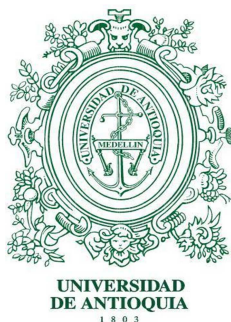


UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA



**EVALUACIÓN DE LA MIGRACIÓN DE AGENTES ANTIMICROBIANOS
EN PELÍCULAS DE PROTEÍNA DE SUERO Y SU EFECTO SOBRE LA
EXTENSIÓN DE VIDA ÚTIL EN AREPAS DE MAÍZ BLANCO.**

JUAN DANIEL RESTREPO VELÁSQUEZ

Trabajo presentado para optar al grado de Magister en Ciencias Farmacéuticas y
Alimentarias

ASESORA

Diana María Granda Restrepo
Ph.D Línea Envases para alimentos

Medellín, Colombia

2014

**EVALUACIÓN DE LA MIGRACIÓN DE AGENTES ANTIMICROBIANOS
EN PELÍCULAS DE PROTEÍNA DE SUERO Y SU EFECTO SOBRE LA
EXTENSIÓN DE VIDA ÚTIL EN AREPAS DE MAÍZ BLANCO.**

JUAN DANIEL RESTREPO VELÁSQUEZ

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
FACULTAD DE QUIMICA FARMACÉUTICA

2014

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la oportunidad de realizar este proyecto el cual contó siempre con su bendición.

A mi familia quienes estuvieron siempre brindándome su apoyo incondicional en todas las etapas de este proceso.

A mi asesora de grado Diana María Granda Restrepo por su incondicional apoyo durante todo el proceso de aprendizaje.

Al laboratorio de salud pública y análisis sensorial de la universidad de Antioquia.

A todo mis compañeros y colegas de trabajo quienes siempre fueron un apoyo en el desarrollo de mi trabajo.

DEDICATORIA

*A mi madre, quien es la luz de mis ojos
y el motor que mueve mi ser.*

LISTA DE ABREVIATURAS

AOAC	Association of Official Analytical Chemists.
ISO	International Standard Organization.
PCL	Proteína concentrada del lactosuero.
PAL	Proteína aislada del lactosuero.
NTC	Norma Técnica Colombiana.
INVIMA	Instituto de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos.
ASTM	Sociedad americana para pruebas de materiales.
%E	Porcentaje de elongación.
TS	Fuerza de tensión.
nm	Nanómetros.
pH	Potencial de Hidrógeno.
umas	Unidades de masa atómica.
°C	Grado Celcius.
a_w	Actividad acuosa.
D.E.	Desviación estándar.
UFC/g.	Unidades formadoras de colonias por gramo.
Kg	Kilogramo.
m/m	masa masa.
min.	Minutos.
ml.	Mililitros.
mm.	Milímetros.
N	Newtons.
N/mm^2	Newtons por milímetro cuadrado.
FDA	Administración de alimentos y drogas de Estados Unidos.
FAO	Organización de las naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación.
μg	Microgramos.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	8
1. INTRODUCCIÓN.	9
2. OBJETIVOS.	18
2.1 Objetivo General.	18
2.2 Objetivos Específicos.	18
3. ESTADO DEL ARTE.	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS.	29
4.1 CARACTERIZACIÓN DE LA AREPA DE MAÍZ BLANCO.	29
4.1.1 Análisis fisicoquímicos.	30
4.1.2 Análisis microbiológicos.	31
4.1.3 Análisis sensorial.	31
4.2 FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PELÍCULA PCL CON UN ANTIMICROBIANO.	31
4.2.1 Elaboración de la película PCL con y sin agente antimicrobiano.	32
4.2.2 Caracterización de las propiedades mecánicas de la película PCL con y sin agente antimicrobiano.	33
4.2.3 Selección de agentes antimicrobianos aplicables a la película PCL.	33
4.2.4 Incorporación del agente antimicrobiano a la película PCL.	34
4.3 ESTUDIO DE MIGRACION EN LA PELICULA PCL Y EN AREPA DE MAÍZ BLANCO.	34
4.3.1 Estudio de migración en películas PCL.	35
4.3.2 Estudio de migración en arepas de maíz blanco.	35
4.4 ESTUDIO DE VIDA ÚTIL EN LA AREPA DE MAÍZ BLANCO.	36
4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36

5. RESULTADOS Y DISCUSION.	37
6. CONCLUSIONES.	57
7. PERSPECTIVAS.	59
BIBLIOGRAFÍA.	60

RESUMEN

Con el fin de minimizar el impacto negativo que se genera debido al vertimiento de lactosuero de la industria quesera y contribuir con el aprovechamiento de este subproducto, se aprovechó la funcionalidad estructural de su contenido protéico: α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina para elaborar un envase activo adicionando el agente antimicrobiano (natamicina). El estudio buscó evaluar la migración de este antibiótico y su efecto en la extensión de la vida útil en un producto de alto consumo en la ciudad de Medellín como lo es la arepa de maíz blanco. Se realizó una caracterización fisicoquímica, microbiológica y sensorial de la arepa, información que sirvió de punto de partida para este estudio. Se elaboró el envase activo y se le evaluaron propiedades mecánicas como porcentaje de elongación (%E) y fuerza de tensión (TS). Con base a metodologías de investigación que se han desarrollado a nivel mundial con respecto a la migración de agentes antimicrobianos, se realizó un test de migración en el cual se determinó la cantidad de natamicina presente en la película a base de proteína y en la arepa de maíz blanco. La incorporación de natamicina en la película evidenció un efecto retardante en el crecimiento de los hongos que resultaron en favorecer la extensión de la vida útil de la arepa de maíz blanco.

Palabras clave: Envase activo, Lactosuero, migración, natamicina, arepa de maíz blanco.

1. INTRODUCCIÓN.

El envasado se considera como uno de los factores más importantes en cuanto a la conservación de las propiedades de un alimento, pues este representa la vía para contener el alimento y como función principal: protegerlo de múltiples efectos externos que pueden afectar su calidad, estabilidad, vida útil [1] y más aún cuando se trata de productos autóctonos regionales que en su gran mayoría, tanto su producción, distribución, alta comercialización y estabilidad en el tiempo no garantizan condiciones óptimas de consumo. Dentro de este tipo de productos se encuentra la arepa de maíz blanco.

La arepa de maíz blanco es un alimento de consumo masivo listo para calentar, obtenido a partir de la masa de maíz blanco previamente cocinada y mezclada con otros ingredientes y que debe ser almacenada en frío, una vez empacada se comercializa. En Colombia, específicamente en Antioquia su consumo es muy alto (entre 200.000 y 250.000 toneladas anuales) situándose como un alimento que reemplaza comidas fuertes en los hogares antioqueños [2]. Según estadísticas de 2010 de la subdirección de vigilancia y control de alimentos de la secretaría de salud de Medellín, en la ciudad, la arepa de maíz blanco presenta una producción mayoritariamente artesanal y a escala doméstica (no tecnificada industrialmente) presentándose condiciones higiénico sanitarias deficientes en infraestructura, equipos, utensilios, insumos, materias primas, producción, empaque y con un personal poco calificado para su elaboración y que con sus prácticas contribuyen a una higiene deficiente, afectando directamente el proceso de envasado del producto, distribución y comercialización, lo que se traduce en una vida útil baja de la arepa de maíz blanco.

La vasta comercialización de la arepa de maíz blanco representa un consumo por hogar (4 personas en promedio) de \$339.767 anuales (diciembre de 2008), queriendo decir, que cada persona gastó en promedio \$84.942 en consumirlas [3]. Este producto es altamente perecedero debido a la microbiota que puede desarrollar en su tiempo de vida útil promedio (3 a 25 días dependiendo del proceso al cual es sometido el producto) donde se aíslan frecuentemente especies del género *Aspergillus* como *A. flavus* y *A. parasiticus* entre otros, que producen toxinas como aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂) y fumonisinas (B₁, B₂) y que no deben superar los 10 µg/Kg y 1000 µg/Kg respectivamente de acuerdo a la Resolución 004506 de 2013 [4] ya que en concentraciones altas a largo plazo, pueden producir alteraciones a nivel fisiológico como cáncer o trastornos gastrointestinales provenientes de la microbiota bacteriana presente, Por esta razón, se considera a la arepa de maíz blanco como un producto de alto impacto en la salud pública de la población [5].

Otro aspecto importante a tener en cuenta en el producto es su vida útil, la cual inicia desde la comercialización al consumidor bajo condiciones de temperatura y humedad relativa muy variadas, las cuales no son controladas en la mayoría de establecimientos expendedores como tiendas o supermercados de grandes superficies [6]. El empaque del producto (generalmente polietileno) expone una baja barrera a gases como oxígeno, dióxido de carbono, sabores, aromas y alta migración de otros compuestos como grasas y aceites, favoreciendo el deterioro progresivo del producto [7].

El panorama presentado previamente, establece, no solo el impacto en salud pública sino también el impacto económico que a nivel industrial puede presentarse en el contexto local y nacional ya que el deterioro progresivo de las propiedades del producto puede ser perjudicial para el sector industrial que

controla el producto y que según datos al año 2009 generó ventas anuales por más de 3.9 billones de pesos [2].

El lactosuero es el líquido obtenido en el proceso de fabricación del queso después de la separación de la cuajada, líquido verdoso - amarillento, turbio, sabor fresco, débilmente dulce, ácido, con un contenido de nutrientes o extracto seco del 5,5 % al 7,0 % provenientes de la leche; constituye además una fracción del 90% del volumen total de la leche. Los componentes del lactosuero son: Proteínas que son de gran aprovechamiento tecnológico (6,0 %), grasa (1,0 %), lactosa (42,0 %), materias minerales (8,0 %), ácido láctico (10,0 %) y diversos macroelementos entre los cuales sobresalen el sodio, magnesio y potasio [8].

Actualmente, atendiendo al impacto que este subproducto ofrece a la población, se tiene en Colombia una legislación en la cual se establecen las disposiciones sobre los requisitos sanitarios que deben cumplir los lactosueros en polvo, como materia prima de alimentos para consumo humano y se dictan otras disposiciones sobre el descarte de este subproducto, todo esto legislado en la Resolución 2997 de 2007 con actualizaciones en el año 2010 [9].

Las propiedades funcionales del lactosuero vienen dadas por las de sus dos principales proteínas: α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina. Entre ellas destacan su solubilidad, incluso a pH 4,5, si no se calientan, sus propiedades emulsionantes y espumantes y su capacidad de gelificación. Se recuperan por ultrafiltración o intercambio iónico, con secado a temperaturas lo más bajas posible para evitar su desnaturalización [8].

La α -lactoalbúmina (Figura 1) es una proteína que se encuentra en la leche de casi todas las especies, es la segunda proteína en concentración en el lactosuero de vaca (entre 1 y 1,5 mg/ml). Formada por una sola cadena polipeptídica, de 123 aminoácidos, con un peso molecular de 14.200 umas. Su estructura terciaria, muy compacta, globular, está mantenida por cuatro puentes disulfuro, con una zona de hélice α y otra de hojas plegadas.

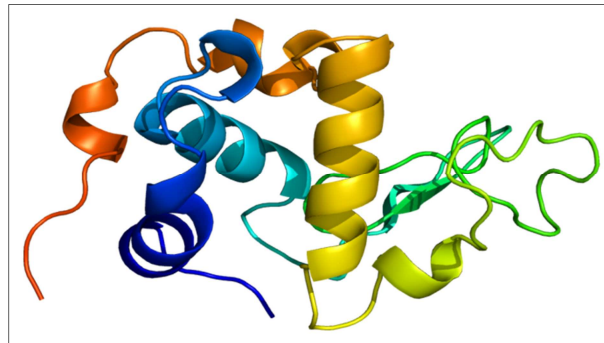


Figura 1. Estructura de la proteína α -lactoalbúmina.

Imagen Tomada de: bioagroin.blogspot.com

Es una proteína ácida con un punto isoeléctrico de alrededor de 4,8, tiene un ión de Ca unido, que es imprescindible en el mantenimiento de su estructura. La eliminación del Ca produce la estructura llamada "moltenglobule", un estado intermedio de desnaturalización que ha sido muy utilizado como modelo en la desnaturalización de proteínas. En este estado, la proteína es mucho menos resistente que la forma saturada con Ca frente a condiciones desnaturalizantes, como el calentamiento [8].

La β -lactoglobulina (Figura 2) es la proteína más abundante en el lactosuero bovino, en el que alcanza concentraciones de 2 a 4 mg/ml, representando alrededor de la mitad de las proteínas del lactosuero. Está formada por una sola cadena de 162 aminoácidos, con un peso molecular de 18.400 umas [78]. Al pH

de la leche, la β -lactoglobulina de los rumiantes se presenta en forma de dímeros con los monómeros unidos de forma no covalente. Estos dímeros se forman entre pH 5,2 y pH 7,5, el punto isoeléctrico de la β -lactoglobulina. Por debajo de pH 3,5 y por encima de pH 7,5, la β -lactoglobulina está en forma de monómeros, mientras que entre pH 3,5 y pH 5,2 se encuentra en forma de octámeros [10].



Figura 2. Estructura de la proteína β -lactoglobulina.

Imagen Tomada de: bioagroin.blogspot.com

Los puentes disulfuro son también bastante reactivos, y dan lugar a reacciones de intercambio de sulfidrilos. La β -lactoglobulina se desnaturaliza con relativa facilidad por el calor. Es capaz de interactuar con distintas moléculas hidrofóbicas, especialmente el retinol y los ácidos grasos. Esta propiedad, además de estar probablemente relacionada con su función biológica, hace que tenga buenas propiedades emulsionantes. La β -lactoglobulina es la más hidrofóbica de las proteínas comunes del lactosuero [11].

Gracias a estas múltiples propiedades el lactosuero está siendo de gran interés en el ámbito científico mundial en cuanto al aprovechamiento de sus propiedades funcionales, convirtiéndolo en un precursor de aplicaciones industriales como lo es el desarrollo de ingredientes funcionales y la elaboración de envases para alimentos [12]. Durante su largo recorrido evolutivo, los envases, han adquirido un

peso importante para responder a la demanda de los consumidores por productos más frescos y de los productores de un aumento en la vida útil de los alimentos. Estos dos aspectos han marcado la pauta para la generación e innovación de nuevas materias primas en el desarrollo de envases para alimentos, hasta el punto de involucrar condiciones desde los envases que extiendan la vida útil y mejore su seguridad y/o propiedades sensoriales mientras mantiene su calidad (envasado activo) [13].

