



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**Desarrollo, Caracterización y Aplicación de  
Nanopartículas Lipídicas Sólidas para la Conservación  
de Granos y Semillas.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADO EN QUÍMICA INDUSTRIAL**

**P R E S E N T A :**

**MARA ELISA ESPINOSA DE LOS MONTEROS  
VEGA.**

**ASESOR: DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO.**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis**

**Desarrollo, Caracterización y Aplicación de Nanopartículas Lipídicas Sólidas para la Conservación de Granos y Semillas.**

Que presenta la pasante: **Mara Elisa Espinosa de los Monteros Vega**  
Con número de cuenta: **411073561** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Química Industrial**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a de de 2016.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Juan Manuel Aceves Hernández	
<b>VOCAL</b>	I.B.Q. Leticia Figueroa Villarreal	
<b>SECRETARIO</b>	Dr. David Quintanar Guerrero	
<b>1er. SUPLENTE</b>	I.A. Miriam Alvarez Velasco	
<b>2do. SUPLENTE</b>	Dra. Raquel Gómez Pliego	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

---

---

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM <Clave IT201914> <Diseño y caracterización de nuevos sistemas de liberación controlada de fármacos ensamblados por la adsorción de nanopartículas en dispersiones micrométricas>. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

---

---

Este trabajo fue un sueño, que en su momento fue algo lejano, sin embargo sin su apoyo no hubiera sido posible, a cada uno ¡GRACIAS! Por alentarme, y darme su mano incondicional para seguir por este sueño que hoy lo veo convertido en realidad.

### ***Papí:***

Gracias por siempre ser ese héroe en mi vida, gracias por siempre estar cuando se te necesita y nunca dejarme sola, eres el mejor padre que cualquier persona podría desear. Siempre buscas darnos lo mejor, pero sabes algo, siempre lo das, tu cariño y amor es incomparable. De ti he aprendido tantas cosas, como la responsabilidad en deberes y siempre hacer con gran amor lo que hemos decidido, al igual que siempre amar a la familia, porque la familia es primero. Me regalas un hermoso hogar, sé que contigo a mi lado jamás me quedaré sola en este mundo aunque así lo llegará a creer y aunque tu cara demuestre seriedad, eres el papi más amoroso, cariñoso y divertido que puede existir. Papi, me has dado lo mejor que puede dar un padre a sus hijos, y es tener amor y comprensión en su hogar, que siempre me apoyas en cada sueño que tengo y siempre decirme que yo soy la mejor, eres el mejor padre que mi hermano y yo pudimos tener. Gracias papi, por ti y tu esfuerzo es posible este sueño, por siempre irme a dar un buenas noches, por ir por mi cuando salía tarde y sobre todo aguantar mis malos humores y siempre tratar de arrancarme una sonrisa. Te amo papi, este trabajo y logro es para ti y espero que te sientas muy orgulloso de mí, porque yo estoy orgullosa del padre que tengo.

### ***Mamá:***

Eres la mejor mujer que he conocido, no pude haber caído en mejores manos, siempre estás para mí, siempre me apoyas. Siempre me alientas a ser mejor persona, y es algo que jamás podré pagar. Gracias a ti este trabajo es posible, con esa hermosa manera que has llevado a la familia, siempre manteniéndonos unidos. Te amo mami, y es por ello que siempre quiero regalarte satisfacciones y aunque a veces reñimos, mi amor por ti es infinito. Haces un hogar maravilloso, al que me encanta llegar, pues siempre estás esperándome para preguntarme cómo me fue y aunque estés cansada estas ahí conmigo. Gracias por siempre llevarme a cada escuela a la que asistí y estar al pendiente de mí, ve mami hasta donde hemos llegado y vamos por más porque este camino aquí no acaba. Jamás podré pagar todo lo que has hecho por mí, pero espero que siempre tengas esa sonrisa y alegría que tanto te caracteriza, que jamás se borre eso de ti, espero que siempre mamita linda, estés orgullosa de mí porque mi mami es la mejor y siempre estaré orgullosa de la hermosa persona que es, de sus valores y amor a su familia, siempre me tendrás ahí contigo, eres lo más bonito de este mundo. Gracias por que junto con mi papá me han dado lo más hermoso y es tanto amor. Te amo mami, este logro es con todo mi amor para ti.

### ***Betito:***

Eres mi pequeño hermano, y aunque hoy en día estés mucho más alto que yo, siempre trataré de cuidarte y protegerte. No sé cómo decirte lo mucho que te amo, llegaste a mi vida para hacerme saber que no crecía sola y aunque al inicio fue difícil aceptar que estabas tú, poco a poco comprendí que tenía que llevar el rol de hermana mayor, espero ser una buena. Tantas locuras que haces que me hacen reír y aunque siempre me estas molestando y me enoje miles de veces, jamás te dejaré solo, sin ti chaparrito, esto no estaría listo, aún recuerdo cuando empecé a escribir y me dijiste, cualquier cosa que necesites estoy aquí. Siempre estás para nosotros y buscas ayudarnos, eres el mejor regalito que la vida me pudo dar. Y como dice mi mamá podremos quedarnos solos, pero siempre nos tendremos el uno al otro, eres mi gran compañero. Para ti es este trabajo. Te amo Chaparrito.

### *A mis amigos:*

Gracias a ustedes este logro fue posible, a mis amigos Leslie, Edna, Rodrigo, Marcos, Óscar. El compartir con ustedes las aulas, el conocimiento, trabajos y más, lejos de ser equipos o compañeros de universidad, se fueron convirtiendo en algo más, no sé qué hubiera sido el paso de la carrera sin ustedes. Llenaron de risas, alegrías y mucha felicidad mi vida, sé que esta amistad no es de etapa, sino para toda la vida. Compañeros, colegas y amigos, LOS QUIERO TANTO, gracias, infinitas gracias por estar conmigo, hoy y siempre.

### *Leslie Lizeth:*

Siempre te diré que las mejores cosas vienen en empaques pequeños, eres clara muestra de ello. Llegaste a mi vida, siendo una compañera y poco a poco te convertiste en la mejor amiga que una persona puede desear, cómplice de risas, locuras, tristeza y un sin fin de alegrías y buenos momentos, eres una persona la cuál vio el crecimiento y desarrollo de este trabajo, estuvo conmigo alentándome y siempre diciéndome "Tú puedes". Eres y siempre serás mi mejor amiga, gracias por compartir conmigo momentos, por estar conmigo en mis éxitos y no dejarme caer en los fracasos. Te adoro, de aquí en adelante tendrás a una compañera en tu vida.

### *A mi asesor:*

Dr. David, sin usted este trabajo no hubiera sido posible, siempre estaré agradecida por el haberme brindado la confianza de realizar esta investigación, por guiarme de la mejor manera durante la experimentación y redacción. Siempre brindándome el conocimiento y experiencia. De usted he aprendido tanto, infinitas gracias.

Y por último y no por ello menos importante, a mi amada universidad, la gloriosa UNAM, porque en tus aulas obtuve el placer de aprender esta amada ciencia llamada química, eres cuna de grandes científicos, GRACIAS, por abrirme las puertas al conocimiento y al saber, por ello hoy y siempre, **"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPIRITU"**

## ÍNDICE.

ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
GLOSARIO	vii
1. INTRODUCCIÓN.	1
2. ANTECEDENTES.	4
2.1. LA NANOTECNOLOGÍA.	4
2.2. EL CONCEPTO DE NANOPARTÍCULAS.	5
2.3. LAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS (NLS).	6
2.4. MÉTODOS DE PREPARACIÓN.	9
2.4.1. Homogenización de alta presión.	10
2.4.2. Microemulsión.	11
2.4.3. Emulsificación-Evaporación.	12
2.4.4. Emulsificación mediante membrana de contacto.	13
2.4.5. Emulsificación- Difusión.	14
2.5. ROTOR- ESTATOR.	15
2.5.1. Principio del Rotor- Estator.	15
2.6. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS LIPIDICAS SOLIDAS.	16
2.6.1. La distribución del tamaño de partícula.	16
2.6.2. Potencial Zeta.	17
2.7. LA NANOTECNOLOGÍA EN ALIMENTOS.	19
2.8. LOS RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES.	21
2.8.1. Uso de las ceras en recubrimientos comestibles.	22

2.9. SEMILLAS Y GRANOS.	24
2.9.1. Calidad en granos y semillas.	27
2.9.2. Proceso respiratorio de granos y semillas.	29
2.9.2.1. Factores que afectan la respiración.	29
2.9.3. Factores que influyen en el deterioro de granos y semillas.	31
2.9.4. Microorganismos que influyen en la calidad de granos y semillas.	32
3. JUSTIFICACIÓN.	35
4. HIPÓTESIS.	36
5. OBJETIVOS.	37
6. METODOLOGÍA.	38
6.1. MATERIALES.	38
6.2. DIAGRAMA DE FLUJO.	39
6.3. PREPARACIÓN DE LAS NLS.	40
6.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS NLS.	42
6.4.1. Tamaño de partícula y PDI.	42
6.4.2. Potencial Zeta.	42
6.4.3. Densidad de las NLS.	42
6.4.4 Viscosidad de las NLS.	43
6.5. APLICACIÓN DE LAS NLS A GRANOS Y SEMILLAS.	43
6.6. RETO MICROBIANO PARA GRANOS Y SEMILLAS.	45

7. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS.	47
7.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS NLS.	47
7.1.1. Medición del tamaño de partícula.	47
7.1.2. Índice de polidispersión.	49
7.1.3. Potencial Zeta.	50
7.2. RETO MICROBIANO PARA GRANOS Y SEMILLAS.	50
8. CONCLUSIONES.	61
9. PERSPECTIVAS.	62
10. REFERENCIAS.	63

## ÍNDICE DE TABLAS.

TABLA 1.	Principales componentes de las NLS (Palma <i>et al</i> , 2007).	8
TABLA 2.	Reactivos y equipos utilizados en la metodología experimental.	38
TABLA 3.	Material utilizado en la metodología experimental.	38
TABLA 4.	Formulación para NLS.	41
TABLA 5.	Diseño experimental de inoculación de hongos para semillas y granos.	45
TABLA 6.	Resultados de caracterización fisicoquímica para NLS.	47
TABLA 7.	Conteo de esporas <i>Aspergillus flavus</i> .	51
TABLA 8.	Conteo de esporas <i>Aspergillus niger</i> .	51
TABLA 9.	Grano no cubierto inoculado por <i>Aspergillus flavus</i> .	53
TABLA 10.	Grano cubierto inoculado por <i>Aspergillus flavus</i> .	53
TABLA 11.	Semilla no cubierta inoculada por <i>Aspergillus flavus</i> .	54
TABLA 12.	Semilla cubierta inoculada por <i>Aspergillus flavus</i> .	54
TABLA 13.	Grano no cubierto inoculado por <i>Aspergillus niger</i> .	56
TABLA 14.	Grano cubierto inoculado por <i>Aspergillus niger</i> .	57
TABLA 15.	Semilla no cubierta inoculada por <i>Aspergillus niger</i> .	57
TABLA 16.	Semilla cubierta inoculada por <i>Aspergillus niger</i> .	57

## ÍNDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1. Representación de la estructura de una NLS (Villafuerte et al, 2008).	6
FIGURA 2. Métodos de homogenización a alta presión (Pardeike et al, 2009).	11
FIGURA 3. Representación esquemática de la membrana de contacto para la preparación de NLS. (Garzón et al. 2008).	13
FIGURA 4. Principio rotor-estator (Manual IKA ULTRA-TURRAX®).	16
FIGURA 5. Diagrama de flujo.	39
FIGURA 6. Esquema de objetivos.	41
FIGURA 7. Equipo de recubrimiento utilizado para granos y semillas.	44
FIGURA 8. Bombo para recubrimiento.	44
FIGURA 9. Cuadrícula de cámara de Neubauer.	45
FIGURA 10. Cuadro metodológico.	46
FIGURA 11. Medición de tamaño de partícula.	48
FIGURA 12. Conteo de esporas.	52
FIGURA 13. Comparación de granos cubiertos y no cubiertos inoculados por <i>Aspergillus flavus</i> .	55
FIGURA 14. Comparación de semillas cubiertas y no cubiertas inoculados por <i>Aspergillus flavus</i> .	55
FIGURA 15a. Semilla con recubrimiento inoculada.	56
FIGURA 15b. Semilla sin recubrimiento inoculada con <i>Aspergillus flavus</i> .	56
FIGURA 16. Comparación de granos cubiertos y no cubiertos inoculados por <i>Aspergillus niger</i> .	58
FIGURA 17. Comparación de semillas cubiertas y no cubiertas inoculados por <i>Aspergillus niger</i> .	58

FIGURA 18 a. Grano cubierto inoculado con <i>Aspergillus niger</i> .	59
FIGURA 18 b. Grano no cubierto inoculado por <i>Aspergillus niger</i> .	59

## GLOSARIO

nm	Nanómetro.
NLS	Nanopartícula lipídica sólida.
GRAS	Generalmente reconocidos como seguros.
PDI	Índice de polidispersión.
PLS	Acrónimo en inglés, técnica de dispersión de luz.
PEG	Polietilenglicol.
<b>P</b>	Densidad.
<b>cP</b>	Centipoise.
ppm	Partes por millón.
Rpm	Revolución por minuto.
ZrO <sub>2</sub>	Óxido de Circonio.
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Óxido de Aluminio.
TiO <sub>2</sub>	Óxido de Titanio.
C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> KO <sub>2</sub>	Sorbato de potasio .
PVA	Alcohol Polivinílico.
PDA	Agar dextrosa y papa.

## 1. INTRODUCCIÓN

El creciente interés por el desarrollo de películas y recubrimientos para incrementar la conservación de alimentos se debe fundamentalmente a las exigencias, cada vez mayores, de reducir el impacto de contaminación ambiental que se ha producido con el incremento de desechos generados por el uso de envases y plásticos de origen sintético o no biodegradable para el empaquetado y preservación de alimentos (Bósquez, 2003).

Una película comestible se define como aquella capa delgada de material formada sobre un alimento como recubrimiento, sobre o entre los componentes de los alimentos. Su propósito es el de inhibir y/o reducir la migración de humedad, oxígeno, dióxido de carbono, aromas, lípidos, pigmentos, entre otros; servir como vehículo para aditivos alimentarios (antioxidantes, antimicrobianos, saborizantes, colorantes); y/o mejorar la integridad mecánica o características de manejo del alimento en cuestión (Krotcha et al, 1997).

Actualmente las películas y cubiertas comestibles encuentran una amplia variedad de aplicaciones, entre las que encontramos el uso de cubiertas de cera para frutos. Los retos técnicos involucrados en producir alimentos y conservarlos con calidad estable, indican que el uso de este tipo de recubrimientos y películas será mayor en el futuro (Bósquez, 2003).

Sin embargo, a pesar de la información técnica disponible para la elaboración de películas comestibles es amplia, no es universal para todos los productos, lo que implica un reto para el desarrollo de recubrimientos y películas específicas para cada alimento (Bósquez, 2008).

En el área de la conservación de alimentos la nanotecnología es una nueva y novedosa área que trata de acercarse, medir, ver y manipular materiales a escalas individuales y muy pequeñas que va de 1 a 1000 nm (Bhushan, 2003).

Como referencia un nanómetro es la millonésima parte de un milímetro (Rao et al, 2004).

El uso de la nanotecnología en alimentos no comenzó a tomar importancia sino hasta la década pasada cuando se comenzaron a desarrollar gran parte de las aplicaciones que ahora impactan el envasado de alimentos, dadas las potencialidades que ofrece las aplicaciones se han ampliado a otros campos de la industria de los alimentos en particular a sistemas de liberación nanoparticulados (micelas, liposomas, nanoemulsiones, nanopartículas, etc.), es importante resaltar que en la industria de alimentos,

la aplicación de la nanotecnología es aún limitada, teniendo impacto en la producción de envases activos e inteligentes por ejemplo; la utilización de sistemas antimicrobianos, potenciadores de sabor, etc. recientemente se han identificado cuatro áreas del proceso productivo de alimentos donde se puede emplear la nanotecnología: 1) desarrollo de nuevos materiales funcionales. 2) procesamiento a micro- y nano-escala, 3) desarrollo de nuevos productos y 4) métodos de instrumentación (Chen *et al.* 2006; Chau *et al.* 2007).

Dentro de los sistemas coloidales con potencial función como acarreadores de sustancias de interés alimenticio (antioxidantes, antimicrobianos, humectantes, saborizantes, etc.) se encuentran las nanoemulsiones, nanocápsulas y nanopartículas.

En el caso particular de granos y semillas, el cual es el objeto de esta investigación, es necesario recurrir a su almacenamiento para su conservación, la cual es necesario que no sufran daños por acción de plagas o enfermedades causadas por hongos de almacenamiento.

Es por ello que en la presente investigación, se explica el desarrollo, caracterización fisicoquímica así como aplicación de nanopartículas lipídicas sólidas como recubrimientos para los granos y semillas evitando la contaminación de hongos de almacén, en este caso *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* son utilizados debido a la importancia que generan en la contaminación de granos y semillas, el daño que causan es la pudrición en los granos y semillas por lo tanto se genera una pérdida.

Por lo que se hace observar el efecto benéfico de las nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) y no afectando la integridad de granos y semillas de maíz que se emplearon para dicha investigación de este modo alargando su vida útil.

