



Desarrollo de un envase activo biodegradable a partir de proteínas de lactosuero y nanoemulsiones encapsulando α -tocoferol como antioxidante y natamicina como antimicrobiano

Camilo Agudelo Cuartas

Tesis doctoral presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

Asesora

Diana María Granda Restrepo, Doctor (PhD) en Ciencias

Universidad de Antioquia
Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias
Doctorado en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias
Medellín, Antioquia, Colombia

2022

Cita	(Agudelo-Cuartas, 2022)
Referencia	Agudelo-Cuartas, C. (2022). <i>Desarrollo de un envase activo biodegradable a partir de proteínas de lactosuero y nanoemulsiones encapsulando α-tocoferol como antioxidante y natamicina como antimicrobiano</i> [Tesis doctoral]. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
Estilo APA 7 (2020)	



Doctorado en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Cohorte III.

Grupo de Investigación Biotecnología de Alimentos (BIOALI).

Centro de Innovación e Investigación Farmacéutica y Alimentaria (CENQFAL).



Biblioteca Carlos Gaviria Díaz

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

A educação, se bem compreendida, é a chave do progresso moral (Allan Kardec)

Agradecimientos:

Al Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación "Francisco José de Caldas" COLCIENCIAS (Convocatoria 727 de 2015).

A mi orientadora, doctora Diana María Granda Restrepo, por la dedicación, la paciencia y el apoyo incondicional en todo el proceso de mi formación doctoral.

Al Comité tutorial conformado por el doctor Paulo José do Amaral Sobral y Hugo Fernando Hernández García, que desde el principio han compartido su tiempo, conocimiento y consejos oportunos en este proceso investigativo.

A la Universidad de São Paulo, Facultad de Zootecnia e Ingeniería de Alimentos, Pirassununga, Brasil, por acogerme su campus universitario.

A la Universidad de Antioquia, sus espacios, y a cada una de las personas que brindaron su grano de arena, el cual fue muy importante para mí como apoyo en este camino recorrido.

CONTENIDO

RESUMEN.....	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUCCIÓN	18
1.1. Planteamiento del Problema.....	22
1.2. Objetivos	24
1.2.1. Objetivo General.....	24
1.2.2. Objetivos Específicos	24
1.3. Hipótesis.....	25
2. MARCO TEÓRICO.....	26
2.1. Envases de uso alimentario	26
2.1.1. Plásticos	27
2.1.2. Bioplásticos	28
2.1.3. Películas y recubrimientos comestibles	30
2.1.4. Proteínas del lactosuero	34
2.1.4.1. Estructura, características y formación de películas de β -Lg y α -La	35
2.2. Envasado activo.....	38
2.2.1. Envases antimicrobianos y antioxidantes	38
2.2.1.1. Alfa-tocoferol como antioxidante.....	41
2.2.1.2. Natamicina como antifúngico.....	42
2.3. Nanoemulsión y Nanosuspensión	43
2.3.1.1. Surfactantes	45
2.4. Migración química a los alimentos	47
2.5. Modelación de la migración.....	48
2.5.1. Coeficiente de partición.....	49

2.5.2. Coeficiente de difusión.....	50
2.5.2.1. Modelo de difusión I.....	51
2.5.2.2. Modelo de difusión II	52
2.5.2.3. Modelo de difusión III.....	53
2.5.3. Dependencia del coeficiente de difusión con la temperatura	54
2.5.4. Modelación de integración multiescala	54
2.5.4.1. Modelación en la escala nano	54
2.5.4.2. Modelación en la escala meso/macro	56
3. METODOLOGÍA	58
3.1. Materiales	59
3.2. Nanosuspensión de natamicina	59
3.2.1. Diseño experimental	59
3.2.2. Preparación de la nanosuspensión de natamicina.....	60
3.3. Nanoemulsiones de α -tocoferol.....	60
3.3.1. Diseño experimental	60
3.3.2. Análisis estadístico y optimización	61
3.3.3. Preparación de la nanoemulsión de α -tocoferol mediante el método de cizalla.....	62
3.4. Caracterización de la nS de NAT y nEm de α -TOC	63
3.4.1. Tamaño medio de gota, índice de poli dispersión y potencial zeta	63
3.4.2. Estabilidad de la nanosuspensión y la nanoemulsión.....	64
3.4.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	64
3.4.4. Actividad antioxidante.....	65
3.4.4.1. Preparación de la muestra.....	65
3.4.4.2. Método ABTS ^{•+}	65
3.4.4.3. Método DPPH [•]	66

3.4.4.4. Método FRAP	66
3.5. Preparación de la solución formadora de película	67
3.6. Producción de las películas	67
3.7. Caracterización de las películas	68
3.7.1. Espesor.....	68
3.7.2. Humedad.....	68
3.7.3. Solubilidad en agua y grado de hinchamiento.....	68
3.7.4. Permeabilidad al vapor de agua.....	69
3.7.5. Propiedades ópticas	70
3.7.5.1. Color, opacidad y brillo.....	70
3.7.5.2. Barrera a la luz UV-Vis y Transparencia	71
3.7.6. Propiedades mecánicas	71
3.7.7. Ángulo de contacto.....	72
3.7.8. Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)	72
3.7.9. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	72
3.7.10. Difracción de Rayos X	73
3.7.11. Microestructura de las películas	73
3.7.11.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	73
3.7.11.1. Microscopía de fuerza atómica (AFM)	73
3.7.12. Actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar.....	74
3.7.13. Actividad antioxidante.....	74
3.7.14. Biodegradabilidad de las películas	75
3.8. Análisis estadístico.....	75
3.9. Migración de los compuestos activos.....	75
3.9.1. Estudio in vitro de la migración de la natamicina y el α -tocoferol	75

3.9.1. Estudio de la migración de la natamicina y el α -tocoferol en el sistema de envasado (película-queso).....	76
3.9.2. Determinación del coeficiente de difusión y de partición	77
3.10. Modelación Multiescala de la migración	78
3.11. Cuantificación del hexanal en queso como indicador de la oxidación lipídica.	79
4. RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN	80
4.1. Reducción de tamaño a escala nanométrica	80
4.1.1. Nanosuspensión de natamicina.....	80
4.1.2. Nanoemulsión de α -tocoferol	82
4.1.2.1. Optimización de la nanoemulsión	85
4.1.2.2. Estabilidad de la nEm de α -TOC y su mezcla con nS de NAT.....	87
4.1.1. Concentración mínima inhibitoria para nS de <i>NAT</i> y capacidad antioxidante de la nEm de α - <i>TOC</i>	89
4.2. Caracterización de las películas	91
4.2.1. Contenido de humedad (CH), solubilidad en agua (S) y grado de hinchamiento (GH).....	93
4.2.2. Permeabilidad al vapor de agua.....	95
4.2.3. Propiedades ópticas (Color, opacidad y brillo)	96
4.2.4. Barrera a la luz UV-Vis y Transparencia	98
4.2.5. Propiedades mecánicas	99
4.2.6. Ángulo de contacto.....	101
4.2.7. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)	102
4.2.8. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	104
4.2.9. Difracción de Rayos X	106
4.2.10. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	108
4.2.11. Microscopía de fuerza atómica (AFM)	111

4.2.12. Actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar.....	113
4.2.13. Actividad antioxidante.....	115
4.2.14. Biodegradabilidad de las películas	115
4.3. Migración de los compuestos activos.....	117
4.3.1. Determinación del coeficiente de partición, de difusión y energía de activación: in vitro	117
4.3.2. Determinación del coeficiente de partición, de difusión y energía de activación en el sistema de envasado Película-Queso.....	122
4.4. Modelación multiescala de la migración.....	128
4.4.1. Escala nanométrica.....	129
4.4.2. Escala mesoscópica y macroscópica	131
4.5. Cuantificación del hexanal en queso como indicador de la oxidación lipídica	135
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	137
6. REFERENCIAS	140
7. APÉNDICES.....	161
Apéndice A. Raíces de $q_n \tan q_n = Sh$ y $\tan q_n = -\alpha q_n$	161
Apéndice B. Códigos de la simulación (Matlab)	162
B.1 Simulación del movimiento Browniano	162
B.2 Método de diferencias finitas (Explicito)	164

LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

- ABTS**: sal diamónica del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
- AFM**: Microscopia de fuerza atómica
- ANOVA**: Análisis de varianza
- α** : Relación adimensional entre el volumen del alimento y del material de envase
- α -La**: Alfa lactoalbúmina
- α -TOC**: Alfa tocoferol
- β -Lg**: Beta lactoglobulina
- $\beta_i, \beta_{ij}, \beta_{ijk}$** : Coeficientes de la regresión en la optimización de la nanoemulsión
- C_p** : Concentración del migrante en el envase
- $C_{p,\omega}$** : Concentración del migrante en el envase cuando el sistema llega a un equilibrio
- $C_{a,\omega}$** : Concentración del migrante en el alimento cuando el sistema llega a un equilibrio
- C_m^{i+1}** : Concentración en el nodo m para el tiempo $i+1$ (mg kg^{-1})
- C_m^i** : Concentración en el nodo m para el tiempo i (mg kg^{-1})
- C_{m-1}^i** : Concentración en el nodo anterior al nodo m (mg kg^{-1})
- C_{m+1}^i** : Concentración en el nodo siguiente al nodo m (mg kg^{-1})
- CH**: Contenido de humedad (% m/m)
- Cis**: Cisteína
- CMI**: Concentración mínima inhibitoria
- $\frac{\partial C_p}{\partial t}$** : Variación de la concentración del migrante en el envase respecto al tiempo
- D**: Coeficiente de difusión ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)
- D_j** : Coeficiente de difusión del compuesto j ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)
- D_0** : Factor pre-exponencial de la difusión
- DPPH**: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
- DSC**: Calorimetría diferencial de barrido
- E_a** : Energía de activación (J mol^{-1})
- FRAP**: poder antioxidante de la reducción férrica
- FTIR**: Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier
- GH**: Grado de hinchamiento (% m/m)

Gli: Glicerol

h: Coeficiente convectivo de transferencia de masa (m s^{-1})

HLB: balance hidrófilo lipófilo

IPD: Índice de poli dispersión

K_{p,a}: Coeficiente de partición

L_p y ***L_a***: Espesor medio del material de envase y alimento (cm)

M: Número de nodos

M_{a,t}: Cantidad de migrante en el alimento al tiempo de migración *t*

M_{a,∞}: Cantidad del migrante en el alimento cuando alcanza el equilibrio

ME: Módulo elástico

MTT: Sal de tetrazolium (Bromuro de [3-(4,5-dimethylthiazol – 2 -yl) - 2,5 – diphenyltetrazol])

NAT: Natamicina

n_d: Número de dimensiones

nEm: Nanoemulsión

nS: Nanosuspensión

O/W: Oil in wáter, acetite en agua

PCL: Proteína concentrada de lactosuero

ppm: Partes por millón

PE: Porcentaje de elongación

PVA: Permeabilidad al vapor de agua ($\text{g Pa}^{-1}\text{s}^{-1}\text{m}^{-1}$)

R: Constante de gases ideales ($8.3145 \text{ J mol}^{-1} \text{ k}^{-1}$)

$\langle r \rangle^2$: Distancia máxima de la partícula

RW: Random Walk o caminata aleatoria

SA: Solubilidad en agua (% *m/m*)

SEM: Microscopía electrónica de barrido

SFP: Solución formadora de película

Span® 60: Monoestearato de sorbitano

$\tau_{p,j}$: Número adimensional

T: Temperatura (K)

TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity

TPTZ: 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina

TR: tensión de rotura

Trolox: ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico

Tween® 80: Polioxietilén 20 sorbitán monolaurato

V_a, V_p: Volumen del alimento y del material de envase (cm³)

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Estimación del consumo mínimo de materiales plásticos usados como envase....	28
Tabla 2. Producción de bioplásticos por tipo de polímero.....	29
Tabla 3. Propiedades mecánicas de diversos materiales de uso alimentario.	32
Tabla 4. Propiedades de barrera, permeabilidad al vapor de agua y oxígeno de diversos materiales de uso alimentario.	32
Tabla 5. Efecto antimicrobiano de diversos agentes activos en algunos materiales de envase provenientes de fuentes renovables.	39
Tabla 6. Efecto antioxidante de diversos agentes activos en algunos materiales de envase provenientes de fuentes renovables.	40
Tabla 7. Aplicación de los surfactantes según su intervalo HLB.	46
Tabla 8. Valores HLB de algunos surfactantes.....	46
Tabla 9. Formulaciones de nanosuspensión de natamicina	60
Tabla 10. Diseño experimental del diseño de mezclas para tres componentes.....	61
Tabla 11. Formulación de la fase orgánica y acuosa para las nanoemulsiones	63
Tabla 12. Formulaciones de las SFP para las películas de PCL incorporadas con los compuestos activos	67
Tabla 13. Tamaño de partícula (d. nm), índice de polidispersión y potencial Zeta de diferentes soluciones de natamicina.	81
Tabla 14. Caracterización de las nanoemulsiones de α -Tocoferol para el diseño de mezclas.	83
Tabla 15. Resumen del análisis estadístico y de los modelos para el tamaño de gota.....	86
Tabla 16. Resultado experimental y predicho de la formulación optimizada para el tamaño de gota.....	86
Tabla 17. Evaluación del índice de estabilidad para la mezcla de nEm de α -TOC y nS de NAT en las concentraciones óptimas durante en la reducción de tamaño, simulando diferentes tiempos de almacenamiento a 20 °C.....	88
Tabla 18. Capacidad antioxidante expresada en equivalente de Trolox para la nEm α -TOC y su mezcla con nS de NAT.....	91

Tabla 19. Espesor promedio y propiedades fisicoquímicas de películas incorporadas con nS NAT, nEm α -TOC, o ambos.....	93
Tabla 20. Permeabilidad al vapor de agua (PVA), color (L^* , a^* , b^* , ΔE^*), opacidad y brillo de películas incorporadas con nS de NAT, nEm α -TOC, o ambos.	96
Tabla 21. Propiedades mecánicas y ángulo de contacto de las películas elaboradas	100
Tabla 22. Resultados del análisis de calorimetría diferencial de barrido	104
Tabla 23. Halo de inhibición y capacidad antioxidante en equivalente Trolox TEAC de las películas.	114
Tabla 24. Coeficiente de partición y de difusión de la natamicina y del α -Tocoferol in vitro para la película de proteína concentrada de lactosuero.....	118
Tabla 25. Coeficiente de partición y de difusión de la natamicina y del α -Tocoferol en el sistema película-queso.	124
Tabla 26. Parámetros utilizados en la simulación a escala nanométrica.	129
Tabla 27. Coeficiente de difusión para NAT y α -TOC estimado en la escala nanométrica.	131

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Generación mundial de residuos generales, de plásticos y alimentos.	27
Figura 2. Clasificación de los materiales de envasado según su origen.	31
Figura 3. Estructura de las proteínas predominantes en el lactosuero.	36
Figura 4. Desnaturalización y agregación de proteínas del lactosuero.	36
Figura 5. Estructura química de α -tocoferol.	41
Figura 6. Reacción del α -tocoferol con el radical peroxilo.	42
Figura 7. Estructura química de la natamicina	43
Figura 8. Representación de varios procesos de degradación de una emulsión.	44
Figura 9. Puntos nodales para la formulación en diferencias finitas unidimensional en el sistema de envasado activo.	57
Figura 10. Modelo de integración entre las diferentes escalas.	79
Figura 11. Distribución en el tamaño medio de partícula para las nanosuspensiones de natamicina.	82
Figura 12. Distribución en el tamaño medio de gota para las nanoemulsiones de α -Tocoferol.	84
Figura 13. Gráfico ternario y superficie de respuesta de la nanoemulsion optimizada.	87
Figura 14. Perfil del índice de estabilidad como función del tiempo para nEm de α -TOC y su mezcla con nS NAT en las concentraciones óptimas.	88
Figura 15. Concentración mínima inhibitoria de la natamicina para la <i>Cándida albicans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Penicillium chrysogenum</i>	90
Figura 16. Películas elaboradas a partir de proteína concentrada de lactosuero.	92
Figura 17. Espectrograma de la transmisión a luz UV-Vis y transparencia de las películas.	99
Figura 18. Espectrograma FTIR de las películas obtenidas. Rangos de 4000-600 cm^{-1} (a), 3800-2700 cm^{-1} (b) y 1800-800 cm^{-1} (c).	103
Figura 19. Termogramas DSC de las películas obtenidas.	106
Figura 20. Difractograma de las películas elaboradas	108
Figura 21. Micrografías SEM de la superficie y la sección transversal de las películas. ...	110

Figura 22. Topografía y parámetros de rugosidad de las películas elaboradas.	112
Figura 23. Inhibición de <i>Candida albicans</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por método de difusión en disco.	113
Figura 24. Curva de biodegradación de las películas obtenidas de proteína concentrada de lactosuero.	116
Figura 25. Cambio de la concentración de NAT y α -TOC en medio acuoso para la película con 2% TOC – 300 ppm NAT a tres temperaturas (in vitro).	118
Figura 26. Difusión in vitro de la natamicina y del α -Tocoferol hacia la solución acuosa de etanol 50% (m/m) conforme la segunda ley de Fick para la película con 2% (m/m) α -TOC-300 ppm NAT.	121
Figura 27. Cambio de la concentración de NAT y α -TOC en la película con 2% TOC – 300 ppm NAT y en el queso a tres temperaturas en el sistema de envasado.	124
Figura 28. Difusión en el sistema película-queso de la natamicina y del α -Tocoferol conforme la segunda ley de Fick.	127
Figura 29. Algoritmo del movimiento Browniano de las nanogotas de NAT y α -TOC dentro de la película de proteína.	130
Figura 30. Perfiles de concentración en la película y el queso para NAT y el α -TOC a diferentes temperaturas.	133
Figura 31. Escala macroscópica: integración del modelo multiescala en la película.	134
Figura 32. Concentración de hexanal durante el almacenamiento de queso doble crema en contacto con la película control y la película con 2% (m/m) α -TOC – 300 ppm NAT a diferentes temperaturas.	136

RESUMEN

La mayoría de los materiales de envasado tradicionales se han obtenido de fuentes fósiles y no son biodegradables, lo que aumenta la contaminación ambiental. Esta problemática despierta el interés de evaluar nuevas materias primas de fuentes renovables, como la proteína de suero lácteo para el desarrollo de materiales de envasado, especialmente para producir películas activas biodegradables. Esta investigación tuvo como objetivo general desarrollar un envase activo biodegradable a partir de proteínas de lactosuero (PCL) y nanoemulsiones encapsulando α -tocoferol (α -TOC) como antioxidante y natamicina (NAT) como antimicrobiano. Se fabricaron nanosuspensiones de NAT y nanoemulsiones de α -TOC (O/W) mediante el método de homogenización de alta cizalla, se caracterizaron y se incorporaron a la solución formadora de película formuladas con PCL, glicerol y agua; obteniendo cuatro películas por el método solvent-casting con 300 ppm NAT, 2% (m/m) α -TOC y ambas. Las películas se caracterizaron en sus propiedades fisicoquímicas, mecánicas, ópticas, barrera de vapor de agua, FTIR, microestructura, actividad antioxidante, antimicrobiana y biodegradabilidad. Se evaluó la migración mediante modelación multiescala y la migración experimental de la NAT y el α -TOC *in vitro* y en el envasado película-queso a 4, 14 y 25 °C. Los tamaños de partícula obtenidos fueron nanométricos con distribución monomodal. Las películas activas no presentaron defectos a simple vista, no presentaron diferencias significativas en el espesor y humedad ($p > 0.05$); la solubilidad, opacidad, la diferencia de color total, la barrera de luz UV-Vis, ángulo de contacto y la permeabilidad al vapor de agua aumentaron cuando se incorporaron compuestos a la película mejorando algunas de las propiedades ($p < 0.05$); se obtuvieron películas estirables, menos resistentes y rígidas ($p < 0.05$), debido al aumento del porcentaje de elongación, disminución de la tensión de rotura y el módulo elástico; se conservó la capacidad antifúngica y antioxidante, con un 90% de biodegradabilidad a 21 días en compost. Se confirmó la migración experimental de NAT y α -TOC en ambos sistemas, pudiéndose utilizar la modelación multiescala en la comprensión del mecanismo de migración. Las películas activas desarrolladas presentan un potencial para ser utilizados como envases alimentarios.

Palabras clave: Natamicina, α -Tocoferol, proteína de lactosuero, envasado activo, modelación multiescala.

ABSTRACT

Most of the traditional packaging materials have been obtained from fossil sources and are non-biodegradable, which increases environmental pollution. This problem arises interest to evaluate new raw materials from renewable sources to develop whey protein as a food packaging material, to produce biodegradable active films. The general aim of this research was to create a biodegradable active package from whey proteins (PCL) and nanoemulsions encapsulating α -tocopherol (α -*TOC*) as an antioxidant and natamycin (*NAT*) as an antimicrobial. *NAT* nanosuspensions and α -*TOC* (*O/W*) nanoemulsions manufactured by the high shear homogenization method, characterized and incorporated into the film-forming solution formulated with PCL, glycerol, and water. Four films were obtained using a solvent-casting method with 300 ppm *NAT*, 2% (*m/m*) α -*TOC*, and both. The films were characterized in their physicochemical, mechanical, optical, water vapor barrier, FTIR, microstructure, antioxidant, antimicrobial activity, and biodegradability. Migration was evaluated by multiscale modeling and experimental migration of *NAT* and α -*TOC* in vitro and film-cheese packaging at 4, 14, and 25 °C. The particle sizes obtained were nanometric with the monomodal distribution. The active films did not present defects, with smooth surface, compact morphology, and did not present significant differences for thickness and moisture ($p > 0.05$); solubility, opacity, total color difference, UV-Vis light barrier, contact angle, and water vapor permeability increased when compounds were incorporated into the film, improving some properties ($p < 0.05$). Stretchable, less resistant, and rigid films were obtained ($p < 0.05$) due to increased percentage elongation at break, decreased tensile strength, and elastic modulus. The antifungal and antioxidant capacity was preserved, with 90% of biodegradability at 21 days in compost. The experimental migration of *NAT* and α -*TOC* was confirmed in both systems, and multiscale modeling could be used to understand the migration mechanism. The active films developed have the potential to be used as food packaging.

Keywords: Natamycin, α -Tocopherol, whey protein, active packaging, multiscale modeling

1. INTRODUCCIÓN

En la última década, se han realizado grandes esfuerzos para reducir la cantidad de desechos asociados con el consumo de alimentos y el uso de materiales plásticos, en particular en el desarrollo de materiales de envasado que sean amigables con el ambiente, dado que, la generación de residuos plásticos crece rápidamente con el aumento de la población, y se ha estimado que la generación mundial de desechos se duplicará en el año 2050 y se triplicará en el 2100 (Ferdous et al., 2021). Una investigación realizada por (Zhao, Lv, y Ni 2018) presentó una estadística sobre la generación de desechos plásticos, llegando a 6300 millones de toneladas, donde el 79% se desecha, el 12% se quema y solo el 9% se recicla; de igual forma, los vertederos y la incineración son métodos tradicionales para manejar los desechos plásticos que tienen un impacto ambiental negativo (Abdul-Khalil et al., 2016). Este contexto ha llevado a la implementación de leyes sobre el uso razonable de materiales plásticos, como en el caso de Europa con respecto a la reducción del consumo de bolsas plásticas ligeras con la Directiva (UE) 2015/720. El creciente problema mundial de la contaminación de los plásticos derivados del petróleo y la necesidad de generar nuevos materiales como alternativas para el envasado de alimentos han abierto un campo de investigación para el desarrollo de materiales biodegradables a partir de fuentes renovables (Almasi et al., 2021).

Una alternativa al plástico a base de petróleo podrían ser materiales basados en biopolímeros derivados de fuentes animales como el colágeno (Cazón et al., 2017; Marangoni et al., 2021; Shi et al., 2019), gelatina (Dammak et al., 2019; Shankar et al., 2019), colágeno y quitosano (Andonegi et al. 2020; Bhuimbar et al., 2019; Sionkowska et al., 2020), quitosano (Li et al., 2021; Mohamed y Madian 2020; Yeamsuksawat y Liang 2019)(Yeamsuksawat and Liang 2019), gelatina y quitosano (Bonilla y Sobral 2016; Pérez-Córdoba et al., 2018); caseína (Picchio et al., 2018), proteínas de suero aisladas o suero concentrado (Ghadetaj et al., 2018; Schmid et al., 2018); o de fuentes vegetales, como alginato (Iñiguez-Moreno et al., 2021; Szekalska et al., 2019), celulosa (Cazón et al., 2018; Lavoine et al., 2016; Song et al., 2021; Zhao et al., 2019), almidón (Ballesteros-Martínez et al., 2020; González-Forte et al., 2019; Ollé Resa et al., 2016; Zam y Ali 2018), pectina (Shivangi et al., 2021), pectina y gluten (Sartori et al., 2018), zeína (Xue et al., 2021), entre otros.

Las proteínas del suero han sido de gran interés porque, en la actualidad, la producción mundial total de suero de queso anualmente es de aproximadamente $1.8 - 1.9 \times 10^8$ toneladas (Zhou et al., 2019). Las proteínas predominantes en el suero son la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina, con un alto valor nutricional que representa aproximadamente el 50% y el 20% del contenido total de proteínas, estas proteínas pueden formar emulsiones, espumas, geles y un alto potencial para formar biopolímeros. materiales basados para aplicaciones alimentarias (Ghadetaj et al., 2018; Ozer et al., 2016; Schmid et al., 2018; Shokri y Ehsani 2017). Los materiales de embalaje hechos con estas proteínas también son comestibles y biodegradables, presentando una adecuada barrera a los gases en comparación con los plásticos convencionales (Oymaci y Altinkaya 2016). Además, todos estos materiales pueden servir como vehículos de compuestos bioactivos que permiten el desarrollo de envases de alimentos (Atarés y Chiralt 2016).

En relación a los compuestos activos de carácter antimicrobiano, y teniendo en cuenta que una causa del deterioro de los alimentos corresponde al crecimiento de microorganismos, como mohos y levaduras, que comprometen la estabilidad de los alimentos y amenazan la seguridad del consumidor porque pueden producir micotoxinas (Moatsou et al., 2015); diversos autores han estudiado fungicidas, extractos naturales, enzimas, bacteriocinas y ácidos orgánicos para su aplicación en películas biodegradables (Altenhofen et al., 2012; Krause et al., 2012; Pintado et al., 2010). Un agente antifúngico de interés en este estudio es la natamicina, el cual se usa ampliamente para prevenir la contaminación por levaduras y mohos en diferentes productos alimenticios. La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) ha considerado este aditivo como un producto reconocido como seguro y la Unión Europea como un conservante natural (E235) y además presenta ventajas como aditivo porque no tiene color, olor ni sabor.

La oxidación de los lípidos es otra causa del deterioro de los alimentos y tiene efectos sobre los malos olores, la pérdida de color, los compuestos nocivos y el desarrollo de sabores desagradables. El α -tocoferol es generalmente aceptado como un antioxidante lipídico, se recomienda su uso en alimentos que contienen grasas, aceites y se ha utilizado en películas comestibles de quitosano (Martins et al., 2012), metilcelulosa (Noronha et al. 2014), proteína concentradas de suero (Shokri y Ehsani 2017), carboximetilcelulosa (Martelli et al., 2017) y gelatina-quitosano (Bonilla y Sobral 2016; Pérez-Córdoba et al., 2018; Pérez y Sobral 2017). Los

tocoferoles fueron clasificados como sustancias generalmente seguras GRAS para productos alimenticios por el Código de Regulaciones Federales; Por lo tanto, el uso de α -tocoferol como antioxidante natural ha aumentado el interés en proteger y extender la vida útil en los alimentos (Granda-Restrepo et al., 2009; Shokri y Ehsani 2017). Aunque el α -tocoferol es poco soluble en sistemas acuosos y es muy difícil de incorporar dentro de la formación de películas, que son sistemas hidrófilos o acuosos, la incorporación de α -tocoferol en la matriz del biopolímero se ve facilitada por emulsiones o nanoemulsiones (Pérez-Córdoba et al., 2018). Por esta razón, existe la oportunidad de incorporar los compuestos activos de origen natural y reconocidos como GRAS en el material de envase para que desde el envase ejerzan su función como antioxidantes y antifúngicos.

En la terminología del envasado de alimentos, la migración se usa generalmente para describir la transferencia de un compuesto de interés desde el envase hacia el alimento, este fenómeno ha involucrado el estudio del coeficiente de difusión desde diferentes matrices poliméricas (Bierhalz et al., 2012; Granda-Restrepo et al., 2009; Manzanarez-López et al., 2011; Mascheroni et al., 2010; Mercea et al., 2018; Poças et al., 2008; Samsudin et al., 2018; Suppakul et al., 2011; Vitrac et al., 2007; Yeamsuksawat y Liang 2019). Una alternativa novedosa en el estudio de la migración de compuestos activos en un material de envase, denominada como la modelación multiescala, permite estudiar el fenómeno de transferencia de masa vinculados en diferentes escalas para modelar y predecir propiedades de transporte, mecánicas, estructurales, entre otras (Fermeglia y Pricl 2007; Hernández 2008; Urrea-Quintero et al., 2020). En concordancia del contexto antes mencionado, es necesario el estudio de la incorporación de una nanosuspensión de natamicina y una nanoemulsión de α -Tocoferol en películas elaboradas de proteína concentrada de lactosuero en contacto con queso doble crema a diferentes temperaturas de almacenamiento.

Este documento está conformado por varias secciones:

Sección 1. Introducción. Se contextualiza esta tesis en el área del envasado de alimentos con la presentación del planteamiento del problema, los objetivos de la tesis con su respectiva hipótesis de investigación.

Sección 2. Marco teórico. Se presentan los materiales de envase convencionales y biodegradables para alimentos, haciendo un énfasis en las características y propiedades de las proteínas del lactosuero en la fabricación de envases biodegradables; también se muestra el envasado activo en el control de reacciones de deterioro de alimentos a través de la incorporación de diversos agentes, en especial se presenta la natamicina y el α -Tocoferol como antifúngico y antioxidante respectivamente; además, se conocen los aspectos clave en la fabricación de nanosuspensiones y nanoemulsiones como técnicas para la reducción de tamaño a escala nanométrico; por último, se detallan los diversos modelos derivados de la segunda ley de Fick, los cuales se han aplicado en la migración de compuestos activos incorporados en diversas matrices poliméricas, al mismo tiempo que se presenta una novedosa metodología de modelación en diferentes escalas (modelación multiescala) aplicadas en el sistema de envasado estudiado en esta tesis (película en contacto con queso doble crema).

Sección 3. Metodología. Se reúnen los materiales utilizados, la metodología propuesta de fabricación de la nanosuspensión de natamicina y la nanoemulsión de α -Tocoferol con su respectiva optimización para obtener el menor tamaño de gota; posteriormente se propone la caracterización general de las anteriores dispersiones, en especial conociendo la concentración mínima inhibitoria y la capacidad antioxidante antes de ser incorporadas a la película de proteína concentrada de lactosuero, además, se producen diversos tipos de películas con/sin compuestos activos, las cuales, deben ser caracterizadas, especialmente su biodegradabilidad; posterior a ello se presenta el estudio propuesto para la migración *in vitro* y en el sistema real (película/queso) a tres temperaturas, donde, para determinar los coeficientes de partición y de difusión respectivamente, se utiliza una solución a la segunda ley de Fick. Al sistema de envasado real se aplica la modelación multiescala, donde se trabaja la escala nanométrica, meso y macrométrica respectivamente, con ellas se conocen los coeficientes de difusión nanométricos, perfiles de concentración a las temperaturas evaluadas, por último, se cuantifica el hexanal en queso como indicador de la oxidación lipídica.

Sección 4. Resultados, análisis y discusión. Es esta sección se presentan y se discuten cada uno de los resultados referentes a las pruebas detalladas en la metodología.

Sección 5. Corresponde a las conclusiones del estudio realizado.

1.1. Planteamiento del Problema

El plástico se ha convertido en uno de los materiales más utilizados en nuestra vida cotidiana. Sus notables propiedades los han hecho imprescindibles en diversos sectores, generando beneficios para la sociedad, y específicamente en la industria de alimentos, donde se han utilizado para proteger y conservar los alimentos ayudando a reducir su desperdicio; en contraposición a esto, la mayoría de los materiales utilizados como envases alimentarios están fabricados de polímeros derivados del petróleo y otros aditivos, y sumado el consumo excesivo y la inadecuada disposición de residuos plásticos causan serias consecuencias ambientales ya que no son biodegradables después de ser desechados (Zhao et al., 2018), además, sin una acción urgente, estos residuos aumentarían para el 2050 a 408 millones de toneladas, representando un 70% respecto a los niveles actuales (Ferdous et al., 2021; Kaza et al., 2018).

Ahora bien, ésta problemática ha llevado a la necesidad de explorar otras fuentes preferiblemente renovables para obtener materias primas que permitan el desarrollo de materiales que puedan cumplir con la función de envases, que además de proteger y conservar el alimento sean amigables con el medio ambiente; en este sentido los procesos de transformación de la industria alimentaria generan gran cantidad de residuos con altos contenidos de carbohidratos, proteínas y otros componentes que pueden ser nuevamente aprovechados. Para ilustrar esta situación, se menciona el caso de la industria láctea, la cual, en el proceso de transformación de la leche en queso, genera como residuo el lactosuero, que a nivel mundial representa una producción anual aproximada de $1.8-1.9 \times 10^8$ toneladas (Zhou et al., 2019), y en Colombia de 2.043.000 toneladas-año, las cuales pueden convertirse en un contaminante de efluentes al no darle un buen uso (Minagricultura 2020).

Las proteínas del lactosuero se han identificado como una materia prima idónea en la elaboración de películas y recubrimientos, esto se debe a la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina representan el 20% y 50% en el suero respectivamente (Deeth y Bansal 2019), además se ha resaltado un uso especial de estas en presentación de proteínas aisladas o concentradas de lactosuero en el envasado activo mediante la incorporación de diferentes compuestos, tal es el caso de nanopartículas de zeína (Oymaci y Altinkaya 2016), nanopartículas de TiO_2 , nanofibras de celulosa y aceite esencial de romero (Alizadeh-Sani et al., 2018), aceite esencial de *Grammosciadium ptrocarpum* Bioss (Ghadetaj et al., 2018), quitosano (Brink et al., 2019), aceite de bergamota estabilizada con nanocelulosa (Sogut 2020), acetite esencial de canela con nanofibras de quitosano (Mohammadi et al., 2020), entro otros, buscando así, mejorar la funcionalidad de los materiales, reducir el proceso de deterioro y aumentar la vida útil del alimento mediante la liberación de aditivos antimicrobianos o antioxidantes. Aunque se han realizado progresos considerables en el desarrollo de envases activos utilizando biopolímeros, aún son necesarios estudios exhaustivos en la caracterización y la evaluación del comportamiento de los compuestos incorporados en el material de envase, teniendo muy presente sus interacciones en el sistema envase-alimento.

Dentro del marco del envasado activo, el interés del presente trabajo es evaluar una mezcla de un antifúngico (E235: natamicina) y un antioxidante (E307: α -tocoferol o vitamina E) en la escala nanométrica, siendo estas sustancias generalmente reconocidas como seguras según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, la Organización Mundial de la Salud y la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos. La natamicina se ha utilizado para inhibir el crecimiento de mohos y levaduras, especialmente en superficies de queso (González-Forte et al., 2019; Grafia et al., 2018; Romero et al., 2016). Por otro lado, el α -tocoferol es un antioxidante de carácter lipídico recomendado en alimentos que contengan grasas y aceites, éste actúa previniendo o reduciendo la oxidación lipídica que es otra causa del deterioro de los alimentos (Fang et al., 2019; Yeamsuksawat y Liang 2019). En vista que estos aditivos se han utilizado en escala macroscópica y por separado se debe profundizar en el estudio de su comportamiento en tamaño nanométrico incorporado en el material de envase de interés.

Por último, pero no menos importante es la evaluación de la migración de los agentes activos desde el material de envase hacia el alimento, que tradicionalmente se ha realizado mediante modelos matemáticos obtenidos a partir de la segunda ley de Fick aplicada en materiales plásticos como el polietileno de baja densidad y etilen vinil acetato (GilakHakimabadi et al. 2019), polietileno de alta densidad y polipropileno (Mercea et al. 2018), entre otros; no obstante, es poco frecuente el uso de la modelación en los envases activos fabricados con biopolímeros como, por ejemplo, almidón (Tampau et al., 2018), ácido poliláctico (Samsudin et al., 2018), entre otros. Yang et al., (2019) menciona que, a pesar de los avances logrados en la modelación de diversas propiedades de materiales a nivel macroscópico, sigue existiendo una gran incertidumbre sobre como predecir y modelar muchas otras propiedades de interés industrial. Por consiguiente, la modelación multiescala como rama de la ciencia computacional de los materiales propicia una predicción rápida y precisa de las propiedades que van desde lo nano hasta lo macro del material desarrollado, siendo de nuestro interés, la determinación de los coeficientes de difusión a diferentes temperaturas, complementando así, el estudio de la migración de los agentes activos desde la película hacia el medio-alimento.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Desarrollar un envase activo biodegradable a partir de proteínas de lactosuero y nanoemulsiones encapsulando α -tocoferol como antioxidante y natamicina como antimicrobiano para aumentar la vida útil de diferentes alimentos.

1.2.2. Objetivos Específicos

-Elaborar nanoemulsiones encapsulando α -tocoferol, natamicina y mezcla de ellos garantizando la estabilidad para adicionarlas en las películas biopoliméricas.

-Fabricar películas a partir de proteínas de lactosuero con la inclusión de las nanoemulsiones de α -tocoferol y natamicina con la caracterización adecuada para ser utilizadas en el envasado de alimentos.

-Establecer los mecanismos de la migración del α -tocoferol y la natamicina incorporados en el envase activo.

-Evaluar el efecto de α -tocoferol y natamicina en la extensión de la vida útil de un alimento graso.

-Evaluar la biodegradabilidad del envase activo con la incorporación de los nanocompuestos.

1.3. Hipótesis

La incorporación de una nanoemulsión encapsulando α -tocoferol y una nanosuspensión de natamicina en un envase elaborado a partir de proteína concentrada de lactosuero, producen películas activas, sin disminuir considerablemente las propiedades funcionales y físicas del material de envase desarrollado, además permite modificar el fenómeno de migración de los compuestos adicionados con el fin de controlar las reacciones de deterioro en el sistema película-queso.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Envases de uso alimentario

Una definición clásica de envase según Robertson (2013) corresponde a un envoltorio de un producto en una bolsa, caja, botella, bandeja, lata, entre otros; el envase debe realizar las funciones de contener, proteger, de conveniencia y comunicación con el consumidor; también Yambrach et al., (2009) coincide con esta definición y explica las cuatro funciones principales:

Contener. Es la función más básica del envase, y la mayoría de los alimentos deben estar contenidos en un envase antes de ser transportados, sin esto, la pérdida de producto y la contaminación serían generalizadas, así mismo, un envase defectuoso también puede generar contaminación.

Proteger. Esta es considerada como la función principal de un envase ya que, para la mayoría de los alimentos, la protección del envase es primordial para la conservación, esta protección se realiza al proporcionar una barrera alrededor del alimento frente a influencias externas como polvo, microorganismos, gases, vapor de agua, agua, olores, vibraciones, golpes y fuerzas de compresión.

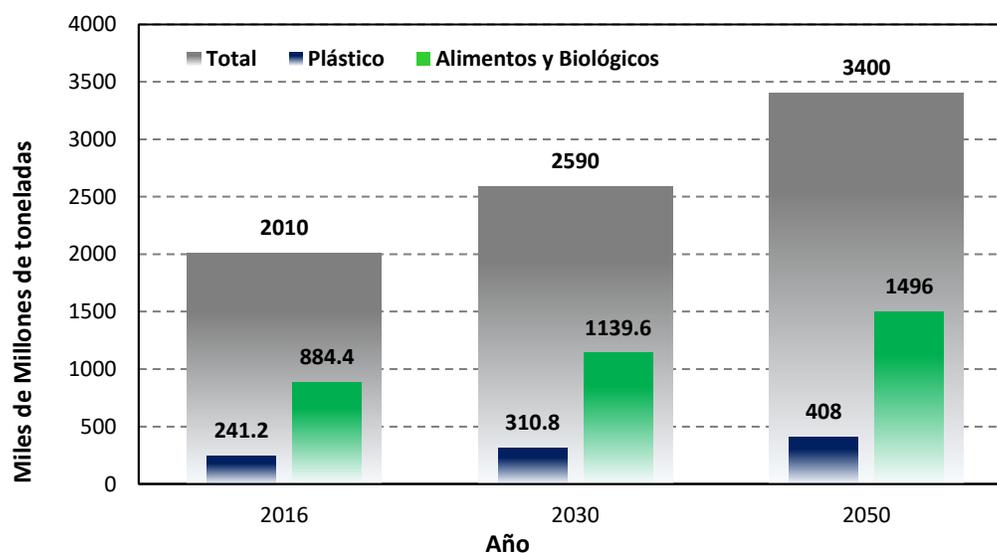
Conveniencia. Hace referencia a la constante adaptación del envase a la evolución del estilo de vida de la sociedad, se tienen ejemplo de envases personales con comida lista para calentar, cierres abre fácil y resellables, envases reutilizables, entre otros; estas características permiten que los productos se utilicen cómodamente siendo llamativos para el consumidor y a su vez promueve las ventas para una compañía.

Comunicación. Un envase debe presentar la información necesaria al consumidor a través de la etiqueta permitiendo que se tome la decisión de compra, esto puede denominar al envase como un vendedor silencioso, también permite a los mercados funcionar como autoservicio. Esta información consta de un código universal de producto, permite a los almacenes leer información

del producto de manera inmediata para su distribución, organización y posterior venta; otra información que está regulada en los países es la información nutricional del alimento contenido.

2.1.1. Plásticos

Los plásticos son materiales poliméricos a base de petróleo, estos materiales industriales son típicos del siglo pasado, y desde 1950 su producción ha aumentado desde 2 millones de toneladas anuales (Mta) hasta 407 Mta en el 2015 (OCDE 2018), con una proyección de 408 Mta al 2050 (Kaza et al., 2018), estos materiales presentan una creciente preocupación de su disposición final, porque no todo se recicla, no son biodegradables y no se tratan adecuadamente, siendo más fácil arrojarlo a los vertederos. La problemática de generación de desechos a nivel mundial (**Figura 1**) muestra la cantidad de residuos totales generados por año, especificando para este caso, los residuos plásticos secos reciclables y de alimentos respectivamente, presentando proyecciones para el 2030 y 2050.



Adaptado de (Kaza et al., 2018)

Figura 1. Generación mundial de residuos generales, de plásticos y alimentos.

En la **Tabla 1** se muestran los tipos de plástico más comunes utilizados en la industria de alimentos, el código de identificación y el porcentaje de envases para alimentos según el tipo de

distribución (Spruit y Almenar 2021); el mercado más grande de plásticos es la fabricación de envases con el 44.8% del consumo total en el rango 2002-2014 (Geyer et al., 2017).

Tabla 1. Estimación del consumo mínimo de materiales plásticos usados como envase

<i>Plástico</i>	<i>Código</i>	<i>Cadena de suministro</i>	
		<i>Tradicional (%)</i>	<i>Comercio virtual (%)</i>
Tereftalato de Polietileno (PET)	1	47.4	52.6
Polietileno de Alta Densidad (HDPE)	2	66.7	33.3
Policloruro de Vinilo (PVC)	3	*	**
Polietileno de Baja Densidad (LDPE)	4	*	**
Polipropileno (PP)	5	60.0	40
Poliestireno (PS)	6	*	**
Otros	7	*	**

Adaptado de Spruit y Almenar (2021) . La suma de todos los *: 32.1% y **: 68.0 %

2.1.2. Bioplásticos

En vista de la problemática medioambiental ocasionada por los plásticos convencionales producidos a partir de petróleo crudo, existe una primera alternativa más sostenible, denominada *bioplásticos*, cuentan con la misma estructura química y con la misma tecnología de fabricación de sus contrapartes petroquímicas, pero muestran en su mayoría, mejores propiedades para su procesamiento, uso y eliminación; los bioplásticos son productos a base de biopolímeros, y se pueden dividir en bioplásticos degradables y plásticos de origen biológico (Bioplastics 2020; IfBB 2019).

Los *bioplásticos degradables* son materiales que pueden ser degradados por microorganismos para formar agua y dióxido de carbono en condiciones aeróbicas, y en condiciones anaeróbicas forma agua y metano. Se pueden producir a partir de fuentes de carbono biológicas o fósiles (Arıkan y Ozsoy 2015).

Los *plásticos de origen biológico* se fabrican a partir de biopolímeros de fuentes renovables como el maíz, trigo, papa, caña de azúcar, azúcar de remolacha o celulosa de madera. Estos plásticos no son necesariamente biodegradables (Arikan y Ozsoy 2015).

La producción de estos bioplásticos en el 2019 fue alrededor de 3.8 Mt, representando el 1% del volumen de producción de plásticos (GmbH 2020); los bioplásticos son utilizados en diversas áreas, desde envases, electrónica, juguetes, entre otros, siendo el envasado el campo de aplicación más grande con una participación del 59% del mercado (relacionado con la producción en el 2019), además la **Tabla 2** muestra la participación por el tipo de envase (flexible o rígido) para un bioplástico biodegradable y no biodegradable.

Tabla 2. Producción de bioplásticos por tipo de polímero

<i>Bioplástico</i>	<i>Producción (%)</i>	<i>Tipo de envase Participación (%)</i>	
		<i>Flexible</i>	<i>Rígido</i>
<i>Biodegradable</i>		43	16
Poli (Butilén Adipato-co-Tereftalato) PBAT	13.4		
Succinato de polibutileno (PBS)	4.3		
Poliácido láctico (PLA)	13.9		
Polihidroxialcanoato (PHA)	1.2		
Mezclas de almidón	21.3		
Otros	1.4		
<i>No biodegradable</i>		16	30
Tereftalato de politrimetileno (PTT)	9.2		
Polipropileno (PP)	0.9		
Poliamida (PA)	11.6		
Tereftalato de Polietileno (PET)	9.8		
Polietileno (PE)	11.8		
Otros	1.1		

Adaptado de (Bioplastics 2020; IfBB 2019)

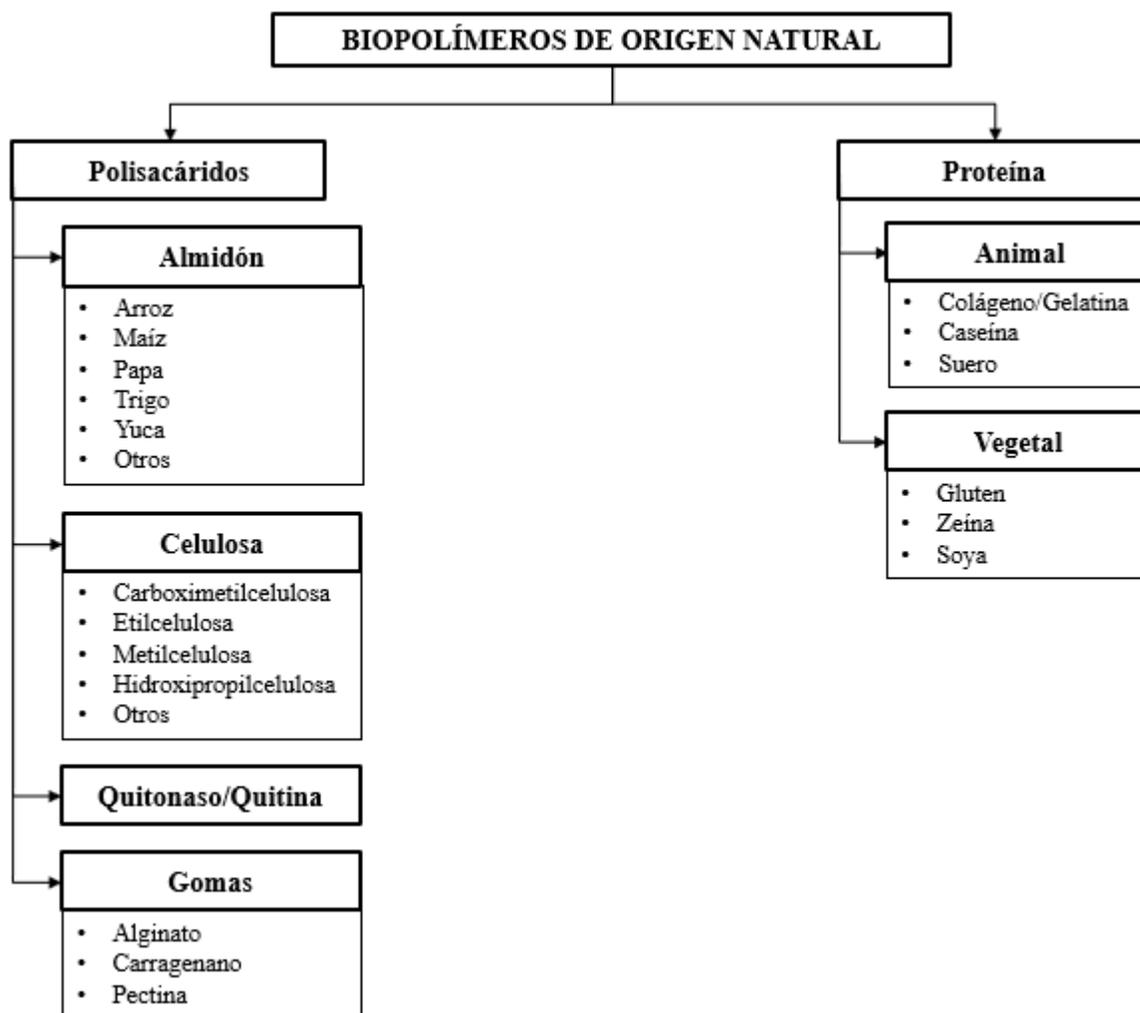
Aunque los bioplásticos son un buen sustituto de los plásticos sintéticos, estos presentan algunas desventajas a tener en cuenta: los bioplásticos presentan un costo más alto que los materiales convencionales; aumenta la preocupación sobre la disponibilidad y el uso de la tierra destinada a la producción de materias primas para producir bioplásticos, afectando los recursos alimentarios (Peelman et al. 2013); en cuanto al reciclaje de estos materiales, se debe realizar por separado de los plásticos convencionales; los bioplásticos no son compostables en el hogar porque requieren un tratamiento industrial diferente y generalmente, no está disponible en los sitios de compostaje (Arikan y Ozsoy 2015).

