

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Agroindustria Alimentaria
Ingeniería en Agroindustria Alimentaria



Proyecto Especial de Graduación

**Desarrollo de un material de envase biodegradable con aceite
esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) y evaluar la vida de anaquel
en tortillas de maíz.**

Estudiante

Alisson Cristina Ayala Pilatasig

Asesores

Adela Acosta, D.Sc

Luis F. Maldonado, PhD.

Herlinda Soto Valdez, Ph.D.

Honduras, noviembre 2023

Autoridades

SERGIO ANDRÉS RODRÍGUEZ ROYO

Rector

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

ADELA M. ACOSTA MARCHETTI

Directora del Departamento de Agroindustria Alimentaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Agradecimientos

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por su generoso financiamiento, el cual fue esencial para llevar a cabo mi investigación de tesis. También, quiero manifestar mi sincera gratitud al Departamento de Agroindustria Alimentaria de Zamorano por su apoyo y respaldo continuo a lo largo de este proyecto. Adicionalmente, quiero extender mi reconocimiento al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C y a todos los profesionales que forman parte de este destacado centro, por haberme recibido con brazos abiertos, por su orientación experta y por su valiosa contribución durante el desarrollo de mi investigación. Su apoyo fue fundamental para el éxito de este proyecto y estoy profundamente agradecido por ello.

Contenido

Agradecimientos	3
Contenido.....	4
Índice de Cuadros	6
Índice de Figuras	7
Índice de Anexos	8
Resumen	9
Abstract.....	10
Introducción.....	11
Materiales y Métodos	14
Ubicación del Estudio.....	14
Materiales	14
Etapa 1	14
Formulación y Co-extrusión de Películas PHB	14
Medición de Espesor.....	17
Espectroscopía de Infrarrojo con Transformadas de Fourier (FTIR).....	17
Transmisión de Vapor de Agua (WVTR).....	17
Migración Global.....	18
Propiedades Mecánicas	19
Etapa 2	19
Halo de Inhibición	20
Vida de Anaquel	20
Pérdida de Peso	21
Aislamiento e Identificación de Hongos en las Tortillas de Maíz.....	23
Cuantificación de Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA) Totales en Tortillas de Maíz.....	23

Cuantificación de Mohos y Levaduras en Tortillas de Maíz.....	24
Resultados y Discusión.....	25
Etapa 1	25
Apariencia de los Envases Usados en este Estudio.....	25
Espectroscopía de Infrarrojo con Transformadas de Fourier (FTIR).....	25
Transmisión de Vapor de Agua Normalizado (WVTRn)	27
Migración Global.....	29
Propiedades Mecánicas	30
Etapa 2	32
Aislamiento e Identificación de Hongos en Tortillas de Maíz.....	32
Halo de Inhibición	36
Capacidad Antimicrobiana	37
Conclusiones	43
Recomendaciones.....	44
Referencias.....	45
Anexos.....	51

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Formulaciones para extrusión de capa externa de la película soplada.....	15
Cuadro 2 Formulaciones para extrusión de capa interna de la película soplada.	16
Cuadro 3 Migración global (mg dm^{-2} y (mg kg^{-1}) para película de PHB y PHB con aceite esencial de tomillo después de 2 horas a 40°C de exposición a etanol al 10%.	30
Cuadro 4 Propiedades mecánicas de películas a base de polihidroxibutirato con incorporación de aditivos y aceite esencial de tomillo.	32

Índice de Figuras

Figura 1 <i>Esquema de un coextrusor</i>	16
Figura 2 <i>Proceso de muestreo para determinar vida de anaquel en tortillas de maíz en almacenamiento a 5°C</i>	22
Figura 3 <i>Apariencia de las bolsas usadas en este estudio</i>	25
Figura 4 <i>Espectro de FTIR (500-4000 cm⁻¹) de la capa externa de la película de polihidroxitirato con aditivos y aceite esencial de tomillo (PTM)</i>	26
Figura 5 <i>Espectro de FTIR (500-4000 cm⁻¹) de la capa interna de la película de polihidroxitirato con aditivos y aceite esencial de tomillo (PTM)</i>	27
Figura 6 <i>WVTRn de cuatro películas PEAD, PHB, PHBA y PTM</i>	28
Figura 7 <i>Hongos aislados de tortillas de maíz</i>	33
Figura 8 <i>Aspergillus niger observado en microscopio óptico</i>	34
Figura 9 <i>Rhizopus oryzae en tinción con azul de lactofenol</i>	35
Figura 10 <i>Estructuras de Penicillium sp.</i>	36
Figura 11 <i>Muestra del halo de inhibición del aceite esencial de tomillo frente a E.coli</i>	37
Figura 12 <i>Comparación del efecto de la adición de AETM en películas sobre el crecimiento de mohos y levaduras en tortillas envasadas en bolsas de PEAD, PHBA y PTM</i>	38
Figura 13 <i>Comparación del efecto de la adición de AETM en películas sobre el crecimiento de bacterias mesófilas aerobias en tortillas envasadas en bolsas de PEAD, PHBA y PTM los días 0 y 59 a 5°C</i>	40
Figura 14 <i>Crecimiento de microorganismos en tortillas de maíz empacadas en envases de PEAD, PHBA y PTM al día 80 de almacenamiento a 5°C</i>	40
Figura 15 <i>Pérdida de peso de las tortillas de maíz envasadas a 5°C</i>	42

Índice de Anexos

Anexo A Proceso para determinar migración global de compuestos desde el envase hacia el alimento.	51
Anexo B Zona de inhibición de discos de papel filtro impregnados con gotas de aceite esencial de tomillo frente a E. coli.....	52
Anexo C Ecuación de la recta obtenida con regresión lineal para cada tratamiento.....	53

Resumen

La tortilla de maíz, esencial en la dieta mexicana, la cual, presenta un contenido de humedad del 45-50% y una a_w de 0.94-0.98, condiciones que favorecen la proliferación de mohos y bacterias. Además, las prácticas deficientes de manufactura y envasado contribuyen a que la tortilla tenga una vida de anaquel corta. Esta investigación se centró en desarrollar una película a base de polihidroxibutirato (PHB) por extrusión con adición de aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) (AET) para extender la vida de anaquel de las tortillas de maíz. Se realizó una caracterización fisicoquímica, mecánica y antimicrobiana de la película. Los espectros FTIR mostraron la presencia de compuestos del AET en la capa interna de la película. Las propiedades mecánicas demostraron una reducción del módulo de Young (455.49 ± 28.13 MPa), resistencia a la tracción (13.95 ± 0.79 MPa) y porcentaje de deformación ($81.01 \pm 4.05\%$). La adición de AET redujo la tasa de WVTR (35.23 ± 4.06 g mil m^{-2} día $^{-1}$) y la migración global no superó los límites establecidos por la legislación. Las tortillas envasadas en películas PHB con aditivos (PHBA) y PHB con aditivos y aceite esencial de tomillo (PTM), excedieron el 2.5% de pérdida de peso al día 20 de almacenamiento. Se identificaron tres hongos en las tortillas de maíz, *Penicillium* sp, *Rhizopus oryzae* y *Aspergillus niger*. La película con AET logró inhibir mohos y levaduras al igual que bacterias mesófilas aerobias. El AET demostró ser eficaz para *E. coli* con un halo de inhibición de 4.14 ± 1.04 cm.

Palabras clave: co-extrusión, película, polihidroxibutirato, tortillas de maíz, aceite esencial de tomillo.