El sistema empleado para la conservación de los granos y semillas debe integrarse homogéneamente con el fin de proteger, enriquecer y/o inhibir el crecimiento microbiano. De acuerdo con la revisión realizada es posible desarrollar sistemas submicrónicos a base de ceras e ingredientes nivel GRAS NLS que tiene una amplia posibilidad de ser utilizada en la protección y conservación de granos y semillas.

Por otro lado, la nanotecnología en el área de conservación de alimentos, tendrá un importante y gran impacto científico, razón por la cual el sistema propuesto en este proyecto resulta innovador en el área para incrementar la vida de anaquel en granos y semillas.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 LA NANOTECNOLOGÍA

La nanociencia y la nanotecnología son recientes disciplinas definidas en la escala de longitud nanométrica, científicos e ingenieros de múltiples campos descubren fascinantes fenómenos y aplicaciones y nos proveen con nuevas y exquisitas herramientas para diseñar novedosos materiales y componentes en electrónica, y avances fundamentales y aplicaciones en la física, la química, la biología molecular, la medicina, el medio ambiente, las industrias químicas, las farmacéuticas, etc. (Mendoza *et al*, 2007).

Por lo tanto, la nanotecnología implica la caracterización, la fabricación y/o manipulación de estructuras, dispositivos o materiales que tienen al menos una dimensión nano (o que contienen componentes con al menos una dimensión nano). Cuando el tamaño de partícula se reduce por debajo de este umbral, el material resultante exhibe propiedades físicas y químicas que son significativamente diferentes de las propiedades de los materiales macroescala compuestas de la misma sustancia (Duncan, 2011), en la conservación de alimentos la nanotecnología es una nueva ciencia de medir, ver, manipular y fabricar materiales a escalas individuales y muy pequeñas en un rango de 1 a 1000 nm (Bhusahan, 2003).

Investigaciones recientes han puesto de relieve el potencial de la nanotecnología que se utiliza en amplias aplicaciones en alimentos, incluyendo la mejora de los suplementos, el envasado de alimentos, el aumento de la gama de texturas de alimentos, colores y gustos. (Cushen *et al*. 2012). La investigación en este campo, se ha disparado en la última década, y ya hay numerosas empresas especializadas en la fabricación de nuevas formas de materia nanométricas, con aplicaciones anticipadas que incluyen terapias médicas y diagnósticas, la producción de energía, computación molecular y materiales estructurales, entre muchas otras. (Duncan, 2011).

Debido a estos nuevos desarrollos, es probable que se perciban los cambios radicales en la forma de alimentos debido a que se almacenan, envasan, transportan, monitorean, consumen y son procesados. La literatura disponible sugiere que hay muchas incertidumbres acerca de los nanomateriales, incluyendo el potencial de bioacumulación y posibles riesgos para la salud humana (Cushen *et al*, 2012).

Esta tecnología fusionada y altamente multidisciplinaria que se ha convertido en área de investigación vital y activa, que se está desarrollando rápidamente y se extiende en casi todos los campos de la tecnología (Islam *et al.* 2009). La reactividad química y la conductividad eléctrica con las que se pueden hacer productos que cumplan múltiples funciones, que sean más eficientes y que interactúen de manera más inteligente en el medio (Foladori *et al.*, 2005).

Se prevé que la nanotecnología traerá importantes beneficios a la industria agroalimentaria y los consumidores, incluyendo los métodos de producción de alimentos más eficiente, el desarrollo de alimentos funcionales que ofrecen declaraciones de propiedades saludables, aumento de la vida útil de los productos alimenticios, la elaboración de alimentos más higiénico, y la mejora de la trazabilidad y seguridad de los productos (Chaudry *et al.*, 2011).

## 2.2 EL CONCEPTO DE NANOPARTÍCULAS

Desde el punto de vista químico-biológico, se denomina nanopartícula a un sólido coloidal, formado de materiales aceptados como seguros (polímeros biodegradables o no, lípidos, proteínas, etc.) en los que una sustancia de interés "activo" puede ser incorporada, absorbida o unida químicamente con un tamaño que oscila entre los 10 y 1000 nm (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998)

Para lograr el tamaño óptimo de partícula, existen distintos factores, los cuales influyen, en el paso de una micropartícula a nanopartícula, los principales son la disminución del tamaño de partícula y el incremento de la relación superficie/volumen (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1996).

Las nanopartículas presentan muchas ventajas en relación a otros sistemas coloidales, debido a que tienen estabilidad física durante su proceso de almacenamiento, su forma de preparación es muy sencilla, con distintas técnicas conocidas para su reproducibilidad lote a lote.

## 2.3 LAS NANOPARTÍCULAS LÍPIDICAS SÓLIDAS (NLS)

Las NLS son sistemas coloidales con una alta proporción de agua (70-95%), elaborados principalmente a partir de lípidos fisiológicos sólidos que tienden a gelificar, son biodegradables y tienen buena tolerancia a los cambios. Las propiedades y la estabilidad de las NLS se han mejorado mediante la adición de lípidos líquidos, dando lugar a nuevos sistemas nanoparticulares conocidos como acarreadores lipídicos nanoestructurados (Garzón *et al*, 2008).

Las NLS fueron desarrolladas a comienzo de los años 90 como sistemas alternativos de otros sistemas coloidales (nanoemulsiones, liposomas, nanopartículas poliméricas).

Poseen un núcleo lipídico sólido que puede solubilizar principios activos lipofílicos. El núcleo lipídico se estabiliza con tensoactivos o emulsificantes. El núcleo lipídico puede estar constituido por un solo lípido o por una mezcla de varios lípidos (Villafuerte *et al*, 2008).

Una representación esquemática de las nanopartículas se muestra en la Figura 1.

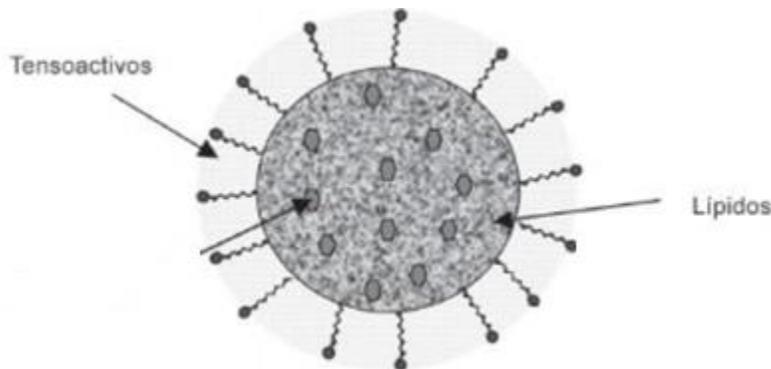


Figura 1. Representación de la estructura de una NLS (Villafuerte *et al*, 2008).

La estabilidad fisicoquímica de las NLS muestra variaciones debidas a sus diferentes composiciones y diferentes estructuras. En las dispersiones de partículas lipídicas con un intervalo de diámetro en nanómetros donde el principal o único componente es un lípido es muy importante la estabilidad fisicoquímica. Para dicha estabilidad se deben considerar los mecanismos de desestabilización, las técnicas utilizadas para detectar la inestabilidad así como los agentes que inducen la desestabilización. La selección de tensoactivo adecuado o una mezcla de tensoactivos a concentraciones convenientes, contribuye a la estabilidad de las NLS (Villafuerte *et al*, 2008).

Las NLS combinan las ventajas de diferentes sistemas coloidales. Al igual que las emulsiones y los liposomas son fisiológicamente aceptables y al igual que las nanopartículas poliméricas, puede ser posible modular la liberación de compuestos desde la matriz lipídica. Sin embargo comparado a liposomas y emulsiones (Palma *et al*, 2007).

Las NLS combinan las ventajas de las nanopartículas poliméricas y emulsiones aceite/agua. Presentan buena tolerancia para su consumo, alta biocompatibilidad para la administración oral, acarreador, fácil escalamiento para su producción a nivel industrial; sin embargo, también tienen limitaciones como son la baja capacidad de carga y expulsión de activos durante su almacenamiento. Considerando que en los alimentos además de acarrear nutraceuticos es necesario también protegerlos de las condiciones ambientales a las que se exponen durante su almacenamiento, distribución y comercialización, la utilización de nanopartículas poliméricas representa un potencial desarrollo en sistemas de barrera con permeabilidad selectiva. Además dado los métodos de obtención también son sistemas termodinámicamente más estables con lo que es posible tener mayor funcionalidad para su aplicación como recubrimientos (Mehnert *et al*, 2001; Weiss *et al*, 2008).

Otras ventajas de la utilización de las nanopartículas lipídica como transportadores de activos son la utilización de lípidos fisiológicos para su preparación, la posibilidad de evitar el uso de solventes orgánicos en su preparación. Además, se puede también que sea una ventaja el que existan métodos de fabricación bien establecidos como la homogeneización a presión elevada. Las nanopartículas lipídicas presentan una mejor disponibilidad, protegen las moléculas susceptibles de degradarse bajo la influencia de agentes externos como la luz y el agua y podrían ser de liberación prolongada para compuestos poco solubles en agua incorporados en la matriz lipídica sólida. Entre sus desventajas estarían el crecimiento de las partículas, una tendencia hacia una gelificación impredecible, cambios inesperados en sus transiciones polimórficas y su inherente baja capacidad de incorporación de los compuestos debido a la estructura cristalina del lípido sólido (Jores *et al*, 2003; Jores *et al*, 2004).

Para la obtención de NLS se utilizan lípidos que a temperatura ambiente y corporal están en estado sólido. Estas sustancias lipídicas son generalmente triglicéridos purificados, mezclas complejas de triglicéridos y aun ceras. Estos lípidos deben poseer características tales como: no ser tóxicos, ser accesibles en cantidad y en la calidad requerida, etc.

Como ingredientes comúnmente utilizados para la formulación de NLS se encuentran lípidos (formadores de matriz), emulsificantes, co-emulsificantes y agua Tabla 1. Otros componentes auxiliares también suelen ser utilizados, tales como modificadores de carga, agentes que prolongan el tiempo de circulación y efectividad como vector (Palma *et al*, 2007).

Tabla 1. Principales componentes de las NLS (Palma *et al*, 2007).

Núcleos lipídicos	Tensoactivos	Co-tensoactivos
Cera de abejas	Fosfatidil colina 95%	Butanol
Ácido Behénico	Lectina de soya	Taurocolato sódico
Colesterol	Lectina de huevo	Dodecil sulfonato de sodio
Parafina sólida	Poloxámero 188	Glicolato sódico
Glicéridos ac. grasos (C16-C18)	Polisorbato 60	Oleato de Sodio
Cetilpalmitato	Cremophor EL	
Ácido Esteárico		

La calidad de los tensoactivos tiene un gran impacto en la calidad de las NLS formadas puesto que son absorbidos en la superficie del lípido, formando una barrera estérica que les imparte estabilidad. Existen diferentes tipos de tensoactivos y co-tensoactivos, algunos de los cuales pueden ser mezclados con el lípido. Su naturaleza y concentración debe ser determinada en cada caso.

Las mezclas de tensoactivos generalmente tienen un efecto sinérgico, produciendo una película interfacial con alta capacidad de recubrimiento y con viscosidad suficiente para disminuir la agregación de las partículas durante su producción y almacenamiento (Garzón *et al*, 2008).

## 2.4 MÉTODOS DE PREPARACIÓN

Las NLS se han generado simplemente intercambiando el lípido líquido de las emulsiones, por un lípido sólido, lo que significa que son sólidas a la temperatura ambiente y también a la temperatura corporal. Son de forma esférica, con un diámetro entre 50 nm y 500 nm y al estar dispersas en un medio acuoso, forman un sistema coloidal (con una proporción de agua del 70-95%) que ha permitido el suministro de manera controlada y localizada (Quiñonez-Palacio *et al*, 2009).

Entre los materiales que se utilizan para la preparación de las NLS existe una gran cantidad de sustancias lipídicas y emulsificantes con la categoría de GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros) o con un estatus regulatorio de aceptado, que pueden ser utilizados en la elaboración de sistemas transportadores de compuestos destinados a distintos usos así como administraciones.

Los parámetros involucrados en el proceso de preparación de las NLS así como la relación lípido-lípido y lípido-tensoactivo, deben optimizarse con el fin de obtener el tamaño de partícula, eficiencia de encapsulamiento, disponibilidad biológica y estabilidad deseadas. (Garzón *et al*, 2009)

Para la preparación de las NLS existen diversos métodos los cuales serán descritos a continuación.

### 2.4.1 HOMOGENIZACIÓN A ALTA PRESIÓN.

La homogenización a alta presión es una tecnología que ha sido utilizada por muchos años y una de sus principales ventajas es que puede escalarse fácilmente e incluso se pueden producir grandes volúmenes de dispersión. Los métodos utilizados con mayor frecuencia para la preparación de NLS son la técnica de homogenización a alta presión en caliente y en frío. La elección a realizar la técnica en frío o en caliente depende principalmente cuando las nanopartículas son cargadas con algún compuesto, generalmente si este muestra sensibilidad a altas temperaturas es conveniente usar la técnica en frío (Müller *et al*, 2000).

Si el proceso se lleva a cabo en frío, la fase oleosa y el lípido sólido, es enfriada hasta su solidificación. Una vez en estado sólido, la masa es triturada y molida para obtener micropartículas lipídicas. Posteriormente, estas micropartículas son dispersadas en una solución fría de surfactante formando una presuspensión de partículas lipídicas micronizadas. Esta suspensión se pasa a través de un homogenizador de alta presión y se aplican de 5 a 10 ciclos para obtener la nanosuspensión (Pardeike *et al*, 2009).

Para preparar nanopartículas por la técnica en caliente, el lípido es fundido por encima de su punto de fusión y es dispersado bajo agitación en una solución acuosa que contiene al tensoactivo disuelto, esta solución se encuentra a la misma temperatura del lípido fundido, en esta etapa se forma una pre-emulsión que es homogenizada con un homogenizador a alta presión, en donde se forma la nanoemulsión que al ser enfriada se forman la nanosuspensión.

Los métodos de homogenización a alta presión tanto en frío como en caliente se explican en la Figura 2.

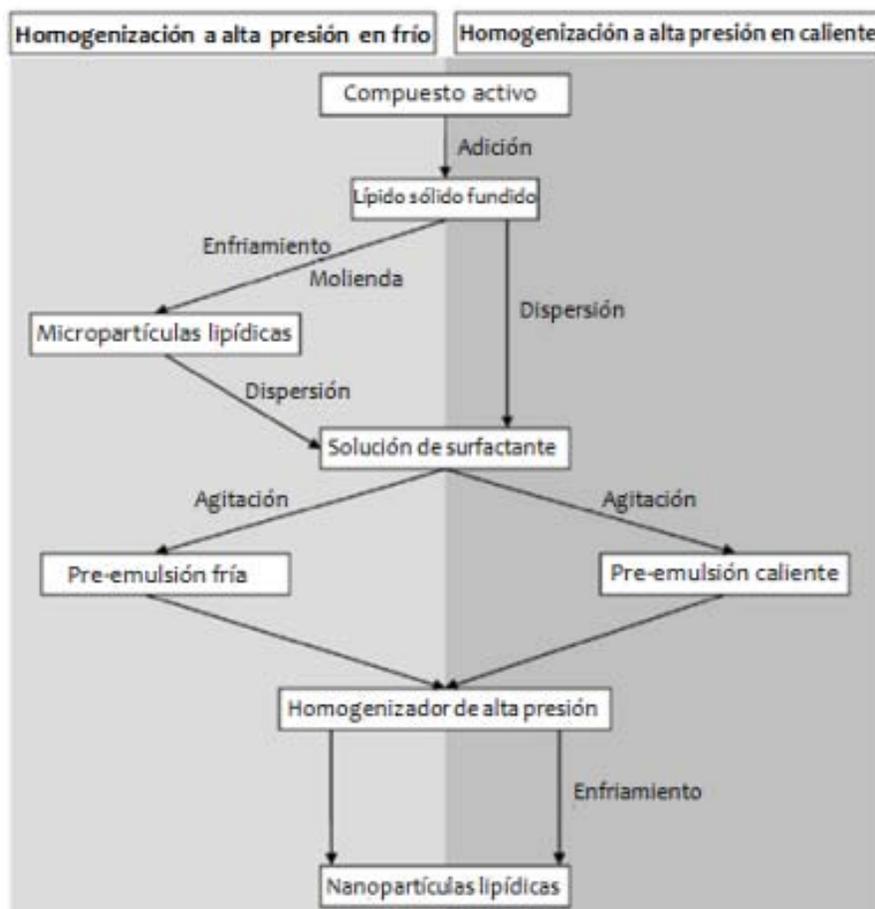


Figura 2. Métodos de homogenización a alta presión (Pardeike et al, 2009).

#### 2.4.2 MICROEMULSIÓN.

La preparación de NLS por el método de microemulsificación permite obtener partículas termodinámicamente estables, ópticamente isotrópicas y con un tamaño que puede ser controlado en el momento de la emulsificación. El proceso es fácilmente escalable sin necesidad de equipo especializado y con bajo consumo de energía.

Las nanoemulsiones obtenidas por este método contienen altas concentraciones de tensoactivos y co-tensoactivos, por lo que su uso en humanos se encuentra sujeto a regulaciones sanitarias. La elaboración de NLS por microemulsificación se logra debido a la cristalización de las gotas de lípido dentro del medio acuoso.