Desde una perspectiva más general, la biodegradabilidad no es solo un requisito funcional de los bioplásticos, sino también una necesidad para la sostenibilidad que se debe dar en respuesta a la creciente conciencia ambiental que exige a los materiales poseer atributos ecológicos y fáciles de usar (Arias et al., 2021). La constante investigación sobre usos alternativos y fabricación de biopolímeros ve la oportunidad de utilizar y valorizar los residuos industriales, tal es el caso de los excedentes en la producción agrícola y pesquera, dando además un valor comercial a estos desechos (de Moraes Crizel et al. 2016).

2.1.3. Películas y recubrimientos comestibles

Este tipo de materiales de envase están fabricados a partir de los recursos renovables proporcionados por la industria alimenticia; su característica de comestible es proporcionada por la materia prima con la cual se ha elaborado: polisacáridos, proteínas y lípidos (**Figura 2**). En general, estas materias primas permiten fabricar envases en forma de láminas, películas y recubrimientos; las película se caracterizan por tener un espesor $< 254 \mu\text{m}$, de lo contrario será considerado como lámina u hoja ($> 254 \mu\text{m}$) y se forman por separado de los alimentos, mientras que los recubrimientos son capas muy delgadas formadas directamente sobre la superficie de los alimentos (Moeini et al., 2021; Robertson 2013; Yambrach et al., 2009). Aunque las películas y recubrimientos comestibles no están destinados a reemplazar completamente los envases sintéticos, muchas de sus funciones son similares a estos últimos, ofreciendo una barrera selectiva para disminuir la transferencia de diversos agentes que comprometen la calidad del alimento (humedad, oxígeno, aromas, entre otros), las películas y recubrimientos permiten incluso la incorporación de

compuestos de interés que pueden aumentar la vida útil del alimento, como es el caso de antimicrobianos y antioxidantes (Realini y Marcos 2014).



Adaptado de (Ramos 2011; Robertson 2013)

Figura 2. Clasificación de los materiales de envasado según su origen.

Las características funcionales más importantes para una aplicación particular de una película o recubrimiento dependen del producto alimenticio, no obstante, cada material desarrollado pasa por una serie de análisis donde se evalúa la resistencia mecánica (**Tabla 3**), las propiedades físicas y de barrera (**Tabla 4**), claro está, teniendo como referente un material de envase sintético.

Tabla 3. Propiedades mecánicas de diversos materiales de uso alimentario.

<i>Material</i>	<i>Resistencia a Rotura (MPa)</i>	<i>Elongación (%)</i>	<i>Mód. Elástico (MPa)</i>	<i>Referencia</i>
Polímero sintético				
Polietileno de baja densidad	8 - 20	500-1000	300-500	(Robertson 2013)
Polietileno de alta densidad	29,3	859	NR	
Polipropileno	30 - 40	400 - 900	1000 - 2000	
Poli alcohol vinílico	31.5	36.8	1623	
Bioplástico				
Poliácido láctico	40-63	9	2050	(Robertson 2013)
Tereftalato de politrimetileno	180	28-33	1830	
Biopolímero de origen natural				
Polisacáridos				
Almidón	38.24	6.48	1666	(Ballesteros-Mártinez et al., 2020)
Metilcelulosa	25	29	NR	(Cazón et al. 2017)
Quitosano	52.08	65.13	2005.04	(Mohamed y Madian 2020)
Carboximetilcelulosa	56	6.5	2719	(Martelli et al. 2017)
Proteína				
Caseína	2.59	460.4	1.99	(Picchio et al., 2018)
Gelatina	33.6	15.0	1050	(Shankarvet al., 2019)
Concentrada de suero	55.5	8.75	75.3	(Ramos et al. 2013)
Aislada de suero	65.0	9.65	21.6	

Tabla 4. Propiedades de barrera, permeabilidad al vapor de agua y oxígeno de diversos materiales de uso alimentario.

<i>Material</i>	<i>Condición</i>	<i>Permeabilidad (x10¹⁰)</i>		<i>Referencia</i>
		Vapor de Agua (g / m s Pa)	Oxígeno (cm ³ cm/cm ² s Pa)	

<i>Polímero sintético</i>				
Polietileno de baja densidad	50% HR 23 °C	0.0073- 0.0097	519.44	(Cazón et al. 2017), (Miller and Krochta 1997)(Bonilla et al. 2012)
Polietileno de alta densidad		0.0024	3.33	
Polipropileno		0.0049	0.75	
Poli alcohol vinílico		0.0007- 0.0024	NR	
<i>Biopolímero de origen natural</i>				
<i>Polisacáridos</i>				
Almidón	57% RH 20 °C	4.65 x 10 ⁻¹⁰	0.389	(Ballesteros-Mártinez et al., 2020; Bonilla et al. 2012)
Metilcelulosa	50% RH 25 °C	NR	26.9	(Bonilla et al., 2012)
Quitosano	50% RH 20 °C	9.47 x 10 ⁻¹¹	NR	(Li et al., 2021)
Carboximetilcelulosa	2-75% RH 25 °C	1.12	NR	(Martelli et al., 2017)
<i>Proteína</i>				
Gelatina	53-100% HR 25 °C	2.03	NR	(Bonilla y Sobral 2016)
Caseína	100-25% HR 25 °C	1.93-2.14	NR	(Belyamani et al. 2014)
Concentrada de suero	50% HR	28.08	0.0081	(Ramos et al. 2013)
Aislada de suero	25°C	35.33	0.0147	

El uso de las proteínas del suero en la fabricación de envases ha recibido una gran atención, ya que las películas elaboradas son comestibles, biodegradables, flexibles, transparentes, incoloras e inodoras, además poseen propiedades mecánicas (**Tabla 3**) y barrera a la humedad con un

potencial moderado y un buen potencial como barrera al oxígeno (**Tabla 4**) siendo comparables a la de los materiales convencionales (Ramos et al. 2013; Schmid y Müller 2019).

2.1.4. Proteínas del lactosuero

Las proteínas están constituidas de unidades básicas denominadas aminoácidos, y según su estructura, se puede clasificar en primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria. La estructura primaria de una proteína es un polímero sigmoide o lineal con una cadena de aminoácidos acoplados por enlaces peptídicos. Las estructuras secundarias se dividen en hélices α y hojas β conformadas por cadenas de aminoácidos, las cuales están estabilizadas principalmente por enlaces de hidrógeno. La estructura terciaria es considerada como proteínas globulares, de estructura tridimensional, estabilizada por aminoácidos hidrófobos y por enlaces disulfuro formados entre dos aminoácidos de cisteína. Las proteínas con menos enlaces disulfuro forma estructuras débiles y flexibles, pero aún resistentes a la rotura. Al contrario, las proteínas que contienen más enlaces disulfuro poseen estructuras más rígidas, fuertes y duras. La estructura cuaternaria de la proteína también corresponde a una proteína globular y está constituida de más de dos cadenas de péptidos con una variedad de interacciones, que incluyen principalmente puentes salinos, enlaces de hidrógeno, enlaces disulfuro, entre otros (Gupta y Nayak 2015).

Las proteínas del suero que se encuentran en la leche son proteínas globulares típicas con estructuras secundarias y terciarias, y se incluyen en mayor proporción la β -lactoglobulina (β -Lg) seguida de la α -lactoalbúmina (α -La), el resto de proteínas es la albúmina de suero bovino, inmunoglobulinas, lactoferrina bovina, y lactoperoxidasa además de otros componentes proteicos menores (Ramos, 2011). En la leche bovina, la β -Lg representa aproximadamente del 10% al 12% del total de proteínas, y con el 50% en el suero lácteo; así mismo, la α -La aporta el 3.5% del total de proteínas en la leche, y aproximadamente un 20% en el suero lácteo (Deeth y Bansal 2019; Schmid y Müller 2019). El suero líquido puede ser transformado con el fin de obtener productos de suero con perfiles cualitativos y cuantitativos de minerales, lípidos y en especial de proteínas, debido a su capacidad de formar recubrimientos y películas; un primer producto es conocido como proteína concentrada de lactosuero (PCL), obtenida mediante la ultrafiltración para concentrar las proteínas y la diafiltración para eliminar la lactosa, minerales y componentes de bajo peso

molecular, la concentración proteica de la PCL puede variar de 20-80% (m/m) (Costa et al., 2018; Ramos 2011); también se puede obtener proteína aislada de lactosuero (PAL), con una concentración mínima del 90% (m/m) de proteínas y puede ser obtenida por intercambio iónico o por separación por membranas seguido de concentración y secado.

2.1.4.1. *Estructura, características y formación de películas de β -Lg y α -La*

La β -Lg es una proteína globular que pertenece a la familia de las lipocalinas, presentándose como un dímero con una masa molar de 36.6 kDa y un punto isoeléctrico es de 5.13 lo que le permite ser estable en un rango de pH 5.5 hasta 7.5 a temperatura ambiente, la β -Lg posee estructuras secundarias y terciarias bien definidas conformadas con 45% de hojas β , 8% de hélices α , y 47% de espirales aleatorias, además está constituida de 162 aminoácidos, de los cuales los aminoácidos apolares se encuentran en el interior y los residuos polares en el exterior de la estructura globular, esto explica la solubilidad de esta proteína en el agua; el monómero de β -Lg posee dos enlaces disulfuro (-S-S) en Cis66-Cis160 y Cis106-Cis119, y un grupo sulfhidrilo libre (-SH) en Cis121, siendo más importante que la α -La en la formación de películas (**Figura 3a**) (Buggy et al., 2018; Deeth y Bansal 2019; Wijayanti et al., 2019).

La segunda proteína más abundante del lactosuero es la α -La, esta proteína es pequeña y compacta, ha sido clasificada como metaloproteína de calcio presentando un punto isoeléctrico entre 4.2 y 4.5, y una masa molar de 14.2 kDa, la α -La contiene aproximadamente 26% de hélices α , 14% de hojas β y 60% de estructuras desordenadas, dicha proteína contiene una cadena de 123 aminoácidos y no contiene un grupo sulfhidrilo libre, pero posee cuatro enlaces disulfuro en Cis6-Cis120, Cis28-Cis111, Cis60-Cis77 y Cis73-Cis90 y iones Ca^{2+} que participan en la estabilización de la estructura terciaria mediante el plegado adecuado y la formación de enlaces disulfuro (**Figura 3b**), esto convierte a la α -La en la proteína más estable en la leche (Deeth y Bansal 2019; Iyer y Qasba 1999; Schmid y Müller 2019). La capacidad de estas proteínas para cambiar las conformaciones de las cadenas e interactuar entre sí para formar redes tridimensionales modificadas son propiedades deseadas para ser utilizadas en recubrimientos y películas.

El primer paso en la desnaturalización proteica es la disociación reversible del oligómero en especies monoméricas (**Figura 4a**), en el segundo paso, los monómeros de la proteína (P_N) presentan un despliegue parcial (P_D) de la estructura nativa (**Figura 4b**), a partir de este estado desnaturalizado, la proteína puede volver a su estado original (replegarse) o interactuar con otros componentes; aunque este despliegue es reversible; en mezclas complejas, dicho proceso es acompañado de la exposición de los aminoácidos hidrófobos y del grupo sulfhidrilo interno libre de la β -Lg, permitiendo que se produzcan reacciones de agregación irreversibles con otras proteínas desplegadas (**Figura 4c**). En el mismo sentido Wijayanti et al., (2019) presenta un modelo más complejo, demostrando que la desnaturalización y la agregación dependen de las propiedades moleculares de la proteína (en este caso, la β -Lg), es decir, de las cadenas laterales hidrófobas expuestas, grupo -SH, y los puentes -S-S; esta vía se presenta a continuación:

1. *Disociación*. Al calentar el dímero de β -Lg se separa en dos monómeros.
2. *Despliegue*. Los monómeros se desenvuelven, volviéndose más reactivos debido a la exposición de los residuos hidrofóbicos de la proteína y del grupo sulfhidrilo libre en la posición Cis 121 (Figura 3a), los cuales participan en la posterior etapa si se continua con el tratamiento térmico.
3. *Agregación*. Los monómeros reactivos interactúan para producir oligómeros a través de interacciones no covalentes y/o enlaces disulfuro disponibles, este último se da mediante reacciones de intercambio -SH/-S-S, que finalmente forma un nuevo grupo -SH; esto se puede repetir muchas veces. La formación de estos agregados se ve favorecida a través de interacciones no covalentes a temperaturas entre 65 y 85 °C, mientras que a temperaturas mayores que 85 °C favorece la participación de reacciones de intercambio -SH/-S-S.
4. *Polimerización*. La reacción termina cuando los grupos -SH internos son usados en la formación de polímeros de mayor masa molar e interacciones covalentes. Además, la finalización de esta reacción está indicada por la formación de redes o geles más grandes.

2.2. Envasado activo

El envasado activo presenta funciones adicionales a la de ser una barrera, esto es debido a que se ha incluido componentes en el sistema de envasado como sobres (Sachets) o almohadillas que cumplen el papel de absorbedores de O₂, CO₂, etileno, humedad, olores, o también de emisores de O₂, etanol y humedad; también se ha incorporado dentro del material de envase diversos agentes activos que cumplen una función específica (Barros-Velázquez 2016; Flórez et al., 2022; Robertson 2013). De esta manera, las películas y recubrimientos comestibles por su origen natural facilita una función más allá de una barrera pasiva (Yambrach et al. 2009), y mediante la incorporación de agentes activos como ácidos orgánicos, enzimas, bacteriocinas, fungicidas, extractos naturales, vitaminas, iones, nutrientes, pigmentos, entre otros, pueden mejorar las propiedades físicas del material, la nutrición, seguridad, y la calidad de los alimentos envasados (Abdollahzadeh et al., 2021; Amin et al., 2021; Zlata et al., 2015). Sin embargo, solo la categoría de agentes activos incorporados en el material de envase se discutirá por su interés particular para los objetivos del presente trabajo.

De hecho, es ideal encontrar un agente activo que combine características antioxidantes y antimicrobianos, debido a ello es común mezclar dos o más compuestos con el fin de lograr los beneficios de cada componente, así mismo estos agentes activos no pueden presentar ningún tipo de toxicidad, impartir aroma, sabor o color al producto, pero debe ser efectivo en concentraciones bajas, ser fácil de incorporar para obtener una mezcla homogénea, resistir la temperatura y estar disponible para su compra (Bhargava et al. 2020).

2.2.1. Envases antimicrobianos y antioxidantes

En los alimentos, los agentes antimicrobianos y antioxidantes se han agregado durante su formulación, pero su actividad puede ser inhibida en su fabricación y por muchos compuestos en la propia matriz, lo que limita su eficiencia, es por ello que mediante la incorporación de agentes activos en la película o recubrimientos puede resultar más eficiente, ya que estos compuestos migrarán de manera gradual y selectiva desde el material de envase a la superficie del alimento y difundirse en él, por lo que se mantendrán concentraciones relativamente altas en la superficie

durante períodos prolongados con la finalidad de retrasar, reducir o inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y deteriorantes en los alimentos, o bien, de mejorar la estabilidad de los productos sensibles a la oxidación (Adamczak et al., 2020; Gómez-Estaca et al., 2014; Ramos 2011; Varghese et al., 2020; Vestergaard y Ingmer 2019). La **Tabla 5** presenta estudios reportados de antimicrobianos incorporados en biopolímeros.

Tabla 5. Efecto antimicrobiano de diversos agentes activos en algunos materiales de envase provenientes de fuentes renovables.

Agente activo antimicrobiano	Polímero	Microorganismo	Referencia
Extracto de piel de naranja	Gelatina / proteína concentrada de suero	<i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	(Shams et al., 2019)
Quitosano	Gelatina/Quitosano	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	(Pérez-Córdoba et al. 2018)
Aceite esencial de canela y ajo		<i>Listeria monocytogenes</i>	
Aceite esencial de orégano y timol	Proteína aislada de suero	Bacterias productoras de H ₂ S Bacterias ácido lácticas Enterobacterias <i>Pseudomonas spp</i>	(Carrión-Granda et al. 2018)
Carvacrol	Caseinato de sodio	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	(Arrieta et al. 2014)
Extracto de piel de granada	Zeina	<i>E. coli</i> , <i>P. perfringens</i> , <i>M. luteus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. vulgaris</i> y <i>S. typhi</i>	(Mushtaq et al. 2018)
Ácido tartárico	Carboximetilcelulosa	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Salmonella enterica</i> <i>Shigella flexneri</i>	(Choi et al. 2017)

Natamicina	Almidón de maíz	<i>Penicillium</i> spp	(González-Forte, et al., 2019)
Natamicina	Harina de triticale	<i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus niger</i>	(Romero et al. 2016)

En relación con la oxidación lipídica de los alimentos, es uno de los principales procesos que ocurren en los sistemas alimentarios y tiene fuertes efectos sobre el desarrollo de sabores desagradables, pérdida de color, malos olores y compuestos dañinos. La prevención de la oxidación mediante la adición de antioxidantes en el material de envase es muy deseable para preservar los ácidos grasos del deterioro oxidativo (Martins, Cerqueira, y Vicente 2012), en la **Tabla 6** muestra el uso de diversos antioxidantes incorporados en diferentes polímeros.

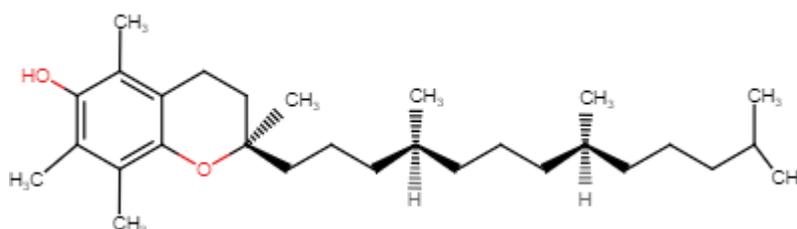
Tabla 6. Efecto antioxidante de diversos agentes activos en algunos materiales de envase provenientes de fuentes renovables.

<i>Antioxidante</i>	<i>Polímero</i>	<i>Referencia</i>
Rutina	Gelatina	(Dammak et al., 2017)
α -tocoferol	Gelatina/Quitosano	(Pérez-Córdoba et al., 2018)
Aceite esencial de canela y ajo		
Extracto hidroalcohólico de bayas de mirto	Almidón/alginato de sodio/proteína de suero	(Zam y Ali 2018)
Aceite esencial de clavo	Quitosano	(Xu et al. 2020)
Curcumina y aceite de naranja	Almidón	(Sanchez et al., 2022)
Aceite esencial de orégano	Celulosa	(Wu et al. 2021)
Extracto de barbatimão	Alginato	(Nascimento et al. 2021)
α -tocoferol	Metilcelulosa	(Noronha et al., 2014)
Extracto de laurel y salvia	Proteína de suero	(Akcan et al., 2017)
Extracto de yerba mate y té blanco	Furcellaria/Proteína de suero	(Pluta-Kubica et al. 2020)
Carvacrol	Gelatina	(Neira et al., 2019)

α -tocoferol	Carboximetilcelulosa	(Martelli et al., 2017)
Aceite esencial de lavanda	Almidón de papa/gelatina	(Jamróz et al., 2018)

2.2.1.1. *Alfa-tocoferol como antioxidante*

La familia de los tocoferoles (α , β , γ , y δ) son sintetizados y almacenados en hojas y semillas de plantas (aproximadamente 100-1000 ppm de tocoferoles mixtos), y en menor medida en aceites de pescado (250-350 ppm) y grasas animales (< 100 ppm) (Kamal-Eldin y Budilarto 2015); su estructura está formada por un anillo cromanol y una cadena lateral hidrófoba llamada fitol, la diferencia química entre los tocoferoles consiste en el número y la posición de los grupos metilo del anillo de cromanol (**Figura 5**), el α -tocoferol es un compuesto lipofílico y biológicamente activo que representa a la vitamina E (Azzi 2018). La vitamina E es un micronutriente esencial para humanos, y la recomendación de uso refiere a su papel como antioxidante lipídico, además es generalmente reconocida como segura (GRAS) y puede ser utilizada como aditivo alimentario en alimentos que contienen grasas y aceites (FAO/OMS 2019), además, el α -tocoferol ha sido utilizado en películas comestibles a partir de quitosano (Martins, Cerqueira, y Vicente 2012), carboximetilcelulosa (Martelli et al. 2017), metilcelulosa (Noronha et al. 2014), proteína concentrada de lactosuero (Shokri y Ehsani 2017) y en gelatina-quitosano (Bonilla y Sobral 2016; Pérez et al. 2018; Pérez y Sobral 2017).

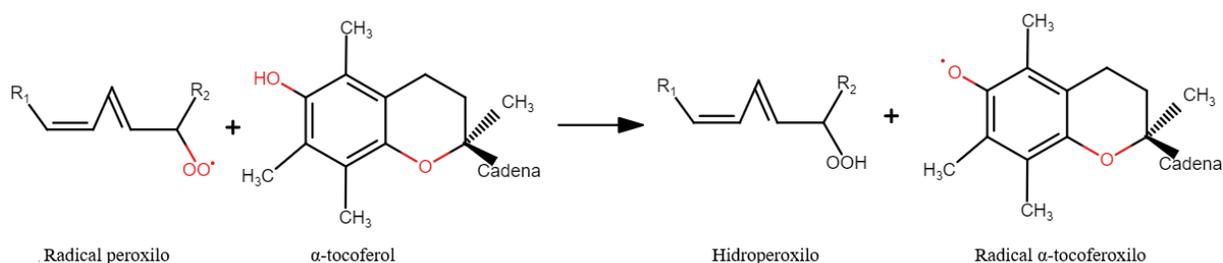


Tomado de *Reaxys*; Elsevier; 2020

Figura 5. Estructura química de α -tocoferol.

La función antioxidante del α -tocoferol en alimentos grasos es debida a su capacidad para reaccionar con los radicales peroxilo de los ácidos grasos, los cuales son los productos primarios de la peroxidación lipídica y convertirse él mismo en un radical α -tocoferoxilo (**Figura 6**) (Azzi

2018; Pérez-Jiménez 2011). No obstante, el uso de α -tocoferol como ingrediente funcional en alimentos está limitado debido a la alta sensibilidad al oxígeno, luz, temperatura y su baja afinidad por el agua, además, cuando se utilizan concentraciones mayores a 250 ppm, pueden ser prooxidante (Balaguer et al., 2014; Zuta et al., 2007); por las primeras razones, es necesario proteger el α -tocoferol con el fin de mejorar su estabilidad biológica con el fin de promover la actividad antioxidante y preservar su valor nutricional (Teixeira et al. 2017). Por tal motivo, se ha estudiado el α -tocoferol incorporado en emulsiones y partículas (Fang et al. 2019), nanoemulsiones (Gao et al. 2016; Kaur et al. 2016; Pérez-Córdoba et al. 2018), nanocapsulas (Noronha et al. 2014), entre otros, como alternativas a la adición directa del compuesto activo.



Adaptado de (Pérez-Jiménez 2011), *Reaxys*; Elsevier; 2020

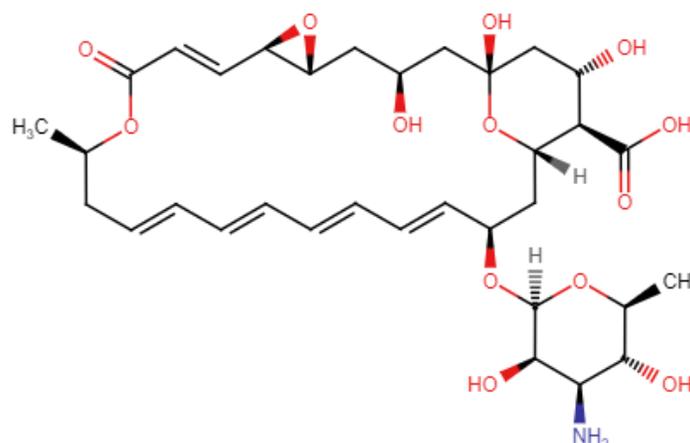
Figura 6. Reacción del α -tocoferol con el radical peroxilo.

2.2.1.2. Natamicina como antifúngico

La natamicina, o también llamada pimamicina es un antifúngico natural producido en la fermentación por la bacteria *Streptomyces natalensis*, este compuesto se denomina un macrólido poliénico y está conformado por un anillo de lactona con una cadena lipofílica rígida que contiene dobles enlaces conjugados y una porción hidrofílica flexible que lleva varios grupos hidroxilo **Figura 7** (EFSA 2009; Gregorí 2000; van Leeuwen et al. 2013). La natamicina es eficiente contra mohos y levaduras, pero no contra bacterias, virus y protozoos, siendo el mecanismo de acción su unión con las partículas lipídicas de la pared celular denominadas ergosterol, las cuales contribuyen alrededor de 25% de la membrana celular fúngica, es probable que la región hidrófoba de la natamicina se complemente con el ergosterol para formar poros polares que alteran la permeabilidad de la membrana lo que permite pasar iones H^+ , K^+ , aminoácidos, glúcidos,

interrumpiendo el control iónico de la célula, causando la muerte de la célula fúngica (Balaguer et al. 2014; Ollé Resa et al., 2014).

La natamicina ha sido utilizada como aditivo alimentario por lo que, al igual que el α -tocoferol es generalmente reconocida como segura (GRAS) (FAO/OMS 2019); la natamicina se puede aplicar directamente en alimentos líquidos y en superficies sólidas mediante inmersión, aspersión u otras técnicas, con el fin de controlar el crecimiento microbiano (Ollé Resa et al., 2014), también, el uso de la natamicina se ha extendido para su incorporación en diferentes materiales de envase, tal es el caso proteína de suero (Franssen, Rumsey, y Krochta 2004), alginato-quitosano (Altenhofen, Krause, and Kieckbusch 2012), gluten (Balaguer et al. 2014), almidón (Ollé Resa, Gerschenson, y Jagus 2016), almidón de maíz (González-Forte et al., 2019), entre otros.



Adaptado de *Reaxys*; Elsevier; 2020

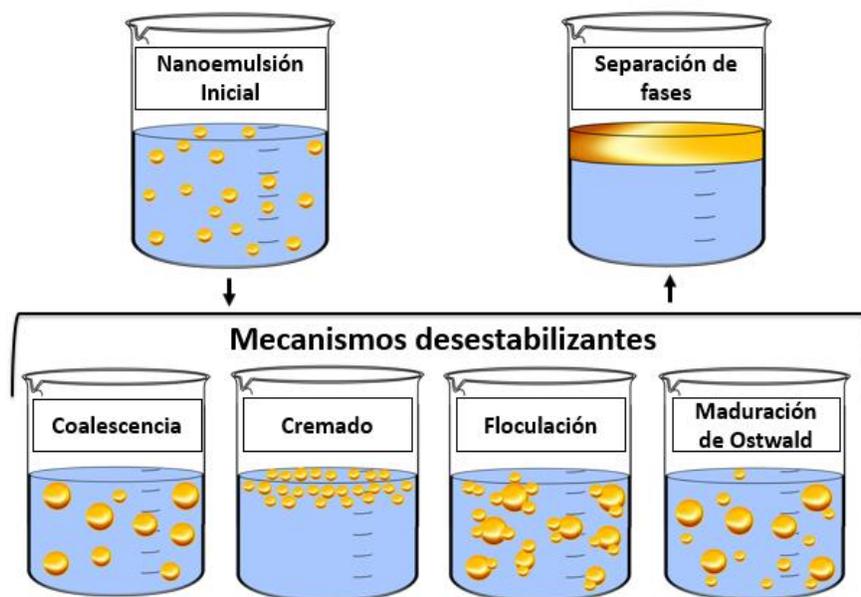
Figura 7. Estructura química de la natamicina

2.3. Nanoemulsión y Nanosuspensión

Los sistemas nanoemulsionados consisten en una suspensión de nanogotas líquidas (fase dispersa) dispersos en una fase líquida (fase continua), las gotas son estabilizadas por surfactantes o tensioactivos, estos sistemas cuentan con la característica de que su formulación, caracterización y escalado son sencillas (Aliofkhazraei 2015; Tessaro et al., 2021; Zhang et al., 2019); una nanoemulsión aceite en agua (O/W, oil in water) se compone de nanogotas lipídicas (en un rango

de 20-600 nm) dispersas en una fase acuosa (Cardoso y Jiménez 2015; Dammak et al., 2021; Teixidó 2015). En el mismo sentido, una nanosuspensión contiene un sólido disperso suficiente pequeño, también llamado fase dispersa en el medio de suspensión (fase continua) (Gooch 2007).

Las nanoemulsiones también se conocen como miniemulsiones, emulsiones finamente dispersas o emulsiones submicrónicas, debido a que la fase dispersa se encuentra en escala nanométrica, estas presentan dispersiones ligeramente turbias o transparentes, además de tener una mayor solubilidad y estabilidad ante los diferentes mecanismos que afectan su integridad (Aliofkhazraei 2015; Ganiari et al., 2017). La diferencia de tamaño de una dispersión a escala macro frente a una escala nano radica en que esta última es menos susceptible al cremado, porque el tamaño de las partículas induce la estabilización en la medida que las nanogotas están bajo la influencia del movimiento browniano, y también presenta una estabilidad frente a la floculación y coalescencia (**Figura 8**) debido a que la gama de fuerzas de atracción entre partículas disminuye con la reducción del tamaño (Villareal 2004).



Elaboración propia

Figura 8. Representación de varios procesos de degradación de una emulsión.

La desestabilización de las nanoemulsiones se debe principalmente a un fenómeno denominado maduración de Ostwald, este se debe a la difusión de la fase dispersa a través de la

continua entre dos gotas de diferentes tamaños, y el origen de este proceso comienza con las diferencias del radio de las gotas, que inducen diferencias en el potencial químico del material dentro de las gotas, reduciendo la energía libre en la emulsión, lo que también disminuye el área interfacial, resultando un crecimiento de las gotas de emulsión más grandes a costa de las más pequeñas (Aliofkhazraei 2015; Donsì y Ferrari 2016). Sin embargo, la maduración de Ostwald se puede disminuir al obtener nanoemulsiones con una distribución monomodal, es decir, baja polidispersión en el tamaño de la nanogota; otra forma, es controlar el coeficiente de difusión adicionando un segundo componente soluble en la fase dispersa e insoluble en la fase continua, y por último se puede controlar la tensión interfacial de la fase dispersa mediante la adición de tensoactivos (Donsì y Ferrari 2016; Tadros 2014).

2.3.1.1. *Surfactantes*

De manera general, las emulsiones son termodinámicamente inestables, por lo tanto, existe la necesidad de utilizar agentes estabilizantes que favorezcan la formación de las gotas y se evite la separación de las fases; estos compuestos se caracterizan por su estructura anfifílica, es decir, la molécula está constituida por una parte hidrofílica (polar) y otra parte lipofílica (apolar) (Rincón-Fontán et al. 2019).

Los surfactantes deben presentar algunos requerimientos para ser utilizados como emulsificantes (Rincón-Fontán et al. 2019; Villareal 2004):

- Debe ser seguro y no tóxico.
- Ejercer su función de emulsionante a bajas concentraciones.
- Ser más soluble en la fase continua que en la dispersa para que se pueda absorber alrededor de las gotas (fase dispersa).
- Migrar fácilmente hacia la interfase para formar una película fina resistente a la colisión entre gotas evitando la inestabilidad de la emulsión.
- Reducir la tensión interfacial.

La selección de un surfactante, se realiza según la mezcla de ingredientes o las características del producto final, es decir, la nanoemulsión que se pretende formar está en función de un balance entre las afinidad para la fase oleosa (lipofílica) y la fase acuosa (hidrófilas) del

surfactante (Aranberri et al. 2006). Esta propiedad se conoce como balance hidrófilo-lipófilo (HLB), este consiste en asignar a los surfactantes un número que está relacionado con la polaridad del surfactante, y dicha polaridad puede asemejarse a la de la fase oleosa a emulsionar (Tadros 2014), la **Tabla 7** proporciona los intervalos de HLB requeridos según el tipo de aplicación y en la **Tabla 8** se observan los diferentes valores de HLB de surfactantes, donde los más solubles en aceite o lipófilos tienen valores bajos de HLB (<9), y a los solubles en agua o hidrófilos tienen valores altos de HLB (>11).

Tabla 7. Aplicación de los surfactantes según su intervalo HLB.

<i>Aplicación</i>	<i>Rango HLB</i>
Emulsificante W/O	3-6
Humectante	7-9
Emulsificante O/W	8-18
Detergente	13-15
Solubilizante	15-18

Adaptado de (Tadros 2014).

Tabla 8. Valores HLB de algunos surfactantes.

<i>Surfactante</i>	<i>Nombre</i>	<i>HLB</i>
Monopalmitato de sorbitol	Span 40	6.7
Monoestearato de sorbitol	Span 60	4.7
Monooleato de sorbitol	Span 80	4.3
Monopalmitato de sorbitol polioxietilenado (20)	Tween 40	15.6
Monoestearato de sorbitol polioxietilenado (20)	Tween 60	14.9
Monooleato de sorbitol polioxietilenado (20)	Tween 80	15.0
Octil-fenol-1,5	Triton X-15	3.6
Octil-fenol-7,5	Triton X-114	12.4
Dodecil sulfato de sodio	Sipex SB	40.0
Dodecil sulfato de amonio	Sipon L-22	31.0
Dodecil sulfato de trietanolamina	Sipon LT6	34.0

Adaptado de (Tadros 2014)

Se han establecido varias ecuaciones para calcular los valores de HLB de un sistema a emulsionar, la Ec. (1) representa el cálculo del valor de HLB de una mezcla (HLB_M) de dos o más surfactantes (i), y está determinada por la masa de cada surfactante (m_i) y su valor de HLB (HLB_i) (Bouchemal et al. 2004).

$$HLB_M = \frac{\sum_i^n m_i HLB_i}{\sum_i^n m_i} \quad \text{Ec. (1)}$$

En resumen, se ha destacado la capacidad de este tipo de sistemas coloidales para transportar ingredientes activos, de este modo disminuye el impacto sobre las propiedades organolépticas en los alimentos adicionados, manteniendo una mayor biodisponibilidad de sus componentes bioactivos incorporados en la fase dispersa (Donsì y Ferrari 2016; Teixeira et al. 2017).

2.4. Migración química a los alimentos

La migración es la liberación de sustancias de bajo peso molecular denominados migrantes que están presentes en el material de envase, los cuales se transfieren hacia el alimento como resultado de la interacción o el contacto entre ellos, de ahí que la cinética de migración depende de la difusión de los migrantes en la matriz polimérica y del equilibrio de la sustancia en el material de envase y el alimento (Heldman y Lund 2007; Robertson 2013). Dada la variedad de materiales de envase, migrantes, alimentos, condiciones de envasado, entre otros, la elaboración de modelos para la predicción del comportamiento de diferentes sistemas envase-alimento ha sido objeto de atención y actualmente uno de los temas prioritarios de investigación de la tecnología de envases (Catalá y Gavara 2002; Samsudin et al., 2018).

La difusión de los migrantes está sujeta al control cinético y termodinámico siendo descritos mediante matemáticas de difusión derivadas de las leyes de Fick, estas leyes representan el proceso de difusión en función del tiempo de contacto, la temperatura del sistema, la cantidad del migrante y el espesor del material. En ese sentido, la dimensión cinética de la migración interpreta qué tan

rápido ocurre el proceso de migración y la dimensión termodinámica cuán extensivamente será la transferencia de sustancias al finalizar la migración (Barnes, Sinclair, y Watson 2007). Es importante comprender los factores que controlan la migración química porque de esta comprensión surge la capacidad de manipular una migración deseada o no a los alimentos, tal es el caso de un aumento de la migración cuando se incrementa la concentración del migrante, la temperatura del sistema, el tiempo y área de contacto; por el contrario, la migración disminuye si el migrante posee gran peso molar, y el material de envase tiene baja difusividad.

La migración se puede clasificar en *migración global* y en *migración específica*, la primera es la suma de todos los componentes del material de envase que son transferidos al alimento, ya sean de interés toxicológico o no, e incluirá sustancias que son fisiológicamente inofensivas, y la segunda se refiere a un solo compuesto individual el cual es identificable. En ambos casos, la migración puede ser determinada para cada material de envase destinado a entrar en contacto con el alimento (Mercosur/GMC/Res-03 1992; Ministerio de Protección Social 2012; Unión Europea/No-10 2011). Esta migración es representada mediante el fenómeno de difusión para el sistema envase-alimento exponiendo dos parámetros importantes, el *coeficiente de partición* y el *coeficiente de difusión*; el primero se define como la relación de la concentración del migrante en el material de envase en equilibrio y el segundo mide la velocidad a la que ocurre el proceso de difusión.

2.5. Modelación de la migración

La descripción matemática más conocida para la modelación de la migración en envases alimentarios involucra un modelo matemático basado en la segunda ley de Fick o ecuación de difusión descrita por Crank (1979) Ec. (2), este modelo es más apropiado en situaciones donde se miden o necesitan concentraciones como función de la posición y el tiempo, en otras palabras, estado transitorio. Por el contrario, existe otra ley más simple que no posee un nombre formal e involucra el coeficiente de transferencia de masa Ec. (3), este modelo es especialmente útil cuando solo están involucradas concentraciones promedio (Cussler 2009). La elección entre los modelos de transferencia de masa y difusión es, por lo tanto, una cuestión de gusto y no de precisión.

$$\frac{\partial C_p}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 C_p}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C_p}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C_p}{\partial z^2} \right) \quad \text{Ec. (2)}$$

$$\frac{\partial C_p}{\partial t} = h(C_p - C_{p,\infty}) \quad \text{Ec. (3)}$$

Donde $\frac{\partial C_p}{\partial t}$ es la variación de la concentración del migrante en el material de envase respecto al tiempo, D es el coeficiente de difusión, expresado en $(\text{cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ o } \text{m}^2 \text{ s}^{-1})$, $\frac{\partial^2 C_p}{\partial x^2}$, $\frac{\partial^2 C_p}{\partial y^2}$ y $\frac{\partial^2 C_p}{\partial z^2}$ corresponden a la variación de la concentración del migrante en cada componente en coordenadas cartesianas, h es el coeficiente convectivo de transferencia de masa, usualmente expresado en (m s^{-1}) , C_p y $C_{p,\infty}$ es la concentración del migrante en el material de envase y la misma concentración pero cuando el sistema llega a un equilibrio.

2.5.1. Coeficiente de partición

En el momento que se envasa un alimento, es decir, el material de envase entra en contacto con el alimento se crea un nuevo sistema (envase-alimento) que se encuentra inicialmente en desequilibrio, en tal sentido, la migración juega un papel importante debido a que las sustancias presentes en el envase comienzan un proceso de transporte hacia el alimento hasta que alcanza el equilibrio, el cual es denominado como coeficiente de partición ($K_{p,a}$) representado por la Ec. (4) y expresa la solubilidad relativa o afinidad química del migrante entre el envase y el alimento, relacionando la concentración del migrante en el envase ($C_{p,\infty}$) y en el alimento ($C_{a,\infty}$) respectivamente (Granda-Restrepo et al. 2009). Valores de $K_{p,a} = 1$ indica que las concentraciones del migrante en el envase y en el alimento son las mismas, $K_{p,a} < 1$ describe la alta afinidad del migrante en el alimento en contraste con el envase, y $K_{p,a} > 1$ indica una mayor concentración de migrante en el envase comparada con la del alimento (Cruz-Zuñiga 2011; Manzanarez-López et al., 2011; Samsudin et al., 2018).

$$K_{p,a} = \frac{C_{p,\infty}}{C_{a,\infty}} \quad \text{Ec. (4)}$$

Donde $C_{p,\omega}$ y $C_{a,\omega}$ corresponde a la concentración en equilibrio del agente activo o migrante en la película y el alimento.

2.5.2. Coeficiente de difusión

El coeficiente de difusión mide la velocidad a la que ocurre el movimiento de las partículas en el polímero o envase, la mayoría de los estudios de migración se limitan a trabajar con la ecuación de difusión de Fick más simple, expresando la Ec. (2) en una nueva expresión, que representa la transferencia de masa unidimensional Ec. (5), y cuya solución permite calcular el coeficiente de difusión.

$$\frac{\partial C_p}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 C_p}{\partial x^2} \right) \quad \text{Ec. (5)}$$

En el desarrollo de los modelos obtenidos de la ecuación anterior, se aplican los siguientes supuestos:

- La migración solo ocurre en el lado del material de envase que está en contacto con el alimento y es controlada por la difusión de Fick.

- Los coeficientes de partición ($K_{p,a}$) y de difusión (D) dependen de la temperatura y pueden ser constantes durante todo el experimento.

- La interfaz entre el material de envase y el alimento siempre están en equilibrio.

- No se produce interacción entre el material de envase y el alimento y los efectos de borde son despreciables.

- La masa total de los migrantes se conserva durante todo el proceso por lo que no se consideran reacciones químicas o evaporación de los compuestos migrantes (Ec. (6) y Ec. (7)).

$$M_{p,0} = M_{p,t} + M_{a,t} \quad \text{Ec. (6)}$$

$$M_{p,0} = M_{p,\infty} + M_{a,\infty} \quad \text{Ec. (7)}$$

Donde $M_{i,t}$ es la masa total del migrante en el tiempo para la fase i , es decir, material de envase (p) y alimento (a).

-En el caso de los envases activos, el material de envase contiene una concentración inicial del migrante (C_o) uniformemente distribuida, cuyas condiciones iniciales a $t = 0$ son:

$$C_p(x, 0) = C_o \quad C_a(x, 0) = 0 \quad \text{Ec. (8)}$$

Donde C_p y C_a corresponde a la concentración inicial del migrante en el material de envase y el alimento.

Se han identificado tres casos generales que describen el proceso de migración brindando solución a la Ec. (5), basado en que un compuesto activo presente en un material de envase en forma de película migra hacia el alimento (Crank 1979; Mascheroni et al., 2010; Poças et al., 2008; Samsudin et al., 2018), en donde según de las suposiciones hechas para la condición de frontera en la interfaz del sistema envase-alimento y en el volumen de la solución o alimento en sí, se obtienen los correspondientes modelos que son útiles para predecir la migración dentro del material de envase y determinar la difusividad; a continuación se describe cada caso con su respectivo modelo matemático.

2.5.2.1. *Modelo de difusión I*

El supuesto para desarrollar este modelo se basa en que el material de envase está en contacto con un volumen infinito del alimento y se tiene en cuenta el coeficiente de transferencia de masa externo.

$$\left. \frac{\partial C_p}{\partial x} \right|_{x=0} = 0 \quad -D \left. \frac{\partial C_p}{\partial x} \right|_{x=L} = h(C_p - C_{p,\infty}) \quad \text{Ec. (9)}$$

La solución de la ecuación diferencial parcial Ec. (5) corresponde

$$\frac{M_{a,t}}{M_{a,\infty}} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2Sh^2}{(q_n^2 + Sh + Sh^2)q_n^2} \exp\left[-\frac{Dq_n^2 t}{L^2}\right] \quad \text{Ec. (10)}$$

Donde $M_{a,t}$ es la cantidad de migrante en el alimento al tiempo de migración t , $M_{a,\infty}$ la cantidad del migrante en el equilibrio, D es el coeficiente de difusión, h es el coeficiente de transferencia de masa, L es el espesor medio del material de envase, $Sh = Lh/D$ es el número de Sherwood, y q_n son las raíces positivas de $q_n \tan q_n = Sh$ (Apéndice A. Raíces de $q_n \tan q_n = Sh$ y).

Este tipo de modelo se usa comúnmente cuando hay resistencia interfacial en la capa límite entre la película y el alimento, como en el caso una película en contacto con un alimento similar al aceite, bajas temperaturas, y / o cuando el número de Biot < 200 (Samsudin et al., 2018; Vitrac et al., 2007). En el caso de que $Bi > 200$ la Ec. (10) se puede reescribir o reducir al modelo de difusión III.

2.5.2.2. Modelo de difusión II

El modelo se basa en que el material de envase con un espesor $2L$ está suspendido en un volumen finito del alimento bajo agitación, y el coeficiente de transferencia de masa externo es despreciable.

La condición de frontera para este escenario es:

$$\left. \frac{\partial C_p}{\partial x} \right|_{x=0} = 0 \quad -D \left. \frac{\partial C_p}{\partial x} \right|_{x=L} = \frac{V_a}{A} \left. \frac{\partial C_a}{\partial t} \right|_{x=L} \quad \text{Ec. (11)}$$

Por consiguiente, la solución de la ecuación diferencial parcial Ec. (5) junto con las condiciones corresponde a la Ec. (12) y converge rápidamente para tiempos de difusión largos, mientras que para cortos tiempos es necesario utilizar un mínimo de 50 términos de la sumatoria (Barnes, Sinclair, y Watson 2007).

$$\frac{M_{a,t}}{M_{a,\infty}} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2\alpha(1+\alpha)}{1+\alpha+\alpha^2q_n^2} \exp\left[-\frac{Dq_n^2 t}{L^2}\right] \quad \text{Ec. (12)}$$

$$\alpha = \frac{1}{K_{p,a}} \frac{V_a}{V_p} = \frac{1}{K_{p,a}} \frac{L_a}{L_p} \quad \text{Ec. (13)}$$

Donde α es una relación adimensional entre el volumen del alimento (V_a), el material de envase (V_p) y el coeficiente de partición, por ejemplo, si $K_{p,a}$ es alto debido a una baja migración, el valor de α tiende a ser pequeña y viceversa; q_n son las raíces positivas diferentes de cero de $\tan q_n = -\alpha q_n$ (Apéndice A. Raíces de $q_n \tan q_n = Sh$ y) que, según Barnes et al., (2007) son necesarios mínimo 50 términos de la serie para que la ecuación converja en cortos periodos de tiempo y Catalá y Gavara, (2002) recomiendan más de 500 términos para el mismo periodo de tiempo.