Actualmente los envases activos han cobrado fuerza en el marco investigativo mundial con el desarrollo de múltiples estudios que involucran la incorporación de aditivos que tienen un efecto benéfico en la calidad de varios alimentos y que confirman la pertinencia de estas nuevas tendencias en el envasado de alimentos involucrando sectores de gran impacto económico y de salud pública, tal es el caso de su uso en productos cárnicos en los cuales se adicionan agentes antimicrobianos para extender la vida útil [14]; adición de antioxidantes naturales que permiten mantener en óptimas condiciones cortes de carne de res a través del tiempo [15]; incorporación de compuestos extraídos de especias para inhibición de microbiota fúngica en pan [16]; incorporación de agentes antioxidantes para retardar procesos oxidativos en leche en polvo [17], estos como algunos de los estudios de investigación que hacen referencia al envasado activo recientemente. Es de resaltar que estos aspectos tienen una gran significancia desde el punto de vista estructural del envase activo, ya que están influenciados con procesos como la transferencia de masa de sustancias desde el envase hacia el producto (migración) creando un sistema envase – alimento que puede proveer beneficios tan significativos como la extensión de la vida útil en un alimento [18].

La migración se define como la transferencia de masa de una fuente externa al producto envasado por un proceso submicroscópico mediante movimientos

brownianos (difusión) que no requieren de fuerzas externas que la promuevan. La afinidad de los componentes que interactúan en el sistema envase – alimento permite un proceso de disolución, migración, y equilibrio. La migración del compuesto puede darse del polímero hacia el alimento o del alimento hacia el polímero. En estos procesos intervienen factores importantes y directos como: espesor de la película y área de contacto (alimento – envase) [18]. Las consecuencias del proceso de migración en el envase implican la alteración de características fisicoquímicas y mecánicas del polímero durante la vida útil del producto [19].

En los polímeros se presenta una transferencia de masa a través de la matriz polimérica por el que los componentes y aditivos se incorporan al producto envasado formándose un nuevo sistema químico con varias fases que se encuentran en desequilibrio y por lo tanto tenderá al equilibrio químico, obedeciendo entonces a procesos de migración, todas aquellas sustancias de bajo peso molecular presentes en las paredes del envase que comienzan un proceso de transporte hacia el producto. Esta transferencia es el resultado de su difusión dentro del sistema polimérico y el equilibrio químico, que se alcanza entre el polímero y la superficie del alimento. Este se puede expresar como la relación entre la concentración del migrante en el producto y la concentración en el polímero; ambos a un tiempo infinito [19-21].

Las primeras etapas del compuesto migrante se presentan en las áreas amorfas de la matriz polimérica. La migración está controlada por el proceso de difusión del migrante, que consiste en la transferencia de masa a través de los espacios libres originados por los movimientos moleculares naturales aleatorios de fragmentos de cadena del polímero que ocurren en ausencia de fuerzas externas tales como agitación, mezclado o corrientes de convección en líquidos. Este

modo de transporte molecular obedece en la mayoría de los casos a leyes de Fick para la difusión, según las cuales, se produce un flujo de migrante en dirección contraria a la diferencia de concentración a lo largo del espesor del polímero [22,23].

Uno de los aprovechamientos más importantes en donde se ha utilizado el transporte de sustancias para optimizar las características de un alimento ha sido la incorporación de agentes antimicrobianos, que, gracias a los procesos de migración desde el envase, han tenido buenos resultados en la inhibición o control del crecimiento de la microbiota indeseable en los alimentos. Varios estudios de estos han sido desarrollados en alimentos y desde las películas elaboradas a partir de lactosuero en las cuales se han incorporado agentes antimicrobianos como la natamicina, nicina y ácido málico para disminuir la microbiota fúngica y bacteriana en productos lácteos [24]; se ha evaluado la incorporación de lactato de sodio y agentes naturales como el carvacrol extraído del orégano en productos cárnicos, logrando inhibir la microbiota bacteriana [25]. Otros estudios señalan la evaluación de procesos de migración de compuestos antimicrobianos como el sorbato de potasio en matrices biopoliméricas de WPI para establecer un modelo de migración hacia una matriz alimentaria [26]. Los estudios citados anteriormente se orientan a productos de consumo masivo en la población mundial como lácteos y cárnicos, pero muy poca información se tiene en productos de origen vegetal y más aún en productos autóctonos como la arepa de maíz blanco.

El presente estudio establece en primera instancia la caracterización de la arepa de maíz blanco, lo cual brinda un punto de partida desde sus características propias (físicoquímicas, microbiológicas y sensoriales) para aplicar posteriormente un sistema de envasado activo mediante la incorporación de un agente antimicrobiano en películas elaboradas a partir de la proteínas concentradas del

lactosuero donde se evalúa la migración del compuesto desde la película a la arepa de maíz blanco y se evalúa la extensión de su vida útil.

2. OBJETIVOS.

2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la migración de agentes antimicrobianos desde películas de proteína de suero y su efecto sobre la extensión de vida útil en arepas de maíz blanco (*Zea mays*).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar la arepa de maíz blanco (*Zea mays*) en cuanto a su composición fisicoquímica, microbiológica y sensorial.

Formular y caracterizar las películas a base de proteína de lactosuero con un agente antimicrobiano.

Evaluar la migración de agentes antimicrobianos desde las películas hacia la arepa de maíz blanco.

Evaluar la vida útil de arepas de maíz blanco envasadas en películas activas con agentes antimicrobianos y elaborados a partir de proteína concentrada del lactosuero (PCL).

3. ESTADO DEL ARTE.

El envasado de alimentos es un concepto que involucra muchas definiciones, teniendo en cuenta el punto de vista desde el cual se quiera abordar: tecnológico, funcional, impacto ambiental, etc. Dentro de esta conceptualización global, la definición de envase se refiere a aquel recipiente adecuado que, estando en contacto directo o indirecto con el producto, lo protege, conserva y facilita su manejo, transporte, almacenamiento y distribución [1]; siendo la protección el parámetro más importante en cuanto a la estabilidad del alimento se refiere. Precisamente este concepto a través del tiempo ha cobrado más significancia de acuerdo a los retos que desde hace años y hasta la fecha se han impuesto en el envasado de alimentos, sobre todo, desde el punto de vista de la conservación y/o extensión de su vida útil donde hoy productores y consumidores prestan una mayor atención a dos parámetros de vital importancia: estabilidad e inocuidad del alimento respectivamente [27]. En este sentido, la estabilidad e inocuidad del alimento en dirección a su conservación y/o extensión de la vida útil pondera un concepto de envasado promisorio e innovador: envasado activo. El envasado activo hace referencia a la incorporación de sustancias dentro de sistemas de envasado para mejorar y mantener la calidad del producto y así mismo extender su vida útil; oficialmente, según la European FAIR – Project CT 98-4170 se define como: tipo de envasado que cambia la condición del envasado para extender la vida útil o mejora la seguridad y las propiedades sensoriales mientras mantiene la calidad del alimento [28].

Como ejemplos de este desarrollo en el envasado activo se contempla la incorporación de agentes antimicrobianos, antioxidantes, enzimas, especias y/o sus derivados permitiendo mejorar y potencializar propiedades de inocuidad microbiológica, estabilidad, nutritivas y sensoriales [14].

El desarrollo del envasado activo ha tomado una gran importancia en cuanto a evolución tecnológica se refiere durante los 10 últimos años (2000 – 2012), donde, los estudios se han visto llamados a establecer avances en los mecanismos o métodos para incorporación de sustancias, evaluación de sus efectos en matrices alimentarias o simulantes y así mismo buscar alternativas frente al uso de materiales convencionales (polímeros sintéticos) por otros (biopolímeros) [15,16,29,31,32] que buscan aprovechar subproductos industriales y permitan establecer un marco referencial para futuras aplicaciones de trascendencia en la industria de alimentos.

Los envases activos han sido evaluados en sistemas de simulación de alimentos o en alimentos reales, esto ha permitido confirmar la migración de los componentes desde el envase y su efecto benéfico en alimentos mejorando su calidad [2830]. Así, el estudio de los desarrollos en envasado activo, ha permitido hoy en día orientar pruebas en este campo haciendo una evaluación directa sobre el alimento en las cuales se pone a prueba un sistema de envasado activo. La incorporación de diversas sustancias y su efecto sobre un alimento se ha reportado a través de estudios a escala mundial como por ejemplo: antioxidantes que pueden retardar reacciones de oxidación como el α -tocoferol en leche en polvo entera [31], ascorbil palmitato en maní [32]; y en este sentido se ha evaluado el efecto de antimicrobianos de extractos de aceites esenciales como mostaza, carvacrol, ajo y romero) [33,34], sobre gran variedad de microorganismos y enzimas (lactoferrina hidrolizada, lactoperoxidasa y lisozima) [35] y productos metabólicos de microorganismos (nicina y natamicina) [36] para disminuir y/o eliminar la microbiota en alimentos como quesos; también la utilización de ácidos orgánicos (ácido láctico y ácido málico) [37] y sales de ácidos orgánicos (ácido sórbico y sorbatos) [38] con el mismo fin; además de otros de los cuales se tienen como referencia el ácido p-aminobenzóico (PABA) sobre los cuales se han desarrollado estudios de migración desde matrices poliméricas [39].

La incorporación de antimicrobianos y antioxidantes se ha visto enmarcada a su utilización en varios tipos de materiales para el envasado de alimentos, tal es el caso de materiales sintéticos como polietileno (PE) [31], polipropileno (PP) [34], Polietilentereftalato (PET) [40], etilen vinil alcohol (EVOH) [31,32], entre otros; los cuales, son utilizados muchas veces como sistemas de envasado multicapa [31, 41]. La incorporación también se ha realizado con gran auge en otro tipo de materiales como por ejemplo derivados del lactosuero (subproducto de la industria quesera) que permite aprovechar las bondades de su alto contenido proteico. La aplicación de compuestos en estas películas desarrolladas a partir de matrices protéicas como proteínas aisladas del lactosuero (PAL) ó proteínas concentradas del lactosuero (PCL), las cuales han sido ampliamente estudiadas a escala mundial gracias a su facilidad para incorporar sustancias que, mediante efectos de migración hacia el alimento, brindan protección y extienden su vida útil. [28,42-44].

La incorporación de antimicrobianos, generalmente se realiza en forma directa sobre el alimento pero desde hace años, también se hace desde el envase (envase activo) [28], protegiendo el alimento de microorganismos, algunos alteradores como mohos y levaduras u otros patógenos como *L. monocytogenes*, *E. coli*. entre otros. Los antimicrobianos que se incorporen en los envases deben ser seguros para el consumidor, garantizando una estabilidad tanto en el envase como en los alimentos, por lo cual deben cumplir con estándares de regulación de acuerdo al país en el cual se vaya a elaborar. Por ello, deben ser reconocidos por legislaciones nacionales como seguros (*Generally Recognized as Safe - GRAS -*) [45]. Entre los principales antimicrobianos usados en sistemas de envasado activo se encuentran ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido málico, ácido sórbico, ácido p-aminobenzóico) [37,39], sales de ácidos orgánicos (sorbato de potasio, sorbato de sodio, benzoato de potasio, benzoato de sodio, propionatos) [46], antibióticos (nisina, natamicina) [47], aceites esenciales (aldehído cinámico, canela, limoncillo, mostaza) [48,49,55], extractos de plantas (carvacrol, eugenol) [50,53] y

polisacáridos (quitosano) entre otros [51]. Muchos de estos agentes antimicrobianos han sido estudiados en sistemas de envases hechos con materiales derivados del petróleo (polímeros sintéticos) y de origen natural (biopolímeros). De acuerdo a su utilización y a la manera de contener y transportar el antimicrobiano hacia el alimento, el envase sea cual sea su origen, presenta dos maneras de incorporación: la primera es la adición superficial al envase que inhibe directamente la microbiota y la segunda es la adición como componente primario del envase en donde su actividad se ve orientada a la liberación controlada desde el envase hacia el alimento. Varios son los estudios que muestran el uso de antimicrobianos en diferentes envases que contienen alimentos como derivados lácteos (quesos) [52,54] y derivados cárnicos (pastrami y embutidos) principalmente [57]. La evaluación de la efectividad se realiza por varios métodos, entre los cuales uno de los más usados es mediante ensayos de difusión en placa con agares específicos de acuerdo al microorganismo de interés [54]. En esta línea, varios estudios presentan sus investigaciones como el de Ouattara et al. quienes utilizaron ácido acético con película de quitosano en pastrami disminuyendo considerablemente la carga microbiana al aplicarse en el alimento [57]; A. Cagri, et al. quienes utilizando ácido p-aminobenzóico en película PAL y lograron comprobar la migración afectiva del ácido [39]; Hoffman et al. quienes usaron ácido láurico en película de zeína de maíz con resultados efectivos de inhibición bacteriana [58], entre otros.

Además de la inhibición de microorganismos a través del envasado activo, desarrollos prometedores como el reportado por L.M. Pérez et al. [56] permite conocer el gran potencial que tiene este tipo de envasado y las amplias oportunidades que ofrece para la conservación de los alimentos, en donde se comprobó la eficacia biocida del sorbato de potasio incorporado desde la película de proteína del lactosuero inhibiendo la producción de *Shigatoxina* al igual que el microorganismo patógeno *E. coli* [56]. En esta línea de uso de antimicrobianos

convencionales como el sorbato de potasio, M. Ozdemir et al. investigaron su comportamiento de difusión desde una película de proteína de lactosuero mediante solventes simulantes cuyo resultado demostró que es útil desde este sistema de envasado activo para proveer protección contra microorganismos indeseables que alteren el alimento [38].

Siguiendo con el uso películas PAL en alimentos como quesos, Pintado et al. trabajaron la adición de antimicrobianos (nisina, natamicina y ácido málico) logrando efectos inhibitorios eficaces contra microorganismos patógenos como *L. monocytogenes*, *Ps. Aeruginosa*, *Y. políptica*, *P. commune* y *P. Chrysogenum* [59]; P. Fajardo et al. y Martins et al. evaluaron el efecto antimicrobiano de la natamicina incorporada en película de quitosano contra mohos y levaduras con inhibición de microorganismos favoreciendo la extensión de su vida útil [60].

Estudios con otros materiales comprueban la efectividad de antimicrobianos como el realizado por Kristýna Hanušová et al. quienes usaron películas de polietileno (PE) / Cloruro de polivinilideno (PVdC) adicionados con nisina y natamicina, en el cual se envasó queso Blatacké comprobándose inhibición de microorganismos como *P. expansum*, *F. culmorum*, *L. helveticus* y *L. Ivanovii* [34].

