



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



Centro Interdisciplinario de Investigación

Para el Desarrollo Integral Regional

CIDIR MICHOACÁN

**PELÍCULAS COMESTIBLES ADICIONADAS CON EXTRACTOS
ANTOCIÁNICOS DE FRESA PARA EL CONTROL DE BACTERIAS
ENTEROPATÓGENAS**

TESIS

para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
PRODUCCIÓN AGRÍCOLA SUSTENTABLE**

PRESENTA:

Rocío Del Carmen Álvarez Cervantes

Directores:

M. en C. Ernesto Oregel Zamudio

Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante

Jiquilpan, Michoacán, México, diciembre de 2019.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Jiquilpan, Michoacán siendo las 10:00 horas del día 7 del mes de Enero del 2020 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR Unidad Michoacán para examinar la tesis titulada:

"Películas comestibles adicionadas con extractos antociánicos de fresa para el control de bacterias enteropatógenas".

Presentada por el alumno:

Álvarez

Cervantes

Rocio del Carmen

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre

Con registro:


B	1	7	1	1	2	5
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA
Directores de tesis


M. en C. Ernesto Oregel Zamudio


Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante


Dra. María Valentina Angoa Pérez


Dr. José Luis Montañez Soto


Dra. Ma. del Rocio Ramirez Jimenez


Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante.
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES.



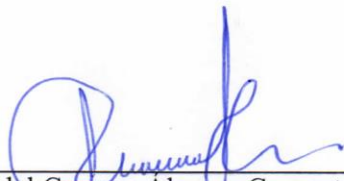


INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Jiquilpan de Juárez Michoacán el día 06 del mes de Enero del año 2020 el (la) que suscribe Rocío del Carmen Álvarez Cervantes alumno(a) del Programa de Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable, con número de registro B171125, adscrito(a) al C.I.I.D.I.R I.P.N. Unidad Michoacán, manifiesto(a) que es el (la) autor(a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Hortencia Gabriel Mena Violante y el M. en C. Ernesto Oregel Zamudio cede los derechos del trabajo titulado “Películas comestibles adicionadas con extractos antociánicos de fresa para el control de bacterias enteropatógenas”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones rocioalvarez.qfb@hotmail.com, hmena@ipn.mx, ernesto_oregel@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Rocío del Carmen Álvarez Cervantes

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios por haberme guiado e iluminado para llegar hasta este punto de mi vida profesional, el cual fue desde el comienzo un gran reto para mí y que, sin embargo, el me ayudó a culminar.

Al CIIDIR IPN por permitirme ser parte de su centro de investigación y ayudarme a adquirir educación de calidad.

A la Dra. Hortencia Gabriel Mena Violante por dirigir y apoyar este trabajo de investigación, por su paciencia y apoyo en todo momento y sobre todo, por confiar en mi y creer que yo podría culminar este trabajo.

Al M. en C. Ernesto Oregel Zamudio por ser la base de este trabajo, por sus consejos, paciencia y por transmitirme sus conocimientos siempre. Además de aceptarme como su estudiante y permitirme contribuir con su investigación.

A la M. en C. Jeanette Cárdenas Valdovinos, un agradecimiento especial por su apoyo incondicional, por animarme en momentos de tensión y desgano, por su amistad, asesoría y por transmitirme gran parte de sus conocimientos. Además de ayudarme siempre en momentos complicados y no tan complicados. Gracias Jeanette.

A la Dra. María Valentina Angoa Pérez por brindarme paz cuando sentía que no la tenía, por sus importantes consejos y orientación para mi investigación.

A mis papás María del Rayo Cervantes C. y Rodolfo Álvarez Valdovinos por ser mi ejemplo, mi fuerza, por apoyarme incondicionalmente y darme un jalón de orejas cada que pensaba en desistir.

A mi esposo Miguel García Frutos por su amor, por animarme y estar de mi lado siempre. Por ser mi equipo, mi amigo y mi apoyo. Te amo siempre.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	7
2.1. IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE FRESA.....	7
2.2. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL Y NUTRACÉUTICA	8
2.3. CALIDAD E INOCUIDAD DE FRESA	9
2.4. RIESGOS DE MANIPULACIÓN POSCOSECHA.....	10
2.5. COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA FRESA	11
2.6. CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO	14
2.7. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR LOS ALIMENTOS	15
2.8. PELÍCULAS COMESTIBLES.....	18
2.9. JUSTIFICACIÓN.....	22
2.10. HIPÓTESIS	23
2.11. OBJETIVOS	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	24
3.2. EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DE FRESA.....	24
3.3. ELABORACIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES.....	25
3.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA.....	25
3.5. PELÍCULAS COMESTIBLES ADICIONADAS CON EXTRACTO DE ANTOCIANINAS DE FRESA.....	26
3.6. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE PELÍCULAS COMESTIBLES ADICIONADAS CON EXTRACTOS ANTOCIÁNICOS.....	27
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	30
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS EN EXTRACTOS DE FRESA DE DIFERENTES VARIEDADES.....	31
4.2 CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS.....	32
4.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE PELÍCULAS COMESTIBLES ADICIONADAS CON EXTRACTOS ANTOCIÁNICOS.....	34
6. CONCLUSIONES.....	40
7. REFERENCIAS.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura básica de las antocianinas (Clemente & Galli, 2011).....	12
Figura 2. Estructura química de las antocianinas más comunes en la naturaleza (Dao <i>et al.</i> , 2015).	12
Figura 3. Imagen tomada por microscopia de transmisión electrónica de células de E. coli mostrando cambios citológicos, tratadas con extracto antociánico de col morada (Brassica oleracea): C) Células control; D) Células tratadas con extracto. Tomada de (Hafidh <i>et al.</i> , 2011).	14

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición y contenido nutrimental de frutos de fresa (por 100 g de fruto fresco) (Yan <i>et al.</i> , 2019)	9
Tabla 2. Diluciones de extractos antociánicos de tres variedades de fresa utilizadas para determinar la CMI.....	26
Tabla 3. Concentración de antocianinas de los extractos de frutos de fresa de diferentes variedades.....	31
Tabla 4. Concentraciones Mínimas Inhibitorias de las películas comestibles adicionadas con extracto de antocianinas de frutos de fresa de diferentes variedades.....	33
Tabla 5. Diferencia total de color lado brillante (LB) de películas comestibles adicionadas con extracto de antocianinas de fresa de 3 variedades diferentes a diferentes concentraciones	35
Tabla 6. Diferencia total de color lado opaco (LO) de películas comestibles adicionadas con extracto de antocianinas de fresa de 3 variedades diferentes a diferentes concentraciones.	35
Tabla 7. Grosor (mm) de las películas comestibles adicionadas con extracto de antocianinas de fresa de 3 variedades diferentes a diferentes concentraciones.	36
Tabla 8. Densidad (g/cm ³) de las películas comestibles adicionadas con extracto de antocianinas de fresa de 3 variedades diferentes a diferentes concentraciones.....	36
Tabla 9. Porcentaje de humedad relativa (% HR) de las películas comestibles adicionadas con extracto de antocianinas de fresa de 3 variedades diferentes a diferentes concentraciones.	37

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. cálculo de antocianinas totales.....	24
Ecuación 2. diferencia total de color.....	28
Ecuación 3. densidad	28
Ecuación 4. velocidad de transmisión de vapor de agua.....	29
Ecuación 5. permeabilidad de vapor de agua	29

RESUMEN

La fresa es un fruto con propiedades específicas que lo hacen apetitoso y nutritivo, y uno de los más consumidos a nivel mundial. Sin embargo, la comercialización de este fruto depende de estándares de inocuidad y calidad que aseguren que el fruto pueda ser distribuido y consumido sin ocasionar daños a la salud humana. Por ello, se han implementado diversas tecnologías de preservación que en su mayoría ocasionan cambios estructurales y organolépticos al fruto, así como daños a consumidores. El objetivo de este trabajo es elaborar una película comestible (PC) a base de extractos antociánicos de fresa con actividad antimicrobiana para bacterias enteropatógenas. Para lo cual, se extrajeron y cuantificaron las antocianinas totales de tres variedades de fresa (Festival, Albion y Frontera); se determinó la CMI de los extractos antociánicos de fresa contra tres bacterias enteropatógenas: *Salmonella choleraesuis*, *Shigella flexneri* y *Escherichia coli*; se diseñó y elaboró una PC adicionada con extractos antociánicos. La PC fue caracterizada evaluando: color, grosor, densidad, humedad, solubilidad y permeabilidad al vapor de agua (PVA). Finalmente, se evaluó la actividad antibacteriana de PC adicionadas con extractos antociánicos contra las tres bacterias enteropatógenas. Los datos se analizaron con el software estadístico SAS 9.0 y Design Expert versión 11. La cuantificación de antocianinas de tres variedades de fresa indicó que la variedad con mayor concentración fue Festival (34.84 ± 0.7 mg de cianidina 3-glucósido/100 g PS), seguido de Frontera (17.33 ± 0.16 mg de cianidina 3-glucósido/100 g PS) y Albion (7.53 ± 0.8 mg de cianidina 3-glucósido/100 g PS). La CMI de la variedad Festival se encontró en 200 $\mu\text{g/ml}$ de cianidina 3-glucósido para las cepas *Salmonella choleraesuis* y *Escherichia coli*, mostrándose más resistente *Shigella flexneri* con una CMI de 183.33 mg/kg. La CMI de la variedad Albion para *Salmonella choleraesuis* se encontró en 266.66 mg/kg, seguido de *E. coli* con una CMI de 233.3 mg/kg y *Shigella flexneri* con 200 mg/kg. En cuanto a la variedad Frontera la CMI se observó con mayor inhibición para *Escherichia coli* con 116.67 mg/kg, para *Salmonella* y *Shigella* la CMI se encontró en 166.67 mg/kg.

Palabras clave: *Fragaria x ananassa*, antocianinas, inocuidad, capacidad antibacteriana

ABSTRACT

The strawberry is a fruit with specific properties that make it appetizing and nutritious; this has made the fruit one of the most consumed worldwide. However, the commercialization of this fruit depends on standards of safety and quality that ensure that the fruit can be distributed and consumed without causing damage to health. For this reason, several technologies have been implemented that, in their majority, have caused structural and organoleptic changes to the fruit, as well as damages to consumers. The objective of this work is to produce an edible film (PC) based on anthocyanin strawberry extracts with antimicrobial activity for enteropathogenic bacteria. The methodology is divided into five phases: 1.- Extraction and quantification of anthocyanin extracts of three strawberry varieties (Festival, Albion and Frontera), 2.- Determination of the IMC of strawberry anthocyanin extracts against three enteropathogenic bacteria (*Salmonella choleraesuis*, *Shigella flexneri* and *Escherichia coli*), 3.- Elaboration of a PC added with anthocyanin extracts, 4.- Physicochemical evaluation of PC evaluating color, thickness, density, humidity, solubility and water vapor permeability (PVA), 5.- Evaluation of the antibacterial activity of PCs added with anthocyanin extracts against three enteropathogenic bacteria. The data was analyzed with statistical software SAS 9.0 and Design Expert version 11. As results; the quantification of anthocyanins from three strawberry varieties indicates that the variety with the highest concentration is Festival with 34.84 ± 0.7 mg cyanidin 3-glucoside/100 g DW, followed by Frontera with 17.33 ± 0.16 mg cyanidin 3-glucoside/100 g DW and Albion with 7.53 ± 0.8 mg cyanidin 3-glucoside/100 g DW. The CMI of the Festival variety is found at 116.67 mg / kg of cyanidin 3-glucoside for the *Samonella choleraesuis* and *Escherichia coli* strains, with *Shigella flexneri* being more resistant with a MIC of 183.33 mg / kg. The MIC of the Albion variety for *Salmonella choleraesuis* is found at 266.66 mg / kg, followed by *E. coli* with a MIC of 233.3 mg / kg and *Shigella flexneri* with 200 mg / kg. Regarding the Frontera variety, the MIC was observed with greater inhibition for *Escherichia coli* with 116.67 mg / kg, for *Salmonella* and *Shigella* the MIC is found at 166.67 mg / kg.

Keywords: fragaria x ananassa, anthocyanins, safety, antibacterial capacity

1. INTRODUCCIÓN

Los frutos de fresa (*Fragaria x ananassa*) tienen una gran demanda comercial hoy en día. México es uno de los principales productores de esta frutilla en el mundo, después de China y Estados Unidos (FAO, 2018). La fresa es un fruto no climatérico, con excelentes propiedades organolépticas, son ricos en vitaminas y minerales, además de su alto contenido de metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas (Tulipani *et al.*, 2008). Las antocianinas, además de ser el grupo más abundante en el fruto de fresa, son compuestos de naturaleza fenólica que tienen como principal función en el fruto dar coloración naranja-rojo intenso, participan en la atracción de polinizadores y dispersores de semillas e intervienen como protectores ante ciertos tipos de estrés biótico y abiótico (Liu *et al.*, 2018). Asimismo, las antocianinas juegan un papel importante en la salud de los consumidores, al tener actividades antioxidante, antihipertensiva, anticancerígena, antiinflamatoria y antimicrobiana (Abountiolas & do Nascimento Nunes, 2017). Sin embargo, debido a sus características fisiológicas, tienen una corta vida de anaquel, por lo que presentan alta susceptibilidad a la pérdida de humedad y al ataque por microorganismos, que ocasiona grandes pérdidas durante su transporte y comercialización. Esto hace que se vean disminuidos de forma drástica los atributos de sabor, aroma y textura, afectando su calidad comercial y su atractiva frescura para el consumidor (Restrepo & Aristizábal, 2010).