Un caso particular en que $\alpha \gg 1$ debido a que $V_a \gg V_p$ o $K_{p,f} < 1$ se puede hallar una solución más simplificada que corresponde al *modelo de difusión III* debido a que las raíces de $q_n = \left(n + \frac{1}{2}\right)\pi$, y se presenta a continuación:

2.5.2.3. *Modelo de difusión III*

Este modelo se basa en el supuesto de que el material de envase está en contacto con un volumen infinito de alimento y el coeficiente de transferencia de masa externo es despreciable. Se debe tener en cuenta que el valor de L depende del número de superficies en el que el material de envase está en contacto con el alimento, para una superficie L corresponde al valor del espesor de la película y si son dos superficies, L es la mitad.

$$\frac{M_{a,t}}{M_{a,\infty}} = 1 - \sum_{n=0}^{\infty} \frac{8}{(2n+1)^2\pi^2} \exp\left[-\frac{D(2n+1)^2\pi^2 t}{L^2}\right] \quad \text{Ec. (14)}$$

2.5.3. Dependencia del coeficiente de difusión con la temperatura

Para determinar el efecto de la temperatura en la difusión de los migrantes incorporados en la película de proteína, la energía de activación se ha calculado mediante la ecuación de Arrhenius (Granda-Restrepo et al., 2009; Manzanarez-López et al., 2011).

$$D = D_o \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad \text{Ec. (15)}$$

Donde D es el coeficiente de difusión, D_o es el factor pre-exponencial de la difusión, E_a es la energía de activación (J mol^{-1}) de la difusión, R es la constante de gases ideales ($8.3145 \text{ J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$), y T es la temperatura en K.

A continuación, se presenta la fundamentación de los modelos multiescala, los cuales serán tenidos en cuenta para la estimación del coeficiente de difusión para la natamicina y el α -tocoferol que se encuentran incorporados en el material de envase.

2.5.4. Modelación de integración multiescala

La simulación multiescala puede definirse como una metodología que permite vincular fenómenos, modelos e información entre varias escalas de sistemas complejos, tal es el caso en la investigación computacional de materiales, donde se ha convertido en una herramienta ideal para modelar y predecir diversas propiedades, tales como, estructurales, térmicas, mecánicas y de transporte a nivel macroscópico, existiendo aún una incertidumbre sobre cómo predecir muchas propiedades de interés industrial (Fermeglia y Priol 2007). La modelación multiescala se ha convertido en una alternativa muy prometedora para estudiar el fenómeno de migración en la que los coeficientes de difusión se determinan periódicamente para el sistema de envasado.

2.5.4.1. Modelación en la escala nano

Una alternativa para conocer el movimiento de los compuestos activos en el sistema de envasado, es de utilizar un tipo de aproximación de Lagrange denominada Random Walk (RW) o caminata aleatoria, siendo denominada una técnica precisa y fácil de utilizar como lo demostró Fayazi y Ghazanfari., (2015) en el estudio de un flujo miscible en un medio poroso heterogéneo, Hernández (2008) en la agregación de partículas coloidales en dispersiones poliméricas, y Huang et al., (2019) en el estudio de la difusión de medios porosos complejos; es entonces que en el proceso de difusión, la materia es transportada de una parte del sistema a otra parte como resultado del movimiento aleatorio de las moléculas, en el caso del presente estudio desde el material de envase hacia el alimento. En el desarrollo de la teoría del movimiento Browniano, Einstein y Smoluchowski fueron pioneros en describir el movimiento Browniano microscópico observado en partículas coloidales a través del coeficiente de difusión macroscópico de la difusión Fickiana, la Ec. (16) define el coeficiente de difusión constante y es conocida como la ecuación de difusión de Einstein (Cussler 2009; Hernández 2008; Honary et al. 2019).

$$\langle r \rangle^2 = 2n_d D_j t \quad \text{Ec. (16)}$$

Donde r^2 es la distancia máxima de la partícula, n_d es el número de dimensiones, D_j es el coeficiente de difusión del compuesto j ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ o $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$).

El método de seguimiento aleatorio de las partículas en el tiempo y en el espacio unidimensional esta descrito por la expresión estocástica (Ec. (17)), dicho método es ampliamente utilizado en el análisis de dispersión y de difusión (Fayazi y Ghazanfari 2015; Huang et al., 2019; Nordam et al., 2019).

$$x(t + \Delta t) = x(t) + \xi \sqrt{2D_{ij}\Delta t} \quad \text{Ec. (17)}$$

Donde D_{ij} es el coeficiente de difusión inicial i del compuesto j ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), ξ es un número aleatorio con distribución normal (media = 0 y varianza = 1), y Δt es el cambio del tiempo (s). El mayor desplazamiento posible de las partículas durante un paso de tiempo debería satisfacer la condición en relación con la discretización de la resolución espacial Δx para la siguiente expresión:

$$\xi_1 \sqrt{2D_i \Delta t} \leq \Delta x \quad \text{Ec. (18)}$$

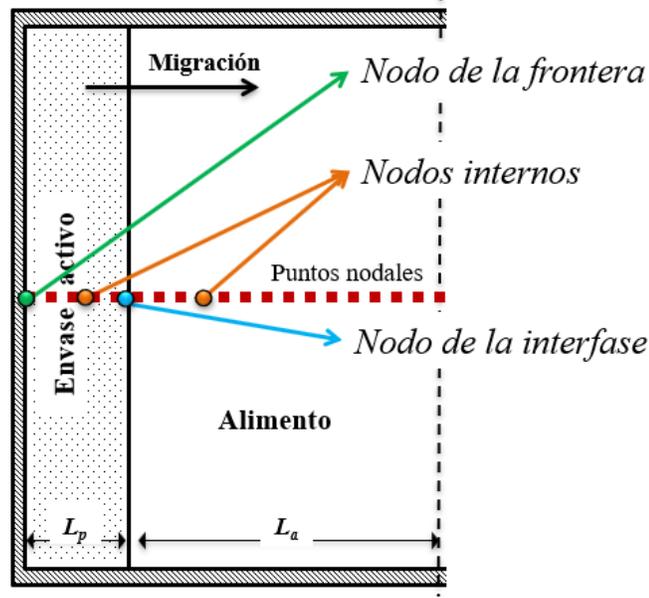
Estas técnicas son adaptadas para simular el desplazamiento de partículas en diferentes medios, el coeficiente de difusión se obtiene ajustando el perfil de concentración predicho del modelo de caminata aleatoria a los datos experimentales (Fayazi y Ghazanfari 2015), algunas consideraciones de la aplicación de la ecuación de Einstein para el movimiento Browniano son:

- Cada partícula representa una parte del total de la masa del soluto.
- Cada partícula individual ejecuta un movimiento que es independiente de los movimientos de todas las demás partículas.
- Los movimientos de una partícula dada en diferentes intervalos de tiempo son procesos independientes, estos intervalos determinan la evolución del sistema.

2.5.4.2. *Modelación en la escala meso/macro*

Desde un punto de vista matemático el sistema de envasado activo se puede considerar como un sistema complejo, pudiéndose utilizar modelos matemáticos basados en aproximaciones numéricas como lo es el método de diferencias finitas donde puede proporcionar predicciones del comportamiento de la migración en estado transitorio, es decir, conocer los perfiles de concentración de cada compuesto como función del tiempo y de la posición siendo una alternativa de soluciones analíticas para las leyes de Fick (Ghajar y Cengel 2014; Tveito y Winther 2006), la **Figura 9** representa el sistema de envasado, la clasificación y distribución de los diferentes nodos a tener en cuenta en el desarrollo de las diferencias finitas (método explícito), el cual está sujeto a los siguientes supuestos:

- El sistema envase-alimento se encuentra aislado.
- El envase está en pleno contacto con el alimento.
- La transferencia de masa es unidimensional en una pared plana en estado transitorio y va del material de envase hacia el alimento.
- El coeficiente de difusión de los compuestos es constante en el material de envase (subíndice p) y el alimento (subíndice a).



Elaboración propia

Figura 9. Puntos nodales para la formulación en diferencias finitas unidimensional en el sistema de envasado activo.

La formulación matemática en estado transitorio en el sistema envase-alimento es considerada como una pared plana con espesor L_p para el material de envase y L_a para el alimento, M nodos en el intervalo $(1, M)$, un espaciamiento nodal de $\Delta x = L/(M - 1)$, y las ecuaciones se presentan a continuación:

Para el nodo de frontera aislada ($m = 1$) que está en contacto con el material de envase se representa con la ecuación nodal:

$$C_m^{i+1} = 2\tau_{p,j}C_{m+1}^i + (1 - 2\tau_{p,j})C_m^i \quad \text{Ec. (19)}$$

Las ecuaciones para los nodos internos del material de envase, el alimento y la interfase se representan por las ecuaciones Ec. (20), Ec. (21), y Ec. (22) respectivamente.

$$C_m^{i+1} = \tau_{p,j}(C_{m-1}^i + C_{m+1}^i) + (1 - 2\tau_{p,j})C_m^i \quad \text{Ec. (20)}$$

$$C_m^{i+1} = \tau_{a,j}(C_{m-1}^i + C_{m+1}^i) + (1 - 2\tau_{a,j})C_m^i \quad \text{Ec. (21)}$$

$$C_m^{i+1} = \tau_{p,j} C_{m-1}^i + \left(1 - \tau_{p,j} - \frac{D_{p,j}}{D_{a,j}} \tau_{p,j} \right) C_m^i + \frac{D_{p,j}}{D_{a,j}} \tau_{p,j} C_{m+1}^i \quad \text{Ec. (22)}$$

Donde $\tau_{p,j} = D_{p,j} \Delta t / \Delta x^2$ es un número adimensional para envase del compuesto j , $D_{p,j}$ y $D_{a,j}$ es el coeficiente de difusión en el envase y alimento de j ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), el término C_m^{i+1} expresa la concentración nodal en el material de envase y alimento respectivamente (mg kg^{-1}) para el tiempo $i+1$. Por último, la escala macroscópica se determina el perfil de concentración como función del tiempo, para lo que utiliza el promedio de las concentraciones del compuesto j obtenidas de todos los nodos en el sistema envase alimento para cada intervalo de tiempo.

En el numeral 2.5.2 se ha mostrado el método tradicional de como se ha modelado el proceso de difusión de un migrante macroscópico en una lámina plana, lo que corresponde a la geometría del envasado activo, y que según las condiciones del sistema se puede utilizar una de las tres formas de la solución analítica a la segunda ley de Fick en el cálculo del coeficiente de difusión a través de los datos experimentales (numerales 2.5.2.1, 2.5.2.2 y 2.5.2.3); en el caso de este trabajo, el material de envase fabricado a partir de proteína concentrada de lactosuero está en contacto directo con el alimento sólido y bajo los supuestos del numeral 2.5.4.2 cumple con las condiciones para utilizar el modelo de difusión expresado en la Ec. (14), además mediante la modelación multiescala permite obtener más información sobre el proceso de difusión, desde la escala nanométrica a la cual se encuentran los compuestos de interés incorporados en el material de envase, y mediante la integración de diferentes técnicas de simulación en las diferentes escalas permite modelar y/o simular el proceso de difusión, con la bondad de ahorrar tiempo y recursos, otra ventaja desde el método en sí, lo plantea Urrea-Quintero et al., (2020) expresando que las fluctuaciones estocásticas de los estados microscópicos a aproximar no son significativos en las escalas más grandes, describiendo adecuadamente el sistema.

3. METODOLOGÍA

3.1. Materiales

Todos los reactivos fueron de grado cromatográfico o analítico, correspondiendo a: Proteína concentrada de lactosuero (*PCL*, 80% *m/m*) obtenida de Ingredientes y productos funcionales, Colombia; Natamicina (*NAT*, 50% *m/m* en lactosa, ZSEB-E Co. Ltd, China); Estándar de α -tocoferol (α -*TOC*, > 97% *m/m* Sigma-Aldrich, USA); glicerol (*Gli*, J.T.Baker, Alemania); polisorbato 80 (Tween® 80), monoestearato de sorbitano (Span® 60) de Sigma-Aldrich, Sao Paulo, Brasil. Para la prueba de capacidad antioxidante se utilizó ABTS^{•+}: sal diamónica del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), Trolox: ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico, TPTZ: 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina y DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, persulfato de potasio, ácido clorhídrico, metanol, etanol, tricloruro de hierro, buffer acetato de sodio, (Sigma-Aldrich, EUA). Los microorganismos utilizados para las pruebas microbiológicas fueron *Candida albicans* ATCC 10231, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601, and *Penicillium chrysogenum* ATCC 10106 y la sal de tetrazolium MTT (Bromuro de [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazol]) fueron suministrados por el grupo de investigación Toxinología, alternativas terapéuticas y alimentarias de la Universidad de Antioquia; los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de los hongos y levaduras fueron agar y caldo Sabouraud agar (Merk, Alemania). Para los ensayos de migración y cuantificación de volátiles se utilizó queso fresco, semiduro y graso (queso doble crema con aproximadamente 26.7% *m/m* de grasa) fabricado por Colanta, Colombia; metanol, acetonitrilo grado HPLC, ácido fórmico (98%) los tres de JT Baker, Alemania, sulfato de sodio anhidro (Panreac, Alemania), estándar de hexanal (> 97 %) y estándar interno 4-heptanona, ambos de Sigma-Aldrich, USA.

3.2. Nanosuspensión de natamicina

3.2.1. Diseño experimental

Para la elaboración de las nanosuspensiones (nS) de natamicina se utilizó un diseño de un solo factor en el cual el interés radica en la comparación de los niveles de un simple factor determinado como la concentración de *NAT* (ppm, mg kg^{-1}) completamente al azar con tres réplicas y como variable respuesta el tamaño medio de partícula (nm), la concentración de *NAT* varió desde 100 hasta 600 ppm (mg kg^{-1}) con intervalos de 100 ppm, siendo estas realizadas por triplicado (Noordam et al. 2002; van Rijin, Tan, y Warmerdam 1998; Sáez 2017).

3.2.2. Preparación de la nanosuspensión de natamicina

Para la elaboración de la nanosuspensión de natamicina (nS *NAT*) se usó el método descrito en la patente ES2143586T3 por Noordam et al., (2002) con algunas modificaciones, estos autores utilizaron la natamicina en suspensiones acuosas concentradas, hasta un 40% (*m/m*). Se fabricaron 6 tipos de nS basado en el diseño experimental y cuya formulación se muestra en la **Tabla 9**. Primero, se adicionó el Gli y el Tween 80 con el agua bajo agitación magnética durante 20 minutos, posteriormente se adicionó la *NAT* y se homogenizó con un homogenizador MicroDisTech MDT100 (Kinematica, Suiza) utilizando 5-periodos a 20000 rpm durante 5 minutos con 3 minutos de reposo.

Tabla 9. Formulaciones de nanosuspensión de natamicina

<i>Tratamiento</i>	<i>Concentración de natamicina (mg kg^{-1})</i>					
	100	200	300	400	500	600
	<i>Porcentaje de ingrediente (%)</i>					
Natamicina (50%)	0.020	0.040	0.060	0.080	0.100	0.120
Glicerol	0.005	0.010	0.015	0.020	0.025	0.030
Tween 80	0.002	0.004	0.006	0.008	0.010	0.012
Agua	99.973	99.946	99.919	99.892	99.865	99.838

3.3. Nanoemulsiones de α -tocoferol

3.3.1. Diseño experimental

Para conocer la concentración óptima de los componentes en la nanoemulsión (nEm) aceite en agua (*O/W*) de α -tocoferol se evaluó el efecto de tres factores o variables independientes en % (*m/m*) de α -*TOC* (x_1), mezcla de surfactantes (x_2) y agua (x_3) sobre las variable respuesta tamaño medio de gota (Y_1), para lo cual se utilizó un diseño de mezclas “Simple Lattice”, con un aumento de diseño obteniendo 10 combinaciones experimentales, cada uno evaluada por triplicado determinado por el software Statgraphics® centurion Version 17.2.00 (Statpoint Technologies, Inc., EUA); este tipo de diseño permite estudiar la posible interacción entre compuestos a través de la construcción de modelos polinomiales utilizando pocas corridas (Ferreira-Nunes et al. 2018; Lazcano Díaz et al. 2019; Rincón-Fontán et al. 2019), la **Tabla 10** presenta los porcentajes y los valores codificados mediante pseudocomponentes de las variables independientes.

Tabla 10. Diseño experimental del diseño de mezclas para tres componentes

<i>Tratamiento</i>	<i>Valores experimentales</i>			<i>Valores codificados</i>		
	<i>(% m/m)</i>			x_1	x_2	x_3
	x_1	x_2	x_3	x_1	x_2	x_3
1	1.80	1.04	97.16	0.17	0.17	0.67
2	3.42	1.04	95.54	0.67	0.17	0.17
3	2.88	0.50	96.62	0.50	0.00	0.50
4	2.88	2.12	95.00	0.50	0.50	0.00
5	2.34	1.58	96.08	0.33	0.33	0.33
6	1.26	0.50	98.24	0.00	0.00	1.00
7	1.26	2.12	96.62	0.00	0.50	0.50
8	1.80	2.66	95.54	0.17	0.67	0.17
9	1.26	3.74	95.00	0.00	1.00	0.00
10	4.50	0.50	95.00	1.00	0.00	0.00

Donde: α -*TOC* (x_1), mezcla de surfactantes (x_2) y agua (x_3).

3.3.2. Análisis estadístico y optimización

Se utilizó un análisis de regresión de mínimos cuadrados para determinar la significancia estadística de los diferentes modelos a los datos experimentales; para evaluar la idoneidad de los modelos se consideró el valor $p \leq 0.05$ y el mayor R^2 obtenido del análisis de varianza (ANOVA)

(Lazcano Díaz et al. 2019; Rincón-Fontán et al. 2019). Las hipótesis para el diseño de experimentos fueron las siguientes, *H₀*: la combinación de los factores no afecta el tamaño de partícula de la nano dispersión, y *H_i*: El tamaño de partícula se ve afectado por la combinación de los factores.

Modelo Lineal

$$Y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 \quad \text{Ec. (23)}$$

Modelo Cuadrático

$$Y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 \quad \text{Ec. (24)}$$

Modelo Cúbico especial

$$Y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{123} x_1 x_2 x_3 \quad \text{Ec. (25)}$$

Donde *Y* es la variable respuesta, β_i , β_{ij} , β_{ijk} son los coeficientes de la regresión, y x_i son los factores del diseño.

Las proporciones óptimas de los componentes de las nanoemulsiones (x_1 , x_2 , y x_3) fueron determinadas de acuerdo a la minimización de la variable respuesta: tamaño medio de gota (Özbek y Ergönül 2020; Cornell 2011). Los análisis estadísticos y el proceso de optimización fueron realizados con el software Statgraphics® centurion Version 17.2.00 (Statpoint Technologies, Inc., EUA).

3.3.3. Preparación de la nanoemulsión de α -tocoferol mediante el método de cizalla

Las nanoemulsiones fueron preparadas por emulsificación espontánea seguida de homogenización de alta cizalla de acuerdo con Bouchemal et al., (2004) y Kaur et al., (2016) respectivamente con algunas modificaciones. Cada nEm de α -TOC se preparó partiendo de una emulsión gruesa (O/W) con un balance hidrófilo lipófilo (HLB) de 11 (**Tabla 11**), la cual se elaboró a partir de una fase orgánica compuesta de α -TOC, Span 60 (HLB = 4.7) y etanol mezcladas en un

agitador magnético (AA-2050, Gehaka, Brazil) 10 min a 35 °C. Simultáneamente se preparó la fase acuosa compuesta de agua destilada y Tween 80 (HLB = 15) usando un agitador magnético 10 min a 25 °C. Posteriormente las dos fases se mezclaron y homogenizaron mediante un homogenizador Ultraturrax® IKA T25 (Labotechnik, Alemania) utilizando 5-períodos a 20000 rpm durante 5 min con 3 min de reposo.

Tabla 11. Formulación de la fase orgánica y acuosa para las nanoemulsiones

<i>Fase</i>	<i>Ingrediente</i>	<i>Rango (% m/m)</i>	
		<i>Mín</i>	<i>Máx</i>
<i>Orgánica</i>	<i>α-TOC</i>	1.26	4.50
	<i>Span 60</i>	0.19	1.45
	<i>Etanol</i>	1.50	5.36
<i>Acuosa</i>	<i>Tween 80</i>	0.31	2.29
	<i>Agua</i>	95.00	98.24

3.4. Caracterización de la nS de NAT y nEm de α -TOC

3.4.1. Tamaño medio de gota, índice de poli dispersión y potencial zeta

El tamaño medio de gota, el índice de polidispersión (IPD) y el potencial zeta (PZ) de cada una de las nS de natamicina y las nEm de α -TOC fueron determinadas utilizando la técnica de dispersión de luz láser con un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). Las muestras se diluyeron en agua miliQ (1:100) antes de las mediciones a 25 °C, tres réplicas fueron realizadas para cada una, los resultados fueron obtenidos del software Zetasizer v.7.11 (Malvern

Instruments, Reino Unido) reportando el promedio y su desviación estándar (Ghadetaj et al., 2018; Pérez-Córdoba et al. 2018).

3.4.2. Estabilidad de la nanosuspensión y la nanoemulsión

La estabilidad de la nEm de α -TOC y su mezcla con nS de NAT elaborada por el método de dispersión de alta energía (numeral 3.3.3) fue medido según lo propuesto por Pérez-Córdoba et al., (2018) y Dammak et al., (2017), con el fin de simular la estabilidad en condiciones de almacenamiento durante 6 meses (180 d); se depositó 0.4 mL de la muestra en una celda de policarbonato con un radio de 130 mm para ser centrifugada a 4000 rpm (2325.4 x g) en una centrifuga analizadora de dispersión LUMISizer® (LUM GmbH, Berlin, Alemania) a 20 °C, 865 nm y factor de luz cada 10 s durante 2 horas. Los resultados fueron obtenidos del software SepView v. 4.1 (L. U. M, Alemania).

3.4.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La determinación de la CMI para las nS de NAT se determinó bajo el método colorimétrico de microdilución en caldo utilizado por Abate et al., (1998) y Ciro et al., (2014) con algunas modificaciones, la CMI se evaluó para los siguientes microorganismos: *Candida albicans* (ATCC 10231), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601), y *Penicillium chrysogenum* (ATCC 10106).

El crecimiento de los microorganismos se realizó bajo las directrices de método utilizado por Ciro et al., (2014) con ligeras modificaciones, para *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*, se utilizó 100 mL de caldo Sabouraud a 37 °C durante 12 horas en continua agitación mediante un shaker (Heidolph Unimax 1010, Alemania) hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial. El *Penicillium chrysogenum* se cultivó en un tubo de agar inclinado usando 50 mL de agar Sabouraud incubado a 37 °C hasta que alcanzó la esporulación. El día de la prueba antimicrobiana, las esporas se rasparon con agua estéril.

Para evaluar la CMI de las muestras se utilizaron microplacas de 96 pozos (Biologix, EUA), se prepararon diluciones de nS de NAT en un rango de 0.4 hasta 100 mg kg⁻¹ y para evaluar el

efecto de los ingredientes de la nanoemulsión, se realizaron las mismas diluciones de nS de *NAT*, pero con la mezcla de una nEm de α -TOC. Se tomaron 20 μ L de cada muestra, se le adicionaron 200 μ L de caldo Sabouraud y 10 μ L del inóculo del microorganismo con una turbidez de 0.5 en una escala de McFarland (aproximadamente con 1.5×10^8 UFC/mL), posteriormente se llevó a incubación a 37 °C durante 12 horas. Pasado el este tiempo se adicionaron 25 μ L de una solución de MTT (0.8 mg mL^{-1}) incubando nuevamente a 37 °C/ 1 hora permitiendo que las células viables metabolizaran el MTT a formazán; después se realizó la lectura colorimétrica, debido a que los microorganismos viables reducen el MTT soluble, de color amarillo para convertirlo en un producto de color azul intenso e insoluble (formazán) (G. Ciro 2012). El valor de CMI corresponde a concentración del primer pozo que no presentara cambio de color (amarillo a azul).

3.4.4. Actividad antioxidante

Se realizó las pruebas de ABTS⁺, DPPH[•] y FRAP a la nEm α -TOC optimizada y a una mezcla de nEm con nS de *NAT*, estas pruebas fueron realizadas por triplicado y los resultados fueron expresados en Capacidad antioxidante equivalente al trolox, TEAC ($\mu\text{mol/g}$ muestra).

3.4.4.1. Preparación de la muestra

Cada una de las muestras se preparó bajo el método propuesto por Contreras-Calderón et al., (2011) con ligeras modificaciones, con el fin de garantizar la solubilización completa del α -TOC presente en la nEm, se tomaron 0.1 g de nEm en un tubo de ensayo, se agregaron 6 g de una solución metanol-agua (50:50 *v/v*), después fue llevado a agitación durante 3 minutos a un agitador de tubos Vortex (Benchmark, EUA), después fue adicionado 6 g de una solución acetona-agua (60:40, *v/v*) y se repitió la agitación en el Vortex, finalmente la solución se ajustó hasta 25 g con agua destilada, a esta última solución se llamó extracto.

3.4.4.2. Método ABTS⁺

Este método se realizó de acuerdo a lo propuesto por Re et al., (1999) con algunas modificaciones; inicialmente se preparó una solución acuosa de la sal ABTS a 7mM, el radical

ABTS^{•+} se produjo al mezclar partes iguales de la solución anterior junto con una solución de persulfato de potasio 2.45 mM, esta mezcla se almacenó a temperatura ambiente durante 16 h y en completa oscuridad. Transcurrido ese tiempo, se midió la absorbancia a 730 nm con un espectrofotómetro UV-Vis (Mapada-UV330, China) y fue ajustada con etanol a un valor de 0.7 ± 0.02 nm. Para el análisis, se tomaron 100 μL de extracto (previamente obtenido en el numeral 3.4.4.1), se mezcló con 1 mL de radical ABTS^{•+} y fue incubada a 30 °C durante 30 min en oscuridad, posterior al tiempo se realizó la medida de absorbancia; la curva de calibración se realizó en paralelo utilizando una solución de Trolox (2.45 mM) en un rango de 0 hasta 500 $\mu\text{M L}^{-1}$ (Contreras-Calderón et al. 2011).

3.4.4.3. *Método DPPH•*

El método utilizado se basó en las directrices de Alam et al., (2013) con modificaciones menores. La preparación del radical DPPH• se realizó diluyéndolo con etanol hasta una concentración de 120 μM y almacenado a 4 °C durante 24 horas en completa oscuridad. Para el análisis, se tomó 0.2 mL de extracto, el cual se mezcló con 2 mL de etanol y, a continuación, con 2 mL de radical DPPH•, esta última solución fue incubada a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente se determinó la absorbancia a 515 nm usando un espectrofotómetro UV-Vis (Mapada-UV330, China) (Pérez-Córdoba et al. 2018); la curva de calibración se realizó en paralelo utilizando una solución de Trolox (2.45 mM) en un rango de 0 hasta 500 $\mu\text{M L}^{-1}$.

3.4.4.4. *Método FRAP*

El método FRAP (poder antioxidante de la reducción férrica) se realizó de acuerdo a lo propuesto por Benzie y Strain, (1999) con modificaciones; el reactivo de FRAP se preparó mediante la reacción de 2.5 mL de TPTZ (preparado en 40 mM de HCl), 2.5 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM) y 25 mL de buffer acetato de sodio (0.3 mM, pH 3.6), esta solución se mantuvo a 37 °C. Para el análisis, se mezcló 30 μL de extracto con 90 μL de agua destilada y 900 μL de reactivo FRAP, la mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min. Posteriormente, se midió la absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro UV-Vis (Mapada-UV330, China) (Contreras-Calderón et al. 2011);

la curva de calibración se realizó en paralelo utilizando una solución de Trolox (2.45 mM) en un rango de 0 hasta 500 $\mu\text{M L}^{-1}$.

3.5. Preparación de la solución formadora de película

Se formularon cuatro soluciones formadoras de película (SFP) las cuales se muestran en la **Tabla 12**. La SFP fue preparada bajo continua agitación, disolviendo PCL en agua destilada, nS de NAT, nEm de α -TOC, o ambos y se adiciono el plastificante (Gli) ajustando el pH a 7 con una solución acuosa de NaOH 0.1 M, ese valor de pH está por encima del rango del punto isoeléctrico de la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina (pH 4.6 a 5.2) respectivamente (Buggy et al., 2018; Ramos et al., 2013). Al finalizar la incorporación de los componentes, la SFP se calentó a 90°C durante 20 minutos en un baño (Marconi®, MA-184, SP, Brasil) y homogenizada a 7000 rpm con un Ultraturrax® IKA T25 (Labotechnik, Alemania) (Bonilla and Sobral 2016), transcurrido este tiempo, se realizó un choque térmico en un baño de hielo hasta temperatura ambiente.

Tabla 12. Formulaciones de las SFP para las películas de PCL incorporadas con los compuestos activos

<i>Película</i>	<i>Componente</i>	<i>P0</i>	<i>P1</i>	<i>P2</i>	<i>P3</i>
<i>Composición en la película</i>	α -TOC (%)	0	2	0	2
	NAT (ppm)	0	0	300	300
<i>Formulación de la SFP (% m/m)</i>	PCL	10.0	10.0	10.0	10.0
	Agua destilada	85.0	52.5	25.0	0
	Glicerol	5.0	5.0	5.0	5.0
	nEm α -TOC	0	32.5	0	32.5
	nS NAT	0	0	60	60

3.6. Producción de las películas

La producción de las películas fue realizada mediante el método de solvent casting, el cual consistió en verter la respectiva SFP en placas de poliestireno de 12 cm de arista, controlando la proporción masa de SFP/área de la placa para mantener el espesor de la película, a continuación,

se secaron en una estufa de aire forzado (Marconi, MA035/5, Brasil) a 30 °C durante 12 horas. Transcurrido el tiempo de secado de las películas, se desmoldaron realizando una revisión visual para llevarlas a acondicionamiento durante 7 días, una parte se llevó en un desecador con sílica gel (humedad relativa \approx 0%) para los análisis de microscopia electrónica de barrido (MEB) y microscopia de fuerza atómica (MFA), y la otra parte de las películas se llevaron a un desecador con una solución saturada de NaBr (Humedad relativa = 58% y actividad de agua = 0.58 en equilibrio) antes de la caracterización se las propiedades fisicoquímicas, antioxidantes y antimicrobianas (Bonilla y Sobral 2016; Pérez-Córdoba et al., 2018).

3.7. Caracterización de las películas

3.7.1. Espesor

El espesor fue medido en 10 lugares aleatorios de la película utilizando un micrómetro digital (\pm 0.001 mm; Mitutoyo IP65 Mitutoyo, Japón) con una tolerancia de 0.001 mm (Granda et al. 2014).

3.7.2. Humedad

La humedad (CH) (% m/m) se determinó a muestras de película de 20 mm de diámetro, cada muestra se depositó en un pesafiltro y se llevó a una estufa de secado (315 SE, Fanem, Brazil) a 105 °C durante 24 horas (Pérez y Sobral 2017). El contenido de humedad se calculó con la Ec. (26) (Ahmed e Ikram, 2016).

$$CH = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad \text{Ec. (26)}$$

Donde m_i es la masa inicial (g) de la muestra, y m_f es la masa final (g) de la muestra.

3.7.3. Solubilidad en agua y grado de hinchamiento

La solubilidad en agua (SA) (% m/m) y el grado de hinchamiento (GH) (% m/m) se determinaron a muestras de película de 20 mm de diámetro, las cuales fueron pesadas y depositadas en un beaker con 50 mL de agua destilada, se llevaron a agitación en un Shaker (SOLAB-SL223, Brasil) con 25 rpm a 25 °C durante 24 horas; después, las muestras fueron removidas del agua, se secaron de forma superficial con un paño y se pesaron nuevamente. Continuando para la metodología de solubilidad en agua, las anteriores muestras fueron llevadas a una estufa a 105 °C durante 24 horas y pesadas después del tiempo de secado (Blanquicet et al. 2015; Schmid et al. 2017; Ghadetaj et al., 2018; Pérez et al. 2018). La SA fue calculada con la Ec. (27) y el GH mediante la ecuación Ec. (28).

$$SA = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad \text{Ec. (27)}$$

Donde m_i es la masa inicial (g) de la muestra, y m_f es la masa final (g) de la muestra.

$$GH = \frac{m_f - m_i}{m_i} \times 100 \quad \text{Ec. (28)}$$

Donde m_i es la masa inicial (g) de la muestra, y m_f es la masa final (g) de la muestra, transcurridos las 24 h de inmersión en agua.

3.7.4. Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) ($\text{g Pa}^{-1}\text{s}^{-1}\text{m}^{-1}$) fue obtenida gravimétricamente acorde al método reportado por Ahmed y Ikram (2016) y Dammak et al., (2017) adaptando el método estándar ASTM E96/E96M (ASTM, 2016) con algunas modificaciones. Se seleccionaron las películas que no presentaron agujeros ni burbujas, estas se cortaron en discos de 65 mm de diámetro, cada disco se colocó en un vaso de aluminio conteniendo 50 g de sílica gel (Humedad relativa $\approx 0\%$). Una vez asegurado, cada vaso fue puesto en un desecador hermético pre-equilibrado con agua (Humedad relativa $\approx 100\%$) a 25 °C en una incubadora BOD (Marconi MA-415, Brasil),

el sistema es pesado cada día durante 7 días alcanzando el estado estable, la PVA fue calculada con la Ec. (29).

$$PVA = \frac{w}{t} \times \frac{x}{A\Delta P} \quad \text{Ec. (29)}$$

Donde w/t es el coeficiente lineal de la regresión de los datos (g s^{-1}), x es el espesor de la película (mm), A es el área de permeación (0.0032 m^2), ΔP es la diferencia de presión parcial entre la atmósfera seca y el agua a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (3169.1 Pa).

3.7.5. Propiedades ópticas

3.7.5.1. Color, opacidad y brillo

El color y la opacidad de las películas fueron evaluadas usando un colorímetro portable (MiniScan MSEZ, HunterLab, EUA) con una abertura de celda con 30 mm de diámetro, iluminación D65 (luz diurna), ángulo de 10° y un rango de 400 hasta 700 nm (Bonilla y Sobral, 2016; Dammak et al., 2017). Se obtuvieron los valores en la escala de color CIELab, siendo la luminosidad (L^*) una coordenada vertical con valores de 0 (negro) hasta 100 (blanco), a^* es la primera coordenada horizontal con valores de -80 (verde) hasta +80 (rojo), y b^* es la segunda coordenada horizontal con valores de -80 (azul) hasta +80 (amarillo), lo que permite el cálculo de la diferencia de total de color ΔE^* utilizando la Ec. (30) (Ramos et al., 2013; Ghadetaj et al., 2018).

La opacidad fue evaluada siguiendo el método en modo reflectancia utilizando el mismo equipo para el análisis de color mediante el software (HunterLab Associated Laboratories, Reston, EUA).

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad \text{Ec. (30)}$$

Donde ΔL^* , Δa^* y Δb^* son las diferencias entre el correspondiente parámetro de color de la muestra y la película control, sin compuestos activos ($L^* = 89.65$, $a^* = -1.86$ y $b^* = 9.79$).

El brillo en la superficie de las películas fue medido acorde al método reportado por (Bonilla y Sobral 2016) y adaptando el método estándar ASTM D2457-13 y ASTM D523-14 (ASTM 2013; ASTM, 201) para películas plásticas, donde cada muestra se midió con un ángulo de incidencia de 60° utilizando el Glossímetro (NGL 20/60, Rhopoint, Reino Unido).

3.7.5.2. *Barrera a la luz UV-Vis y Transparencia*

Estas propiedades se midieron utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Lambda 35, Perkin Elmer, EUA), las películas fueron cortadas en tiras de 10 x 40 mm y puestas en el lugar de las cubetas para medir el porcentaje de Transmitancia en un rango de 200 hasta 800 nm. La transparencia relativa fue medida con la absorbancia a 600 nm y calculada con la Ec. (31) (Ahmed e Ikram 2016; Bonilla y Sobral 2016; Ramos et al., 2013).

$$Transparencia = \frac{A_{600}}{x} = \frac{-\log T_{600}}{x} \quad \text{Ec. (31)}$$

Donde x es el espesor de la película (mm) y A_{600} es la absorbancia a 600 nm.

3.7.6. **Propiedades mecánicas**

Las propiedades mecánicas evaluadas de las películas fueron la tensión de rotura (TR, MPa), el porcentaje de elongación (PE, %) y el módulo elástico (ME, MPa) basado en la prueba de tracción del método estándar ASTM D882-18 (ASTM, 2018) con ligeras modificaciones usando un analizador de textura (TA.XT2i, Stable Micro System, Reino Unido). Las películas fueron cortadas en láminas de 15 x 100 mm, las cuales se fijaron en las mordazas con una separación inicial de 50 mm, la velocidad de tracción fue de 1.0 mms⁻¹ hasta la rotura. Los valores de TR, PE y EM fueron determinados con el software Exponent Lite V.4.0.13.0 (Stable Micro System, Reino Unido) según lo reportado por Bonilla y Sobral. (2016) y Pérez-Córdoba y Sobral (2017). Para este análisis, se utilizaron mínimo 10 réplicas de cada película.

3.7.7. Ángulo de contacto

La hidrofobicidad de la superficie de la película fue determinada usando el método de la gota sésil midiendo el ángulo de contacto con un tensiómetro óptico (Attension Theta Lite, KSV Instruments, Finlandia), se cortaron películas rectangulares de 20 mm de arista, después de ubicar la película en el tensiómetro, con una jeringa de precisión se colocó una gota de agua desionizada (5 μ L) en la superficie de la película dando comienzo a la medición, capturando imágenes cada dos segundos durante 120 segundos. El análisis de imagen se realizó con el software OneAttension (Attension Theta Lite, Finlandia), la curva de la gota fue ajustada a la ecuación de Laplace-Young para medir el ángulo formado (θ) entre la superficie y la línea tangente de la gota (Ramos et al. 2013; Dammak et al., 2017; Pérez y Sobral 2017).

3.7.8. Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia FTIR fue utilizada para identificar de bandas de absorción relacionadas con las vibraciones de grupos funcionales presentes en las películas utilizando un espectrómetro (Spectrum One FTIR, Perkin-Elmer, EUA), los espectrogramas fueron determinados a 25 °C en un rango de número de onda de 650 hasta 4000 cm^{-1} con una resolución de 1 cm^{-1} y 14 barridos espectrales para medir en el modo de transmitancia (Bonilla y Sobral, 2016; Lara et al., 2019). Los datos fueron tratados con el software Spectrum One (Perkin-Elmer, EUA).

3.7.9. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Las propiedades térmicas, temperatura de transición vítrea (T_g), temperatura de fusión (T_m) y entalpia de fusión (ΔH_m) de las películas fueron determinadas mediante un calorímetro diferencial de barrido (DSC TA2010, TA Instruments, EUA) equipado con un accesorio de enfriamiento criogénico. Se depositaron las muestras (~10 mg) en celdas de aluminio que fueron herméticamente selladas y pesadas en una balanza de precisión (± 0.01 mg) (AP250F, Ohaus, Switzerland). Las celdas fueron calentadas desde -20 hasta 120°C con un incremento de 5 °C min^{-1} en una atmosfera inerte (45 mL min^{-1} N_2), se usó una celda vacía de aluminio como referencia. Las propiedades

térmicas se calcularon utilizando el software Universal Analysis 2000 (TA Instruments), calculando T_m como la temperatura del pico endotérmico. T_g como el punto de inflexión de la línea de base, causado por la discontinuidad del calor específico de la muestra y ΔH_m como el área del pico endotérmico (Pérez et al. 2018; Valencia et al., 2019).

3.7.10. Difracción de Rayos X

El análisis de cristalinidad de las películas se realizó con un difractómetro de rayos X (AXS Analytical X.ray D50005, Siemens, Alemania) operando con una corriente y voltaje de 40 mA y 40 kV respectivamente, con una longitud de onda $\lambda=1.54056$ nm de la radiación Cu $K\alpha$ 1. Las películas fueron cortadas de cuadrados de 3 cm de arista y puestas en un marco de aluminio, los datos fueron recolectados a 25 °C en una región de $2\theta = 5^\circ$ hasta 40° , con una velocidad de 1° min^{-1} (Pérez-Córdoba et al. 2018; Valencia et al. 2018).

3.7.11. Microestructura de las películas

3.7.11.1. *Microscopía electrónica de barrido (SEM)*

La microestructura de la sección transversal y superficial de las películas fue visualizada por SEM usando Microscopio electrónico de barrido (TM3000, Hitachi Ltd, Japón), las imágenes fueron tomadas a 5 kV con ampliaciones entre 500x y 1500x respectivamente. Las muestras fueron cortadas en cuadrados de 10 mm aproximadamente y adheridos en el porta muestras mediante una cinta adhesiva. Para la sección transversal las muestras fueron crio-fracturadas después de sumergirlas en nitrógeno líquido (Dammak et al., 2017).

3.7.11.1. *Microscopía de fuerza atómica (AFM)*

Cada una de las películas fabricadas se les midió la topografía mediante la técnica de AFM usando un microscopio de fuerza atómica (NT-MDT, Solver Next Brand, Rusia) equipado con un software para análisis de imagen (New Model 3.1.0 programa PX), el equipo fue operado en modo de semi-contacto con una fuerza de contacto, frecuencia de resonancia y tasa de barrido de 5 Nm^{-1}

¹, 150 kHz y 0.3 Hz respectivamente. Los análisis fueron realizados en un campo de visión de 0.0025 mm² (50 μm x 50 μm). Las micrografías se tomaron con colores RGB y una resolución de 0.2 μm por pixel (Valencia et al. 2018). La rugosidad superficial fue calculada con base al promedio de la altura de los picos.

3.7.12. Actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar

El método de difusión en disco se utilizó para determinar el efecto las películas sobre *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Penicillium chrysogenum*. El crecimiento de cada microorganismo fue descrito en el numeral 3.4.3.

Se tomaron 100 μL del inóculo de cada microorganismo con una turbidez de 0.5 en una escala de McFarland aproximadamente con 1.5×10^8 UFC/mL para distribuirlos en cajas de petri que contenían agar Sabouraud sólido (Ciro, 2012).

Las películas, P0 (control negativo), P2, P3 (**Tabla 12**) y el control positivo (discos de papel filtro empapados con un una nS a 300 ppm NAT) fueron cortadas en discos de 7 mm de diámetro, y puestos en la superficie del agar previamente inoculado para ser incubadas a 25 °C durante 24 h (Ciro, 2012; Ollé Resa et al., 2014). Se calculó el área de toda la zona, para luego restar el área del disco, y la diferencia entre estas dos áreas (mm²) se reportó como la zona de inhibición.

3.7.13. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de las películas fue determinada por los métodos de captación de radicales ABTS⁺, DPPH[•] y poder antioxidante de la reducción férrica (FRAP) descritos en el numeral 3.4.4, con algunas modificaciones en la preparación de la muestra. Las soluciones que contenían α -TOC fueron preparadas conforme al método de extracción descrito por Contreras-Calderón et al., (2011), se tomaron 0.1 g de película en un tubo de centrifuga, se agregaron 6 g de una solución metanol-agua (50:50 v/v), después fue agitado durante 1 minuto en un agitador de tubos Vortex (Benchmark, EUA), posteriormente se llevó a un shaker (Heidolph Unimax 1010, Alemania) a 150 rpm durante 1 hora. Transcurrido el tiempo, el tubo fue centrifugado a 6000 rpm

por 10 min en una centrifuga (BOECO C-28 A, Alemania) recuperando el sobrenadante. El proceso se repitió con el residuo, pero adicionando 6 g de una solución acetona-agua (60:40 v/v), finalmente se mezclaron los sobrenadantes y la solución se ajustó hasta 25 g con agua destilada.

3.7.14. Biodegradabilidad de las películas

La prueba de biodegradación aerobia en condiciones controladas de compostaje se realizó bajo la metodología utilizada por Salazar-Sánchez et al., (2019), el método consistió en cortar 40 g de cada película en cuadros de 1 cm de arista; las películas utilizadas fueron la película control (P0) y película con 2% (m/m) α -TOC y 300 ppm NAT (P3); posteriormente se depositó en un biorreactor de 2000 mL junto con 240 g de una mezcla de compost y agua destilada (ajustada a 53.81% de sólidos totales). Cada biorreactor se instaló en el equipo de biodegradación Micro Oxymax Respirimeter (Columbus Instruments, E.U.A) con un flujo de aire continuo de 300 mL/min, y se incubaron a $58 \pm 2^\circ\text{C}$ empleando una incubadora IN260plus (Mettler, Alemania). Se cuantificó el dióxido de carbono acumulado en cada biorreactor durante 21 días de degradación para reportar porcentaje de biodegradabilidad. Cada muestra se realizó por triplicado.

3.8. Análisis estadístico

Los resultados de los análisis de las nanosuspensiones, nanoemulsiones y películas fueron presentados como el promedio \pm desviación estándar. El análisis estadístico de estos datos se realizó mediante el análisis de varianza simple (ANOVA) utilizando el software Statgraphics® Centurion XVII V17.2.00 (Statpoint Technologies, Inc, E.U.A). Los valores promedio obtenidos se utilizaron en la prueba de intervalo múltiple de Duncan siendo considerados significativos los valores de $p \leq 0.05$. Las pruebas se realizaron como mínimo, por triplicado.

3.9. Migración de los compuestos activos

3.9.1. Estudio in vitro de la migración de la natamicina y el α -tocoferol

La prueba de migración para *NAT* en las películas fue desarrollada conforme al método reportado por Altenhofen et al., (2012) y Bierhalz et al., (2012) con algunas modificaciones. Las películas se cortaron en cuadrados de 2.2 cm de arista con una masa aproximada de 0.1 g, estas fueron depositadas en un beaker que contenía 15 mL de una solución acuosa de etanol (50% *m/m*) y posteriormente se llevó para agitación en un shaker (Heidolph Unimax 1010, Alemania) a 150 rpm a 4, 14 y 25 °C respectivamente. La concentración de natamicina en cada beaker fue cuantificada cada 4 minutos aproximadamente hasta alcanzar el equilibrio, para ello se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis (Mapada-UV330, China) en un rango de longitud de onda de 290 -350 nm hasta 350 nm. El espectro de absorción se sometió a la tercera derivada y la concentración de natamicina se obtuvo a partir de la altura del pico a 317 nm con la línea base comparado con una curva estándar de *NAT* (de Oliveira et al. 2007). El volumen tomado para la medición fue devuelto al beaker y el procedimiento de medición se repitió hasta que la concentración de natamicina fue constante, es decir, hasta verificar que no se presentaba más liberación de *NAT*. Para evaluar la migración del α -*TOC* en las películas se utilizó un método reportado por Martelli et al., (2017) y Yeamsuksawat y Liang., (2019) con algunas modificaciones. Se utilizaron cortes de películas similares para la prueba de *NAT*, se depositaron en una beaker con 15 mL de una solución acuosa al 50% *m/m* de etanol y llevadas a agitación a las mismas condiciones anteriores. La concentración de α -*TOC* se cuantificó en el mismo espectrofotómetro a 291 nm en un intervalo aproximado de 4 minutos. Cada prueba se realizó por triplicado.

3.9.1. Estudio de la migración de la natamicina y el α -tocoferol en el sistema de envasado (película-queso)

La película que contenía 2% (*m/m*) α -*TOC* y 300 ppm *NAT* se puso en contacto directo con el queso doble crema, la película se cortó en cuadrados de 22 mm de arista y se pusieron sobre cilindros de queso (15 mm de diámetro y 2 mm de altura) garantizando su total cobertura, el sistema (película-queso) fue almacenado en cajas de petri a 4, 14 y 25 °C respectivamente. Se cuantificó *NAT* y α -*TOC* en las películas y el queso doble crema a las tres temperaturas de almacenamiento mediante cromatografía líquida usando un HPLC (Cromatógrafo líquido Shimadzu, Tokyo, Japón), con sistema de bombeo LC-20AD, un detector de arreglo de diodos (PDA) SPD-M20A, un inyector

automático SIL-20A/HT, con módulo de comunicación CBM-20A y una columna C18, 250 x 4 mm, 5 μm (Knauer, Alemania) mantenida a temperatura ambiente.