Abstract

Corn tortillas, essential in the Mexican diet, have a moisture content of 45-50% and an a_w of 0.94-0.98, conditions that promote the growth of molds and bacteria. In addition, poor manufacturing and packaging practices contribute to a short shelf life. This research focused on developing a polyhydroxybutyrate (PHB)-based film by extrusion with the addition of thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil (TEO) to extend the shelf life of corn tortillas. A physicochemical, mechanical, and antimicrobial characterization of the film was performed. FTIR spectra showed the presence of oil TEO compounds in the inner layer of the film. Mechanical properties showed a reduction in Young's modulus (455.49 ± 28.13 MPa), tensile strength (13.95 ± 0.79 MPa) and strain percentage (81.01 ± 4.05 %). The addition of TEA reduced the WVTR (35.23 ± 4.06 g mil m^{-2} day $^{-1}$) and overall migration did not exceed the limits established by European legislation. Tortillas packaged in PHB film with additives (PHBA) and PHB with additives and thyme essential oil (PTM), exceeded 2.5% weight loss at day 20 of storage at 5 °C. Three fungi were identified in the corn tortillas, *Penicillium sp*, *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus niger*. The film with TEO was able to inhibit molds and yeasts as well as aerobic mesophilic bacteria. TEA proved to be effective for *E. coli* with an inhibition zone of 4.14 ± 1.04 cm.

Keywords: co-extrusion, film, polyhydroxy butyrate, corn tortillas, thyme essential oil.

Introducción

La tortilla de maíz (*Zea mays sp.*) desempeña un papel fundamental en la dieta mexicana y, además, encarna un profundo significado cultural arraigado en la historia del país (Torres Sombra, 2018). La tortilla de maíz se elabora tradicionalmente con maíz blanco, por un proceso de nixtamalización. La nixtamalización abarca el remojo de los granos de maíz en una solución de hidróxido de calcio (Ca (OH)_2), reposo, lavado, molienda, moldeado de la tortilla y finalmente el horneado por ambos lados en un comal (Rooney y Serna Saldivar, 2016). Según datos de la Secretaría de Agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación (2017), se estima que el consumo diario promedio de tortillas por persona es de aproximadamente 217.9 g (equivalente a 8 tortillas) en áreas rurales y 155.4 g (equivalente a 6 tortillas) en las zonas urbanas (Espejel García et al., 2016). Sin embargo, las características intrínsecas de las tortillas, como su contenido de humedad (45-50%) y actividad de agua (0.94-0.98), junto con prácticas de manufactura y envasado deficientes, las convierten en un medio propicio para la proliferación de hongos y bacterias (Martínez Flores et al., 2004). Ibarra Valenzuela (2019), ha identificado microorganismos como *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* y *Penicillium sp.* en las tortillas de maíz. Para mitigar el crecimiento de estos microorganismos y extender la vida útil de las tortillas de maíz, la industria alimentaria ha recurrido a la adición de conservantes como el propionato de sodio, sorbato de potasio, hidróxido de calcio, propil parabeno y ácido fumárico, entre los más comunes (Martínez Flores et al., 2004). Sin embargo, el consumo de conservantes en concentraciones elevadas plantea preocupaciones sobre la salud, lo que ha llevado a una creciente preferencia de los consumidores por productos con niveles más bajos de estos aditivos. En respuesta a esta demanda, en los últimos años se ha explorado el potencial antimicrobiano de extractos naturales derivados de tallos, hojas y flores, como es el caso de los aceites esenciales (AE) (Vignola et al., 2020). Los componentes responsables de la actividad antimicrobiana en los AE, como aldehídos, fenoles y terpenoides oxigenados, han sido objeto de investigaciones previas (Carpena et al., 2021; Chouhan et al., 2017). En particular, el aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) se destaca

por su combinación de monoterpenos con propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiespasmódicas y antibacterianas (Hosseinzadeh et al., 2015). En el estudio realizado por Meléndez Pastrana et al. (2021), se comprobó que la adición de aceite esencial de tomillo fue más eficaz al alargar la vida de anaquel de tortillas de maíz en comparación con el propionato de sodio. Anteriormente los AE formaban parte de la formulación del alimento. En un enfoque más amplio, se han desarrollado envases activos, que incorporan materiales absorbentes o emisores capaces de interactuar con el entorno interior del envase para mejorar la vida de anaquel de los alimentos, sin necesidad de modificar la formulación del producto (Bhargava et al., 2020). En la mayoría de los casos, estos envases son fabricados de plásticos convencionales de un solo uso, como polietileno de baja densidad (PEBD), polietileno lineal de baja densidad (PELBD), polietileno de alta densidad (PEAD) y tereftalato de polietileno (PET), entre los más comunes (Góngora, 2014). Actualmente, la industria alimentaria busca abordar la problemática de la contaminación ambiental derivada de los envases de un solo uso. Esto ha llevado al desarrollo de envases activos antimicrobianos biodegradables que utilizan materiales como almidón termoplástico, colágeno, zeína, ácido poliláctico, polihidroxicanoatos (PHAs), entre otros (Asgher et al., 2020). Dentro de los PHAs está el polihidroxiбутirato (PHB), termoplástico biodegradable, biocompatible y respetuoso con el medio ambiente (Kavitha et al., 2018). Es un tipo de polihidroxicanoato sintetizado por microorganismos (Pawar y Purwar, 2013). Por lo tanto, esta investigación se centró en diseñar un envase biodegradable a base de polihidroxiбутirato por el método de extrusión, adicionado con aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) y evaluar la vida de anaquel en tortillas de maíz y evaluar sus propiedades físicas, químicas y microbiológicas. Por lo anterior, los objetivos planteados en esta investigación fueron:

Diseñar un envase de polihidroxiбутirato con la adición de aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*).

Evaluar las propiedades físicas, químicas y mecánicas de las películas de polihidroxiбутirato con la adición de aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*).

Identificar los principales microorganismos presentes en la tortilla de maíz, responsables de deteriorar la vida de anaquel.

Evaluar el efecto de las películas de polihidroxibutirato con aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) en la inhibición del crecimiento de los microorganismos en tortillas de maíz, con el fin de evaluar su vida útil durante el almacenamiento.

Materiales y Métodos

Ubicación del Estudio

La extrusión de las películas y los análisis físico, químicos, mecánicos y microbiológicos se llevaron cabo en el Laboratorio de Envases del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), ubicado en la ciudad de Hermosillo, Sonora, México. Los análisis microbiológicos de halo de inhibición se efectuaron en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano (LMAZ) ubicado en la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Km 30 carretera de Tegucigalpa a Danlí, Valle del Yeguaré, Municipio de San Antonio de Oriente., Francisco Morazán, Honduras.

Materiales

Los pellets de PHB comercializados bajo el nombre de TVB-x103 Resin y los aditivos (AB1 y SL05) utilizados en la fabricación de las películas, fueron obtenidos de la empresa canadiense TerraVerdae Bioworks Inc[®]. El aceite esencial de tomillo comercial utilizado en el estudio fue de las marcas Young Living[®] y HBNO[®]. Se empleó buffer de fosfato, caldo soya tripticasa de la marca una escala de MCFarland, todos de la marca Liofilchem (Italia). Se usaron agar cuenta estándar y agar rosa de bengala de la marca Sigma[®]. El nitrato de magnesio marca Fermont[®] (Monterrey, México) y las tortillas comerciales fueron adquiridas en una tortillería del centro de la ciudad de Hermosillo, Sonora.

Etapas 1

Esta etapa comprende la fabricación y caracterización de las películas como se muestra a continuación.

Formulación y Co-extrusión de Películas PHB

Para la producción de películas bicapa, se llevaron a cabo formulaciones en las cuales se emplearon pellets de PHB que fueron sometidos a un pretratamiento de secado a 60°C por 24 horas.

Se agregaron AB1 (erucamida) y SL05 (carbonato de calcio) en diferentes concentraciones para la capa externa, como se detalla en el Cuadro 1.

Cuadro 1

Formulaciones para extrusión de capa externa de la película soplada.

Formulación	PHB (%)	AB1 (%)	SL05 (%)
1*	100	0	0
2**	86	10	4
3	85	10	5
4	86	12	2
5	84	14	2
6	80	16	4
7	81	16	3
8	82	16	2

Nota. * Formulación 1: Película testigo (PHB). ** Formulación 2-8: Película con Aditivos (PHBA). AB1. Nombre comercial del aditivo

erucamida. SL05. Nombre comercial del aditivo carbonato de calcio.