El tamaño de partícula dependerá principalmente del tipo de tensoactivos y co-tensoactivos, y de las condiciones experimentales. La optimización del

proceso comienza realizando pruebas de solubilidad de los compuestos. en los lípidos y solubilizantes, utilizando diagramas de fase pseudoternarios que permiten seleccionar los componentes de una microemulsión estable, es decir, aquella que soporte ciclos de enfriamiento-calentamiento (de -4 °C a 40 °C) de 24 h durante 1 semana. Este mecanismo de selección da lugar a procedimientos de alta eficiencia de carga, con un tamaño promedio inferior a 200 nm y un IP inferior a 0.6.

Una microemulsión típica para obtener NLS se elabora a partir de 10% de lípido sólido fundido, 15% de tensoactivo y 10% de co-tensoactivo. La fase oleosa tibia se adiciona con flujo lento o mediante inyección con una jeringa temosellada, dentro de un exceso de agua fría, dispersando con agitación fuerte o ultrasonido hasta lograr la formación de gotas del lípido y su posterior precipitación. El exceso de agua se remueve por ultrafiltración o por liofilización (Garzón *et al*, 2008).

#### 2.4.3 EMULSIFICACIÓN-EVAPORACIÓN.

La emulsificación de lípidos que previamente se han disuelto en disolventes orgánicos, permite la incorporación de compuestos termolábiles en las NLS; el procedimiento se realiza en una sola etapa sin necesidad de equipo especial y en condiciones benignas de temperatura. Las principales desventajas de este método son: la posible retención de residuos del disolvente (hasta de 100 ppm), la producción de dispersiones muy diluidas debido a la limitada solubilidad del lípido en el material orgánico (0.1g/L generalmente), así como la dificultad de recuperación de los disolventes durante el proceso de escalamiento.

En el proceso de emulsificación- evaporación los componentes lipídicos y el compuesto se disuelven en un disolvente inmiscible en agua previamente saturado, emulsificándolo a altas temperaturas con una disolución de tensoactivo en el agua saturada. Posteriormente el disolvente se evapora a presión reducida, induciendo la precipitación del lípido y la formación de suspensiones casi transparentes conteniendo NLS cercanas a 100 nm, con un intervalo de dispersión estrecho. La obtención de partículas más pequeñas (hasta de 30 nm) dependerá de la carga y del tipo de emulsificante utilizado. La generación de partículas extremadamente pequeñas podría favorecer su floculación durante el almacenamiento, ya que presentan un incremento considerable en el área superficial y/o una disminución en el potencial zeta (Garzón *et al*, 2008).

#### 2.4.4. EMULSIFICACIÓN MEDIANTE MEMBRANA DE CONTACTO.

Las membranas de contacto Figura 3 se han usado recientemente en la preparación de NLS, ya que son fáciles de utilizar, aseguran el control del tamaño de las partículas mediante la selección de los parámetros de producción y permiten el fácil escalamiento del proceso. Son de cerámica, usualmente de 40 cm con 1 cm de diámetro externo y 0.6 cm de diámetro interno, con  $7.5 \times 10^{-3} \text{ m}^2$  de superficie y poros de 0.1-0.45 mm, que se comportan como capilares paralelos. Contienen una capa activa de  $\text{ZrO}_2$  sobre un soporte de  $\text{Al}_2\text{O}_3 - \text{TiO}_2$ . La fase oleosa contenida en un recipiente presurizado con atmósfera de nitrógeno, a temperatura regulada por arriba del punto de fusión, se alimenta al módulo de la membrana a través de los poros. Por un extremo se alimenta la fase acuosa también a temperatura controlada, la cual fluye tangencialmente en el interior, estableciendo contacto con los lípidos y desprendiendo las pequeñas gotas. El flujo que sale se enfría con agitación hasta temperatura ambiente. La membrana puede ser regenerada hasta recuperar una permeabilidad superior al 80% antes de utilizarse nuevamente (Garzón et al, 2008).

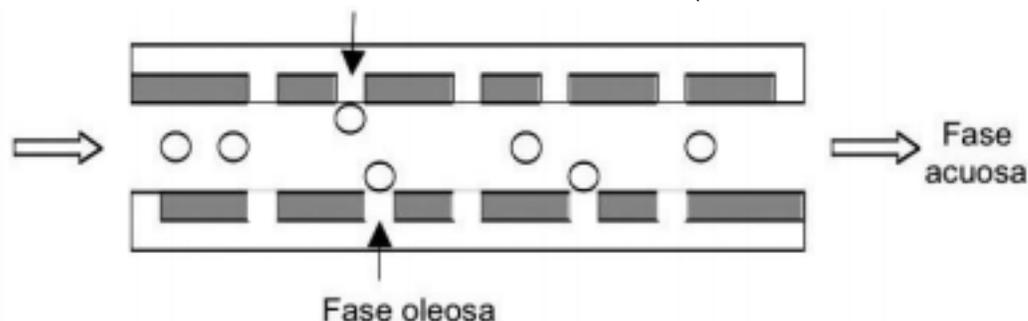


Figura 3. Representación esquemática de la membrana de contacto para la preparación de SLN. (Garzón et al. 2008)

## 2.4.5 EMULSIFICACIÓN-DIFUSIÓN

La originalidad del método de emulsificación-difusión consiste en el uso de disolventes parcialmente miscibles en agua, generalmente aceptados para su uso farmacéutico y alimenticio. Al desarrollar este método para la preparación de nanopartículas poliméricas se usó alcohol bencílico como disolvente (Leuroux *et al*, 1995<sup>a</sup>, b). Las nanopartículas se preparan al formar una emulsión (aceite/agua) entre la solución del polímero en alcohol bencílico y una solución acuosa que contiene al hidrocoloide estabilizante, seguido de la dilución de la emulsión con agua.

Posteriormente, se introdujo una modificación en la metodología que fue la saturación del disolvente parcialmente miscible en agua. Esta saturación de la fase orgánica con agua y de la fase acuosa con el disolvente orgánico permite mejorar el equilibrio termodinámico del sistema (Quintanar-Guerrero *et al*, 1996). La técnica consiste en la formación de una emulsión (aceite/agua), entre la solución de un polímero biodegradable en el disolvente saturado con agua y una fase acuosa que con tiene el estabilizante por ejemplo alcohol polivinílico, previamente saturada con el disolvente orgánico. La subsecuente adición de agua al sistema causa que el disolvente difunda hacia la fase externa, lo que trae como resultado la formación de nanopartículas del polímero. La adición de un estabilizante adecuado evita la formación de grumos del polímero, pues este actúa como un agente protector tanto para formar la emulsión como para estabilizar las nanopartículas formadas.

Se ha demostrado que cada gota de la emulsión primaria formará varias nanopartículas y que estas son formadas por fenómenos no pueden ser totalmente explicados por efectos de convección causados por la turbulencia interfacial. Los autores sugieren que las nanopartículas se forman debido a una inestabilidad química producida por el transporte del solvente. La idea básica es que la difusión del solvente desde los glóbulos acarrea moléculas hacia la fase acuosa, constituyendo regiones locales de supersaturación en las que los nuevos agregados del polímero (no totalmente desolvatados) serán formados (Quintanar-Guerrero *et al*, 1997).

## 2.5 ROTOR-ESTATOR

El ULTRA-TURRAX® es un sistema rotor/estator o de alta eficiencia que es utilizado para producir emulsiones y dispersiones. Este equipo es utilizado en etapas previas de preparación de NLS por la técnica de homogenización a alta presión así como en la técnica de emulsificación- evaporación (Camacho, 2010).

### 2.5.1 PRINCIPIO DEL ROTOR-ESTATOR.

Debido al elevado número de revoluciones del rotor, el medio a procesar se aspira axialmente y de modo automático en el cabezal de dispersión y a continuación se presiona radialmente a través de las ranuras del conjunto rotor/estator. Por las grandes fuerzas de aceleración, el material está sometido a altos esfuerzos de cizallamiento y empuje muy intensos. En la rendija de cizallamiento que existen entre el rotor y el estator aparece adicionalmente una gran turbulencia que conduce a una mezcla óptima de la suspensión para el rendimiento de la dispersión es decisivo el producto obtenido de multiplicar el gradiente de cizallamiento y el tiempo de permanencia de las partículas en el campo de cizallamiento. El margen óptimo de la velocidad periférica del conjunto rotor/estator se sitúa entre 10 y 24 m/s. Generalmente basta de un tiempo de procesamiento de unos pocos minutos para conseguir la finura definitiva deseada. Tiempos de procesamiento prolongados mejoran sólo insignificanamente la finura alcanzable, limitándose a aumentar la temperatura del medio debido a la energía incorporada. (Manual IKA ULTRA-TURRAX®).

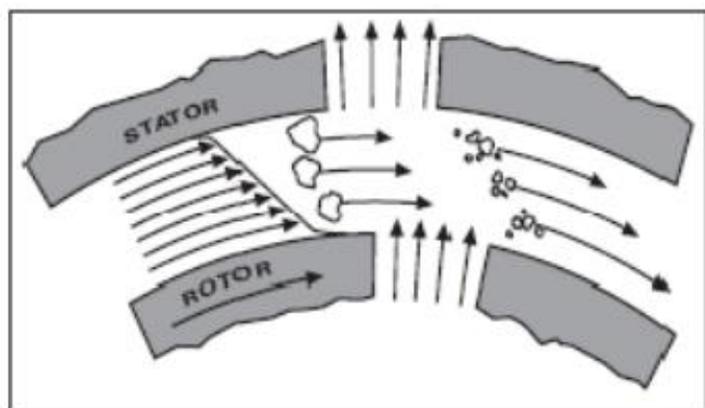


Figura 4. Principio rotor-estator (Manual IKA ULTRA-TURRAX®).

## 2.6 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS LÍPIDICAS SÓLIDAS.

La calidad y el desempeño de las NLS provienen de sus características fisicoquímicas, al determinar estas características se obtiene un buen entendimiento de su comportamiento, asó mismo permite el diseño de la partícula, desarrollo de la formulación, localizar y solucionar problemas en el proceso de producción.

Muchas de las técnicas de caracterización son similares a algunas que se utilizan para el análisis de otros sistemas coloidales como las micelas, liposomas y emulsiones (Camacho, 2010).

### 2.6.1 LA DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA.

El tamaño de las partículas es uno de los parámetros más importantes para la caracterización de las nanopartículas en sistemas coloidales (Nastruzzi, 2005). La distribución del tamaño de partícula, no se define por la media del tamaño presentado, sino por la amplitud de la curva o presencia de diferentes poblaciones.

La propia forma de la partícula es importante también, una forma esférica presenta una dispersión de la luz diferente de una que es rectangular. Las determinaciones de tamaño de las partículas son en su mayoría para confirmar que el rango deseado del tamaño coloidal se ha obtenido durante la preparación y que se mantiene durante el almacenamiento o la transformación posterior (Nastruzzi, 2005).

Mediante la técnica de dispersión de luz (DLS), es posible determinar el tamaño de partícula (diámetro), de un material en suspensión como la distribución de tamaños por medio de medidas del movimiento browniano de las partículas. Cuando se tienen partículas en dispersión, éstas se desplazan de manera aleatoria como consecuencia de los choques con el medio en el que están inmersas (movimiento browniano). Al hacer incidir un haz de luz sobre estas este es dispersado y su intensidad varía con el tiempo debido al movimiento browniano. Utilizando varios algoritmos matemáticos se puede relacionar esta variación en la intensidad con el tamaño hidrodinámico de las partículas. Parámetros como la temperatura y la viscosidad del disolvente, entre otros, influyen en el tamaño y éste, a su vez,

depende tanto de la forma de la partícula como de las interacciones con las moléculas del medio en el que se encuentra (Nitbiosafe, 2015)

### 2.6.2 POTENCIAL ZETA.

Los fenómenos electrocinéticos es un término genérico aplicado a los efectos asociados con el movimiento de las soluciones iónicas cerca de las interfaces cargadas. La determinación de la estructura detallada de la doble capa eléctrica de polímeros coloidales son de gran importancia en problemas de estabilidad y reología de sistemas dispersos (Hidalgo-Álvarez, 1996).

La fuerza de repulsión entre partículas es definida por el potencial zeta que es una medida de la fuerza eléctrica que existe entre átomos, moléculas, partículas y células en un líquido.

El potencial zeta es una propiedad física que tiene cualquier partícula que se encuentra en una suspensión. Como es conocido los estados fundamentales de la materia son: sólido, líquido y gaseoso. Si alguno de esos estados esta finamente disperso en otro entonces se tiene un sistema coloidal. Ejemplos de sistemas coloidales son el agua, la sangre y muchos productos farmacéuticos. Las propiedades físicas del sistema coloidal son fuertemente afectadas por las propiedades de los coloides, que pueden ser partículas sólidas en una solución líquida. Es posible cambiar las características de una suspensión al comprender las interacciones de las partículas entre sí. Algunas veces es deseable maximizar las fuerzas repulsivas entre ellas para producir suspensiones estables. Así las repulsiones mutuas entre partículas adyacentes no permite la sedimentación. En otros casos, como en el tratamiento de agua se deben minimizar las fuerzas de repulsión entre las partículas que las enturbian, para formar grandes aglomerados que se sedimenten y sean filtrados fácilmente (Tibaquirá *et al*, 2007).

La capa doble está formada en para neutralizar el coloide cargado y, a su vez, provoca un electrocinética potencial entre el superficie del coloide y cualquier punto en la masa del líquido de suspensión. Esta diferencia de tensión está en el orden de milivoltios y se conoce como el potencial de superficie. La magnitud de la superficie potencial está relacionado con la superficie carga y el espesor de la capa doble. Al salir de la superficie, el potencial cae más o menos linealmente en la capa de Stern y luego de manera exponencial a través de la difusa capa, acercándose a cero en el límite imaginario de la doble capa. La curva de potencial es útil porque indica la fuerza de la fuerza eléctrica entre partículas y la distancia a la cual

esta fuerza entra en juego. Una partícula cargada se moverá con una velocidad fija en un campo de tensión. Este fenómeno se llama electroforesis. La movilidad de la partícula es relacionada con la constante dieléctrica y la viscosidad del líquido de suspensión y al potencial eléctrico en el límite entre el traslado partícula y el líquido. Este límite se llama el plano de deslizamiento y por lo general se define como el punto donde la capa de Stern y la difusa capa se encuentran. La capa de Stern, se considera que está unido rígidamente al coloide, mientras que la capa difusa no es. Como resultado, la eléctrica potencial en este cruce está relacionada a la movilidad de la partícula y es llamado el potencial zeta. Aunque potencial zeta es una valor intermedio, a veces es considera más significativa de potencial de superficie medida de lo repulsión electrostática se refiere. El potencial zeta puede ser cuantificada mediante el seguimiento de las partículas coloidales a través de un microscopio a medida que migran en un campo de tensión (Zeta-meter, 2016).

## 2.7 LA NANOTECNOLOGÍA EN ALIMENTOS

En alimentos, la nanotecnología no comenzó a tomar importancia sino hasta la década pasada cuando se comenzaron a desarrollar gran parte de las aplicaciones que ahora impactan el envasado de alimentos, dadas las potencialidades que ofrece las aplicaciones se han ampliado a otros campos de la industria de los alimentos en particular a sistemas de liberación nanoparticulados (micelas, liposomas, nanoemulsiones, nanopartículas, etc.), es importante resaltar que en la industria de alimentos, la aplicación de la nanotecnología es aún limitada, teniendo impacto en la producción de envases activos e inteligentes por ejemplo la utilización de sistemas antimicrobianos, potenciadores de sabor, etc. recientemente se han identificado cuatro áreas del proceso productivo de alimentos donde se puede emplear la nanotecnología: 1) desarrollo de nuevos materiales funcionales. 2) procesamiento a micro- y nano-escala, 3) desarrollo de nuevos productos y 4) métodos de instrumentación (Chen *et al.* 2006; Chau *et al.* 2007).

La aplicación de la nanotecnología en la agricultura y en la industria alimentaria, se trató por primera vez en el Departamento de Agricultura de EEUU (USDA) en septiembre de 2003. Su aplicación está teniendo gran impacto industrial y comercial, a pesar de estar aún en fase de despegue. Sus principales aplicaciones en esta área abarcan:

- a) Dentro del envasado (e. g. envases activos y envases inteligentes)
- b) Par el desarrollo de nuevos y mejores productos (e. g. nanoalimentos funcionales, microcápsulas)
- c) En la calidad y la seguridad alimentaria (e. g. biosensores)
- d) En la mejora de los procesos de producción de los alimentos (e. g. gelatinización, espumas y emulsiones)(Joseph *et al.* 2006)

La nanotecnología ofrece múltiples oportunidades de mejora a diferentes sectores agroalimentarios, sobre todo a los que emplean materiales plásticos en sus envases alimentarios. Entre las aplicaciones que se dan en el envasado en la actualidad destacan las siguientes:

- a) Los nanorecubrimientos para aumentar las propiedades de alimentos frescos, con el fin de retrasar su maduración y alargar su vida útil. En la actualidad algunos nanocompuestos son ya usados como material de envasado o recubrimiento para controlar la difusión de gases y prolongar el tiempo de conservación de diversos productos. Un sensor detecta el gas que se produce

cuando el alimento deja de estar fresco. Un simple cambio de color proporciona una pista visual rápida de la caducidad.

- b) Para elaborar materiales de contacto con los alimentos dotados de propiedades antimicrobianas. Las actuales investigaciones sobre ese tipo de superficies tienen por objeto conseguir sensores capaces de detectar la contaminación bacteriana y reaccionar contra ella.
- c) En nanomateriales cuyas propiedades cambiarán en función de las condiciones externas o internas, como la temperatura. Éstos llevan a cabo un seguimiento de las temperaturas que se han mantenido a lo largo del ciclo. Un cambio de color indica que no se cumplen las especificaciones de temperatura (Joseph *et al.* 2006).