La extracción de los compuestos activos se realizó según Paseiro-Cerrato et al., (2013) y Molognoni et al., (2016) con algunas modificaciones, se pesaron aproximadamente 0.1 g de filme o 0.5 g de queso, se cortó y se adicionó en un tubo Falcon con 10 g de metanol acidificado con 0.001% de ácido ascético, se llevó a Vortex (Benchmark, EUA) durante 5 min, posteriormente se agitó a 180 rpm en un shaker (Heidolph Unimax 1010, Alemania) durante 1 hora protegido de la luz, y posteriormente se centrifugó a 6000 rpm por 10 min en una centrifuga (BOECO C-28 A, Alemania). Al finalizar el sobrenadante se llevó a un vial previamente usando un filtro con un tamaño de poro de 0.2 μm .

Las condiciones para cuantificar *NAT* correspondieron a un flujo de 1.0 mL min⁻¹ durante 21 min, 50 μL de inyección, 304.4 nm de longitud de onda, la fase móvil fue agua y acetonitrilo acidificados al 0.1% de ácido fórmico, el perfil de elución se expresó como en modo gradiente expresado en tiempo (min)-agua-acetonitrilo fue de 0-70-30; 10-40-60; 15-40-60, y 21-70-30 respectivamente (Molognoni et al. 2016; Paseiro-Cerrato et al. 2013). La curva de calibración para la natamicina se construyó con 7 niveles incluidos el cero en el rango de 10-85 mg kg⁻¹, la linealidad fue evaluada usando tres replicas por nivel en tres días diferentes. Las condiciones para cuantificar α -*TOC* correspondieron a un flujo de 1.0 mL min⁻¹ durante 15 min, 5 μL de inyección, a una longitud de onda de excitación y de emisión de 292 y 310 nm respectivamente, la fase móvil fue metanol y acetonitrilo (50:50) (Granda-Restrepo et al. 2009). La curva de calibración para el α -*TOC* se realizó de la misma manera que para la natamicina, pero el rango de los niveles fue de 100-1000 mg kg⁻¹. El muestreo para *NAT* y α -*TOC* se realizó de 2 a 3 días para 4 y 14 °C y de 0.5 a 2 días a 25 °C respectivamente, hasta alcanzar el equilibrio.

3.9.2. Determinación del coeficiente de difusión y de partición

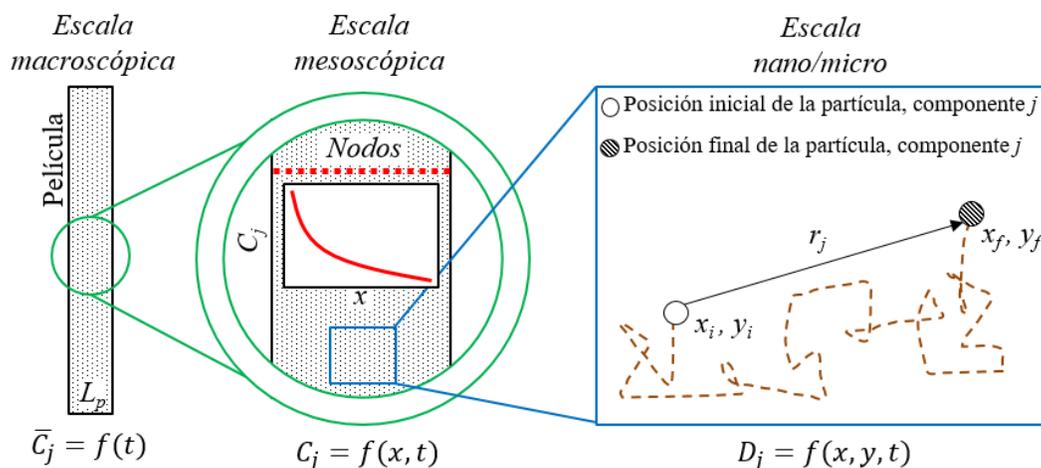
El coeficiente de partición, el coeficiente de difusión y la dependencia de la temperatura del coeficiente de difusión se determinó según lo establecido en la sección “2.5. Modelación de la migración”, y dependiendo de las características del sistema de envasado se utilizó alguno de los tres modelos mencionados basados en la solución de la segunda ley de Fick. Para este proceso de modelación se usó el conjunto de datos de la concentración de *NAT* o α -*TOC* en el tiempo, en

consecuencia, se calculó la masa acumulada M_t de cada uno de los compuestos, graficando M_t/M_∞ en función del tiempo, donde M_∞ es la máxima cantidad liberada por el material de envase, es decir, cuando el sistema se encuentra en equilibrio.

3.10. Modelación Multiescala de la migración

La estrategia que se utiliza para la construcción de los modelos multiescala es Bottom-Up, primero se construye el modelo a la escala más pequeña representado por la **Figura 10** (Escala nano/micro), los modelos fueron presentados en la sesión 2.5.4.1, acá se simula el movimiento aleatorio de cada nano partícula representativa de *NAT* y α -*TOC* con el fin de estimar los coeficientes de difusión nanométricos del α -tocoferol y la natamicina (Fayazi y Ghazanfari 2015; Hernández 2008; Huang et al. 2019); con la información anterior, se modela la siguiente escala **Figura 10** (Mesoscópica) explicada en la sesión 2.5.4.2 (utilizando el método de diferencias finitas), con ello se construyen los perfiles de concentración como función del tiempo y la posición en el material de envase (Ghajar y Cengel 2014; Tveito y Winther 2006).

La integración de las escalas se realiza desde la escala más pequeña hasta la escala más grande, la **Figura 10** muestra un esquema de integración, y la escala macroscópica se obtiene a partir de la homogenización de la escala mesoscópica (promedio de la concentración de los compuestos como función de la longitud del sistema de envasado y el tiempo).



Elaboración propia. Donde, r_j es la distancia neta alcanzada por la partícula j , C_j y D_j es la concentración y el coeficiente de difusión del compuesto j que migra hacia el alimento.

Figura 10. Modelo de integración entre las diferentes escalas.

El análisis de la información y las respectivas simulaciones se realizaron mediante MATLAB® R2011b (MathWorks, Natick, MA, EE. UU.) y Visual Basic para Aplicaciones de Microsoft Excel 365.

3.11. Cuantificación del hexanal en queso como indicador de la oxidación lipídica.

Se cuantificó el hexanal como indicador de la oxidación lipídica en queso doble crema, se utilizaron muestras de queso en contacto directo con una película que contenía 2% (*m/m*) α -TOC y 300 ppm NAT y en contacto con la película control, todas ellas fueron almacenadas a 4, 14 y 25 °C respectivamente, el sistema (película-queso) fue expuesto en presencia de luz incandescente utilizando una bombilla E12 110v 7W; la prueba se realizó durante 8 semanas, midiendo cada semana la concentración de hexanal en queso; para la extracción de los compuestos volátiles se utilizó la técnica de micro extracción en fase sólida con una fibra DVB/CAR/PDMS 50/30 μm (Supelco, E.U.A), un cromatógrafo de gases (Agilent 6890 Series, E.U.A) equipado con un detector de ionización de llama y una columna capilar de sílice 30m x 0.32mm x 0.25 μm (Supelco SPB50, E.U.A). La inyección se realizó en forma manual, el flujo de H_2 fue de 0.6 mL min^{-1} en modo Split, la temperatura del inyector fue de 250 °C y la temperatura del horno se mantuvo a 50 °C durante 6 minutos, después incrementada hasta 230 °C a una tasa de 20 °C min^{-1} mantenida durante 10 minutos.

Las curvas de calibración del hexanal se prepararon desde 2 hasta 10 mg kg^{-1} , adicionando 4-heptanona como estándar interno. La preparación de la muestra de queso se realizó según Delgado et al., (2010) y Nzekoue et al., (2019) con algunas modificaciones, la muestra de queso (aproximadamente 0.25 g) se llevó a un vial de 20 mL, se adicionó 0.375 g de sulfato de sodio anhidro, 1.8 mL de agua desionizada y 200 μL de una solución de estándar interno de 4-heptanona (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Se cerró el vial con un septum de teflón y fue llevado a un baño maría a 50 °C, después de 20 min, se introdujo la fibra en el vial para ser expuesta al espacio de cabeza durante 10 min bajo agitación continua (250 rpm) con un agitador magnético. Después del tiempo de

extracción, se removió la fibra del vial y posteriormente inyectada manualmente en el puerto de inyección de cromatógrafo con un tiempo de desorción de 10 min. Posterior a la desorción, los extractos fueron transferidos a la columna y la fibra fue nuevamente acondicionada durante 20 min a 250 °C para prevenir contaminación cruzada con las demás muestras. Se graficaron los resultados de los dos tratamientos para la concentración de hexanal (mg kg^{-1}) contra el tiempo de almacenamiento a las tres temperaturas.

4. RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

4.1. Reducción de tamaño a escala nanométrica

4.1.1. Nanosuspensión de natamicina

El tamaño de partícula para las diferentes soluciones de *NAT* se presenta en la **Tabla 13**, donde se puede evidenciar que la concentración de 100 mg kg^{-1} fue la que presentó el menor tamaño promedio ($133.85 \pm 2.62 \text{ d.nm}$) con diferencia significativa a los demás tratamientos ($p < 0.05$); el incremento del tamaño de partícula aumenta con la concentración de *NAT*, esto se debe a que los cristales de natamicina poseen una baja solubilidad en agua ($20\text{-}50 \text{ mg L}^{-1}$) (EFSA 2009), y la

presentación comercial de producto utilizado está al 50% en lactosa, como consecuencia, aumenta la densidad de los sólidos insolubles afectando las condiciones del proceso de reducción de tamaño (Patil et al. 2018), dicho proceso fue de 5-periodos a 20000 rpm durante 5 minutos con 3 minutos de reposo; aun así, los valores promedio de todos los tratamientos fueron menores a 207 nm siendo considerados en escala nanométrica (Donsì and Ferrari 2016; Gooch 2007; Teixidó 2015).

Tabla 13. *Tamaño de partícula (d. nm), índice de polidispersión y potencial Zeta de diferentes soluciones de natamicina.*

Concentración (mg kg⁻¹)	Tamaño (d.nm)	Índice de polidispersión	Potencial Zeta (mV)
100	133.9 ± 2.6 ^a	0.31 ± 0.03 ^a	-41.10 ± 3.08 ^a
200	204.0 ± 5.1 ^b	0.25 ± 0.00 ^b	-40.40 ± 2.20 ^a
300	207.0 ± 0.9 ^b	0.26 ± 0.02 ^b	-40.70 ± 1.91 ^a
400	198.8 ± 0.8 ^c	0.23 ± 0.01 ^c	-45.10 ± 3.67 ^b
500	203.7 ± 3.3 ^b	0.29 ± 0.02 ^a	-43.20 ± 3.70 ^{ab}
600	204.5 ± 1.5 ^b	0.22 ± 0.00 ^c	-40.30 ± 1.35 ^a

Valores promedio ± desviación estándar (n=3). Los diferentes superíndices indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Estos resultados son coincidentes con lo reportado por Khames et al., (2019) en nanopartículas lipídicas sólidas donde se reportó un tamaño de 130 d.nm y un valor de 0.248 de índice de polidispersión (IPD); la nS a 100 mg kg⁻¹ mostró menor tamaño de partícula con 133 d.nm y un IPD de 0.31 ± 0.03 que presentó diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las otras concentraciones evaluadas (**Tabla 13**), y en la **Figura 11** se presenta la distribución monomodal de todos los tratamientos con una estrecha variación entre ellos, lo que evidencia una buena estabilidad física en las condiciones estudiadas. Como se puede observar en la misma tabla, los valores del potencial zeta para todas las nS fueron menores a -40 mV, lo que sugiere una alta estabilidad debido a que las partículas están lo suficientemente cargadas para permitir que dominen las fuerzas repulsivas entre partícula y partícula (Zambrano 2013).

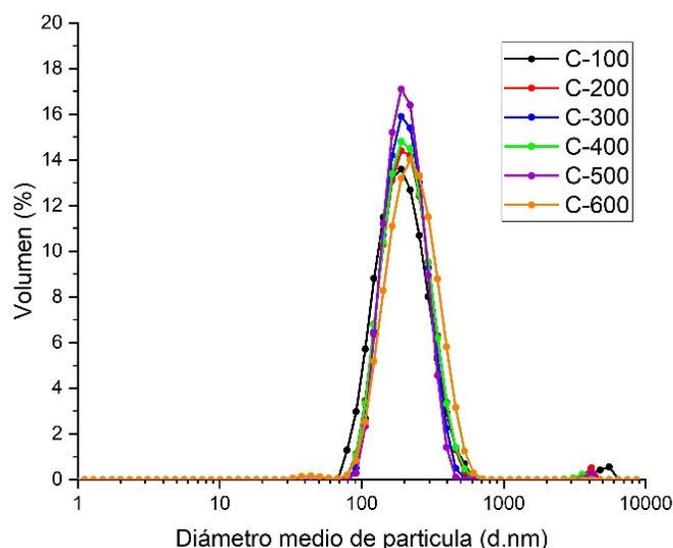


Figura 11. Distribución en el tamaño medio de partícula para las nanosuspensiones de natamicina.

4.1.2. Nanoemulsión de α -tocoferol

Es necesario asegurar el éxito en la fabricación de la nanoemulsión antes de determinar su efecto sobre las propiedades en la película de PCL; por lo tanto, la evaluación del diámetro de gota de la nanoemulsión encapsulando α -Tocoferol (nEm de α -TOC) es indispensable; en la **Tabla 14** se presentan los niveles de los factores (reales y codificados) y los valores experimentales del tamaño de gota y el IPD; en la misma tabla se puede evidenciar dos agrupaciones según los tamaños promedio de gota (< 200 nm) y los cuales no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$), el primer grupo involucra tamaños promedio de 61.7, 73.0 y 48.9 nm para los tratamientos 7, 8 y 9, respectivamente, este grupo se caracteriza por que la fase oleosa está en menor proporción que la de surfactantes (α -TOC:surfactantes) en un rango de 0.33:1 - 0.68:1, estos resultados coinciden con (Zambrano 2013) que obtuvo una nEm de α -TOC utilizando Span 80 y Tween 80 en una proporción α -TOC:surfactantes de 0.04:1 respectivamente, el tamaño de gota obtenido fue de 194 nm, utilizando también, el método utilizado en este trabajo; Kaur (2016) preparó una nEm de α -TOC con un tamaño de 38 nm y mediante un homogenizador ultrasónico, utilizando Lauril Sulfato de Sodio/ Tween 80 como surfactantes en proporción α -TOC:surfactantes de 0.33:1; Teixeira (2017) obtuvo un tamaño de gota de 69.9 nm en una nEm de α -TOC con una proporción de 0.5:1 (α -TOC:surfactantes) y un homogenizador de alta presión.

El segundo grupo presentó tamaños hasta 4 veces más grandes que el grupo anterior, con tamaños de gota de 137.8, 115.2 y 116.5 nm para los tratamientos 1, 4 y 5, respectivamente; en este grupo, el α -TOC está en mayor proporción que la mezcla de surfactantes, con valores de α -TOC:surfactantes entre 1.36:1 y 1.73:1; según el estudio de Pérez y Sobral (2017) se pueden obtener nanoemulsiones de una mezcla de α -TOC y aceite esencial de ajo con un tamaño de 79 nm utilizando la proporción de fase oleosa:surfactantes de 2:1, utilizando un microfluidizador; también Teixeira (2017) fabricó una nEm de α -TOC con una proporción α -TOC:surfactantes en 2:1 obteniendo un tamaño de gota de 89.5 nm utilizando un homogenizador de alta presión.

Tabla 14. Caracterización de las nanoemulsiones de α -Tocoferol para el diseño de mezclas.

<i>Tratamiento</i>	<i>Niveles experimentales</i> <i>(%m/m) (codificados)</i>			<i>Tamaño</i> <i>(d.nm)</i>	<i>Índice de</i> <i>polidispersión</i> <i>IPD</i>	<i>Potencial</i> <i>Zeta</i> <i>mV</i>
	<i>x₁ (x₁ cod)</i>	<i>x₂ (x₂ cod)</i>	<i>x₃ (x₃ cod)</i>			
1	1.80 (0.17)	1.04 (0.17)	97.16 (0.67)	137.8 ± 0.1 ^a	0.23 ± 0.01 ^a	-27.71 ± 1.87
2	3.42 (0.67)	1.04 (0.17)	95.54 (0.17)	252.9 ± 27.8 ^c	0.39 ± 0.13 ^c	-17.29 ± 0.29
3	2.88 (0.50)	0.50 (0.00)	96.62 (0.50)	522.1 ± 22.2 ^d	0.50 ± 0.02 ^d	-16.60 ± 0.55
4	2.88 (0.50)	2.12 (0.50)	95.00 (0.00)	115.2 ± 0.9 ^a	0.27 ± 0.00 ^{ab}	-35.30 ± 2.01
5	2.34 (0.33)	1.58 (0.33)	96.08 (0.33)	116.5 ± 1.0 ^a	0.27 ± 0.01 ^{ab}	-30.50 ± 2.38
6	1.26 (0.00)	0.50 (0.00)	98.24 (1.00)	217.9 ± 14.3 ^e	0.33 ± 0.03 ^{bc}	-21.40 ± 1.51
7	1.26 (0.00)	2.12 (0.50)	96.62 (0.50)	61.7 ± 0.1 ^b	0.30 ± 0.01 ^{ab}	-42.50 ± 1.99
8	1.80 (0.17)	2.66 (0.67)	95.54 (0.17)	73.0 ± 1.1 ^b	0.34 ± 0.00 ^{bc}	-40.30 ± 1.04
9	1.26 (0.00)	3.74 (1.00)	95.00 (0.00)	48.9 ± 0.4 ^b	0.49 ± 0.01 ^d	-43.26 ± 1.75
10	4.50 (1.00)	0.50 (0.00)	95.00 (0.00)	632.5 ± 24.5 ^f	0.29 ± 0.07 ^{ab}	-12.70 ± 0.51

Donde x_1 , x_2 , y x_3 son los niveles experimentales para el α -TOC, la mezcla de surfactantes y el agua respectivamente. Los valores codificados para las mismas variables están dentro de paréntesis. Valores promedio ± desviación estándar (n=3). Los diferentes superíndices indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Considerando la proporción de los surfactantes en una nanoemulsión, Solans et al., (2005) y Silva et al., (2012) plantean que el tamaño de gota disminuye cuando se incrementa la

concentración del surfactante, esto es debido al aumento del área interfacial del tensoactivo y la disminución de la tensión interfacial, esto evita la agregación de gotas de la fase oleosa al aumentar las fuerzas de repulsión entre ellas promoviendo la estabilidad cinética.

El índice de polidispersión de todos los tratamientos se presenta en la **Tabla 14**, valores cercanos a cero indican la mayor homogeneidad posible en una nanoemulsión (Teixidó 2015) y menores a 0.5 pueden ser considerados para describir una nanoemulsión estable (Pérez y Sobral 2017); el valor de IPD de los tratamientos son 1, 4 y 5 no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) cuyos valores están entre 0.23 y 0.27, estos tratamientos presentaron una distribución estrecha y levemente bimodal **Figura 12**, debido a la absorción uniforme del surfactante en la interfaz de la gota (Donsì y Ferrari 2016), lo que confirma que el respectivo tamaño de gota para cada tratamiento (**Tabla 14**). Los tratamientos 7, 8 y 9, presentaron menor tamaño de gota (61.7, 73.0 y 48.9 nm respectivamente) con una distribución de tamaño bimodal y presentaron un IPD de 0.30, 0.34 y 0.49 en el mismo orden, este aumento de IPD indica que se estaba presentando un leve incremento en una segunda población de gotas con tamaños aproximados a 10 nm (**Figura 12**), lo que permite inferir que se puede disminuir aún más el tamaño promedio de gotas al aumentar el periodo y tiempo de proceso en la fabricación de la nanoemulsión.

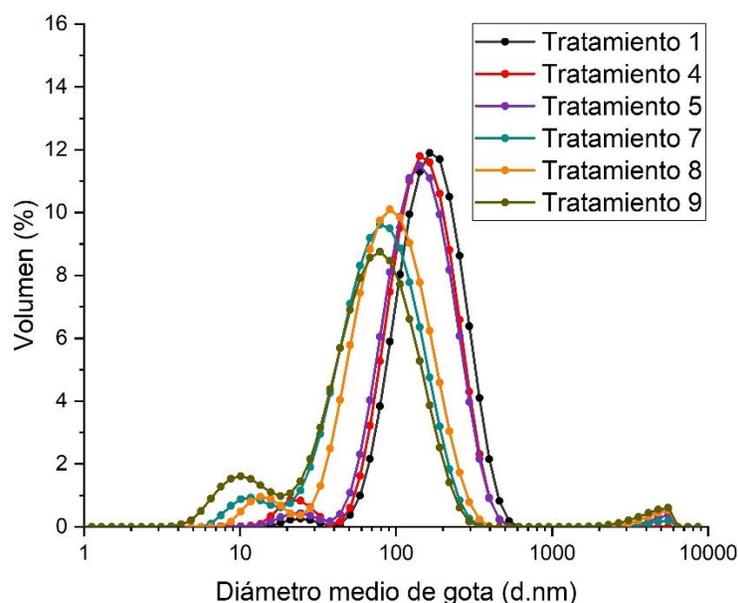


Figura 12. Distribución en el tamaño medio de gota para las nanoemulsiones de α -Tocoferol.

Los valores del potencial zeta fueron negativos para todas las nanoemulsiones (**Tabla 14**), con la característica de que esta carga negativa presenta muy poca o nula toxicidad en las membranas biológicas (Teixidó 2015), lo que permite ser incorporadas en un material de envase que está en contacto con alimentos; los tratamientos con tamaños de gota menores a 100 nm presentaron un valor alrededor de -41 mV, lo que le confiere estabilidad a la agregación, de acuerdo con Silva et al., (2012) y Zambrano (2013) valores de -11 a -20 mV indican una estabilidad ligera con pocos aglomerados, en el rango de -21 a -30 mV a una estabilidad moderada, sin aglomerados y valores superiores a -30 mV indican estabilidad moderada y la repulsión excede a la atracción entre gotas; los resultados presentados son consecuentes con lo reportado por Teixidó (2015), Teixeira (2017) y Pérez et al. (2018) para nanoemulsiones de α -TOC, reportando valores menores a -30 mV, esto es el resultado de la adsorción de iones hidroxilo en la interfaz aceite-agua y el desarrollo posterior de enlaces de hidrógeno entre estos iones y los grupos de óxido de etileno del surfactante.

4.1.2.1. *Optimización de la nanoemulsión*

El análisis de regresión de los 10 tratamientos evaluados se presenta en la **Tabla 15**, los factores independientes (α -TOC, mezcla de surfactantes y agua) fueron ajustados a tres modelos diferentes: lineal, cuadrático y cúbico especial para encontrar su significancia en el tamaño de gota de la nanoemulsión; altos valores de F , indican un fuerte efecto de los factores en el tamaño de gota, y junto con el R^2 el modelo que mejor se ajustó fue el modelo cubico especial, con valores de 12.46 y 0.8843 respectivamente. En el modelo seleccionado para realizar la optimización (cubico especial) se puede apreciar que los valores positivos de los coeficientes indican un efecto sinérgico sobre el tamaño de gota, es decir incrementan su valor, y un coeficiente negativo muestra un efecto antagónico (disminuye el tamaño de gota), de lo anterior se observa que los coeficientes que afectan la disminución del tamaño de gota, es la combinación del α -TOC:surfactantes, donde la cantidad de surfactantes debe ser mayor a la de α -TOC para promover la formación y estabilización de la

nanoemulsión debido a que se disminuye la tensión interfacial entre la fase lipídica y la fase acuosa (Patil et al. 2018).

Tabla 15. Resumen del análisis estadístico y de los modelos para el tamaño de gota.

<i>Modelo</i>	<i>Razón F</i>	<i>Valor p</i>	<i>Ecuación codificada</i>	<i>R² ajustado</i>
Lineal	10.24	0.0084	$529.60x_1 - 73.18x_2 + 197.01x_3$	0.6724
Cuadrático	11.88	0.0163	$616.98x_1 + 78.83x_2 + 213.55x_3 - 1084.28x_1x_2$ $+ 134.96x_1x_3 - 466.60x_2x_3$	0.8580
Cúbico especial	12.46	0.0316	$610.72x_1 + 72.56x_2 + 207.28x_3 - 896.43x_1x_2$ $+ 322.81x_1x_3 - 258.75x_2x_3$ $- 3043.24x_1x_2x_3$	0.8843

Donde x_1 , x_2 , y x_3 son las variables codificadas para el α -TOC, la mezcla de surfactantes y el agua respectivamente.

La **Tabla 16** muestra la minimización del tamaño de gota según el modelo cubico especial, también se presenta valor experimental del tamaño de gota, y la composición de la mezcla optima; estos resultados de composición presentan una proporción de α -TOC:surfactantes de 0.58:1, cuyo análisis se presentó en la sesión (4.1.2). La **Figura 13** representa gráficamente el diagrama ternario y de superficie donde se evidencia la región en el cual la combinación de variables representa el mínimo de tamaño de gota. Estos resultados validan el procedimiento de optimización y respaldan la ecuación del modelo de regresión para la predicción de la respuesta en los niveles de variable seleccionadas.

Tabla 16. Resultado experimental y predicho de la formulación optimizada para el tamaño de gota.

<i>Valor predicho</i>	<i>Valor experimental</i>		<i>Error de la predicción (%)</i>
32.4 d.nm	35.4 ± 0.6 d.nm		9.13
<i>Composición de la mezcla</i> (% m/m)	<i>α-TOC</i>	<i>Mezcla surfactantes</i>	<i>Agua</i>
	1.46	2.51	96.03

Valor promedio ± desviación estándar (n=3).

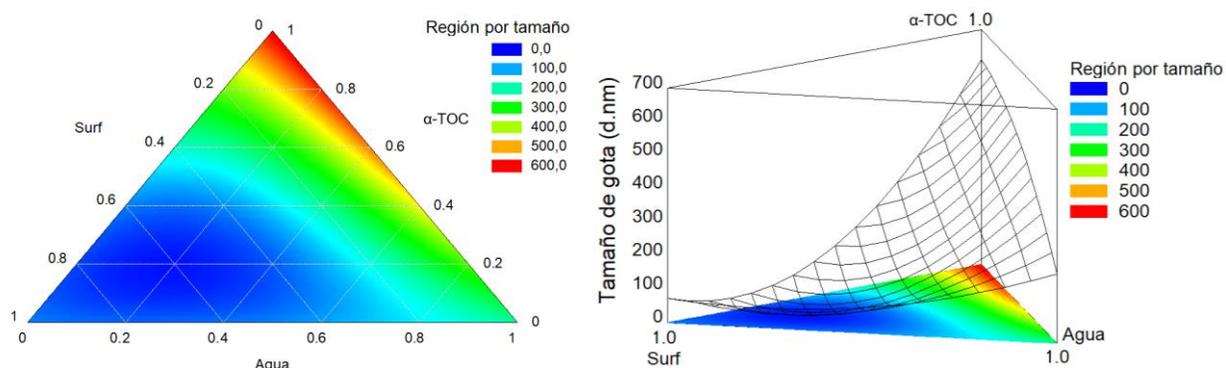


Figura 13. Gráfico ternario y superficie de respuesta de la nanoemulsion optimizada.

4.1.2.2. Estabilidad de la nEm de α -TOC y su mezcla con nS de NAT

El perfil de estabilidad para la nEm de α -TOC y la mezcla con nS de NAT para cada uno de los periodos utilizados en el proceso de reducción de tamaño se presenta en la **Figura 14**, valores cercanos a 1 presentan mayor inestabilidad en las muestras, los valores debajo de 0.5 son considerados para describir una nanoemulsion estable (Dammak y Sobral 2017), y generalmente esos valores corresponden a nanoemulsiones con menores valores de tamaño medio de partícula tal como lo plantea Zambrano (2013) que al aumentar los periodos de cizalla, el tamaño de gota se ve disminuido, tal es el caso de la nEm de α -TOC (nEm -P5) y su mezcla con nS de NAT (nEm-nS -P5) en el último periodo de cizalla presentan valores menores a 0.42 a un tiempo de almacenamiento simulado de 180 días mediante el equipo LUMiSizer® lo que evidencia una adecuada formulación, proceso y estabilidad de la nEm de α -TOC y nS de NAT.

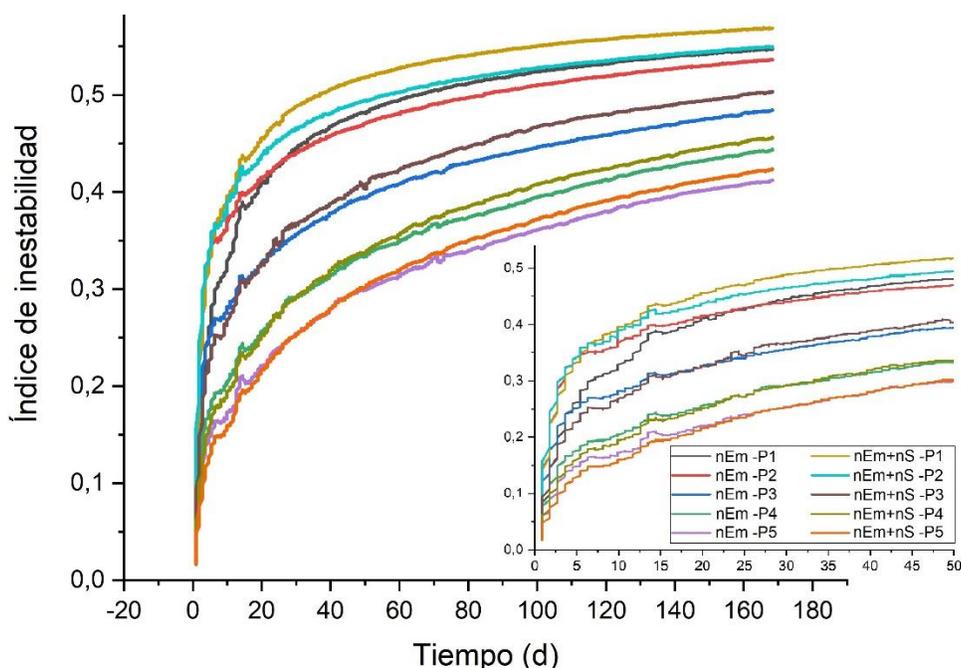


Figura 14. Perfil del índice de estabilidad como función del tiempo para nEm de α -TOC y su mezcla con nS NAT en las concentraciones óptimas.

La información de la **Tabla 17** presenta los valores puntuales de la estabilidad de la mezcla de nEm de α -TOC y nS de NAT para cada periodo de cizalla y en diferentes tiempos simulados obtenidos mediante la aceleración centrífuga, este tipo de análisis permite confirmar que a medida que se aumenta el periodo de cizalla se incrementa la estabilidad de la mezcla, como consecuencia de la disminución del tamaño de partícula ya que los valores al periodo 5 fueron menores a 0.424 ± 0.003 , permitiendo así, fabricar y almacenar la respectiva mezcla sin temor a que se comprometa su estabilidad y tamaño de partícula a escala nanométrica.

Tabla 17. Evaluación del índice de estabilidad para la mezcla de nEm de α -TOC y nS de NAT en las concentraciones óptimas durante en la reducción de tamaño, simulando diferentes tiempos de almacenamiento a 20 °C.

Tiempo (d)	Periodo 1	Periodo 2	Periodo 3	Periodo 4	Periodo 5
10	0.392 ± 0.003	0.384 ± 0.007	0.266 ± 0.002	0.193 ± 0.003	0.157 ± 0.002
30	0.488 ± 0.002	0.465 ± 0.001	0.366 ± 0.002	0.290 ± 0.001	0.252 ± 0.001

90	0.546 ± 0.003	0.523 ± 0.004	0.458 ± 0.001	0.397 ± 0.001	0.361 ± 0.001
180	0.569 ± 0.005	0.550 ± 0.003	0.504 ± 0.003	0.456 ± 0.002	0.424 ± 0.003

4.1.1. Concentración mínima inhibitoria para nS de NAT y capacidad antioxidante de la nEm de α -TOC

La concentración minimiza inhibitoria (CMI) de la *Cándida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* y el *Penicillium chrysogenum* se muestra en la **Figura 15**, en la misma figura se presentan las concentraciones evaluadas de nS de NAT, siendo máxima la concentración de 100 mg kg⁻¹ (obtenido previamente en la **Tabla 13**), la nS de NAT presentó inhibición para los microorganismos mencionados en una concentración mínima de 12, 1 y 0.8 mg kg⁻¹ respectivamente, estos valores fueron menores que los obtenidos con la mezcla de nS de NAT con 2% (m/m) de α -TOC, presentando una concentración de 24, 4 y 6 mg kg⁻¹ en el mismo orden de microorganismos; esto demuestra que la adición del de α -TOC interfiere levemente con el desempeño del antifúngico, pero sin comprometer su funcionalidad; los valores de CMI obtenidos en el presente estudio son menores que los presentados por Dalhoff et al., (2015) y Costa et al., (2018) cuyos valores para *C. albicans* (> 0.2 g L⁻¹), *S. cerevisiae* (0.27 g kg⁻¹) y *P. chrysogenum* (> 2 g L⁻¹); esto puede ser debido a la sensibilidad del método, obteniendo concentraciones más específicas. En conformidad con los límites permitidos de natamicina en productos alimentarios, la normativa Colombiana (Resolución 2310 de 1985) estableció un máximo de 12.5 mg kg⁻¹ de natamicina en la superficie de queso, el Codex alimentarius establece un máximo de 40 mg kg⁻¹ para quesos, y para productos cárnicos un máximo 6 mg kg⁻¹ (FAO/OMS 2019) con esta información normativa y los resultados de esta prueba, se puede preestablecer una concentración de 300 mg kg⁻¹ de natamicina en la película con el fin de controlar el crecimiento de estos microorganismos en la superficie del queso doble crema.

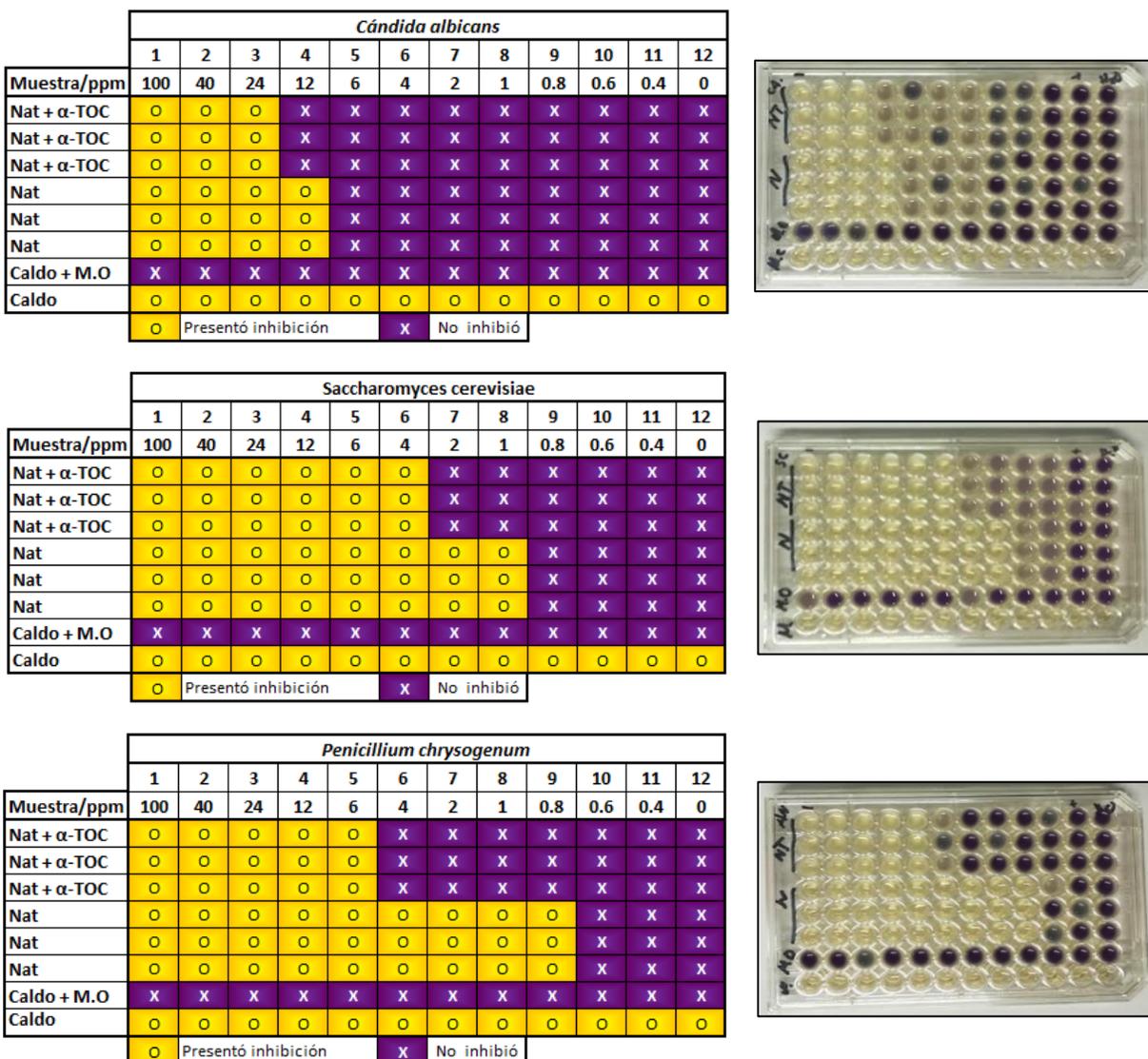


Figura 15. Concentración mínima inhibitoria de la natamicina para la *Cándida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Penicillium chrysogenum*.

Relacionando la capacidad antioxidante de la nEm de α -TOC (2% m/m) y su mezcla con nS de NAT a 300 mg kg⁻¹ se presenta en la **Tabla 18**, la adición de natamicina presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) comparada con la nEm α -TOC, siendo mayor en la capacidad antioxidante para esta última en las tres pruebas evaluadas; estos resultados son consistentes con lo reportado por Martins et al., (2012), Kaur et al., (2016), Pérez et al., (2018) donde utilizaron α -tocoferol nanoemulsionado como antioxidante; aunque este estudio no comparó capacidad antioxidante a escala nano y micro, Silva et al., (2012) dejó indicado que el aumento de la capacidad antioxidante

puede explicarse con el aumento del área de contacto cuando se reduce el α -TOC a escala nanométrica.

Tabla 18. Capacidad antioxidante expresada en equivalente de Trolox para la nEm α -TOC y su mezcla con nS de NAT

	<i>TEAC ($\mu\text{mol TE/ g de solución}$)</i>		
	<i>ABTS^{*+}</i>	<i>FRAP</i>	<i>DPPH[*]</i>
nEm α -TOC	29.7 \pm 0.3 ^a	41.8 \pm 0.5 ^a	54.1 \pm 0.6 ^a
nEm α -TOC + nS NAT	28.9 \pm 0.2 ^b	40.6 \pm 0.3 ^b	52.4 \pm 0.5 ^b

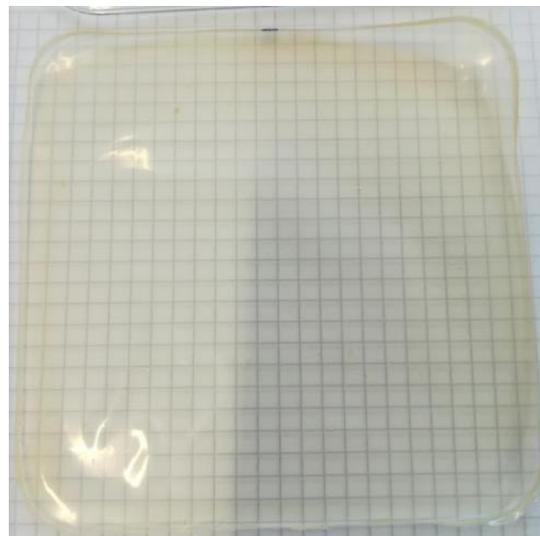
Valor promedio \pm desviación estándar (n=3). Diferentes superíndices en la misma columna son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

4.2. Caracterización de las películas

Todas las películas obtenidas fueron transparentes, sin defectos a simple vista, como burbujas, arañazos, separación de fases o grietas (**Figura 16**). El espesor de todas las películas se mantuvo en todos los tratamientos (**Tabla 19**), y no se observó diferencia estadística entre los datos ($p > 0.05$), es decir, la adición de los compuestos activos no modificó el espesor de las películas obtenidas, permitiendo calcular un espesor promedio de 0.126 ± 0.021 mm, estos valores pueden ser comparables con los reportados por Ramos et al., (2013) con un espesor de 0.13 ± 0.04 mm para películas producidas con una solución filmógena a la misma concentración de proteína (10% m/m).



a. Película control (P0)



b. Película con α -TOC (P1)

Resumen de composición SFP

Ingrediente	SFP 1	SFP 2
Prot	10	10
Gl	5	5
Agua	85	0
NAT (2%)	0	85
Water		
M. activo + To. Tímico	167,45 g	174,07 g
M. disp. " "	157,22 g	162,53 g
Densidad media	67,41 g	73,69 g
Resumen	89,77 %	90,51 %

Forma para el análisis de la película

Experimento

c. Película con Natamicina (P2)



d. Película con los compuestos activos (P3)

P0: Película sin ningún compuesto activo (Control); **P1:** Película con 2% (*m/m*) α -TOC – 0 ppm NAT; **P2:** Película con 0% (*m/m*) α -TOC – 300 ppm NAT; **P3:** Película con 2% (*m/m*) α -TOC – 300 ppm NAT

Figura 16. Películas elaboradas a partir de proteína concentrada de lactosuero.

4.2.1. Contenido de humedad (CH), solubilidad en agua (S) y grado de hinchamiento (GH)

El contenido de humedad es una variable que influye en el comportamiento de barrera de los materiales poliméricos hidrófilos con un efecto plastificante y/o de hinchamiento, también puede modificar la permeabilidad de la película a los gases y vapores (Hong y Krochta 2006); las películas obtenidas no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en CH (**Tabla 19**), lo que permitió calcular un valor promedio de 29.4 g de agua en 100 g de película. La nEm α -TOC, la nS de NAT o su mezcla no modificaron la higroscopicidad de las películas, como lo demostró (Pérez-Córdoba et al. 2018) con la adición de nEm de α -TOC en películas de quitosano-gelatina y Ramos et al., (2012) con la adición de natamicina en películas de proteína aislada de lactosuero, concluyendo que el CH fue definido mayormente por la matriz polimérica y plastificante, y no por los componentes lipofílicos, o insolubles en agua incorporados en la película. Por otro lado, Ramos et al., (2012) también mostró un aumento en el CH en películas de proteína aislada de suero mediante la adición de agentes activos hidrofílicos (quitosano y ácido propiónico).

Tabla 19. Espesor promedio y propiedades fisicoquímicas de películas incorporadas con nS NAT, nEm α -TOC, o ambos.

<i>Película</i>	<i>Espesor (mm)</i>	<i>Contenido de Humedad (%)</i>	<i>Solubilidad en agua (%)</i>	<i>Grado de hinchamiento (%)</i>
<i>n</i>	10	3	3	3
P0	0.122 ± 0.017 ^a	28.3 ± 2.3 ^a	58.9 ± 0.7 ^a	70.2 ± 0.5 ^a
P1	0.119 ± 0.037 ^a	28.3 ± 2.0 ^a	55.4 ± 1.1 ^b	130.1 ± 8.9 ^b
P2	0.124 ± 0.010 ^a	31.3 ± 5.7 ^a	58.8 ± 0.8 ^a	52.7 ± 1.1 ^c
P3	0.139 ± 0.020 ^a	29.5 ± 3.2 ^a	55.3 ± 1.5 ^b	95.6 ± 8.8 ^d

P0: Película sin ningún compuesto activo (Control); **P1:** Película con 2% (m/m) α -TOC – 0 ppm NAT; **P2:** Película con 0% (m/m) α -TOC – 300 ppm NAT; **P3:** Película con 2% (m/m) α -TOC – 300 ppm NAT. Valor promedio ± desviación estándar. Diferentes superíndices en la misma columna son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

La solubilidad de las películas en agua puede ser considerado como un índice de la afinidad por la matriz polimérica en medio acuoso (Bahram et al. 2013), es decir, a mayor solubilidad menor es la resistencia al agua (Ramos et al. 2012), además es una característica que puede afectar la integridad de las películas en contacto con alimentos húmedos, y según el estudio de Schmid et al., (2017) en películas de proteína aislada de lactosuero, la solubilidad está influenciada principalmente por los enlaces no covalentes y el grado de desnaturalización de la proteína. En nuestro estudio se observó que la solubilidad de las películas P1 y P3 presentaron valores alrededor de 55.4 % y mostraron una *S* ligeramente menor ($p < 0.05$) que P0 y P2 (alrededor de 58.8 %) (**Tabla 19**), mientras que no se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) entre estas dos últimas películas. De acuerdo con estos resultados, la presencia de *NAT* no afectó la solubilidad de las películas por su baja concentración, a diferencia del α -*TOC* nanoemulsionado que contribuyó a reducir la solubilidad de la película (hasta 55.4 %), y todos los resultados de *S* mostraron que las películas de PCL mantienen su integridad después de 24 h en agua, debido al establecimiento de enlaces disulfuro entre moléculas de proteína generadas como resultado del tratamiento térmico, tal como lo planteó Ramos et al., (2012) con películas de proteína adicionada con natamicina.

El grado de hinchamiento de las películas puede tener un papel crucial en la liberación de los compuestos activos incorporados en el material polimérico y, por lo tanto, controlando esta variable se puede controlar la velocidad de liberación de los compuestos activos (Ghadetaj et al., 2018); los resultados para el GH se presentan en la **Tabla 19** evidenciando una diferencia significativa para todas las películas ($p < 0.05$). La película control presentó un valor de 70.2 %, siendo menor que lo reportado por Schmid et al., (2017) con un GH de 400 % en una película con 10 % *m/m* de proteína aislada de suero; la película (P1) con 2 % de α -*TOC* nanoemulsionado presentó un GH de 130.1 % en contraste con un GH de 870 % presentado por Ghadetaj et al, (2018) en películas similares pero con la adición de 1.5 % de una nanoemulsión con aceite esencial de *Grammosciadium ptrocarpum Bioss*, la diferencia en los resultados puede relacionarse con el tamaño de gota, que para la nEm α -*TOC* era de 35.4 d.nm y del aceite esencial de 118 d.nm, razón por la cual se puede haber distribuido mejor y de forma homogénea entre la red proteica formada en la película dejando más espacio, tal como orificios libres para que la matriz pudiese permitir el acceso a más agua y por ende, aumentar el GH. También, la variación del GH está relacionada con la formación de enlaces, como lo explica Schmid, Merzbacher, y Müller (2018) al aumentar la

formación de redes mediante enlaces en la película de proteína aislada de suero, se ve disminuido el grado de hinchamiento ya que se puede acumular menos agua.

4.2.2. Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) es una propiedad importante en películas biodegradables, donde autores como Martins et al., (2012), Atarés y Chiralt (2016) y Ghadetaj et al., (2018) mencionan que esta propiedad es esencial para determinar la viabilidad de las películas para evitar reacciones de deterioro en los alimentos, previniendo el ingreso de la humedad hacia el alimento y retrasando la pérdida de humedad del producto.