En el proceso de cosecha y poscosecha, es muy frecuente que los frutos se deterioren debido a que carecen de cáscara y a su naturaleza blanda, puedan entrar en contacto con agentes microbiológicos que afecten su calidad y, por ende, la salud del consumidor final (Cuevas-Álvarez, 2018). Desde que inicia la manipulación del fruto en la cosecha, pasa por el proceso de empaque, transporte y comercialización, hay riesgo de contaminación, y las bacterias oportunistas son las más comunes, por ejemplo, aquellas del género *Escherichia*, *Shigella* y *Salmonella*. Estas cepas son generalmente conocidas por causar alteraciones en el sistema digestivo del ser humano, causando síntomas como diarrea, vómito, inflamación y malestar estomacal (Soto Varela, Pérez Lavalle, & Estrada Alvarado, 2016).

En la actualidad, los consumidores demandan productos de mayor calidad, que presenten propiedades benéficas para el consumidor y que contengan sólo ingredientes naturales que

favorezcan sus características sensoriales y nutritivas, que sean alimentos mínimamente procesados, totalmente inocuos, y que no representen un riesgo a la salud.

La necesidad de satisfacer la creciente demanda de este tipo de frutos con máxima calidad, ha conducido a la constante búsqueda e implementación de estrategias de preservación que permitan prolongar la vida útil de éstos. En los últimos años, se han desarrollado diversas estrategias de conservación que permiten que los frutos comercializados que llegan a manos del consumidor final, sean de la máxima calidad posible; por ejemplo, el uso de atmósferas modificadas y las películas comestibles (Gol, Patel, & Rao, 2013).

Una película comestible (PC) es una capa delgada y fina que se elabora a base de componentes alimenticios y se adhiere directamente sobre la superficie de un alimento con el fin de prolongar su vida útil de almacenamiento, o protegerlo de agentes externos (Silva-Weiss, Ihl, Sobral, Gómez-Guillén, & Bifani, 2013). Al ser compuesta por materiales poliméricos y lípidos como la cera de candelilla, que actúan como mejoradores de propiedades mecánicas, además de crear una barrera al vapor de agua, y en conjunto retrasan la senescencia en frutas climatéricas y no climatéricas, ayudan a conservar la apariencia, disminuyen la transpiración, la pérdida de aromas y mejoran la textura del fruto (Restrepo & Aristizábal, 2010). Es muy importante recalcar que las PC también pueden actuar como barrera contra agentes microbiológicos externos, tales como hongos y bacterias, que causan deterioro del fruto o pueden ocasionar daño en la salud del consumidor.

En los últimos años, se ha explorado la adición de compuestos bioactivos a las PC con el fin de adicionar o incrementar cualidades nutraceuticas a los frutos en los que se aplican; por ejemplo, la adición de aceites esenciales y otros compuestos que aportan y/o exaltan las cualidades propias del fruto como sabor, textura y aroma, y además, de aportar compuestos bioactivos responsables de las propiedades antioxidante, anticancerígena, antiinflamatoria, antimicrobiana, entre otras (Otoni *et al.*, 2017). Por ello, la creación de una PC adicionada con extractos antociánicos de fresa que poseen actividad antibacteriana contra enteropatógenos de humanos, se propone como una estrategia que promete ofrecer a los consumidores un producto inocuo. El objetivo de este trabajo fue evaluar películas comestibles a base de extractos antociánicos de fresa para el control de bacterias enteropatógenas de humano.

2. ANTECEDENTES

La fresa, por su sabor y aroma especial es un cultivo económica y comercialmente importante en México, se trata de un fruto con alta demanda de consumo tanto en su forma fresca como procesada, lo cual conlleva a que sea la frutilla más estudiada (Hafidh *et al.*, 2011). Taxonómicamente, la fresa pertenece al reino *Plantae*, subreino *Embryobionta*, división *Magnoliophyta*, clase *Rosidae*, orden *Rosales*, Familia de las *Rosaceas*, subfamilia *Rosoideae* y género *Fragaria*. Es una planta herbácea pequeña, dicotiledónea, que produce brotes cada año. Cuenta con un sistema radicular fasciculado y se compone de raíces y raicillas. Los frutos se dan a partir de la fecundación de un óvulo que logra dar lugar a un fruto de tipo aquenio (Amil-Ruiz, Blanco-Portales, Munoz-Blanco, & Caballero, 2011). Es producto de una hibridación accidental entre *Fragaria chiloensis* y *Fragaria virginiana* (Jules Janick, 2008). Además, como característica morfológica, esta planta cuenta con una corona de hojas trifoliadas, flores blancas que dan lugar al crecimiento de frutos rojos y jugosos en los cuales se incrustan las diminutas semillas amarillas denominadas aquenio (Vaughan, 2003).

2.1. Importancia del cultivo de fresa

México ha sido productor de fresa desde hace más de 50 años, tiempo en el que los cultivos de fresa se realizaban únicamente de manera doméstica, en casa. Después, se comenzó el proceso de exportación en el cual, los principales productores de México eran Irapuato y Zamora, posteriormente se unieron estados como Baja California, Guanajuato, Jalisco y Morelos (Salinas-Callejas, Tavera-Cortes, Alvarado-Raya, & Escamilla-Garcia, 2015). Esta importancia de producción nacional y exportación incrementó debido al producto que México exportaba, frutos con propiedades y aspectos de calidad como: tamaño, color, textura, aroma y sabor. La importancia comercial de este cultivo radica en el considerable aumento de producción cada año, Estados Unidos, como principal comprador de este fruto incrementa las demandas de frutos producidos en México gracias a la calidad que estos frutos brindan por ser producidos en su mayoría bajo condiciones de microclimas, particularmente en Irapuato y Zamora. Adicionalmente estos frutos brindan alto contenido nutricional específicamente vitaminas y minerales, lo cuales brindan beneficios a consumidores como prevención de enfermedades (Salinas-Callejas *et al.*, 2015).

Las variedades Festival, Albion, Camarosa, San Andreas, Camino Real y Frontera son ampliamente cultivadas en México, a partir de la reproducción en viveros de una planta madre proveniente de Estados Unidos, debido al rendimiento y calidad que ofrecen (C. Rodríguez Ledesma, 2016). Además, estas variedades en la temporada de otoño mejoran significativamente las condiciones financieras del estado, pues al ser cultivadas en invierno y otoño, permiten ofrecer a los productores un fruto con mejor calidad por las condiciones climáticas del estado y a las características propias de cada variedad; entre ellas, que en su mayoría son de buen rendimiento, con frutos cónicos, firmes, de color brillante e intenso, y sus requerimientos edafoclimáticos no son tan exigentes, es decir, son de fácil adaptación a cualquier clima o temporada de siembra (Salinas-Callejas *et al.*, 2015). Debido a sus características nutricionales y nutraceuticas, la fresa es uno de los frutos de mayor importancia dentro de la dieta del ser humano. Su importancia radica en su alto contenido de nutrientes esenciales y compuestos fitoquímicos que se han asociado principalmente con disminución en la incidencia de enfermedades crónicas, incluyendo obesidad, infecciones, enfermedades cardiovasculares, cáncer entre otras. Dentro de los compuestos que se encuentran principalmente en el fruto destacan las antocianinas y los elagitaninos, los cuales presentan propiedades antioxidantes (Hafidh *et al.*, 2011).

2.2. Composición nutricional y nutraceutica

De acuerdo a su perfil nutrimental la fresa representa una opción saludable de alimento, gracias a que es un fruto con alto contenido de fibra y fructosa, es una fuente de ácidos grasos esenciales, carotenoides y tocoferoles. Sin embargo, el gran interés de consumir este fruto se debe a que presenta un alto contenido de vitaminas: vitamina C, vitamina K, vitamina A, vitamina E, vitamina B 6, tiamina, riboflavina, entre otras. Su contenido de compuestos fitoquímicos comprende la clase de los flavonoides (antocianinas y flavonoles) así como taninos (elagitaninos y galotaninos), ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinámicos) y taninos condensados (Hafidh *et al.*, 2011). Por sus diversas actividades biológicas se han convertido en un objeto de estudio constante, para ello se han utilizado modelos de estudio animal que han logrado poner en evidencia el efecto de sus componentes sobre patologías humanas, como ejemplo, existe evidencia de que la adición de fresas a la dieta diaria disminuye riesgos de salud en el ser humano al ser fuente principal de compuestos antioxidantes, antiinflamatorios, entre otros, y proporcionar beneficios neurológicos

(Manganaris, Goulas, Vicente, & Terry, 2014). La Tabla 1, muestra la composición del fruto de fresa, así como su contenido de vitaminas, minerales y compuestos nutraceuticos.

Tabla 1. Composición y contenido nutrimental de frutos de fresa (por 100 g de fruto fresco) (Yan et al., 2019)

Composición química	%	Minerales	%	Vitaminas	%	Nutraceuticos	%
Agua	90.95	Calcio	16 mg	Vitamina C	16 mg	Cianidina	1.7
Calorías	32 kcal	Hierro	0.41 mg	Tiamina	0.024 mg	Petunidina	0.1
Proteína	0.67	Magnesio	13 mg	Riboflavina	0.022 mg	Delfinidina	0.3
Lípidos totales	0.3	Fósforo	24 mg	Niacina	0.386 mg	Pelargonidina	24.9
Carbohidratos	7.68	Potasio	153 mg	Vitamina B 6	0.047 mg	Peonidina	0.1
Fibra dietética	2 g	Sodio	1 mg	Ácido fólico	24 µg	Catequina	3.1
Azúcares	4.89	Zinc	0.14 mg	Vitamina E	0.29 mg	Kaempferol	0.5

2.3. Calidad e inocuidad de fresa

La fresa es consumida de distintas maneras; por ejemplo, en fresco, congelada, procesada, semiprocada. La fruta en fresco debe contar con propiedades y características específicas, por ejemplo: tamaño, color, consistencia, que mejoren la apariencia y resulte apetitoso para el consumidor (Avendaño Ruiz, Schwentesius Rindermann, & Lugo Morones, 2006) La inocuidad alimentaria se puede entender como la implementación de medidas que reducen los riesgos provenientes de estresores biológicos y químicos, tales como aditivos alimenticios, para proteger a los consumidores de peligros involuntarios. En la actualidad la inocuidad de alimentos se ha vuelto un requerimiento especial para la comercialización nacional e internacional de todo tipo de alimentos, específicamente en frutas y hortalizas. La concientización del daño que pueden ocasionar los alimentos contaminados sobre la salud del ser humano ha provocado que se vuelva una exigencia la implementación de Buenas Prácticas Agrícolas y del análisis de peligros y puntos críticos de control (Avendaño Ruiz *et al.*, 2006)

El fruto de fresa puede sufrir daños microbiológicos que ocasionando a su vez daños a la salud; a pesar de que por su pH bajo se considera un fruto sano que difícilmente puede sufrir daños por patógenos. Sin embargo, se han relacionado a estos varios brotes entre los que destaca el brote de *Escherichia coli* O157 en 2011 en Estados Unidos (Delbeke *et al.*, 2015) La falta de inocuidad de los alimentos, conlleva riesgos significativos para la salud debido a las enfermedades generadas denominadas Enfermedades por Transmisión de Alimentos, y a

las graves afectaciones en la economía en desarrollo debido a las pérdidas que genera el hecho de que los lotes o productos contaminados sean detenidos, desechados o devueltos en el momento de su exportación por ello los alimentos consumidos en fresco como las frutas, deben cumplir con una serie de parámetros que permitan asegurar un alimento inocuo. Las actividades para garantizar la inocuidad de los alimentos son un factor fundamental para obtener productos de calidad. Los consumidores de frutos frescos han recalcado que la contaminación microbiológica es un criterio de suma importancia para comprar y consumir un alimento, ya que podría comprometer la seguridad causando enfermedades o infecciones (Kader, 2013).