Con otro tipo de alimentos como derivados cárnicos Kyriaki G. et al. evaluaron el efecto contra la microbiota en carne de res mediante la adición de aceite de orégano en película PAL, estableciendo su efectividad contra la inhibición de bacterias del género *Pseudomonaceae* [37].

En este orden de ideas, los estudios de los antimicrobianos han demostrado efectividad contra microorganismos alteradores y patógenos usando, entre ellos antibióticos (natamicina) en combinación con otros (ácidos málico y láctico) los cuales actúan bien contra microorganismos alteradores como hongos y bacterias patógenas para favorecer a extensión de vida útil en el alimento evaluado [62].

Otros estudios como el de Karbowiak, T. et al. estudiaron una difusión controlada de antimicrobianos mediante la encapsulación, favorecidos con medios hidrófobos con la adición de lípidos para optimizar la barrera al agua [61]. En cuanto a la liberación controlada de agentes antimicrobianos como la nisina, trabajos desarrollados como el de Guiga, W. et al. proponen sistemas hidrófobos multicapa con la incorporación de etilcelulosa, lo cual presenta un potencial en la liberación controlada de agentes antimicrobianos como éste [62]. Debeaufort et al. Al igual que Kristo, E. et al. describen la importancia y el efecto de combinar diferentes materiales como proteínas / polisacáridos y la introducción de lípidos para mejorar las propiedades fisicoquímicas del envase [63-66]; Prospero Di Pierro et al. estudiaron el uso de una película activa PAL combinada de quitosano aprovechando las cualidades antimicrobianas del quitosano contra un amplio espectro de microorganismos (mohos, levaduras, bacterias y virus), el cual fue evaluado en atmósfera modificada a 4 °C logrando la inhibición microorganismos mesófilos y psicrótrofos y extender la vida útil de queso Ricotta [51]. Otros compuestos importantes de los cuales se tienen referencias frente a la inhibición de microorganismos y la prevención de la oxidación son: orégano, extracto de romero, los cuales han sido usados en películas PAL con óptimos resultados para la conservación de alimentos [33,67] y también aceites esenciales como extractos de ajo, canela y mostaza estudiados por Per. V. Nielsen et al. quienes demostraron su eficacia antimicrobiana en la inhibición de *A. flavus* y *A. roqueforti* [49].

En cuanto a otros componentes que son importantes de acuerdo a su uso y protección, también se tienen complejos proteicos y enzimáticos estudiados por Seacheol Min et al. [68] como la lactoferrina, hidrolizados de lactoferrina y lactoperoxidasa que inhiben, desde películas PAL microbiota patógena como *P. commune* y que permitieron caracterizar también las propiedades mecánicas de la película [33]. Otra investigación llevada a cabo por Seacheol Min et al. trabajaron los mismos antimicrobianos en película PAL, comprobando su efectividad contra *E. coli O157:H7* y *S. entérica*, de acuerdo a ensayos de difusión en disco que lograron una inhibición importante de esta microbiota [68].

Faten Sadaka et al. hacen hincapié en que actualmente, el envasado activo con antimicrobianos, ha atraído la atención de la industria alimentaria gracias al incremento en la demanda de los consumidores para alimentos mínimamente procesados y aquellos libres de aditivos [69]. El uso de antimicrobianos es de gran importancia y puede proveer una alta seguridad en la calidad de los productos presentándose como una nueva aproximación para preservar la calidad de los alimentos y extender la vida útil y dentro de este, el envasado con antimicrobianos realmente brinda un beneficio para la industria de alimentos [44]. Generalmente los estudios también presentan consideraciones importantes de cómo son afectadas las propiedades mecánicas de los sistemas poliméricos permitiendo establecer su estabilidad en el tiempo.

Un componente importante, tanto en la elaboración como en el mantenimiento de las características de las películas elaboradas a partir de proteínas es la estabilidad de sus propiedades mecánicas que permiten evaluar la viabilidad de este tipo de películas para ser usadas en sistemas de envasado activo. Tales propiedades como la flexibilidad, fuerza, resistencia pueden verse favorecidas o por el contrario, afectadas con la adición de compuestos como antioxidantes,

antimicrobianos, aceites esenciales, enzimas, etc. Sustancias como glicerol y sorbitol son ampliamente adicionados para brindarle una mayor estabilidad a la matriz polimérica (principalmente de origen natural) proporcionando mejoras substanciales en la flexibilidad, fuerza y resistencia. Además pueden mejorar las propiedades de barrera al oxígeno y vapor de agua. Estudios como el realizado por Javier Osés et al. incluyó gomas de mesquita (GM) en películas PAL lo cual produjo que se afectaran considerablemente las propiedades mecánicas resultando en una mejora del porcentaje de elongación lo cual sugiere la incorporación de plastificantes de bajo peso molecular [70].

Algunas Investigaciones como las de Anastasia Fitria et al. estudian las variaciones en la microestructura de las películas de proteína del lactosuero/gelatina de conglomerados protéicos que resultan de aplicar diversas presiones a diferentes condiciones de temperatura evaluando sus propiedades mecánicas para diversos usos [71]; otros trabajos sobre propiedades mecánicas en películas del lactosuero como el de Murek M. et al. estudian el efecto en cuanto a la influencia del vapor de agua como propiedad barrera en relación a las propiedades y cambios que presenta la superficie de las películas obteniendo como principal resultado alteraciones en su superficie y sus propiedades estructurales mediante métodos novedosos como la laminación. Las propiedades mecánicas, sobre todo cuando se habla de materiales naturales como los derivados proteicos (PAL, PCL) tienen un mayor grado de variación en cuanto a su estabilidad estructural en contraposición con sus similares sintéticos debido a su inestabilidad intrínseca del material crudo [72].

Cuando estos sistemas son expuestos durante un tiempo de almacenamiento a diferentes condiciones ambientales es posible observar diferentes cambios en su estructura fisicoquímica. Los cambios fisicoquímicos que se pueden establecer

aquí son la oxidación y degradación de las cadenas poliméricas lo cual fue reportado por Javier Osés et al. quienes establecieron cambios físicos notables como la recristalización del polímero (retrogradación del almidón en película de almidón) y esto debido principalmente a la migración de componentes de alto peso molecular como los plastificantes usados en la formulación. La migración de aditivos puede ser considerada como la principal causa de la inestabilidad de propiedades mecánicas del envase activo [73].

Los plastificantes incrementan la flexibilidad de la película y la manejabilidad. Muchas de las teorías en cuanto a las propiedades mecánicas se apoyan en el efecto que estas sustancias (plastificantes) tienen en la interacción de puentes de hidrógeno y en las interacciones inter e intramoleculares de fuerzas de atracción por las moléculas plastificantes. Como una consecuencia de esto se puede evidenciar el incremento de volumen de la estructura y la disminución en la temperatura de transición vítrea, los cuales afectan significativamente sus propiedades mecánicas. Los estudios realizados en este tipo de sistemas de envasado activo contemplan un renglón importante en la evaluación de las propiedades mecánicas sobre todo cuando estos sistemas de envasado son de matrices poliméricas naturales que tienen incorporados antimicrobianos, antioxidantes y plastificantes. Un estudio realizado se basó en la estabilidad de las propiedades mecánicas de películas PAL durante 50 días y a condiciones de humedades relativas diferentes (50 % y 75 %) con dos plastificantes diferentes (sorbitol y glicerol), en el cual se pudo constatar que la adición de un plastificante (sorbitol) el cual afectó significativamente la superficie de las películas y por efecto de recristalización provocó que las películas fueran más rígidas y menos flexibles, lo que no ocurrió con la adición de glicerol que mantuvo una mayor estabilidad en la matriz polimérica [74].

Theeranun Janjarasskul y Daniel J. Rauch estudiaron las propiedades mecánicas y propiedades de barrera en películas de proteínas del lactosuero partiendo de la influencia del glicerol mediante procesos de extrucción y compresión que mejoraron las propiedades de barrera influenciados por los cambios en la morfología de las películas [54].

En este aspecto también se tiene como referencia un estudio llevado a cabo por Kyriaki et al. En el cual evaluaron las propiedades mecánicas cuando se incorporaron antimicrobianos (aceite esencial de orégano) usando sorbitol como plastificante. Los resultados obtenidos mostraron que la permeabilidad al vapor de agua no se afectó con las concentraciones del antimicrobiano utilizado pero la temperatura de transición vítrea si se afectó por adición de este agente mientras que hubo un aumento significativo en la fuerza de tensión y elongación de la película [37]. En esta misma línea un estudio realizado por Granda D. et al. caracterizaron las propiedades mecánicas de una película activa a la cual se le incorporó alfa-tocoferol en diferentes concentraciones (1 % y 2 %) resultando en una disminución de la tensión (TS) para películas con ambas concentraciones y un incremento en el porcentaje de elongación (%E) para la película con 1% de alfa-tocoferol [75].

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. CACTERIZACION DE LA AREPA DE MAÍZ BLANCO

Muestra

La arepa de maíz blanco usada para la caracterización fisicoquímica, microbiológica y sensorial se elaboró con materia prima obtenida en la Central Mayorista de Antioquia (CMA), la cual produce y comercializa este producto en la ciudad de Medellín. Se utilizó producto del mismo lote y del mismo día de producción. Un total de 15 unidades con un peso promedio de 50 g cada una con temperatura promedio de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para el análisis fisicoquímico y microbiológico la muestra fue homogenizada manualmente en bolsas plásticas selladas, proporcionando una disminución de tamaño de partícula. Para el análisis sensorial las unidades de arepas fueron calentadas a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ y divididas en varias piezas de menor tamaño para realizar la evaluación con un panel de 3 jueces entrenados. Para el análisis de vida útil se evaluaron 6 paquetes de arepas con análisis diarios fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales.

Equipos

Estufa de secado BINDER.

Unidad extractora de Solventes VELP SCIENTIFICA SER 06.

Unidad de destilación de nitrógeno VELP SCIENTIFICA UDK-142.

Balanza analítica OHAUS.

Homogenizador Kalley.

Medidor de pH THERMO ORION.

Pipetas MERCK.

Micropipetas MERCK.
Cuenta colonias SCHBAUM.
Cabina de Flujo Laminar C4.
Microscopio BRAND.
Campana de Durham.
Vortex VELP SCIENTIFICA.

Materiales

Éter de petróleo MERCK
Catalizador nitrógeno MERCK.
Ácido sulfúrico concentrado p.a. MERCK .
Hidróxido de sodio MERCK.
Ácido clorhídrico MERCK.
Agar Mossel estéril MERCK.
Emulsión de yema de huevo.
Reactivos para coloración de Gram.
API 50CH.
Tubos estériles.
Reactivo de Kovacs.
Agar DRBC.

Métodos

4.1.1. Análisis fisicoquímicos.

Humedad. Deseccación en estufa (AOAC 925.10.1995 – GTC 1 1.14.2).
Grasa total. Extracción con solventes (GTC 1. 6.1 Extracto etéreo).
Cenizas Totales. Incineración directa (AOAC 923.03 – GTC 1 3.4.1)
Proteína total. Micro Kjeldahl (AOAC 954.01).
pH. Potenciométrico (AOAC Official Method 973.41).
Carbohidratos totales y calorías totales por cálculo algebraico a partir de componentes.

4.1.2. Análisis microbiológicos.

Mohos y Levaduras. Inclusión en placa ISO 21521-121521-2.

Coliformes totales y fecales. FDA-BAM/ NMP (Enumeration of E. coli and coliform bacteria) tubos múltiples, Inclusión en placa profunda.

Bacillus cereus AOAC's Official Methods Analysis chapter 14: Bacillus cereus., Agotamiento en superficie, identificación.

4.1.3. Análisis sensorial.

NTC 3932 Análisis sensorial. Identificación y selección de descriptores para establecer un perfil sensorial por una aproximación multidimensional. 1996-08-21. Homologada a norma ISO 11035:1994. Sensory Analysis. Identification and selections of descriptors for stablishing a sensory profile by an Multidimensional approaching. Se evaluaron atributos de textura, color, olor, sabor y apariencia. Se determinaron los parámetros en una escala de 0 (mínima) a 5 (máxima) para cada atributo. Se realizó con un panel sensorial de 3 jueces entrenados del laboratorio de análisis sensorial de la universidad de Antioquia con un tiempo de entrenamiento entre 7 y 14 años. El estudio se realizó durante tres días, tiempo en el cual se detuvo el estudio por alteración microbiológica.

4.2. FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PELÍCULA PCL CON UN AGENTE ANTIMICROBIANO.

Equipos

Máquina de Prueba Universal DIGIMESS®

Capacidad: 500 KgF.

Velocidad programable: 50 mm/min.

Celda de carga: 1 Ajustable a carga automática

Rango de menor división: 0.5 KgF.

Alimentación: 220 Vac 50/60Hz.

Materiales

Proteína Concentrada de Lactosuero (80 %). TECNAS.

Glicerol JT BAKER.

Agua destilada.

Natamicina DSM Food Specialities B.V. (E235).

Cajas de petri MERCK (100 mm x 15 mm).

Método

4.2.1. Elaboración de la película PCL con y sin agente antimicrobiano.

Para la elaboración de las películas se empleó proteína concentrada de lactosuero en una proporción de 10 % la cual fue disuelta en agua destilada a temperatura de 25 °C y con agitación constante. La mezcla se llevó a baño María con una temperatura de 80 °C por 15 min. La solución obtenida fue expuesta a un choque térmico con hielo por 15 min. con agitación. Inmediatamente, se adicionó 7 % de glicerol como plastificante, se mantuvo la agitación y seguidamente se adicionó natamicina a una concentración de 1 %, posteriormente se agregaron 10 ml. de la solución en cajas de petri y se introdujeron a una estufa de secado a 30 °C por 24 horas para ser luego retiradas de la caja de petri. Esta metodología fue empleada por otros autores [56]. Ver composición (Tabla 1).

Tabla 1. Composición de películas PCL con y sin adición de natamicina.

Componente	Sin natamicina	Con natamicina
Proteína	10 %	10 %
Agua	83 %	82 %
Glicerol	7 %	7 %
Natamicina	0 %	1 %

4.2.2. Caracterización de las propiedades mecánicas de la película PCL con y sin agente antimicrobiano.

De acuerdo con los lineamientos de la norma ASTM D882-01[76]. para medición de las propiedades de tensión para plásticos delgados. La solución formadora de la película fue vertida en una placa de teflón (Figura 3. a.) se ubicaron las probetas (películas PCL) en las mordazas de la máquina universal con una longitud de película de 100 x 25 mm y un espesor menor de 1,0 mm (Figura 3. b. c.) programada con una velocidad de 50 mm/min y utilizando una celda de carga C1 autoajustable por la máquina. Las propiedades de tensión, elongación y módulo de Young fueron medidas a las películas PCL con y sin adición de agente antimicrobiano.