En la capa interna, se emplearon los mismos materiales, con la adición del aceite esencial de tomillo (AET), lo que resultó en las formulaciones detalladas en el Cuadro 2. La fabricación de las películas se realizó mediante dos extrusores de la marca Beutelspacher® (México, C.D), ambos diseñados con un solo husillo para la técnica de extrusión por soplado. Estos extrusores estaban conectados a una matriz que insuflaba la película resultante (Figura 1). La capa externa se generó utilizando el extrusor 1, con condiciones óptimas que incluyeron una velocidad de husillo de 29 rpm y un perfil de temperaturas específico: 115°C en la zona de alimentación, 140°C en la zona de transición, 140°C en la zona de bombeo y 145°C en la zona de moldeo de la película soplada monocapa. Por otro lado, en la capa interna, debido a la incorporación del AET, se realizaron ajustes en las condiciones del extrusor 2, que comprendieron una velocidad de husillo de 106 rpm y temperaturas de 145°C en la zona de bombeo y 155°C en la zona de moldeo. Con el fin de garantizar un espesor uniforme en toda la película, los dispositivos de tracción y enrollado operaron a velocidades constantes de 72 y 75 rpm, respectivamente. Una vez obtenidos los rollos de la película coextruida, se envasaron en bolsas de polietileno estériles, se etiquetaron y se almacenaron a una temperatura de -20°C hasta su utilización.

Se seleccionaron películas similares a las comerciales y se establecieron condiciones de procesamiento ideales para futuras réplicas experimentales. Siendo estas: películas de PHB, películas de PHB con aditivos (PHBA) y películas de PHB con aditivos y con aceite esencial de tomillo (PTM).

Cuadro 2

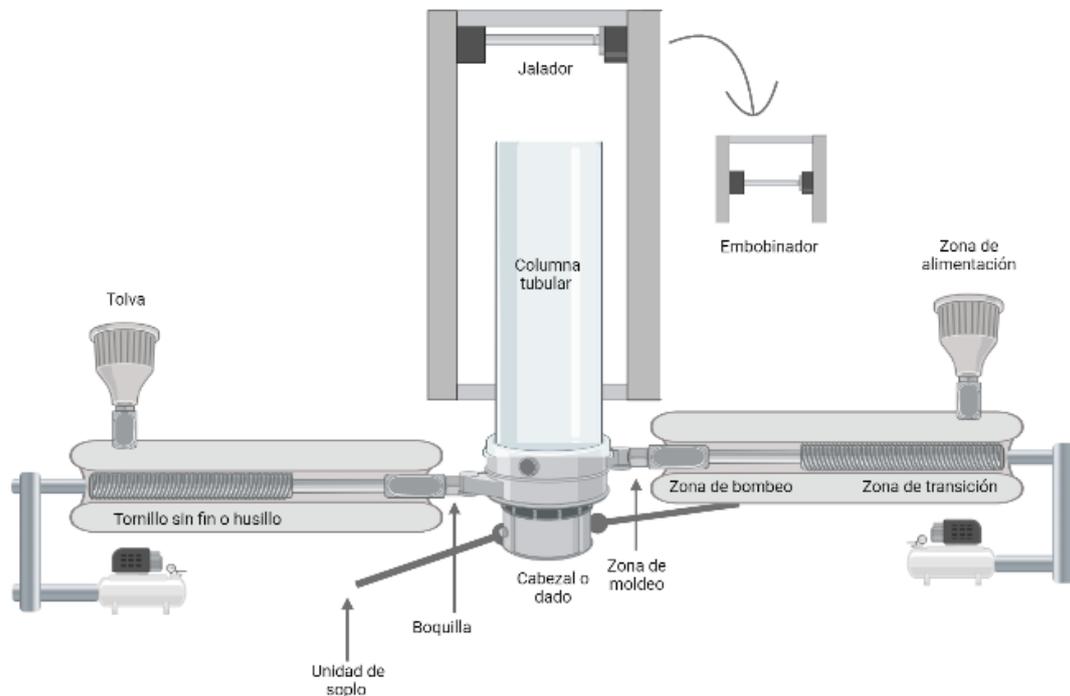
Formulaciones para extrusión de capa interna de la película soplada.

Formulación	PHB (%)	AB1 (%)	SL05 (%)	AET (%)
1	79	10	4	7
2	78	10	5	7
3	79	12	2	7
4	77	14	2	7
5*	73	16	4	7
6	74	16	3	7

Nota. *Formulación 5: Película con aditivos y aceite esencial de tomillo (PTM). PHB. Polihidroxibutirato. AB1. Nombre comercial del aditivo erucamida. SL05. Nombre comercial del aditivo carbonato de calcio. AET. Aceite esencial de tomillo.

Figura 1

Esquema de un coextrusor.



Medición de Espesor

El espesor de las películas se determinó usando un micrómetro digital marca E.J. Cady & Company (Wheeling, IL). Se muestrearon en 10 posiciones aleatorias a lo largo de las películas y los valores medidos se reportaron en unidad de mils.

Espectroscopía de Infrarrojo con Transformadas de Fourier (FTIR)

Para el análisis de los grupos funcionales característicos de los componentes de interés del AET presentes en la capa interna de la película, se utilizó un espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR); marca Nicolet, modelo iS50 FT-IR. Los espectros se registraron en el intervalo de 4000 a 500 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} sobre 64 barridos. Los espectros se registraron en modo de transmitancia.

Transmisión de Vapor de Agua (WVTR)

La tasa de transmisión de vapor de agua (WVTR) se determinó a una temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 0.1$ siguiendo el método establecido por la norma ASTM E96/E96M-10 (American Society for Testing Materials [ASTM], 2010). Para ello, se procedió a llenar cápsulas con 30 ± 0.2 g de cloruro de calcio (CaCl_2) deshidratado (0% HR). Muestras cuadradas (10 cm X 10 cm) de los tres tipos de películas se colocaron sobre las cápsulas: películas de PHB, películas de PHB con aditivos (PHBA) y películas de PHB con aditivos y con aceite esencial de tomillo (PTM), con espesores de 2.0, 1.8 y 2.3 mils, respectivamente. Las muestras se aseguraron a las cápsulas colocando tornillos sobre el anillo externo. Una vez selladas, las cápsulas se dispusieron en desecadores que contenían una solución sobresaturada (50% HR) de nitrato de magnesio (NO_3). Durante un período de 10 días, las muestras fueron sometidas a un proceso de pesado diario y la ganancia en peso se graficó contra el tiempo. La pendiente de la recta se determinó por regresión lineal y la WVTR se calculó mediante la ecuación 1 y la WVTR_n normalizada haciendo uso de la ecuación 2.

$$\text{WVTR} = \frac{\Delta W}{At} = \frac{g}{(\text{m}^2 \cdot \text{día})} \quad [1]$$

$$WVTR_n = \frac{\Delta W}{At} * E = \frac{g}{(m^2 * día)} * mils \quad [2]$$

Donde:

ΔW : cambio de masa (g)

A : área expuesta (m^2)

t : tiempo (día)

E : espesor (mils)

Este experimento se realizó por quintuplicado, para calcular la media, desviación estándar y coeficiente de variación de cada película.