La presencia de los compuestos activos modificó los valores de PVA (**Tabla 20**); a pesar de las diferencias significativas entre todas las películas, los valores son muy cercanos con el mismo orden de magnitud. La película control presentó un valor de PVA de $1.4 \times 10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ y este aumentó hasta $1.9 \times 10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ para P1 y $1.6 \times 10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ para P3. Aunque el α -TOC es hidrófobo, los valores de PVA aumentaron cuando se incorporó el α -TOC nanoemulsionado (P1 y P3). Quizás el efecto del α -TOC nanoemulsionado sobre las fuerzas de cohesión de la red proteica permite el movimiento del vapor de agua a través de la matriz de la proteína concentrada de lactosuero (Ghadetaj et al., 2018; Ramos et al., 2013) y en películas a base de quitosano que contienen α -tocoferol (Martins et al., 2012). Además, el α -TOC nanoemulsionado incorporado aumenta los espacios moleculares entre la red de proteínas y reduce la interacción intermolecular por lo que aumenta la permeabilidad de las películas de PCL. Sin embargo, la natamicina presentó una disminución de la PVA con un valor de $1.3 \times 10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ (P2) y este valor es mucho menor que la película de control, cuyo valor fue de $1.4 \times 10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$. Estos valores son consistentes con lo reportado por Ramos et al., (2012) y Ollé Resa et al., (2014a), el primer autor incorporó natamicina 250 mg L^{-1} en películas a base de proteína aislada de lactosuero utilizando concentraciones similares de glicerol y de proteína reportando una PVA de $1.28 \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$. El segundo autor presentó un rango de PVA de 3.68×10^{-9} hasta $2.12 \times 10^{-11} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ en películas a base de almidón de tapioca con la incorporación de natamicina 9.25 mg dm^{-2} de película, ambos autores concluyen que el uso de natamicina reduce el valor de esta propiedad.

Tabla 20. Permeabilidad al vapor de agua (PVA), color (L^* , a^* , b^* , ΔE^*), opacidad y brillo de películas incorporadas con nS de NAT, nEm α -TOC, o ambos.

<i>Película</i>	<i>P0</i>	<i>P1</i>	<i>P2</i>	<i>P3</i>
<i>PVA</i>	1.4 ± 0.0^a	1.9 ± 0.1^b	1.3 ± 0.1^c	1.6 ± 0.0^d
<i>L*</i>	89.6 ± 0.4^a	90.9 ± 0.6^b	90.5 ± 0.3^c	90.9 ± 0.3^b
<i>a*</i>	-1.9 ± 0.1^a	-1.5 ± 0.1^b	-1.3 ± 0.1^c	-1.6 ± 0.1^d
<i>b*</i>	9.8 ± 1.3^a	$10.7 \pm 1.6^{b,c}$	$10.2 \pm 0.8^{a,b}$	11.4 ± 0.9^c
ΔE^*	-	2.2 ± 0.8^a	1.3 ± 0.4^a	2.2 ± 0.5^a
<i>Opacidad</i>	4.2 ± 0.6^a	5.5 ± 0.3^b	6.4 ± 0.5^c	6.3 ± 0.3^c
<i>Brillo</i>	53.7 ± 1.7^a	48.1 ± 3.5^a	49.8 ± 8.6^a	51.7 ± 3.1^a

P0: Película sin ningún compuesto activo (Control); **P1:** Película con 2% (m/m) α -TOC – 0 ppm NAT; **P2:** Película con 0% (m/m) α -TOC – 300 ppm NAT; **P3:** Película con 2% (m/m) α -TOC – 300 ppm NAT. Valor promedio \pm desviación estándar, n=3. Diferentes superíndices en la misma fila son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

PVA ($\times 10^{10}$ $\text{gm}^{-1}\text{s}^{-1}\text{Pa}^{-1}$), *L**: Luminosidad, *a**: Rango cromático verde-rojo, *b**: Rango cromático verde-azul-amarillo, ΔE^* : Diferencia total del color, *Opacidad* (%) y *Brillo* (%).

4.2.3. Propiedades ópticas (Color, opacidad y brillo)

La medida del color de las películas se presenta en la **Tabla 20**. Estos atributos pueden afectar la apariencia del producto y la aceptabilidad del consumidor. De acuerdo con estos resultados, los valores de L^* , a^* , b^* , y opacidad aumentaron por la incorporación de los compuestos activos; aunque L^* y a^* muestran alguna diferencia significativa ($p < 0.05$), este valor estuvo alrededor de 90 y -1.5 respectivamente; de ahí que estas películas presentaran un color ligeramente amarillento y translúcido. Estos valores fueron mayores a lo reportado por Ghadetaj et al., (2018) en películas de proteína aislada de lactosuero con incorporación de nanoemulsión de un aceite esencial (*Grammosciadium ptrocarpum* Bioss) reportando valores para L^* y a^* de 82 y -5.5 respectivamente, concluyendo que el uso de la nanoemulsión no afectó los parámetros mencionados. Con respecto a los resultados de ΔE^* , se observó que las películas tenían un aspecto amarillo debido a la naturaleza de la proteína utilizada (**Figura 16**), las películas P1, P2 y P3 no presentaron diferencia ($p > 0.05$), las películas que contenían α -TOC (P2 y P3) presentaron valores

promedio en el mismo orden de magnitud ($\Delta E^* = 2.2$), esto como consecuencia del color amarillo del α -*TOC*, mientras que la adición de nS de *NAT* no parece tener un efecto en el color debido a que presentó un menor valor de $\Delta E^* = 1.3$. Los resultados del ΔE^* fueron consistentes con Bahram et al., (2013), que encontró que la incorporación de aceite esencial de canela aumenta el valor ΔE^* en películas de PCL; con estos resultados se podría dar la utilidad de este material de envase en alimentos cuyo color no se ve afectado por los valores obtenidos, tal es el caso del queso doble crema que presenta una tonalidad amarilla.

Una película es virtualmente transparente cuando la opacidad es cercana a cero, tal como lo evidenció Bonilla y Sobral (2016) cuyo valor de opacidad en películas a base de gelatina fue de 0.3 ± 0.033 % y para quitosano de $0.5\% \pm 0.033$; en relación a este estudio, la adición de los compuestos activos aumento la opacidad desde 4.2% para la película control hasta 5.9, 6.5 y 6.1% para P1, P2 y P3 respectivamente (**Tabla 20**). El aumento de opacidad provocado por la natamicina puede estar asociado a la baja solubilidad de la natamicina en agua (50 mg L^{-1}), la pureza (50% en lactosa), y por la estructura de la molécula de natamicina que tiene un componente hidrófobo e hidrófilo (Bierhalz et al., 2012), éste último autor reportó un aumento de la opacidad debido a la adición de natamicina en películas a base de pectina, el valor cambió desde 4.55% (película control) hasta 51.98% (película con natamicina). También, Fajardo et al., (2010) presentó un aumento de la opacidad desde 2.73% hasta 4.10% para películas a base de quitosano con natamicina; así mismo la adición de α -*TOC* aumenta la opacidad, estudio publicado por Martins et al., (2012) donde la opacidad aumentó desde 4.74% hasta 7.83% en películas de quitosano. Por lo anterior, la opacidad puede verse afectada por el proceso de fabricación de la película, el tamaño y la concentración de los compuestos cargados.

El brillo de una película es determinado por la morfología superficial alcanzada durante el secado, donde investigadores como Atarés y Chiralt (2016) explican que la incorporación de compuestos en una matriz polimérica tiene como consecuencia un aumento de la heterogeneidad y un aumento de la rugosidad de la superficie, lo que está relacionado con la disminución del brillo. Esto se ha observado en diversos estudios, Bonilla y Sobral (2016) reportaron la disminución del brillo a medida que se incorporó diferentes extractos en películas de gelatina, quitosano y su mezcla, una tendencia similar fue observada por Valencia et al., (2019) donde se evidenció que el uso de Laponita en películas a base de colágeno redujo el brillo, igualmente en la **Tabla 20** se

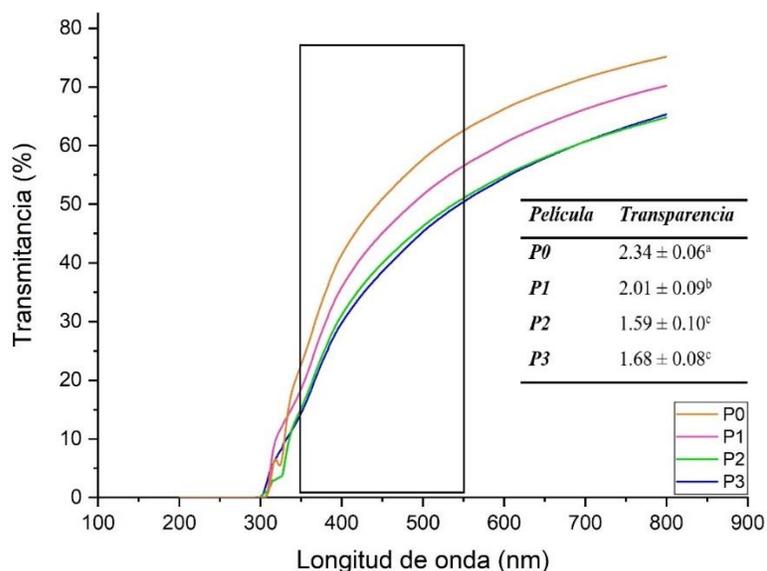
puede observar que la película P0 fue la más brillante con un valor de $53.7 \pm 1.7\%$, con la incorporación de los compuestos activos se disminuyó el brillo sin presentar diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre las películas, presentándose una ventaja al utilizar nS de NAT y nEm de α -TOC como agentes activos sin modificar negativamente esta propiedad.

4.2.4. Barrera a la luz UV-Vis y Transparencia

La transmisión de luz de las películas de muestra en la **Figura 17**, todas las películas tienen propiedades de barrera altas en el rango UV (200-300 nm), lo que puede deberse al alto contenido de aminoácidos aromáticos en las proteínas en las películas, que pueden absorber luz UV independiente de la presencia de los componentes activos (Ramos et al., 2012). En cuanto a la luz visible, el rango que comprende longitudes de onda de 350–550 nm es el más perjudicial (rectángulo en la **Figura 17**) donde se presenta un daño máximo a un alimento envasado a una longitud de onda de 450 nm según lo reportado por Robertson (2013), lo que provoca reacciones químicas inducidas por la luz visible (p. Ej., Vitamina B2). Como consecuencia, en el rango mencionado, las películas P2 y P3 presentaron la mejor barrera a la luz, tal como lo plantea Ramos et al., (2013) que confirma que la adición de compuestos activos y en especial la proteína del lactosuero mantiene una buena propiedad de barrera a la luz.

Por otro lado, la transparencia es una característica importante en las películas debido a que afecta su aplicación y también indica la capacidad en que la matriz polimérica pueda mezclarse con otros compuestos sin perder sus propiedades (Zolfi et al. 2014b). La transparencia obtenida para las películas adicionadas con α -TOC (P1), NAT (P2) y su mezcla (P3) fueron de 2.01, 1.59 y 1.68 respectivamente, estas fueron menos transparentes que la película control (2.34) presentando diferencia significativa ($p < 0.05$) (**Figura 17**), este resultado es consistente con el resultado de opacidad de la **Tabla 20**, y como lo explican Ahmed e Ikram (2016) y Atarés y Chiralt (2016) donde un mayor valor de transparencia representa un menor valor de opacidad en una película. Las películas fabricadas exhiben una transparencia similar a la obtenida por Pires et al., (2011) y Ramos et al., (2012), el primero autor obtuvo películas de merluza con aceite esencial de tomillo en rangos de 1.67 hasta 2.74; el segundo autor fabricó película de proteína de suero lácteo con antimicrobianos con valores de 1.35 hasta 3.43, en todos los casos, la adición de compuestos

activos disminuyó la transparencia de la película. Estos resultados sugieren que las películas fabricadas con proteína de lactosuero con adición de compuestos activos podrían retardar la oxidación de lípidos inducida por la luz ultravioleta en los sistemas alimentarios.



P0: Película sin ningún compuesto activo (Control); **P1:** Película con 2% (*m/m*) α -TOC – 0 ppm NAT; **P2:** Película con 0% (*m/m*) α -TOC – 300 ppm NAT; **P3:** Película con 2% (*m/m*) α -TOC – 300 ppm NAT. Valor promedio \pm desviación estándar, $n=3$. Diferentes superíndices en la misma fila son estadísticamente diferentes ($p<0.05$).

Figura 17. Espectrograma de la transmisión a luz UV-Vis y transparencia de las películas.

4.2.5. Propiedades mecánicas

La incorporación de los compuestos activos produjo películas con menor tensión de rotura (TR, MPa) y módulo elástico (ME, MPa), esto significa que las películas P1, P2 y P3 fueron menos resistentes y rígidas que la película control (P0) ($p<0.05$), por el contrario, se incrementó el porcentaje de elongación (PE, %) para las mismas películas exhibiendo películas más estirables comparadas con P0 ($p<0.05$) (**Tabla 21**). Sin embargo, la NAT fue el componente activo que provocó menos cambios considerables en TR y ME (P2 y P3). Así, la película con nEm de α -TOC (P1) presentó los valores más bajos de TR y EM ($p<0.05$). Curiosamente, este comportamiento no se observó para PE, donde todas las películas (P1, P2 y P3) presentaron valores similares entre si

($p > 0.05$). Los valores de TR disminuyeron significativamente de 10.8 ± 0.6 (P0) a 3.3 ± 0.6 MPa (P1) ($p < 0.05$) para películas cargadas con α -TOC nanoemulsionado.

Tabla 21. Propiedades mecánicas y ángulo de contacto de las películas elaboradas

Película	P0	P1	P2	P3
TR* (MPa)	10.8 ± 0.6^a	3.3 ± 0.6^b	6.4 ± 0.9^c	5.9 ± 0.7^c
PE* (%)	29.4 ± 10.2^a	48.6 ± 14.9^b	45.6 ± 9.2^b	46.4 ± 11.5^b
ME* (MPa)	2.4 ± 0.4^a	0.8 ± 0.2^b	1.5 ± 0.3^c	1.3 ± 0.2^c
A. Contacto** (°)	22.2 ± 1.2^a	27.3 ± 1.6^b	23.9 ± 0.8^a	28.0 ± 2.8^b

P0: Película sin ningún compuesto activo (Control); **P1:** Película con 2% (m/m) α -TOC – 0 ppm NAT; **P2:** Película con 0% (m/m) α -TOC – 300 ppm NAT; **P3:** Película con 2% (m/m) α -TOC – 300 ppm NAT. Valor promedio \pm desviación estándar, *n = 10, **n = 3. Diferentes superíndices en la misma fila son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

Aparentemente, los compuestos activos parecen presentar un efecto plastificante sobre las películas. Estos resultados de películas más débiles coinciden con los presentados por Ramos et al., (2012) con agentes antimicrobianos que incluyen natamicina en películas de proteína aislada de lactosuero, películas de alginato-pectina cargadas con natamicina; también coinciden con Bierhalz et al., (2012) y Noronha et al., (2014) en películas de metilcelulosa cargadas con nanocápsulas de α -tocoferol. Además, Martins et al., (2012) encontraron en películas de quitosano que la incorporación de α -tocoferol reducía el TR ($p < 0.05$), y Bahram et al., (2013) observaron que la presencia de aceite esencial de canela en el interior de las películas de PCL provocó una disminución de la TR ($p < 0.05$). Pérez-Córdoba et al., (2018) también presentó un comportamiento similar para el TR en películas de gelatina-quitosano incorporadas con α -tocoferol, aceite de ajo y cinamaldehído. Por el contrario a los resultados presentados Martins et al., (2012) relaciona que la adición de α -TOC a escala macrométrica dentro de la película de PCL produce una estructura con menor movilidad de cadena proteica, flexibilidad y resistencia a la fractura.

Los resultados del ME se comportan como los de TR, es decir, con la adición de nEm α -TOC, nS NAT o ambos en las películas redujo la rigidez ($p < 0.05$) porque estos compuestos modificaron el enlace intermolecular en las cadenas de proteínas (Ghadetaj et al., 2018). En

general, se podría esperar un ME alto debido a que un grado más alto de desnaturalización genera más enlaces disulfuro. Sin embargo, la adición de nEm α -TOC con ingredientes hidrófobos y tensioactivos modificó sus interacciones con los materiales de la película, disminuyendo el valor de ME (**Tabla 21**), también, podría realizar una acción plastificante y aumentar la movilidad del polímero debido su tamaño nanométrico.

Se han demostrado efectos análogos en películas de proteína concentrada de lactosuero con la adición de aceites esenciales *Grammosciadium ptrocarpum Bioss* (Ghadetaj et al., 2018) y natamicina (Ramos et al., 2012). El PE en la película control (P0) fue de 29.4%, la inclusión de nEm de α -TOC, nS de NAT o ambos (P1, P2 y P3) no cambió el valor de PE significativamente entre estos últimos ($p>0.05$). Bahram et al., (2013) revelaron un aumento en PE por la adición de aceite esencial de canela o lípidos en películas proteicas; en síntesis, las películas adicionadas con compuestos activos (P1, P2 y P3) son superiores al control (P0); estos resultados reflejan el grado de compatibilidad química y estructural de los compuestos en las películas de proteína concentrada de lactosuero.

4.2.6. Ángulo de contacto

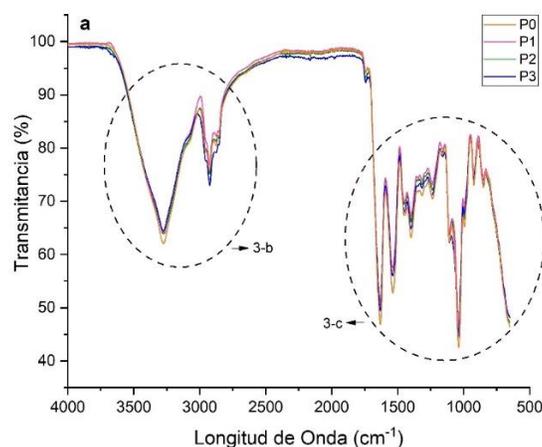
La hidrofobicidad de las películas fue evaluada mediante la medición del ángulo de contacto del agua sobre la superficie de la película que está en contacto con el aire. Los resultados en la **Tabla 21** indican que todas las películas tienen un carácter hidrófilo con ángulos de contacto menores a 65° , como lo explica Ramos et al., (2013), las películas con ángulos menores a 65° representan superficies hidrófilas y ángulos mayores que 65° a superficies hidrófobas, el mismo autor reportó un ángulo de 47.5° para películas con 10% *m/m* de proteína aislada de lactosuero y 5% *m/m* de glicerol, de la misma forma, Ozer et al., (2016) en películas de proteína aislada de suero (5 % *m/m*) con la incorporación de lisozima encontró ángulos de contacto menores a 63° , evidenciando el carácter hidrófilo de la superficie de las películas.

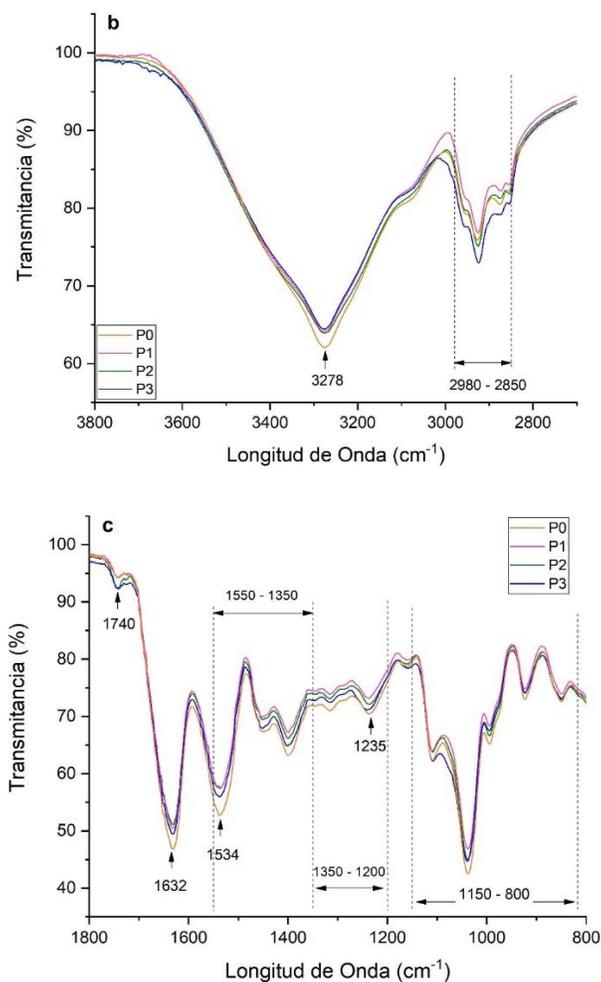
Los resultados del ángulo de contacto sugieren que la hidrofobicidad superficial de las películas no dependió de la adición de nS NAT (P2) comparada con la película control (P0) cuyos valores fueron alrededor de 23.9° y 22.2° respectivamente ($p>0.05$), esto se puede explicar por la baja concentración de natamicina (300 mg kg^{-1}) en la película (P2), un resultado similar fue

presentado por Ollé Resa et al., (2014a) donde el ángulo de contacto fue de 29° en películas de almidón con natamicina; del mismo modo se presentó diferencia ($p > 0.05$) entre las películas que contenían nEm de α -TOC comparada con la película control debido al carácter hidrofóbico de las moléculas lipídicas del α -TOC, el ángulo de contacto aumentó de 22.2° (P0) hasta 27.3° (P1) y 28.0° (P3) respectivamente, cambios similares fueron reportados por Bahram et al., (2013) en películas de proteína concentrada de lactosuero con aceite esencial de canela, Noronha et al., (2014) en películas de metilcelulosa adicionada con nano cápsulas de α -Tocoferol, y Gökkaya et al., (2019) en películas de proteína concentrada de lactosuero incorporada con aceite de girasol.

4.2.7. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

Se utilizó espectroscopía FTIR para determinar la presencia de α -TOC y NAT, y conocer los cambios estructurales en las películas fabricadas. La **Figura 18** muestra los espectros de películas los cuales mostraron bandas que variaban de 3150 a 3600 cm^{-1} atribuidas a grupos OH libres y N-H en las cadenas de proteínas; las bandas de 2850 a 2980 cm^{-1} están asociadas al estiramiento de los enlaces C-H, los picos de 1600 a 1700 cm^{-1} se atribuyen al grupo Amida-I relacionados con el estiramiento C=O y las vibraciones C-N; los picos de 1400 a 1550 cm^{-1} corresponden a Amida-II (grupos N-H); los picos en 1200 - 1350 cm^{-1} se relacionan con Amida III (estiramiento C-N y enlaces N-H), picos de 800 a 1150 cm^{-1} están asociados a enlaces de absorción de glicerol (Ghadetaj et al., 2018; Ramos et al., 2013).





P0: Película sin ningún compuesto activo (Control); **P1:** Película con 2% (*m/m*) α -TOC – 0 ppm NAT; **P2:** Película con 0% (*m/m*) α -TOC – 300 ppm NAT; **P3:** Película con 2% (*m/m*) α -TOC – 300 ppm NAT.

Figura 18. Espectrograma FTIR de las películas obtenidas. Rangos de $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ (a), $3800\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$ (b) y $1800\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ (c).

Mediante la adición de natamicina en las películas P2 y P3 el pico en 1740 cm^{-1} se relaciona con estiramientos C-H. Los picos que oscilan entre 3500 cm^{-1} y 3350 cm^{-1} también son característicos del grupo N-H de la natamicina y posiblemente fueron superpuestos por picos OH del glicerol, α -TOC y la proteína; resultados similares se presentan en películas activas de alginato con natamicina (Bierhalz et al., 2012) y polietileno con natamicina (Grafia et al., 2018). Para P1, la intensidad de la banda en 2920 cm^{-1} disminuyó al igual que Martins et al., (2012) que evidenció la posible creación de nuevas conexiones en la película por la presencia de α -TOC y el surfactante.

Para P3, la intensidad de la banda en 3278 cm^{-1} disminuyó, lo que se asocia al grupo N-H y O-H de la proteína.

Generalmente, los compuestos activos permanecieron en la red de la película mediante el establecimiento de enlaces químicos y también por atrapamiento físico, Bahram et al.,(2013) con la adición de aceite esencial de canela y Ghadetaj et al., (2018) con la inclusión de aceite esencial de *Grammosciadium ptrocarpum Bioss* han mostrado resultados similares en las propiedades estructurales de las películas.

4.2.8. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los valores de transición vítrea (T_g , °C), temperatura de fusión (T_m , °C) y entalpia de fusión (ΔH_m , J g^{-1}) se presentan en la **Tabla 22**, y en la **Figura 19** se muestran los termogramas DSC para cada una de las películas fabricadas; en todas las películas se observó una primera transición vítrea (T_{g1}) con valores de -58.5 y -57.9 °C para P0 y P1 ($p>0.05$) y -57.0 y -57.1 °C para P2 y P3 ($p>0.05$) respectivamente, este resultado coincide con lo reportado por Valencia et al., (2019) donde se observó una transición vítrea correspondiente a la fracción de glicerol presente en películas de colágeno entre -76 y -72 °C. La segunda transición vítrea (T_{g2}) puede ser asociada al polímero y sugiere la posible separación entre los compuestos de la película; en este estudio se presentó una tendencia a aumentar los valores de T_{g2} desde 30.56 °C para P0 en contraste con la película incorporada de nEm α -TOC y nS de NAT con 38.7 °C ($p<0.05$) (**Tabla 22**), debido a que estos compuestos pueden limitar la movilidad de las cadenas de proteína por la formación de diferentes tipos de enlaces en el proceso de formación de la película (discutido en la sección 4.2.7), resultados análogos lo exponen Hassannia-Kolaei et al., (2018) en películas de PCL con nano-SiO₂. En consecuencia, a temperaturas por debajo de la transición vítrea, las películas pueden tener mejores propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua para ser aplicadas como envases alimentarios (Valencia et al. 2019).

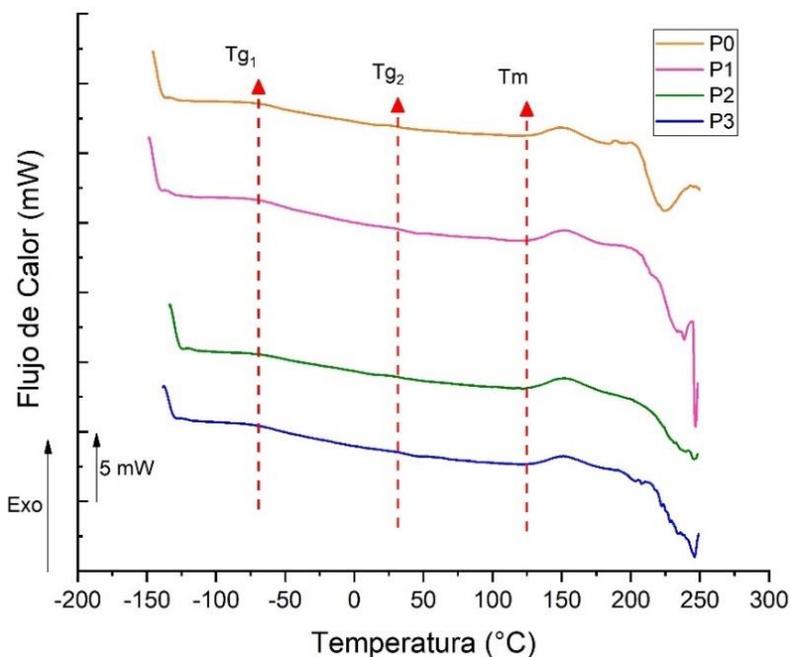
Tabla 22. Resultados del análisis de calorimetría diferencial de barrido

<i>Película</i>	<i>P0</i>	<i>P1</i>	<i>P2</i>	<i>P3</i>
T_{g1} (°C)	-58.5 ± 0.1^a	-57.9 ± 0.4^a	-57.0 ± 0.3^b	-57.1 ± 0.3^b
T_{g2} (°C)	30.5 ± 0.0^a	34.7 ± 0.0^b	34.0 ± 0.8^b	38.7 ± 0.1^c

T _m (°C)	126.4 ± 0.9 ^a	123.8 ± 0.0 ^b	122.1 ± 0.0 ^c	122.8 ± 0.0 ^c
ΔH _m (J g ⁻¹)	11.1 ± 0.1 ^a	9.9 ± 0.1 ^b	13.0 ± 0.3 ^c	10.6 ± 0.2 ^d

P0: Película sin ningún compuesto activo (Control); **P1:** Película con 2% (m/m) α -TOC – 0 ppm NAT; **P2:** Película con 0% (m/m) α -TOC – 300 ppm NAT; **P3:** Película con 2% (m/m) α -TOC – 300 ppm NAT. Valor promedio ± desviación estándar, n =3. Diferentes superíndices en la misma fila son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

Todas las películas presentaron un pico endotérmico con temperaturas de fusión (T_m) alrededor de 123.8 °C (**Figura 19**), sin embargo, la adición de los compuestos activos disminuyó este desde 126.4 °C (P0) hasta 122.8 °C (P3) ($p < 0.05$) formando estructuras menos densas relacionadas con la estabilidad térmica de la estructura de la red de proteínas (Hassannia-Kolae et al., 2018), resultados similares fueron presentados por Mohammadi et al., (2020) y Agustinisari et al., (2020) en películas de proteínas aislada de lactosuero con aceite esencial de canela y en un polímero a base de proteína de suero y maltodextrina en la encapsulación de eugenol respectivamente; Hwang et al., (2013) explica que esta disminución se puede asociar al efecto plastificante del α -TOC, disminuyendo la cristalinidad (Martins et al., 2012), para la película con NAT se explica que el descenso de T_m es debido a la adecuada distribución en la matriz polimérica (Khames et al. 2019).



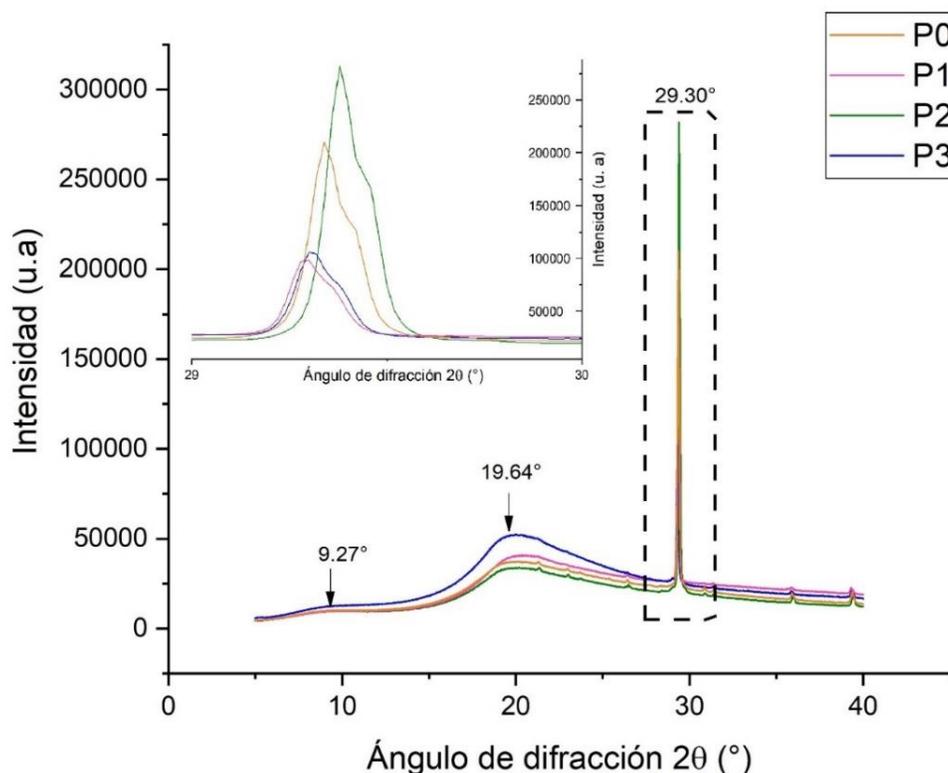
P0: Película sin ningún compuesto activo (Control); **P1:** Película con 2% (*m/m*) α -TOC – 0 ppm NAT; **P2:** Película con 0% (*m/m*) α -TOC – 300 ppm NAT; **P3:** Película con 2% (*m/m*) α -TOC – 300 ppm NAT.

Figura 19. Termogramas DSC de las películas obtenidas.

La entalpia de fusión en el pico endotérmico disminuyó hasta 9.99 J g^{-1} con la adición de α -TOC ($p < 0.05$). Por el contrario, la adición de NAT, aumentó el valor de la entalpia hasta 13.03 J g^{-1} ($p < 0.05$). La disminución de ΔH_m es asociada con la disminución de la cristalinidad y con la interrupción que presentan los compuestos en las interacciones entre las cadenas del polímero, generando un aumento en el volumen libre de la red y una movilidad segmentaria de las cadenas del material (Sukhija et al., 2016). Los picos exotérmicos presentados después de $150 \text{ }^\circ\text{C}$ se atribuyen a la descomposición de la película.

4.2.9. Difracción de Rayos X

Los patrones de difracción de rayos X están relacionados con la estructura amorfa-cristalina de los materiales a nivel molecular que depende de la velocidad de cristalización (Zhang et al. 2020). Los difractogramas de las películas elaboradas se presentan en la **Figura 20**, los picos agudos se asocian con las fracciones cristalinas, mientras que las partes amorfas se representan con picos amplios y difusos (Farrokhi et al., 2018); cómo se puede apreciar, todas las películas presentaron dos picos amorfos característicos de difracción atribuidos a la PCL, el primero a $2\theta \approx 9.27^\circ$ con menos intensidad que el segundo a $2\theta \approx 19.64^\circ$, este carácter amorfo es el efecto del tratamiento térmico de la proteína, es decir, con un calentamiento intensivo, la estructura globular de las proteínas del suero que está altamente ordenada se transforma en forma fibrilar (Farrokhi et al., 2018); estos resultados son consistentes con lo presentado por Hassannia-Kolae et al., (2018), Ghadetaj et al., (2018) y Zhang et al., (2020) en películas de proteína concentrada y aislada de lactosuero donde se indica la existencia de estas mismas regiones, donde las denominan semicristalinas y de enlaces no covalentes estableciéndose como un biopolímero semicristalino. A pesar del carácter amorfo, se presenta un pico agudo a $2\theta \approx 29.30^\circ$, este pico se redujo con la incorporación de α -TOC (P1) y se incrementó con la adición de NAT (P2), lo que sugiere un cambio conformacional en el polímero debido a las interacciones intermoleculares entre el polímero (Nallan et al., 2020), glicerol, y los componentes de la nEm de α -TOC y nS NAT (discutido anteriormente en la sesión 4.2.7). Por la adición de α -TOC y NAT (P3), la intensidad de los picos amorfos se vio incrementada en el rango 2θ de 5.00° hasta 27.30° , demostrando miscibilidad molecular e interacción entre los componentes (Sukhija et al., 2016).



P0: Película sin ningún compuesto activo (Control); **P1:** Película con 2% (*m/m*) α -TOC – 0 ppm NAT; **P2:** Película con 0% (*m/m*) α -TOC – 300 ppm NAT; **P3:** Película con 2% (*m/m*) α -TOC – 300 ppm NAT.

Figura 20. Difractograma de las películas elaboradas

4.2.10. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

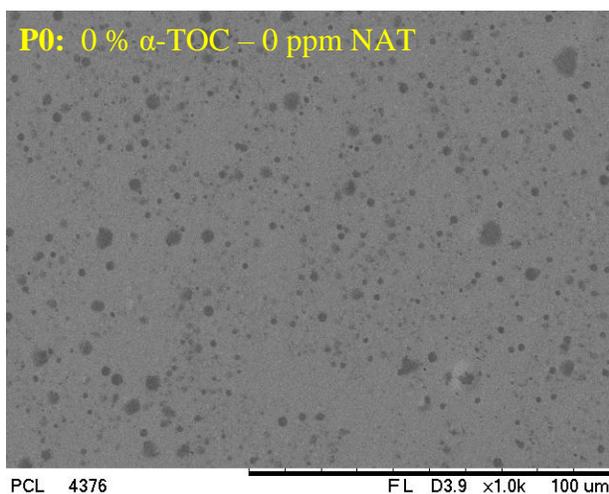
Las micrografías de la superficie y de la sección transversal de las películas elaboradas se presenta en la **Figura 21**, en todas las películas se pueden observar superficies heterogéneas debido a la presencia de estructuras circulares que parecen estar ocupadas por gotitas de glicerol, pudiéndose observar aún más en la película control (P0), esta misma distribución se presentó en la sección transversal, estos resultados sugieren que la cantidad de glicerol utilizado en la formulación de las películas (5% *m/m*) está en exceso, según estudios en proteína de suero presentados por Otín, (2011), Ramos et al., (2013), Qazanfarzadeh y Kadivar (2016) demostraron que el uso de 5 % (*m/m*) del mismo plastificante presentó muy buenas propiedades.

Por otro lado, no se observó separación entre los compuestos activos y la proteína, lo que indica una alta compatibilidad del α -TOC nanoemulsionado (P1), la NAT (P2) y su mezcla (P3) con la matriz polimérica, produciendo una morfología relativamente suave y compacta. Además, se observaron pequeños orificios (poros) en la sección transversal, tal vez fueron las marcas de gotitas que permanecieron en la película durante la fracturación con nitrógeno.

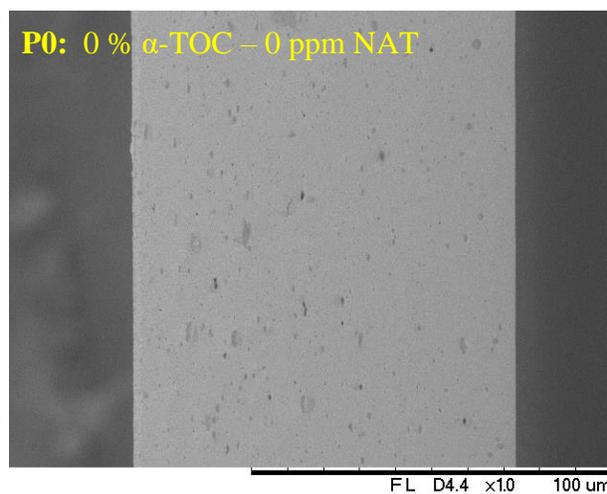
Considerando los resultados de las micrografías, Noronha et al., (2014) encontró que las nanocápsulas de α -TOC incorporadas en película de metilcelulosa, presentaron una estructura lisa y compacta probablemente debido al fuerte enlace químico entre los componente incorporados. Oymaci y Altinkaya (2016) presentó resultados similares, donde se indica que la incorporación de nanoemulsión puede disminuir la miscibilidad de las películas de proteína concentrada de lactosuero, mientras que produce una estructura menos compacta y más porosa.

La película a la cual se le adicionó nS NAT (P2) mostró una superficie libre de cristales, en comparación con los presentados por Bierhalz et al., (2012) con películas de alginato/pectina que indican que el agregado de natamicina mostró presencia de cristales y una superficie no uniforme.

Superficie



Sección transversal



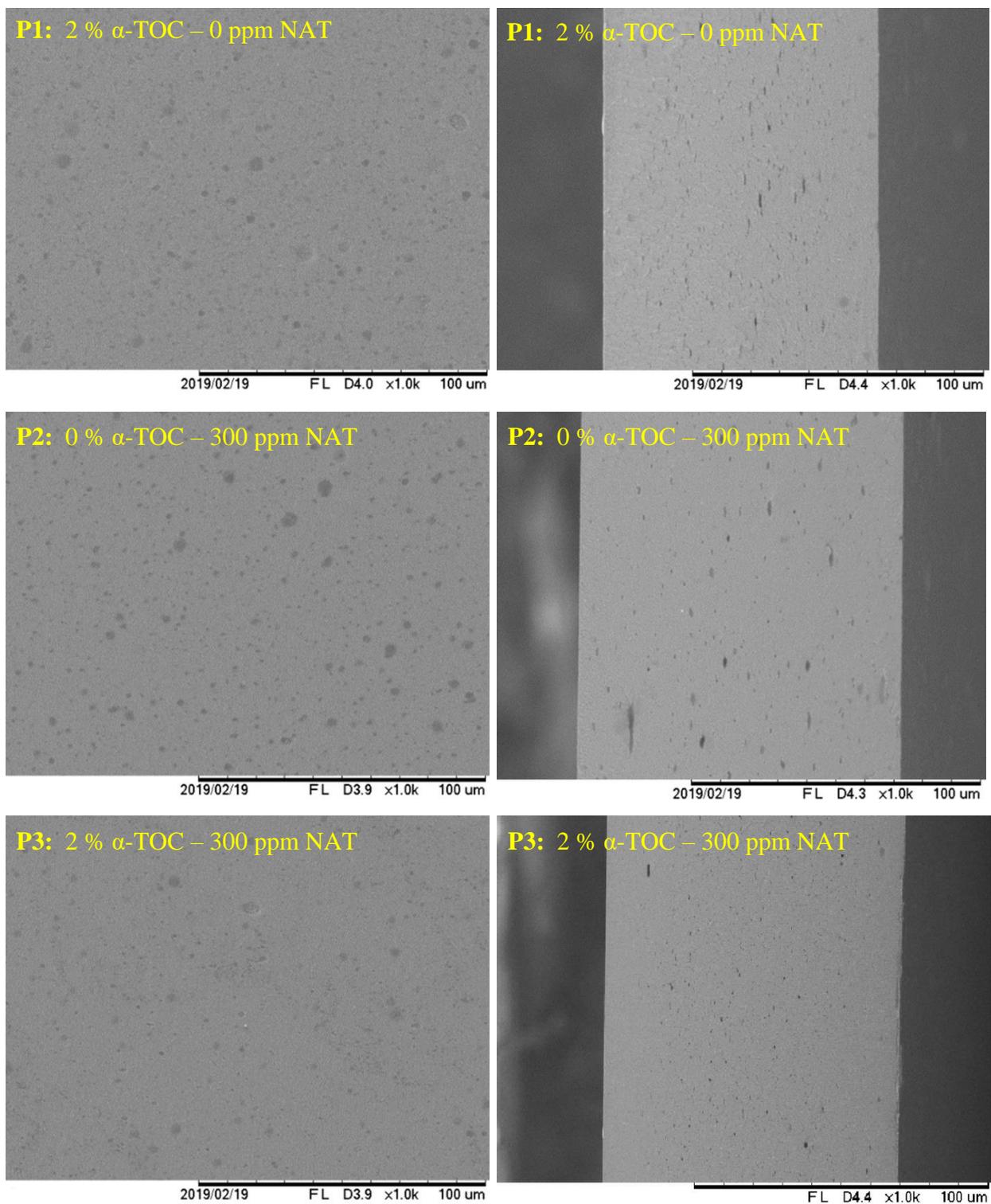


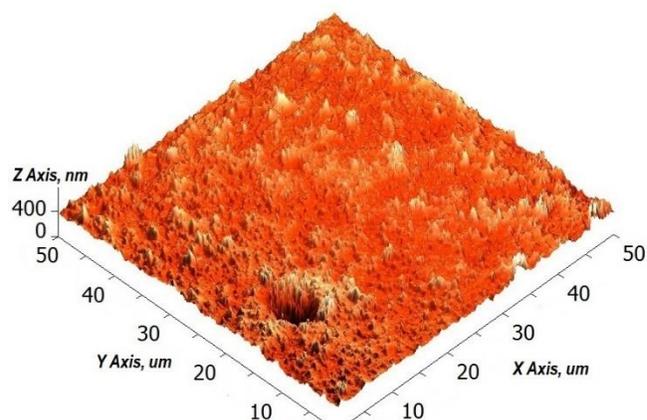
Figura 21. Micrografías SEM de la superficie y la sección transversal de las películas.

4.2.11. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

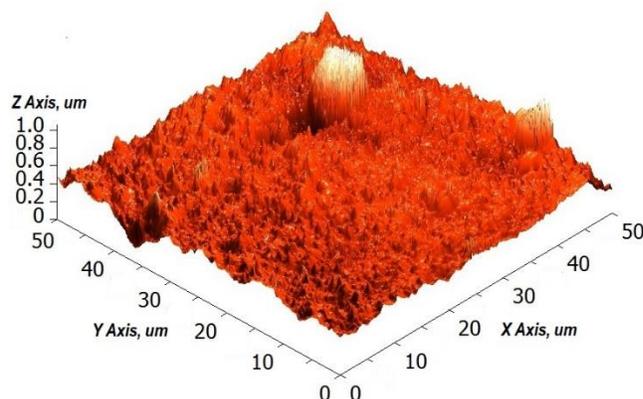
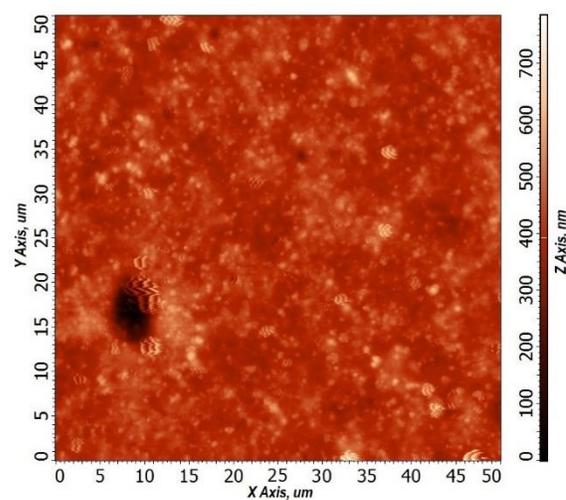
La topografía de la superficie de las películas que está en contacto con el aire se presenta en la **Figura 22**, excepto para la película control (P0) debido a que el resultado SEM mostró alta concentración de glicerol en la superficie por lo que no se comprometió la integridad del cantiléver. Las imágenes topográficas mostraron que todas las películas presentaron proyecciones o pequeñas irregularidades, tal como lo presentó Ghanbarzadeh y Oromiehi (2008) en materiales de proteína de suero, y su mezcla con zeína; en este estudio, la película que contenía nEm de α -TOC (P1) presentó proyecciones más bajas y homogéneas, evidenciando una superficie más suave que P2 y P3 respectivamente, estos resultados confirman lo descrito en el numeral 4.2.10.

Los valores de rugosidad promedio (R_p , nm) para P1, P2 y P3 fue de 50, 65 y 60 respectivamente (**Figura 22**), estos valores, en especial P2 y P3 fueron comparables con lo reportado por de Paula Herrmann et al., (2004), Ghanbarzadeh y Oromiehi (2008) en películas de suero lácteo con valores aproximados de 61.5 nm para ambos estudios; por otro lado Zolfi et al., (2014a) obtuvo una mayor rugosidad en películas de kefirán y proteína aislada de suero con la adición de nanopartículas de TiO_2 y nanoarcillas, reportando valores de 215.2 y 233.5 nm respectivamente; los resultados de este estudio evidencian que la adición de α -TOC y NAT a escala nanométrica no afecta la rugosidad de las películas comparada con películas fabricadas sin adición de otros compuestos.

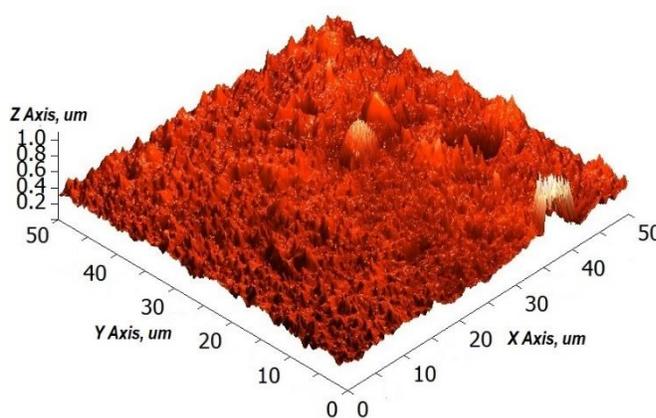
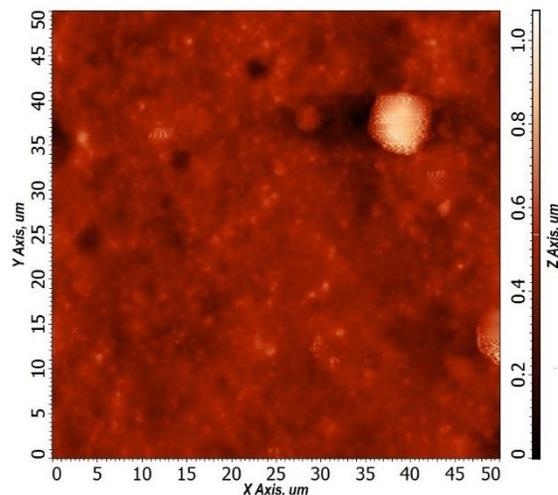
Retomando la topografía de las películas, Gökkaya et al., (2019) explica que el aumento de la rugosidad, la existencia de agujeros y grietas en las películas puede atribuirse inicialmente a la separación de las fases de la matriz, o bien, agregaciones de los compuestos activos en el proceso de secado, en este caso, el glicerol (como se vio en las imágenes SEM).