Mediante la adición de nanopartículas pueden desarrollarse nuevos envases y recubrimientos comestibles con mejores propiedades mecánicas y de barrera a los gases, también es posible incluir nanosensores para alertar a los consumidores cuando la vida útil de un producto ha terminado. La nanotecnología puede también emplearse en alimentos funcionales con sistemas de liberación en sitios de acción específicos para mejorar la salud humana (Chi-Fai *et al.*, 2207; Siegrist *et al.*, 2008).

## 2.8 RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES

Un recubrimiento comestible es definido como una sustancia aplicada en el exterior de alimentos de manera que el producto final sea apto para el consumo. Estos recubrimientos deben ser legales, inocuos, aceptables sensorialmente y deben proporcionar un valor agregado al alimento. (Baldwin *et al.* 2012).

También se puede definir como la capa delgada de material comestible formado directamente sobre un alimento, éstos son aplicados en forma de líquido por inmersión, aspersión o goteo (Olivas *et al.*, 2005).

La función principal de los recubrimientos comestibles es proteger al producto de daños mecánicos, físicos, químicos y actividades microbiológicas que lo deterioren (Falguera *et al.* 2011). Dependiendo de las características de los recubrimientos, estos pueden ayudar a reducir dichos daños en el alimento mediante un proceso mínimo, retardando su deterioro, aumentando su calidad y mejorando su inocuidad, esto último, gracias a la actividad natural del recubrimiento contra microorganismos o por la incorporación de compuestos antimicrobianos en la formulación (Rojas-Graü *et al.*, 2009).

El uso de los recubrimientos en alimentos y especialmente en productos altamente perecederos está condicionado por parámetros tales como el costo, la disponibilidad, la funcionalidad, las propiedades mecánicas como flexibilidad y tensión, las propiedades ópticas como brillo y opacidad, la barrera que proporcionan contra el flujo de gases, la aceptabilidad sensorial y la resistencia estructural contra agua y microorganismo. Dichas características dependen del tipo de material utilizado como matriz estructural, las condiciones en que se formaron el recubrimiento (tipo de disolvente, pH, concentración de aditivos) (Rojas-Graü *et al.*, 2009).

Los recubrimientos comestibles tienen la capacidad de actuar como barrera de migración de humedad de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, aromas sabores y lípidos. Ayudan a mantener la calidad de los alimentos, pues sirven para estabilizar los gradientes de actividad de agua, protegiéndolo contra la pérdida o ganancia de humedad y la pérdida de aromas además que hacen posible la incorporación de agentes antimicrobianos (Park, 1999)

Un recubrimiento comestible debe cumplir con exigencias de calidad, seguridad y rendimiento. Uno de los principales propósitos de los recubrimientos es mejorar la apariencia del producto, brindando brillo y a veces color, que debe mantenerse a través de los procesos de transporte,

manejo y comercialización (McHugh *et al*, 2000). Para que la aplicación sea exitosa en el producto, este debe secar rápidamente, no debe producir espuma y se debe remover fácilmente de los equipos. Una vez aplicado, no debe agrietarse, decolorarse o caerse durante la manipulación. No debe reaccionar de manera adversa con los alimentos. Durante el almacenamiento de los productos el recubrimiento no debe fermentar, coagular, separarse, desarrollar sabores desagradables, entre otras anomalías (Baldwin *et al*. 2012).

La funcionalidad de los recubrimientos comestibles se puede mejorar mediante la incorporación de nanopartículas (agente antimicrobianos, aditivos, antioxidantes e ingredientes funcionales), los cuales pueden tener una mejor distribución en la superficie del producto y lograr interactuar con la membrana celular, o impedir el desarrollo de microorganismos (Costa *et al*, 2012).

### 2.8.1 USO DE CERAS EN LOS RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES.

Las ceras son lípidos completamente insolubles en agua, se encuentran en la superficie de plantas y animales, donde funcionan como impermeabilizante, están constituidas por ácidos grasos esterificados (generalmente con número par de átomos de carbono) a alcoholes de cadena larga de 10 a 30 carbonos). Los ácidos grasos que forman parte de estos lípidos, pueden ser ramificados, insaturados o formar anillos (Wilbraham *et al*, 1998).

Las ceras generalmente contienen una amplia variedad de materiales como son glicéridos, alcoholes grasos, ácidos grasos y sus ésteres (Camacho, 2010).

Las ceras han sido utilizadas por la industria farmacéutica por muchos años, como es en la preparación de ungüentos, cremas o lociones y supositorios así como numerosas formulaciones para aplicaciones tópicas. Debido a su característica lipofílica las ceras han sido para formas de dosificación de liberación sostenida usada como matriz lipídica o en recubrimiento (Swarbrick *et al*, 2002).

Las ceras funcionan como agentes de recubrimiento, se emplean principalmente por cuestiones estéticas y para evitar la degradación del alimento; actualmente se está investigando en ceras comestibles, biodegradables, o bien, que aporten alguna proteína adicional a los productos comestibles.

La mayoría de las ceras contienen antioxidantes naturales, y las ceras vegetales son en general más ricas en sustancias antioxidantes. Su utilización ayuda a retardar la alteración oxidativa del fruto, pero no la evitan de una forma definitiva. Las ceras, combinadas con otros manejos pos-cosecha pueden dar mejores resultados en los frutos.

#### Tipos de ceras

1) Las ceras al agua, que son derivadas de resinas naturales y de plantas como la cera de abeja, de aceites orgánicos, la carnauba, la candelilla, resinas de madera, ésteres de sacarosa, ceras a base de proteínas, del suero de la leche, de polisacáridos, etcétera. Son más eficientes, producen menor brillo y son menos contaminantes; algunas compañías ya las están produciendo de manera comercial, tal es el caso de la empresa Ceras Universales, la única distribuidora de este tipo de productos.

2) Las ceras solventes, cuya composición es básicamente de hidrocarburos, se han dejado de utilizar por contener derivados del petróleo, son más contaminantes aunque ofrecen la misma protección (www.2000agro.com.mx, 2016).

El recubrimiento con ceras tiene varias ventajas con respecto a los recubrimientos con soluciones o dispersiones poliméricas, esto es, pueden ser aplicadas sin solventes orgánicos y en el caso de ceras fundidas a altas temperaturas el proceso de recubrimiento se hace más corto. Las ceras pueden ser aplicadas en recubrimiento como ceras fundidas, emulsiones calientes, suspensiones acuosas o en soluciones orgánicas (Camacho, 2010).

El proceso de recubrimiento con ceras fundidas, la cera debe ser mantenida en estado líquido, es decir, fundida, el aire de atomización debe ser también calentado a la misma temperatura de la cera fundida para evitar la solidificación prematura, las gotas de cera deben mantenerse líquidas hasta que toca la superficie del sustrato, puesto que pueden formar un recubrimiento rugoso y poroso.

El recubrimiento con emulsiones calientes tiene varias ventajas en comparación con el proceso anterior, aquí la cera continúa en estado líquido, pero el riesgo de solidificación prematura durante el atomizado es minimizado por la presencia de agua caliente, aunque el paso de evaporación del agua produce procesos más largos (Swarbrick *et al*, 2002).

## 2.9 SEMILLAS Y GRANOS.

Las semillas y granos constituyen la fuente principal de alimentos para el mundo. Cuando se consumen tras quitarle las cubiertas y el germen, se denomina cereal 'refinado'. Cuando se procesa sin quitarle las cubiertas, el producto resultante se denomina 'entero'.

En los últimos años, los productos basados en granos enteros han ganado atención debido a los beneficios que aportan a la salud. Podemos definir a los granos enteros como aquellos granos intactos, molidos, chancados o laminados luego de haberles removido las partes no comestibles, en los cuales sus principales componentes (endosperma, germen y cáscara) mantienen la misma proporción relativa, tal como existen en el grano intacto. Se consideran también aquellos que sufrieron la separación temporal de sus componentes durante el procesamiento para una posterior recombinación.

Cada día es más evidente que los productos elaborados sobre la base de granos enteros tienen potencial para mejorar la salud y para reducir el riesgo de enfermedades relacionadas con los hábitos alimentarios.

Los cereales son principalmente fuente de carbohidratos provenientes del endosperma del grano de donde se obtiene la mayoría de los productos industriales, como la harina de trigo o el arroz pilado. Sin embargo, también son una fuente importante de componentes favorables para la salud, como la fibra dietética, los prebióticos, los minerales, los lípidos, las vitaminas y las ligninas ubicados principalmente en la cáscara y el germen del grano que, en muchos casos, al ser subproductos de los procesos de molienda, se destinan para la alimentación animal (Villanueva, 2012).

Para garantizar la disponibilidad de granos y semillas en la cantidad, así como con la oportunidad y calidad requerida es necesario recurrir a su almacenamiento y conservación.

El almacenamiento se refiere a concentrar la producción en lugares estratégicamente seleccionados; en tanto que la conservación implica proporcionar a los productos almacenados las condiciones necesarias para que no sufran daños por la acción de plagas, enfermedades o del medio ambiente, evitando así mermas en su peso, reducciones en su calidad o en casos extremos la pérdida total.

En México no existen cifras precisas que indiquen el volumen de pérdidas de granos y semillas, sin embargo, se estima que anualmente se pierde entre el

5% y el 25 % de la producción total de maíz, trigo y frijol que son los principales granos del país (SAGARPA)

Los granos de trigo, centeno y maíz son los de mayor importancia y son conocidos como granos desnudos los cuales se componen de una cubierta llamada pericarpio y semilla.

El grano se subdivide en tres partes fundamentales: pericarpio, endospermo y germen

1. *Pericarpio*: Protege al grano contra agentes bióticos (microorganismos, insectos), impide la pérdida de humedad, conduce y distribuye el agua y otros nutrientes durante la germinación. El pericarpio está compuesto por las siguientes capas: epicarpio, mesocarpio, endocarpio.
2. *Endospermo*: Es la porción más grande de un grano y está compuesto de células que almacenan almidón. Sus paredes son bastante delgada ya que existe menos celulosa. Los nutrimentos que se encuentran en esta son el almidón y las proteínas.
3. *Germen (embrión)*: Sirve como almacén de nutrientes y como puente de comunicación entre el embrión en desarrollo y los nutrientes del endospermo carecen de almidón y tiene un alto contenido en grasas, proteínas, azúcares solubles y cenizas.

Las semillas son importantes en varios aspectos, desde el punto de vista biológico contienen los recursos genéticos recombinados necesarios para el ciclo completo de la planta que dará origen y normalmente de ellas depende la sobrevivencia del germoplasma en condiciones desfavorables del crecimiento. Antropocéntricamente, las semillas son una fuente importante en la alimentación humana y animal, además de, algunas tienen usos industriales en la producción de aceites, de fibra textil y en la fibra textil y en la fabricación de bebidas, así como para uso medicinal y en artesanías siendo el objetivo principal de las semillas generar una plántula que use eficientemente sus reservas nutricionales, durante su crecimiento inicial, y sea capaz de lograr su autosuficiencia en el menor tiempo posible (Manzo, 1982).

Las semillas deben conservar su viabilidad, germinación y vigor hasta el momento en que serán utilizadas, a fin de asegurar el desarrollo de una nueva planta y con ello la producción de más cosechas. Si una semilla pierde o reduce su capacidad para generar una nueva planta, debe ser utilizada sólo como grano; siempre y cuando no esté tratada con productos

que puedan afectar la salud humana o animal y que no se le hayan desarrollado compuestos tóxicos o alterado sus cualidades alimenticias (Hernández-Guzmán *et al.* 2015).

Es por ello que entre grano y semilla existen similitudes en cuanto definición y estructura, sin embargo la diferencia radica en que se utiliza el término de grano cuando se destinan para la alimentación humana y animal, o como materia prima para la industria; mientras que el término de semilla se utiliza para indicar su uso en la siembra, reproducción y multiplicación de la especie o variedad (SAGARPA).

Dada la explicación de grano y semilla se ve la importancia de este producto, por ello es importante preservar en la mejor calidad este alimento.

### 2.9.1 CALIDAD EN GRANOS Y SEMILLAS.

Se define como un grado o padrón de excelencia, en ciertos atributos que pueden determinar el desempeño del grano y/o semilla en la siembra o en el almacén. En la práctica, la expresión "calidad" es utilizada libremente para reflejar el valor de la semilla y/o grano para supuestos específicos tales como estar a la altura de las expectativas del consumidor (Manzo, 1982).

La calidad para granos y semillas puede definirse como el nivel o grado de excelencia alcanzado por las semillas cuando son producidas y beneficiadas en forma óptima, el cual es asumido por las semillas solamente cuando son comparadas con un estándar aceptable. Las semillas y/o granos pueden ser superior, buena, mediana o pobre calidad (Andrade, 1922).

Los componentes que determinan la calidad de la semilla son los siguientes, genética, viabilidad y germinación, limpieza y estructura física todo ello aunado a un buen almacenamiento (Cabrera, 2003).

Cada componente será explicado a continuación.

1. Componente genético: es óptima cuando se asegura pureza varietal de acuerdo con la semilla original. El grano y/o semilla debe ser genéticamente puro, manteniendo los atributos propios de la especie o cultivar como son productividad, adaptación, precocidad, calidad de grano resistencia, etc. (Sánchez, 2004).

La constitución genética respecto a las semillas determina la respuesta del cultivo a las condiciones ambientales, a la aplicación de otros insumos y a las prácticas de cultivo; aunque el ambiente que rodea a la semilla durante su proceso de formación influye en su nivel de vigor; incluso se considera que el almacenamiento de la semilla puede llegar a ser un factor determinante en el deterioro del componente genética (Vázquez, 2004).

Dentro de los factores que afectan la pureza genética se encuentran: origen, contaminaciones mecánicas, estabilidad genética, los efectos de selección y contaminaciones durante la polinización (Andrade, 1992).

2. Componente físico: Se refiere al nivel de excelencia con respecto a tamaño, forma, color, brillantez, densidad de la semilla entre otras características (Sánchez, 2004). Para llegar a una óptima calidad la

semilla debe ser limpiada, clasificada por su forma y tamaño, evaluando su pureza, determinando el porcentaje de malezas nocivas, semillas de otras variedades y otros cultivos al igual que material inerte (Moreno *et al*, 1988).

El contenido de humedad es uno de los aspectos con mayor importancia, ya que durante la cosecha todo ello con el objetivo de evitar el daño mecánico, (Juárez, 1997). La gran relevancia de la humedad en el manejo de granos y semillas radica en que es el factor más importante en su conservación, ya que favorece el desarrollo de insectos y hongos que tienen efectos en los procesos fisiológicos de las semillas, de los que dependen la pérdida de vigor y viabilidad (Moreno *et al*, 1988).

3. Componente sanitario: Se refiere al hecho de que la semilla se encuentra libre de microorganismos. La sanidad se refiere a la presencia o ausencia de organismos causantes de enfermedades; hongos, bacterias, virus y plagas de animales (gusanos e insectos), pero también pueden estar involucradas condiciones fisiológicas, tales como deficiencias de microelementos (Moreno, 1996).

La semilla con calidad sanitaria debe estar libre de patógenos que pueden afectar a la propia semilla o grano de enfermedades transmitidas por la semilla o grano infectado y de este modo se afecta al propio cultivo y genera un problema patológico (Andrade, 1992).

4. Componente fisiológico: Se le conoce también como calidad biológica, son aquellos atributos endógenos que dan a la semilla capacidad para germinar rápidamente y producir poblaciones uniformes de plantas productivas en una gran variación de condiciones ambientales. Estas características que definen los aspectos biológicos son entre otros viabilidad, germinación y vigor (Andrade, 1992).

Otro aspecto importante a evaluar para tener una buena calidad en los granos y semillas es el proceso respiratorio, ya que con ello se puede evaluar la semilla y si es que llega presentar algún problema, ya que son organismos vivos.

## 2.9.2 PROCESO RESPIRATORIO DE GRANOS Y SEMILLAS.

Después de ser cosechados los granos y semillas continúan viviendo y como todos los organismos vivos, respiran. La respiración es bajo condiciones aeróbicas es el proceso por el cual las células vivas de los vegetales oxidan los carbohidratos y las grasas, por medio del oxígeno atmosférico, produciendo gas carbónico ( $\text{CO}_2$ ) agua y liberando energía en forma de calor (Trcheuschkner, 2001).

### 2.9.2.1 FACTORES QUE AFECTAN LA RESPIRACIÓN.

El proceso respiratorio va acompañado de una pérdida de sustancias nutritivas para las semillas y granos. Los principales factores que afectan la velocidad del proceso respiratorio son:

1. Temperatura: Al estudiar la influencia de la temperatura sobre el proceso respiratorio de los granos, diversos investigadores concluyeron que la respiración aumenta rápidamente cuando la esta se eleva de 30 a 40 grados Celsius y a partir de este punto se producen un notable descenso del proceso. Por lo general, el aumento de la temperatura puede acelerar la respiración dos o tres veces hasta cierto límite, arriba del cual disminuye como resultado de los efectos destructores de altas temperaturas sobre las enzimas.
2. Nivel de humedad: El nivel de humedad de los granos influye directamente sobre su velocidad de respiración. Los granos almacenados de entre 11 y 13 por ciento tienen un proceso respiratorio lento. Sin embargo, si se aumenta el contenido de humedad se acelera considerablemente la respiración y en consecuencia ocurre un deterioro. El nivel de humedad del producto es un factor fundamental para su conservación.
3. Desarrollo de hongos: La respiración del grano es bastante difícil de medir a causa de la dificultad para distinguir entre la respiración propia del grano y la de los microorganismos que siempre van asociados con él.