Migración Global

El análisis de migración global se llevó a cabo utilizando el simulante A, que consiste en una solución de etanol al 10% (v/v) en agua Mili-Q, para simular alimentos acuosos. Se procedió a cortar películas cuadradas de 10 x 10 cm y se colocaron sobre las celdas de migración, se aseguró el anillo para permitir que 0.28 dm² de las películas estuvieran en contacto con 38 mL de simulante, debido a las dimensiones de la parte superior de la celda de migración. Posteriormente, las celdas fueron invertidas, de modo que la tapadera quedara hacia abajo y las películas quedaran en contacto directo con el simulante. Las celdas se sometieron a una temperatura de 70°C en un horno de convección forzada durante dos horas (Anexo A). Este ensayo experimental representa las peores condiciones de uso para este alimento, según el Reglamento sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. (2011). Después de la incubación, el simulante contenido en las celdas se pasó a cápsulas de porcelana para ser evaporado a 115°C, se pusieron a peso constante, y la cantidad de residuos resultante fue determinada por método gravimétrico. Para la determinación de los blancos, el simulante estuvo en contacto con un círculo de vidrio que hacía de tapa. Para cada una de las muestras se realizaron 5 repeticiones y 4 para los blancos. La migración global fue calculada en mg dm⁻² y mg kg⁻¹ usando las ecuaciones 3 y 4.

$$M = [(m_a - m_b)]/A \quad [3]$$

Donde M es la migración global del simulante, (mg dm^{-2}); m_a es la masa del residuo del espécimen después de la evaporación del simulante (mg); m_b es la masa del residuo del blanco (sin muestra) (mg); y A es el área de la superficie del espécimen (dm^2).

$$M = [(m_a - m_b)]/B \quad [4]$$

Donde M es la migración global del simulante, (mg kg^{-1}); m_a es la masa del residuo del espécimen después de la evaporación del simulante (mg); m_b es la masa del residuo del blanco (sin muestra) (mg); y B es el peso inicial del simulante que contenía el espécimen (kg).

Propiedades Mecánicas

Las propiedades mecánicas de tensión se determinaron con un texturómetro TA-XT plus c. Se evaluaron tres propiedades: resistencia a la tensión, elongación a la ruptura y módulo de elasticidad en las tres muestras de películas fabricadas: PHB, PHBA y PTM. Se cortaron probetas en forma de hueso con 20 mm de longitud, 5 mm de ancho de sección reducida y 15 mm de ancho de la sección de sujeción. Las pruebas mecánicas se efectuaron en dirección máquina de acuerdo con la norma ASTM D882-12 (ASTM, 2012), utilizando una velocidad de estirado de 34.8 mm min^{-1} . El espesor de las películas se midió con un micrómetro digital E.J. Cady & Company. Los valores de resistencia a la tensión, elongación a la ruptura y módulo de elasticidad, se calcularon de la gráfica de esfuerzo-deformación de cada muestra ensayada (con cuatro réplicas).

Etapa 2

La etapa 2 corresponde a la identificación de hongos en las tortillas de maíz, determinación de vida de anaquel y evaluación antimicrobiana.

Halo de Inhibición

La evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo frente a *Escherichia coli* (ATCC 2535) (*E. coli*) se llevó a cabo mediante un ensayo de halo de inhibición en el Laboratorio de Microbiología de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. En primera instancia, se aisló la cepa de *E. coli* en agar cuenta estándar (ACE) usando la técnica de Frobisher, y se incubó a una temperatura de 37°C durante un período de 24 horas. A continuación, del caldo que contenía *E. coli*, con una concentración de cultivo bacteriano en los inóculos de 10^6 UFC mL⁻¹, correspondiente a la concentración típica encontrada en alimentos contaminados, y estandarizada en la escala McFarland 0.5 (El-Naggar et al., 2020; Suppakul et al., 2011), se procedió a sembrar de manera uniforme en placas previamente solidificadas con agar cuenta estándar. Luego en cada plato se colocaron dos discos de papel filtro de 0.5 cm de diámetro, previamente impregnados con una gota de aceite esencial de tomillo (HBNO[®]), cada una con un peso de 0.0501 g. Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas, y posteriormente se midió en centímetros el diámetro en la zona transparente más amplia de la placa (Figura 11), que se conoce como halo de inhibición. Se realizó cuatro réplicas y todas las mediciones se promediaron. Este procedimiento se realizó siguiendo el método de difusión en disco de agar descrito por Turki et al. (2023).

Vida de Anaquel

Para este experimento, se envasaron 18 bolsas de tortillas para cada uno de los envases correspondientes a los dos tratamientos PHBA y PTM. Para este experimento se agregó un tratamiento más, correspondiente a los envases comerciales utilizados para vender y almacenar tortillas de maíz denominado polietileno de alta densidad (PEAD). En cada bolsa se envasaron 15 tortillas. Luego, se almacenaron en una cámara Binder[®] LCR-735T[®] con temperatura ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) y humedad relativa (80-85%) controladas durante 30 días o hasta que se terminó la vida de anaquel. Para determinar la vida de anaquel basadas en el crecimiento microbiano en la tortilla de maíz, se

cuantificaron bacterias mesófilas aerobias, hongos y levaduras. Cada 5 días se muestrearon tres bolsas de tortillas de cada tratamiento, (Figura 2). Adicionalmente, se envasaron 5 bolsas de tortillas para cada uno de los tratamientos PEAD, PHBA y PTM (15 en total), cada bolsa con 15 tortillas. Se almacenaron en las mismas condiciones y cada paquete se pesó diariamente. Se graficó el peso (% de pérdida de peso) contra el tiempo para observar el día en que los paquetes perdieron 2.5% de peso. El término del experimento se dio cuando las tortillas alcanzaron un crecimiento bacteriano para Bacterias Mesófilas Aerobias el equivalente a 1000 unidades formadoras de colonias por gramo de tortillas (UFC g⁻¹) (NOM Norma Oficial Mexicana-093-SSA1-1994, 1994) y la vida de anaquel fue el tiempo correspondiente al muestreo anterior. O bien, la vida de anaquel terminó el día previo al que alcancen 2.5% de pérdida de peso, lo que ocurrió primero.

Pérdida de Peso

Las tortillas envasadas se pesaron con la ayuda de una balanza modelo AND GX-6000, una vez al día durante todo el almacenamiento. Se realizó una gráfica por regresión lineal en donde se evidenció, una relación pérdida de peso (eje y) por día transcurrido (eje x). La vida de anaquel terminó el día de muestreo previo al que alcanzó el 2.5% de pérdida de peso.

Figura 2

Proceso de muestreo para determinar vida de anaquel en tortillas de maíz en almacenamiento a 5°C.



Los datos de vida de anaquel se analizaron mediante un diseño de medidas repetidas en el tiempo. Las pruebas mecánicas, que incluyen el módulo de Young, la resistencia a la tensión y el porcentaje de deformación, se evaluaron utilizando un diseño completamente al azar, al igual que los análisis físicos, con la excepción de WVTR, que se analizó mediante una comparación de medias utilizando la prueba t de Student. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico SAS® (Statistical Analysis System) versión 9.4. Cuando se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$), se realizaron comparaciones múltiples de medias utilizando el método de Tukey. Cabe destacar que los tratamientos se envasaron en envases de PEAD, PHBA y PTM, y todos los análisis se realizaron en triplicado.

Aislamiento e Identificación de Hongos en las Tortillas de Maíz

Los hongos que crecieron en las tortillas de maíz envasadas para la determinación de vida de anaquel fueron seleccionados, inoculados en medio agar papa dextrosa (PDA) y se incubaron a 25°C durante 7 días. Cada aislado fue resembrado tres veces para evitar contaminación. Se tomó una colonia pura y se realizó una tinción con azul de lactofenol utilizando la técnica de cinta adhesiva (Antonio et al., 2018). Las muestras fueron observadas en el microscopio óptico Amscope B020c® a 40X. Para la identificación, se compararon las estructuras encontradas con las reportadas en la bibliografía (Abarca, 2000; Maldonado et al., 2017).

Cuantificación de Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA) Totales en Tortillas de Maíz

Para el análisis microbiológico de BMA se siguió el proceso descrito en la NOM Norma Oficial Mexicana-092-SSA1-1994 (1995). El contenido de cada envase se trituró en una licuadora, se tomó una muestra representativa de 10 g, se añadieron 90 mL de buffer de fosfato a pH neutro y en conjunto se homogenizaron en un vortex Genie 0236 por 5 minutos. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas como lo indica la NOM Norma Oficial Mexicana-110-SSA1-1994 (1994). Se tomó un mL de la mezcla homogenizada y se le agregó nueve mL de buffer de fosfato. Luego, un mL de cada inóculo se

agregó a placas estériles con 15 mL de Agar Triptona Extracto de Levadura (Plate Count). Se incubó a 37°C por 48 horas, luego se identificaron placas con intervalo de 50 a 250 colonias, los resultados se reportaron en UFC g⁻¹.