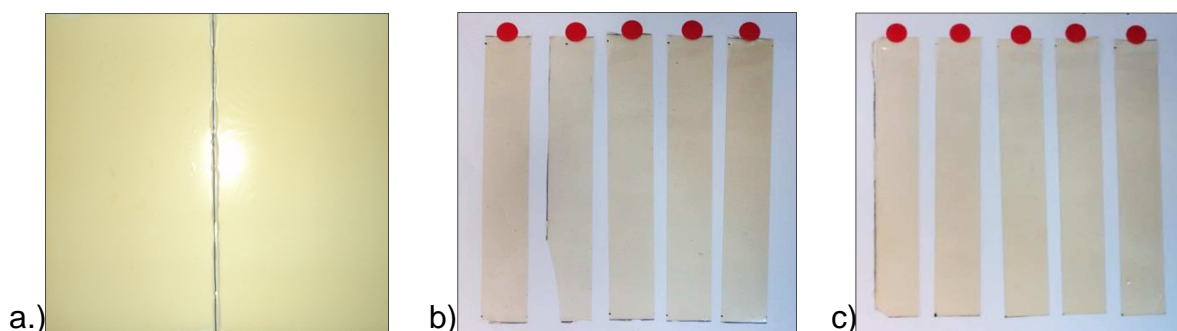


Figura 3. a) Placa de preparación de las láminas de películas del lactosuero con y sin adición de natamicina. b) Probetas de películas PCL sin adición de natamicina. c) Probetas de películas PCL sin adición de natamicina.

4.2.3. Selección de agentes antimicrobianos aplicables a la película PCL.

La selección del agente antimicrobiano para el presente estudio parte desde la necesidad de incorporar un agente antimicrobiano que retrase el crecimiento de microorganismos tipo moho para extender la vida útil del producto. Entre los antimicrobianos adicionados a la arepa comúnmente se encuentran los elaborados químicamente como sorbatos, benzoatos y propionatos (sales de potasio) principalmente, los cuales, a concentraciones no controladas en su adición (y que ocurre a nivel de industria poco tecnificada como la que se encuentra en Medellín) generan cambios del sabor, generalmente indeseables en el producto, al igual que

cambios indeseables en su textura como un oscurecimiento amarilloso de la arepa. Como una alternativa, se realizó una búsqueda bibliográfica y como criterios para la selección se consideraron parámetros como:

1. Ser seguro para el consumidor. 2. No crear resistencia. 3. Demostrar inhibición en el crecimiento de microorganismos. 4. Enmarcarse como tendencia mundial para su aplicación en productos. Una vez finalizada la búsqueda bibliográfica se identificó que el antimicrobiano natamicina se ajustaba muy bien a cada uno de estos criterios.

4.2.4. Incorporación del agente antimicrobiano a la película PCL.

La adición del agente antimicrobiano (natamicina) se realizó en forma directa a la formulación luego de la adición del plastificante empleado (glicerol). La cantidad empleada fue de 1 %, cantidad que presentó una óptima solubilidad en la solución con la cual se prepara la película. La manera de adición está además referenciada en estudios de investigación como los descritos por Perez Gago et al. 2002 [77], los cuales aparecen en diferentes estudios donde se elaboran películas con natamicina y otros agentes antimicrobianos.

4.3. ESTUDIO DE MIGRACION EN LA PELICULA PCL Y EN AREPA DE MAÍZ BLANCO.

Equipos

Estufa de secado BINDER con rango de temperatura 24 °C – 250 °C

Balanza analítica OHAUS 0.0001 g – 200,0000 g

Espectrofotómetro GENESYS 6 THERMO

Pipetas volumétricas 1,0; 5,0; 10,0; 25,0 ml.

Micropipetas 100 microlitros TRANSFERPIPETE BRAND

Balones volumétricos 10, 100, 50, 1000 ml. BRAND

Materiales

Películas PCL

Arepa de maíz blanco

Natamicina DELVOSID

Etanol 95 %

Agua destilada

Método

4.3.1. Estudio de migración en películas PCL.

Se usaron las películas PCL con dimensiones de 100 x 15 mm con antimicrobiano (natamicina) y sin antimicrobiano a las cuales se les hizo seguimiento por un período de tiempo establecido (9 días). Se midió la cantidad de natamicina remanente en la película PCL mediante técnica espectrofotométrica estableciendo con una longitud de onda para la natamicina de 317 nm. Se realizó una inmersión en solución hidroalcohólica de las películas PCL y se midió el contenido de natamicina por método espectrofotométrico referenciado por Oliveira et al. 2007 [78]. Se midió el contenido de natamicina durante un período de tiempo de 9 días para evaluar la liberación gradual de la natamicina desde la película PCL.

4.3.2. Estudio de migración en arepas de maíz blanco.

Se usaron arepas de maíz blanco asadas (con y sin exposición de natamicina, las cuales tuvieron una medida de 100 x 15 mm (medida de la película PCL) a las cuales, luego de un previa homogenización se les cuantificó en un período de tiempo la cantidad de natamicina remanente la por técnica espectrofotométrica estableciendo una medición a una longitud de onda para la natamicina de 317 nm. Tras una posterior homogenización, se realizó una inmersión en solución acuosa de las arepas y se midió por método espectrofotométrico referenciado por Oliveira et al. 2007 [78]. Se midió el contenido de natamicina durante un período de

tiempo de 9 días para evaluar el aumento progresivo de la concentración de la natamicina en arepa de maíz blanco. (Figura 4.)

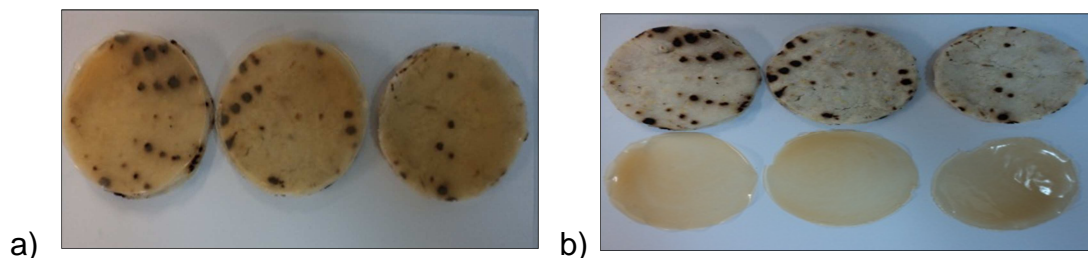


Figura 4. a) Arepas con exposición a la película PCL con natamicina (Día 1). b) Arepas a las cuales se les ha retirado la película PCL con natamicina (Día 1).

4.4 ESTUDIO DE VIDA ÚTIL EN LA AREPA DE MAÍZ BLANCO.

Se realizó teniendo en cuenta el análisis en el tiempo donde se evaluaron factores fisicoquímicos, microbiológicos y atributos sensoriales de la arepa de maíz blanco según lineamientos de norma ASTM E 2454-05 [79] aplicando la fórmula para valoración del factor Q_{10} [80,81] en tiempo real durante 6 días, la cual consistió en realizar la medición de las variables en condiciones de temperatura promedio en el laboratorio de $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura de distribución en el mercado de $25,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa promedio de $48\% \pm 2\%$.

4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos fueron procesados en el programa StatGraphics Centurion XVI 8 para Windows[®] Versión 16.1.1. Se realiza análisis de varianza de una sola vía en tabla ANOVA para comparar diferencias de medias entre grupos y comprueba si existen diferencias significativas entre las medias.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

CARACTERIZACIÓN DE LA AREPA DE MAÍZ BLANCO.

Tabla 2. Caracterización fisicoquímica de la arepa de maíz blanco.

PARAMETRO ANALIZADO	VALOR OBTENIDO (%)	VALOR DE REFERENCIA (%)
Humedad	60,33	64,10
Cenizas	0,11	0,10
Extracto etéreo	0,11	0,30
Proteína	2,40	3,40
Carbohidratos	37,05	32,10
calorías	158,75	145,0
pH	6,02	-
a_w	$\geq 0,70$	-

Valores de referencia según FAO-CODEX stand. Código A027. Arepa blanca de maíz plana y delgada. Colombia. [82].

En los resultados obtenidos a partir de la caracterización fisicoquímica de la arepa de maíz blanco (Tabla 2.) la humedad obtenida con un promedio de 60,33 % permite establecer la gran disponibilidad de agua que puede proveer deterioro físico y sobre todo microbiológico al servir de vía para el crecimiento de microorganismos en el producto, lo cual disminuye la vida útil de la arepa. En cuanto al contenido protéico obtenido con un promedio de 2,40 %, se establece una fuente óptima de proteína que puede ser aprovechada por microorganismos proteolíticos como el *B. cereus* y que también puede deteriorar el producto disminuyendo su vida útil. El resultado de extracto etéreo en promedio con un 0,11% permite descartar el deterioro debido a reacciones de oxidación por ácidos grasos favoreciendo el desarrollo de microbiota como hongos y bacterias, principalmente del tipo coliforme y *B. cereus*. Es un resultado esperado en este punto además porque el contenido de extracto etéreo de la materia prima como el maíz no supera el 0,5%. En cuanto al valor de pH que en promedio fue 6,02 está dentro de la región amplia en la cual múltiples microorganismos crecen, entre ellos los microorganismos de interés en este estudio como hongos.

En cuanto al valor de actividad acuosa [a_w] consultada para este estudio ($\geq 0,70$) [83] y su asociación con el porcentaje de humedad hallado en la arepa (60,33 %) se confirmaron como condiciones óptimas para el desarrollo de microbiota como hongos en la arepa de maíz blanco.

Tabla 3. Caracterización microbiológica de la arepa de maíz blanco.

PARÁMETRO ANALIZADO	VALOR OBTENIDO (UFC/g)	VALOR DE REFERENCIA (UFC/g)
Coliformes	740	-
Escherichia coli	<10	Ausente
Bacillus cereus	4.100	Máx. 1.000
Mohos	6.000	Máx. 1.000
Levaduras	92.000	Máx. 1.000

Valores tomados de la Norma Técnica Colombiana NTC 5372 (Primera actualización). AREPAS DE MAÍZ REFRIGERADAS. 2007-07-25 [84].

En los resultados obtenidos a partir de la caracterización microbiológica de la arepa de maíz blanco (Tabla 3.), se resalta el crecimiento por fuera de los límites permisibles de microbiota característica en este alimento como mohos (6000 UFC/g) y levaduras (92000 UFC/g), siendo los primeros, potenciales productores de micotoxinas en la arepa. El crecimiento de *Bacillus cereus* (4100 UFC/g), microorganismo patógeno presente en productos derivados de cereales, tiene 4 veces más de la cantidad máxima permitida por la norma NTC 5372 [84]. relacionándose directamente con la cantidad de humedad y sobre todo con el contenido protéico disponible en la arepa, el cual es uno de sus principales nutrientes (microorganismo proteolítico).

En cuanto al recuento de coliformes totales (740 UFC/g), también se observa un incremento en la cantidad de microorganismos viables para producir un deterioro de las condiciones de estabilidad del producto ya que de acuerdo a este

resultados se infiere directamente una mala manipulación en las etapas de producción de la arepa. No hay presencia de microorganismos de origen fecal, *E. coli* (<10 UFC/g).

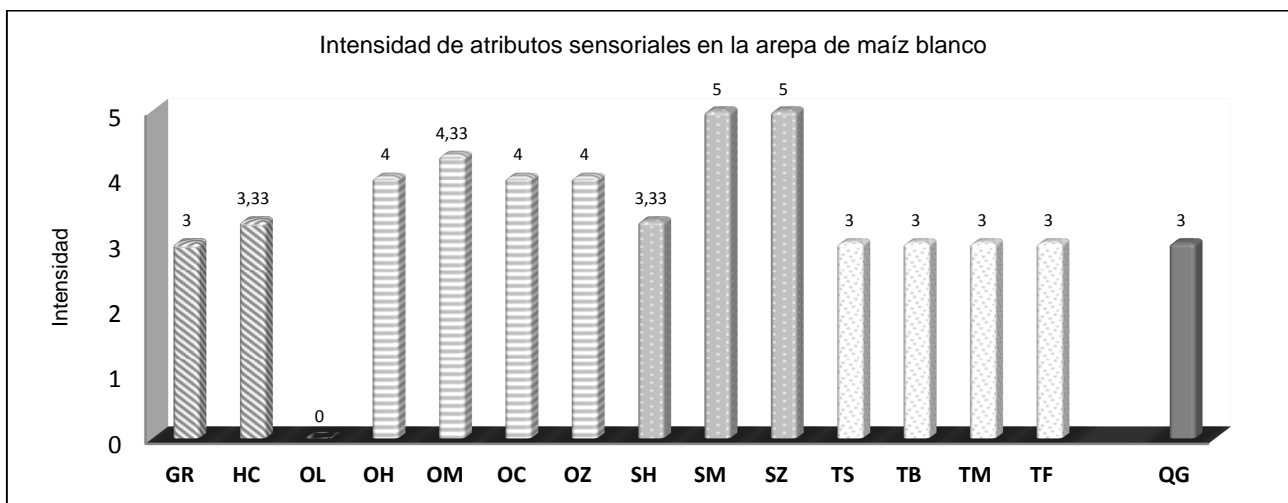


Figura 5. Medición de la Intensidad de atributos sensoriales en la arepa de maíz blanco según NTC 3932 1996-08-21

Convenciones: **GR**:grosor; **HC**:homogeneidad del color; **OL**:color; **OH**:olor horneado; **OM**:olor a maíz; **OC**:olor a cereal; **OZ**:olor maíz cocido; **SH**:sabor horneado; **SM**: sabor maíz; **SZ**: sabor maíz cocido; **TS**: textura seca; **TB**: textura blanda; **TM**: textura masticable; **TF**: textura fibrosa. **QG**: Calidad General.

En la caracterización sensorial realizada a la arepa de maíz blanco (Figura 5) se evaluaron todos los atributos posibles para lograr establecer en cada uno de ellos una calificación de calidad sensorial general. Esta caracterización es fundamental a la hora de establecer estudios de vida útil y para pruebas de aceptación. La evaluación pudo establecer una alta puntuación (entre 4,0 y 5,0) para los atributos de más interés para este estudio (OH, OM, OC, OZ, SM, SZ). Con la asociación de todos los atributos evaluados se definió una calidad general (QG) de la arepa de maíz blanco de 3,0, calificación definida como media y que denota la aceptación del consumidor final.