Para garantizar que el producto llegue al consumidor final en excelentes condiciones organolépticas, fisicoquímicas y microbiológicas, el agricultor debe hacer una serie de consideraciones, el agricultor deberá realizar una recolección diaria de frutos y desecho de frutos en mal estado, aquellos que se hayan madurado deberán ser retirados para evitar su pudrimiento y ataque de hongos hacia los demás productos (Thompson, Prange, Bancroft, & Puttongsiri, 2018). Elegir los frutos de acuerdo a tamaño, color y madurez permitirá ordenarlos para su distribución. Además, los frutos recolectados deberán ser acomodados para su comercialización pronta, ya que si transcurre demasiado tiempo entre la cosecha y el empaque y entrega comenzará el proceso de fermentación y por lo tanto pérdida del producto.

Además de las anteriores recomendaciones, la Norma Oficial Mexicana NMX-FF-062-2002 establece los parámetros dentro de los cuales deben ser cosechados los frutos de fresa para ser comercializados y consumidos en estado fresco. Dentro de estos requerimientos se encuentran los siguientes: los frutos deben estar sanos, frescos, enteros y bien desarrollados, limpios, firmes; tener olor, tamaño y color característicos de la variedad; al menos $\frac{3}{4}$ de la superficie con color rosa-rojo, según la escala de maduración, se recomienda una recolección entre un grado 3 a 5.

2.4. Riesgos de manipulación poscosecha

Las frutas frescas se han impuesto como fuente principal de alimento para llevar una vida sana, se ha dado a conocer que alimentarnos de ellos proveerá beneficios como disminución de enfermedades cardiovasculares, efectos antioxidantes y dieta equilibrada (Berger *et al.*, 2010). Sin embargo, los frutos frescos que se consumen crudos, como la fresa han estado

involucrados en casos de contaminación por alimentos y se reconocen como vehículos de transmisión de patógenos (Berger *et al.*, 2010). Debido a que algunas bacterias son ubicuas en la naturaleza, además pueden introducirse a través del manejo o contacto humano directo del alimento, el aire, el agua y el equipo con el que son manipulados (Bhunias, 2018).

Por otro lado, los microorganismos, pueden evadir inteligentemente diversas barreras de inocuidad de alimentos y lograr persistir en ellos, utilizan estrategias como la formación de esporas, de biopelículas, detección de quorum, adaptación al pH del alimento, temperatura e incluso a antibacterianos (Bhunias, 2018) pero los tipos de microorganismos que pueden desarrollarse y vivir en un alimento especialmente en frutos va de la mano con la fuente original del alimento, su calidad microbiológica en estado crudo o sin procesar, condiciones sanitarias bajo las cuales se manipuló o procesó el producto, y las condiciones para el posterior envasado, manipulación, almacenamiento y distribución (Bhunias, 2018)

Asimismo, las fuentes de contaminación por patógenos humanos en frutas en periodo pre cosecha incluyen suelo, agua de riego, estiércol animal inadecuadamente compostado, polvo, animales salvajes y domésticos, manipulación humana y agua utilizada para rociar pesticidas, tratamientos foliares y hormonas de crecimiento (Berger *et al.*, 2010). Las fuentes de contaminación en la etapa posterior a la cosecha incluyen el manejo humano (trabajadores, consumidores), equipos de cosecha, contenedores de transporte, animales salvajes y domésticos, plagas, polvo, agua de lavado y enjuague, equipos de clasificación, empaque, corte y procesamiento adicional, contaminación cruzada, transporte y ventas (Bhunias, 2018). Por ello, la seguridad e inocuidad alimentaria se ha vuelto un problema grave de salud y en la industria alimentaria para lo cual se debe continuar en la búsqueda de opciones para contrarrestar los daños y pérdidas que las enfermedades transmitidas por alimentos ocasionan.

2.5. Compuestos fenólicos de la fresa

Descripción general

Los compuestos fenólicos encontrados en plantas, hojas, frutas y hortalizas presentan dentro de su estructura un anillo aromático, estas estructuras confieren a las moléculas propiedades de protección para las plantas, frutas y hortalizas contra agentes patógenos, estrés, radiación UV y al mismo tiempo contribuyen a su coloración.

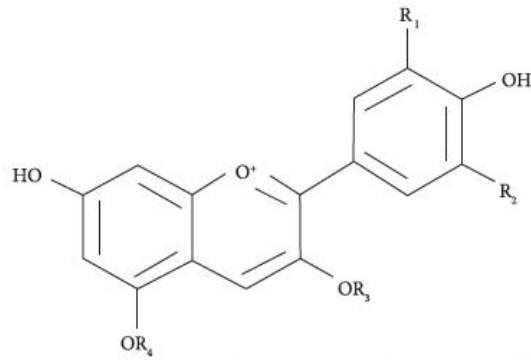


Figura 1. Estructura básica de las antocianinas (Clemente & Galli, 2011)

Las antocianinas provienen de un subgrupo denominado antocianidinas, el cual a su vez pertenece al grupo de los flavonoides. Las principales antocianidinas son: cianidina, pelargonidina, peonidina, delphinidina, petunidina y malvidina, todas tienen en común un catión pirulina y un grupo hidroxilo en la posición 3 del mismo anillo (Figura 1). Sus principales usos han sido como colorantes, ya que las antocianinas mencionadas anteriormente tienen como función primordial dar pigmentación roja, naranja, azul, violeta y morada en frutas, flores y demás partes de las plantas, dependiendo directamente del pH (Peñarrieta, Tejeda, Mollinedo, Vila, & Bravo, 2014). Las antocianinas son compuestos solubles en agua que se han encontrado en diferentes partes de plantas como: hojas, tallos, frutos y flores específicamente de frutos rojos o bayas. Los frutos de fresa son altamente ricos en compuestos fenólicos, el grupo de compuestos que más predomina son las antocianinas, principalmente pelargonidina 3-glucósido, pelargonidina 3-rutinósido y cianidina 3-glucósido.

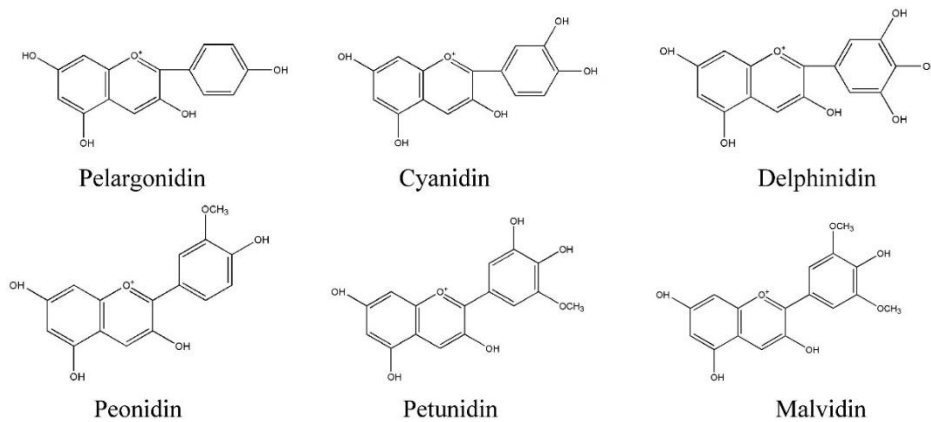


Figura 2. Estructura química de las antocianinas más comunes en la naturaleza (Dao et al., 2015).

Dentro de la naturaleza, las antocianinas se agrupan naturalmente como glucósidos de sales flavilio y se basan en seis grupos: pelargonidina, cianidina, peonidina, delfinidina, petunidina y maldivina, pues todos ellos constan de una estructura química similar; su diferencia radica en “el patrón de sustitución de metoxilo e hidroxilo del anillo B aromático” (Figura 2).

Propiedades y beneficios

Los frutos rojos como fresas, arándanos, frambuesas presentan en su superficie o capas externas gran cantidad de compuestos fenólicos, entre ellos las antocianinas, a las cuales se les atribuye la respuesta de defensa que los frutos despliegan en su capa superficial para protegerse de agentes patógenos y el daño que estos causan. Se sabe que compuestos fenólicos son antioxidantes multifuncionales que actúan como agentes reductores, antioxidantes donadores de hidrógeno y / o inhibidores de oxígeno (radicales libres) individuales (Dai, Gupte, Gates, & Mumper, 2009). Sin embargo, los beneficios hacia la salud humana que aportan los compuestos fenólicos como las antocianinas dependen de la absorción, metabolismo, distribución en los tejidos y excreción. Entre los diversos compuestos fenólicos, las antocianinas han recibido una gran atención gracias a su potente actividad antioxidante (Bowen-Forbes, Zhang, & Nair, 2010). Se ha demostrado que varios extractos de plantas y frutas que contienen antocianinas reducen las enfermedades inflamatorias asociadas con el estrés oxidativo. Por lo que, el consumo de antioxidantes en la dieta ofrece beneficios a la salud ya que el efecto antioxidante y protector de células ante radicales libres, permite contrarrestar el daño por estrés oxidativo provocado por enfermedades crónicas. Además de la actividad antioxidante, otras actividades biológicas de estos compuestos han sido ampliamente estudiadas, tal como la antimicrobiana, demostrando que controlan la invasión y crecimiento de microorganismos patógenos en humanos *in vitro*. De este modo, los compuestos antociánicos extraídos de frutillas se han utilizado en la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia, como antioxidantes en medicamentos o en productos cosméticos, además en alimentos como colorantes y antimicrobianos. Nohynek *et al.* (2006) sugirió que estos compuestos tienen un mecanismo de acción como antibacterianos directamente sobre la membrana externa de algunos microorganismos. Por lo cual, el mecanismo de acción que se le ha atribuido a estos compuestos fenólicos, en especial a las antocianinas, se enfoca en la desintegración de la membrana externa y el aumento de la

permeabilidad del contenido de las células, sobre todo en bacterias Gram negativas (Hafidh *et al.*, 2011)

Por otro lado, se sugiere que los compuestos fenólicos provenientes de extractos de frutillas como la fresa, han mostrado actividad directa en el efecto de adhesión bacteriana. El contacto de los extractos sobre las bacterias inhibe la adhesión bacteriana, lo cual a su vez evita el proceso de colonización o infección bacteriana, inmovilizando a las células bacterianas viables y evitando su proliferación. Sin embargo, hay relativamente pocos datos disponibles sobre los mecanismos antimicrobianos de los compuestos antociánicos derivados de fresas, aunque se ha informado sobre la actividad inhibidora del crecimiento bacteriano en extractos de bayas (Nohynek *et al.*, 2006). El mecanismo de acción que se le ha atribuido a las antocianinas como compuesto antibacteriano indica que los compuestos fenólicos pequeños que se encuentran en plantas herbarias desintegran la membrana externa de bacterias Gram negativas, las antocianinas en contacto con esta membrana libera LPS y aumenta la permeabilidad del trifosfato de adenosina citoplásmica (ATP).

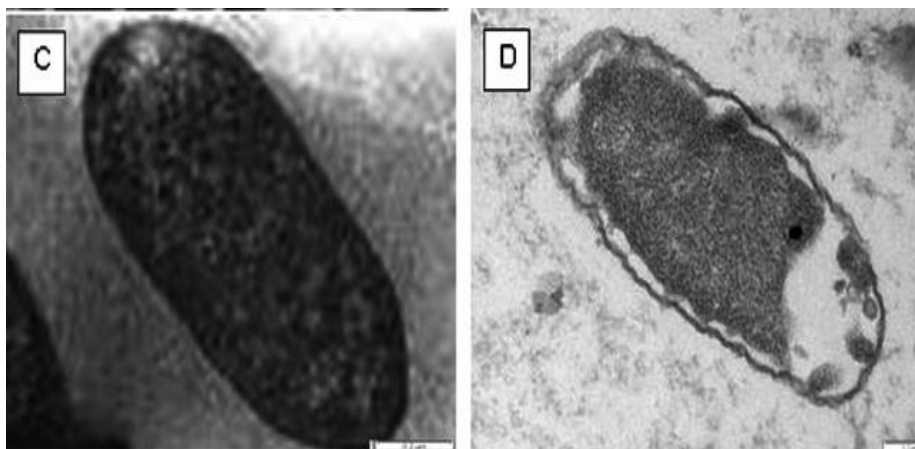


Figura 3. Imagen tomada por microscopía de transmisión electrónica de células de *E. coli* mostrando cambios citológicos, tratadas con extracto antociánico de col morada (*Brassica oleracea*): C) Células control; D) Células tratadas con extracto. Tomada de (Hafidh *et al.*, 2011).

2.6. Condiciones de almacenamiento

Las fresas en fresco cuentan con un tiempo de vida útil muy corto, lo cual es dependiente del cultivo, grado de maduración, condiciones de almacenamiento, por lo que existen diversos factores que deben ser considerados para preservar la calidad de los frutos (Salinas-Callejas *et al.*, 2015). El manejo poscosecha ha tomado cada vez más importancia debido al comercio

internacional de productos frescos, la preferencia de los consumidores por una amplia variedad de frutos y por la conservación de las propiedades nutraceuticas, además de los altos precios que implica consumir productos frescos de alta calidad. Para satisfacer sus necesidades, los proveedores y distribuidores deben aplicar un conjunto modificado de prácticas de poscosecha que garanticen la calidad e inocuidad, pero a un costo bajo y de fácil acceso (Giampieri, Alvarez-Suarez, & Battino, 2014).