Cuantificación de Mohos y Levaduras en Tortillas de Maíz

Para la cuantificación de mohos y levaduras se siguió el procedimiento descrito en la NOM Norma Oficial Mexicana -111-SSA1-1994 (1995). Las muestras se prepararon igual que para cuantificación de BMA, siguiendo la NOM Norma Oficial Mexicana-110-SSA1-1994 (1994) para preparar diluciones. Para este análisis se usó el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) acidificada. Las placas se incubaron a 25°C por 72 horas. Se identificaron las diluciones en las que las colonias tuvieron un mínimo de colonias de 50 y máximo de 250 UFC por placa, los resultados se reportaron en UFC g⁻¹.

Resultados y Discusión

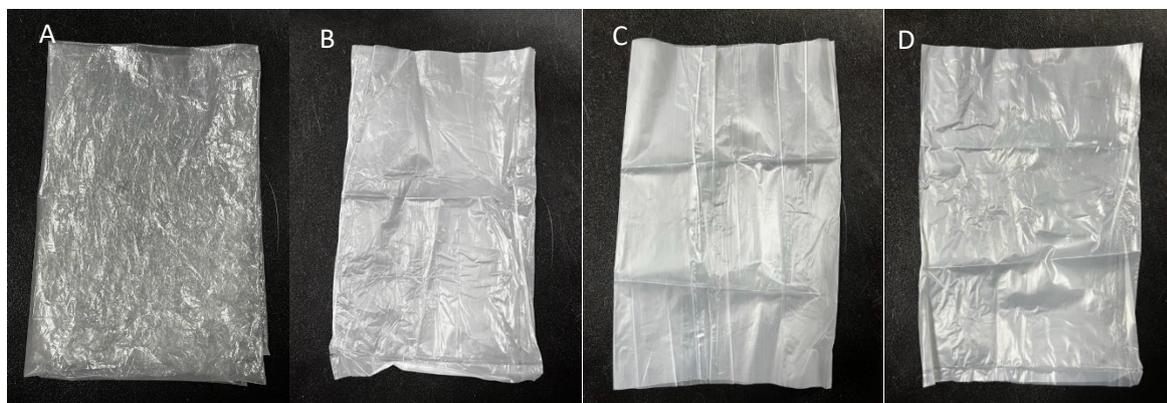
Etapa 1

Apariencia de los Envases Usados en este Estudio

Las bolsas de PEAD, PHB, PHBA y PTM para envasar tortillas de maíz en este trabajo, se muestran en la Figura 3.

Figura 3

Apariencia de las bolsas usadas en este estudio.



Nota. (A) Bolsa comercial de PEAD. (B) Bolsa PHB (PHB). (C) Bolsa de polihidroxitirato con aditivos-PHBA. (D) Película activa de polihidroxitirato con aditivos y aceite esencial de tomillo-PTM.

Espectroscopía de Infrarrojo con Transformadas de Fourier (FTIR)

En las Figuras 4 y 5, se han identificado picos que son característicos de las terminaciones de polihidroxitirato (PHB). El pico en 1712 cm^{-1} corresponde a una vibración que ha sido previamente reportada por Garrido (2018) y atribuida a los grupos carbonilos (-C=O) de este polímero, tal como lo indicaron Biradar et al. (2018). Asimismo, alrededor de 1270 cm^{-1} , se observaron vibraciones que podrían ser generadas por el enlace C-O del grupo éster. Astudillo y Olmedo (2021), han señalado en su estudio que las vibraciones de estos grupos se encuentran normalmente en la región cercana a 1000 y 1300 cm^{-1} . En relación a los grupos metileno ($\text{-CH}_2\text{-}$) y metilo (-CH_3), se han observado que las bandas que se sitúan entre 2850 y 3000 cm^{-1} se relacionan con los estiramientos de C-H, corroborando

lo expresado por Astudillo y Olmedo (2021) y Rivas et al. (2017). No obstante, los picos que se muestran en la Figura 5 no presentan diferencias con las bandas de reflexión de PHB. Esto podría atribuirse a la estrecha similitud de la mayoría de los picos del aceite esencial de tomillo que coinciden con los del PHB, dificultando su identificación (Topala y Tataru, 2016). O bien, podría ser resultado de lo documentado por G. Garde (2013), quién demostró que los compuestos de los aceites esenciales, tienden a perderse durante la formación de películas o láminas, debido a las temperaturas de procesamiento. Su investigación indica que las condiciones de procesamiento pueden afectar la retención de los compuestos volátiles en las películas, lo que posiblemente haya influido en la ausencia de diferencias discernibles en las bandas observadas en la Espectroscopia de Infrarrojo con Transformadas de Fourier (FTIR).

Figura 4

Espectro de FTIR (500-4000 cm^{-1}) de la capa externa de la película de polihidroxitirato con aditivos y aceite esencial de tomillo (PTM).

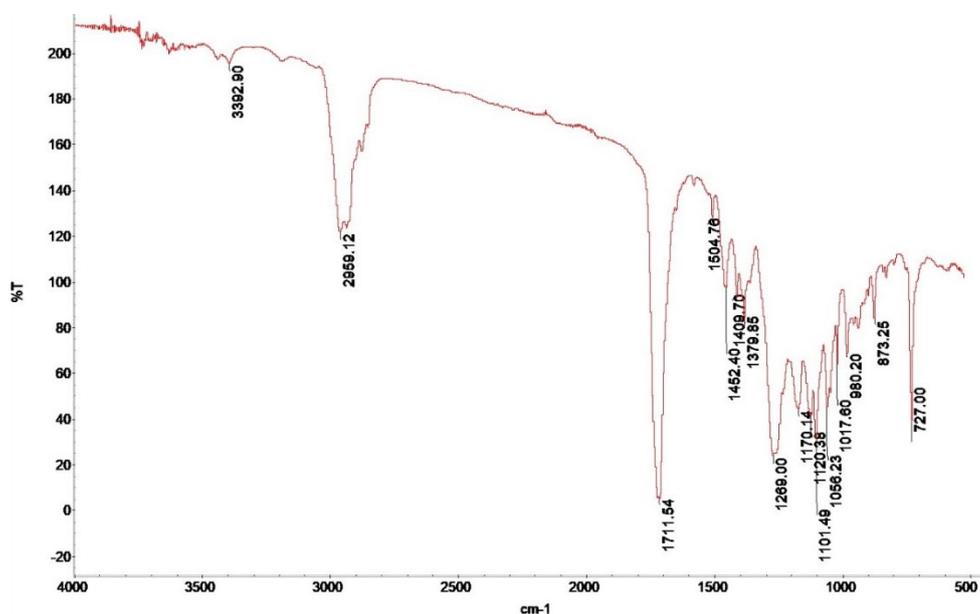
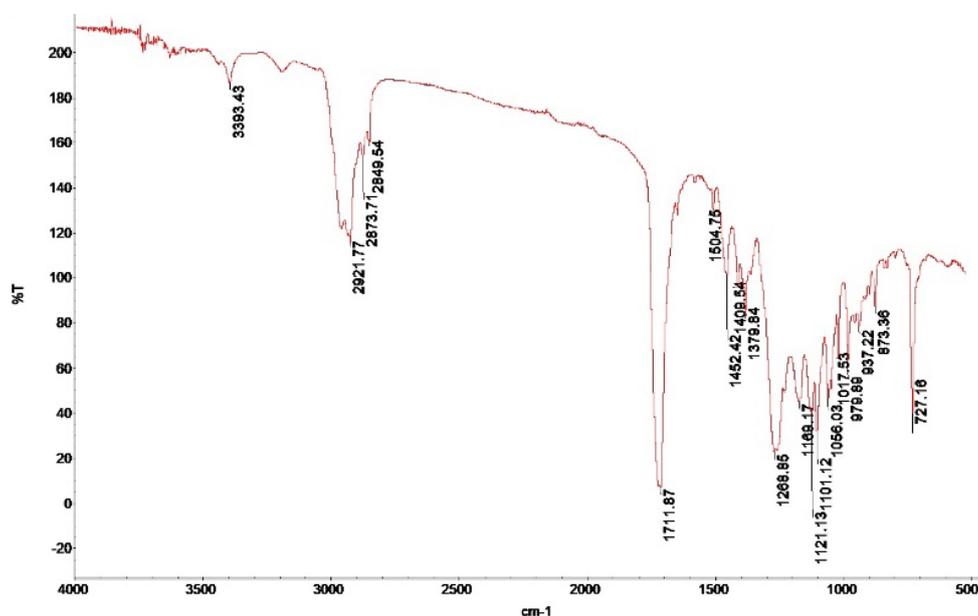


Figura 5

Espectro de FTIR (500-4000 cm^{-1}) de la capa interna de la película de polihidroxibutirato con aditivos y aceite esencial de tomillo (PTM).