Nota: calidad baja: 0,0 – 2,9; calidad media: 3,0 – 3,9; calidad alta: 4,0 - 5,0.

De acuerdo a la caracterización fisicoquímica, microbiológica y sensorial realizada y tomando como base los parámetros críticos de humedad, pH, mohos y levaduras

se estableció un tiempo de vida útil aplicando la fórmula para valoración del factor Q_{10} [90] en tiempo real de 1,46 días a condiciones de temperatura ideal de almacenamiento promedio ($21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) y temperatura promedio de almacenamiento en expendio ($25,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) a una humedad relativa promedio de $48\% \pm 2\%$. Es de anotar que la arepa de maíz blanco no tiene adición de antimicrobianos.

FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PELÍCULA PCL.

Para todas las películas PCL elaboradas en el estudio con y sin adición de natamicina se obtuvieron soluciones estables viscosas y fluídas de coloración cremosa y sin presencia de burbujas. Después del proceso de secado, todas las películas presentaron características muy similares entre ellas una adecuada apariencia física, aspecto brillante, maleables y dúctiles, coloración ligeramente parda y sin burbujas (Figura 6. a. b.)

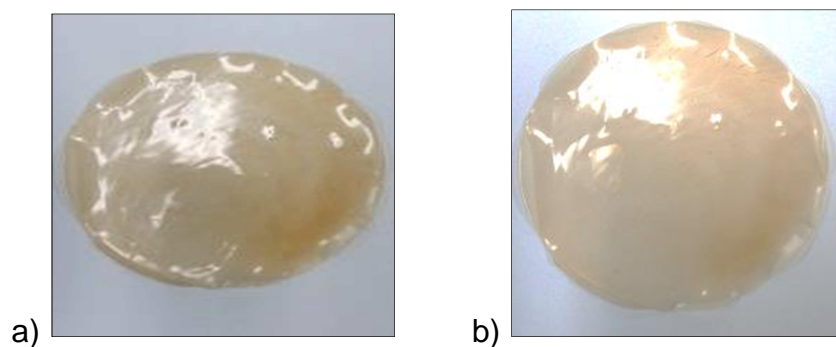


Figura 6. a) Película PCL sin adición de natamicina. b) Película PCL con adición de natamicina.

Caracterización de las propiedades mecánicas de la película PCL con y sin natamicina.

Según los resultados obtenidos en cuanto a las propiedades mecánicas de las películas PCL en este estudio con y sin adición de natamicina, estas presentaron cambios debido a la adición de la natamicina siendo esto concordante con

Bastarrachea et al. [85]. quienes afirman que los cambios en las propiedades mecánicas y en atributos de las películas PCL después de la incorporación de agentes antimicrobianos son esperados.

Tabla 4. Caracterización mecánica de películas PCL con y sin adición de natamicina.

Película	Espesor (mm)	Ancho (mm)	Área transversal (mm ²)	Tensión nominal (N/mm ²)	Elongación total (%)	Módulo de young (N/mm ²)
Sin natamicina (0 %)	0,361±0,118	24,378±0,287	8,807±2,921	0,785±0,134	98,656±18,019	9,149±3,647
Con natamicina (1 %)	0,254±0,041	24,080±0,142	6,121±1,018	0,920±0,059	60,164±7,498	13,303±1,481

Los resultados obtenidos en este estudio en cuanto a tensión para película PCL con adición de natamicina (0,920 N/mm²) y sin adición de natamicina (0,785 N/mm²) (Tabla 4) se encuentran entre el rango de valores esperados según lo reporta Krochta-Cuq 2002. [86], quienes establecen que para este tipo de películas, los valores se encuentran en un rango entre 0,5 – 17 N/mm².

La incorporación de la natamicina en la película PCL produjo una disminución en el volumen libre de la película causando una disminución en la movilidad de las cadenas de proteína aumentando la rigidez de la película PCL en comparación con la película PCL sin adición de la natamicina. Estos efectos también son reportados por Hart et al. 2003 [87].

Los resultados obtenidos en este estudio en cuanto al porcentaje de elongación (%E) para película PCL con adición de natamicina (60,16 %) y sin adición de natamicina (98,60 %) se encuentran entre el rango de valores esperados según lo reporta Krochta-Cuq 2002 [86]., quienes establecen que para este tipo de películas, los valores se encuentran en un rango entre 1,0 – 260 %.

La adición de natamicina redujo porcentaje de elongación y aunque se podría decir que hay efecto desfavorable en la película PCL con natamicina (porque su deformación disminuye) comparado con la literatura tenemos en este estudio un factor favorable ya que autores como Ramos et al. 2013 [88] reportan valores mínimos en este tipo de películas de 48 % frente al 60 % obtenido.

Otros estudios como los reportados por Krause et al. [89] relacionan un efecto cuando se incorpora natamicina en película de proteína en la fuerza tensil causando una disminución de la tensión y sin diferencias significativas en el porcentaje de elongación. Estos efectos fueron atribuidos al uso de pectina incorporado como plastificante frente al glicerol que se usó en el estudio.

Las propiedades mecánicas para películas de proteína del lactosuero reportadas en la literatura son más bajas (% E 48 % $MY 8 \times 10^{-2} \text{ N/mm}^2$) Ramos et al. 2013 [88]. comparada con los obtenidos en este estudio (% E 60 % $MY 13 \text{ N/mm}^2$).

El Módulo de Young es una relación entre el esfuerzo y la deformación y es inversamente proporcional al %E mientras más alto es el modulo más rígido y menos elástico es el material. Estos resultados se relacionan con la fuerza tensil y el porcentaje de elongación obtenidos en este estudio siendo la película PCL con natamicina más rígida (0,92) con el módulo de Young más alto (13) respectivamente.

Según Mia kurek et al. 2014 [72] la comparación de los datos para películas de matrices similares es muy difícil debido a las diferencias en la preparación de las

películas, la composición de los compuestos usados para estudios en condiciones diferentes, el método de solubilización empleado y los contenidos de plastificantes.

Los resultados de las propiedades mecánicas mostrados para la película PCL con natamicina son óptimos para el uso que se pretende dar desde este estudio al ser incorporada entre unidades de arepa.

Selección de agentes antimicrobianos aplicables a la película PCL.

La Natamicina es una sustancia fungicida, que previene la aparición de levaduras y mohos en los alimentos. Usada en pequeñas cantidades la natamicina es muy eficaz debido a que trabaja en menores cantidades que el sorbato de potasio y a diferencia de otros sorbatos impide la migración de las levaduras y los mohos hacia el interior del producto, eliminando el coste de la reaplicación.

La actividad de la natamicina no destruye otros gérmenes, por lo tanto no perturba el proceso de maduración natural de los alimentos. La natamicina es segura y efectiva de modo que protege los quesos y embutidos del deterioro que los mohos, levaduras y otros hongos puedan causarles. La natamicina contiene 50% de lactosa y 50% de natamicina, que previene la formación de mohos y levaduras en la superficie. A diferencia de otros agentes antimicrobianos, la natamicina no afecta en la apariencia, gusto ni color de los productos. Se ha demostrado que la natamicina se mantiene segura y efectiva hasta el punto de alargar la vida de una amplia variedad de productos alimenticios en más de treinta años. La aplicación de la Natamicina está aprobada en muchos países para su utilización en quesos, y productos cárnicos curados. La organización mundial de la salud y la oficina para la alimentación y agricultura de la organización de las naciones unidas, en su comité experto en aditivos alimenticios determinó para las personas un consumo de 0,3 mg por día y Kg de peso. Dicho nivel es considerablemente más alto que la

cantidad utilizada en los quesos y embutidos. Actualmente se utiliza en superficies de quesos curados o madurados [45].

La natamicina tiene forma cristalina y su fórmula empírica es $C_{33}H_{47}NO_{13}$. Su efectividad microbiológica se ha comprobado en diversos laboratorios y ensayos que han demostrado la efectividad de la natamicina contra mohos, levaduras y otros hongos. La natamicina no actúa contra bacterias, virus u otros organismos tales como los protozoos. La cantidad así como el método de utilización de la natamicina varía en función del tipo de alimento a proteger así como el nivel microbiano inicial. La aplicación de la natamicina es exitosa usada en tratamiento externo de quesos y productos cárnicos curados [60]. La natamicina se puede aplicar en la superficie de los quesos o embutidos mediante la inmersión del producto en solución acuosa de natamicina o bien la aspersion de la solución acuosa alrededor del producto. La concentración más frecuente de natamicina varía entre 1.000 y 2.000 ppm, aunque algunas aplicaciones requieran concentraciones más o menos bajas. Las soluciones de natamicina se mantienen estables e inalterables a temperaturas ambientes y en períodos de exposiciones breves a una temperatura que sobrepase los 100 °C. No obstante se verá afectada (debido a la hidrólisis) de su estructura circular) en exposiciones a temperaturas superiores a los 50 °C durante largos periodos o periodos superiores a las 24 horas. Las soluciones de natamicina se pueden pasteurizar pero eso significa una pérdida de la actividad. La función del producto puede verse perturbada por la exposición prolongada a la luz ultravioleta. Se debe evitar que la natamicina entre en contacto directo con agentes oxidantes, especialmente con aquellos que contengan peróxidos, cloro o sulfidrilos, ya que la oxidación química reducirá la efectividad del producto. Actúa óptimamente cuando el pH está entre 5 y 7. Entre pH 3 y 5, la acción disminuye de 8 a 10 %. Por debajo de pH 4 y encima de pH 9, la efectividad del fungicida puede disminuir tanto como un 30 %. La natamicina cumple con las especificaciones del FDA y del JEFCA en lo que se

refiere al uso en quesos y sistemas de carne fermentada. Los microorganismos contra los cuales es efectiva son: *Brettanomyces*, *Candidas*, *Kloeckera*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, entre otras y hongos del género *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Gleosporium*, *Mucor*, *Penicillium* y *Rhyzhopus* [90]

El mecanismo de acción de los antimicóticos, entre los cuales se encuentra la natamicina, inhibe el crecimiento de hongos, depende del lugar en el que actúen, lo cual está relacionado con la estructura química del antimicótico. La acción de la natamicina sobre la membrana celular del hongo se centra en su membrana celular desempeñando una importante función en la división celular y en el metabolismo. Las complejas partículas lipídicas llamadas esterolatos, son aproximadamente el 25 % de la membrana celular. Sin embargo, el contenido de esterol de la célula fúngica y mamífera es diferente. En las células fúngicas el primario es el ergosterol. La diferencia del contenido de esteroles ha sido explotada como blanco de acción en los medicamentos antimicóticos. Dentro de ellos se tiene a los polienos donde se encuentra la natamicina. La natamicina que se encuentran en este grupo, se une al ergosterol presente en la membrana celular fúngica, donde se forman poros que alteran la permeabilidad de la membrana lo que permite una pérdida de proteínas, glúcidos y cationes monovalentes y divalentes, causas de la muerte celular [91].

EVALUACIÓN DE LA MIGRACIÓN EN LA PELÍCULA PCL Y EN LA AREPA DE MAÍZ BLANCO.

Tabla 5. Concentración de natamicina en la película PCL por día.

Unidades/Día	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9
mg/Kg	719,66	722,69	666,30	603,76	569,27	557,39	537,76	542,88	539,08
D.E.	2,00	3,00	2,59	4,61	6,99	2,25	1,71	0,73	2,09

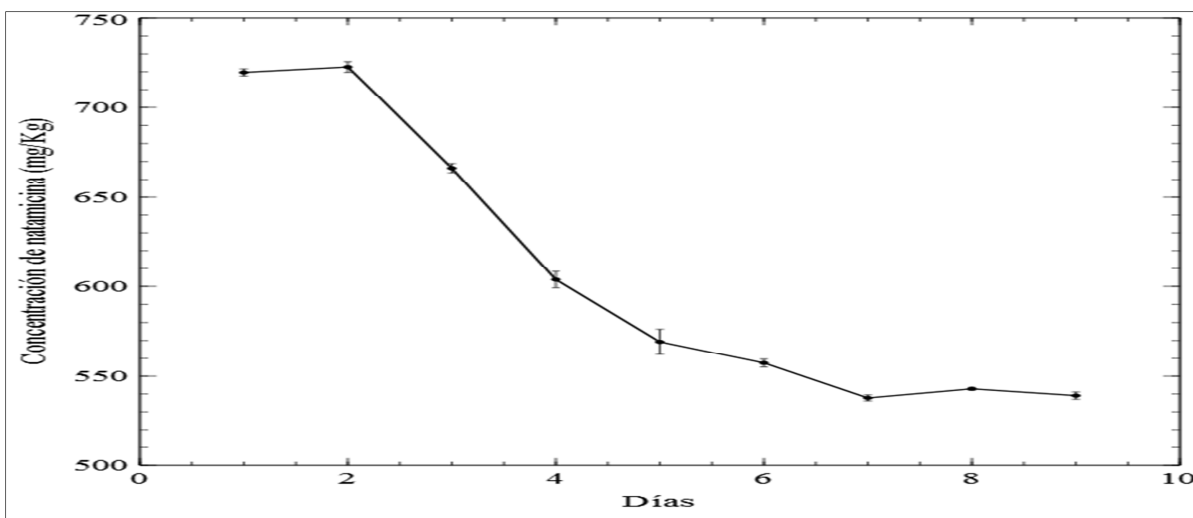


Figura 7. Concentración de natamicina en la película PCL por día.

Según los resultados obtenidos, se evidenció una liberación gradual del agente migrante (natamicina) desde la película PCL (Figura 7), evidenciando la disminución progresiva de la concentración de natamicina durante los 9 días de evaluación (Figura 4) a unas condiciones de temperatura y humedad relativa promedio de $25,5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y $48 \% \pm 2 \%$ respectivamente. La liberación gradual de la natamicina desde la película PCL se logró evidenciar a partir del día 2 y así mismo transcurridos los siguientes 5 días donde una cantidad máxima de 184,93 mg/Kg de natamicina fué liberada en el día 7.

La liberación de la natamicina desde la película en el día 7 no evidenció una liberación marcada hasta el día 9 en comparación con los días anteriores (2 – 5). Se puede observar en general un equilibrio del sistema de envasado activo donde no se libera una gran cantidad de natamicina a partir del séptimo día el cual a pesar de mostrar un leve aumento, este puede ser atribuido posiblemente a la distribución no uniforme de la natamicina en la película PCL evaluada y por manipulación de la película en el desmolde frente a las otras películas pero se puede inferir que la tendencia de la liberación baja de la natamicina desde el día 7

hasta el día 9 es constante. Esta liberación gradual hace pensar en que se presenta una buena afinidad entre la película y la natamicina además de ser favorecida por el espesor de la película y el área de contacto con el producto. En concordancia con los resultados obtenidos en este estudio, investigadores como P. Fajardo et al. obtuvieron un efecto similar de la natamicina al comprobarse una liberación de este antimicrobiano desde una sistemas de envasado película de quitosano [60].