Topografía en 3D

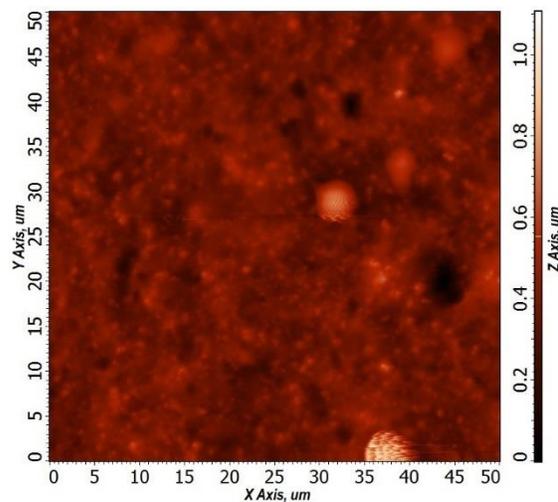
P1: 2 % α -TOC – 0 ppm NAT
R_p: 50 nm, **R_{mc}:** 65 nm

Topografía en 2D

P2: 0 % α -TOC – 300 ppm NAT
R_p: 65 nm, **R_{mc}:** 94 nm



P3: 2 % α -TOC – 300 ppm NAT
R_p: 60 nm, **R_{mc}:** 78 nm



R_p: Rugosidad promedio (nm), **R_{mc}:** Rugosidad media cuadratica (nm)

Figura 22. Topografía y parámetros de rugosidad de las películas elaboradas.

4.2.12. Actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar

Como se esperaba, las películas incorporadas con natamicina (P2 y P3) presentaron inhibición contra *C. albicans*, *P. chrysogenum* y *S. cerevisiae* al evaluarse mediante el método de difusión en agar (**Figura 23**). Por el contrario, las películas sin natamicina (P0 y P1) no mostraron actividad al evaluarse mediante el método de difusión en agar antimicrobiana en área de inhibición; el área de inhibición de las películas P2 y P3 fue más extensa que la película de control, sin diferencia estadística entre ellas y los microorganismos evaluados ($p>0.05$) (**Tabla 23**), esto puede ser atribuido a la buena distribución del antimicrobiano en la película (como se discutió en la sesión 4.2.10) y también por la difusión del antimicrobiano a través de la matriz polimérica. La presencia de α -TOC (P3) solo conduce a una reducción en el área de inhibición, sin embargo, no modificó la actividad antimicrobiana de las películas ($p>0.05$).

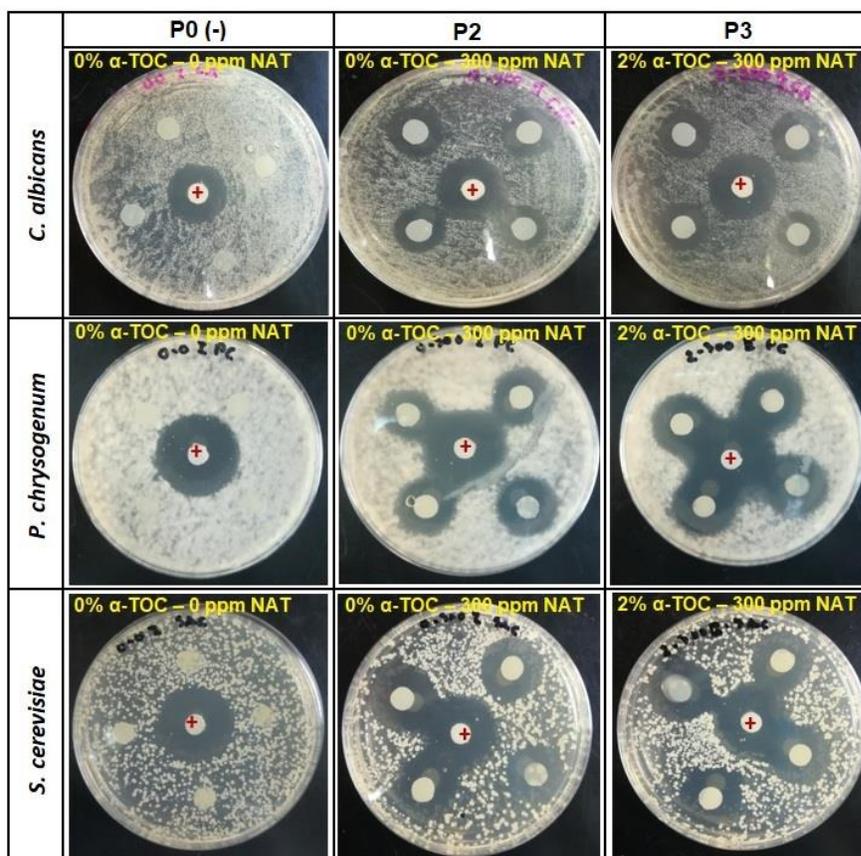


Figura 23. Inhibición de *Candida albicans*, *Penicillium chrysogenum* y *Saccharomyces cerevisiae* por método de difusión en disco.

La difusión de NAT en el agar fue similar para la prueba en mohos y levaduras debido a que se utilizó el mismo agar para su crecimiento, sin embargo, los diferentes diámetros obtenidos se relacionaron con la sensibilidad a la natamicina y diferente tasa de crecimiento para los microorganismos probados (**Tabla 23**). Estudios reportados por diversos autores reportaron resultados análogos, tal como lo plantea Fajardo et al., (2010) donde reportó inhibición contra *Penicillium crustosum*, *P. roqueforti*, *P. commune* y *Aspergillus niger* de un recubrimiento de quitosano con natamicina; Ramos et al., (2012) informaron que las películas de proteína de suero incorporada con natamicina inhibieron la levadura *Y. lipolytica*; Ollé Resa et al., (2014) incorporó natamicina en películas a base de almidón, las cuales presentaron actividad antimicrobiana contra *S. cerevisiae* y González-Forte et al., (2019) reportó halos de inhibición contra *Penicillium spp*, *Fusarium sp*, *Cladosporium sp*, *Alternaria sp*, *Mucor sp* y *Aspergillus Niger sp* en un recubrimiento de almidón enriquecido con natamicina en contacto con queso. Estos estudios demostraron que la natamicina presenta inhibición microbiana al unirse particularmente al ergosterol, que solo está presente en mohos y membranas plasmáticas de levadura inhibiendo la fusión vacuolar a través de la mencionada interacción con el ergosterol (Ollé Resa et al., 2014b).

Tabla 23. Halo de inhibición y capacidad antioxidante en equivalente Trolox TEAC de las películas.

<i>Película</i>	<i>Zona de inhibición</i>			<i>TEAC</i>		
	<i>(mm²)</i>			<i>(μmol TE/g película)</i>		
	<i>C. albicans</i>	<i>P. chrysogenum</i>	<i>S. cerevisiae</i>	ABTS*⁺	DPPH*	FRAP
P0	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a			
P1	-	-	-	19.5 ± 1.1 ^b	28.8 ± 0.5 ^b	9.5 ± 0.9 ^b
P2	170.1 ± 22.0 ^b	315.3 ± 35.5 ^b	334.9 ± 40.5 ^b	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a
P3	150.9 ± 29.3 ^b	288.2 ± 39.6 ^b	303.5 ± 14.5 ^b	14.6 ± 1.2 ^c	26.5 ± 0.7 ^c	4.4 ± 1.0 ^c

P0: Película sin ningún compuesto activo (Control); **P1:** Película con 2% (m/m) α -TOC – 0 ppm NAT; **P2:** Película con 0% (m/m) α -TOC – 300 ppm NAT; **P3:** Película con 2% (m/m) α -TOC – 300 ppm NAT. Valor promedio \pm desviación estándar, n = 3. Diferentes superíndices en la misma columna son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

4.2.13. Actividad antioxidante

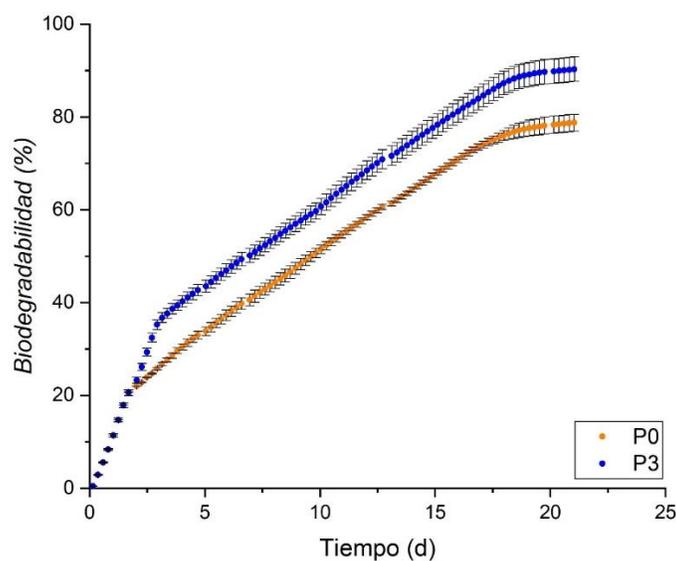
La actividad antioxidante de las películas obtenidas se expresó en Capacidad antioxidante equivalente al trolox, TEAC ($\mu\text{mol TE/g}$ película) evaluada para $\text{ABTS}^{\bullet+}$, DPPH^{\bullet} y FRAP (**Tabla 23**). Como era de esperar, la película control (P0) y la que contenía solamente *NAT* (P2) no presentaron ninguna actividad captadora de radicales en métodos probados porque ni la proteína, ni la *NAT* tienen esta propiedad. Solo las películas que contienen $\alpha\text{-TOC}$ (P1 y P3) mostraron actividad antioxidante, de esta misma forma lo evidenció Noronha et al.; (2014) donde adicionó nanocápsulas de α -tocoferol en películas de metilcelulosa; generalmente el $\alpha\text{-TOC}$ actúa como captador de los radicales peroxílo e inhibidor de la peroxidación lipídica, por lo que puede donar un átomo de hidrógeno para captar los radicales libres mediante la producción del radical α -tocoferoxilo hasta la decoloración del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ y DPPH^{\bullet} , respectivamente (Azzi 2018; Contreras-Calderón et al., 2011; Re et al., 1999).

La película P1 presentó una actividad antioxidante superior ($p < 0.05$) a la película P3 en los tres métodos evaluados, lo que sugiere que la incorporación de *NAT* en P3 reduce la acción antioxidante del $\alpha\text{-TOC}$, es decir, tiene efecto antagonista. Aunque P3 tiene $\alpha\text{-TOC}$ y *NAT*, su capacidad antioxidante en términos de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ y DPPH^{\bullet} fue mayor que lo reportado por Martelli et al., (2017) y Pérez-Córdoba et al., (2018), el primer autor fabricó películas de carboximetilcelulosa con α -tocoferol presentado valores de 2.1 ± 0.4 y 2.8 ± 0.3 respectivamente, y el segundo autor elaboró películas de gelatina con la adición α -tocoferol nanoemulsionado, reportando valores de 2.6 ± 0.1 y $0.2 \pm 0.0 \mu\text{mol TE/g}$ película.

4.2.14. Biodegradabilidad de las películas

Los resultados obtenidos en la prueba de degradación aerobia en condiciones controladas de compostaje muestran que la película control (P0) y la película con 2% (*m/m*) $\alpha\text{-TOC}$ – 300 ppm *NAT* (P3) experimentaron una biodegradación aeróbica en el compost, lo que indica una mayor mineralización, es decir, generación de CO_2 en cada uno de los biorreactores durante los 21 días de experimentación; la biodegradabilidad para P3 fue mayor que para P0, presentando diferencia significativa ($p < 0.05$) con valores de $90.29 \pm 3.73\%$ y $78.77 \pm 3.64\%$ respectivamente. En la

Figura 24 se presenta la curva de biodegradación para las películas mencionadas, la diferencia en los perfiles respirométricos para P3 y P0 se observaron a partir de los 2.2 días, en el caso de P3, la frecuencia respiratoria indicada por la pendiente de la curva se mantuvo constante hasta el día 3, mientras que para P0 fue hasta el día 1.7; ahora bien, la biodegradación ocurre en los extremos y dominios amorfos del polímero, donde las cadenas son más flexibles y móviles que en las regiones cristalinas (Salazar-Sánchez et al. 2019), por consiguiente, en este trabajo se observó que por la adición de los compuestos activos a la película de PCL, la intensidad de los picos amorfos se vio incrementada (discutido en la sesión 4.2.9 Difracción de Rayos X) resultando un mayor valor de biodegradabilidad que la película control. Con respecto al carácter hidrofílico de la película y su influencia en la biodegradabilidad, Granda-Restrepo et al., (2014) y Camacho-Muñoz et al., (2020) coinciden que la degradación depende directamente de la naturaleza hidrofílica y la presencia de enlaces hidrolizables en la proteína y el glicerol utilizado como plastificante, recordando el valor de la solubilidad de las películas, la cual fue mayor a 55% (**Tabla 19**, sesión 4.2.1), aumentando en el compost un mayor contenido de nutrientes solubles en agua ya que el medio fue preparado con una humedad aproximada de 43.2 %. Los resultados obtenidos en el presente estudio son acordes con lo reportado por Cinelli et al., (2014) en películas de ácido poli láctico / proteína de suero, donde se observó una desintegración mayor al 90% en 30 días en el compost.



P0: Película sin compuestos activos (Control); **P3:** Película con 2% (*m/m*) α -TOC – 300 ppm NAT. Valor promedio \pm desviación estándar, $n = 3$.

Figura 24. Curva de biodegradación de las películas obtenidas de proteína concentrada de lactosuero.

4.3. Migración de los compuestos activos

4.3.1. Determinación del coeficiente de partición, de difusión y energía de activación: *in vitro*

El comportamiento de la difusión de *NAT* desde la película de proteína concentrada de lactosuero con 2% α -*TOC* y 300 ppm de *NAT* (P3) a tres temperaturas se presenta en la **Figura 25**, la natamicina alcanzó el equilibrio en el medio (agua) después de 91.6, 78.3 y 49.7 min para 4, 14, y 25 °C respectivamente y su concentración final fue de 0.235, 0.256 y 0.275 mg g⁻¹ en el mismo orden. Para la determinación del coeficiente de partición ($K_{p,a}$, Ec. (4)) se cuantificó la *NAT* en la película transcurrido el experimento a 4, 14, y 25 °C con valores de 0.065, 0.044 y 0.025 mg g⁻¹ para obtener valores de $K_{p,a}$ reportados en la **Tabla 24**; recordando el concepto del coeficiente de partición expresado por Granda-Restrepo et al., (2009), el $K_{p,a}$ determina la solubilidad relativa de un migrante entre el material de envase y un alimento alcanzado el equilibrio; en este estudio, los valores obtenidos de $K_{p,a}$, fueron menores que 1, lo que indica mayor concentración de *NAT* en el agua comparado con la película, esto debido a que el sistema se encontraba en continua agitación y el agua estaba rodeando la película, lo que permite una mayor difusión desde la película hasta el fluido, el valor de $K_{p,a} < 1$ describe la alta afinidad del migrante en el alimento, en este caso el agua en contraste con el envase (Cruz-Zuñiga 2011; Manzanarez-López et al. 2011; Samsudin et al., 2018).

El coeficiente de difusión para la natamicina se calculó mediante la Ec. (14) para 100 términos de la sumatoria, las consideraciones para el uso de este modelo fueron: *i*) la *NAT* inicialmente se encuentra distribuida de manera homogénea en la película, *ii*) la masa total de *NAT* se conserva durante todo el proceso por lo que no se consideran reacciones químicas o evaporación *iii*) no hay resistencia entre la interfase de la película y el medio estando en equilibrio, *iv*) la matriz polimérica no cambia en todo el proceso de migración, *v*) la migración ocurre en ambas caras de la película ya que está sumergida en el medio y está controlada por la difusión de Fick *vi*) el $K_{p,a}$ obtenido fue menor que 1 y $\alpha \gg 1$ representada por la Ec. (13), donde α es una relación adimensional entre los volúmenes del alimento (V_a) y el material de envase (V_p) (Manzanarez-

López et al. 2011; Samsudin et al., 2018), los valores de α para NAT en este estudio fueron de 1946.1, 2082.1 y 4767.8 para 4, 14 y 25 °C respectivamente.

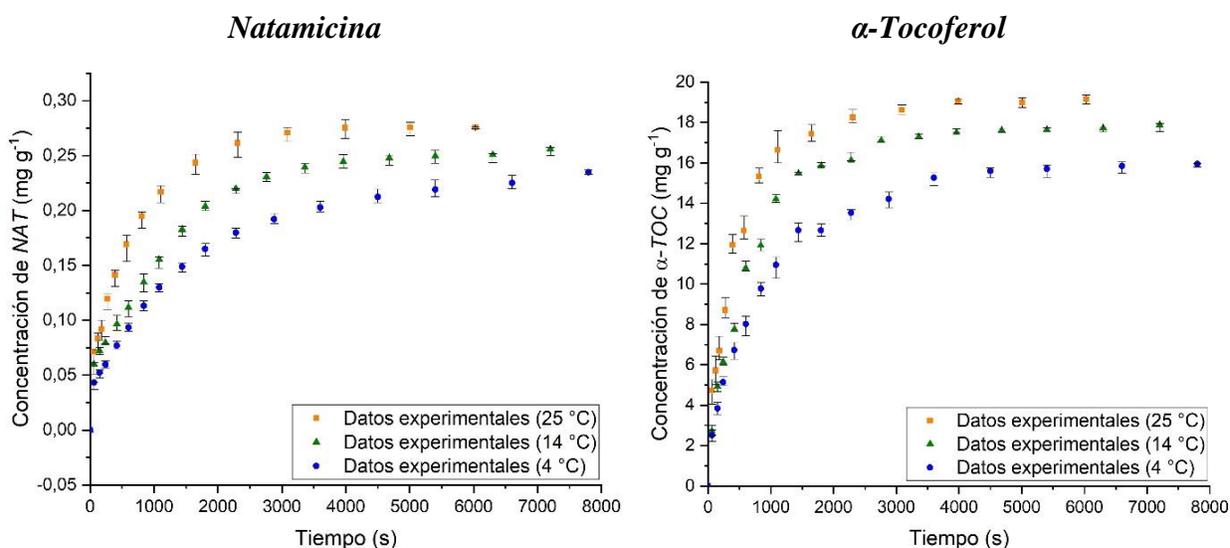


Figura 25. Cambio de la concentración de NAT y α -TOC en medio acuoso para la película con 2% TOC – 300 ppm NAT a tres temperaturas (in vitro).

En la **Figura 26** se muestran las gráficas de la difusión conforme a la segunda ley de Fick para las tres temperaturas evaluadas y los resultados para D ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) a las temperaturas evaluadas (**Tabla 24**) y estos fueron mayores que los coeficientes de difusión para la natamicina presentado por Franssen et al., (2004) con un valor de $6.67 \times 10^{-11} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ en películas con 10% (m/m) de proteína aislada de lactosuero a 24 °C, Fajardo et al., (2010) reportó un valor de $3.60 \times 10^{-10} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ a 4 °C en películas de quitosano, Altenhofen et al., (2012) con $1.64 \times 10^{-11} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ a 25 °C en películas de alginato; el aumento de esta propiedad puede explicarse a que el sistema se encontraba en constante agitación y también por el tamaño a escala nanométrica en la que se encuentra la natamicina incorporada en la película.

Tabla 24. Coeficiente de partición y de difusión de la natamicina y del α -Tocoferol in vitro para la película de proteína concentrada de lactosuero.

T (°C)	<i>Natamicina</i>			<i>α-Tocoferol</i>		
	$K_{p,a}$	$D \times 10^9$ ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	R^2	$K_{p,a}$	$D \times 10^9$ ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	R^2

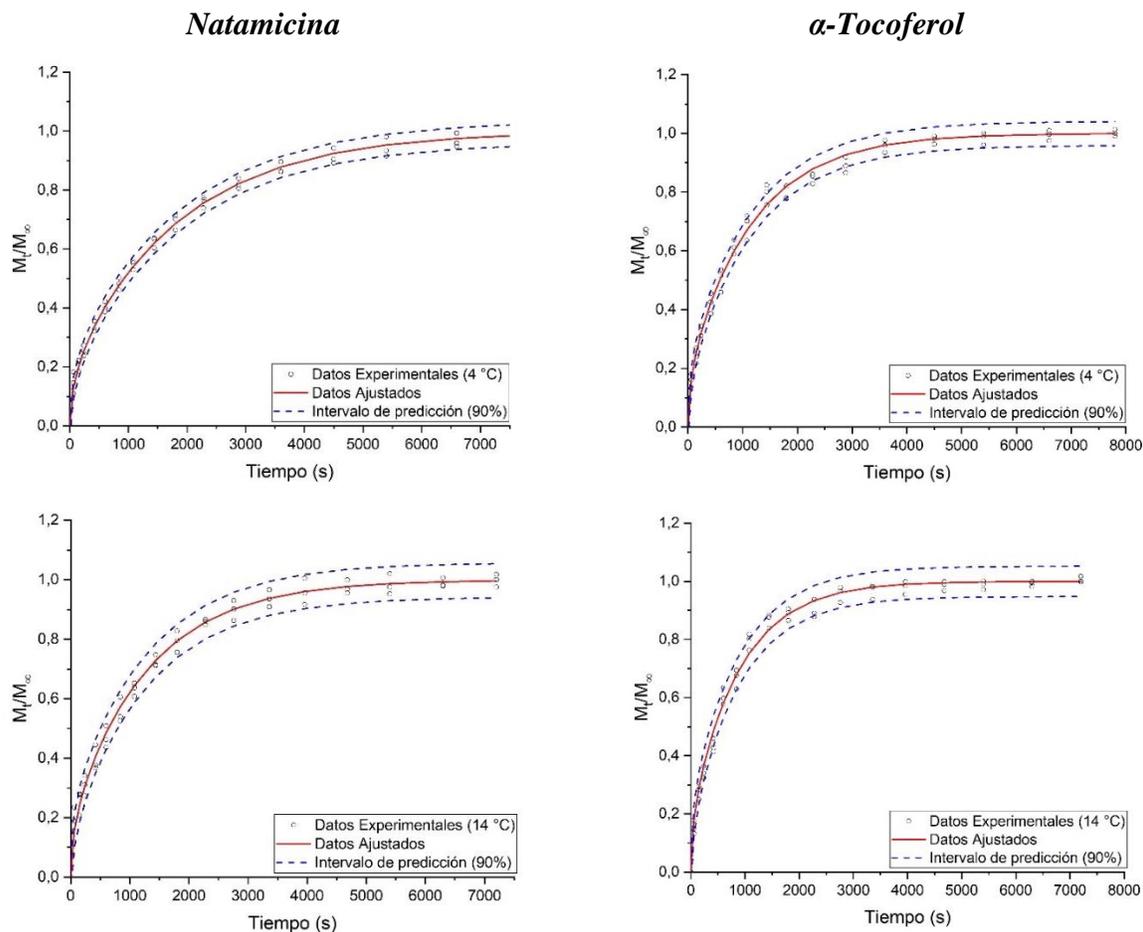
4	0.28 ± 0.02^a	2.61 ± 0.23^a	0.9964	0.25 ± 0.02^a	4.10 ± 0.47^a	0.9963
14	0.17 ± 0.04^b	3.55 ± 0.44^b	0.9918	0.12 ± 0.03^b	5.33 ± 0.59^a	0.9940
25	0.09 ± 0.01^c	6.36 ± 0.13^c	0.9905	0.04 ± 0.02^c	7.93 ± 1.53^b	0.9928
Ea (kJ mol ⁻¹)	-	29.17	0.9708	-	21.56	0.9626

Película con 2% (m/m) α -TOC – 300 ppm NAT. Valor promedio \pm desviación estándar, n = 3.

Diferentes superíndices en la misma columna son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

La concentración de α -TOC liberado desde la película con 2% α -TOC y 300 ppm de NAT (P3) hacia la solución acuosa de etanol al 50% (m/m) se muestra en la **Figura 25**. Gráficamente el equilibrio en el medio se alcanzó después de 3600, 2760 y 2310 s o su equivalente en minutos de 60, 46 y 38.5 para 4, 14, y 25 °C respectivamente y su concentración final fue de 15.95, 17.88 y 19.13 mg g⁻¹ en el mismo orden. La concentración de α -TOC en la película se cuantificó transcurrido el experimento, asumiendo que todo el compuesto activo liberado de la película migró hacia el medio. La concentración en equilibrio de α -TOC en la película fue de 4.05, 2.12 y 0.84 mg g⁻¹ a 4, 14, y 25 °C respectivamente, los valores de $K_{p,a}$ para el α -TOC se presentan en la **Tabla 24**, los valores fueron decreciendo al aumentar la temperatura y estos fueron menores que 1 presentando diferencia entre las tres temperaturas evaluadas ($p < 0.05$). La relación inversa del $K_{p,a}$ con la temperatura también la presentó Manzanarez-López et al., (2011) para 2.5% de α -Tocoferol en películas de poli ácido láctico sumergidas en metanol con valores de $K_{p,a} > 1$ coincidiendo con la baja migración en dicho estudio; Hwang et al., (2013) presentó la misma tendencia decreciente de $K_{p,a}$ con el aumento de la temperatura y cuyos valores obtenidos de $K_{p,a} > 1$ para diferentes concentraciones de α -Tocoferol en películas de ácido poli láctico / almidón en etanol. Dicha disminución del valor de $K_{p,a}$, está influenciada por la energía requerida para que el sistema pueda romper los enlaces entre los grupos polares de α -Tocoferol y la proteína. Los resultados de este estudio pueden explicarse a la continua agitación del sistema, a la solubilidad y al grado de hinchamiento de la película en agua con valores de 55.3 y 95.6 % respectivamente (**Tabla 19**), lo que permite aumentar la difusión desde la película hasta el medio describiendo mayor afinidad por este último. Los valores de α para α -Tocoferol en este estudio fueron de 1783.7, 3716.0 y 11148.1 para 4, 14 y 25 °C respectivamente.

El coeficiente de difusión *in vitro* para el α -TOC se calculó de la misma forma que para la natamicina. Las gráficas de la difusión a las tres temperaturas evaluadas conforme a la segunda del de Fick se presenta en la **Figura 26**; los resultados para el coeficiente de difusión presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) (**Tabla 24**) para las tres temperaturas cuyo orden de magnitud fue de 10^{-9} , estos resultados fueron mayores que lo reportado por Manzanarez-López et al., (2011) para el α -Tocoferol con un valor de $3.16 \times 10^{-11} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ en películas de poli ácido láctico a $23 \text{ }^\circ\text{C}$, también fue mayor a lo presentado por Hwang et al., (2013) en películas de ácido poli láctico / almidón α -Tocoferol con un valor de 4.63×10^{-11} y $22.2 \times 10^{-11} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para 13 y $23 \text{ }^\circ\text{C}$ respectivamente; el α -TOC en la escala nanométrica presente en la película y la agitación continua del sistema puede explicar el aumento del coeficiente de difusión.



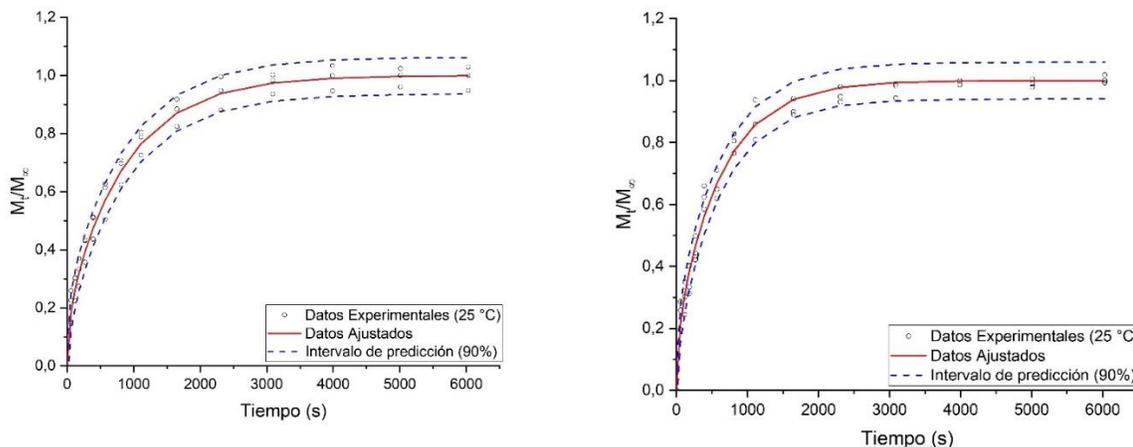


Figura 26. Difusión *in vitro* de la natamicina y del α -Tocoferol hacia la solución acuosa de etanol 50% (m/m) conforme la segunda ley de Fick para la película con 2% (m/m) α -TOC-300 ppm NAT.

El efecto de la temperatura en la difusión de la natamicina y el α -Tocoferol a través de la matriz proteica fue descrita mediante la ecuación de Arrhenius (**Tabla 24**), donde E_a es la energía requerida para producir una abertura entre las cadenas de la proteína para que una molécula del migrante se mueva a través de ella (Manzanarez-López et al. 2011). Los valores de E_a para la natamicina y α -Tocoferol fueron de 29.17 y 21.56 kJ mol⁻¹ respectivamente. De la revisión de literatura no se evidenció un reporte de la E_a para la natamicina en sistemas de envasado, por lo que no se puede realizar una comparación en el orden de magnitud de dicha propiedad; por el contrario, el valor obtenido de este estudio para el α -Tocoferol fue menor que lo reportado para el mismo compuesto por Manzanarez-López et al., (2011) y Hwang et al., (2013) en películas de poli ácido láctico cuya E_a fue de 96.2 y 140.6 kJ mol⁻¹ respectivamente, esto explica que se necesita menos energía para que el α -Tocoferol se difunda desde la película hacia la solución acuosa de etanol, comparada con los estudios relacionados, además, las gotas de α -Tocoferol se encuentran tamaño nanométrico y, químicamente posee un solo grupo hidroxilo con una cadena de 13 carbonos, lo que permite una interacción moderada con la proteína.

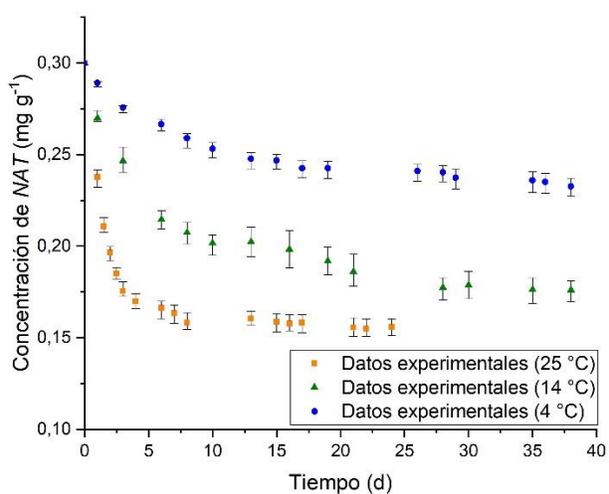
4.3.2. Determinación del coeficiente de partición, de difusión y energía de activación en el sistema de envasado Película-Queso

El proceso de difusión en alimentos sólidos, como en el caso del presente estudio, es mucho más complejo que en un medio líquido simple (*in vitro*). Por consiguiente, el estudio de la difusión en el sistema película-queso puede obtener una evaluación más realista de este fenómeno, la Ec. (14) fue empleada para el cálculo del coeficiente de difusión para la *NAT* y el α -*TOC*, el cálculo se realizó para 100 términos de la sumatoria, teniendo presente las siguientes suposiciones *i*) los compuestos inicialmente se encuentran distribuidos de manera homogénea en la película, *ii*) la masa total de cada compuesto se conserva durante todo el proceso por lo que no se consideran reacciones químicas o evaporación *iii*) no hay resistencia entre la interfase de la película y el queso estando en equilibrio, *iv*) la matriz polimérica no cambia en todo el proceso de migración, *v*) la migración ocurre en la superficie en contacto con el queso (unidireccional) y está controlada por la difusión de Fick. La **Figura 27** presenta la concentración de *NAT* y α -*TOC* en la película (P3) en contacto con el queso doble crema almacenadas a tres temperaturas, donde se evidencia la influencia de la temperatura en la migración; se obtuvieron diferentes equilibrios para la *NAT* en la película, el primero se alcanzó a los 25 °C cerca de los 8 días de almacenamiento con una concentración promedio de 0.16 mg g⁻¹, en segundo lugar a 14 °C a aproximadamente a los 28 días para 0.18 mg g⁻¹ y por ultimo a 4 °C a los 29 días con 0.24 mg g⁻¹. Estos resultados demuestran la habilidad de la natamicina para migrar desde la película de proteína concentrada de lactosuero hacia el queso. Los $K_{p,a}$ calculados presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) para 4, 14 y 25 °C con valores de 11.18 ± 0.34 , 7.41 ± 0.34 , 6.05 ± 0.25 respectivamente (**Tabla 25**), esto se confirma con el orden de la liberación de *NAT* (**Figura 27**); con los valores de $K_{p,a}$ mayores a 1, la natamicina muestra un comportamiento totalmente diferente al presentado cuando estaba en contacto con agua (sistema *in vitro*), para el caso del contacto con el queso doble crema, la natamicina muestra baja solubilidad con el alimento y tener más afinidad por la película, en especial a bajas temperaturas, confirmando la influencia que tienen la temperatura y el tipo de alimento en el proceso de migración de los compuestos.

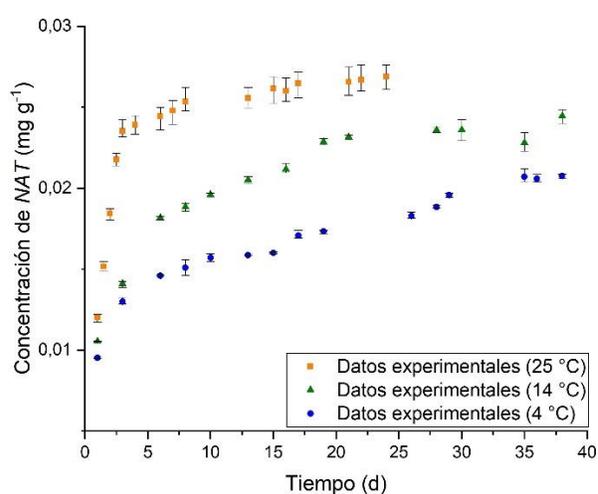
El aumento de *NAT* en el queso se evidencia en la **Figura 27**, la concentración de *NAT* a 4 °C aumentó gradualmente conforme se ha liberado desde el material de envase, el equilibrio se

alcanzó a los 35 días con una concentración de 0.021 mg g^{-1} . A $14 \text{ }^{\circ}\text{C}$, el queso también mostró un aumento gradual de *NAT* alcanzando una concentración máxima de 0.025 mg g^{-1} a los 38 días de almacenamiento. Por el contrario, a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ se presentó un mayor aumento de *NAT* en los primeros 3 días, alcanzando el equilibrio a los 17 días con una concentración de 0.027 mg g^{-1} ; con estas concentraciones máximas se estimó un porcentaje de liberación de la *NAT* hacia del queso del 7.0, 8.3 y 9.0 % para 4, 14 y $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ respectivamente basado en la concentración inicial de *NAT* incorporado en la película. A pesar de la poca liberación de *NAT* desde la película hacia el queso, las concentraciones alcanzadas demuestran su potencial eficacia contra los microorganismos evaluados en la prueba de concentración mínima inhibitoria (Sección 4.1.1) y halo de inhibición (Sección 4.2.12), por esta razón, la película fabricada puede ser considerada como material de envasado activo con capacidad antifúngica.

Película



Queso



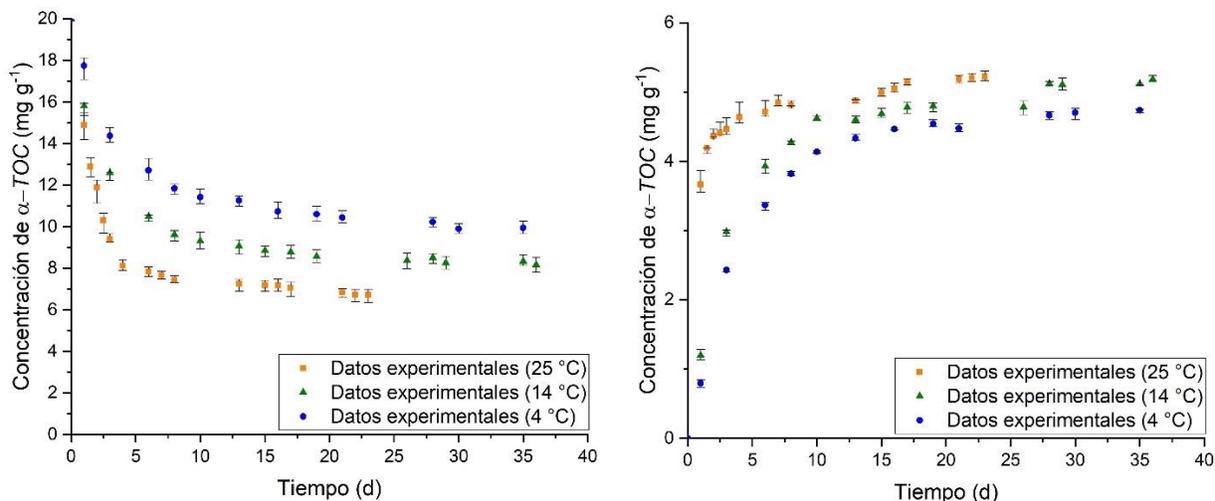


Figura 27. Cambio de la concentración de NAT y α -TOC en la película con 2% TOC – 300 ppm NAT y en el queso a tres temperaturas en el sistema de envasado.

De una forma análoga a la NAT, el tiempo de equilibrio para el α -TOC disminuye al aumentar la temperatura cuyos valores fueron los 30, 28 y 15 días para 4, 14 y 25 °C respectivamente, alcanzando una concentración de 9.90, 8.50 y 7.17 mg g⁻¹ en el mismo orden de temperaturas. Como se puede observar en la **Tabla 25**, los valores de $K_{p,a}$ obtenidos para el α -TOC son menores que para la NAT y también disminuyen con la temperatura, de acuerdo con Hwang et al., (2013) esto puede ser explicado por la afinidad y la interacción molecular de α -TOC con la grasa y la proteína presentes en la muestra de queso doble crema, lo que influye en su solubilidad, por lo tanto, el antioxidante presenta una migración más rápida resultando valores de $K_{p,a}$ más bajos que la NAT. De igual modo, un estudio presentado por Granda-Restrepo et al., (2009) en un envase activo con α -Tocoferol en contacto con leche en polvo, encontraron valores de $K_{p,a}$ mayores y cercanos a la unidad, lo que indica la afinidad del α -TOC es principalmente por la película, también hay afinidad por el alimento.

Tabla 25. Coeficiente de partición y de difusión de la natamicina y del α -Tocoferol en el sistema película-queso.

<i>T</i> (°C)	<i>Natamicina</i>			<i>α-Tocoferol</i>		
	$K_{p,a}$	$D \times 10^{11}$ (cm ² s ⁻¹)	R^2	$K_{p,a}$	$D \times 10^{11}$ (cm ² s ⁻¹)	R^2
4	11.18 ± 0.34 ^a	2.01 ± 0.19 ^a	0.9903	2.02 ± 0.08 ^a	3.67 ± 0.49 ^a	0.9872

14	7.41 ± 0.34^b	2.84 ± 0.35^b	0.9942	1.60 ± 0.10^b	5.09 ± 0.78^b	0.9899
25	6.05 ± 0.25^c	11.5 ± 0.14^c	0.9876	1.30 ± 0.09^c	9.17 ± 2.07^c	0.9827
Ea (kJ mol ⁻¹)	-	55.77	0.8993	-	30.04	0.9754

Película con 2% (m/m) α -TOC – 300 ppm NAT. Valor promedio \pm desviación estándar, n = 3.

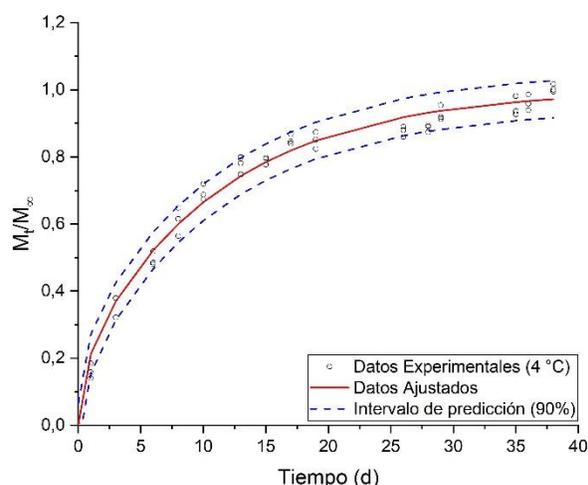
Diferentes superíndices en la misma columna son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

En la literatura se encuentran pocos reportes relacionados con el uso de la natamicina en películas de proteína concentrada de lactosuero en contacto con queso, en especial presentado los cálculos del coeficiente de partición y de difusión, los estudios presentados hacen referencia a sistemas más simples como lo son los estudios *in vitro*. En la **Figura 28** se muestran la fracción liberada desde la película hacia el queso, de acuerdo con esta figura, la comparación entre las curvas para 4, 14 y 25 °C indican que la NAT migra más lentamente a bajas temperaturas, este resultado se complementa con lo discutido anteriormente sobre el $K_{p,a}$ para la NAT; en este trabajo, los valores calculados para D (cm² s⁻¹) se presentan en la **Tabla 25**, como se puede apreciar, los coeficientes de difusión son afectados por la temperatura presentado diferencias significativas ($p < 0.05$), a mayor temperatura, mayor valor de D, los resultados para 4, 14 y 25 °C fueron 2.01×10^{-11} , 2.84×10^{-11} y 11.50×10^{-11} cm² s⁻¹ respectivamente; estos datos son menores que lo reportado por Franssen et al., (2004) cuyo coeficiente de difusión fue 8.68×10^{-10} cm² s⁻¹ para natamicina en una película de proteína aislada de lactosuero sumergida en un simulante alimentario, Altenhofen et al., (2012) incorporó natamicina en películas de alginato y alginato/quitosano sumergidas en agua a 25 °C con un valor de 1.64×10^{-11} y 2.53×10^{-11} cm² s⁻¹ respectivamente, Bierhalz et al., (2013) presentó un valor de D igual a 0.16 cm² s⁻¹ de natamicina en películas de alginato en agua a 25 °C, por último, Fajardo et al., (2010) evaluó la natamicina en una película de quitosano en queso Saloio, obteniendo un coeficiente de difusión alrededor de 1.29×10^{-12} cm² s⁻¹ a 4 °C calculado con un modelo matemático diferente al utilizado en el presente trabajo, este último autor explica que la liberación de natamicina al queso como modelo de alimento sólido presentan valores más bajos de coeficiente de difusión comparado en sistema *in vitro*, atribuyéndose a las características del queso graso y con menor actividad de agua que en el sistema líquido (Ollé Resa et al., 2014b), por lo que una pequeña cantidad de agua se difunde en la película, lo que resulta en efectos de hinchamiento insignificantes y menor transferencia de masa, y la NAT con su naturaleza anfifílica junto con el

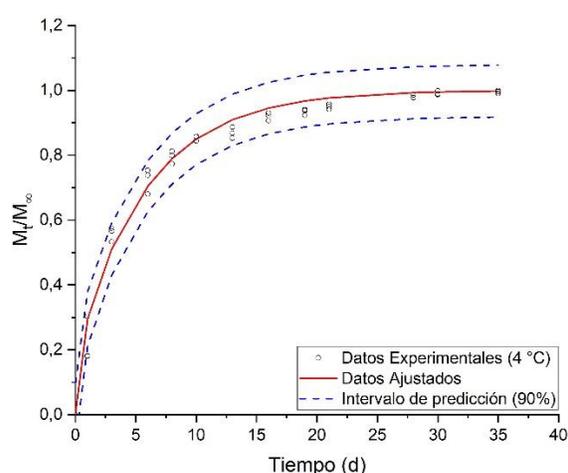
carácter hidrofílico de la película determinan su comportamiento hacia el interior del queso tal y como se explicó en anteriores párrafos.

El coeficiente de difusión para el α -TOC se presenta en la **Tabla 25**, todos ellos presentaron diferencia significativa ($p < 0.05$); el valor de D a 4 °C fue de $3.67 \times 10^{-11} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, el cual fue similar a lo reportado Granda-Restrepo et al., (2009) en un polímero sintético (PEBD) adicionado con 4% de α -Tocoferol obteniendo valores de $3.14 \times 10^{-11} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ a 40 °C, para un polímero sintético en contacto con leche en polvo entera. De manera similar, el coeficiente de difusión calculado *in vitro* por otros estudios reportan valores de $3.16 \times 10^{-11} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ a 23 °C en películas de poli ácido láctico (PAL) con 3% de α -Tocoferol (Manzanarez-López et al. 2011), $4.63 \times 10^{-11} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ a 13 °C en películas de PLA/almidón con 2.5% de α -Tocoferol (Hwang et al., 2013), $3.50 \times 10^{-11} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ a 9 °C en PAL con 2.6% de α -Tocoferol (Samsudin et al., 2018), y $4.83 \times 10^{-10} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ a 23 °C para α -Tocoferol en películas de quitosano (Yeamsuksawat y Liang 2019), este último explica que el valor del coeficiente de difusión y la liberación del α -TOC depende de estructura de la matriz polimérica, donde un aumento en los enlaces formados de la matriz disminuye el espacio libre, al mismo tiempo que el movimiento del antioxidante en la estructura, otro factor que influye, es la solubilidad del α -TOC en medios grasos como en el queso doble crema, y posiblemente el tamaño nanométrico del α -TOC incorporado en la película de lactosuero, todo esto representa un aumento de la migración al compararlos con los estudios *in vitro*.

Natamicina



α -Tocoferol



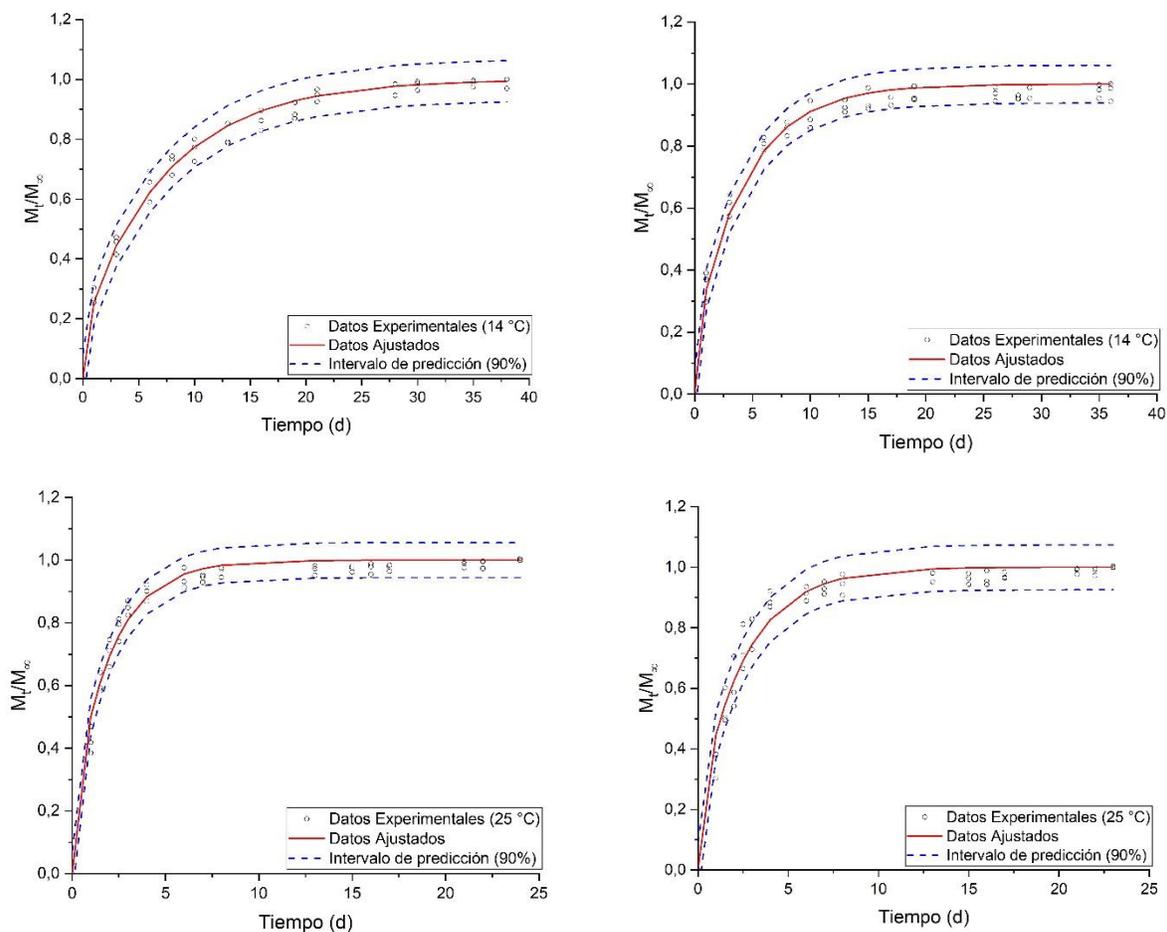


Figura 28. Difusión en el sistema película-queso de la natamicina y del α -Tocoferol conforme la segunda ley de Fick.