2.7. Enfermedades transmitidas por los alimentos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que las enfermedades gastrointestinales ocasionadas por la ingesta de alimentos contaminados por patógenos o sustancias químicas representan un grave problema de salud pública. Las frutas o alimentos que se consumen en fresco son susceptibles a contaminarse a lo largo de toda la cadena de producción y los factores más comunes para que esto suceda son: contaminación de agua de riego, contaminación de suelo o tierra en donde fueron cultivados y cosechados los frutos o bien, por transmisión de microorganismos por aire (OMS, 2018). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA's) se presentan como uno de los principales problemas de salud ocasionados por la mala higiene de alimentos, y que afectan directamente a la salud de las personas, específicamente de aquellos que muestran un sistema inmunológico debilitado como lo son: niños, ancianos, mujeres embarazadas o personas enfermas. Las ETA's ocasionan signos y síntomas tales como náuseas, vómito, diarrea, dolor abdominal y fiebre, en casos más graves la muerte; entre los agentes causales más frecuentes se enlistan los microorganismos bacterianos principalmente *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Escherichia coli*, productora de toxina shiga (STEC) O157, STEC O157, *Vibrio*, *Yersinia* y *Listeria* (Soto Varela *et al.*, 2016).

Género Salmonella

Salmonella spp. es un bacilo Gram negativo anaerobio facultativo, móvil debido a la presencia de flagelos, no produce esporas y pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, presentan una temperatura óptima de crecimiento que oscila entre 35 y 37°C. Este género es el principal implicado en enfermedades como gastroenteritis y fiebre tifoidea. Estudios realizados hasta el 2013 señalan que este microorganismo, además de sus reservorios naturales como carne cruda, huevo y jamón puede desarrollarse en alimentos como ensaladas

de frutas, yogurt y chorizo (Soto Varela *et al.*, 2016). El mecanismo de transmisión de este microorganismo es vía fecal-oral directa o indirectamente a través de alimentos contaminados con aguas residuales o bien, por el manejo insalubre del mismo alimento (Barreto, Castillo-Ruiz, & Retamal, 2016). Las infecciones ocasionadas por *Salmonella sp.* dependen de la patogenicidad del serotipo implicado en la enfermedad, el serotipo que afecta directamente a animales de sangre caliente pertenece a la sub variedad “entérica” con dos serotipos específicos: *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium*. Este género es capaz de resistir condiciones extremas en el hospedero con la finalidad de internarse en las células epiteliales del intestino, resistiendo la fagocitosis, acidez del estómago, entre otros factores (Barreto *et al.*, 2016). La infección en el hospedero dependerá de la virulencia del serotipo implicado en la contaminación del alimento, lo cual dependerá a su vez de la dosis infectiva que el alimento presente, o bien, de los factores o vectores a los que esté expuesto el alimento (Koopman, 2017).

Género Shigella

El género *Shigella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es un bacilo Gram negativo anaerobio facultativo, no móvil, que no forma esporas. Este género presenta cuatro especies patógenas distintas: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei*, es transmitido generalmente al ser humano vía fecal-oral, lo cual resulta de las malas medidas de higiene propiciando una rápida propagación del microorganismo y, debido a que el inóculo necesario para causar una infección es pequeño (1×10^2 ufc / mL) la transmisión y propagación suele ser rápida y fácil (Koopman, 2017). El principal reservorio de este microorganismo es el ser humano, sin embargo, en condiciones de hacinamiento o deficientes de saneamiento, la infección puede transmitirse más fácilmente por el excremento de personas infectadas. Algunos vectores como las moscas pueden interferir en la propagación de *Shigella*, así como en la contaminación de agua y alimentos. Este género presenta un mecanismo de patogenicidad complejo, el microorganismo invade el epitelio del colon provocando una cascada inflamatoria de órganos y tejidos adyacentes. Posterior a la invasión del epitelio y la penetración de las mucosas del colon, este bacilo comienza a degenerar el epitelio intestinal provocando úlceras en la mucosa y por lo tanto excreciones sanguinolentas, mucoides e inflamación del intestino. Los síntomas provocados por enterotoxinas o citotoxinas

producidas por *Shigella* son: diarrea, colitis y escasez de heces con sangre y moco (Hale & Keusch, 1996).

Género Escherichia coli

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, no esporulado que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, es anaerobio facultativo, móvil por flagelos y se encuentra de manera natural en el tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente (Soto Varela *et al.*, 2016). A pesar de que este microorganismo es residente habitual del tracto gastrointestinal de animales y del ser humano, existen varias cepas que son consideradas patógenas para el ser humano, las cuales se han dividido en seis grupos: *Escherichia coli enteropatogénica*, *Escherichia coli enteroagregante*, *Escherichia coli* de adhesión difusa, *Escherichia coli* enteroinvasiva, *Escherichia coli* enterotoxigénica y *Escherichia coli* enterohemorrágica. Este microorganismo es transmitido vía fecal-oral a través de alimentos y agua contaminados directamente con excremento o a través de contaminación cruzada o por el manejo de alimentos por contacto humano durante la preparación de los mismos (Koopman, 2017).

Las cepas mencionadas pueden producir síntomas característicos en el ser humano, sin embargo, a pesar de que cada cepa produce síntomas específicos aquellos con mayor incidencia son: diarrea leve, diarrea sanguinolenta, síndrome hemolítico-urémico y muerte (FAO, 2018). Dentro de las cepas patógenas, *Escherichia coli* O157:H7 es la que más ha sido reportada como agente causal de brotes y muertes alrededor del mundo, se ha relacionado con la ingestión de alimentos contaminados como leche no pasteurizada, productos cárnicos, mariscos, bebidas y verduras frescas (Soto Varela *et al.*, 2016).

En cuanto a la contaminación de alimentos por *E. coli* esta se deriva en general de malas condiciones de higiene y sanidad atribuidas al contacto directo de materia fecal. Debido a que la materia fecal humana o animal tiene amplias maneras de diseminación en el medio ambiente, esta bacteria puede encontrarse en estiércol animal, aguas residuales, zonas de cultivo agrícola, semillas contaminadas, suelos abonados con estiércol, suelos o parcelas de cultivo regadas con aguas residuales, etc. Adicionalmente, recientes investigaciones han demostrado que este microorganismo tiene un tiempo de supervivencia de hasta 20 meses pudiendo permanecer y sobrevivir en hojas y raíces de los cultivos. Por este motivo, en los

últimos años los productos frescos contaminados con *E. coli* han sido de los principales factores causantes de brotes y epidemias (Delbeke *et al.*, 2015).

2.8. Películas Comestibles

Se define como película comestible a la capa delgada y fina que se elabora a base de componentes alimenticios y se adhiere directamente sobre la superficie de un alimento con el fin de prolongar su vida útil de almacenamiento o protegerlo de agentes externos. Estas, en los últimos años han resultado ser atractivas dentro de la industria de alimentos, se trata de una tecnología amigable con el medio ambiente comparándolos con otros empaques (Silva-Weiss *et al.*, 2013).

Las películas comestibles son sistemas preformados utilizados como empaque de alimentos, los cuáles pueden ofrecer diversos beneficios, entre ellos pueden ser utilizados como portadores de ingredientes activos (Salgado, Ortiz, Musso, Di Giorgio, & Mauri, 2015). Estos pueden considerarse tanto como empaque, como un componente de empaque, o como componente alimenticio, pero deben cumplir requisitos específicos como: presentar buenos atributos sensoriales, constituir barreras de permeabilidad al vapor de agua eficientes para el alimento, mejorar las propiedades mecánicas de los alimentos, brindar protección a daños mecánicos, mejorar las características sensoriales y propiedades mecánicas, estabilidad bioquímica, fisicoquímica y microbiana (Han, 2014).

Además, pueden ser utilizados como transporte de compuestos bioactivos y aditivos que aporten beneficios y mejoren las propiedades de la película. El uso de aditivos con capacidad bioactiva contribuye a lograr estos requisitos para preservar la calidad, la seguridad y las propiedades sensoriales de los alimentos. Constantemente se realizan investigaciones más centradas con la finalidad de optimizar formulaciones que permitan ofrecer una película con propiedades bioactivas y que además cumpla con su función de proteger a los alimentos, y sean efectivas en sistemas de alimentos reales (Salgado *et al.*, 2015).

Las películas comestibles han sido utilizadas por cientos de años para proteger los alimentos y evitar la pérdida de humedad de los mismos. Desde principios hasta mediados del siglo XX, los recubrimientos se utilizaron para evitar la pérdida de agua y agregar brillo a las frutas y verduras, como envolturas para salchichas y como algún tipo de recubrimiento azucarado para confitería, incluido el chocolate. A partir de ahí, las aplicaciones de los recubrimientos

para alimentos se han mejorado. Cuando un material de empaque, como una película, una capa delgada o un recubrimiento, es parte integral de un alimento y se puede consumir con él, califica como empaque "comestible". Las películas son estructuras que se pueden usar para envolver productos alimenticios. Pueden ubicarse en la superficie de los alimentos o entre diferentes componentes de un producto alimenticio (Salgado *et al.*, 2015).

Las películas comestibles deben producirse principalmente a partir de biopolímeros comestibles y aditivos de calidad alimentaria. Deben ser seguros bajo las condiciones de uso previstas, y procesados y aplicados de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación (Han, 2014). Estos materiales prometen mejorar la calidad de los productos alimenticios al protegerlos del deterioro físico, químico y biológico, lo que se traduce en una vida útil más larga y una mayor seguridad. Por lo tanto, los beneficios y funciones con las que una película comestible debe cumplir son: actuar como barrera contra gases o vapores, aceites y solutos; proporcionar protección estructural para evitar daños mecánicos durante el transporte, manejo y visualización; y proteger los alimentos contra la oxidación, el crecimiento microbiano y otras reacciones químicas. También podrían utilizarse para mejorar las características visuales y sensoriales de los productos alimenticios, y para transportar sustancias activas como antioxidantes, antimicrobianos, nutraceuticos, colores y sabores (Han, 2014). Por otro lado, las películas comestibles deben poder ser degradadas por microorganismos. Además, las películas comestibles deben cumplir su función de manera segura y efectiva durante el tiempo requerido y solo después de que el uso funcional previsto haya terminado, deben poder ser biodegradables.

Los componentes principales de elaboración de películas comestibles se dividen en dos: biopolímeros y lípidos. Las características físicas y químicas de estos componentes son muy diferentes, por lo que influirían en la funcionalidad de los materiales formados (Han, 2014). Los biopolímeros incluyen proteínas de origen vegetal o animal, como: proteínas de soja, gluten de trigo, zeína de maíz, proteínas de girasol, gelatina, suero de leche, caseína y queratina; y polisacáridos, tales como derivados de celulosa, almidones, alginatos, pectinas, quitosanos, carrageninas, gomas y fibras (Miramont, 2012).

Las películas de proteínas y lípidos generalmente presentan excelentes propiedades de barrera contra el oxígeno, los lípidos y los aromas, propiedades mecánicas moderadas pero

altas permeabilidades al vapor de agua. Dentro de los lípidos utilizados para la elaboración de películas se utilizan: cera de abeja, cera de candelilla, cera de carnauba, triglicéridos (por ejemplo, fracciones de grasa de leche), monoglicéridos acetilados, ácidos grasos libres, alcoholes grasos, ésteres de sacarosa y resinas (Salgado *et al.*, 2015) Los materiales de lípidos y resinas pueden proporcionar un brillo deseable y una barrera efectiva para la pérdida de agua.

Las películas compuestas se pueden crear mezclando dos o más de estos componentes, produciendo una capa de película homogénea, o una película multicapa, para lograr las mejores propiedades de cada componente y minimizar sus desventajas (Han, 2014). Por lo tanto, la ventaja de las buenas propiedades de barrera al agua de los recubrimientos de lípidos y la capacidad para formar películas cohesivas con buenas propiedades de permeabilidad al gas, se pueden combinar para formar emulsiones comestibles o recubrimientos de bicapa. Actualmente, existe un interés especial en el uso de biomateriales extraídos de recursos agrícolas renovables o subproductos industriales para este fin, debido a su mayor disponibilidad, menor costo y como alternativa para proporcionar valor agregado a estos subproductos (Cruz-Morfin, Martínez-Tenorio, & López-Malo, 2013).

Descripción e Importancia de películas comestibles

Estas soluciones formadoras de películas generan una barrera frente al transporte de gases entre otras propiedades, las cuales son conferidas por las características de las sustancias o elementos adicionados en la formulación. Además, su elaboración debe ser bajo condiciones específicas que aseguren que la película comestible cumpla con criterios como disponibilidad, funcionalidad y bajo costo (Oregel-Zamudio, Aguilar-Cristóbal, Oyoque-Salcedo, Angoa-Pérez, & Mena-Violante, 2016).