La liberación gradual de la natamicina desde el envase activo posiblemente esté relacionado con una buena compatibilidad entre la natamicina y la estructura polimérica de la película PCL, ya que la influencia de la natamicina en cuanto a la compatibilidad química de la estructura polimérica es clave debido a que por su gran tamaño influencia el incremento del volumen libre en la estructura polimérica y por tanto permite una liberación lenta y gradual, siendo esto concordante con lo señalado por Gavara-Catalá, 2000 [18]. No obstante, una alternativa para comprobar dicha compatibilidad entre la natamicina y la red polimérica de la película PCL sería la de realizar un análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC).

De acuerdo al tratamiento estadístico de los datos, en la tabla ANOVA (Tabla 6) teniendo como variable respuesta la concentración de natamicina en película PCL y como factor el día, se establece que hay diferencias significativas en la concentración de natamicina por día, ya que el valor P (P-Value) es menor a 0,05 a un nivel de significancia del 95 % por día en la película.

Analizando la prueba de rangos múltiples (Tabla 7) se tiene que entre los días 7,8 y 9; y 1 y 2 no hay diferencias significativas en la concentración de natamicina en la película PCL.

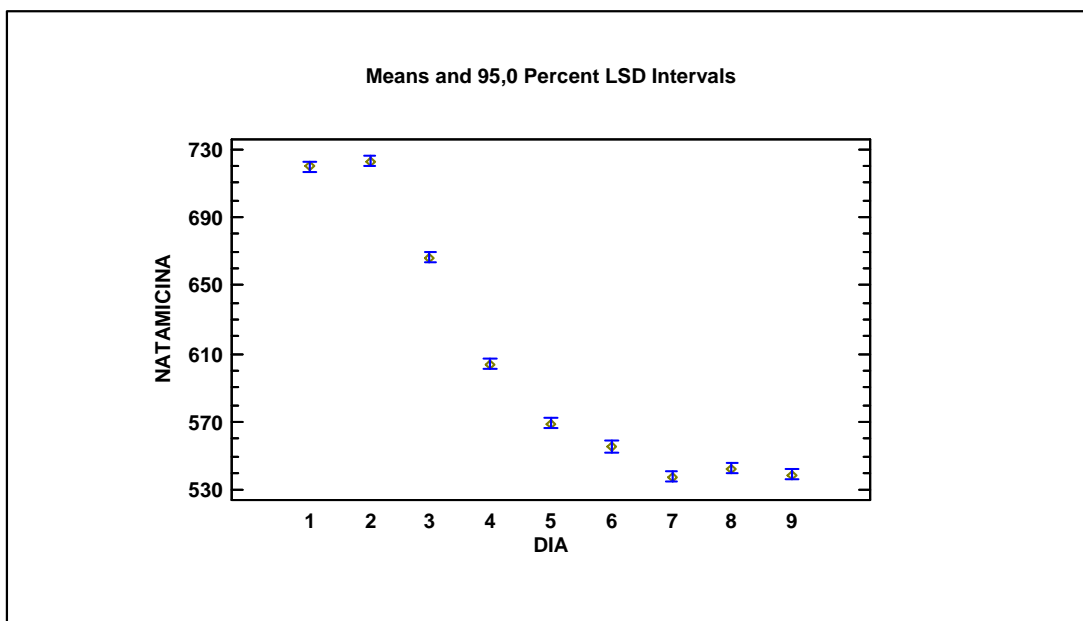


Figura 8. Concentración de natamicina en Película PCL por día.

Tabla 6. Tabla ANOVA para concentración de natamicina por día.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1,388E5	8	1,734E4	1496,13	0,0000
Within groups	197,1	17	11,59		
Total (Corr.)	1,39E5	25			

Tabla 7. Prueba de Rangos múltiples de natamicina por día.

DIA	Count	Mean	Homogeneous Groups
7	3	537,8	X
9	3	539,1	X
8	3	542,9	X
6	2	556,2	X
5	3	569,3	X
4	3	603,8	X
3	3	666,3	X
1	3	719,7	X
2	3	722,7	X

Tabla 8. Concentración de natamicina en arepa de maíz blanco por día.

Unidades/Día	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9
mg/Kg	87,31	93,5	161,91	216,86	261,79	274,63	283,29	275,9	270,39
D.E.	1,01	1,86	1,04	2,92	4,63	0,74	2,47	1,22	1,59

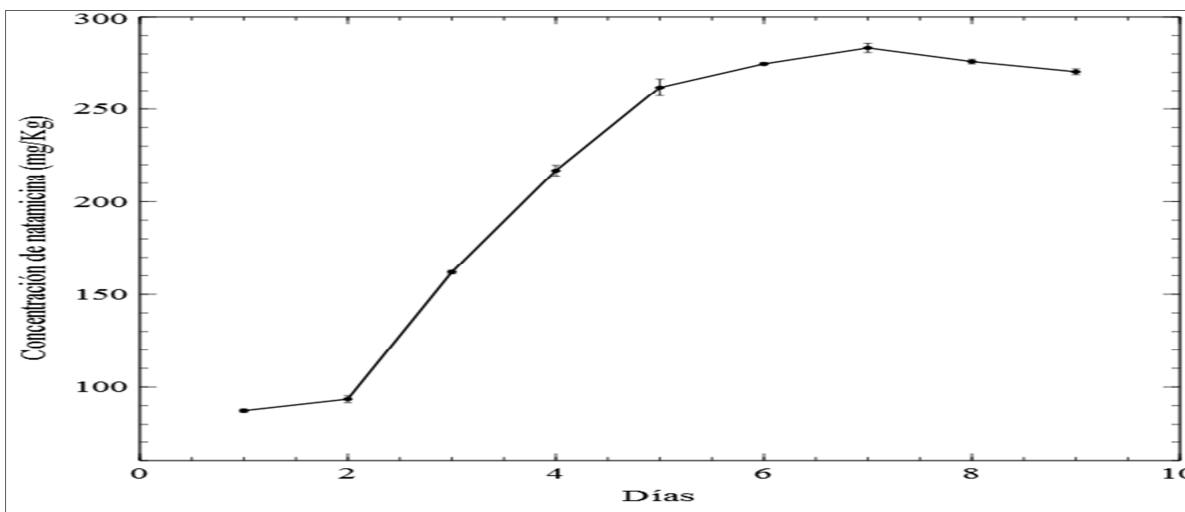


Figura 9. Concentración de natamicina en arepa de maíz blanco por día.

Según los resultados obtenidos, se evidenció una liberación gradual (Figura 9) en donde se observa cómo se da el proceso de incremento en la concentración de natamicina en la arepa de maíz blanco, donde a partir del día 2 la natamicina incrementa gradualmente hasta el día 7 (195,98 mg/Kg de natamicina) y donde se empieza a dar en la arepa de maíz blanco el inicio del equilibrio del sistema de envasado activo. La leve disminución observada a partir del día 7 se puede atribuir al consumo de la natamicina por parte de los microorganismos que están empezando a proliferar en el producto.

Este estudio utilizó una matriz sólida (arepa de maíz blanco) al igual que estudios como el de P. Fajardo et al. quienes evaluaron el efecto antimicrobiano de la natamicina incorporada en película de quitosano con una efectiva la inhibición

superficial de mohos y levaduras en una matriz sólida (queso tipo saloio) lo cual también se estableció en la arepa de maíz blanco [60].

Otro aspecto que tuvo influencia en la liberación gradual de natamicina hacia la arepa de maíz blanco fue el espesor de la película de proteína del lactosuero utilizada en el estudio (menor de 1,0 mm). (Tabla 4), y el área de contacto de la película PCL con la arepa (100mm x 15 mm), además de una superficie visualmente uniforme lo cual garantizó condiciones que favorecieron el acondicionamiento de la masa total de la natamicina y su posterior liberación hacia la arepa de maíz blanco, estos factores son importantes para el proceso de migración Gilbert, 1985 [80].

De acuerdo al tratamiento estadístico de los datos, en la tabla ANOVA (Tabla 9) teniendo como variable respuesta la concentración de natamicina en arepa de maíz blanco y como factor el día, se establece que hay diferencias significativas en la concentración de natamicina por día, ya que el valor P (P-Value) es menor a 0,05 a un nivel de significancia del 95 % por día en la película.

Analizando la prueba de rangos múltiples (Tabla 10) se tiene que durante todos los días hay diferencias significativas en la concentración de natamicina en la película PCL.

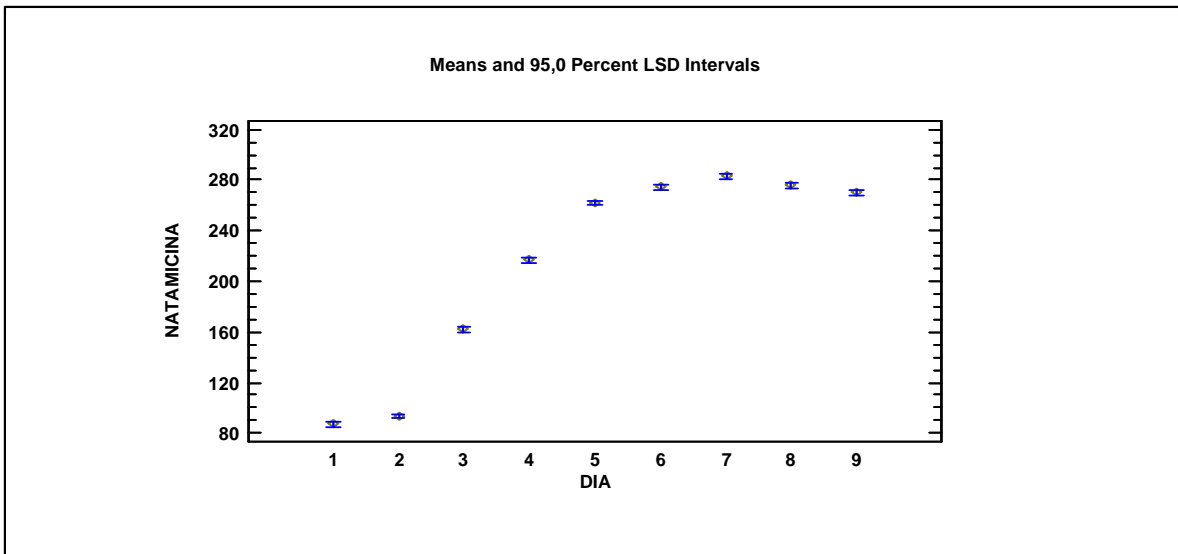


Figura 10. Concentración de natamicina en arepa de maíz blanco por día.

Tabla 9. Tabla ANOVA para concentración de natamicina por día.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1,493E5	8	1,867E4	3434,19	0,0000
Within groups	92,4	17	5,435		
Total (Corr.)	1,494E5	25			

Tabla 10. Prueba de Rangos múltiples para concentración de natamicina por día.

DIA	Count	Mean	Homogeneous Groups
1	3	87,32	X
2	3	93,51	X
3	3	161,9	X
4	3	216,9	X
5	3	261,8	X
9	3	270,4	X
6	2	274,4	XX
8	3	275,9	X
7	3	283,3	X

Tabla 11. Concentración de natamicina en la película PCL con natamicina por día (testigo).

Unidades/Día	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9
mg/Kg	819,94	820,77	819,70	819,60	819,66	820,54	819,46	819,92	819,96
D.E.	0,26	1,20	1,65	1,12	2,09	0,62	0,52	1,36	0,38

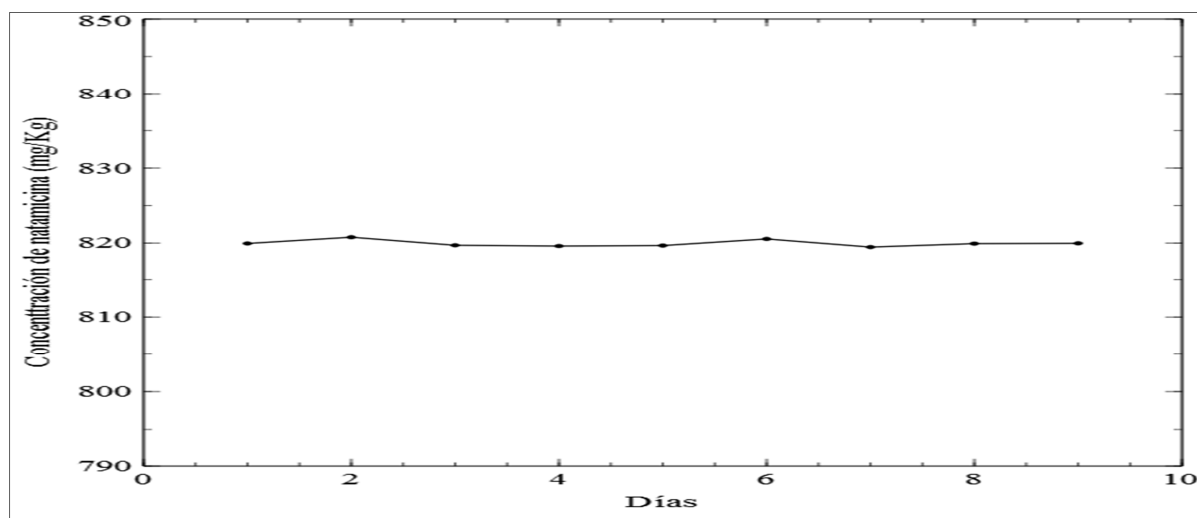


Figura 11. Concentración de natamicina en la película PCL con natamicina por día (testigo).

La liberación gradual de una masa constante de la natamicina se comparó con ensayos realizados en muestras testigos positivos en películas PCL (Figura 11) evidenciando que la concentración de la natamicina en las películas fue generalmente constante durante los 9 días del estudio.

Las pequeñas fluctuaciones que se presentaron en la concentración de la natamicina en las películas PCL no tuvieron una variabilidad importante y se infiere a que se pudieron haber suscitado debido a la extracción de la película en el momento del desmolde.

Tabla 12. Concentración de natamicina en arepa de maíz blanco sin natamicina por día (testigo).

