Día 4	Día 8	Día 14
Bolsa PE (Testigo) ¹	- ²	2.30 ³ ± 0.72	2.51 ± 1.04	3.38 ± 1.76
Bioplástico con MC	-	9.69 ± 2.78*	12.14 ± 2.04*	14.84 ± 1.13*
Bioplástico con CL	-	9.09 ± 1.02*	10.91 ± 1.88*	15.16 ± 2.05*
MP a/e	0.00 ± 0.00	-	-	-
Nivel de significancia				
T	-	S	S	S

PE: polietileno. MC: micropartícula de citral. CL: citral libre. MP a/e: Materia prima (queso fresco) antes de envasar.

¹Testigo: envasado en bolsa de polietileno.

²Guiones indican evaluación no realizada.

³Los valores indican el promedio (n=3) y ± indica su desviación estándar.

*/ Indica tratamientos estadísticamente diferentes al testigo para cada microorganismo y día de evaluación, según la prueba Dunnett (p < 0,05). S: Significativo para p<0,05.

Tabla D.5. Análisis comparativo entre los tratamientos con diferentes biopelículas y el testigo, según la blancura en queso fresco almacenado a 6 °C por 14 días.

Tratamiento (T)	Blancura (W) del queso fresco			
	Día 0	Día 4	Día 8	Día 14
Bolsa PE (Testigo) ¹	- ²	78.23 ³ ± 1.23	76.61 ± 1.71	74.02 ± 2.26
Bioplástico con MC	-	67.98 ± 2.96*	66.35 ± 1.72*	64.34 ± 1.09*
Bioplástico con CL	-	68.73 ± 0.97*	67.72 ± 1.37*	64.34 ± 1.58*
MP a/e	77.02 ± 1.17	-	-	-
Nivel de significancia				
T	-	S	S	S

PE: polietileno. MC: micropartícula de citral. CL: citral libre. MP a/e: Materia prima (queso fresco) antes de envasar.

¹Testigo: envasado en bolsa de polietileno.

²Guiones indican evaluación no realizada.

³Los valores indican el promedio (n=3) y ± indica su desviación estándar.

*/ Indica tratamientos estadísticamente diferentes al testigo para cada microorganismo y día de evaluación, según la prueba Dunnett ($p < 0,05$). S: Significativo para $p < 0,05$.

ANEXO E. Artículos científicos publicados y por publicar, derivados de la tesis doctoral

ANEXO E.1. Artículos científicos publicados

Los artículos científicos publicados a la fecha de sustentación de tesis (12 de septiembre de 2012) en revistas científicas indizadas en base de datos Scopus, derivados del ensayo “Determinación del contenido superficial de citral en micropartículas mediante espectroscopía NIR y herramientas quimiométricas”, los cuales se adjuntan al presente informe de tesis en las páginas siguientes, fueron dos, estos son los siguientes:

Artículo 1.

Título: “Predicción del contenido superficial de citral en micropartículas mediante espectroscopía NIR y regresión por mínimos cuadrados parciales”

Revista: Revista Técnica de Ingeniería de la Universidad de Zulia

Volumen (número): 42 (2)

Páginas: 75 - 85

Fecha de publicación: 01/05/2019

Doi: doi.org/10.22209/rt.v42n2a04

Web: <https://produccioncientificaluz.org/index.php/tecnica/article/view/26182>

Abstract

In this study *NIR* spectroscopy and Partial Least Square Regression (*PLSR*) were evaluated for prediction of citral superficial content (*SC*-superficial of citral) on microparticles. For this purpose, samples of microparticles with different *SC* were prepared; varying the citral:dextrin (*Ct:Dx*) ratio, in the solution (1:5 and 1:20), in the solution and inlet air temperature (*TAI*) in a spray dryer (120 and 200 °C), in the drying process, getting 12 treatments. The *SC* was measured by gas chromatography. Then, each treatment was divided into six-parts, four for modeling and two for validation, obtaining 72 parts and from each one its absorbance spectral profile (1100 and 2500 nm), was extracted and pretreated. Subsequently, the *PLSR* method was applied to model the relationship between the spectral profiles and the *SC* values. Models were obtained with full spectra and optimized models with the relevant wavelengths. The results obtained with the optimized *PLSR* model showed R^2 values higher than 0.89 and *RMSEC* less than 4.86×10^{-15} . So, the *NIR-PLSR* method showed potential for the determination of citral on microcapsules.

Artículo 2.

Título: “Determination of the superficial citral content on microparticles: An application of NIR spectroscopy coupled with chemometric tools”

Revista: Heliyon

Volumen: 5

Páginas: e02122

Fecha de publicación: 18/07/2019

Doi: doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02122

Web: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844019357822>

Abstract

This work evaluates near-infrared (*NIR*) spectroscopy coupled with chemometric tools for determining the superficial content of citral (SC_{ct}) on microparticles. To perform this evaluation, using spray drying, citral was encapsulated in a matrix of dextrin using twelve combinations of citral:dextrin ratios (*CDR*) and inlet air temperatures (*IAT*). From each treatment, six samples were extracted, and their SC_{ct} and *NIR* absorption spectral profiles were measured. Then, the spectral profiles, pretreated and randomly divided into modeling and validation datasets, were used to build the following prediction models: principal component analysis-multilinear regression (*PCA-MLR*), principal component analysis-artificial neural network (*PCA-ANN*), partial least squares regression (*PLSR*) and an artificial neural network (*ANN*). During the validation stage, the models showed R^2 values from 0.73 to 0.96 and a root mean squared error (*RMSE*) range of [0.061–0.140]. Moreover, when the models were compared, the full and optimized *ANN* models showed the best fits. According to this study, *NIR* coupled with chemometric tools has the potential for application in determining SC_{ct} on microparticles, particularly when using *ANN* models.

ANEXO E.2. Artículos científicos por publicar

El artículo científico en revisión, derivado del ensayo “Microencapsulación del citral mediante secado por atomización: caracterización y actividad antimicrobiana”, se encuentra en su última etapa de revisión y traducción al idioma Inglés, para ser sometido a la revista “LWT - Food Science and Technology”, este artículo se titula “Microencapsulation of citral by spray drying: physical-chemical characterization and antimicrobial activity”.

El artículo científico en redacción, derivado del ensayo “Biopelículas activas elaboradas con micropartículas de citral para prolongar la vida útil del queso fresco”, se encuentra en la primera etapa de redacción, para su futura publicación en una revista por definir, que se encuentre en base de datos Scopus.