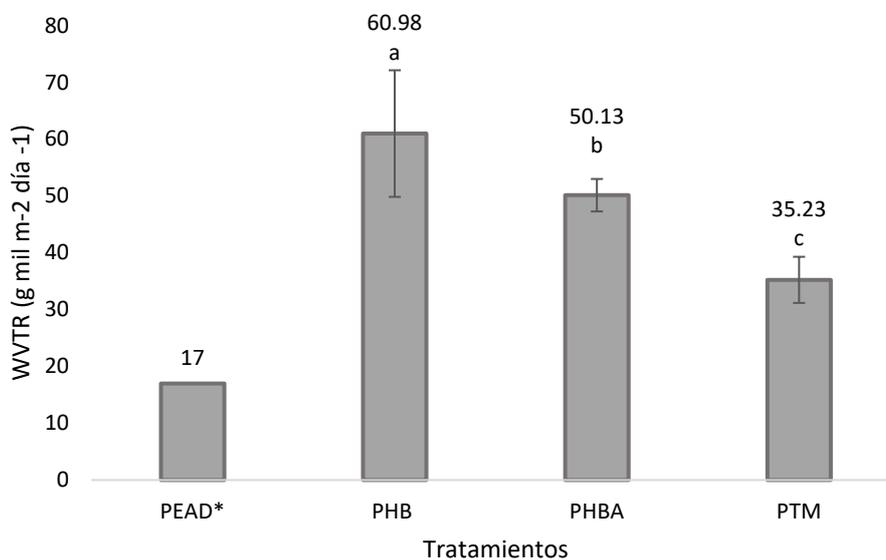
Transmisión de Vapor de Agua Normalizado (WVTRn)

Los resultados obtenidos de las mediciones de transmisión de vapor de agua (WVTR) revelan diferencias significativas ($P < 0.0082$) entre los tres tratamientos (Figura 6). En particular, la película 100% PHB (PHB) exhibió una tasa de transmisión de $60.98 \pm 11.14 \text{ g mil m}^{-2} \text{ día}^{-1}$. Este resultado es muy cercano a lo reportado por Modi et al. (2011) en donde evaluaron polihidroxibutirato en diferentes concentraciones para posibles aplicaciones de envasado y los valores de WVTR normalizado oscilaron entre 63.1 y $440 \text{ g mil m}^{-2} \text{ día}^{-1}$. La alta tasa de WVTR es posible debido a que las cadenas poliméricas se deslizan causando un aumento en el volumen del polímero generando espacios y a su vez permite la difusión de las moléculas de agua (Modi et al., 2011). Por otro lado, la película denominada PHBA presentó diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) con los tres tratamientos, siendo la WVTR ($50.13 \pm 2.86 \text{ g mil m}^{-2} \text{ día}^{-1}$), menor a la película PHB. Esto puede estar directamente relacionado con la presencia de aditivos dentro de la película. Según Kuusipalo (2000), los aditivos y plastificantes disminuyen la densidad de los poros de los envases puesto que estos migran a las zonas

amorfos de la película rellenando estos espacios, lo que a su vez impide en gran parte la penetración de moléculas de líquidos. Esto también se puede ver evidenciado en la película con tomillo que presentó diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre los tres tratamientos y una transmisión ($35.23 \pm 4.06 \text{ g mil m}^{-2} \text{ día}^{-1}$) aún menor que los dos tratamientos. Estas observaciones resaltan claramente la influencia distintiva de las composiciones de las películas en la tasa de transmisión de vapor de agua. En el contexto de los envases para tortillas de maíz, una elevada tasa de WVTR indica una mayor permeabilidad al agua, lo que conduce a una rápida pérdida de humedad en las tortillas de maíz, es decir, su deshidratación. Esta es la razón por la cual las bolsas de PEAD son ampliamente utilizadas en el envasado de tortillas, puesto que ofrecen una eficaz barrera contra la humedad, con una tasa de WVTR_n oscila que generalmente oscila entre $14\text{-}20 \text{ g mil m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ como lo menciona Esparza (2008).

Figura 6

WVTR_n de cuatro películas PEAD, PHB, PHBA y PTM.



Nota. *Película PEAD, dato tomado de Esparza (2008). Película 100% PHB (PHB). Película de polihidroxibutirato con aditivos (PHBA). Película de polihidroxibutirato con aditivos y aceite esencial de tomillo (PTM). Letras diferentes representan diferencias estadísticas significativas.

Migración Global

La migración es un proceso de transferencia de masa que implica la liberación de sustancias de baja masa molecular desde el envase hacia el alimento, ocupando un lugar crucial en el envasado de alimentos. Este proceso puede tener un impacto significativo en la calidad sensorial de los productos, además de potencialmente inducir efectos adversos, incluso la toxicidad, si se produce la transferencia de sustancias indeseables (J. A. Garde et al., 2001). Por otro lado, en el contexto de envases activos, la migración global (MG) adquiere un carácter ventajoso. Los resultados del Cuadro 3 muestran que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) en la migración global de sustancias entre la película testigo, PHB con aditivos y películas con aditivos y aceite esencial de tomillo. Los resultados demuestran que están muy por debajo del límite máximo de MG (10 mg dm^{-2} de superficie de contacto o 60 mg kg^{-1} de alimento), establecido por el Reglamento sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. (2011). Estos resultados tienen implicaciones significativas, ya que demuestran que la incorporación de un 7% de aceite esencial de tomillo no solo cumple con los estándares regulatorios, sino que también sugiere la viabilidad de emplear porcentajes mayores de esta adición. Ramos et al. (2014), han evaluado la liberación y actividad antioxidante de carvacrol y timol, los compuestos mayoritarios en el aceite esencial de tomillo, en películas de polipropileno. Esta investigación sugiere que la cantidad migrada está relacionada con la polaridad del simulante y la solubilidad intrínseca del compuesto. Sin embargo, aún no se han reportado estudios que indiquen la migración de estos compuestos en matrices poliméricas biodegradables o compostables, como es el caso del polihidroxibutirato.

Cuadro 3

Migración global (mg dm^{-2} y mg kg^{-1}) para película de PHB y PHB con aceite esencial de tomillo

después de 2 horas a 40°C de exposición a etanol al 10%.

Tratamiento	MG (mg dm^{-2}) \pm D. E	MG (mg kg^{-1}) \pm D. E
Película testigo (PHB)	1.70 \pm 0.86	13.18 \pm 6.62
Película con aditivos y aceite esencial de tomillo (PTM)	2.65 \pm 0.76	20.58 \pm 5.93
Probabilidad	0.8255	0.8347

Nota. MG: migración global. D. E: Desviación Estándar. Probabilidad: $P < 0.05$ indica diferencias significativas en la misma columna.