Unidades/Día	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9
mg/Kg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
D.E.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

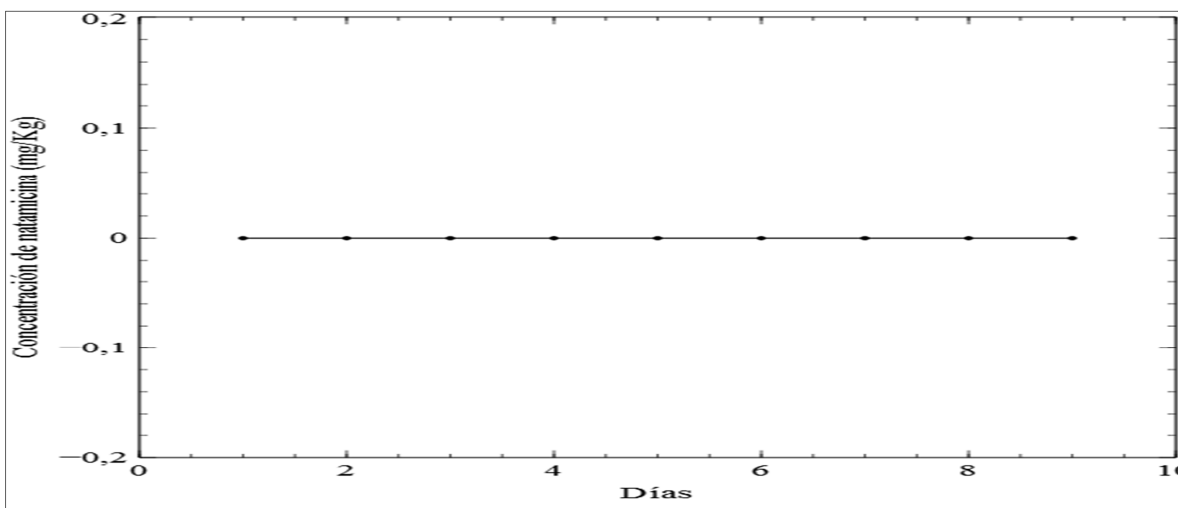


Figura 12. Concentración de natamicina en arepa de maíz blanco sin natamicina por día (testigo).

Se realizó la cuantificación de la natamicina en muestras testigo negativo para arepa de maíz blanco sin película PCL (Figura 12) que comprobó que ninguna de las muestras del estudio tuvo la natamicina antes de ser expuesta al envase activo y demostró que tampoco se presentó una producción espontánea de la natamicina en la arepa de maíz blanco. La ausencia de la natamicina fue constante durante los 9 días del estudio.

ESTUDIO DE VIDA ÚTIL EN AREPA DE MAÍZ BLANCO.

Tabla 13. Parámetros fisicoquímicos de la arepa de maíz blanco.

ANALITO /DIA	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6
Humedad	59,28±0,65	59,81±0,07	60,7±0,38	61,57±0,09	62,26±0,63	65,91±0,73
pH	6,12±0,02	6,18±0,03	6,15±0,03	6,16±0,06	6,16±0,06	6,16±0,06

Se estableció el día 5 como día de corte debido que se observó un incremento en el porcentaje de humedad notándose el día 6 con un máximo de 65, 91 % (Tabla 9), el pH generalmente se mantuvo constante y es dicho valor se considera como apropiado para el crecimiento de mohos en la arepa de maíz blanco.

Tabla 14. Parámetros microbiológicos de la arepa de maíz blanco.

ANALITO /DIA	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6
Recuento de coliformes	<10	<10	<10	<10	<10	<10
recuento estafilococo coagulasa (+)	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Recuento presuntivo Bacillus cereus	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Recuento mohos y levaduras	3 tipo moho	7 tipo levadura	1 tipo moho	1 tipo levadura	<1	1tipo levadura 2 tipo moho

Los parámetros microbiológicos evidenciaron una reducción significativa comparado con el estudio inicial ya que la reducción de hongos es notoria en los días de evaluación (Tabla 14) consecuencia atribuída a la liberación de natamicina desde la película hacia la arepa de maíz blanco.

La inhibición de mohos y levaduras que se obtuvo en el presente estudio está directamente relacionada con la incorporación de natamicina desde la película PCL teniendo el mismo efecto con estudios como el de Pintado et al. quienes trabajaron la adición de natamicina logrando efectos inhibitorios eficaces contra mohos [59] y el de Hanušová et al. inhibiendo mohos de queso Blatacké utilizando un sistema de envasado activo con natamicina [36].

Tabla 15. Atributos sensoriales de la arepa de maíz blanco.

ATRIBUTO / DIA	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6
Olor						
Horneado	4,5	4,5	4,0	4,0	4,5	4,0
Cereal	5,0	5,0	5,0	4,0	4,0	4,0
Maíz	4,5	4,5	4,5	4,0	4,0	4,0
Maíz cocido	4,5	5,0	4,5	4,5	4,5	4,0
Color						
Homogeneidad	4,0	3,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Textura						
Blanda	4,0	4,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Masticable	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Fibrosa	4,0	4,0	4,0	3,0	3,0	3,0
Sabor						
Maíz	4,5	4,5	4,5	4,0	4,5	4,0
Horneado	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
Promedio calidad General (día)	4,2	4,2	4,1	3,8	3,7	3,8

La vida útil se estableció en tiempo real en condiciones de temperatura ideal de almacenamiento promedio ($21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) y temperatura promedio de almacenamiento en expendio ($25,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) aplicando la fórmula para valoración del factor Q_{10} . [80,81]. La fórmula establece la relación en tiempo real de temperaturas de expendio ($^{\circ}\text{Te}$) y de trabajo experimental a condiciones del laboratorio ($^{\circ}\text{Ta}$) y que se expresa como: $Q_{10}^{[(^{\circ}\text{Te} - ^{\circ}\text{Ta})/10]}$ [82, 83]. Se puede observar los valores de humedad en las muestras de arepa de maíz blanco (Tabla 15), desde el día 1 hasta el día 6; es importante resaltar que durante el día 6 se alcanza un máximo de 65,91 % lo cual define la fecha de corte del estudio ya que el máximo porcentaje de humedad permitido para este producto es de 64,10 %.

En comparación con el valor de calidad general de la arepa de maíz blanco obtenido en la caracterización sensorial (3,0) y con respecto al obtenido en este estudio de vida útil con exposición al envase activo en el día 6 (3,8) se puede establecer un aumento de la calidad que, aunque sigue siendo calificada como media, aproxima al producto a una calidad como BUENA. Esto está directamente relacionado con las características que le brinda desde el envase activo la natamicina a la arepa de maíz blanco ya que no aporta sabores, olores ni efectos en la textura. Los datos del estudio se tomaron durante todos los días del estudio.

Aplicando la fórmula para valoración del factor Q_{10} [80, 81], Se logró determinar un aumento de la arepa de maíz blanco de 3,6 días en relación al estudio que se estableció inicialmente donde el tiempo de vida útil fue de 1,46 días.

6. CONCLUSIONES.

1. La caracterización de la arepa de maíz blanco estableció los atributos (físicoquímicos, microbiológicos y sensoriales) de composición más importantes y que sirvieron como punto de partida para evaluar la migración de la natamicina hacia la arepa de maíz blanco y la extensión de vida útil.
2. La caracterización de la arepa de maíz blanco que se distribuye en la ciudad de Medellín tienen unas condiciones de producción, empaque y comercialización que impactan directamente en la vida útil de la arepa haciendo necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para su conservación.
3. Se logró elaborar la película del lactosuero con unas características de transparencia y brillo que son deseables en el mercado de alimentos y al evaluar sus propiedades mecánicas se encontró que éstas se ajustaron a los rangos de valores reportados para biopolímeros elaborados con proteína del lactosuero.
4. El antimicrobiano seleccionado después de ser incorporado en la película logró generar un sistema de envasado activo el cual logró liberarse gradualmente sin perder sus propiedades antimicóticas.
5. Se logró establecer la migración de la natamicina desde la película con una cantidad de 184,93 ppm.
6. La arepa de maíz blanco en contacto directo con el envase activo elaborado a partir de proteína del lactosuero y natamicina mostró una disminución

contundente en su contenido de hongos y después de 6 días de estudio la vida útil se vió afectada por una factor fisicoquímico que fue la humedad.

7. Después de aplicar la fórmula Q_{10} para el cálculo de vida útil en la arepa de maíz blanco comercializada en expendios o tiendas de barrio sin frío tiene una vida útil de 1,5 días, mientras que las arepas que tuvieron contacto con el envase activo presentaron una vida útil de 3,6 días.

7. PERSPECTIVAS.

Para futuros estudios sobre envasado activo como alternativa de conservación se plantea realizar el estudio microbiológico con microorganismos específicos de la microbiota característica de este producto.

Realizar el estudio de seguimiento microbiológico por día en arepa de maíz blanco sin envase activo y el rastreo de humedad en el envase activo.

Establecer la compatibilidad entre la natamicina y la red polimérica de la película PCL teniendo como alternativa la realización de un análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC)

BIBLIOGRAFÍA

[1] Rodríguez Tarango, José A. (2005). Manual de Ingeniería y diseño de envase y embalaje para la industria de los alimentos, químico, farmacéutica y cosméticos. México, p. 1:1.

[2] Mercado de arepas precocidas alcanzó en Colombia \$3,9 billones, con un crecimiento de 3% en 2008. Disponible en portafolio.co 15 mar 2009. <http://www.portafolio.co/archivo/documento/CMS-4879921>. Consultado 2011/11/21

[3] GARZON, Rolando. Las arepas le presentan batalla comercial al pan; Revista Portafolio (2009). [Consultado el 4 de nov. de 2011]. Disponible en: <http://www.portafolio.com.co/archivo/documento/MAM-3363508>.

[4] Resolución 004506 de 2013 del 30 de octubre de 2013. Niveles máximos de contaminantes en alimentos destinados al consumo humano. Ministerio de Salud y Protección Social. República de Colombia. 1 -10.

[5] Martínez OL, Arcila MP. Factores relacionados con la presencia de aflatoxinas en la fabricación de la arepa delgada de maíz blanco en dos industrias de Medellín y su área metropolitana [tesis]. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia; 2006..

[6] MEDELLIN. SECRETARIA DE SALUD DE MEDELLIN. VIGILANCIA Y CONTROL DE ALIMENTOS, Estadística de fábricas de arepas en Medellín, 2010.

[7] Rodríguez Tarango, José A. (2005). Manual de Ingeniería y diseño de envase y embalaje para la industria de los alimentos, químico, farmacéutica y cosméticos. México, p. 6:1-6:5.

[8] Londono, M., Sepulveda, J., Hernandez, A., et al. Fermented fresh cheese milk whey beverage inoculated with *Lactobacillus casei*. Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín, Jan./June (2008), vol.61, no.1, 4409-4421.

[9] REPÚBLICA DE COLOMBIA, Ministerio de la Protección Social. Resolución número 2997 de 2007 (03/09/07)

[10] EVALUACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA EFECTIVIDAD DE UN RECUBRIMIENTO COMESTIBLE EN LA CONSERVACIÓN DE UCHUVA (2009). (*Physalis peruviana* L. var. Colombia), Raúl Alberto Castro^{1*}, Gloria Helena González Blair¹, Facultad de Ingeniería de Alimentos, Fundación Universitaria Agraria de Colombia.

- [11] A. Kilara, Arun Kilara Worldwide, USA and M.N. Vaghela, Nestlé R & Center, USA. (2000), p. 1-24.
- [12] A. Gennadios, Cardinal Health, Inc. USA. Proteins in Food Processing. Edited by R y Yada. CRC Press LLC 2000 Corporate Blvd. NW. Boca Raton, FL. 33431 usa. 442-457.
- [13] ROBERTSON, Gordon. Food Packaging: Principles and Practice. 2nd. ed. Boca Raton, FL, 2006. p. 21 – 44.
- [14] Quintavalla Stefania, Loredana vicini. (2002) Antimicrobial food packagin in meat industry. Meat science, 62, 373-380.
- [15] S. Manso, F. Cacho-Nerin, R. Becerril, C. Nerín. (2012). Combined analytical and microbiological tools to study the effect on Aspergillus flavus of cinnamon essential oil Contained In Food packaging. 1-20.
- [16] Hoffman , k. L., Han, I. Y., & Dawson, P. L. (2001). Antimicrobial effects of corn zein films impregnated with nisin, lauric acid and EDTA. Journalof Food Protection. 64, 885-889.
- [17] Diana Granda-Restrepo, Herlinda Soto-Valdez, Elizabeth Peralta, Rosalba Troncoso Rojas, Belinda Vallejo-Córdoba, Nohemí Gámez-Meza, Abril Z. Graciano Verdugo. (2009). Migration of Alpha-tocopherol from an active multilayer film into whole mlk powder. Food Research International, 42, 1396-1402.
- [18] Catalá R., Gavara R., migración de componentes y residuos de envases con alimentos. p 1-5
- [19] Krochta, J. M., Baldwin, E., & Nisperos-Carriedo, M. O. (1994). Edible films and coatings to improve food quality. Lancaster, PA: Technomic Publishing Co.
- [20] Guilbert S. 1986. Technology and application of edible protective films. In: Mathlouthi M, editor. Food packaging and preservation-theory and practice. New York: Elsevier Applied Science Publisher. p. 371-394.
- [21] Pérez-Gago, M. B., & Krochta, J. M. (2000). Drying temperature effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein-lipid emulsion films. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 2689e2692.
- [22] Kester, J. J., & Fennema, O. R. (1986). Edible films and coatings: areview. Food Technology.

- [23] Catalá R., Gavara R., (2002) Migración de componentes y residuos de envases con alimentos. p 7-10
- [24] Cristina M.B.S. Pintado a,b, Maria A.S.S. Ferreira b, Isabel Sousa b.(2010). Food Control. Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. Instituto Superior de Agronomia, Technical University of Lisbon, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal. Food Control. P 241 – 246.
- [25] Viuda-Martos M. Ruiz-Navajas Y. Fernández-López J. Pérez –Alvarez J.A. Antifungal Activities of thyme, clove and oregano essential oils.. Food Safety 2007; 27:91-101
- [26] M. Ozdemir, J.D. Floros. (2001). Analysis and modeling of potassium sorbate diffusion through edible whey protein films. Journal of Food Engineering. 47, 149-155.
- [27] Arrieta Maria Patricia, Peltzer Mercedes Ana, Garrigos Selva maria del Carmen, Jimenez Migallón Alfonso. Desarrollo de un sistema de envasado activo: biopelículas de proteínas lácteas para un desarrollo sostenible. 2009 p. 5.
- [28] Vermeiren, L., Devlieghere, F. van Beest, M., de Kruijf, N., & Debevere, J. (1999). Developments in the active food packaging of foods. Trends in food science & technology, 10, 77-86.
- [29] Tharanathan, R. N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. Trends in Food Science and technology, 14, 71-78.
- [30] Jooyandeh, H. (2011). Whey Protein Films and Coatings: A Review. Pakistan Journal of Nutrition, 10(3), 296-301.
- [31] Diana Granda-Restrepo, Herlinda Soto-Valdez, Elizabeth Peralta, Rosalba Troncoso Rojas, Belinda Vallejo-Córdoba, Noemí Gámez-Meza, Abril Z. Graciano Verdugo. (2009). Migration of Alpha-tocopherol from an active multilayer film into whole milk powder. Food Research International, 42, 1396-1402.
- [32] J.H. Han, H.-M. Hwang, S. Min, and J.M. Krochta. (2008). Coating of peanuts with Edible Whey Protein Film Containing alpha-Tocopherol and Ascorbyl Palmitate. Journal of Food Science. Food Engineering and Physical Properties. 73, 349-355.
- [33] A.C. Seydim, G. Sarikus. (2006). Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. Food Research International. 39, 639-644.