El uso de PC ha tenido mayor auge dentro de la industria agrícola hortofrutícola tomando en cuenta las características de elaboración y material de estos empaques, para otorgar características funcionales como brillo, flexibilidad o tensión, costo, resistencia estructural al agua, etc. Sin embargo, la elaboración de estos y sus aplicaciones, se relacionan con el tipo de material que se utiliza para su elaboración, condiciones de preformación y el tipo y concentración de aditivos, por ejemplo: antimicrobianos, antioxidantes, emulsificantes, etc. (Quintero, Falguera, & Muñoz, 2010).

Clasificación de películas comestibles

La formación de PC según los componentes de elaboración como: proteínas, lípidos, polisacáridos y carbohidratos o compuestas. Diversas investigaciones basadas en películas comestibles han demostrado que pueden mejorar la vida útil de la fresa, manteniendo la calidad nutricional y composición química del fruto (Yan *et al.*, 2019).

Recientemente se han utilizado películas y recubrimientos a base de polisacáridos derivados de celulosa y quitosano (Gol *et al.*, 2013), en vista de que no presentan toxicidad al ser adicionados a los alimentos. Asimismo, (Oregel-Zamudio *et al.*, 2016) evaluaron una película comestible a base de cera de candelilla en frutos de fresa, logrando disminuir el deterioro poscosecha.

Ventajas y desventajas

En los últimos años, los recubrimientos y películas comestibles han tomado gran importancia en la industria de alimentos, debido a que esta biotecnología se ha creado en su mayoría de compuestos naturales biodegradables y comestibles, logrando satisfacer las necesidades de los productores y consumidores, además al ser un “empaque” comestible y biodegradable resulta ser inofensivo contra el medio ambiente. Entre los diversos beneficios que esta biotecnología ofrece al sector alimentario, específicamente en la conservación de alimentos y frutos frescos; ha logrado prolongar el almacenamiento y vida útil de los mismos, reduciendo las pérdidas de peso, disminuyendo la respiración, tasas de reacción oxidativa y trastornos o daños fisiológicos y por manejo.

Materiales de elaboración

En la actualidad se han implementado componentes extras para la formulación de una PC entre ellos, diversos polisacáridos como: carboximetilcelulosa, pectina, caseína, goma tragacanto, goma guar y gelatina o sucrosa como plastificantes (Cennadios, 2005). Las películas comestibles pueden dividirse en tres grandes grupos con base a sus componentes de elaboración, el primer grupo se denomina de componentes principales de los cuales derivan los biopolímeros y a su vez de ellos polisacáridos, proteínas y lípidos. El segundo grupo en el que se pueden dividir es con base al solvente de elaboración: agua y etanol. Finalmente, el último grupo se relaciona con los aditivos que puedan agregarse en la matriz de la película comestible. Aquellos aditivos que pueden mejorar o modificar la funcionalidad

básica del material y aquellos que mejoran la calidad, estabilidad y seguridad de los alimentos empaquetados (Salgado *et al.*, 2015).

Se conocen como compuestos bioactivos a aquellos componentes de origen natural, los cuales presentan actividades biológicas o nutrimentales y que pueden ser adicionados a los alimentos para conferirles propiedades funcionales o nutraceuticas benéficas para la salud, pues ayudan a reducir riesgos de enfermedades crónico-degenerativas. El mayor interés por estos productos podría impactar tanto a los consumidores como a la industria, a través de contribuciones para mejorar la calidad de vida de los consumidores, agregando valor a los residuos industriales y generando más patentes en estos sectores (Jeannine Bonilla & Sobral, 2015). Con la finalidad de mejorar las condiciones de estos empaques comestibles se ha optado por añadirles compuestos naturales con propiedades antioxidantes, antimicrobianas, entre otras que, brinden un beneficio extra a la película comestible y a su vez al alimento (Rojas-Graü, Soliva-Fortuny, & Martín-Belloso, 2009). Además, el uso de compuestos bioactivos en las formulaciones de películas comestibles permite extender el tiempo de vida útil de algunos productos, previniendo la deshidratación, el crecimiento microbiano, la rancidez oxidativa, el oscurecimiento o manchas de superficie y la difusión de aceites.

Es importante mencionar que la aplicación, uso y comestibilidad de estas películas, se debe a que todos sus componentes son grado alimenticio únicamente, utilizando como solventes únicamente el alcohol y agua (Rojas-Graü *et al.*, 2009). Por lo tanto, la incorporación de componentes activos naturales en sistemas de empaque comestible podría modificar la funcionalidad del alimento y características sensoriales, por ello, la implementación de compuestos que provengan directamente de plantas es la idea más factible, dependiendo de las propiedades bioactivas de la planta, la disponibilidad de ella y los costos de tratamiento para obtener los extractos (Silva-Weiss *et al.*, 2013).

2.9 Justificación

Debido a que en la actualidad los consumidores demandan productos frescos inocuos, de calidad, con alto valor nutrimental y nutraceutico que promuevan la salud y no representen riesgos a la salud, se siguen buscando estrategias que permitan cumplir con tales exigencias. Las películas comestibles se han reconocido como un método de conservación de alimentos, que, además de crear una barrera física que evita la pérdida de humedad y retarda la

senescencia en frutas climatéricas y no climatéricas, ayuda a conservar la apariencia, disminuye la transpiración, la pérdida de aromas y mejora la textura del fruto. Además, la adición de sustancias bioactivas (ej.: extractos antociánicos) permite agregar propiedades benéficas a los productos con efecto directo sobre la salud del consumidor, ya que pueden conferir actividad antioxidante, antiinflamatoria, antihipertensiva y antimicrobiana, entre otras. La manipulación que conlleva todo el proceso y manejo de la cosecha y postcosecha de frutos de fresa, hace que el riesgo de contaminación sea muy frecuente; debido a su naturaleza blanda y a que carecen de cáscara, pueden sufrir daños físicos, haciendo más factible que entren en contacto con agentes microbiológicos que afecten su calidad e inocuidad, además de ser más susceptibles a la contaminación por malas prácticas durante su producción y manejo. Por esta razón, la elaboración de una película comestible adicionada con antocianinas de fresa con actividad antibacteriana contra enteropatógenos de humanos, se propone como una estrategia que promete darle una propiedad protectora contra microorganismos contaminantes que ocasionen enfermedades gastrointestinales, ofreciendo así un producto inocuo y funcional, además de preservarlo por más tiempo.

2.10. Hipótesis

Las películas comestibles adicionadas con extractos antociánicos de fresa inhiben el crecimiento *in vitro* de bacterias enteropatógenas de humano.

2.11. Objetivos

Evaluar películas comestibles a base de cera de candelilla adicionadas con extractos antociánicos de fresa para el control de bacterias enteropatógenas *in vitro*.

Objetivos específicos

- Evaluar la actividad antibacteriana de películas comestibles adicionadas con extractos antociánicos de tres variedades de fresa (Festival, Frontera y Albion) contra *Shigella flexneri*, *Salmonella choleraesuis* y *Escherichia coli*.
- Caracterizar las películas comestibles adicionadas con extractos antociánicos de fresa de las variedades Festival, Frontera y Albion.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material biológico

Se utilizaron frutos frescos de fresa (*Fragaria x ananassa*) de las variedades Albión, Frontera y Festival, suministrados por un proveedor de la región de Zamora, Michoacán, México. Los frutos fueron seleccionados de manera uniforme en estado de maduración 5 por su color rojo intenso, tamaño y textura de acuerdo con la norma mexicana NMX-FF-062-2002, excluyendo aquellos con defectos y daños mecánicos o microbiológicos.

Se utilizaron tres cepas enteropatógenas certificadas: *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Shigella flexneri* ATCC 12022 y *Escherichia coli* ATCC 12792. Las cepas se mantuvieron en criopreservación con glicerol a una temperatura de -20°C hasta su posterior uso.

3.2. Extracción de antocianinas de fresa

La extracción de compuestos antociánicos de fresa se realizó bajo la técnica descrita por (Abdel-Aal & Hucl, 1999). con modificaciones. Los frutos frescos de fresa se lavaron con agua destilada, se cortaron en trozos, se congelaron y se sometieron a liofilización para su posterior análisis. Se maceraron 10 g de muestra seca con ayuda de mortero y pistilo, adicionando 25 ml de etanol acidificado (etanol y HCl 1N; 85:15 v/v). Posteriormente, los extractos se agitaron vigorosamente en Vórtex y se ajustó el pH a 1 con ácido clorhídrico.

Después, los extractos se agitaron (agitador orbital LSE®) a 250 rpm durante 16 h, a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, los extractos se centrifugaron a 6,000 rpm por 15 min y se recuperó el sobrenadante, mismo que fue aforado a 25 mL con etanol acidificado. Una vez realizado lo anterior, se leyó su absorbancia a 535 nm (espectrofotómetro UV/VIS Perkin Elmer, Massachusetts, EUA, modelo Lambda 2) utilizando como blanco etanol acidificado. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su utilización. Para la cuantificación de antocianinas totales se utilizó el pigmento estándar cianidina 3-glucósido; la medición se realizó por triplicado. El cálculo de antocianinas totales se realizó aplicando la siguiente ecuación:

Ecuación 1. cálculo de antocianinas totales

$$C = (A/E) \times (\text{vol}/1,000) \times MW \times (1/\text{peso de la muestra}) \times 10^6$$

Dónde:

C = concentración total de antocianinas (mg/100 g peso seco);

A= absorbancia a 535 nm;

E= absorbancia molar del cianidina 3-glucósido = 25,965 cm⁻¹ M⁻¹

Vol= volumen total del extracto de antocianinas

MW= peso molecular del cianidina 3-glucósido = 449.

La concentración de antocianinas fue expresada en mg de cianidina-3-glucósido, equivalentes a 100 g de peso seco (modificado de Abdel-Aal y Hucl, 1999).

3.3. Elaboración de películas comestibles

El procedimiento se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Oregel- Zamudio (2017). Se prepararon 200 ml de emulsión utilizando como componentes cera de candelilla (Alsak, CDMX, México), glicerol (Meyer, CDMX, México) y goma guar (SYR, CDMX, México).

En un vaso de precipitado se calentaron 200 ml de agua destilada, se llevó a una temperatura de 80 °C, se agregaron 1.6 g de goma guar, y se homogeneizó (Homogeneizador DLAB®, Mod. D160) durante 6 min. Posteriormente, se adicionaron 0.8 g de cera de candelilla, se homogeneizó a 20,500 rpm durante 10 min, se agregaron 0.6 ml de glicerol para llevar nuevamente al homogeneizador y se dejó enfriar con ayuda de un ventilador hasta llegar a 25 °C. La emulsión se usó de manera inmediata en la evaluación de la CMI.

3.4. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria

La CMI de las películas comestibles adicionadas con extracto de antocianinas de fresa se evaluó mediante el método de macrodilución con algunas modificaciones (Wiegand, Hilpert, & Hancock, 2008). Las cepas evaluadas fueron inoculadas en caldo Mueller-Hinton (MH), y se mantuvieron en incubación a 37 °C con agitación constante (150 rpm) por 24 h., Se colocaron 200 µl de inóculo bacteriano ajustado a 1.5x10⁸ UFC/ml en microtubos de 2 ml, además de 250 µl de caldo MH, respectivamente. Los extractos evaluados se diluyeron en serie (usando como diluyente H₂O destilada estéril) partiendo de una concentración de 300 µg equivalentes de cianidina 3-glucósido/ 100 g peso seco por mililitro, para obtener 7 diluciones (300, 250, 200, 150, 100, 50 y 25 µg/ml) (Tabla 1) y se añadieron 500 µl a cada microtubo, respectivamente. Finalmente, se agregaron 500 µl de la emulsión de película

comestible. Los microtubos se agitaron vigorosamente en vórtex, y se incubaron a 37°C por 18 h con agitación constante (150 rpm). Transcurrido este tiempo, se agregaron 50 µl de sal de tetrazolio (bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio) (Sigma-Aldrich®, USA) como indicador de crecimiento y luego se incubaron durante 2 h. El cambio de color a azul-púrpura indicó crecimiento bacteriano. La concentración más baja de los pocillos sin coloración se consideró la Concentración Mínima Inhibitoria. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado de manera independiente. Se realizó un diseño experimental con tres tratamientos: T1: películas con extractos de antocianinas de fresa variedad Festival; T2: películas con extractos de antocianinas de fresa variedad Albion; T3: películas con extractos de antocianinas de fresa variedad Frontera. Dichos tratamientos se confrontaron con las cepas enteropatógenas *S. choleraesuis*, *S. flexneri* y *E. coli*. Se incluyó un control de esterilidad con película comestible y caldo Mueller-Hinton (C1), un control con película comestible y extracto de antocianinas de fresa correspondiente a cada variedad evaluada (C2), un control con película comestible + caldo MH + extracto de antocianinas de fresa correspondiente a cada variedad evaluada (C3), y, por último, un control con película sin ningún componente adicional (C4).