La concentración de α -TOC en el queso presentó un comportamiento similar a la NAT, ambos gráficos se muestran en la **Figura 27** evidenciándose nuevamente la dependencia de la temperatura en el fenómeno de migración; el aumento de la concentración de α -TOC a 4 y 14 °C presentaron un estrecho margen en el transcurso del experimento, la concentración máxima alcanzada fue de 4.74, 5.18 y 5.22 mg g⁻¹ para 4, 14 y 25 °C en un tiempo de 35, 36 y 23 días respectivamente. El mayor aumento de α -TOC se presentó a 25 °C en los primeros 5 días, alcanzando el equilibrio a los 21 días; con estas concentraciones máximas se estimó un porcentaje de liberación del α -TOC hacia el queso del 23.7, 25.9 y 26.1 % para 4, 14 y 25 °C respectivamente basado en la concentración inicial de α -TOC incorporado en la película. En el tiempo del experimento no se observó disminución de la concentración de α -TOC en el queso, quizá por la alta disponibilidad en la película, la migración gradual y la alta capacidad antioxidante de la

película discutido en la sección 4.2.13, por el contrario, Granda-Restrepo et al., (2009) manifestó la dificultad de seguir el comportamiento del α -Tocoferol que migró de la película activa hacia leche en polvo entera después de 40 días de almacenamiento a 30 °C debido a que el antioxidante fue consumido por componentes del alimento sometidos a oxidación.

En la **Tabla 25** se presentan los valores de E_a en el sistema de envasado película-queso para la natamicina y el α -Tocoferol cuyos valores fueron 55.77 y 30.04 kJ mol⁻¹ respectivamente, los valores fueron mayores que los obtenidos en el estudio *in vitro*, siendo de 29.17 y 21.56 kJ mol⁻¹ en el mismo orden y para el rango de temperatura (4-25 °C); la primera diferencia se enmarca en que el sistema película-queso no se encuentra bajo agitación como lo fue en el sistema *in vitro*; en segundo lugar, la película está en contacto con un alimento sólido, y para que se propicie un aumento en la difusión, es necesario suministrar más energía al sistema, de ahí los valores altos en el sistema película-queso. Además, estos resultados son coincidentes con los valores de $K_{p,a} > 1$ (**Tabla 25**), donde los agentes activos presentan mayor afinidad por el material de envase presentando en cierta manera una migración gradual y propiciando una protección para y desde el polímero. Desde un punto de vista químico, las moléculas de los agentes activos pueden interactuar con los grupos polares de la proteína, lo que resulta en la restricción de los movimientos de las moléculas entre ellos y la proteína, lo que requiere más energía para la difusión dentro de la matriz del polímero.

4.4. Modelación multiescala de la migración

Esta sección se divide en tres partes. Primero se presentan los resultados de la modelación en escala nanométrica, donde se estimó el coeficiente de difusión nanométrico para la NAT y el α -TOC desde la película hacia el queso; en segundo lugar (escala mesoscópica), se predijo la distribución de concentración $C(x,t)$ de cada compuesto utilizando los valores de D_{nano} (cm² s⁻¹) calculados en la escala anterior, por último, para la macro escala, se realizó una homogenización de los datos anteriores para estimar la concentración como función del tiempo, para ser comparadas con los datos experimentales de los dos compuestos a las tres temperaturas evaluadas.

4.4.1. Escala nanométrica

Se realizó la simulación de las nanogotas dentro de la película que está en contacto con el queso siguiendo las instrucciones del diagrama de flujo mostrado en la **Figura 29**, un proceso similar fue utilizado por Hernández (2008) para describir la dinámica Browniana de partículas poliméricas; las ecuaciones presentadas en la sesión 2.5.4.1 y en el Apéndice B. Códigos de la simulación (Matlab) se encuentra el código en MATLAB® propuesto; las suposiciones utilizadas en esta etapa fueron las siguientes:

- Las partículas de *NAT* y *α -TOC* se distribuyen de manera homogénea dentro la película.
- Cada partícula representa una parte del total de la masa del compuesto activo.
- Cada partícula individual ejecuta un movimiento que es independiente de los movimientos de todas las demás partículas.
- Los movimientos de una partícula dada en diferentes intervalos de tiempo son procesos independientes, unidimensionales y estos intervalos determinan la evolución del sistema.

Los parámetros de la simulación muestran en la **Tabla 26**, y estos se ajustaron hasta que se obtuvo una coincidencia satisfactoria con los resultados de laboratorio (*NAT* y *α -TOC*, ambos a 4, 14 y 25 °C respectivamente); el número de partículas es un parámetro que es necesario controlar porque un mayor número concierne un aumento del tiempo de cálculo; del mismo modo, valores pequeños de *dt* afecta el tiempo de la simulación, los rangos presentados fueron utilizados en la simulación del movimiento Browniano de cada migrante dentro de la película, más adelante se discutirán los resultados obtenidos.

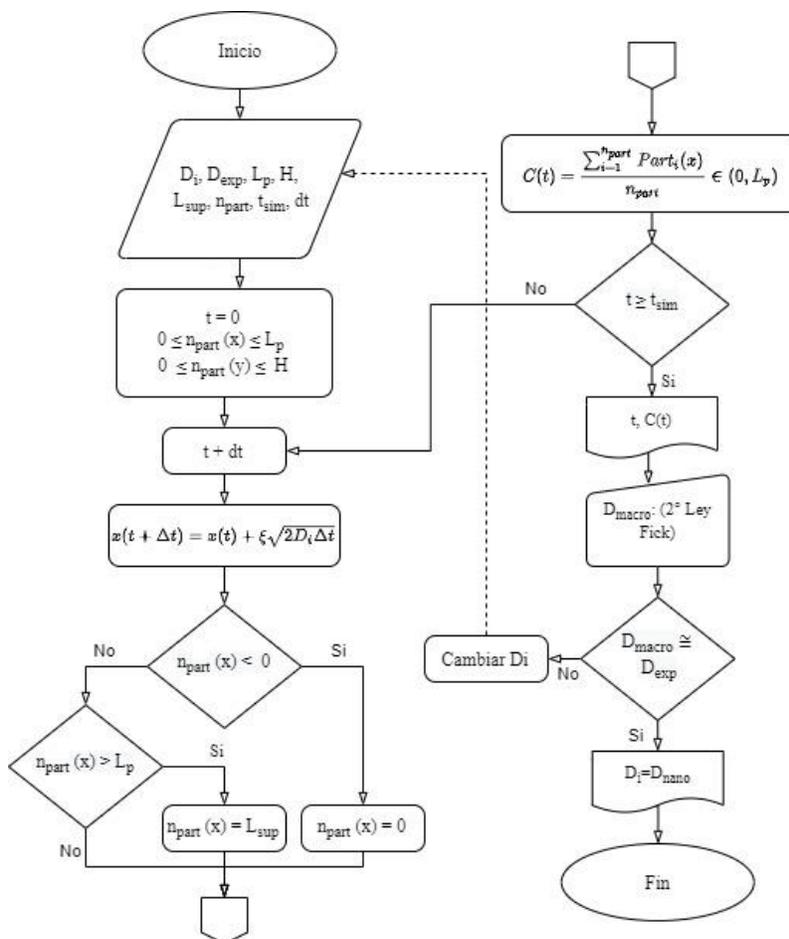
Tabla 26. Parámetros utilizados en la simulación a escala nanométrica.

<i>Parámetro</i>	<i>Natamicina</i>	<i>α-Tocoferol</i>
	<i>Valor o rango</i>	
$D_{nanoi} (cm^2 s^{-1})$	6.12 x 10 ⁻¹¹ – 4.30 x 10 ⁻¹⁰	
$L_{pelicula} (cm)^*$	0.0139	
n_{part}	10000 - 500000	
$C_i (mg g^{-1})^*$	0.3	20
$dt (s)$	600 - 1200	

$t_{fin}(d)$

23 - 38

* Valores del sistema de envasado, son constantes en la simulación



Elaboración propia

Figura 29. Algoritmo del movimiento Browniano de las nanogotas de NAT y α -TOC dentro de la película de proteína.

Los valores del coeficiente de difusión de las nanopartículas de NAT y nanogotas de α -TOC obtenidos mediante la simulación del movimiento Browniano se presentan en la **Tabla 27**, nótese que los valores de D_{nano} son mayores que los valores experimentales que fueron estimados según la segunda Ley de Fick, los cuales son denominados como $D_{macro}(exp)$ (coeficiente de difusión macrométricos y experimentales, sesión 4.3.1), este comportamiento se debe a que se ha descrito el movimiento neto de cada una de las partículas dentro de la película con un tamaño lo suficientemente pequeño, 133.85 y 35.37 d.nm para NAT y α -TOC respectivamente (**Tabla 13** y

Tabla 16), este tamaño permite mayor movilidad dentro de la película y es coincidente la estimación de la concentración de los compuestos activos en el tiempo con los datos experimentales (**Figura 25 y Figura 27**), de allí el valor de R^2 obtenido mayor que 0.9977 (**Tabla 27**).

Estos resultados indican que el movimiento Browniano simulado a la escala nanométrica es un método preciso para predecir el comportamiento de la *NAT* y α -*TOC* a las tres temperaturas evaluadas y los resultados del coeficiente de difusión nanométrico son valores que se llevan al modelo planteado a escala mesoscópica.

Tabla 27. Coeficiente de difusión para *NAT* y α -*TOC* estimado en la escala nanométrica.

<i>T</i> (°C)	<i>Natamicina</i>			α - <i>Tocoferol</i>		
	D_{macro} (exp) ^a	D_{nano}	R^2	D_{macro} (exp) ^a	D_{nano}	R^2
4	2.01*	7.12*	0.9977	3.67*	1.47**	0.9997
14	2.84*	1.15**	0.9997	5.09*	2.03**	0.9999
25	1.16**	5.15**	0.9995	9.18*	3.72**	0.9999

* x 10¹¹ (cm² s⁻¹), ** x 10¹⁰ (cm² s⁻¹), *a*: Coeficiente de difusión experimental

4.4.2. Escala mesoscópica y macroscópica

La evaluación del movimiento de los migrantes fue realizada en la sesión anterior y con esta se toma el valor de D_{nano} para realizar la simulación en la mesoescala (método de diferencias finitas explícitas descritas en la sesión 2.5.4.2) a fin de estimar el respectivo perfil de concentración para *NAT* y α -*TOC* a 4, 14 y 25 °C respectivamente. En el Apéndice B. Códigos de la simulación (Matlab) se encuentra el código propuesto en MATLAB®, para tal fin se utilizó las siguientes consideraciones:

-El sistema está compuesto por la película en pleno contacto con el queso y este se encuentra aislado.

-La transferencia de masa es unidimensional en una pared plana en estado transitorio y se presenta desde la película hacia el queso.

-La concentración inicial de *NAT* y α -*TOC* es homogénea dentro de la película con sus respectivos coeficientes de difusión constantes.

-La región a lo largo del sistema en la coordenada x se divide en puntos igualmente espaciados.

-No existe reacción entre la *NAT* y el α -*TOC*.

Los parámetros utilizados en esta simulación corresponden a C_i (mg g^{-1}), L_{pelicula} (cm) tomados de la **Tabla 26**, con un espesor del queso de 2 cm, el coeficiente de difusión, D_{nano} ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) para la *NAT* y el α -*TOC* a diferentes temperaturas corresponde a los reportados en la **Tabla 27**, para todos los tratamientos se utilizaron 1000 nodos distribuidos de la siguiente manera: 100 nodos para la película, 1 nodo de interfase y 899 nodos para el queso debido a que representa el mayor espesor. Además, para cada tratamiento se evaluó el criterio de estabilidad determinado por los coeficientes de la variable C_m^i (concentración de compuesto en cada nodo del sistema película-queso) expresados en la Ec. (21) y Ec. (22), estos deben ser ≥ 0 determinando así los valores admisibles del Δt , en este estudio se encontró que para *NAT* fue de 120, 120 y 30 s para 4, 14 y 25 °C respectivamente, y para el α -*TOC* de 30, 120, 10 s en el mismo orden de temperaturas.

La representación gráfica de los resultados de la difusión en la película y el queso para *NAT* y el α -*TOC* en función de la posición se presentan en la **Figura 30**. En esta figura se puede observar la línea vertical roja que indica la interfase del sistema (límite película-queso), en el lado izquierdo (nodos 1-100) abarca el espesor de la película (0.0139 cm) y el lado derecho (nodos 101-1000) al queso (esquema mostrado en la **Figura 9**); la leyenda en cada gráfica indica el tiempo de simulación lo que evidencia una disminución de la concentración de *NAT* y α -*TOC* en la película con su respectivo aumento en el queso, estas curvas demuestran que el modelo describe la interpretación física del transporte de masa entre un material de envase y un alimento, tal como lo plantea Vitrac et al., (2007) donde evaluó la transferencia de masa interfacial en productos alimenticios y Ahmed et al., (2015) en sistemas binarios no alimentarios. De estos resultados se observa que las líneas temporales para el α -*TOC* se encuentran más separadas comparadas con *NAT* dado que el D_{nano} fue mayor para el α -*TOC*; en la misma figura se muestra un aumento de escala en el nodo de interfase, de allí se observa que el perfil de concentración para cada tiempo evidencia un leve cambio de dirección, pero solo es debido a la resistencia que puede ofrecer la interfaz con el queso ya que este presenta una diferente composición frente a la película, en especial por el alto contenido de grasa.

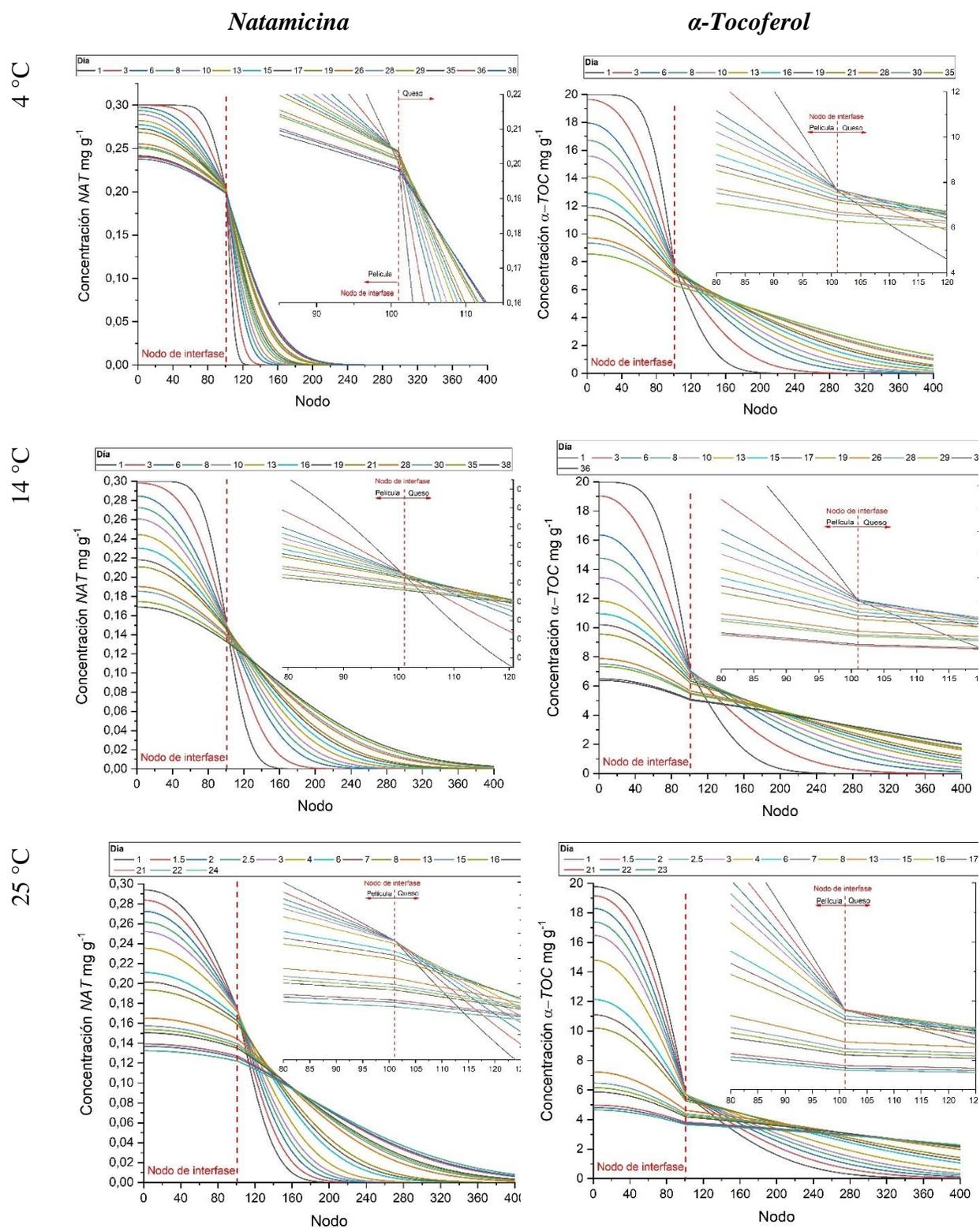
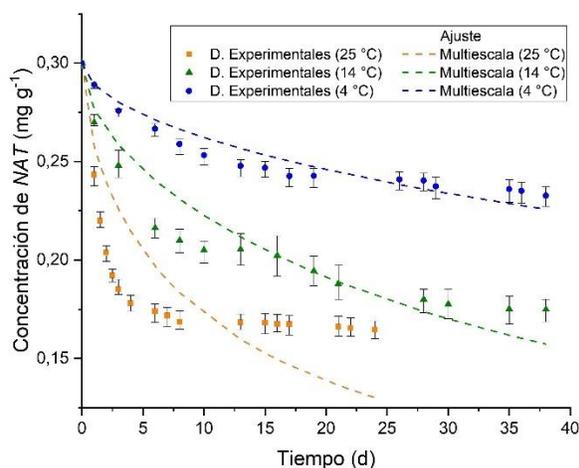


Figura 30. Perfiles de concentración en la película y el queso para NAT y el α -TOC a diferentes temperaturas.

El esquema de integración de las escalas se realizó desde la escala nanométrica pasando por la mesoescala hasta la escala macroscópica (**Figura 10**), ésta última comprende el promedio de las concentraciones representadas en los nodos de la película para la mesoescala en el correspondiente tiempo experimental para *NAT* y α -*TOC* a las tres temperaturas evaluadas (**Figura 31**). De acuerdo con las tendencias generales (líneas punteadas), se aprecia que la natamicina presenta mayor ajuste a 4 °C que a 14 y 25 °C con valores R^2 de 0.9068, comparadas con 0.8856 y 0.4319 respectivamente, asimismo al ser comparada con el α -tocoferol, el cual presentó valores R^2 de 0.8299, 0.7324 y 0.6572 en el mismo orden de temperaturas; esto puede asociarse al carácter sólido de la natamicina en contrastaste con las nanogotas de α -tocoferol provenientes de nanoemulsion aceite en agua; también, se apreció una sensibilidad a los valores estimados de D_{nano} que afectaron los ajustes ya que fueron mucho mayores que los valores experimentales (**Tabla 27**), de ahí se favorece aún más la transferencia de masa dentro de la película. Desde el punto de vista de la modelación multiescala, Urrea-Quintero et al. (2020) explica la implicación de la naturaleza estocástica de la simulación a pequeñas escalas (en este estudio fue la escala nanométrica) se pueden inducir fluctuaciones numéricas hacia las escalas mayores, así como se evidenció en la macro escala (**Figura 31**) donde aparecen grandes cambios en los valores de concentración en contraste con los valores experimentales.

Natamicina



α -Tocoferol

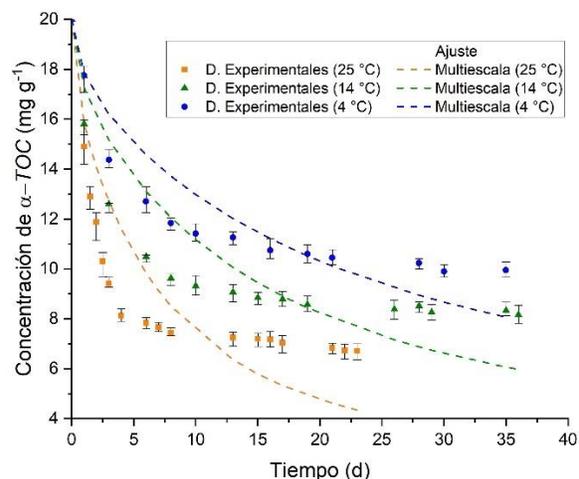
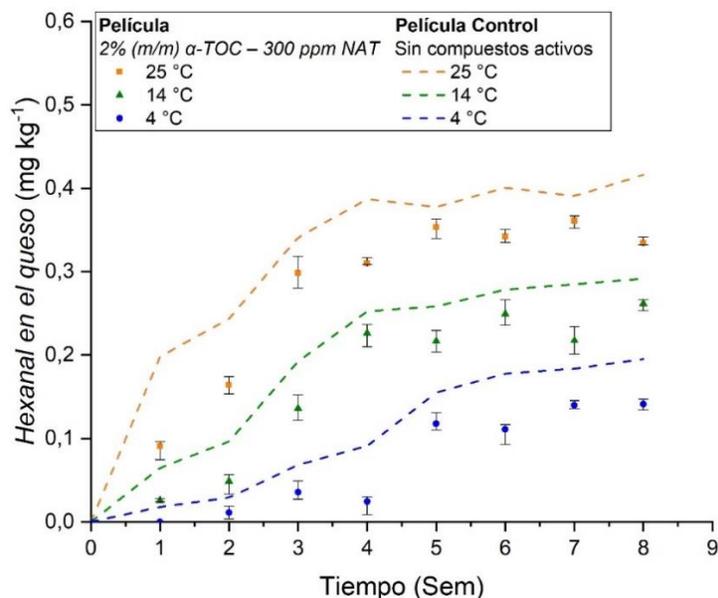


Figura 31. Escala macroscópica: integración del modelo multiescala en la película.

4.5. Cuantificación del hexanal en queso como indicador de la oxidación lipídica

Durante los procesos de oxidación lipídica se general compuestos de bajo peso molecular como aldehídos y cetonas, entre ellos el hexanal, lo que permite usarlo como indicador de oxidación en matrices alimentarias. El aumento del hexanal como compuesto volátil durante el almacenamiento del queso doble crema se muestra en la **Figura 32**, las líneas punteadas representan la cuantificación de hexanal en el queso que ha estado en contacto con una película sin compuestos activos (control); la producción de hexanal en cada control fue mayor que las respectivas muestras durante las 8 semanas de almacenamiento, presentado una relación directa con la temperatura; así mismo, para el queso en contacto con la película activa (2% (m/m) α -TOC – 300 ppm NAT), la concentración de hexanal aumentó rápidamente a 14 y 25 °C en las primeras 4 y 3 semanas respectivamente, después de este tiempo se mantuvo constante con un valor promedio de 0.24 y 0.34 mg kg⁻¹ para 14 y 25 °C respectivamente; en cambio, a 4 °C, no presentó cambios significativos en las primeras 4 semanas, y después de la semana 5, la concentración de hexanal promedio fue de 0.11 mg kg⁻¹; en todo el experimento las muestras evaluadas presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$), alcanzando una concentración aproximada de 0.14, 0.26 y 0.33 mg kg⁻¹ para 4, 14 y 25 °C respectivamente.

Diversas investigaciones presentan resultados sobre la cuantificación del hexanal y su relación con el almacenamiento; Granda-Restrepo et al., (2009) evidencio la protección del α -Tocoferol frente a la oxidación lipídica al incorporarlo en una bolsa multicapa de polímeros sintéticos para envasar leche en polvo entera, obteniendo resultado de hexanal de 0.45 μ g mL⁻¹ a 20 °C para 60 días de almacenamiento. Por otro lado, en un envasado convencional, Nzekoue et al., (2019) realizó el seguimiento del hexanal en el almacenamiento (4 °C) de queso Asiago y Grana Padano durante 4 y 12 semanas respectivamente, el material de envase utilizado fue polietileno de alta densidad, obteniendo valores de 0.55 y 1.04 mg kg⁻¹ en el mismo orden mencionado; como referencia del aumento de compuestos volátiles en queso sin envasar, Teter et al., (2020) cuantificó hexanal en un queso de granja durante 21 días en maduración a 4 °C, obteniendo valores de 1.5 % (15000 mg kg⁻¹), debido a esta concentración tan alta, se infiere que, el uso de un envase es necesario para disminuir la producción de este compuesto como indicador de la oxidación lipídica.



Control: Queso en contacto con la película sin compuestos activos, n = 3.

Figura 32. Concentración de hexanal durante el almacenamiento de queso doble crema en contacto con la película control y la película con 2% (m/m) α -TOC – 300 ppm NAT a diferentes temperaturas.

En general, en los estudios presentados, se observó que la concentración de hexanal en cada uno fue mayor a lo obtenido en este estudio (**Figura 32**), y sugiere que el α -TOC incorporado en la película migró hacia el queso (discutido en la sesión 4.3.2) para realizar su papel como antioxidante en la oxidación lipídica en el queso, pudiendo ser también competente frente a polímeros sintéticos, siendo la película activa mejor que la película control al cumplir su papel de envase activo con capacidad antioxidante.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El método propuesto de homogenización por cizalla presentó tamaños de partícula de 133.9 y 35.4 d.nm para la nanosuspensión de natamicina y nanoemulsión encapsulando α -Tocoferol, siendo comparables como otros métodos de fabricación de dispersiones a escala nanométrica, además presentaron distribución monomodal (nanosuspensión) y bimodal (nanoemulsión), con valores del potencial ζ negativos, y especialmente con una capacidad antifúngica y antioxidante mayores que la película control, lo que permite ser incorporadas en un material de envase en contacto con alimentos.

Se incorporaron exitosamente las dispersiones optimizadas de la nanosuspensión de natamicina y la nanoemulsión encapsulando α -Tocoferol, de manera individual y su mezcla en la película elaborada de proteína concentrada de lactosuero; como resultado de la incorporación en mezcla se obtuvieron películas ligeramente amarillentas y translúcidas como consecuencia de la naturaleza de la proteína y el α -Tocoferol, estas no presentaron defectos a simple vista, con una

morfología relativamente suave y compacta, pero con la presencia de estructuras circulares en la superficie que parecen estar ocupadas por gotitas de glicerol. Los agentes activos no modificaron el espesor de la película, el contenido de humedad y el brillo; estos mostraron un efecto favorable en la solubilidad y la transparencia, manteniendo la integridad de la película en agua y una adecuada barrera a la luz. Los compuestos aumentaron la PVA, se disminuyó la tensión de rotura y el módulo elástico en las películas, haciendo de éstas materiales menos resistentes y rígidos. La caracterización de los materiales permitió establecer que las películas obtenidas son adecuadas para ser utilizadas en el envasado de alimentos.

Se confirmó que en las películas activas obtenidas con la adición de la natamicina se mantiene la capacidad antifúngica contra *C. albicans*, *P. chrysogenum* y *S. cerevisiae*, así mismo, el α -Tocoferol incorporado en el material, mantiene su acción antioxidante, es decir, continua con el proceso de captar los radicales peroxilo e inhibir la peroxidación lipídica.

A través del estudio de biodegradación aerobia se demostró que la película con la natamicina y el α -Tocoferol presentó mayor biodegradabilidad que la película de proteína concentrada de lactosuero sin la incorporación de los agentes activos, esto debido a que con la adición de los compuestos se aumentan los picos amorfos de la película por un posible cambio conformacional en el polímero causado por las interacciones intermoleculares con el polímero y el glicerol, situación que favorece el proceso de biodegradación del polímero.

Se confirmó experimentalmente la migración de la natamicina y el α -Tocoferol desde la película *in vitro* y también en un sistema de envasado real, es decir, desde la película hacia el queso doble crema, obteniendo los respectivos coeficientes de partición y de difusión experimentales a diferentes temperaturas para cada uno de los compuestos activos. Así mismo, se evidenció que el α -Tocoferol redujo la reacción de oxidación lipídica mediante la disminución de la producción de hexanal como indicador en el deterioro del queso.

La modelación multiescala para el fenómeno de la migración permitió, en primer lugar, estimar los respectivos coeficientes de difusión en la escala nanométrica, a través del movimiento browniano de cada partícula de natamicina y de α -Tocoferol respectivamente, ajustándose

fielmente a los datos experimentales (concentración de cada migrante como función del tiempo), ya que el carácter del modelo estocástico permite una mejor variación del movimiento de las partículas dentro de la película. En segundo lugar, en la escala mesoscópica se integró la escala nanométrica para obtener los perfiles de concentración en la película y el queso (concentración como función del tiempo y la posición). Por último, en la mesoescala se obtuvo la concentración del migrante en función del tiempo contrastadas con los datos experimentales, con ello se comprendió aún más el mecanismo que tiene lugar en la migración en un sistema de envasado, evidenciando también, que la sensibilidad del modelo multiescala depende de la magnitud del coeficiente de difusión estimado en la escala más pequeña.

El estudio de la migración a través modelos obtenido de la segunda ley de Fick y la modelación multiescala debe ir acompañado de conocimientos sobre el sistema de envasado a estudiar, tal como la concentración inicial, longitud entre otros, debido a que existen múltiples posibilidades en el uso, en especial de las diferentes escalas y rangos de estas.

Mediante el desarrollo del presente estudio se cumplió con el objetivo general y se logró confirmar la hipótesis planteada, ya que el desarrollo de un biopolímero a partir de proteínas concentradas de lactosuero, con la incorporación de dos agentes activos (nanosuspensión de natamicina y nanoemulsión de α -Tocoferol), permitió el desarrollo de un material de envase activo que permite la migración de estos compuestos en tamaños nanométricos, mejorando las propiedades de la película, además de presentar capacidad fungicida, antioxidante y biodegradable.

Como recomendaciones para futuros estudios se presentan los siguientes temas:

- Estudiar la permeabilidad al oxígeno de las películas.
- Realizar análisis de microscopia confocal laser de barrido en las películas para confirmar una dispersión homogénea de los agentes activos en la matriz polimérica.
- Evaluar el material de envase con los compuestos activos puede ser considerado como comestible mediante la simulación de la digestibilidad gastrointestinal.
- Realizar estudios de migración mediante las metodologías presentadas en este trabajo para diferentes matrices alimentarias compatibles con el material de envase desarrollado.

6. REFERENCIAS

- Abate, G, R Mshana, and H Miorner. 1998. "Evaluation of a Colorimetric Assay Based on 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide (MTT) for Rapid Detection of Rifampicin Resistance in Mycobacterium Tuberculosis." *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2(12).
- Abdollahzadeh, Esmail, Amene Nematollahi, and Hedayat Hosseini. 2021. "Composition of Antimicrobial Edible Films and Methods for Assessing Their Antimicrobial Activity: A Review." *Trends in Food Science & Technology* 110: 291–303.
- Abdul-Khalil, H et al. 2016. "A Review on Nanocellulosic Fibres as New Material for Sustainable Packaging: Process and Applications." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 64: 823–36.
- Adamczak, Artur, Marcin Ożarowski, and Tomasz M Karpiński. 2020. "Curcumin, a Natural Antimicrobial Agent with Strain-Specific Activity." *Pharmaceuticals* 13(7).
- Agustinisari, I, K Mulia, and M Nasikin. 2020. "The Effect of Eugenol and Chitosan Concentration

- on the Encapsulation of Eugenol Using Whey Protein–Maltodextrin Conjugates.” *Applied Sciences* 10(9).
- Ahmed, Shakeel, and Saiqa Ikram. 2016. “Chitosan and Gelatin Based Biodegradable Packaging Films with UV-Light Protection.” *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 163: 115–24.
- Ahmed, Tanvir, Irina V Belova, and Graeme E Murch. 2015. “Finite Difference Solution of the Diffusion Equation and Calculation of the Interdiffusion Coefficient Using the Sauer-Freise and Hall Methods in Binary Systems.” *Procedia Engineering* 105: 570–75.
- Akcan, Tolga, Mario Estévez, and Meltem Serdaroglu. 2017. “Antioxidant Protection of Cooked Meatballs during Frozen Storage by Whey Protein Edible Films with Phytochemicals from *Laurus Nobilis L.* and *Salvia Officinalis.*” *LWT* 77: 323–31.
- Aksoylu Özbek, Zeynep, and Pelin Günç Ergönül. 2020. “Optimisation of Wall Material Composition of Freeze–Dried Pumpkin Seed Oil Microcapsules: Interaction Effects of Whey Protein, Maltodextrin, and Gum Arabic by D–Optimal Mixture Design Approach.” *Food Hydrocolloids* 107: 105909.
- Alam, Md. Nur, Nusrat Jahan Bristi, and Md. Rafiquzzaman. 2013. “Review on in Vivo and in Vitro Methods Evaluation of Antioxidant Activity.” *Saudi Pharmaceutical Journal* 21(2): 143–52.
- Aliofkhazraei, M. 2015. *Handbook of Nanoparticles*. Springer International Publishing.
- Alizadeh-Sani, Mahmood, Arezou Khezerlou, and Ali Ehsani. 2018. “Fabrication and Characterization of the Bionanocomposite Film Based on Whey Protein Biopolymer Loaded with TiO₂ Nanoparticles, Cellulose Nanofibers and Rosemary Essential Oil.” *Industrial Crops and Products* 124: 300–315.
- Almasi, Laleh, Mohsen Radi, Sedigheh Amiri, and David Julian McClements. 2021. “Fabrication and Characterization of Antimicrobial Biopolymer Films Containing Essential Oil-Loaded Microemulsions or Nanoemulsions.” *Food Hydrocolloids* 117: 106733.
- Altenhofen, Mariana, Andréa Cristiane Krause, and Theo Kieckbusch. 2012. “Modelling Natamycin Release from Alginate/Chitosan Active Films.” *International Journal of Food Science & Technology* 47(4): 740–46.
- Amin, Usman et al. 2021. “Potentials of Polysaccharides, Lipids and Proteins in Biodegradable Food Packaging Applications.” *International Journal of Biological Macromolecules* 183:

2184–98.

- Andonegi, Mireia et al. 2020. “Structure-Properties Relationship of Chitosan/Collagen Films with Potential for Biomedical Applications.” *Carbohydrate Polymers* 237: 116159.
- Anema, Skelte G. 2008. “Chapter 8 - The Whey Proteins in Milk: Thermal Denaturation, Physical Interactions and Effects on the Functional Properties of Milk.” In *Food Science and Technology*, eds. Abby Thompson, Mike Boland, and Harjinder B T - Milk Proteins Singh. San Diego: Academic Press, 239–81.
- Aranberri, I, B.P. Binks, J.H. Clint, and P.D.I. Fletcher. 2006. “Elaboración y Caracterización de Emulsiones Estabilizadas Por Agentes Tensoactivos.” *Revista Iberoamericana de Polímeros* 7(3).
- Arias, Ana, Gumersindo Feijoo, and Maria Teresa Moreira. 2021. “Establishing the Multi-Criteria Roadmap and Metrics for the Evaluation of Active Films for Food Packaging.” *Current Research in Green and Sustainable Chemistry* 4: 100160.
- Arikan, Ezgi Bezirhan, and Havva Duygu Ozsoy. 2015. “A Review: Investigation of Bioplastics.” *J. Civ. Eng. Arch* 9: 188–92.
- Arrieta, Marina P et al. 2014. “Functional Properties of Sodium and Calcium Caseinate Antimicrobial Active Films Containing Carvacrol.” *Journal of Food Engineering* 121: 94–101.
- ASTM, D2457. 2013. *Standard Test Method for Specular Gloss of Plastic Films and Solid Plastics*.
- ASTM, D523. 2018. *Standard Test Method for Specular Gloss*.
- ASTM, D882-18. 2018. *Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting*. ASTM International.
- ASTM, E96/E96M-16. 2016. *Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials*.
- Atarés, Lorena, and Amparo Chiralt. 2016. “Essential Oils as Additives in Biodegradable Films and Coatings for Active Food Packaging.” *Trends in Food Science & Technology* 48: 51–62..
- Azzi, Angelo. 2018. “Many Tocopherols, One Vitamin E.” *Molecular Aspects of Medicine* 61: 92–103.
- Bahram, Somayeh et al. 2013. “Whey Protein Concentrate Edible Film Activated with Cinnamon Essential Oil.” *Journal of Food Processing and Preservation* 38(3): 1251–58.
- Balaguer, Mari Pau et al. 2014. “Functional Properties and Antifungal Activity of Films Based on Gliadins Containing Cinnamaldehyde and Natamycin.” *International journal of food*

microbiology 173: 62–71.

- Ballesteros-Mártinez, Lucio, Carmen Pérez-Cervera, and Ricardo Andrade-Pizarro. 2020. “Effect of Glycerol and Sorbitol Concentrations on Mechanical, Optical, and Barrier Properties of Sweet Potato Starch Film.” *NFS Journal* 20: 1–9..
- Barnes, Karen., Richard Sinclair, and David Watson. 2007. *Chemical Migration and Food Contact Materials*. New York: CRC Press.
- Barros-Velázquez, Jorge. 2016. “44.2 Edible Films.” *Antimicrobial Food Packaging*. <https://app.knovel.com/hotlink/khtml/id:kt010WNWO1/antimicrobial-food-packaging/edible-films>.
- Belyamani, Imane, Frédéric Prochazka, Gilles Assezat, and Frédéric Debeaufort. 2014. “Mechanical and Barrier Properties of Extruded Film Made from Sodium and Calcium Caseinates.” *Food Packaging and Shelf Life* 2(2): 65–72.
- Benzie, Iris, and J Strain. 1999. “Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration.” In *Oxidants and Antioxidants Part A*, Academic Press, 15–27.
- Bhargava, Nitya, Vijay Singh Sharanagat, Rahul S Mor, and Kshitiz Kumar. 2020. “Active and Intelligent Biodegradable Packaging Films Using Food and Food Waste-Derived Bioactive Compounds: A Review.” *Trends in Food Science & Technology* 105: 385–401.
- Bhuimbar, Madhuri V, Prashant K Bhagwat, and Padma B Dandge. 2019. “Extraction and Characterization of Acid Soluble Collagen from Fish Waste: Development of Collagen-Chitosan Blend as Food Packaging Film.” *Journal of Environmental Chemical Engineering* 7(2): 102983.
- Bierhalz, Andrea C K et al. 2013. “Influence of Natamycin Loading Methods on the Physical Characteristics of Alginate Active Films.” *The Journal of Supercritical Fluids* 76: 74–82.
- Bierhalz, Andréa Cristiane Krause, Mariana Altenhofen da Silva, and Theo Guenter Kieckbusch. 2012. “Natamycin Release from Alginate/Pectin Films for Food Packaging Applications.” *Journal of Food Engineering* 110(1): 18–25.
- Bierhalz, Andréa, Mariana da Silva, and Theo Kieckbusch. 2012. “Natamycin Release from Alginate/Pectin Films for Food Packaging Applications.” *Journal of Food Engineering* 110(1): 18–25.

- Bioplastics, European. 2020. "BIOPLASTICS Facts and Figures."
- Blanquicet, Richar et al. 2015. "Síntesis y Propiedades de Filmes Basados En Quitosano/Lactosuero." *Polímeros* 25(1): 58–69.
- Bonilla, J, L Atarés, M Vargas, and A Chiralt. 2012. "Edible Films and Coatings to Prevent the Detrimental Effect of Oxygen on Food Quality: Possibilities and Limitations." *Journal of Food Engineering* 110(2): 208–13.
- Bonilla, J, and P.J.A Sobral. 2016. "Investigation of the Physicochemical, Antimicrobial and Antioxidant Properties of Gelatin-Chitosan Edible Film Mixed with Plant Ethanolic Extracts." *Food Bioscience* 16: 17–25.
- Bouchemal, K., S. Briançon, E. Perrier, and H. Fessi. 2004. "Nano-Emulsion Formulation Using Spontaneous Emulsification: Solvent, Oil and Surfactant Optimisation." *International Journal of Pharmaceutics* 280(1–2): 241–51.
- Brink, Ieva, Aušra Šipailienė, and Daiva Leskauskaitė. 2019. "Antimicrobial Properties of Chitosan and Whey Protein Films Applied on Fresh Cut Turkey Pieces." *International Journal of Biological Macromolecules* 130: 810–17.
- Buggy, Aoife K et al. 2018. "Pilot-Scale Formation of Whey Protein Aggregates Determine the Stability of Heat-Treated Whey Protein Solutions—Effect of PH and Protein Concentration." *Journal of Dairy Science*.
- Camacho-Muñoz, Ricardo, Héctor Samuel Villada-Castillo, and Jose Fernando Solanilla-Duque. 2020. "Anaerobic Biodegradation under Slurry Thermophilic Conditions of Poly(Lactic Acid)/Starch Blend Compatibilized by Maleic Anhydride." *International Journal of Biological Macromolecules* 163: 1859–65.
- Cardoso, G.A, and M.T. Jiménez. 2015. "Nanoemulsiones En Alimentos: Preparación y Aplicaciones." *Temas selectos de ingeniería de alimentos* 9: 15–24.
- Carrión-Granda, X, I Fernández-Pan, J Rovira, and J I Maté. 2018. "Effect of Antimicrobial Edible Coatings and Modified Atmosphere Packaging on the Microbiological Quality of Cold Stored Hake (*Merluccius Merluccius*) Fillets" ed. Jorge Barros-Velázquez. *Journal of Food Quality* 2018: 6194906.
- Catalá, R, and R Gavara. 2002. *Migración de Componentes y Residuos de Envases En Contacto Con Los Alimentos*. Valencia: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. CSIC.
- Cazón, Patricia, Manuel Vázquez, and Gonzalo Velazquez. 2018. "Novel Composite Films Based

- on Cellulose Reinforced with Chitosan and Polyvinyl Alcohol: Effect on Mechanical Properties and Water Vapour Permeability.” *Polymer Testing* 69: 536–44.
- Cazón, Patricia, Gonzalo Velazquez, José A Ramírez, and Manuel Vázquez. 2017. “Polysaccharide-Based Films and Coatings for Food Packaging: A Review.” *Food Hydrocolloids* 68: 136–48.
- Choi, Inyoung et al. 2017. “Development of Biopolymer Composite Films Using a Microfluidization Technique for Carboxymethylcellulose and Apple Skin Particles.” *International Journal of Molecular Sciences* 18(6).
- Cinelli, Patrizia et al. 2014. “Whey Protein Layer Applied on Biodegradable Packaging Film to Improve Barrier Properties While Maintaining Biodegradability.” *Polymer Degradation and Stability* 108: 151–57.
- Ciro, Gelmy. 2012. “Conservación de Uchuva (*Physalis Peruviana* L.), Basada En La Impregnación a Vacío de Extractos de Plantas Con Actividad Antimicrobiana y Antioxidante.” Universidad de Antioquia.
- Ciro, Gelmy L, José E Zapata, and Jessica López. 2014. “In Vitro Evaluation of Bixa Orellana L. (Annatto) Seeds as Potential Natural Food Preservative.” *Journal of Medicinal Plant Research* 8(21): 772–79.
- Contreras-Calderón, José, Lilia Calderón-Jaimes, Eduardo Guerra-Hernández, and Belén García-Villanova. 2011. “Antioxidant Capacity, Phenolic Content and Vitamin C in Pulp, Peel and Seed from 24 Exotic Fruits from Colombia.” *Food Research International* 44(7): 2047–53.
- Cornell, J A. 2011. *Experiments with Mixtures: Designs, Models, and the Analysis of Mixture Data*. Wiley.
- Costa, Maria J et al. 2018. “Use of Edible Films and Coatings in Cheese Preservation: Opportunities and Challenges.” *Food Research International* 107: 84–92.
- Crank, J. 1979. *The Mathematics of Diffusion*. Clarendon Press.
- Cruz-Zuñiga, J. 2011. “Difusión de Rutina y Sus Productos de Descomposición En Una Película de Ácido Poliláctico (PLA) Hacia Simulantes de Alimentos.” Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo.
- Cussler, E. L. 2009. *Diffusion Mass Transfer in Fluid Systems*. 3rd ed. New York: Cambridge University Press.
- Dalhoff, A, and S Levy. 2015. “Does Use of the Polyene Natamycin as a Food Preservative

- Jeopardise the Clinical Efficacy of Amphotericin B? A Word of Concern.” *International Journal of Antimicrobial Agents* 45(6): 564–67.
- Dammak, Ilyes, Rosemary Aparecida de Carvalho, et al. 2017. “Properties of Active Gelatin Films Incorporated with Rutin-Loaded Nanoemulsions.” *International Journal of Biological Macromolecules* 98: 39–49.
- Dammak, Ilyes et al. 2021. “Advances in Biopolymeric Active Films Incorporated with Emulsified Lipophilic Compounds: A Review.” *RSC Advances* 11(45): 28148–68.
- Dammak, Ilyes, and Paulo José do Amaral Sobral. 2017. “Formulation and Stability Characterization of Rutin-Loaded Oil-in-Water Emulsions.” *Food and Bioprocess Technology* 10(5): 926–39.
- Dammak, Ilyes, Ana Mônica Quinta Barbosa Bittante, Rodrigo Vinicius Lourenço, and Paulo José do Amaral Sobral. 2017. “Properties of Gelatin-Based Films Incorporated with Chitosan-Coated Microparticles Charged with Rutin.” *International Journal of Biological Macromolecules* 101: 643–52.
- Dammak, Ilyes, Rodrigo Vinicius Lourenço, and Paulo José do Amaral Sobral. 2019. “Active Gelatin Films Incorporated with Pickering Emulsions Encapsulating Hesperidin: Preparation and Physicochemical Characterization.” *Journal of Food Engineering* 240: 9–20.
- Deeth, Hilton, and Nidhi Bansal. 2019. “Chapter 1 - Whey Proteins: An Overview.” In eds. Hilton C Deeth and Nidhi B T - Whey Proteins Bansal. Academic Press, 1–50.
- Delgado, Francisco José et al. 2010. “Characterisation by SPME–GC–MS of the Volatile Profile of a Spanish Soft Cheese P.D.O. Torta Del Casar during Ripening.” *Food Chemistry* 118(1): 182–89.
- Donsì, Francesco, and Giovanna Ferrari. 2016. “Essential Oil Nanoemulsions as Antimicrobial Agents in Food.” *Journal of Biotechnology* 233: 106–20.
- EFSA. 2009. “Scientific Opinion on the Use of Natamycin (E 235) as a Food Additive.” *EFSA Journal* 7(12): 1412.
- Fajardo, P. et al. 2010. “Evaluation of a Chitosan-Based Edible Film as Carrier of Natamycin to Improve the Storability of Saloio Cheese.” *Journal of Food Engineering* 101(4): 349–56.
- Fang, Zheng et al. 2019. “Comparison of Whey Protein Particles and Emulsions for the Encapsulation and Protection of α -Tocopherol.” *Journal of Food Engineering* 247: 56–63.
- FAO/OMS. 2019. *Norma General Para Los Aditivos Alimentarios*. Adoptada en 1995. Revisión

- en 2019.
- Farrokhi, Flora, Mohammad Reza Ehsani, Fojan Badii, and Maryam Hashemi. 2018. "Structural and Thermal Properties of Nanofibrillated Whey Protein Isolate in the Glassy State." *LWT* 95: 274–81.
- Fayazi, Amir, and Mohammad Hossein Ghazanfari. 2015. "Random Walk Simulation of Miscible Flow through Heterogeneous 2D Porous Media Considering Dispersion Tensor." *Chemical Engineering Science* 132: 81–92.
- Ferdous, Wahid et al. 2021. "Recycling of Landfill Wastes (Tyres, Plastics and Glass) in Construction – A Review on Global Waste Generation, Performance, Application and Future Opportunities." *Resources, Conservation and Recycling* 173: 105745.
- Fermeglia, Maurizio, and Sabrina Pricl. 2007. "Multiscale Modeling for Polymer Systems of Industrial Interest." *Progress in Organic Coatings* 58(2): 187–99.
- Ferreira-Nunes, Ricardo, Tais Gratieri, Guilherme M Gelfuso, and Marcilio Cunha-Filho. 2018. "Mixture Design Applied in Compatibility Studies of Catechin and Lipid Compounds." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 149: 612–17.
- Flórez, María, Esther Guerra-Rodríguez, Patricia Cazón, and Manuel Vázquez. 2022. "Chitosan for Food Packaging: Recent Advances in Active and Intelligent Films." *Food Hydrocolloids* 124: 107328.
- Franssen, L, T Rumsey, and J Krochta. 2004. "Whey Protein Film Composition Effects on Potassium Sorbate and Natamycin Diffusion." *Journal of Food Science* 69(5): C347–50.
- Ganiari, Sophie, Evanthia Choulitoudi, and Vassiliki Oreopoulou. 2017. "Edible and Active Films and Coatings as Carriers of Natural Antioxidants for Lipid Food." *Trends in Food Science & Technology* 68: 70–82.
- Gao, Yanan et al. 2016. "Nanoemulsion Enhances α -Tocopherol Succinate Bioavailability in Rats." *International Journal of Pharmaceutics* 515(1): 506–14.
- Geyer, Roland, Jenna R Jambeck, and Kara Lavender Law. 2017. "Production, Use, and Fate of All Plastics Ever Made." *Science Advances* 3(7).
- Ghadetaj, Ali, Hadi Almasi, and Laleh Mehryar. 2018. "Development and Characterization of Whey Protein Isolate Active Films Containing Nanoemulsions of Grammosciadium Ptrocarpum Bioss. Essential Oil." *Food Packaging and Shelf Life* 16: 31–40.
- Ghajar, A, and Y Cengel. 2014. *Heat and Mass Transfer: Fundamentals and Applications*.