Recientes investigaciones concluyeron que una parte significativa de dióxido de carbono, que se produce durante la respiración, se debe

al metabolismo de los insectos presentes en los granos y semillas secos y a los microorganismos la mayoría hongos, presentes en los hongos húmedos. Cuando los hongos son los principales agentes responsables del aumento del proceso respiratorio se puede llegar a un punto en que los granos húmedos dejan de ser organismos vivos y pasan a ser un sustrato alimenticio de los hongos que siguen respirando y transformando la materia seca de los granos en dióxido de carbono, agua y calor.

4. Composición del aire ambiente: A parte de la temperatura y del contenido de humedad que actúan sobre todos los procesos bioquímicos, la composición del aire también afecta el proceso respiratorio de la masa de los granos y/o semillas. Cuanto mayor sea la producción de  $\text{CO}_2$  y menor la de oxígeno, menor será la intensidad respiratoria de los granos almacenados (Ramírez, 1992).

La conservación apropiada de granos y semillas en el almacén, depende principalmente de las condiciones ecológicas de la región, del tipo de troje, bodega o almacén disponible, del tipo y condición del grano o semilla por almacenar y del tiempo del almacenamiento. En las regiones tropicales, donde el clima es cálido y húmedo, se acelera la respiración de los granos y semillas y se favorece el desarrollo de insectos y hongos; sucediendo lo contrario en las regiones de clima frío y seco (Hernández-Guzmán *et al*, 2015).

Las consecuencias de que se vea afectado el proceso respiratorio es que el peso de los granos y/o semillas se pierde. En general si se almacenan de la mejor manera, la pérdida de peso será muy lenta, sin embargo se pierde una proporción mucho mayor de grano en el almacenamiento posterior a la recolección, a causa de los insectos, microorganismos, roedores o pájaros. Estas pérdidas suelen ser muy grandes y en algunos países se estima que son hasta del 50 % (Trcheuschkner, 2001).

### 2.9.3 FACTORES QUE INFLUYEN EN EL DETERIORO DE GRANOS Y SEMILLAS.

Independientemente del uso que se le dará al producto cosechado, es importante no olvidar que el grano o la semilla son entes vivientes que respiran oxígeno del ambiente y producen como resultado bióxido de carbono, agua y energía que se traduce en calor; consecuentemente, en la medida en que se acelere el proceso de la respiración, lo hará también el deterioro del grano o la semilla. Los principales factores que determinan y acentúan las pérdidas de granos y semillas en el almacén, son:

- Altos contenidos de humedad del producto almacenado.
- Elevada temperatura y/o humedad en el ambiente.
- Elevado porcentaje de impurezas mezcladas en granos y semillas como por ejemplo; granos o semillas quebradas, restos de plantas, insectos muertos y tierra.
- Carencia de almacenes adecuados.
- Presencia de insectos, hongos, bacterias y roedores.
- Manejo deficiente.
- Desconocimiento de los principios de la conservación.

#### 2.9.4. MICROORGANISMOS QUE INFLUYEN EN LA CALIDAD DE GRANOS Y SEMILLAS.

Los microorganismos (hongos, levaduras y bacterias) causan considerables efectos nocivos en los alimentos que dan por resultado cambios que llevan a reducirlos y descomponerlos, alterando las cualidades nutricionales y en algunos casos pueden volverse tóxicos para el hombre y animales.

Los hongos son los patógenos más importantes de las plantas y también para granos y semillas. Son organismos heterótrofos uni o pluricelulares, poseen núcleo, generalmente su cuerpo es filamentosos y está formado por hifas, producen numerosas esporas que son fácilmente transportadas por el viento.

Los hongos se producen de forma sexual y asexual, la primera es por medio de esporas que son producto de la fusión de nucleotica seguida de la meiosis, la forma asexual no involucra este paso. Ciertos hongos tienen ambos estados, asexual y sexual, frecuentemente presentan su estado sexual en diferentes géneros de los hongos llamados perfectos (Moreno, 1996).

Son los principales microorganismos de la microflora presentes en los granos almacenados y constituyen la más importante causa de pérdidas y deterioro durante el almacenamiento. Prefieren ambientes o substratos con alto contenido de humedad y son los agentes responsables por el gran aumento de la respiración de los granos húmedos.

Es por ello que los hongos son los principales microorganismos de la microbiota presentes en los granos almacenados y constituyen la más importante de causa de pérdidas y deterioro durante el almacenamiento. Por lo general los hongos que atacan a los granos y/o semillas se dividen ecológicamente en hongos de campo, hongos de almacenamiento y de deterioro avanzado. El grano recién cosechado es a menudo contaminado por una variedad de hongos de campo y de almacén (Clarke, 1986).

Hongos de campo.

Son aquellos que invaden las semillas durante su desarrollo en el campo o cuando están madurando y permanecen en el campo en espera de ser cosechados. Los hongos de campo requieren contenidos de humedad en los granos de 25 a 30% por que detienen su desarrollo cuando las semillas infectadas alcanzan porcentajes de humedad inferiores. Las esporas de estos hongos pueden sobrevivir durante mucho tiempo en los granos

húmedos, sin embargo no germinan cuando el contenido de humedad esta en equilibrio con humedades relativas inferiores al 75 % (Hill, 1983). Los hongos de campo pueden provocar pérdida de la coloración natural y del brillo de los granos, con lo que se reduce el valor comercial del producto. En las semillas, además de reducir el poder germinativo y el vigor, pueden ocasionar putrefacción de las raíces y otras enfermedades de las plantas, los hongos de campo que predominan varían de acuerdo a la cosecha, localidad geográfica y clima pero la mayoría corresponde a los géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Hemilthosporium* y *Fusarium* (Pomeranz, 1982)

Hongos del almacenamiento.

Las fuentes de contaminación se encuentran en los graneros y silos por ser nahí donde estos hongos encuentran las condiciones favorables para su desarrollo y donde las esporas permanecen en estado latente. La característica principal de los hongos de almacén es du habilidad que tienen para crecer en granos y semillas que tienen bajos contenidos de humedad (13.5-14%) Estos hongos se desarrollan después de la cosecha, cuando el contenido de humedad de los granos está en equilibrio con una humedad relativa superior al 65 o 70 por ciento. Los hongos que proliferan con mayor frecuencia en los granos almacenados son algunas especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. (Hill, 1983)

*Aspergillus* es el nombre genérico para designar a un grupo de hongos, este grupo de hongos se encuentra entre los seres vivos más abundantes en la naturaleza. Las condicioes que favorecen el crecimiento de este hongo son altas temperaturas, estas condiciones favorecen la producción de aflotoxinas a partir de estos hongos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus paraiticus*, *Aspergillus niger*. Los mohos de este género causan el deterioro de muchos alimentos. También producen la inhibición de la germinación junto con cambios de color, calentamiento, enmohecimiento, apelmazamiento y finalmente podredumbre de las semillas (Kulik et al, 1987).

Si los granos no se cosechan a tiempo, están expuestos a ser invadidos por los hongos de almacén, dado que el grano empieza a perder humedad y a ser dañado por insectos, ya que el almacenamiento comienza prácticamente después de la cosecha. Uno de los principales efectos que tienen estos hongos en los granos y semillas es que hacen que pierda la viabilidad y por ende ocasionan la podredumbre y perdida de la cosecha (Christensen, 1972)

Los hongos de almacén junto con los insectos son responsables de la mayoría del deterioro del grano almacenado, así como del calentamiento

y endurecimiento, la producción de micotoxinas, la generación de olores y sabores desagradables y la completa pérdida del grano (Moreno, 1996). Durante el deterioro, la proporción de granos invadidos por los mohos de almacenamiento va aumentando al pasar el tiempo (Claridaes, 2005).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Los granos y semillas presentan como problemática una alta contaminación por hongos, el cual se ve afectado por temperatura y humedad. Las técnicas convencionales para la conservación de granos y semillas son sistemas químicos altamente contaminantes, tanto para el medio ambiente como seres vivos los cuales sirven para el control y prevención de crecimientos microbianos.

Por esta razón es necesario buscar nuevos métodos para la conservación y prevención de crecimientos microbianos para granos y semillas, el cual es un recubrimiento a base de ceras, las cuales no presentan ningún riesgo para el medio ambiente y seres vivos debido a que son reactivos nivel GRAS.

Con base en lo dicho anteriormente, el presente trabajo pretende desarrollar un recubrimiento capaz de inhibir el crecimiento de hongos y así conservar los granos y semillas, razón por la que se cree que el sistema propuesto en la presente investigación son innovadores y benéficos en el área de conservación de alimentos, particularmente granos y semillas.

#### 4. HIPÓTESIS

Si las nanopartículas lipídicas sólidas funcionan como agentes protectores de microorganismos patógenos, entonces los granos y semillas al ser recubiertos con las NLS aplicadas por el método de aspersión contribuirá a incrementar su conservación y vida útil.

## 5. OBJETIVOS

### Objetivo general

Realizar recubrimientos en talla submicrónica, a base de reactivos nivel GRAS, a granos y semillas aplicados por método de aspersión, monitoreando su capacidad para inhibir el crecimiento de distintos tipos de hongos.

### Objetivos particulares

1. Caracterizar las nanopartículas lipídicas sólidas obtenidas, con el fin de optimizar la formulación y las condiciones de proceso, para la obtención de los recubrimientos.
2. Emplear nanopartículas lipídicas sólidas, como recubrimiento comestible para granos y semillas de maíz, para evaluar su poder de fungicida y alargar la vida de anaquel de dicho producto.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 MATERIALES

Los reactivos, equipos y materiales utilizados para el presente estudio se muestran en la Tabla 2 y Tabla 3.

Tabla 2. Reactivos y Equipos utilizados en la metodología experimental

Reactivos	Equipos
<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Agua destilada</li> <li>❖ Cera Candeuba<sup>®</sup></li> <li>❖ Alcohol Polivinílico (PVA)</li> <li>❖ Sorbato de Potasio</li> <li>❖ Polietilenglicol 6000</li> <li>❖ Medio PDA (Dibico)</li> <li>❖ Tween 80</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Parrilla de calentamiento</li> <li>❖ Balanza analítica (Boeco<sup>®</sup> BBC32, Alemania)</li> <li>❖ Zeta-sizer<sup>®</sup> 4 (Malvern Ltd., Orsay, France).</li> <li>❖ Ultra-Turrax T50 (Labitechnik Sataufen, Alemania)</li> <li>❖ Pistola de aspersion (Walther pilot, Alemania)</li> <li>❖ Pistola de secado</li> <li>❖ Bomba peristáltica</li> <li>❖ Bombo para recubrimiento</li> <li>❖ Cámara de Neubauer</li> <li>❖ Estufa</li> </ul>

Tabla 3. Material utilizado en la metodología experimental

Material
<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Vasos metálicos de 500, 1000 mL</li> <li>❖ Vasos de precipitado de 50 y 100 mL</li> <li>❖ Probeta de 250 mL</li> <li>❖ Matraces de 250 mL</li> <li>❖ Micropipetas de 1000, 200, microlitros</li> <li>❖ Varilla de vidrio</li> <li>❖ Cajas Petri</li> <li>❖ Espatula</li> <li>❖ Frascos de vidrio</li> <li>❖ Termómetro infrarrojo</li> <li>❖ Termómetro de mercurio</li> <li>❖ Picnómetro de metal (Gardcor, Estados Unidos)</li> </ul>

## 6.2 DIAGRAMA DE FLUJO

El siguiente diagrama de flujo Figura 5, esquematiza las etapas realizadas para el desarrollo de la investigación.

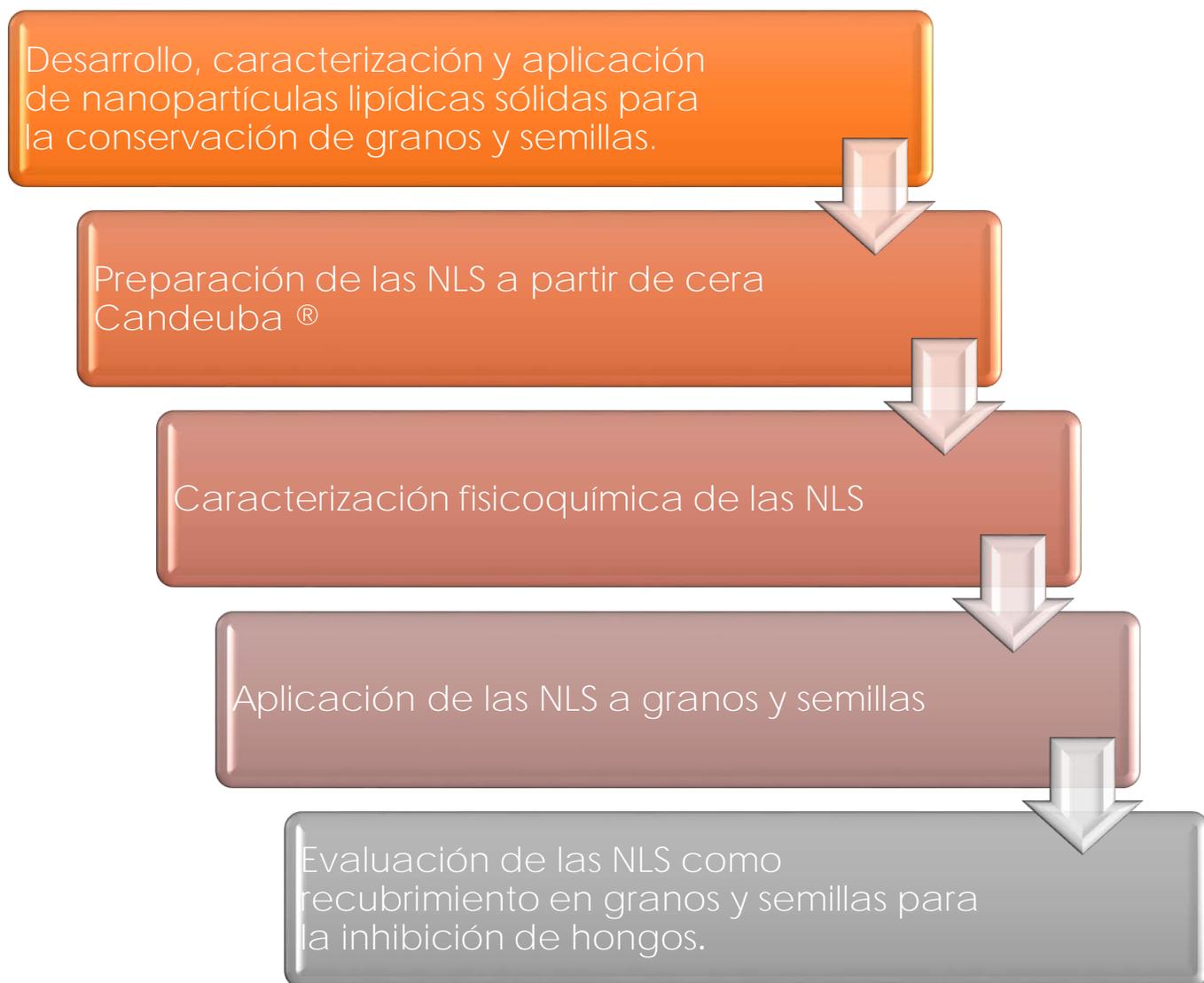


Figura 5. Diagrama de flujo de la metodología experimental.

### 6.3 PREPARACIÓN DE LAS NLS

Todos los reactivos utilizados durante la elaboración de las NLS son nivel GRAS, debido a que esta emulsión, está destinada a un recubrimiento de semillas y granos de consumo humano.

Para la formulación de las NLS, se utilizó cera Candeuba, la cual es una formulación especial, sobre una base netamente vegetal, constituida principalmente por cera de candelilla y ésteres de origen vegetal. El lípido se llevó a una temperatura al menos cinco grados por arriba de su punto de fusión en una proporción del 10% del total del recubrimiento (fase oleosa) a una temperatura controlada de 80°C.

Se añadieron agentes estabilizantes de uso alimenticio no iónicos para evitar la coalescencia, derivados de ésteres de ácidos grasos como el alcohol polivinílico (PVA) en una proporción del 2.5%.

Al tener los componentes en su punto de fusión se añadió el resto de agua destilada (Fase acuosa). Dicha fase se dispersa en agua a una temperatura de 80°C para evitar la polimerización del PVA.

Teniendo las dos fases preparadas a la temperatura de 80°C, se agregó lentamente la fase oleosa a la acuosa con agitación mecánica usando propela marina a 3000 rpm para formar la emulsión aceite en agua (w/o).

Las NLS se elaboraron mediante dispersión en caliente, mediante una agitación mecánica por la técnica de rotor estator Ultra-Turrax T50 (Labitechnik Sataufen, Alemania) de 1 a 5 ciclos, debido a que es el número de ciclos recomendados para esta técnica (Palma et al, 2007).

La temperatura se mantuvo constante durante el proceso, las condiciones establecidas para la técnica fueron elevar la temperatura de la cera 10°C por encima del punto de ebullición de esta, puesto que bajo esta condición la viscosidad del lípido disminuye, favoreciendo la formación de nanopartículas, sin embargo se debe cuidar la temperatura que no sobre pase el límite ya mencionado, debido a que se puede generar la degradación del lípido en este caso la cera Candeuba (Jiménez et al, 2009).

El sistema se dejó enfriar gradualmente a temperatura ambiente.