Propiedades Mecánicas

El módulo de Young y esfuerzo máximo son parámetros que evalúan la tenacidad y rigidez de los materiales, así como su capacidad elástica (Castro et al., 2021). De tal manera que, un módulo mayor implica una mayor rigidez del material, mientras que valores más bajos son más propensos a flexionarse bajo una carga. Resulta indispensable resaltar que el módulo de Young es el resultado de la relación entre la tensión que experimenta un material y la deformación por unidad, y refleja su rigidez antes de enfrentar una carga (Pal et al., 2022). El Cuadro 4 muestra el comportamiento mecánico de las películas PHB, PHBA y PTM. Los resultados obtenidos del análisis del módulo de Young en esta investigación muestran que el tratamiento de PHB con aditivos y aceite esencial de tomillo presentó diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.0001$) en comparación con la película PHB y PTM. Tanto el testigo (PHB) como el Tratamiento 1 (PHBA) exhiben valores elevados de módulo de elasticidad en comparación con el Tratamiento 2 (PTM). Ambos tratamientos muestran similitudes estadísticas, registrando valores de 855.83 ± 23.68 MPa y 812.10 ± 57.25 MPa, respectivamente. Estas observaciones podrían atribuirse a las características intrínsecas de rigidez inherentes al PHB, lo que sugiere, a su vez, que una mayor concentración de polímero está asociada con un aumento en la elasticidad, como se menciona en un estudio realizado por Garrido (2018). Estos resultados son cercanos a lo reportado por Moura et al. (2017), en donde evaluaron las propiedades mecánicas de PHB puro obteniendo valores cercanos a 1000 MPa. Sin embargo, en PHB reforzado con fibras de coco y polvo de madera de *Mezilaurus itauba* encontraron que el módulo de Young superó los 2000 MPa

(Moura et al., 2017). Lo anterior difiere de los resultados obtenidos en esta investigación para el Tratamiento 2 (PTM), debido a la adición de aceite esencial de tomillo, lo que posteriormente mostró una disminución significativa ($P < 0.0001$) del módulo de elasticidad (455.49 ± 28.13 MPa). Sin embargo, en el estudio realizado por Castro et al. (2021), encontraron que la incorporación de aceite de árbol de té en películas compuestas de quitosano y alcohol polivinílico condujo a una disminución en la elasticidad de las películas, porcentaje de deformación y la resistencia a la tracción.

La incorporación de aceite esencial de tomillo y aditivos presentó una influencia significativa en la propiedad de resistencia a la tracción siendo estadísticamente diferentes los tres tratamientos ($P < 0.0026$). En el Cuadro 4 se muestran los resultados de la fuerza de tensión del testigo (18.34 ± 0.52 MPa). Además, se evidencia una disminución de la resistencia de las películas PHBA (15.84 ± 0.43 MPa) y PTM (13.95 ± 0.79 MPa). Esto puede estar relacionado a la adición de carbonato de calcio, que combinado con aceite esencial de tomillo pasa de actuar como plastificante a contribuir en la rigidez de las películas. Por otro lado, se evidencia un aumento en la deformación de la película con aditivos (95.93 ± 0.82), demostrando que los aditivos presentes en esta formulación cumplieron el papel de plastificantes (Safari y van de Ven, 2015) y una disminución en el porcentaje de deformación del tratamiento testigo y PHB con aceite esencial de tomillo (89.36 ± 3.41 y 81.01 ± 4.05 , respectivamente). Para el Tratamiento 2 (PTM), la adición de aceite esencial de tomillo se tradujo a un menor módulo de Young, resistencia a la tracción y porcentaje de deformación. Esto puede estar relacionado a las temperatura del proceso de fabricación, puesto que como mencionan Safari y van de Ven (2015), a temperaturas de cristalización superiores a 50°C existe la probabilidad de prevalencia de nuevas grietas y las propiedades mecánicas como la resistencia y el módulo de Young comiencen a degradarse. Además, Castro et al. (2021) en su investigación pudo definir que la adición de aceite esencial de árbol de té a la matriz polimérica debilitó las uniones de hidrógeno, provocando una menor resistencia a la fractura. Rodríguez y Andino (2022), encontraron resultados similares al reforzar con aceite esencial de romero películas a partir de quitosano extraído de exuvia de *Hermetia illucens*.

Cuadro 4

Propiedades mecánicas de películas a base de polihidroxitirato con incorporación de aditivos y aceite esencial de tomillo.

Tratamiento	Módulo de Young (MPa)	Esfuerzo máximo (MPa)	Deformación (%)
PHB	855.83 ± 23.68 ^a	18.34 ± 0.52 ^a	89.36 ± 3.41 ^b
PHBA	812.10 ± 57.25 ^a	15.84 ± 0.43 ^b	95.93 ± 0.82 ^a
PTM	455.49 ± 28.13 ^b	13.95 ± 0.79 ^c	81.01 ± 4.05 ^c
C.V	4.89	4.53	2.34

Nota. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas. D.E (desviación estándar). C.V.: Coeficiente de variación.

Etapa 2

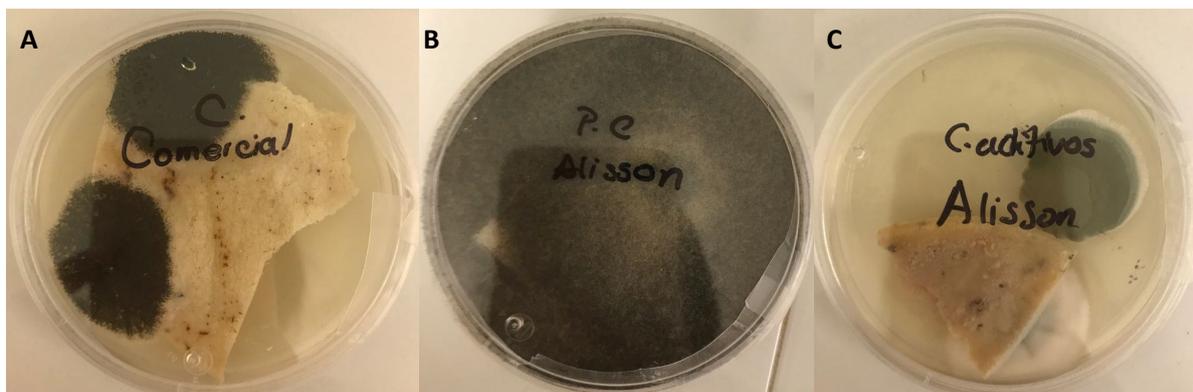
Aislamiento e Identificación de Hongos en Tortillas de Maíz

De las muestras de tortillas que se tomaron durante el estudio de vida de anaquel y después del período de incubación, se observaron colonias que mostraban tonalidades que iban desde el café oscuro al negro y verde, por lo que se sospechó la presencia de *Penicillium sp* o *Aspergillus sp* (Figura 7). Para confirmar la identificación, se llevó a cabo una tinción con azul de lactofenol, un colorante ampliamente utilizado en micología que actúa como agente aclarante debido a la acción combinada del fenol y el ácido láctico. Esta tinción permitió observar la morfología microscópica de cada hongo, resaltando las estructuras de las hifas y los conidios (Gómez et al., 2018). Además, el fenol cumple la función de inactivar enzimas que podrían dañar las células. Por otro lado, el azul de metileno se adhiere a la quitina presente, lo que facilita la visualización clara de cada parte del hongo. Finalmente, el glicerol se utiliza para mantener la tinción húmeda durante la observación (Ibarra Valenzuela, 2019). Después de la tinción con azul de lactofenol, cada hongo aislado fue observado en un microscopio a 40X. Según Martínez et al. y (Cabrera Meraz et al.; 2003), las siembras de maíz están expuestas a condiciones climáticas adversas, lo que da lugar a la inevitable la presencia de aflatoxinas causadas por diversos hongos durante la cosecha, transporte, almacenamiento y procesamiento. En estudios anteriores han documentado una invasión de hongos fitopatógenos en granos de maíz,

pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Hernández et al., 2007). Por lo anterior, se prevé el desarrollo de hongos de alguno de estos géneros en las tortillas de maíz.

Figura 7

Hongos aislados de tortillas de maíz.