Tabla 2. Diluciones de extractos antociánicos de tres variedades de fresa utilizadas para determinar la CMI.

Diluciones*	Festival	Albion	Frontera
	ml extracto/ml agua	ml extracto/ml agua	ml extracto/ml agua
300	0.86 / 14.1	2.7 / 12.3	2.02 / 12.9
250	0.72 / 14.2	2.3 / 12.7	1.75 / 13.2
200	0.57 / 14.4	1.9 / 13.1	1.45 / 13.5
150	0.43 / 14.5	1.5 / 13.5	1.150 / 18.0
100	0.28 / 14.7	1.16 / 13.8	0.870 / 14.3
50	0.14 / 14.8	0.77 / 14.2	0.580 / 14.4
25	0.07 / 14.9	0.38 / 14.6	0.290 / 14.7

* µg de cianidina 3-glucósido, equivalentes a 100 g de peso seco por mililitro.

3.5. Películas comestibles adicionadas con extracto de antocianinas de fresa

De acuerdo a los resultados obtenidos en la CMI, se elaboraron las películas comestibles adicionadas con extractos antociánicos de las tres variedades de fresa. Los componentes de las formulaciones de las películas comestibles (goma guar, cera de candelilla y glicerol) fueron incluidos en las mismas cantidades que en la metodología descrita anteriormente

modificado de Oregel-Zamudio, Angoa-Pérez, Oyoque-Salcedo, Aguilar-González, and Mena-Violante (2017), además del extracto de antocianinas de fresa como único componente variable.

Se evaluaron tres concentraciones de cada variedad de extracto de antocianinas de fresa, tomando en cuenta la CMI que mostró cada uno de ellos sobre las cepas evaluadas, para obtener un total de 9 formulaciones (Festival: 100, 150 y 250 μg de cianidina 3-glucósido equivalentes a 100 g de peso seco, correspondientes a 3.8, 5.7 y 9.6 ml de extracto total, respectivamente; Frontera: 100, 100 y 200 μg , correspondientes a 7.7, 15.4 y 7.7 ml de extracto total; Albion: 250, 200 y 250 mg, correspondientes a 25.5, 20.6 y 25.5 ml de extracto total, respectivamente).

Para la preformación de las películas, se pesaron 40 ml de emulsión en cajas Petri y se llevaron a solidificación durante 24 h con ayuda de un ventilador. Una vez preformadas, se retiraron de las cajas Petri para almacenarse en bolsas de sello hermético a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) hasta su posterior caracterización. Cada formulación se llevó a cabo por cuadruplicado, para obtener un total de 12 películas preformadas por tratamiento.

3.6. Caracterización físico-química de películas comestibles adicionadas con extractos antociánicos

Para la caracterización físico-química de las películas comestibles adicionadas con extracto de antocianinas de fresa se evaluaron los siguientes parámetros en cada una de las nueve formulaciones preformadas: color, grosor, densidad, permeabilidad al vapor de agua, humedad y solubilidad (Sánchez-Aldana *et al.*, 2014; Oregel-Zamudio *et al.*, 2016).

Color

El color de las películas se midió con la técnica utilizada por Sánchez Aldana *et al.*, (2014) con un colorímetro (Minolta, CR-300, Japón) por lado brillante y lado opaco en cinco puntos aleatorios, utilizando como blanco una placa de calibración. Se consideró como lado brillante al lado en contacto con la superficie de la placa y lado opaco al lado expuesto hacia el ambiente durante el secado. Se obtuvieron los promedios de las cinco mediciones de L^* (placa blanca de calibración) a^* y b^* , y se calculó la diferencia total de color (ΔE) con la siguiente ecuación:

Ecuación 2. diferencia total de color

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L^* \text{ referencia})^2 + (a^* - a^* \text{ referencia})^2 + (b^* - b^* \text{ referencia})^2}$$

Donde:

ΔE = Diferencia total de color

L^* = luminosidad

a^* = coordenadas rojo/ verde

b^* = coordenadas amarillo / azul

Grosor

Con ayuda de un micrómetro digital (Surtek, vernier 122230, CDMX., México) se midió el grosor en ocho puntos aleatorios de las películas preformadas y se promediaron los valores obtenidos. El procedimiento se realizó con tres películas por tratamiento.

Densidad

Se recortaron cuatro cuadros de 2 cm² por película preformada, se calculó la masa y el volumen de cada recuadro con una balanza analítica (HIGHLAND ADAM HCB 6024, CDMX., México), para posteriormente obtener la densidad con la siguiente fórmula:

Ecuación 3. densidad

$$\rho = \frac{m}{v}$$

Donde:

ρ = densidad de la película preformada (g/cm³)

m = masa (g)

v = volumen (cm³)

Permeabilidad al vapor de agua

Para determinar la permeabilidad al vapor de agua se siguió la metodología descrita por Sánchez Aldana *et al.*, (2016) con modificaciones. Una pieza de película comestible

preformada se colocó sobre una muestra de 5 g de NaCl₂ dentro de un vaso de precipitado y se selló con una cinta plástica elástica. Se registró en una balanza analítica el peso del vaso de precipitado con la película comestible y el NaCl₂, y se introdujo a un desecador con agua destilada en el fondo. El peso se registró cinco veces cada hora. El mismo procedimiento se realizó con cada una de las nueve formulaciones de películas comestibles por triplicado.

Para determinar la velocidad de transmisión de vapor de agua (VTVA) se utilizó la siguiente ecuación:

Ecuación 4. velocidad de transmisión de vapor de agua

$$VTVA = \text{Pendiente} / A \text{ transfer (g/h} \times \text{m}^2)$$

Donde:

VTVA= velocidad de transferencia de vapor de agua (g·s⁻¹)

Pendiente= obtenida de la recta (tiempo vs ganancia de peso)

A transfer= área de transferencia de vapor de agua (m²)

Para determinar la tasa de permeabilidad de vapor de agua se utilizó la siguiente ecuación:

Ecuación 5. permeabilidad de vapor de agua

$$TPVA = (VTVA \cdot X_{\text{film}}) / \Delta P \text{ (g/h} \cdot \text{m} \cdot \text{Pa)}$$

Humedad

Para la determinación de humedad se utilizaron tres piezas de películas comestibles por tratamiento y se determinó su humedad relativa en una balanza de humedad (AND MX-50) a temperatura de 105°C.

Solubilidad

Se utilizó la metodología descrita por Oregel Zamudio *et al.* (2016) con modificaciones. Se colocó un recuadro (2 cm²) de película comestible en un matraz Erlenmeyer de 150 ml con 80 ml de agua destilada. Se agitaron registrando los tiempos de inicio y terminación de la solubilización. El experimento se realizó 4 veces por tratamiento.

3.7. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la cuantificación de antocianinas y concentraciones mínimas inhibitorias fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANDEVA) y una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para la separación de medias con el software estadístico SAS® para Windows versión 9.0 (Cary, NC, USA). Los resultados de la caracterización físico-química de las películas comestibles se analizaron con el software estadístico Design-Expert® (versión 11) para determinar la correlación de las películas comestibles respecto a la CMI de extracto antociánico de cada variedad adicionado en las distintas formulaciones. Se estableció un experimento factorial (2 factores), y se realizó un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey y una diferencia de $p \leq 0.05$ se consideró significativa, mediante SAS®.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Cuantificación de antocianinas en extractos de fresa de diferentes variedades

Se obtuvieron 150 ml de extracto de antocianinas de fresa de cada una de las diferentes variedades evaluadas. Se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de cianidina 3-glucósido en mg/100 g de peso seco de los extractos de fresa de variedad Festival, Frontera y Albion (Tabla 2). Como puede observarse, la mayor concentración de antocianinas se obtuvo en las fresas de la variedad Festival, que superó por más del 50% a la variedad Frontera y por último la variedad Albion la cual fue menor por más del 70%.

Tabla 3. Concentración de antocianinas de los extractos de frutos de fresa de diferentes variedades.

Variedad de fresa utilizada	Concentración*
Festival	34.84 ± 0.7 a
Frontera	17.33 ± 0.16 b
Albion	7.53 ± 0.8 c

Se muestra el promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=3$). * mg de cianidina 3-glucósido equivalentes a 100 g de peso seco.

Las concentraciones de antocianinas totales obtenidas superaron a los reportados por Buendia et al. (2009), quienes analizaron compuestos fenólicos y flavonoides totales, incluyendo antocianinas (mg de cianidina 3-glucósido/ 100 g PF) de 15 variedades de frutos de fresa, incluyendo Albion y Festival. Los autores destacaron las diferencias en la concentración de antocianinas entre variedades, alcanzando valores hasta 15 veces menores a los reportados en este trabajo. De la misma manera, Fernández-Lara et al. (2015), donde se evaluó la concentración de cianidina 3-glucósido presente en 4 diferentes variedades de fresa (variedades Nikte, Zamorana, Jacona y Pakal). Los autores reportan valores con diferencias significativas entre variedades, desde 16.33 hasta 27.37 mg/100g de cianidina 3-glucósido. Asimismo, las concentraciones reportadas en la presente investigación, fueron significativamente superiores las obtenidas por Tonutare, Moor, and Szajdak (2014), con valores de 10-20 veces menores encontrados en 12 genotipos distintos de frutos de fresa (var. Chamly, Senga Sengana, Darselect, entre otras) respecto a las variedades evaluada en este trabajo.

La discrepancia en la concentración de fitoquímicos entre diferentes variedades de frutos evaluados, no es inusual. En este caso en particular, el contenido de antocianinas de los frutos de fresa pudo estar influenciado principalmente por las diferencias genéticas entre cultivares, condiciones de cultivo y cosecha, o bien, el método de extracción elegido; en conjunto, estos factores afectan directamente la producción y acumulación de estos pigmentos en los frutos. Por ejemplo, Panico et al. (2009) evaluaron el porcentaje de compuestos fitoquímicos y actividad antioxidante de dos genotipos de fresa (*Fragaria x ananassa*) una de la llamada variedad “Tudla” y otra variedad “Maletto” respecto al suelo en el que se cultivaron, los autores determinaron el contenido total de compuestos fenólicos y antocianinas mediante un método espectrofotométrico. En cuanto al contenido total de compuestos antociánicos en las dos variedades encontraron que la variedad Maletto mostró mayor contenido de estos compuestos, asociando esto al tipo de suelo (volcánico) en el que esta variedad había sido sembrada.

El alto contenido de antocianinas presente en los frutos de fresa puede verse influenciada por factores ambientales como temperatura, intensidad de luz solar y condiciones de suelo, sin embargo, el genotipo juega un papel importante para el contenido de estos compuestos en frutos y al mismo tiempo para mejorar la capacidad antioxidante y otras propiedades que se les han atribuido a estos compuestos Panico et al. (2009). También el proceso de extracción de los compuestos bioactivos influye en la concentración de estos, Karaaslan and Yaman (2017). indicaron que existen diferencias entre el contenido de antocianinas de extractos totales de diferentes variedades de fresa, debido al solvente utilizado para la extracción, ya que estos compuestos presentan en su estructura grupos polares que se extraen con alcoholes como el metanol el cual es uno de los alcoholes de uso más común para la extracción de estos compuestos, pero también pueden ser acetona, etanol y acetonitrilo utilizado. Los resultados obtenidos indicaron que la variedad Festival es de mayor utilidad para la elaboración de las películas comestibles bioactivas, debido a su alta concentración de antocianinas respecto a la Frontera y a la Albion.

4.2 Concentraciones Mínimas Inhibitorias

Las CMI de las películas comestibles adicionadas con extractos antociánicos de tres variedades de fresa contra las cepas enteropatógenas *Salmonella choleraesuis*, *Shigella flexneri* y *Escherichia coli*) se presentan en la Tabla 2. Los resultados indicaron que el efecto

antimicrobiano de los extractos de fresa contra las distintas bacterias dependió de la variedad del cultivo. Las PC adicionadas con extractos de las variedades Festival y Frontera inhibieron las cepas *S. choleraesuis* y *S. flexneri* a una concentración de antocianinas totales significativamente de casi el 50% menor que la PC adicionada con extracto de la variedad Albion. Cabe destacar que, la CMI de las PC adicionadas con extracto de fresas var. Festival contra *E. coli* fue significativamente menor respecto a las PC elaboradas con extractos antocianicos de las variedades Frontera y Albion. Las PC adicionadas con extracto de la variedad Albion tuvieron el mismo efecto inhibitorio contra las tres bacterias enteropatógenas evaluadas. De acuerdo con los resultados, las PC adicionadas con antocianinas de fresa variedad Festival poseen el mayor poder inhibitorio contra *Salmonella choleraesuis*, *Shigella flexneri* y *Escherichia coli*. En la actualidad, se ha intensificado el interés por compuestos de origen natural que presenten propiedades bioactivas, como ejemplo de ello las frutillas como las fresas constituyen una excelente fuente de compuestos fenólicos y flavonoides específicamente antocianinas. Estos compuestos han mostrado tener propiedades antioxidantes, anticancerígenos, antiinflamatorias y antibacterianas.