La dispersión preparada se caracterizó por su tamaño de partícula mediante la técnica de dispersión láser con un ángulo fijo de 90° utilizando el equipo Zeta-sizer® 4 (Malvern Ltd., Orsay, France).

Posteriormente se le añadió sorbato de Potasio ( $C_6H_7KO_2$ ) en una concentración de 0.1% (p/v), esta sal se añadió para poder controlar inocuidad de las NLS y así no haya interferencias durante la experimentación.

Se añadió humectante PEG 6000, para dar resistencia y humectación a las NLS, en una proporción del 0.5 %.

La formulación de las NLS, se presenta en la Tabla 4:

Tabla 4. Formulación para NLS

REACTIVO	% P/V
Cera Candeuba ®	10.0
Alcohol Polivinilico (PVA)	2.5
Polietilenglicol 6000	0.5
Sorbato de Potasio	0.1
Agua destilada	87.5

## 6.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS NLS

La caracterización de las NLS se llevó a cabo mediante las siguientes pruebas fisicoquímicas.

### 6.4.1 TAMAÑO DE PARTÍCULA Y PDI

El tamaño de partícula de los sistemas coloidales fue determinado mediante la técnica de dispersión de luz láser con un ángulo fijo de 90° utilizando el equipo Zeta-sizer (Malvern, Francia).

Se diluyó una gota de la dispersión de NLS en 15 mL de agua destilada. La muestra se colocó en una celda de cuarzo para ser medido a una longitud de onda de 630 nm a 25 °C.

### 6.4.2 POTENCIAL ZETA

El potencial zeta se determinó mediante electroforesis de partícula empleando un equipo Zeta-sizer (Malvern, Francia). Para realizar las mediciones se utilizaron dispersiones diluidas, midiendo el potencial zeta con relación a la movilidad electroforética, tomando como referencia soluciones de poliestireno que es igual a -55mV.

### 6.4.3 DENSIDAD DE LAS NLS

La densidad se determinó en un picnómetro de metal (Gardcor, Estados Unidos). Primeramente se pesó el picnómetro limpio y vacío, posteriormente el picnómetro se pesó con agua destilada y con NLS, estas últimas no deben estar diluidas.

Se aplicó la siguiente fórmula:

$$p = \frac{\text{peso del picnómetro con muestra (g)} - \text{peso del picnómetro vacío (g)}}{\text{peso del picnómetro con agua (g)} - \text{peso del picnómetro vacío (g)}}$$

#### 6.4.4 VISCOSIDAD DE LAS NLS

La viscosidad se realiza mediante el viscosímetro de Zeifuchs Cross Arm, donde se toma una muestra y se toma el tiempo que tarda en pasar. Aplicando la siguiente fórmula para obtener la Viscosidad en cP:

$$v = \frac{t \times 0.02732}{p}$$

#### 6.5 APLICACIÓN DE NLS A GRANOS Y SEMILLAS.

Para el recubrimiento de las semillas y granos, todo el material que se utilizó fue desinfectado, para que no hubiese interferencias. En las pruebas microbiológicas que se realizaron en la experimentación.

Las semillas y granos utilizados deben tener un ciclo de vida no mayor a 6 meses, debido a que transcurrido este tiempo, se considera un grano y/o semilla viejo, si se tuviera este caso, la semilla y/o grano podría venir contaminada, y no se observaría el uso benéfico de las NLS.

Las semillas y granos de maíz se humectaron durante 16 horas, el agua utilizada para la humectación fue agua destilada.

Una vez humectadas las semillas y granos de maíz, se procedió a recubrir con las NLS, como parte del proceso de evaluación de las NLS, fue recubierto por el método de recubrimiento de película con una Pistola de aspersión (Walther pilot, Alemania) en bombo como se muestra en la Figura 7 y Figura 8, utilizando las NLS en una disolución de 22.7 mL del concentrado original en 97.3 mL de agua destilada, una vez aplicado el recubrimiento en la superficie del maíz, se sometió a un secado en un intervalo de temperatura 40°C a 45°C, la cual fue óptima, para no perder la humedad de granos y semillas, de igual manera, a una velocidad de 20 rpm. El equipo utilizado fue desinfectado con alcohol etílico 96°.



Figura 7. Equipo de recubrimiento utilizado para granos y semillas



Figura 8. Equipo de recubrimiento utilizado para granos y semillas

## 6.6 RETO MICROBIANO PARA GRANOS Y SEMILLAS.

Los hongos utilizados fueron de la clase de los hifomicetos, *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*.

Se sembraron ambos hongos por el método de picadura en un medio PDA, dejando crecer y esporular dichos hongos, para realizar la suspensión de esporas.

La suspensión se realizó con una solución tween 80 al 10% (Cañedo et al, 2004). Esta solución se llevó a un volumen total de 100 mL, para realizar el conteo de esporas mediante la técnica de cámara de Neubauer, Figura 9.

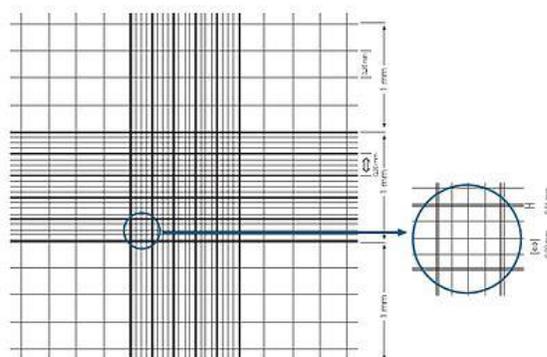


Figura 9. Cuadrícula de cámara de Neubauer

La serie de experimentos que se realizó se muestra en el Tabla 5.

Tabla 5: Diseño experimental de inoculación de hongos para semillas y granos.

Semilla de maíz		Grano de maíz	
Recubierto	No cubierto	Recubierto	No cubierto
6 Frascos de <i>Aspergillus niger</i>			
6 frascos de <i>Aspergillus flavus</i>			

Para poder observar el uso benéfico de las NLS, utilizadas como recubrimiento en granos y/o semillas, se realizó una inoculación al medio (granos y/o semillas) Tabla 5, refiriendo un blanco el cual fueron las muestras de maíz sin recubrimiento. Esta experimentación se realiza con 6 repeticiones para cada hongo.

El tiempo de crecimiento para los hongos inoculados se realizó durante 2 semanas a una temperatura de 28.8°C, para ello se realizó un seguimiento cada 2 días al proceso de crecimiento de los hongos inoculados.

La metodología empleada en la investigación se muestra de manera resumida en la Figura 10.

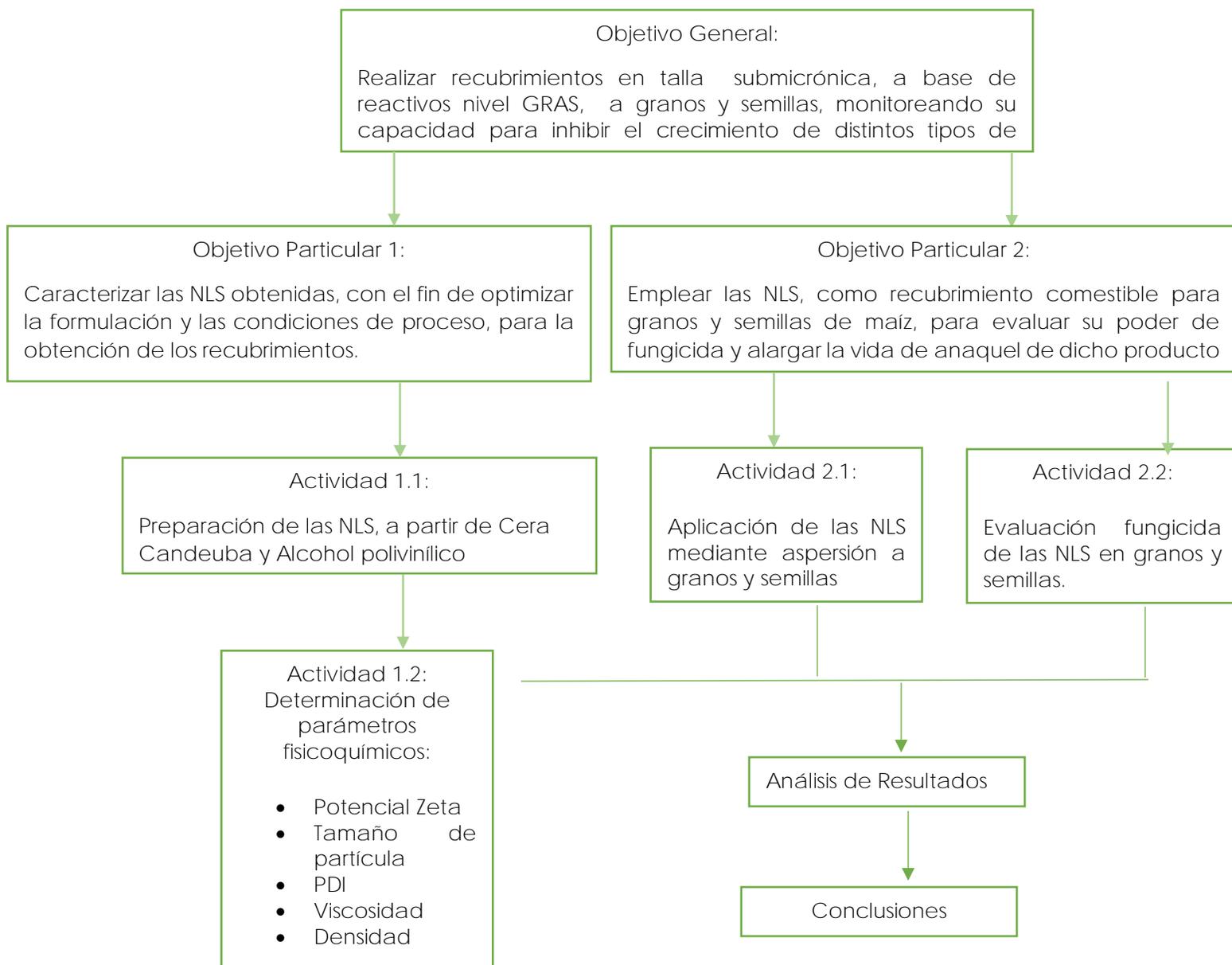


Figura 10. Cuadro metodológico

## 7. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 7.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS NLS

Las características fisicoquímicas básicas como: Tamaño de partícula, viscosidad, densidad, entre otras nos proporcionan el comportamiento y propiedades de las NLS. En la Tabla 6 se proporcionan los datos:

Tabla 6. Resultados de caracterización fisicoquímica para NLS

		$\sigma$
Tamaño de partícula (nm)	432.5	0.2624
Índice de polidispersión (nm)	0.165	0.0431
Potencial Zeta (mV)	-28.9	0.1247
Viscosidad (cP)	51.885	0.0943
Densidad (g/mL)	1.0036	0.1314

#### 7.1.1 MEDICIÓN DEL TAMAÑO DE NANOPARTÍCULAS.

Entre los parámetros más importantes a considerar en la preparación de sistemas coloidales se encuentra el tamaño de partícula el cual debe ser menor de  $1\mu\text{m}$  para ser considerado como nanopartícula.

Los valores que tienen influencia en el tamaño de partícula de las NLS fueron términos lineales de la velocidad de agitación y la concentración de alcohol polivinílico. El efecto del PVA que fue utilizado por el método de homogenización en caliente, establece que el tamaño de partícula disminuye considerablemente entre 0.5- 5% de estabilizante, observándose pocos cambios por debajo del 5% (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1996).

Moinard- Chécot, *et al.*, ha reportado que el incremento en la concentración de alcohol polivinílico incrementa el tamaño de partícula, cuando la concentración del alcohol polivinílico es mayor al 5% (p/v), este fenómeno es explicado debido al incremento de la viscosidad del sistema.

Por lo tanto, se empleó 2.5% (p/v) de alcohol PVA, con el fin de obtener tamaño de partícula, pequeños. Gracias a esto, se obtuvo un tamaño de partícula de 432.5 nm, Tabla 6, el cual es considerado como un buen tamaño de nanopartícula para las NLS. Reportado en la literatura, el

tamaño óptimo en nanopartículas es de 1 a 1000 nm, como se mencionó el tamaño de partícula utilizado para las nanopartículas fue de 432.5 nm, estando dentro de los parámetros óptimos para el buen funcionamiento de las NLS como recubrimiento de semillas y granos.

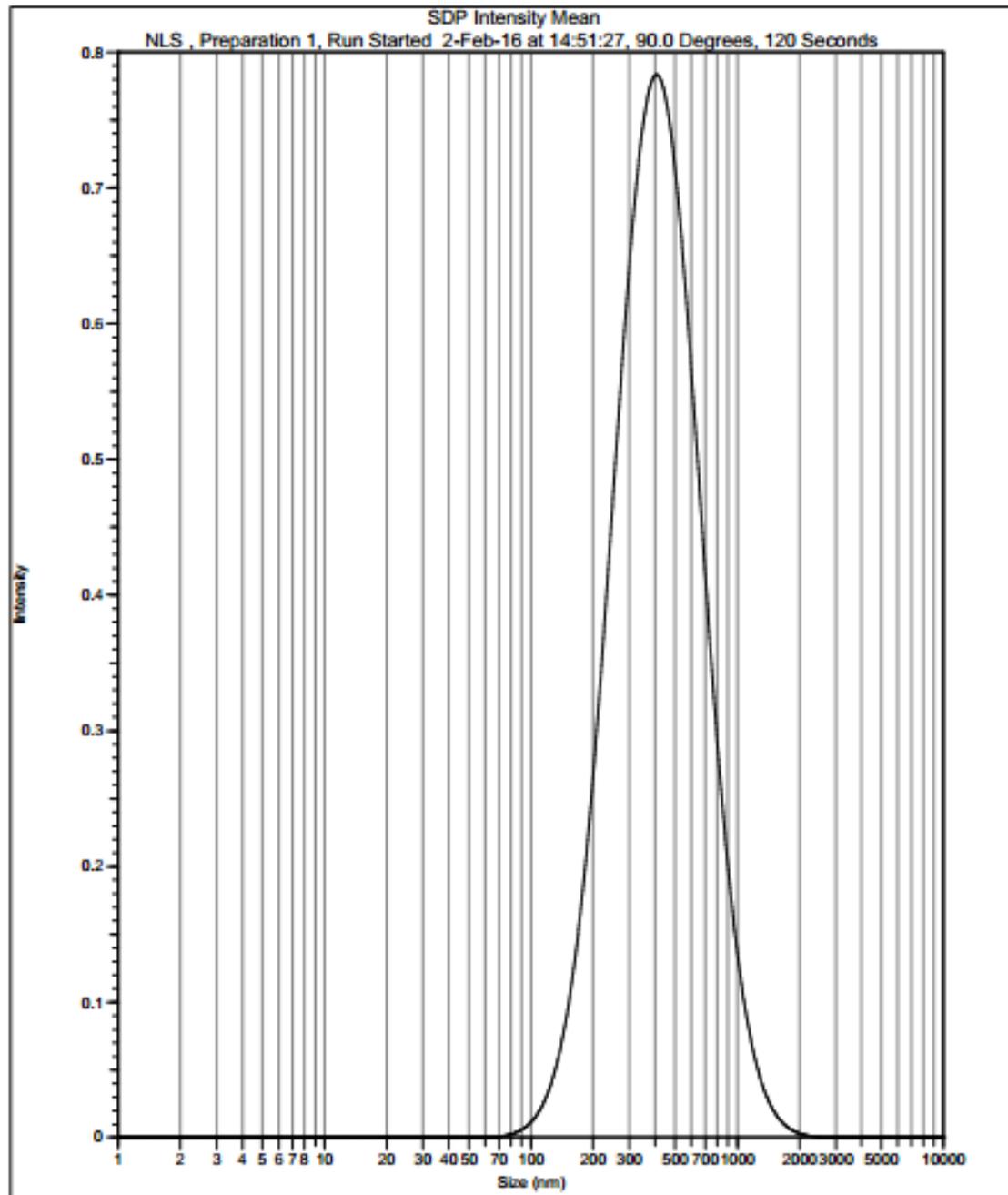


Figura 11. Medición de Tamaño de Partícula

De acuerdo a los datos mostrados en la Tabla 6 y la Figura 11. Se puede observar que el 99.6% de las NLS, Figura 11, corresponde a un tamaño de partícula de 434.1 nm, teniendo una desviación estándar  $\pm 0.2624$  con estos datos, obtuvimos el coeficiente de varianza con la siguiente fórmula:

$$C_V = \frac{\sigma}{|\bar{x}|} \cdot 100$$

Obteniendo un coeficiente de variación de 0.060%, lo cual indica que existe una homogeneidad en los datos, de esta forma no existe una dispersión de datos considerable para las NLS y así el promedio del tamaño de partícula es reproducible.

### 7.1.2 INDICE DE POLIDISPERSIÓN.

El PDI para las NLS muestra la presencia de aglomeración en la dispersión de las NLS, cuando se obtiene un PDI de 1 se dice que la dispersión no ha sido aglomerada, los resultados de la prueba se muestran en la Tabla 6.

La estabilidad física de las NLS radica en la capacidad de la suspensión a permanecer dispersa y no presentar algún tipo de cristalización (Weiiss et al, 2008), cabe destacar que el tamaño de partícula está relacionado al índice de polidispersión ya que al disminuir el tamaño de partícula la superficie de contacto entre ellas se reduce y así se evita la aglomeración de las partículas presentes en el sistema (Jiménez et al, 2009).