McGraw-Hill Education.

- Ghanbarzadeh, Babak, and A R Oromiehi. 2008. "Biodegradable Biocomposite Films Based on Whey Protein and Zein: Barrier, Mechanical Properties and AFM Analysis." *International Journal of Biological Macromolecules* 43(2): 209–15.
- GilakHakimabadi, Saeed et al. 2019. "Controlled-Release of Ferulic Acid from Active Packaging Based on LDPE/EVA Blend: Experimental and Modeling." *Food Packaging and Shelf Life* 22: 100392..
- GmbH, Nova-Institut. 2020. "The Global Bio-Based Polymer Market 2019 – A Revised View on a Turbulent and Growing Market." <http://news.bio-based.eu/the-global-bio-based-polymer-market-2019-a-revised-view-on-a-turbulent-and-growing-market/>.
- Gökkaya Erdem, Burcu, Sevgin Dıblan, and Sevim Kaya. 2019. "Development and Structural Assessment of Whey Protein Isolate/Sunflower Seed Oil Biocomposite Film." *Food and Bioproducts Processing* 118: 270–80.
- Gómez-Estaca, Joaquín et al. 2014. "Advances in Antioxidant Active Food Packaging." *Trends in Food Science & Technology* 35(1): 42–51.
- González-Forte, Lucía del Sol, Javier I Amalvy, and Nora Bertola. 2019. "Corn Starch-Based Coating Enriched with Natamycin as an Active Compound to Control Mold Contamination on Semi-Hard Cheese during Ripening." *Heliyon* 5(6): e01957.
- Gooch, Jan W, ed. 2007. "Suspension BT - Encyclopedic Dictionary of Polymers." In New York, NY: Springer New York, 945.
- Grafia, Ana L, M Belén Vázquez, M Virginia Bianchinotti, and Silvia E Barbosa. 2018. "Development of an Antifungal Film by Polyethylene Surface Modification with Natamycin." *Food Packaging and Shelf Life* 18: 191–200.
- Granda-Restrepo, Diana M. et al. 2009. "Migration of α -Tocopherol from an Active Multilayer Film into Whole Milk Powder." *Food Research International* 42(10): 1396–1402.
- Granda-Restrepo, Diana, Yaqueline Medina-Pineda, Mario Culebras-Rubio, and Clara Gómez-Clari. 2014. "Desarrollo y Caracterización de Una Película Activa Biodegradable Con Antioxidantes (Alfa-Tocoferol) a Partir de Las Proteínas Del Lactosuero." *Vitae* 21(1): 11–19.
- Granda-Restrepo, Diana, Elizabeth Peralta, Rosalba Troncoso-Rojas, and Herlinda Soto-Valdez. 2009. "Release of Antioxidants from Co-Extruded Active Packaging Developed for Whole

- Milk Powder.” *International Dairy Journal* 19(8): 481–88.
- Granda, Diana María, Yaquelin Medina-Pineda, Mario Culebras-Rubio, and Clara Gómez. 2014. “Development and Characterization of an Active Biodegradable Film with Antioxidants (Alpha-Tocopherol) from Whey Proteins.” *Vitae* 21(1): 11–19.
- Gregorí, Bárbara. 2000. 39 *Revista Cubana de Farmacia* *Revista Cubana de Farmacia*. ECIMED.
- Gupta, Pratima, and Kush Kumar Nayak. 2015. “Characteristics of Protein-Based Biopolymer and Its Application.” *Polymer Engineering & Science* 55(3): 485–98.
- Hassannia-Kolae, Mahbobeh, Iman Shahabi-Ghahfarrokhi, and Maryam Hassannia-Kolae. 2018. “Development and Characterization of a Novel Ecofriendly Biodegradable Whey Protein Concentrate Film with Nano-SiO₂.” *International Journal of Food Engineering* 14(2).
- Heldman, Dennis, and Daryl Lund. 2007. *Handbook of Food Engineering*. Second. New York: CRC Press.
- Hernández, H. 2008. “Multiscale Simulation of Heterophase Polymerization. Application to the Synthesis of Multicomponent Colloidal Polymer Particles.” [Tesis doctoral], Universidad de Potsdam.
- Honary, Vahraz, Marissa Nitz, Beata. J Wysocki, and Tadeusz. A Wysocki. 2019. “Modeling 3-D Diffusion Using Queueing Networks.” *Biosystems* 179: 17–23.
- Hong, Seok-In, and John M Krochta. 2006. “Oxygen Barrier Performance of Whey-Protein-Coated Plastic Films as Affected by Temperature, Relative Humidity, Base Film and Protein Type.” *Journal of Food Engineering* 77(3): 739–45.
- Huang, Jingwei, Feng Xiao, Hu Dong, and Xiaolong Yin. 2019. “Diffusion Tortuosity in Complex Porous Media from Pore-Scale Numerical Simulations.” *Computers & Fluids* 183: 66–74.
- Hwang, Sung Wook et al. 2013. “Migration of α -Tocopherol and Resveratrol from Poly(L-Lactic Acid)/Starch Blends Films into Ethanol.” *Journal of Food Engineering* 116(4): 814–28.
- IfBB, Intitute for Bioplastics and Biocomposites. 2019. “Production Capacities, Processing Routes, Feedstock, Land and Water Use” ed. Biopolymers facts and Statistics.
- Iñiguez-Moreno, Maricarmen et al. 2021. “Characterization of Sodium Alginate Coatings with *Meyerozyma Caribbica* and Impact on Quality Properties of Avocado Fruit.” *LWT* 152: 112346.
- Iyer, Lakshmanan K, and Pradman K Qasba. 1999. “Molecular Dynamics Simulation of α -Lactalbumin and Calcium Binding c-Type Lysozyme.” *Protein Engineering, Design and*

Selection 12(2): 129–39.

- Jamróz, Ewelina, Lesław Juszczak, and Mateusz Kucharek. 2018. “Investigation of the Physical Properties, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Ternary Potato Starch-Furcellaran-Gelatin Films Incorporated with Lavender Essential Oil.” *International Journal of Biological Macromolecules* 114: 1094–1101.
- Kamal-Eldin, Afaf, and Elizabeth Budilarto. 2015. “Tocopherols and Tocotrienols as Antioxidants for Food Preservation.” In *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, ed. Fereidoon B T - Handbook of Antioxidants for Food Preservation Shahidi. Woodhead Publishing, 141–59.
- Kaur, Khushwinder, Jaspreet Kaur, Raj Kumar, and S.K. Mehta. 2016. “Formulation and Physiochemical Study of A-Tocopherol Based Oil in Water Nanoemulsion Stabilized with Non Toxic, Biodegradable Surfactant: Sodium Stearoyl Lactate.” *Ultrasonics Sonochemistry*.
- Kaza, Silpa, Lisa Yao, Perinaz Bhada-Tata, and Frank Van Woerden. 2018. *What a Waste 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050*. Urban Deve. Washington, DC: World Bank. © World Bank. <http://hdl.handle.net/10986/30317>.
- Khames, Ahmed, Mohammad A Khaleel, Mohamed F El-Badawy, and Ahmed O H El-Nezhawy. 2019. “Natamycin Solid Lipid Nanoparticles - Sustained Ocular Delivery System of Higher Corneal Penetration against Deep Fungal Keratitis: Preparation and Optimization.” *International journal of nanomedicine* 14: 2515–31.
- Lavoine, Nathalie et al. 2016. “Active Bio-Based Food-Packaging: Diffusion and Release of Active Substances through and from Cellulose Nanofiber Coating toward Food-Packaging Design.” *Carbohydrate Polymers* 149: 40–50.
- Lazcano Díaz, Estefania et al. 2019. “Development of Essential Oil-Based Phyto-Formulations to Control the Cattle Tick *Rhipicephalus Microplus* Using a Mixture Design Approach.” *Experimental Parasitology* 201: 26–33.
- van Leeuwen, M R et al. 2013. “The Effect of Natamycin on the Transcriptome of *Conidia* of *Aspergillus Niger*.” *Studies in Mycology* 74: 71–85.
- Li, Yan et al. 2021. “Development and Characterization of Novel Antioxidant Films Based on Chitosan and Maillard Reaction Products.” *LWT* 141: 110886.
- Manzanarez-López, Francisca, Herlinda Soto-Valdez, Rafael Auras, and Elizabeth Peralta. 2011. “Release of α -Tocopherol from Poly(Lactic Acid) Films, and Its Effect on the Oxidative

- Stability of Soybean Oil.” *Journal of Food Engineering* 104(4): 508–17.
- Marangoni Júnior, Luís, Renan Garcia da Silva, Roniérik Pioli Vieira, and Rosa Maria Vercelino Alves. 2021. “Water Vapor Sorption and Permeability of Sustainable Alginate/Collagen/SiO₂ Composite Films.” *LWT* 152: 112261.
- Martelli, Silvia Maria et al. 2017. “Edible Carboxymethyl Cellulose Films Containing Natural Antioxidant and Surfactants: α -Tocopherol Stability, in Vitro Release and Film Properties.” *LWT- Food Science and Technology* 77: 21–29.
- Martins, Joana T, Miguel A Cerqueira, and António A Vicente. 2012. “Influence of α -Tocopherol on Physicochemical Properties of Chitosan-Based Films.” *Food Hydrocolloids* 27(1): 220–27.
- Mascheroni, Erika et al. 2010. “Diffusivity of Propolis Compounds in Polylactic Acid Polymer for the Development of Anti-Microbial Packaging Films.” *Journal of Food Engineering* 98(3): 294–301.
- Mercea, P V et al. 2018. “Modelling Migration of Substances from Polymers into Drinking Water. Part 1 - Diffusion Coefficient Estimations.” *Polymer Testing* 65: 176–88..
- Mercosur/GMC/Res-03. 1992. *Criteria Generales de Envases y Equipamientos Alimentarios En Contacto Con Alimentos*.
- Miller, K S, and J M Krochta. 1997. “Oxygen and Aroma Barrier Properties of Edible Films: A Review.” *Trends in Food Science & Technology* 8(7): 228–37.
- Minagricultura. 2020. *Cadena Láctea Colombiana. Análisis Situacional Cadena Láctea*.
- Ministerio de Protección Social. 2012. *Requisitos Sanitarios Que Deben Cumplir Los Materiales, Objetos, Envases y Equipamientos Destinados a Entrar En Contacto Con Alimentos y Bebidas Para El Consumo Humano*. Colombia: Ministerio de Salud y Protección Social.
- Moatsou, Golfo et al. 2015. “Effect of Natamycin-Containing Coating on the Evolution of Biochemical and Microbiological Parameters during the Ripening and Storage of Ovine Hard-Gruyere-Type Cheese.” *International Dairy Journal* 50: 1–8.
- Moeini, Arash, Natalie Germann, Mario Malinconico, and Gabriella Santagata. 2021. “Formulation of Secondary Compounds as Additives of Biopolymer-Based Food Packaging: A Review.” *Trends in Food Science & Technology* 114: 342–54.
- Mohamed, Noha, and Noha G Madian. 2020. “Evaluation of the Mechanical, Physical and Antimicrobial Properties of Chitosan Thin Films Doped with Greenly Synthesized Silver

- Nanoparticles.” *Materials Today Communications* 25: 101372.
- Mohammadi, Maryam, Sanam Mirabzadeh, Rahim Shahvalizadeh, and Hamed Hamishehkar. 2020. “Development of Novel Active Packaging Films Based on Whey Protein Isolate Incorporated with Chitosan Nanofiber and Nano-Formulated Cinnamon Oil.” *International Journal of Biological Macromolecules* 149: 11–20.
- Molognoni, Luciano et al. 2016. “A Simple and Fast Method for the Inspection of Preservatives in Cheeses and Cream by Liquid Chromatography- Electrospray Tandem Mass Spectrometry.” *Talanta* 147: 370–82.
- de Moraes Crizel, Tainara, Tania Maria Haas Costa, Alessandro de Oliveira Rios, and Simone Hickmann Flôres. 2016. “Valorization of Food-Grade Industrial Waste in the Obtaining Active Biodegradable Films for Packaging.” *Industrial Crops and Products* 87: 218–28.
- Mushtaq, Mehvesh et al. 2018. “Use of Pomegranate Peel Extract Incorporated Zein Film with Improved Properties for Prolonged Shelf Life of Fresh Himalayan Cheese (Kalari/Kradi).” *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 48: 25–32.
- Nascimento, Kauyse Matos et al. 2021. “Properties of Alginate Films Incorporated with Free and Microencapsulated *Stryphnodendron Adstringens* Extract (Barbatimão).” *Food Packaging and Shelf Life* 28: 100637.
- Neira, Laura M, Josefa F Martucci, Nadia Stejskal, and Roxana A Ruseckaite. 2019. “Time-Dependent Evolution of Properties of Fish Gelatin Edible Films Enriched with Carvacrol during Storage.” *Food Hydrocolloids* 94: 304–10.
- Noordam, Bertus, Jacobus Stark, Ben Haan, and Hong Tan. 2002. “Nuevas Suspensiones Acuósas Concentradas de Natamicina Estables.” http://www.espatentes.com/pdf/2143586_t3.pdf (February 13, 2018).
- Nordam, Tor, Raymond Nepstad, Emma Litzler, and Johannes Röhrs. 2019. “On the Use of Random Walk Schemes in Oil Spill Modelling.” *Marine Pollution Bulletin* 146: 631–38.
- Noronha, Carolina Montanheiro, Sabrina Matos de Carvalho, Renata Calegari Lino, and Pedro Luiz Manique Barreto. 2014. “Characterization of Antioxidant Methylcellulose Film Incorporated with α -Tocopherol Nanocapsules.” *Food Chemistry* 159: 529–35.
- Nzekoue, Franks Kamgang et al. 2019. “HS-SPME-GC-MS Technique for FFA and Hexanal Analysis in Different Cheese Packaging in the Course of Long Term Storage.” *Food Research International* 121: 730–37.

- OCDE. 2018. *Improving Markets for Recycled Plastics: Trends, Prospects and Policy Responses*. Paris. <http://www.oecd.org/centrodemexico/medios/losgobiernosnecesitanactuarparafomentarllosmercadosderecicladedoplasticosdicelaocde.htm>.
- de Oliveira, Talita Moreira, Nilda de Fátima Ferreira Soares, Rodrigo Magela Pereira, and Kátia de Freitas Fraga. 2007. "Development and Evaluation of Antimicrobial Natamycin Incorporated Film in Gorgonzola Cheese Conservation." *Packaging Technology and Science* 20(2): 147–53.
- Ollé Resa, Carolina P., Lía N. Gerschenson, and Rosa J. Jagus. 2014. "Natamycin and Nisin Supported on Starch Edible Films for Controlling Mixed Culture Growth on Model Systems and Port Salut Cheese." *Food Control* 44: 146–51.
- . 2016. "Starch Edible Film Supporting Natamycin and Nisin for Improving Microbiological Stability of Refrigerated Argentinian Port Salut Cheese." *Food Control* 59: 737–42.
- Ollé Resa, Carolina P., Rosa J. Jagus, and Lía N. Gerschenson. 2014a. "Effect of Natamycin, Nisin and Glycerol on the Physicochemical Properties, Roughness and Hydrophobicity of Tapioca Starch Edible Films." *Materials Science and Engineering: C* 40: 281–87.
- Ollé Resa, Carolina P., Rosa J. Jagus, and Lía N. Gerschenson. 2014b. "Natamycin Efficiency for Controlling Yeast Growth in Model Systems and on Cheese Surfaces." *Food Control* 35(1): 101–8.
- Otín, José. 2011. "Estudio de La Difusión Del Carvacrol y El Eugenol Desde Películas de Proteína de Suero Lácteo a Diferentes Simulantes Alimentarios." [Tesis de maestría]. Universidad Pública de Navarra.
- Oymaci, Pelin, and Sacide Alsoy Altinkaya. 2016. "Improvement of Barrier and Mechanical Properties of Whey Protein Isolate Based Food Packaging Films by Incorporation of Zein Nanoparticles as a Novel Bionanocomposite." *Food Hydrocolloids* 54: 1–9.
- Ozer, Bahar Basak Peksen, Metin Uz, Pelin Oymaci, and Sacide Alsoy Altinkaya. 2016. "Development of a Novel Strategy for Controlled Release of Lysozyme from Whey Protein Isolate Based Active Food Packaging Films." *Food Hydrocolloids* 61: 877–86.
- Paseiro-Cerrato, R et al. 2013. "Rapid Method to Determine Natamycin by HPLC-DAD in Food Samples for Compliance with EU Food Legislation." *Food Control* 33(1): 262–67.
- Patil, Akash et al. 2018. "Formulation Development, Optimization, and In Formulation

- Development, Optimization, and In Vitro–In Vivo Characterization Of Vitro–In Vivo Characterization of Natamycin-Loaded PEGylated Nano-Lipid Carriers for Ocular Applications.” *Journal of Pharmaceutical Sciences* 107(8): 2160–71.
- de Paula Herrmann, Paulo Sérgio, Cristiana M Pedroso Yoshida, Aloísio José Antunes, and Jorge A Marcondes. 2004. “Surface Evaluation of Whey Protein Films by Atomic Force Microscopy and Water Vapour Permeability Analysis.” *Packaging Technology and Science* 17(5): 267–73.
- Peelman, Nanou et al. 2013. “Application of Bioplastics for Food Packaging.” *Trends in Food Science & Technology* 32(2): 128–41.
- Pérez-Córdoba, Luis J et al. 2018. “Physico-Chemical, Antimicrobial and Antioxidant Properties of Gelatin-Chitosan Based Films Loaded with Nanoemulsions Encapsulating Active Compounds.” *Food Hydrocolloids* 79: 544–59.
- Pérez-Jiménez, Jara. 2011. “Metodología Para La Evaluación de Ingredientes Funcionales Antioxidantes. Efecto de Fibra Antioxidante de Uva En Status Antioxidante y Parámetros de Riesgo Cardiovascular En Humanos.” : 272.
- Pérez, Luis J, and Paulo J A Sobral. 2017. “Physical and Antioxidant Properties of Films Based on Gelatin, Gelatin-Chitosan or Gelatin-Sodium Caseinate Blends Loaded with Nanoemulsified Active Compounds.” *Journal of Food Engineering* 213: 47–53.
- Picchio, Matías L et al. 2018. “Casein Films Crosslinked by Tannic Acid for Food Packaging Applications.” *Food Hydrocolloids* 84: 424–34.
- Pintado, Cristina M B S, Maria A S S Ferreira, and Isabel Sousa. 2010. “Control of Pathogenic and Spoilage Microorganisms from Cheese Surface by Whey Protein Films Containing Malic Acid, Nisin and Natamycin.” *Food Control* 21(3): 240–46.
- Pires, C. et al. 2011. “Characterization of Biodegradable Films Prepared with Hake Proteins and Thyme Oil.” *Journal of Food Engineering* 105(3): 422–28.
- Pluta-Kubica, Agnieszka et al. 2020. “Active Edible Furcellaran/Whey Protein Films with Yerba Mate and White Tea Extracts: Preparation, Characterization and Its Application to Fresh Soft Rennet-Curd Cheese.” *International Journal of Biological Macromolecules* 155: 1307–16.
- Poças, Maria F, Jorge C Oliveira, Fernanda A R Oliveira, and Timothy Hogg. 2008. “A Critical Survey of Predictive Mathematical Models for Migration from Packaging.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48(10): 913–28..

- Qazanfarzadeh, Zeinab, and Mahdi Kadivar. 2016. "Properties of Whey Protein Isolate Nanocomposite Films Reinforced with Nanocellulose Isolated from Oat Husk." *International Journal of Biological Macromolecules* 91: 1134–40.
- Ramos, Oscar. 2011. "Development and Characterization of Bioactive, Edible Whey Protein Films and Coatings to Improve Quality and Safety of Food Products." Universidade Nova de Lisboa.
- Ramos, Óscar L., Arménia C. Santos, et al. 2012. "Antimicrobial Activity of Edible Coatings Prepared from Whey Protein Isolate and Formulated with Various Antimicrobial Agents." *International Dairy Journal* 25(2): 132–41.
- Ramos, Óscar L. et al. 2013. "Effect of Whey Protein Purity and Glycerol Content upon Physical Properties of Edible Films Manufactured Therefrom." *Food Hydrocolloids* 30(1): 110–22.
- Ramos, Óscar L, Sara I Silva, et al. 2012. "Features and Performance of Edible Films, Obtained from Whey Protein Isolate Formulated with Antimicrobial Compounds." *Food Research International* 45(1): 351–61.
- Re, Roberta et al. 1999. "Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay." *Free Radical Biology and Medicine* 26(9): 1231–37.
- Realini, Carolina E, and Begonya Marcos. 2014. "Active and Intelligent Packaging Systems for a Modern Society." *Meat science* 98(3): 404–19.
- van Rijin, Ferdinand, Hong Tan, and Martinus Warmerdam. 1998. "Composición Fungicida Para Impedir El Desarrollo de Moho En Los Productos Alimenticios y Agrícolas."
- Rincón-Fontán, M et al. 2019. "Study of the Synergic Effect between Mica and Biosurfactant to Stabilize Pickering Emulsions Containing Vitamin E Using a Triangular Design." *Journal of Colloid and Interface Science* 537: 34–42.
- Robertson, G L. 2013. *Food Packaging: Principles and Practice*. Third Edit. ed. CRC Press. New York: Taylor & Francis Group.
- Romero, Viviana, Rafael Borneo, Nancy Passalacqua, and Alicia Aguirre. 2016. "Biodegradable Films Obtained from Triticale (x Triticosecale Wittmack) Flour Activated with Natamycin for Cheese Packaging." *Food Packaging and Shelf Life* 10: 54–59.
- Sáez, Ariel. 2017. "Reducción Del Uso Del Antifúngico Natamicina En La Elaboración Del Queso Tipo Gauda." Universidad Austral de Chile.
- Salazar-Sánchez, Margarita, Sergio David Campo-Eraza, Héctor Samuel Villada-Castillo, and José Fernando Solanilla-Duque. 2019. "Structural Changes of Cassava Starch and Polylactic Acid

- Films Submitted to Biodegradation Process.” *International Journal of Biological Macromolecules* 129: 442–47.
- Samsudin, Hayati, Rafael Auras, Gary Burgess, et al. 2018. “Migration of Antioxidants from Polylactic Acid Films, a Parameter Estimation Approach: Part I – A Model Including Convective Mass Transfer Coefficient.” *Food Research International* 105: 920–29.
- Samsudin, Hayati, Rafael Auras, Dharmendra Mishra, et al. 2018. “Migration of Antioxidants from Polylactic Acid Films: A Parameter Estimation Approach and an Overview of the Current Mass Transfer Models.” *Food Research International* 103: 515–28.
- Sanchez, Leidy T, Magda I Pinzon, and Cristian C Villa. 2022. “Development of Active Edible Films Made from Banana Starch and Curcumin-Loaded Nanoemulsions.” *Food Chemistry* 371: 131121.
- Sartori, Tanara et al. 2018. “Properties of Films Produced from Blends of Pectin and Gluten.” *Food Packaging and Shelf Life* 18: 221–29.
- Schmid, Markus et al. 2017. “Effect of Thermally Induced Denaturation on Molecular Interaction-Response Relationships of Whey Protein Isolate Based Films and Coatings.” *Progress in Organic Coatings* 104: 161–72..
- Schmid, Markus, Sarah Merzbacher, and Kerstin Müller. 2018. “Time-Dependent Crosslinking of Whey Protein Based Films during Storage.” *Materials Letters* 215: 8–10.
- Schmid, Markus, and Kerstin Müller. 2019. “Chapter 11 - Whey Protein-Based Packaging Films and Coatings.” In eds. Hilton C Deeth and Nidhi B T - Whey Proteins Bansal. Academic Press, 407–37.
- Shams, Behrokh, Nadereh Golshan Ebrahimi, and Faramarz Khodaiyan. 2019. “Development of Antibacterial Nanocomposite: Whey Protein-Gelatin-Nanoclay Films with Orange Peel Extract and Tripolyphosphate as Potential Food Packaging” ed. Alexandra Muñoz-Bonilla. *Advances in Polymer Technology* 2019: 1973184.
- Shankar, Shiv, Long-Feng Wang, and Jong-Whan Rhim. 2019. “Effect of Melanin Nanoparticles on the Mechanical, Water Vapor Barrier, and Antioxidant Properties of Gelatin-Based Films for Food Packaging Application.” *Food Packaging and Shelf Life* 21: 100363.
- Shi, Donghui et al. 2019. “Effect of Aging Treatment on the Physicochemical Properties of Collagen Films.” *Food Hydrocolloids* 87: 436–47.
- Shivangi, Sharma, Darshan Dorairaj, Pradeep Singh Negi, and Nandini P Shetty. 2021.

- “Development and Characterisation of a Pectin-Based Edible Film That Contains Mulberry Leaf Extract and Its Bio-Active Components.” *Food Hydrocolloids* 121: 107046.
- Shokri, Sajad, and Ali Ehsani. 2017. “Efficacy of Whey Protein Coating Incorporated with Lactoperoxidase and α -Tocopherol in Shelf Life Extension of Pike-Perch Fillets during Refrigeration.” *LWT- Food Science and Technology* 85: 225–31.
- Silva, Hélder Daniel, Miguel Ângelo Cerqueira, and António A Vicente. 2012. “Nanoemulsions for Food Applications: Development and Characterization.” *Food and Bioprocess Technology* 5(3): 854–67. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0683-7>.
- Sionkowska, Alina, Marta Michalska-Sionkowska, and Maciej Walczak. 2020. “Preparation and Characterization of Collagen/Hyaluronic Acid/Chitosan Film Crosslinked with Dialdehyde Starch.” *International Journal of Biological Macromolecules* 149: 290–95.
- Sirisha Nallan Chakravartula, Swathi et al. 2020. “Influence of Pitanga (*Eugenia Uniflora* L.) Leaf Extract and/or Natamycin on Properties of Cassava Starch/Chitosan Active Films.” *Food Packaging and Shelf Life* 24: 100498.
- Sogut, Ece. 2020. “Active Whey Protein Isolate Films Including Bergamot Oil Emulsion Stabilized by Nanocellulose.” *Food Packaging and Shelf Life* 23: 100430.
- Solans, C. et al. 2005. “Nano-Emulsions.” *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 10(3): 102–10.
- Song, Ziyue, Tiancong Ma, Xiujuan Zhi, and Bin Du. 2021. “Cellulosic Films Reinforced by Chitosan-Citric Complex for Meat Preservation: Influence of Nonenzymatic Browning.” *Carbohydrate Polymers* 272: 118476.
- Spruit, Dylan, and Eva Almenar. 2021. “First Market Study in E-Commerce Food Packaging: Resources, Performance, and Trends.” *Food Packaging and Shelf Life* 29: 100698.
- Sukhija, Sakshi, Sukhcharn Singh, and Charanjit S Riar. 2016. “Analyzing the Effect of Whey Protein Concentrate and Psyllium Husk on Various Characteristics of Biodegradable Film from Lotus (*Nelumbo Nucifera*) Rhizome Starch.” *Food Hydrocolloids* 60: 128–37.
- Suppakul, Panuwat, Kees Sonneveld, Stephen W. Bigger, and Joseph Miltz. 2011. “Diffusion of Linalool and Methylchavicol from Polyethylene-Based Antimicrobial Packaging Films.” *LWT - Food Science and Technology* 44(9): 1888–93.
- Szekalska, Marta et al. 2019. “Alginate Oligosaccharides Affect Mechanical Properties and Antifungal Activity of Alginate Buccal Films with Posaconazole.” *Marine Drugs* 17(12).

- Tadros, Tharwat F. 2014. "Methods of Emulsification and the Role of Surfactants." In *Introduction to Surfactants*, De Gruyter.
- Tampau, Alina, Chelo González-Martínez, and Amparo Chiralt. 2018. "Release Kinetics and Antimicrobial Properties of Carvacrol Encapsulated in Electrospun Poly-(ϵ -Caprolactone) Nanofibres. Application in Starch Multilayer Films." *Food Hydrocolloids* 79: 158–69.
- Teixeira, M et al. 2017. "D- α -Tocopherol Nanoemulsions: Size Properties, Rheological Behavior, Surface Tension, Osmolarity and Cytotoxicity." *Saudi Pharmaceutical Journal* 25(2): 231–35.
- Teixidó, Anna. 2015. "Uso de Nanoemulsiones Enriquecidas En Betacaroteno y Vitamina E Como Recubrimientos Comestibles: Estudio de La Bioaccesibilidad de Sustancias Activas." [Tesis de grado], Universidad de Lleida.
- Tessaro, Larissa, Rodrigo Vinícius Lourenço, Milena Martelli-Tosi, and Paulo José do Amaral Sobral. 2021. "Gelatin/Chitosan Based Films Loaded with Nanocellulose from Soybean Straw and Activated with 'Pitanga' (Eugenia Uniflora L.) Leaf Hydroethanolic Extract in W/O/W Emulsion." *International Journal of Biological Macromolecules* 186: 328–40.
- Teter, Anna et al. 2020. "Volatile Compounds and Amino Acid Profile of Short-Ripened Farmhouse Cheese Manufactured from the Milk of the White-Backed Native Cow Breed." *LWT* 129: 109602.
- Tveito, A, and R Winther. 2006. *Introduction to Partial Differential Equations: A Computational Approach*. Springer Berlin Heidelberg.
- Unión Europea/No-10. 2011. *Reglamento No 10/2011 de La Comisión Del 14 de Enero de 2011 Sobre Materiales y Objetos Plásticos Destinados a Entrar En Contacto Con Alimentos*.
- Urrea-Quintero, Jorge-Humberto, Michele Marino, Hugo Hernandez, and Silvia Ochoa. 2020. "Multiscale Modeling of a Free-Radical Emulsion Polymerization Process: Numerical Approximation by the Finite Element Method." *Computers & Chemical Engineering* 140: 106974.
- Valencia, Germán Ayala et al. 2019. "Morphological and Physical Properties of Nano-Biocomposite Films Based on Collagen Loaded with Laponite®." *Food Packaging and Shelf Life* 19: 24–30.
- Valencia, Germán Ayala, Carla Giovana Luciano, Rodrigo Vinicius Lourenço, and Paulo José do Amaral Sobral. 2018. "Microstructure and Physical Properties of Nano-Biocomposite Films

- Based on Cassava Starch and Laponite.” *International Journal of Biological Macromolecules* 107: 1576–83.
- Varghese, Sandhya Alice, Suchart Siengchin, and Jyotishkumar Parameswaranpillai. 2020. “Essential Oils as Antimicrobial Agents in Biopolymer-Based Food Packaging - A Comprehensive Review.” *Food Bioscience* 38: 100785.
- Vestergaard, Martin, and Hanne Ingmer. 2019. “Antibacterial and Antifungal Properties of Resveratrol.” *International Journal of Antimicrobial Agents* 53(6): 716–23.
- Villareal, Angélica. 2004. “Formulación de Una Nanoemulsión Dermocósmética, Nutritiva y Regeneradora de La Piel.” [Tesis de maestría], Universidad de los Andes.
- Vitrac, O., A. Mougharbel, and A. Feigenbaum. 2007. “Interfacial Mass Transport Properties Which Control the Migration of Packaging Constituents into Foodstuffs.” *Journal of Food Engineering* 79(3): 1048–64..
- Wijayanti, Heni B, André Brodkorb, Sean A Hogan, and Eoin G Murphy. 2019. “Chapter 6 - Thermal Denaturation, Aggregation, and Methods of Prevention.” In eds. Hilton C Deeth and Nidhi B T - Whey Proteins Bansal. Academic Press, 185–247.
- Wu, Min et al. 2021. “ZnO Nanoparticles Stabilized Oregano Essential Oil Pickering Emulsion for Functional Cellulose Nanofibrils Packaging Films with Antimicrobial and Antioxidant Activity.” *International Journal of Biological Macromolecules* 190: 433–40.
- Xu, Jiahao, Rongbian Wei, Zhe Jia, and Ru Song. 2020. “Characteristics and Bioactive Functions of Chitosan/Gelatin-Based Film Incorporated with ϵ -Polylysine and Astaxanthin Extracts Derived from by-Products of Shrimp (*Litopenaeus Vannamei*).” *Food Hydrocolloids* 100: 105436.
- Xue, Feng et al. 2021. “Physicochemical Properties of Chitosan/Zein/Essential Oil Emulsion-Based Active Films Functionalized by Polyphenols.” *Future Foods* 3: 100033.
- Yambrach, Fritz et al. 2009. “Packaging of Food.” In *The Wiley Encyclopedia of Packaging Technology*, Wiley Online Books, , 851–957.
- Yang, Yuankai et al. 2019. “Multiscale Modeling of Ion Diffusion in Cement Paste: Electrical Double Layer Effects.” *Cement and Concrete Composites* 96: 55–65.
- Yeamsuksawat, Thanakorn, and Jun Liang. 2019. “Characterization and Release Kinetic of Crosslinked Chitosan Film Incorporated with α -Tocopherol.” *Food Packaging and Shelf Life* 22: 100415.

- Zam, W., and A. Ali. 2018. "Evaluation of Mechanical, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Edible Film Containing Myrtle Berries Extract." *Natural Products Journal* 8(4): 323–30.
- Zambrano, María. 2013. "Desarrollo y Caracterización de Sistemas Nanoparticulados Con Ingredientes Alimenticios Como Vectores Para Incrementar La Vida Util de Alimentos." Universidad Autónoma de Querétaro.
- Zhang, Xin et al. 2019. "Development of Multifunctional Food Packaging Films Based on Chitosan, TiO₂ Nanoparticles and Anthocyanin-Rich Black Plum Peel Extract." *Food Hydrocolloids* 94: 80–92.
- . 2020. "Physicochemical, Mechanical and Structural Properties of Composite Edible Films Based on Whey Protein Isolate/Psyllium Seed Gum." *International Journal of Biological Macromolecules* 153: 892–901.
- Zhao, Guili et al. 2019. "Biodegradable and Transparent Cellulose Film Prepared Eco-Friendly from Durian Rind for Packaging Application." *Food Packaging and Shelf Life* 21: 100345.
- Zhao, Yi-Bo, Xu-Dong Lv, and Hong-Gang Ni. 2018. "Solvent-Based Separation and Recycling of Waste Plastics: A Review." *Chemosphere* 209: 707–20.
- Zhou, Xin, Xia Hua, Lu Huang, and Yong Xu. 2019. "Bio-Utilization of Cheese Manufacturing Wastes (Cheese Whey Powder) for Bioethanol and Specific Product (Galactonic Acid) Production via a Two-Step Bioprocess." *Bioresource Technology* 272: 70–76.
- Zlata, Hrnjak-Murgić et al. 2015. "2.2 Polymers as Packaging Materials." In *Nanoparticles in Active Polymer Food Packaging*, ed. Smithers Pira. Shrewsbury.
- Zolfi, Mohsen, Faramarz Khodaiyan, Mohammad Mousavi, and Maryam Hashemi. 2014a. "Development and Characterization of the Kefiran-Whey Protein Isolate-TiO₂ Nanocomposite Films." *International journal of biological macromolecules* 65: 340–45.
- . 2014b. "The Improvement of Characteristics of Biodegradable Films Made from Kefiran-Whey Protein by Nanoparticle Incorporation." *Carbohydrate polymers* 109: 118–25.
- Zuta, P C, B K Simpson, X Zhao, and L Leclerc. 2007. "The Effect of α -Tocopherol on the Oxidation of Mackerel Oil." *Food Chemistry* 100(2): 800–807.

7. APÉNDICES

Apéndice A. Raíces de $q_n \tan q_n = Sh$ y $\tan q_n = -\alpha q_n$

<i>Raíces de $q_n \tan q_n = Sh$</i>						
<i>Sh</i>	<i>q₁</i>	<i>q₂</i>	<i>q₃</i>	<i>q₄</i>	<i>q₅</i>	<i>q₆</i>
0	0	3.1416	6.2832	9.4248	12.5664	15.7080
0.01	0.0998	3.1448	6.2848	9.4258	12.5672	15.7086
0.1	0.3111	3.1731	6.2991	9.4354	12.5743	15.7143
0.2	0.4328	3.2039	6.3148	9.4459	12.5823	15.7207
0.5	0.6533	3.2923	6.3616	9.4775	12.6060	15.7397
1.0	0.8603	3.4256	6.4373	9.5293	12.6453	15.7713
2.0	1.0769	3.6436	6.5783	9.6296	12.7223	15.8336
5.0	1.3138	4.0336	6.9096	9.8928	12.9352	16.0107
10.0	1.4289	4.3058	7.2281	10.2003	13.2142	16.2594
100.0	1.5552	4.6658	7.7764	10.8871	13.9981	17.1093
∞	1.5708	4.7124	7.8540	10.9956	14.1372	17.2788

<i>Absorción</i> (Fracción)	<i>Raíces de $\tan q_n = -\alpha q_n$</i>						
	α	q_1	q_2	q_3	q_4	q_5	q_6
0	∞	1.5708	4.7124	7.8540	10.9956	14.1372	17.2788
0.1	9.000	1.6385	4.7359	7.8681	11.0057	14.1451	17.2852
0.2	4.000	1.7155	4.7648	7.8857	11.0183	14.1549	17.2933
0.3	2.333	1.8040	4.8014	7.9081	11.0344	14.1674	17.3036
0.4	1.500	1.9071	4.8490	7.9378	11.0558	14.1841	17.3173
0.5	1.000	2.0288	4.9132	7.9787	11.0856	14.2075	17.3364
0.6	0.667	2.1746	5.0037	8.0385	11.1296	14.2421	17.3649
0.7	0.429	2.3521	5.1386	8.1334	11.2010	14.2990	17.4119
0.8	0.250	2.5704	5.3540	8.3029	11.3349	14.4080	17.5034
0.9	0.111	2.8363	5.7172	8.6587	11.6532	14.6870	17.7481
1.0	0.000	3.1416	6.2832	9.4248	12.5664	15.7080	18.8496

Tomada de Crank (1979)

Apéndice B. Códigos de la simulación (Matlab)

B.1 Simulación del movimiento Browniano

%Simulación unidimensional del movimiento Browniano de las nanogotas dentro de la película. Ejemplo para el a-TOC a 25 °C

```
clear all           % Elimina las variables del espacio de trabajo
clc                % Limpia la ventana de comandos

%% Especificando los parámetros
D=37.2171e-11;    % D nano inicial
L=0.0139;        % Espesor de la película (cm)
Lsup=0.025;      % Criterio de posición para salir del sistema (película)
npart=500000;    % Partículas representativas
Ci=40;           % Concentración inicial del migrante TOC

%Para el tiempo, se ajustan los valores para cada experimentación
tfin = 1987200;   % Tiempo final (s) para TOC 25 °C
dt = 1200;       % Para 4 y 14 son 600 y para 25 son 1200
Datos=17;        % Datos del tiempo para TOC 25°C

%Valores del tiempo según el experimento a ajustar
V_tiempo=[0 1 1.5 2 2.5 3 4 6 7 8 13 15 16 17 21 22 23]; % En días
V_tiempo=86400*V_tiempo; % Ajusta t (s) para la simulación
```

```

%%
%Matriz de registro de resultados para la posición
R_xt=zeros(npart,3); % Col 1 posición inicial, Col 2 posición en t
R_yt=zeros(npart,1); % Col 1 posición inicial

%Matriz de registro de resultados para la concentración
R_Ct=zeros(Datos,3); % Col 1 tiempo, Col2 Película, Col 3 migró
R_CT=zeros(Datos,2); % Datos de C para 10 simulaciones

for s=1:10          %Para 10 simulaciones

%Posición inicial de las partículas t=0
for i=1:npart
    R_xt(i,1)=rand*L;
    R_xt(i,2)=R_xt(i,1);
    R_yt(i,1)=rand*2.2;
end

%Posición de las partículas en el tiempo t
%Para el paso del tiempo

for t=dt:dt:tfin
    Conteo_f=0;          % Lleva el conteo del num de partículas dentro la
película
    Conteo_m=0;          % Conteo que migró
    % Nueva posición para las partículas
    for p=1:npart
        %Genera el valor aleatorio con 1*randn+0
        F=1*randn+0;

        %Distribución aleatoria de las con media=0, desviación estándar=1
        R_xt(p,3)=R_xt(p,2)+F*(2*D*dt)^0.5;

        if R_xt(p,3)<0
            R_xt(p,3)=0;
        else
            if (R_xt(p,3)>=0 & R_xt(p,3)<=L)
                Conteo_f=Conteo_f +1; %Suma el número de partículas
            else
                R_xt(p,3)=Lsup; %Saca la partícula que migró
                Conteo_m=Conteo_m+1;
            end
        end
    end
    R_xt(p,2)= R_xt(p,3); %Actualiza la info para avanzar nuevamente
end

% Cuando coincide con el tiempo guarda en el vector correspondiente
for cont=1:1:Datos
    if t==V_tiempo(1,cont)

        % Contabiliza el número de partículas para estimar C (mg/g)
        % Guarda info en matriz final y no temporal
        R_Ct(cont,1)=t;
        R_Ct(cont,2)=Ci*Conteo_f/npart;
        R_Ct(cont,3)=Ci*Conteo_m/npart;
    end
end

```

```

        R_CT(cont,s)=Ci*Conteo_f/npart; %Para la concentración en cada
iteración
    end
end
end
end

%Gráfica de resultados
subplot(1,2,1);
plot(R_xt(:,1),R_yt(:,1),'r.');
```

% Condición inicial

```

axis([0 L 0 2.2]);
subplot(1,2,2);
plot(R_xt(:,3),R_yt(:,1),'r.');
```

% Condición final

```

axis([0 L 0 2.2]);
```

B.2 Método de diferencias finitas (Explicito)

```

%Método de diferencias finitas (explicito) para la película y queso
%Ejemplo para el Tocoferol a 25 °C
clear all
clc

%% Parámetros del sistema
De=1.4700e-10; %D nano(cm2 s-1)
L=0.0139+0.2; %Espesor de la película y queso(cm)
K=2.; %Relación entre Dq/De
M=1000; %Nodos: pelíc (1-101), Interfase(102) y Queso
t_fin=3024000; %Tiempo de la simulación
Dq=De*K; %Queso
Ci=20; %Concentración inicial (mg g-1)
%%
%Datos del tiempo
V_tiempo=[0 1 3 6 8 10 13 16 19 21 28 30 35]; %En días
V_tiempo=86400*V_tiempo; %Tiempo en segundos

%% Cálculos
dx=L/(M-1); %Espaciamento nodal

%Criterio de estabilidad
dt_1=dx^2/(2*De); %Para los nodos internos y de frontera (s)
dt_2=dx^2/((1+K)*De); %Para el nodo de interfase

dt = input('Ingrese el valor de dt según la evaluación del criterio de
estabilidad: ');
```

```

Tiempos=(t_fin/dt)+1;

C=zeros(Tiempos,M);
R_Ct=zeros(length(V_tiempo),2);

%Se calcula el numero adimensional del tiempo
T=De*dt/(dx^2);           %Para la película

%% Condiciones iniciales t = 0, i=0 C= Ci mg g-1
%Para todos los nodos tiempo = que es igual a 1
for m=1:100
    C(1,m)=Ci;
end

%% Iteración para los tiempos i+1 de cada nodo

%Para el tiempo i+1
for t=2:1:Tiempos
    % Para el nodo aislado izquierda
    C(t,1)=2*T*C(t-1,2)+(1-2*T)*C(t-1,1)+g*t*dt;
    %Para los nodos internos
    for m=2:1:100
        C(t,m)=T*(C(t-1,m-1)+C(t-1,m+1))+(1-2*T)*C(t-1,m)+g*t*dt;
    end
    %Para el nodo de interfase
    C(t,101)=T*C(t-1,100)+(1-T-T*K)*C(t-1,101)+T*K*C(t-1,102)+g*t*dt;
    %Para el nodo interno queso
    for q=102:1:999
        C(t,q)=T*K*(C(t-1,q-1)+C(t-1,q+1))+(1-2*T*K)*C(t-1,q)+g*t*dt;
    end
    %Frontera derecha del queso
    C(t,1000)=2*T*K*C(t-1,999)+(1-2*T*K)*C(t-1,1000);
end
%%
    %Extracción de los datos de interés
    for c=1:length(V_tiempo)
        for fil=1:1:length(C)
            t_1=(fil-1)*dt;
            if t_1==V_tiempo(1,c)
                %Guarda info en matriz final y no temporal
                R_Ct(c,1)=t_1;
                %Para guardar la concentración de los nodos correspondientes
                for n=1:1:400
                    C_n(c,n)=C(fil,n);
                end
            end
        end
        %%Muestra el promedio del último tiempo para la película nodos
        %%1-101 Integración
        Suma=0;
        for j=1:1:101
            Suma=Suma+C(fil,j);
        end
        R_Ct(c,2)=Suma/100;
    end
end
end

```

```
%% Gráfica de resultados
%Nodos vs C para los días de experimentación
x=1:1:400;
plot(x,C_n); %Grafica C de los nodos para los mismos tiempos
%legend('Día 0','Día 1','Día 3','Día 6','Día 8','Día 10','Día 13','Día
16','Día 19','Día 21','Día 28','Día 30','Día 35','Día 38');
xlabel('Nodo');
ylabel('Concentración de TOC a 25 °C(mg g-1)');
C_graf=C_n';
```