Tabla 4. Concentraciones Mínimas Inhibitorias de las películas comestibles adicionadas con extracto de antocianinas de frutos de fresa de diferentes variedades.

	Concentración Mínima Inhibitoria (µg/ml)		
	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>Escherichia coli</i> ATCC 12792
Festival	200 ± 0.9 a	200 ± 0.6 b	100 ± 0.6 a
Frontera	200 ± 0.6 a	150 ± 0.9 a	250 ± 0.3 b
Albion	250 ± 1.2 b	250 ± 0.6 b	250 ± 0.6 b

Se muestra el promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre CMI de variedades de fresa según ANDEVA de una vía con prueba de Tukey ($p \leq 0.05$, $n=3$).

Cárdenas-Valdovinos et al. (2018) evaluaron el efecto antibacteriano de extractos de fresa de variedades Festival y Zamorana contra bacterias enteropatógenas observando que los extractos de la variedad Festival lograron inhibir significativamente *Escherichia coli* y los extractos de la variedad Zamorana lograron inhibir a *Shigella flexneri*. Estos resultados coinciden con lo descrito por Vagiri et al. (2013) quien aseguró que el potencial

antibacteriano en relación con la concentración de compuestos fenólicos se ve afectado por el genotipo del fruto.

Adicionalmente, los resultados concuerdan con lo encontrado por Sun, Zhang, Zhu, Lou, and He (2018), quienes evaluaron el efecto antimicrobiano de antocianinas de moras silvestres (*Vaccinium uliginosum*) sobre diversos microorganismos enteropatógenos, incluida *Salmonella enteritidis*. Los autores encontraron para esta cepa una CMI de 270 µg/ml, y una concentración mínima bactericida de 530 µg/ml; atribuyendo este efecto inhibitorio y bactericida a la acción de las antocianinas, principalmente cianidina 3-glucósido, en conjunto con otros compuestos fenólicos y flavonoides presentes en el extracto evaluado. Los autores propusieron como mecanismo de acción el deterioro de la membrana citoplásmica por permeabilización, causando el flujo de iones y moléculas esenciales como ácidos nucleicos y proteínas fuera de la célula, y finalmente matando a la bacteria. Adicionalmente, las antocianinas pueden entrar a través de la membrana bacteriana e inactivar enzimas como la ATPasa, evitando el correcto metabolismo, llevando a la bacteria a la muerte.

4.3. Caracterización físico-química de películas comestibles adicionadas con extractos antociánicos

A partir del diseño experimental multinivel con tres niveles (variedades de extractos antociánicos) y tres variables (cepas bacterianas) se obtuvieron nueve formulaciones de películas comestibles las cuales variaron en cuanto a concentración de extractos antociánicos de las distintas variedades. Las nueve formulaciones de películas comestibles se evaluaron en función del color, permeabilidad al vapor de agua, humedad, densidad y solubilidad con la finalidad de establecer las mejores condiciones de la película comestible.

El color de la película a base de extractos antociánicos de fresa determinado tanto por el lado opaco como por el lado brillante se muestra en la siguiente tabla. Se observó que la adición de extractos antociánicos influyó en la coloración de las P C en relación a la concentración que se añadió, sin interferencia alguna de los demás componentes de la formulación.

Tabla 5. Diferencia total de color lado brillante (LB) de películas comestibles adicionadas con extracto de antocianinas de fresa de 3 variedades diferentes a diferentes concentraciones

Extracto de fresa variedad			
Formulación PC	Festival	Albion	Frontera
C1	21.8 ± 6.4 f	35.9 ± 7.7 bc	32.1 ± 5.6 bc
C2	48.5 ± 5.0 de	59.3 ± 5.0 ab	62.9 ± 2.3 a
C3	43.1 ± 6.4 def	66.3 ± 6.8 ab	27.2 ± 5.2 ef

Valores promedio ± desviación estándar. Evaluación de lado brillante de películas comestibles adicionadas con extractos antociánicos de fresa a temperatura ambiente (25±2°C). Letras diferentes de valores en las diferencias totales de color entre las formulaciones indican diferencias significativas basadas en un ANDEVA de una vía y prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Tabla 6. Diferencia total de color lado opaco (LO) de películas comestibles adicionadas con extracto de antocianinas de fresa de 3 variedades diferentes a diferentes concentraciones.

Extracto de fresa variedad			
Formulación PC	Festival	Albion	Frontera
C1	27.1 ± 6.8 d	34.9 ± 5.6 b	34.3 ± 5.8 bc
C2	45.1 ± 6.9 bcd	59.45 ± 4.9 a	58.8 ± 3.3 a
C3	43.4 ± 3.3 cd	67.8 ± 0.9 a	24.7 ± 4.4 d

Valores promedio ± desviación estándar. Evaluación de lado opaco de películas comestibles adicionadas con extractos antociánicos de fresa a temperatura ambiente (25±2°C). Letras diferentes de valores en las diferencias totales de color entre las formulaciones indican diferencias significativas basadas en un ANDEVA de una vía y prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

En cuanto a la determinación de grosor que se realizó en ocho puntos aleatorios de las nueve formulaciones de película comestible se encontraron diferencias significativas que se relacionan con el volumen de extractos antociánicos añadidos.

Tomando en cuenta que las nueve formulaciones de películas comestibles fueron distintas en relación de los componentes, es posible sugerir que las películas comestibles a las cuáles se les adicionó mayor cantidad de extractos antociánicos presentaron menor grosor debido a la relación establecida con los demás componentes con los cuales el extracto antociánico funcionó como solvente.

Tabla 7. Grosor (mm) de las películas comestibles adicionadas con extracto de antocianinas de fresa de 3 variedades diferentes a diferentes concentraciones.

Formulación PC	Extracto de fresa variedad		
	Festival	Albion	Frontera
C1	0.11 ± 0.01 a	0.5 ± 0.03 c	0.06 ± 0.02 c
C2	0.10 ± 0.02 ab	0.08 ± 0.02 abc	0.09 ± 0.03 ab
C3	0.11 ± 0.03 a	0.1 ± ab	0.06 ± 0.03 bc

Valores promedio ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre formulaciones de variedades de fresa según ANDEVA de una vía con prueba de Tukey ($p \leq 0.05$, $n=3$).

La formulación de película comestible elaborada con el extracto de la variedad Festival y la MIC resultante para inhibir *Salmonella choleraesuis* obtuvo el mayor grosor, 0.11 mm. Esto se puede deber a que al tener una concentración mínima menor que para las demás cepas, la cantidad de extracto necesaria es menor en cuanto a las otras formulaciones. En cuanto a la caracterización físico química del parámetro de grosor, se observa notable

Los resultados de la evaluación de la densidad de las distintas formulaciones indican que existen diferencias significativas entre aquellas formulaciones elaboradas con extractos de la variedad Frontera y Festival contra la variedad Albion, sin embargo no existe diferencia alguna entre las películas adicionadas con extractos de la variedad Festival y la variedad Frontera para inhibir *Shigella flexneri* y *Escherichia coli*, la única diferencia que se observa es de estas dos variedades para inhibir Salmonella.

Tabla 8. Densidad (g/cm^3) de las películas comestibles adicionadas con extracto de antocianinas de fresa de tres variedades a diferentes concentraciones.

Formulación PC	Extracto de fresa variedad		
	Festival	Albion	Frontera
C1	0.07 d	1.21 a	1.09 a
C2	1.71 b	1.38 c	1.79 a
C3	1.63 b	1.61 b	1.64 b

Valores promedio ± desviación estándar. Letras diferentes entre valores de grosor indican diferencias significativas basadas en una ANDEVA de una vía y prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

En cuanto al porcentaje de humedad de las distintas formulaciones se observó que las formulaciones con extractos de la variedad Festival con un porcentaje homogéneo del 18% mostraron menor porcentaje, con una diferencia de casi el 20 % entre las demás formulaciones con valores de 17 hasta 25 % de humedad.

Tabla 9. Porcentaje de humedad relativa (% HR) de las películas comestibles adicionadas con extracto de antocianinas de fresa de 3 variedades diferentes a diferentes concentraciones.

Formulación PC	Extracto de fresa variedad		
	Festival	Albion	Frontera
C1	18.56 ± 7.9 c	25.54 ± 0.9 a	12.2 ± 4.9 d
C2	18.83 ± 2.7 c	19.89 ± 2.1 c	21.64 ± 6.1 b
C3	18.98 ± 5.0 c	17.95 ± 0.9 d	17.08 ± 0.1 c

Valores promedio ± desviación estándar. Letras diferentes entre valores de humedad indican diferencias significativas basadas en una ANDEVA de una vía y prueba de Tukey ($\rho \leq 0.05$).

Los parámetros físicos y químicos evaluados en cada formulación de películas comestibles permiten acercarnos a obtener información precisa acerca del comportamiento de los componentes de las formulaciones y por otro lado el efecto y el comportamiento de estas una vez que sean aplicadas a los alimentos o que sean consumidas. Además, la evaluación de estos parámetros permite establecer una formulación ideal en relación y proporción de cada componente, dependiendo de la finalidad de la elaboración de la película comestible. Sánchez Aldana, Contreras-Esquivel, Nevárez-Moorillón, and Aguilar (2015) evaluaron parámetros similares en cuatro formulaciones de películas comestibles biodegradables a base de extractos pécticos de bagazo de limón mexicano y observaron en cuanto a humedad, color, grosor y PVA que la adición de aceite esencial de limón no afectó las propiedades no características físicas y químicas de sus películas.

Contrario a ello, en este trabajo se evaluó como primera variable en las películas comestibles el color, tanto por el lado opaco como por lado brillante, en donde se observó que en las películas comestibles con extractos antocianínicos mostraban un color rojizo a las películas, modificando por lo tanto las propiedades físicas de las mismas. Otros autores reportan el color de películas comestibles como transparente, debido a que se pretende que este no modifique las características ni apariencia del alimento recubierto. (Giampieri et al., 2012) menciona que el color y transparencia de las películas comestibles son importantes debido al

efecto visual que se ofrece a los consumidores acerca del alimento. En este sentido la diferencia de color entre el lado opaco y el lado brillante entre las distintas formulaciones de tres variedades de extractos antociánicos fue mínima, como ejemplo la diferencia de color entre el lado opaco y el lado brillante de las películas elaboradas con extractos de la variedad Festival fue del 10%. En este caso la formulación 1 de esta variedad mostró un valor de 21.8 por el lado brillante comparado con 27.1 por el lado opaco.

En cuanto a grosor en la caracterización físico química de las películas comestibles, se han encontrado reportes como el de (Oregel-Zamudio *et al.*, 2016) el cual se encuentra estrechamente relacionado con esta investigación, pues estos autores evaluaron cuatro formulaciones de PC a base de cera de candelilla, goma guar y glicerol a diferentes concentraciones obteniendo valores de grosor en un rango de 0.059 mm a 0.0073 mm lo cual coincide con los valores de grosor de las formulaciones elaboradas con extractos de la variedad Albion y Frontera en donde se observaron grosores desde 0.052 mm a 0.096 mm, con algunas variaciones. Sin embargo, en el caso de la variedad Festival las películas comestibles resultaron con mayor grosor, en un rango de 0.096 mm a 0.113 mm, lo cual podría atribuirse a que los extractos de esta variedad presentan mayor concentración de compuestos antociánicos, por lo tanto, mayor efecto de inhibición bacteriana. Por ello, para la elaboración de películas se requirió menor volumen de extractos antociánicos lo cual hace suponer que la relación solutos (goma guar, glicerol y cera) – solvente (extracto) provoca un aumento de grosor respecto al volumen de extracto que se haya añadido.

No existen hasta el momento datos exactos del grosor que debería tener una PC para considerarla adecuada, solamente se indica que para que una película comestible pueda ser utilizada sobre un alimento debe ser delgada.

Respecto a la solubilidad de las películas las nueve formulaciones presentaron gran porcentaje de solubilidad, cerca del 99%. (Denavi & Pérez-Mateos, 2009) evaluaron una película comestible a base de gelatina y aceite de girasol y observaron un porcentaje de solubilidad del 88 %, sin embargo, en medida que adicionaban aceite disminuía la solubilidad. Atribuyeron este efecto a la interacción entre la proteína y el aceite incorporado a la misma haciendo referencia de que el aceite impedía la solubilización de la gelatina. Aunque no existe evidencia de solubilidad en películas comestibles a base de cera de

candelilla y extractos antociánicos se sugiere que las formulaciones creadas con estos componentes mostraron gran capacidad de solubilización debido a la relación entre los componentes y el solvente utilizado para su elaboración, el cual contenía alto contenido de etanol. La solubilidad juega un papel importante en cuanto a la selección de una formulación ideal de película comestible pues de esta manera se puede elegir correctamente la formulación que más convenga dependiendo del tipo de alimento que se pretenda recubrir.