Los datos mostrados en la Tabla 6 indica que no hubo una aglomeración considerable, debido a que el tamaño de partícula fue adecuado y como se había mencionado al tener un tamaño de partícula pequeño, será menor la aglomeración de las moléculas presentes en la dispersión de las NLS.

### 7.1.3 POTENCIAL ZETA.

Por otro lado, sobre las NLS se midió su potencial zeta, siendo éste de gran importancia de tomar va relacionado con proporciona información acerca de la estabilidad en dispersiones coloidales. El potencial zeta indica el grado de repulsión entre partículas adyacentes, cargadas en una dispersión, para las moléculas y partículas que son lo suficientemente pequeñas como es el caso de las NLS producidas, un alto potencial zeta le confiere estabilidad, es decir, la dispersión se resistirá a la agregación. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

El valor que se obtuvo fue de -28.9 mV, un sistema submicrónico para que sea estable por repulsión electrostática debe tener un valor cercano a +/-30 mV (Müller *et al*, 2001). Este valor obtenido resulta óptimo para la caracterización, por lo que se puede considerar que las NLS poseen estabilidad física, ya que indica que tiene poca posibilidad de agregación temporal debido a que los valores son inferiores o cercanos a -30 mV por lo que la agregación de partículas en la dispersión no se formará tan fácilmente.

Es importante mencionar que cuando se adiciona un modificador de superficie en este caso PEG, el potencial Z negativo es disminuido, incrementando la estabilidad de las partículas, esto se vio favorecido al añadir PEG como plastificante en el sistema de recubrimiento.

### 7.3. RETO MICROBIANO PARA GRANOS Y SEMILLAS

Primeramente se humectaron los granos y semillas cuya finalidad fue tener las mejores condiciones para evaluar el recubrimiento, la humedad necesaria para generar el crecimiento de microorganismos en granos y semillas. La humedad requerida y lograda fue de 15.5 %(p/p).

Para mostrar el uso benéfico de las NLS como recubrimiento, se realizó una inoculación a granos y semillas con dos tipos de hongos que afectan la conservación de estos. Primeramente como se muestra en la Tabla 7 y Tabla 8, se observan los resultados obtenidos, para el conteo de esporas de los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger*.

Tabla 7. Conteo de esporas *Aspergillus flavus*

<i>Aspergillus flavus</i>				
Primer conteo				
12	17	10	14	4
17	13	24	17	16
20	15	25	26	13
22	23	15	13	18
25	12	20	14	10
Número de esporas:		207,500,000		
Segundo conteo				
7	13	3	5	11
3	7	14	10	9
6	10	9	11	14
12	13	7	16	10
11	7	9	15	9
Número de esporas:		120,500,000		
		$\bar{x}=164,000,000$		

Tabla 8. Conteo de esporas *Aspergillus niger*

<i>Aspergillus niger</i>				
Primer conteo				
18	18	10	19	19
24	16	13	15	14
18	17	16	13	13
10	11	13	16	11
11	15	12	12	17
Número de esporas:		185,500,000		
Segundo conteo				
17	12	18	17	18
14	12	15	16	24
10	20	9	17	16
9	11	13	14	15
12	10	17	18	18
Número de esporas:		186,000,000		
		$\bar{x}=185,750,000$		

En la retícula central, la cámara de Neubauer Figura 12, tiene un cuadrado primario que contiene nueve cuadrados secundarios, cada uno de ellos dividido a su vez en 16 cuadrados terciarios. El cuadrado secundario central contiene no 16, sino 25 cuadrados, cada uno de ellos dividido a su vez en 16 cuadrados cuaternarios. En los bordes de este cuadrado central se cuentan las esporas, utilizando sólo los cuadrados de los bordes del terciario central y uno de los centrales. En los secundarios de los bordes superiores e inferiores de la cámara se hace el recuento de esporas.

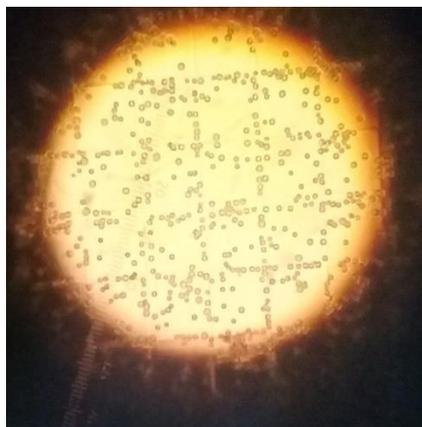


Figura 12. Conteo de esporas

El cálculo de esporas, se realizó por la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Partículas}}{\mu\text{l}} = \frac{\text{Partículas contadas}}{((\text{Superficie contada}(\text{mm}^2) \times \text{Profundidad de la cámara}(\text{mm})) \times \text{Dilución})}$$

Se efectúa la dilución correspondiente para cada hongo y así tener un aproximado de 30,000 esporas por hongo, esta dilución se utiliza para inocular cada frasco, con las muestras de semilla y grano.

La evaluación con *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* para observar el uso benéfico de las NLS es primordial considerando que es la principal causa de deterioro de semillas y granos almacenados con un contenido de humedad superior al 15%. La sequía y las altas temperaturas favorecen el desarrollo de aflatoxina que son tóxicas para el ser humano y los animales que además, afectan el sabor del grano. La infección de la semilla puede reducir la germinación.

A continuación se presentan los resultados para *Aspergillus flavus*, así como su comparación entre grano y/o semilla cubierto y ni cubierto Tabla 9, Tabla 10, Tabla 11 y Tabla 12.

Tabla 9. Grano no cubierto inoculado por *Aspergillus flavus*

Grano no cubierto		
	Total de granos	Granos contaminados con <i>Aspergillus flavus</i> .
	50	2
	50	3
	50	3
	50	5
	50	4
	50	6
Total	300	23

Tabla 10. Grano cubierto inoculado por *Aspergillus flavus*

Grano cubierto		
	Frasco	Granos contaminados con <i>Aspergillus flavus</i> .
	50	1
	50	2
	50	1
	50	0
	50	0
	50	3
Total	300	7

Se obtuvo una mejora del 69.56% con el uso de las NLS como recubrimiento lo cual resalta el uso benéfico de la dispersión

Tabla 11. Semilla no cubierta inoculada por *Aspergillus flavus*

Semilla no cubierta		
	Frasco	Semilla contaminados con <i>Aspergillus flavus</i> .
	50	50
	50	50
	50	50
	50	50
	50	50
	50	50
Total	300	300

Tabla 12. Semilla cubierta inoculada por *Aspergillus flavus*

Semilla cubierta		
	Frasco	Semilla contaminados con <i>Aspergillus flavus</i> .
	50	7
	50	5
	50	4
	50	0
	50	0
	50	1
Total	300	17

El uso de las NLS para las semillas resultó mucho más representativo ya que se logró un beneficio con el uso de NLS del 94.33%.

Al tener los resultados, se realizó la comparación por medio de gráficos los cuales son expuestos en la Figura 13 para granos y Figura 14 para semillas de esta forma es más factible observar el uso de las NLS como recubrimiento antimicótico.

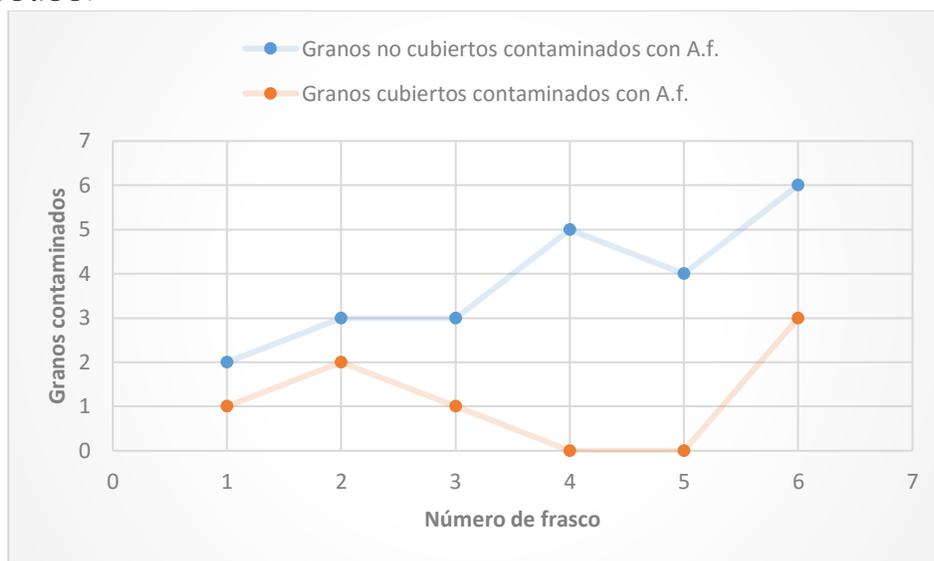


Figura 13. Comparación de granos cubiertos y no cubiertos inoculados por *Aspergillus flavus*

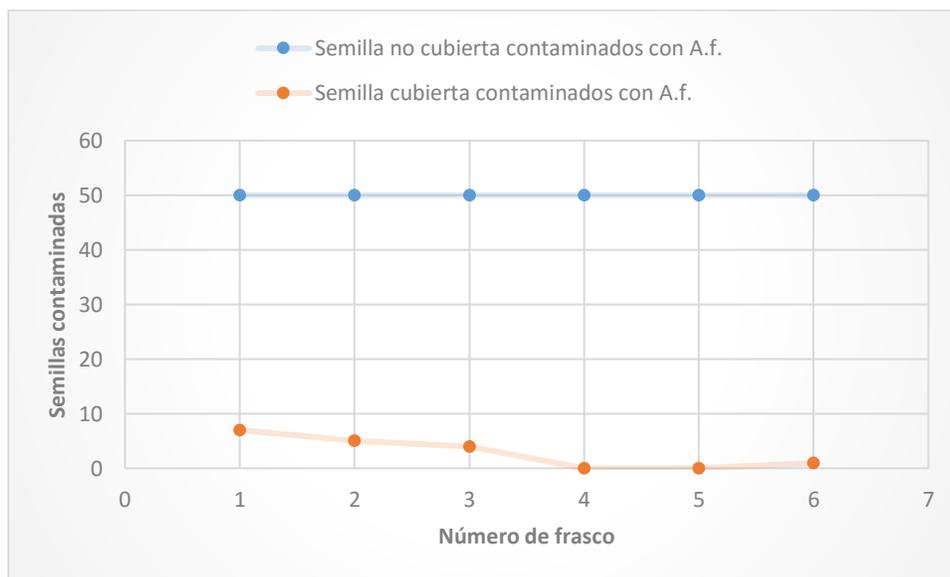


Figura 14. Comparación de semillas cubiertas y no cubiertas inoculados por *Aspergillus flavus*

Las colonias de *Aspergillus flavus*, cuando contaminan los granos y semillas se expanden, presentan una morfología color verde amarillento muy claro, o verde amarillento intenso, o verde oliváceo o café. Sin embargo, se hace mostrar en la Figura 15a la ausencia de la coloración verdosa (grano cubierto) y en la Figura 15b, muestra el color característico de un grano contaminado (grano no cubierto).



Figura 15 a. Semilla con recubrimiento



Figura 15 b. Semilla sin recubrimiento

A continuación se muestran los resultados obtenidos para *Aspergillus niger*, así como su comparación entre grano y/o semilla cubierto y no cubierto. Tabla 13, Tabla 14, Tabla 15 y Tabla 16.

Tabla 13. Grano no cubierto inoculado por *Aspergillus niger*

Grano no cubierto		
	Frasco	Granos contaminados con <i>Aspergillus niger</i> .
	50	3
	50	2
	50	2
	50	2
	50	3
	50	3
Total	300	15

Tabla 14. Grano cubierto inoculado por *Aspergillus niger*

Grano cubierto		
	Frasco	Granos contaminados con <i>Aspergillus niger</i> .
	50	1
	50	1
	50	1
	50	1
	50	1
	50	1
Total	300	6

Se obtuvo una mejora del 60% en inhibir la contaminación del hongo inoculado, ya mencionado en los granos.

Tabla 15: Semilla no cubierta inoculada por *Aspergillus niger*

Semilla no cubierta		
	Frasco	Semillas contaminados con <i>Aspergillus niger</i> .
	50	21
	50	50
	50	50
	50	50
	50	50
	50	36
Total	300	257

Tabla 16. Semilla cubierta inoculada por *Aspergillus niger*

Semilla cubierta		
	Frasco	Semillas contaminados con <i>Aspergillus niger</i> .
	50	4
	50	3
	50	2
	50	3
	50	1
	50	2
Total	300	15

Para el caso de las semillas inoculadas con *Aspergillus niger* se obtuvo una capacidad inhibitoria del 94.16%.

Las colonias de *Aspergillus niger* que se inocularon en granos y semillas, crecen lentamente, como se muestra en la Figura 16 y Figura 17, como se observa la diferencia del crecimiento del hongo inoculado un grano con recubrimiento y una sin recubrimiento.

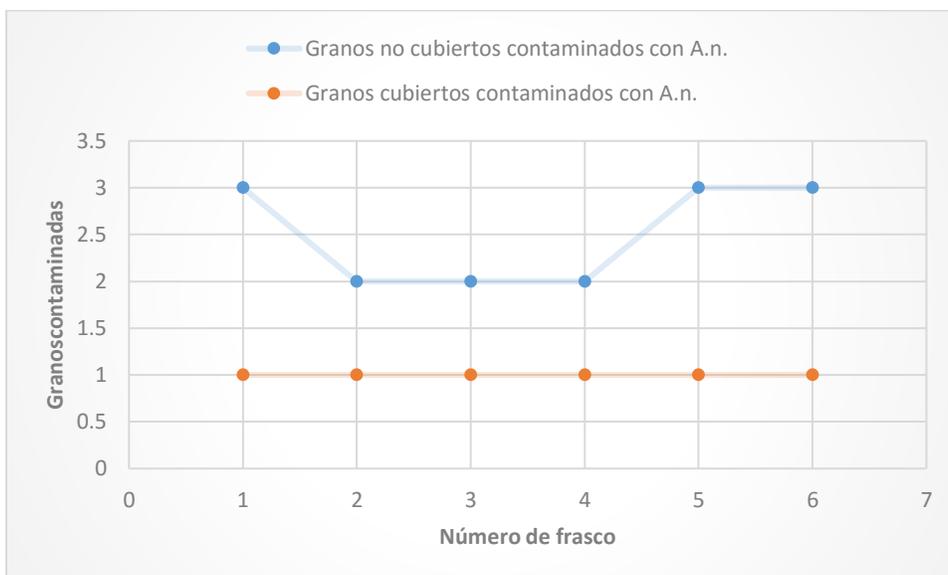


Figura 16. Comparación de granos cubiertos y no cubiertos inoculados por *Aspergillus niger*.

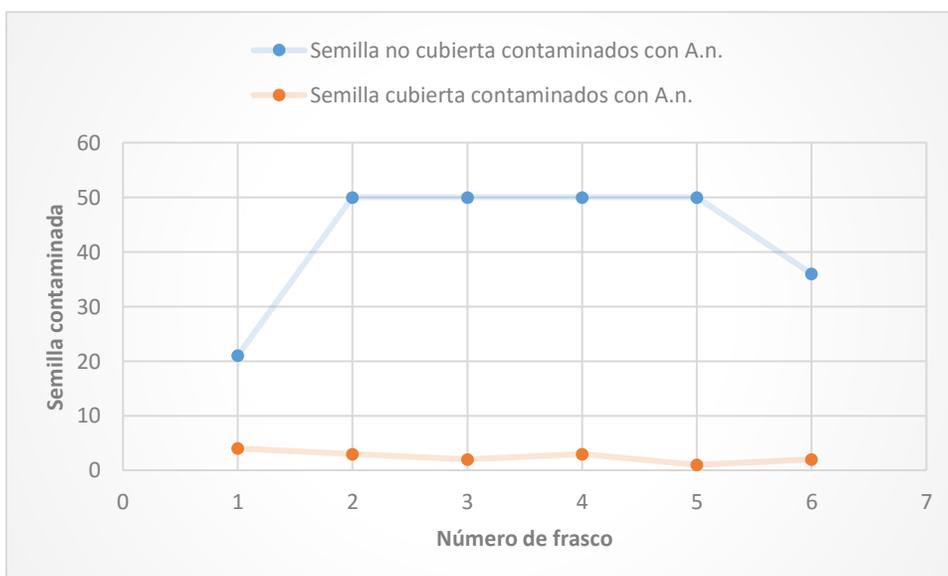


Figura 17. Comparación de semillas cubiertas y no cubiertas inoculados por *Aspergillus niger*

Las colonias de *Aspergillus niger* están constituidas por un micelio basal entre compacto y bastante suelto, de color blanco o tenuamente amarillo, que produce abundantes estructuras conidiales, erguidas y por lo general apiñadas comúnmente de color negro carbón, pero a veces negro parduzco intenso, que cubren toda la colonia excepto por un estrecho margen de crecimiento, como se muestra en la Figura 18 a y Figura 18 b

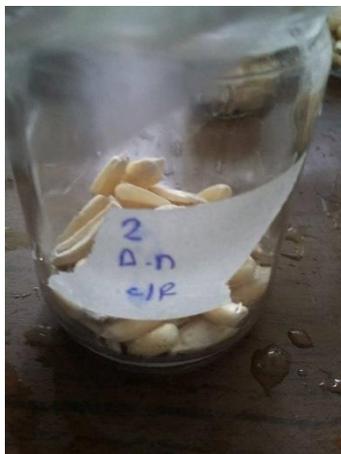


Figura 18 a: Grano cubierto



Figura 18 b: Grano no cubierto

Los resultados obtenidos en la inoculación de granos y semillas con *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* revelaron claramente el uso benéfico y la eficiencia de las NLS como recubrimiento, esto se puede explicar parcialmente porque las ceras en este caso cera Candeuba tienen propiedades antimicóticas

Basado en esto, se probó la acción antimicótica de dicha cera, obteniendo una actividad antifúngica considerable en granos y semillas recubiertos con NLS contra los no recubiertos, debido a que la cera Candeuba contiene antioxidantes naturales que dañan la membrana celular (Hough et al, 1993) de los hongos la cual está conformada por quitina por lo que no se permite la reproducción y crecimiento de los hongos, de esta forma se evita la contaminación en los granos y semillas.