- [34] Marina Ramos, Alfonso Jiménez, Mercedes Peltzer, María C. Garrigós. (2012). Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. *Journal of Food Engineering*. 109, 513-519.
- [35] Seacheol Min and John M. Krochta. (2005). Inhibition of *Penicillium commune* by Edible Whey Protein Films Incorporating Lactoferrin, Lactoferrin hydrolysate, and Lactoperoxidase Systems. *Journal of Food Science*. 70, 87-94.
- [36] Kristýna Hanušová, Monika Štastná, Lenka Votavova, Kamila Klaudivsova, Jaroslav Dobias, Michal Voldrich, Miroslav Marek. (2010). Polymer films releasing nisin and/or natamycin from polyvinylidene chloride lacquer coating: Nisin and natamycin migration, efficiency in cheese packaging. *Journal of Food Science*. 99, 491-496.
- [35] Kyriaki G. Zinoviadou, Konstantinos P. Koutsoumanis, Costas G. Biliaderis. (2010). Physical and thermo-mechanical properties of whey protein isolate films containing antimicrobials, and their effect against spoilage flora of fresh beef. *Food Hydrocolloids*. 24, 49-59.
- [38] M. Ozdemir, J.D. Floros. (2001). Analysis and modeling of potassium sorbate diffusion through edible whey protein films. *Journal of Food Engineering*. 47, 149-155.
- [39] A. Cagri, Z. Ustunol, and E.T. Ryser. (2001). Antimicrobial, Mechanical, and Moisture Barrier Properties of Low pH Whey Protein-based Edible Films Containing p-Aminobenzoic or Sorbic Acids. *Journal Food of Science. Food microbiology and Safety*. 66, 865-870.
- [40] Claudia Contini, Maria G. Katsikogianni, Feidhlim T. O'Neill, Michael., O'Sullivan, Denis.P. Dowling, Frank.J. Monahan. (2011). Development of active packaging containing natural antioxidants. *Food Science*. 1, 224-228.
- [41] Diana Granda-Restrepo, Elizabeth Peralta, Rosalba Troncoso Rojas, Herlinda Soto-Valdez. (2009). Release of Antioxidants from co-extruded active packaging developed for whole milk powder. *International Dairy Journal*. 481-488.
- [42] J.P. Kerry, M.N. O'Grady, S.A. Hogan. (2006). Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. 74, 113-130.
- [43] Han, J. H. Antimicrobial Food Packaging. (2000). *Food Technology*. 54(3), 56-65.

- [44] Alba Manuela Durango, Nilda de Fátima Soares, Margarita Rosa Arteaga. (2009). Edible Films and Coatings as Biodegradable active packaging in the preservation of foods products. *Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*. 9, 112-118.
- [45] European Food Authority. Scientific opinion on the use of natamycin as food additive. EFSA panel on food Additives and Nutrient Sources added to food (ANS). *JOURNAL* 2009; 7(12): 1412. 1-20
- [46] Carmen A. Campos, Lia N. Gerchenson, Silvia K. Flores. (2011). Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. *Food Bioprocess Technol.* 4, 850-875.
- [47] O. Hondrodinou, Y. Kourkoutas, E.Z. Panagou. (2011). Efficacy of natamycin to control fungal growth in natural black olive fermentation. *Food Microbiology*. 28, 621-627.
- [48] Rojas-Grau, Avena Bustillos, R. J., Olsen C., Friedman, M., Henika, P. R., Martin-Belloso, O. et al. (2007). Effects of plant essential oils and oils compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate-apple puree edible films. *Journal of Food Engineering*. 81, 634-641.
- [49] Per. V. Nielsen, Rodrigo Rios. (2000). Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the posible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *International Journal of Microbiology*. 60, 219-229.
- [50] J.P. Cerisuelo, Virginia Muriel-Galet, José M. Bermúdez, Susana Aucejo, Ramón catalá, Rafael Gavara, Pilar Hernández-Muñoz. (2012). Mathematical model to describe the release of an antimicrobial agent from an active package constituted by carvacrol in a hydrophilic EVOH coating on a PP film. *Journal of Food Engineering*. 110, 26-37.
- [51] Prospero Di Pierro, Angela Sorrentino, Loredana mariniello, Concetta Valeria L. Giosafatto Raffaele Porta. (2011). Chitosan /whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life. *Food Science and Technology*. 44, 2324-2327.
- [52] Isil Var, Zerrin Erginkaya, Mehmet Guven, Bulent Kabak. (2006). Effects of antifungal agent and material on microflora of Kashar cheese during storage period. *Food Control*. 17, 132-136.
- [53] Sarekha Woranuch, Rangrong Yoksan. (2010). Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: II. Application in bio-based plastics for active packaging. *Carbohydrate Polymers*. 1-31.

- [54] Oscar L. Ramos, Armenia C. Santos, Mariana V. leao, Joana O. Pereira, Sara I. Silva, JoaoFernandes, Manuela E. Pintado, Xavier Malcata. (2012). Antimicrobial activity edible coatings prepared from whey protein isolate and formulated with various antimicrobial agents. *International Dairy Journal*. 25, 132-141.
- [55] S. Manso, F. Cacho-Nerin, R. Becerril, C. Nerín. (2012). Combined analytical and microbiological tools to study the effect on *Aspergillus flavus* of cinnamon essential oil Contained In Food packaging. 1-20.
- [56] L.M. Pérez, C.E. Balagué, A.C. Rubiolo, R.A. Verdini. (2011). Evaluation of the biocide properties of whey-protein edible films with potassium sorbato to control non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli*. 1, 203-209.
- [57] Ouattara, B., Simard, R.E., Piette, G., Bégin, A., & Holley, R.A. (2000b). Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 139-148.
- [58] Hoffman, k. L., Han, I. Y., & Dawson, P. L. (2001). Antimicrobial effects of corn zein films impregnated with nisin, lauric acid and EDTA. *Journal of Food Protection*. 64, 885-889.
- [59] Pintado, C. M. B. S., Ferreira, M. A. S. S., & Sousa, I. (2010). Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. *Food Control*. 21, 240-246.
- [60] P. Fajardo, J.T. Martins, C. Fuciños, L. pastrana, J.A. Teixeira, A.A. Vicente. (2010). Evaluation of a chitosan edible film as a carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. 101, 349-356.
- [61] Karbowiak, T., Debeaufort, f., & Vollei, A. (2010). From macroscopic to molecular scale investigations of mass transfer of small molecules through edible packaging applied at interfaces of multiphase food products. *Innovative Food Science & Emerging Technology*. 43, 1088-1094.
- [62] Guiga, W., Swesi, Y., Galland, S., Peyrol, E., Degraeve, P., & Sebti, I. (2010). Innovative multilayer antimicrobial films made with Nisaplin® or nisin and cellulosic ethers: Physico-chemical characterization, bioactivity and nisin desorption kinetics. *Innovative Food Science & Emerging Technology*. 11, 352-360.
- [63] Debeaufort, F. Quezada, J., Gallo, A., Delporte, B. & Voilley, A. (2000). Lipid hydrophobicity and physical state effects on the properties of bilayer edible films. *Journal of membrane Science*, 180, 47-55.

- [64] Cho, S. Y., Park, J.-W., & Rhee, C. (2002). Properties of laminated films from whey powder and sodium caseinate mixtures and zein layers. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 35, 135-139.
- [65] Kristo, E., & Biliaderis, C. G. (2006). Water sorption and thermomechanical properties of water/sorbitol-plasticized composite biopolymer films: Caseinate Pullulan bilayers and blends. *Food Hydrocolloids*, 20, 1057-1071.
- [66] Kristo, E., Biliaderis, C. G., & Zampraka, A. (2007). Water vapor barrier and tensile of composite caseinate-pullulan films: Biopolymer composition effects and impact of beeswax lamination. *Food Chemistry*, 101, 753-764.
- [67] Burt, S.A., (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- [68] Seacheol Min, Linda J. Harris, Jhon M. Krochta. (2005). Antimicrobial effects of Lactoferrin, Lysozyme, and Lactoperoxidase System and Edible Whey Protein Films Incorporating the Lactoperoxidase System Against Salmonella Enterica and Escherichia coli O157:H7. *Journal of Food Science. Microbiology and Safety*. 70, 332-338.
- [69] Faten Sadaka y Christelle Nguimjeu, Claire helene Brachais, Isabelle Vroman, Lan Tigghert, Jean Pierre Couvercelle. Review on antimicrobial containing essential oils and their active biomolecules. *Innovative food and science and Emerging Technologies*. 1-23
- [70] Javier Osés, Mayra Fabregat-Vásquez, Ruth Pedroza-Islas, Sergio A. Tomás, Alfredo cruz-orea, Juan I. Maté. (2009). Development and characterization of composite edible films base don whey protein isolate and mesquite gum. *Journal of Food Engineering*. 92, 56-62.
- [71] Anastasia Fitria, Roman Buckow, Yacine Hemar, Stefan Kaspis. Modification of the structural and rheological properties of whey protein/gelatin mixes through high pressure processing. *Food Engineering*. (2014). p. 243-249.
- [72] Mia kurek, Sabina galus, Frederic Debeaufort. Surface, mechanical and barrier properties of biobased composite films based on chitosan and whey protein. *Food Packaging*. (2014). p. 56-67
- [73] Javier Osés, mendoza, M. , & Juan I. Maté. (2009). Stability of the mechanical properties of edible film base don whey protein isolate during storage at different relative humidity. *Food Hydrocolloids*, 23, 125-13.

[74] Javier Osés, Idoya Fernández-Pan., Khalid Ziani., Juan Maté. (2008). Use of edible films base on whey protein isolate to protect foods rich in polyinsaturated fatty acids. *Eur Food Res Technol.* 227, 623-628.

[75] Diana GRANDA-RESTREPO, Yaqueline MEDINA-PINEDA, Mario CULEBRAS-RUBIO, Clara GÓMEZ-CLARI. (2014). Caracterización de una película activa biodegradable con antioxidantes (alfa-tocoferol) a partir de las proteínas del lactosuero. *VITAE.* 21. 11-19.

[76] ASTM D882-01. Standard Test method for Tensile Proprieties if Thin Plastic Sheeting. 162-170.

[77] Perez-gago, M.B. & Krochta, J.M. (2002). Formation and proprieties of whey protein films and coatings. In A. Gennadios (Ed.), *protein-based films and coatings* (pp. 159-180. Boca raton, FL, USA: CRC Press.

[78] Oliveira, T.M., Soares, N.F.F., Pereyra, R.M., Fraga, K.F., 2007. Development and evaluation of antimicrobial Natamycin-incorporated film in gorgonzola cheese conservation. *Packaging Technology and Science* 20 (2), 147-153.

[79] Norma ASTM E 2454 – 05. Guía estándar para métodos de evaluación sensorial para determinar la vida del estante de los productos al consumidor. 2011.1-16

[80] Michael Eskin y David S. Robinson. *Food shelf life stability: chemical, biochemical, and microbiological changes.* Estados Unidos: CRC Press, 2000. CRC series in contemporary food science.

[81] Ross Steele. *Understanding and measuring the shelf life of food.* Estados Unidos: CRC Press, 2004. Woodhead Publishing in Food Science and Technology.

[82] Oficina regional de la FAO para América Latina y el Caribe. 2011. [Consultado el 11 de nov. de 2011]. Disponible en: <http://www.rlc.fao.org>

[83] R. Steele. *Understanding and measuring the shelf life of food.*CRC Woodhead Publishing limited Abington Hall, Abin. USA ISBN 849325560. 1-11

[84] Norma Técnica Colombiana NTC 5372. AREPAS DE MAÍZ REFRIGERADAS. ESPECIFICACIONES DE PRODUCTO. Pimera actualización. 2007-07-25. 1-11.

- [85] Bastarrachea, L. Dhawan, S. Sablani, SS.2011. Engineering properties of polymeric based antimicrobial films for food packaging. Food Engineering Reviews 3 (1) , 79-93
- [86] RY Yada. Proteins in food processing. CRC Woodhead Publishing limited Abington Hall, Abin. USA 2-22
- [87] Hart, H. Craine, L.E. & Hart D.J. (2003). Organic Chemistry (11th edition), Boston, NY: Houghton Mifflin.
- [88] Andrea Cristiane Krause Bierhalz, Marian Altenhofen da Silva, Theo Guenter Kieckbusch. (2012) Natamycin release alginate pectin films for food packaging applications. Journal of Food Engineering. p. 18-25.
- [89] Oscar L. Ramos, Isabel Reinas, sara I. Silva, Joao C. Fernandes, mlguel A. Cerqueira, Ricardo n. Pereira, Antonio A. Vicente, M. fatima Pocas, Manuela M. Pintado, Xavier Malcata. Effecto of whey protein purity and glicerol content upon physical propirties of edible films manufactured therefrom. Food Hidrocolloyds. (2013). p. 110-122.
- [90] Natamicina. Pimaricina. Características de producto. VGP. <http://http://www.pimaricina.com/archivo/documento>. Consultado 2012/02/21. C.Verdaguer, 15 D-A3 08500 Vic (Barcelona-Spain). 1-1
- [91] García, Lía. Univerdidad de las Américas de Puebla. Revisión Antimicrobianos en Alimentos, Capítulo 4,0 - 4,1. Documento en PDF. Disponible en: http://udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lia/garcia_r_mi/capitulo4.pdf. Puebla, México. Consultado 2012/02/28. p. 1 - 57.
- [92] Gilbert S.G. Food Package compatibility, Food Tecno. 39-12, 54-56,63.