No existe hasta el momento algún reporte que indique un valor ideal para la densidad de películas comestibles de cera de candelilla adicionadas con extractos antociánicos de fresa, (Oregel-Zamudio *et al.*, 2016) quien fue pionero en la elaboración de películas comestibles a base de cera de candelilla como la aquí desarrollada menciona que la densidad permite obtener una película comestible estable y conservar las características sensoriales brindando un buen aspecto a los frutos cubiertos por estas además de aportar a la formulación propiedades mecánicas ideales.

6. CONCLUSIONES

Las películas comestibles a base de cera de candelilla y adicionadas con extractos antociánicos de fresa de las variedades Festival, Frontera y Albion, lograron inhibir el crecimiento *in vitro* de las cepas enteropatógenas *S. choleraesuis*, *S. flexneri* y *E. coli*.

Los parámetros físico químicos evaluados en cada formulación nos permitieron observar sus características una vez preformadas. No se seleccionó como tal una película comestible ideal en cuanto a las características físicas y químicas debido a que las propiedades entre ellas resultaron similares.

7. REFERENCIAS

- Abdel-Aal, E. S., & Hucl, P. (1999). A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal chemistry*, 76(3), 350-354.
- Abountiolas, M., & do Nascimento Nunes, M. C. (2017). Anthocyanins and in vitro antioxidant capacity of strawberries from different disease control treatments.
- Amil-Ruiz, F., Blanco-Portales, R., Munoz-Blanco, J., & Caballero, J. L. (2011). The strawberry plant defense mechanism: a molecular review. *Plant and Cell Physiology*, 52(11), 1873-1903.
- Avendaño Ruiz, B. D., Schwentesius Rindermann, R., & Lugo Morones, S. (2006). El impacto de la iniciativa de inocuidad alimentaria de Estados Unidos en las exportaciones de hortalizas frescas del noroeste de México. *Región y sociedad*, 18(36), 07-36.
- Barreto, M., Castillo-Ruiz, M., & Retamal, P. (2016). Salmonella enterica: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. *Revista chilena de infectología*, 33(5), 547-557.
- Berger, C. N., Sodha, S. V., Shaw, R. K., Griffin, P. M., Pink, D., Hand, P., & Frankel, G. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental microbiology*, 12(9), 2385-2397.
- Bhunia, A. K. (2018). *Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis*: Springer.
- Bowen-Forbes, C. S., Zhang, Y., & Nair, M. G. (2010). Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *Journal of food composition and analysis*, 23(6), 554-560.
- Buendía, B., Gil, M. a. I., Tudela, J. A., Gady, A. L., Medina, J. J., Soria, C., . . . Tomás-Barberán, F. A. (2009). HPLC-MS analysis of proanthocyanidin oligomers and other phenolics in 15 strawberry cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 3916-3926.
- C. Rodríguez Ledesma, G. G. G. y. M. G. G. E. (2016). Fresa transgénica: importancia, beneficios y avances científicos en México. *Revista Electrónica Reaxión*.
- Cárdenas-Valdovinos, J. G., Oregel-Zamudio, E., Oyoque-Salcedo, G., Angoa-Pérez, M. V., Padilla-Jiménez, S. M., Molina-Torres, J., & Hortencia, G. (2018). Antimicrobial

- activity of fruit extracts of *Fragaria x ananassa* against human enteropathogenic bacteria. *JOURNAL OF BIOENGINEERING*, 2(2), 17-25.
- Clemente, E., & Galli, D. (2011). Stability of the anthocyanins extracted from residues of the wine industry. *Food Science and Technology*, 31(3), 765-768.
- Cruz-Morfin, R., Martínez-Tenorio, Y., & López-Malo, A. (2013). Biopolímeros y su integración con polímeros convencionales como alternativa de empaque de alimentos. *Temas de Selección de Ingeniería de Alimentos*, 7(2), 42-52.
- Cuevas-Álvarez, M. E., Bautista-Salgado, N., Preciado-Sánchez, V. M., & Walle-Sánchez, S. R. (2018). Manual de Cultivo de fresa en Coalcomán, Michoacán. *INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE COALCOMÁN, MICHOACÁN*.
- Dai, J., Gupte, A., Gates, L., & Mumper, R. (2009). A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food and chemical toxicology*, 47(4), 837-847.
- Dao, T., Pankov, D., Scott, A., Korontsvit, T., Zakhaleva, V., Xu, Y., . . . Veomett, N. (2015). Therapeutic bispecific T-cell engager antibody targeting the intracellular oncoprotein WT1. *Nature biotechnology*, 33(10), 1079.
- Delbeke, S., Ceuppens, S., Hessel, C. T., Castro, I., Jacxsens, L., De Zutter, L., & Uyttendaele, M. (2015). Microbial safety and sanitary quality of strawberry primary production in Belgium: Risk factors for Salmonella and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* contamination. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81(7), 2562-2570.
- Denavi, G., & Pérez-Mateos, M. (2009). nón, P. Montero, AN Mauri, MC Gómez-Guillén. *Food Hydrocolloids*, 23, 2094-2101.
- FAO. (2018). Annual worldwide production of strawberry to 2018. 9-15.
- Fernández-Lara, R., Gordillo, B., Rodríguez-Pulido, F. J., González-Miret, M. L., del Villar-Martínez, A. A., Dávila-Ortiz, G., & Heredia, F. J. (2015). Assessment of the differences in the phenolic composition and color characteristics of new strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cultivars by HPLC–MS and Imaging Tristimulus Colorimetry. *Food Research International*, 76, 645-653.

- Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J. M., & Battino, M. (2014). Strawberry and human health: Effects beyond antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(18), 3867-3876.
- Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J. M., Quiles, J. L., Mezzetti, B., & Battino, M. (2012). The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*, 28(1), 9-19.
- Gol, N. B., Patel, P. R., & Rao, T. R. (2013). Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. *Postharvest Biology and Technology*, 85, 185-195.
- Hafidh, R. R., Abdulmir, A. S., Vern, L. S., Bakar, F. A., Abas, F., Jahanshiri, F., & Sekawi, Z. (2011). Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. *The open microbiology journal*, 5, 96.
- Hale, T. L., & Keusch, G. T. (1996). Shigella. In *Medical Microbiology. 4th edition*: University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Han, J. H. (2014). Edible films and coatings: a review. In *Innovations in food packaging* (pp. 213-255): Elsevier.
- Jeannine Bonilla, F. v. C. V., Tiara Gomes de Oliveira, Gisele Lourenc,o da Aparecida Makishi and Paulo Jose´, & Sobral, d. A. (2015). Recent patents on the application of bioactive compounds in food: a short review. *Science Direct*, 1-7.
- Jules Janick, R. E. P. (2008). The Encyclopedia of Fruit and Nuts. 954.
- Kader, A. A. (2013). Postharvest technology of horticultural crops—An Overview from farm to fork. *Ethiop. J. Appl. Sci. Technol*, 1, 1-8.
- Karaaslan, N. M., & Yaman, M. (2017). Anthocyanin profile of strawberry fruit as affected by extraction conditions. *International journal of food properties*, 20(sup3), S2313-S2322.
- Koopman, J. S. (2017). Transmisión intrafamiliar de Shigella flexneri después de un brote en una guardería de Cali. *Colombia Médica*, 10(1), 27-31.
- Liu, Y., Tikunov, Y., Schouten, R. E., Marcelis, L. F., Visser, R. G., & Bovy, A. (2018). Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in Solanaceous vegetables: a review. *Frontiers in chemistry*, 6, 52.

- Manganaris, G. A., Goulas, V., Vicente, A. R., & Terry, L. A. (2014). Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(5), 825-833.
- Mexicana, N. O. (2002). Productos alimenticios no industrializados para consumo humano. *Frutos Frescos*.
- Miramont, S. (2012). Recubrimientos elaborados a partir de biopolímeros para el soporte de sustancias con actividad antimicrobiana: carvacrol y sorbatos. *Director Lía Noemí Gerschenson.[Tesis de Maestría]. Universidad Tecnológica Nacional de Buenos Aires. Tecnología de Alimentos*.
- Nohynek, L. J., Alakomi, H.-L., Kähkönen, M. P., Heinonen, M., Helander, I. M., Oksman-Caldentey, K.-M., & Puupponen-Pimiä, R. H. (2006). Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutrition and cancer*, 54(1), 18-32.
- Oregel-Zamudio, E., Aguilar-Cristóbal, N., Oyoque-Salcedo, G., Angoa-Pérez, M. V., & Mena-Violante, H. G. (2016). CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE PELÍCULAS COMESTIBLES A BASE DE CERA DE CANDELILLA. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 17(1), 1-7.
- Oregel-Zamudio, E., Angoa-Pérez, M. V., Oyoque-Salcedo, G., Aguilar-González, C. N., & Mena-Violante, H. G. (2017). Effect of candelilla wax edible coatings combined with biocontrol bacteria on strawberry quality during the shelf-life. *Scientia horticulturae*, 214, 273-279.
- Otoni, C. G., Avena-Bustillos, R. J., Azeredo, H. M., Lorevice, M. V., Moura, M. R., Mattoso, L. H., & McHugh, T. H. (2017). Recent advances on edible films based on fruits and vegetables—a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 1151-1169.
- Panico, A., Garufi, F., Nitto, S., Di Mauro, R., Longhitano, R., Magrì, G., . . . De Guidi, G. (2009). Antioxidant activity and phenolic content of strawberry genotypes from *Fragaria x ananassa*. *Pharmaceutical Biology*, 47(3), 203-208.
- Peñarrieta, J. M., Tejada, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. (2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68-81.

- Quintero, C., Falguera, V., & Muñoz, H. (2010). Films and edible coatings: importance, and recent trends in fruit and vegetable value chain. *Revista Tumbaga*, 5, 93-118.
- Restrepo, J. I., & Aristizábal, I. D. (2010). Conservación de fresa (fragaria x ananassa duch cv. camarosa) mediante la aplicación de recubrimientos comestibles de gel mucilaginoso de penca sábila (aloe barbadensis miller) y cera de carnaúba. *Vitae*, 17(3), 252-263.
- Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. *Trends in food science & technology*, 20(10), 438-447.
- Salgado, P. R., Ortiz, C. M., Musso, Y. S., Di Giorgio, L., & Mauri, A. N. (2015). Edible films and coatings containing bioactives. *Current Opinion in Food Science*, 5, 86-92.
- Salinas-Callejas, E., Tavera-Cortes, M. E., Alvarado-Raya, H. E., & Escamilla-Garcia, P. E. (2015). The quality of the mexican strawberry. *ECORFAN Journal-Mexico*, 6-14.
- Sánchez Aldana, D., Contreras-Esquivel, J., Nevárez-Moorillón, G., & Aguilar, C. (2015). Caracterización de películas comestibles a base de extractos pécticos y aceite esencial de limón Mexicano. *CyTA-Journal of Food*, 13(1), 17-25.
- Silva-Weiss, A., Ihl, M., Sobral, P., Gómez-Guillén, M., & Bifani, V. (2013). Natural additives in bioactive edible films and coatings: functionality and applications in foods. *Food Engineering Reviews*, 5(4), 200-216.
- Soto Varela, Z., Pérez Lavalle, L., & Estrada Alvarado, D. (2016). Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia. *Revista Salud Uninorte*, 32(1), 105-122.
- Sun, H., Zhang, P., Zhu, Y., Lou, Q., & He, S. (2018). Antioxidant and prebiotic activity of five peonidin-based anthocyanins extracted from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *Scientific reports*, 8(1), 5018.
- Thompson, A. K., Prange, R. K., Bancroft, R., & Puttongsiri, T. (2018). *Controlled atmosphere storage of fruit and vegetables*: CABI.
- Tonutare, T., Moor, U., & Szajdak, L. (2014). Strawberry anthocyanin determination by pH differential spectroscopic method—how to get true results. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*, 13(3), 35-47.

- Tulipani, S., Mezzetti, B., Capocasa, F., Bompadre, S., Beekwilder, J., De Vos, C. R., . . . Battino, M. (2008). Antioxidants, phenolic compounds, and nutritional quality of different strawberry genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(3), 696-704.
- Vagiri, M., Ekholm, A., Öberg, E., Johansson, E., Andersson, S. C., & Rumpunen, K. (2013). Phenols and ascorbic acid in black currants (*Ribes nigrum* L.): Variation due to genotype, location, and year. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(39), 9298-9306.
- Vaughan, J. G. (2003). *The Oxford Book of Health Foods*. 188.
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*, *3*(2), 163.
- Yan, J., Luo, Z., Ban, Z., Lu, H., Li, D., Yang, D., . . . Li, L. (2019). The effect of the layer-by-layer (LBL) edible coating on strawberry quality and metabolites during storage. *Postharvest Biology and Technology*, *147*, 29-38.