Su utilización ayuda a retardar la alteración oxidativa, debido a que esta cera presenta alto contenido de ésteres de sacarosa los cuales cumplen con la función de no permitir el crecimiento de los hongos debido a que se lleva a cabo la lisis osmótica. El cual es un proceso biológico donde se rompe la membrana celular del hongo debido a la presión osmótica, en este caso, se introduce tanto líquido en las células de los hongos que terminan reventando (el líquido del plasma celular pasa hacia la cera, hasta disecarse la misma) lo dicho anteriormente se basa en los artículos de

García, 2004 y Martín Belloso *et al*, 2005, conforme a lo reportado (Blasco, 2006).

Podemos observar que la actividad antifúngica de las NLS es muy efectiva cuando se trata hongos de almacén y en comparación con lo reportado por Schuef, 2006 donde se presentan fungicidas a base de químicos organofosforados utilizados en la actualidad, las NLS no presentan alguna interferencia o daño para los granos y semillas debido a que utiliza componentes de nivel GRAS, estos no son contaminantes para el medio ambiente al igual que para el ser humano, ya que no contiene compuestos organofosforados, antimicóticos, sin embargo las sustancias siguen siendo activas con cierta toxicidad.

El efecto de NLS se puede observar mejor en la semilla, debido a que esta tuvo un mayor tiempo de almacenamiento al del grano antes de ser recubiertas, así que el uso de NLS resultó benéfico y con datos satisfactorios para las semillas.

Este recubrimiento alarga la vida útil de semillas y granos manteniendo sus propiedades físicas y mecánicas sin afectar su funcionalidad y propiedades (no modifica la germinación del grano y la calidad de semilla) además previene la contaminación microbiológica en particular por hongos un problema muy común durante el almacenamiento. Por lo tanto aumenta la vida útil del producto en los silos.

## 8. CONCLUSIONES.

De acuerdo a los resultados obtenidos a lo largo de la investigación se concluye lo siguiente.

Se logró potencializar las NLS como recubrimiento, mejorando sus características físicas, con base en los resultados fisicoquímicos, demostrándose que un tamaño de 432.5 nm presenta gran estabilidad física y química, lo que permitió aplicarlas en el producto deseado de manera eficaz.

Los sistemas nanoparticulados desarrollados (NLS) permitieron elaborar un recubrimiento estable para el almacenamiento, demostrando el uso NLS para el recubrimiento de granos y semillas el cual no se encuentra reportado y mucho menos para los fines propuestos, hecho que motiva el hallazgo fortuito de haber encontrado que granos y semillas recubiertas con recubrimientos a base de ceras después de prolongados periodos de tiempo no presentaron crecimiento de hongos en contraste con granos y semillas sin recubrir bajo las mismas condiciones.

El desarrollo de las NLS como recubrimiento, resulta benéfico para la sociedad debido a que se prolonga la vida de anaquel de granos y semillas, dando como resultado, el no generar pérdidas significativas por causas de contaminantes microbiológicos, así se conserva de forma sana los granos y semillas para el consumo de la sociedad, sin que implique algún riesgo de toxicidad por el uso del recubrimiento.

Los resultados obtenidos aportan información esencial sobre las propiedades de los recubrimientos comestibles adecuadas para aumentar la vida útil de los productos alimenticios y mejorar su calidad, contribuyendo a optimizar su obtención y comportamiento y satisfacer la demanda de los consumidores por productos cada vez más naturales, seguros y benignos con el medio ambiente.

Con la experimentación realizada fue posible corroborar la hipótesis planteada, estableciendo que los recubrimientos en talla submicrónica potencializan el uso de ceras como recubrimientos para así evitar la contaminación por hongos.

## 9. PERSPECTIVAS.

Con el presente trabajo se espera contribuir a la divulgación de tecnologías de bajo impacto ambiental, como es el uso de NLS, debido a que se cumple con los principios de la química verde los cuales son, 7 “Utilización de materias primas renovables” y 2 “Generar productos biodegradables”, con lo cual se busca en un futuro contribuir con el camino hacia la sostenibilidad.

Con la investigación realizada, se espera que científicos del ámbito farmacéutico indaguen sobre las NLS de uso alimenticio como las presentadas en este trabajo, probando distintos tipos de ceras y formas de aplicación, siendo evaluados a granos y semillas de acuerdo a la problemática que se encuentre.

Llevar la investigación a nivel industrial, para determinar si es posible o no la aplicación de recubrimientos a este nivel, al igual que en el uso para silos y observar qué tan factible es utilizar los NLS para evitar contaminaciones.

## 10. REFERENCIAS

Andrade B., H.J. "Mejoramiento del vigor en semillas de maíz y su relación con emergencia y rendimiento" Tesis, M.C. Colegio de Postgraduados (1992) 14-18.

Baldwin, E, R Hagenmaier y Bai J. "Edible coatings and films to improve food quality ." *CRC Prees* (2012): 190-196.

Bhusahan, B y X Li. "Nanomechanical characterisation of solid surfaces and thin films." *International Materials Reviews* (2003): 48(3).125-164.

Bósquez Molina E. " ¿Desarrollo de recubrimientos comestibles formulados con goma mezquite y cera candelilla para la conservación de frutas" *Revista Mundo alimentario*. Edición Julio-Agosto (2008) 28-31.

Bósquez- Molina, E. " Elaboración de recubrimientos comestibles formulados con goma mezquite y cera Candelilla para reducir la cinética de deterioro en fresco del limón persa" Tesis UAM Campus Iztapalapa (2003).

Cabrera Y., M. "Evaluación del vigor de semilla de los híbridos de maíz puma 1075 y puma 1076 con relación al tamaño de semilla" Tesis, UNAM Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (2003).

Chau, C F, S H Wu y G C Yen. "The development of regulations for food nanotechnology." *Trends in Food Science & Technology* (2007): 18(5);241-258.

Chaudry, Q., Castle, L. "Food applications of nanotechnologies: An overviews of opportunities and challenges for devoloping countries" *Trends in Food science & Technology* (2011) 22; 595-603.

Chen, J Weiss y F Shahidi. "Nanotechnology in nutraceuticals and functional foods." *Food Technology* (2006a): 60(3);30-36.

Chi-Fai, C., Shiuan-Huei, W., Gow-Chin. Y. "The development of regulations for food nanotechnology" *Trends in Food Science & Technology* (2007) 269-280

Christensen, C.M "Microflora and seed deterioration" *Viability of sedes*. (1972) Ed. E.H. Roberts. Champan and Hall. London.

Claridades Agropecuarias No. 138. Almacenamiento de granos. SAGARPA. (2005) 13-13.

Clarke H., Hill T. "Mycoflora of moist barley during sealed storage in farm and Laboratory silos" *Transactions of the British Mycological Society* (1986) 77; 557-565.

Costa, C., Conte, A., Buonocore, G. G., Lavorgna, M., Del Nobile, M.A. "Calcium-alginate coating loaded with silver-montmorillonite nanoparticles to prolong the shelf-life of fresh-cut carrots". *Food Research International* num. 48 (2012) 164-169.

Cushen, M., Kerry, J., Morris, M., Cruz-Romero, M., and Cummins, E. "Nanotechnologies in the food industry- Recent developments, risks and regulation" *Trends in Food Science & Technology* (2012) 24; 30-46.

D'Antonio Faroni, Leda Rita, y otros. "Manual de manejo poscosecha de granos a nivel rural ." Santiago, Chile: Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Catibe , 1993.

Duncan, Timothy V. "Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors" *Journal of Colloid and Interface Science* (2011) 1-24.

Falguera, V, y otros. "Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use." *Trends in Food Science & Technology* (2011): 292-303.

Foladori, G y N Invernizzi. "Nanotechnology for the poor?" *PLoS Medicine* (2005): 2(8). 0810-0811.

García González, Lorena "Obtención y caracterización de nanopartículas sólidas lipídicas de Norflotaxina a partir de microemulsiones por dos técnicas diferentes" Tesis UNAM. Facultad de Química (2006) 19-24.

Garzón S., María de Lourdes , y otros. Preparación de nanopartículas sólidas lipídicas (SLN), Acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC)." *Revista Mexicana de Ciencias Farmáceuticas*, vol.39, núm. 4 (2008): 50-66.

Handford, Caroline E., Dean, M., Spence, M., Henchion, M., Elliott, C. T., Campbell., K. "Awareness and attitudes towards the emerging use of nanotechnology in the agri-food sector" *Food Control* (2015) 57; 24-34.

Hernández Guzmán, Arahón y Aquiles Carballo Carballo. "SAGARPA ." 24 de Octubre de 2015. SAGARPA .

<http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/fichasaapt/Almacenamiento%20de%20semillas.pdf>>.

Hidalgo- Alvaréz, R., Martín, A., Fernández, A., Bastos, D., Martínez, F., y De Las Nieves, F. J. "Electrokinetic properties, colloidal stability and aggregation kinetics of polymer colloids" *Advances in Colloid and Interface Science*.(1996) 67, 1-118.

Hill R.A. Lacey J. "Factors determining the microflora stored barley grains" *Annals of applied biology* (1983) 102; 467-483.

Hough, G., Chiriefe, J. y Mariani, C. "A simple model of osmotic dehydration of Apple" *Lebensm Wiss Technology*(1993): 25: 151-156.

Islam, N y K Miyazaki. "Nanotechnology innovation system: Understanding hidden dynamics of nanoscience fusion trajectories." *Technological Forecasting and Social Change* (2009): 76(1).128-140.

Jiménez, C. P. E.; López P. M. R. "Evaluación del potencial uso de las nanopartículas lipídicas sólidas en recubrimientos de película acuoso" . Tesis UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (2009) 15-20.

Jores, K., Mehner W., Bunjes H., Drechsler M., Mäder K. "From solid lipid nanoparticles (SLN) to nanospoons." *Visions an reality of coloidal lipid dispersions controlled release Society, 30<sup>th</sup>Annual Meeting proceding*.(2003).

Jores, K., Mehner W., Bunjes H., Drechsler M., Mäder K. "Investigations on structure of solid lipid Nanoparticles (SLN) and oil loaded solid lipid nanoparticles bye photo correlation spectroscopy, field-flow fractianation an transmission electron microscopy" *Journal Control Realase num. 95* (2004) 217-227.

Joseph, T y M Morrison. "Nanotechnology in Agriculture and Food." *Nanoforum*. Europa, 2006. 3-6.

Juárez C.R. "Caracterización física de 10 variedades de maíz (Zea mays) y su influencia en la nixtamalización." Tesis, UNAM Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (1997) 4-10

Krochta, J.M. ande De Mulder, Johnston C. "Edible and biodegradable polymer films; Challenges and oportunitoes" *Food technology*. (1997) 51(2); 61-74.

Leroux, J.C; Allémann, E.; Doelker, E.; Gurny, R. "New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification- diffusion method" *Europe Journal Pharmaceutical*. (1995) 4(1): 14-18.

Leuroyx J.C.; Cozens, R.; Roesel, J.I.; Galli, B.; Kubel, F.; Doelker, E.; Gurny. R. "Pharmacokinetics of a novel protease inhibitor incorporated into biodegradable or enteric nanoparticles following intravenous and oral administration to mice" *Pharmaceutical Science*. (1995b) 84(12): 1397-1391.

Manzo G. A. "Efecto de la edad de las semillas sobre el rendimiento y caracteres agronómico de maíz" Tesis *Universidad de Chapingo* 14-16.

Mendoza Uribe , Guadalupe y José Luis Rodríguez López. "La nanociencia y la nanotecnología; una revolución en curso." *Perfiles latinoamericanos* (2007): 161-186.

Nitbiosafe. nitbiosafe testing the safety of your nanoworld. 24 de Octubre de 2015. <[www.nitbiosafe.com](http://www.nitbiosafe.com)>.

McHugh, T. H., and Senesi, E. "Apple wraps: A novel method to improve the quality and extend the shelf life of fresh cut-apples" *Journal of Food Science* (2000) 65(3): 480-490.

Mehnert, W. y Mäder, K. "Solid lipid nanoparticles productions, characterisation and applications." *Advances Drug Delivery Review* (2001) 47(2-3): 165-196.

Mendoza Uribe , Guadalupe y José Luis Rodríguez López. "La nanociencia y la nanotecnología; una revolución en curso." *Perfiles latinoamericanos* (2007): 161-186.

Moreno, M. E. "Análisis físico y biológico de semillas agrícolas" *Universidad Nacional Autónoma de México México D.F.* (1996) 393-425.

Moreno, M. E., Ramírez, G.J., Mendoza. R.M., Valencia, R.G., "Comparison of Mexican Maize Races Stored Under Adverse Humidity and Temperature" *Advances in the conservation and Utilization of Genetic Resources: Proceedings of the Global Maize Germoplasm Workshop. CYMMYT. México.* 95-98.

Müller, R.H., Jacobs, C., Kayser, O. "Nanosuspension as particulate drugs formulations in therapy. Rationale for development and what we can expect for de future." *Adv. Drug. Del.* 47 (2001) 3-19.

Nastruzzi, C. "Lipospheres in Drug Targets and Delivery: Approaches, Methods and Applications" *CR Press. USA.* (2005) 1-22, 41-46.

Nitbiosafe. nitbiosafe testing the safety of your nanoworld. 24 de Octubre de 2015. <www.nitbiosafe.com>.

Olivas, G and Barbosa-Cánovas G. "Edible coating for fresh-cut fruits" *Food Science and Nutriology* (2005) 45(7-8); 89-96.

Palma Santiago, Allemandi Daniel. "Administración de fármacos a través de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) y lípidos nanoestructurados (LNE)" *Nuestra Farmacia num. 52* (2007) 40-48.

Park, H. J. "Development of advanced edible coatings for fruits" *Trends in Food Science and Technology* (1999) 10(8); 393-402.

Quintanar-Guerrero D., Fessi, H., Allémann, E. and Doelker "Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly (D, L-lactic acid) nanoparticles by emulsification-diffusion technique." *International Journal Pharmaceutics.* (1996)143(2); 133-141.

Quintanar-Guerrero D., E. Allémann, H. Fessi and E. Doelker "Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers." *Drug Development and Industrial Pharmacy.* (1997) 24(12); 1113-1117.

Quintanar Guerrero, David, Fessi H Allémann y Doelker. "Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers." *Drug Development and Industrial Pharmacy* (1998): 24(12);1113-1128.

Quiñonez Palacio, Gilberto y María de los Remedios Sanchez Díaz. "Nanopartículas sólidas lipídicas una alternativa farmacológica. Revisión Bibliográfica." *Revista Médica Electrónica* (2009): 1-3.

Rojas-Graü , M A, y otros. "The use of packaging techniques to maintain freshness in fresh-cut fruits and vegetables:a review." *International Journal of Food Science and Technology* (2009): 875-889.

Rao, C.N.R, Govindaraj, A, Gundiah, G., and Vivekchand, S.R.C "Nanotubes and nanowires" *Chemical Engineering Science* (2004) 59(22-23); 4665-4671.

Sánchez C. J. "Velocidad de emergencia, acumulación de energía y acumulación de materia seca en híbridos de maíz (*Zea mays*) en dos

sustratos." Tesis, UNAM Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (2004) 3-15.

Schwartz, J. "Questions in particle theory" *Nature* (1992) 359; 112

Siegrist, M., Stampfli, N., Kastenholz, H., Keller, C. "Perceived risks and perceived benefits of different nanotechnology foods and nanotechnology food packaging" *Appetite num. 51* (2008) 283-290.

Swarbrick, J., Bylon, C. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. 2da edición. USA 2002.

Tibaquirá, Juan E., Moran, Jeff., Otanicar, Todd., Posner, Jonathan D. "Mediciones de potencial zeta de microesferas de vidrio en glicol de etileno y en soluciones tampón de fosfato" *Scientia Et Technical*, (2007) 8(35); 219-224.

Tscheuschener, Horst- Dieter. "Fundamentos de tecnología en los alimentos" *Acribia* (2001) 300-301.

Vázquez M. F. L. "Tolerancia a herbicidas y su efecto en el vigor de genotipos de maíz de calidad proteínica (QPM) " Tesis, UNAM Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (2004).

Villafuerte, L., García, B., Garzón, M., Hernández, A., Vázquez, M. "Nanopartículas Lipídicas Sólidas" *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* (2008) 39(4); 50-66.

Villanueva-Flores, Rafael. "Compuestos importantes para la salud encontrados en los cereales enteros" *Ingeniería Industrial*, núm. 30 ( 2012) 209-224.

Weiss, J., Decker, E. A., and McClements, J. "Solid lipid nanoparticles as deliver systems for bioactive food components". *Food Biophysics*. (2008) 3(2); 146-154.