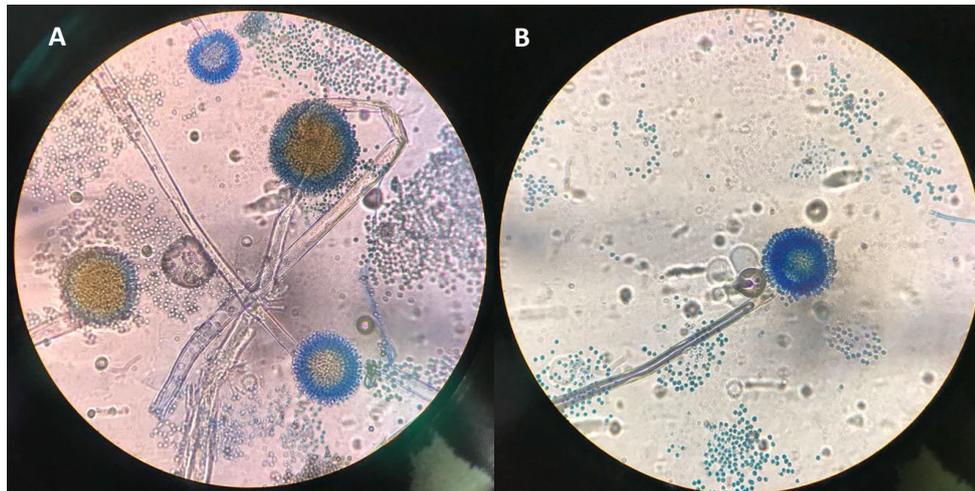
Nota. Hongos aislados de tortillas envasadas en diferentes películas y sembrados en PDA. Hongo aislado de la tortilla envasada en la película comercial de polietileno de baja densidad, película a base de polihidroxibutirato (PHB) y PHB con adición de AB1 y SL05; A, B y C, respectivamente.

Durante las observaciones de las tinciones, se logró identificar la presencia de hifas hialinas, conidióforos y conidios de configuración circular, los cuales rodeaban las vesículas. Un género ampliamente conocido por estas particularidades es *Aspergillus sp.* En este género, los conidióforos, que son un tipo de especializado de hifas septadas, alojan las células conidiógenas, las cuales dan origen a los conidios o esporas. Abarca (2000), enfatiza que las colonias de tonalidad oscura, particularmente negro o marrón oscuro, colonias densas y compactas corresponden a *Aspergillus niger*. Además, dentro de las características microscópicas resalta la forma de cabezas conidiales dispuestas en forma biseriadas y radialmente, así como vesículas casi esféricas. Las métulas cubren toda la superficie de la vesícula, culminando en conidios de forma esférica, teñidos en marrón y típicamente texturizados con crestas irregulares y protuberancias, tal como se observa en la Figura 8. Con base en esta revisión, se concluye que el género de hongo presente en las tortillas de maíz,

envasadas en películas de polietileno de alta densidad, denominada película comercial, es *Aspergillus niger*.

Figura 8

Aspergillus niger observado en microscopio óptico.

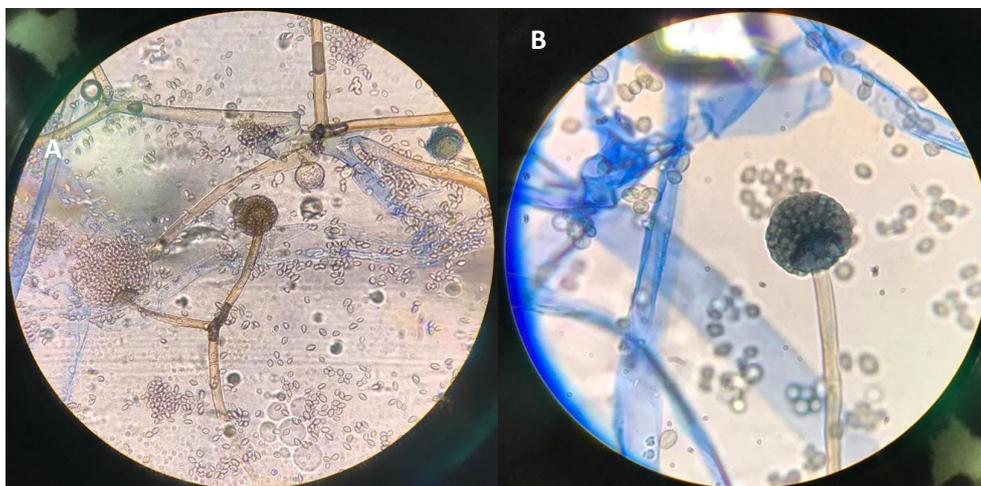


Nota. Morfología de *Aspergillus niger*. (A) Conjunto de hifas hialinas de *Aspergillus niger* a 40X. (B) Estructura visible de conidióforo y conidias.

Para el segundo hongo, durante los primeros días de incubación, los micelios exhibieron tonalidades blanquecinas, que pasados los cinco días evolucionaron a colores grises y negros cubriendo la totalidad de la placa como se muestra en la Figura 7B. Entre las características microscópicas más notables, se destacan las hifas gruesas que carecen de septos, una columnela de forma ovoide y una profusión de rizoides grandes, todos estos rasgos en concordancia con las características propias de hongos del género *Mucor sp.* según lo señalado por Cruz Lachica et al. (2017). La Figura 9A ejemplifica esporangios grandes de color café lo que descarta la posibilidad de que se trate del género *Mucor*, al mismo tiempo que confirma el crecimiento del hongo *Rhizopus oryzae* (Cruz Lachica et al., 2017; Ríos et al., 2023). Este género ha sido registrado como parte del complejo de hongos presentes en las tortillas de maíz, según se documentó en un estudio realizado por Tejeda et al. (2017).

Figura 9

Rhizopus oryzae en tinción con azul de lactofenol.

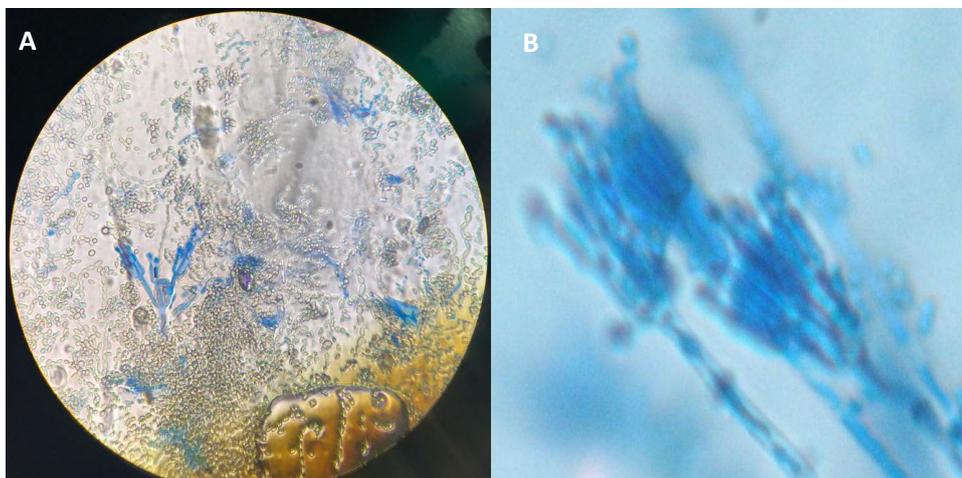


Nota. (A) *Rhizopus oryzae* en diferentes fases observado a 40X. (B) Estructura de esporangióforo y esporangio a 100X.

No se pudo obtener una observación microscópica nítida de la estructura del tercer hongo debido a una contaminación por esporas de otros hongos. Sin embargo, la Figura 7C muestra micelios de color verde opaco con bordes blancos, lo cual coincide con el estudio realizado por Elgarhi et al. (2020). Se destacan la presencia de tonalidades verde azuladas en el micelio, con bordes blancos algodonosos, características distintivas de los géneros *Penicillium sp.* Además, Allende Molar et al. (2013) describe que los hongos del género *Penicillium* se caracterizan por presentar conidióforos septados que conectan a métulas en forma de ramilletes y fiálides. De cada fiálide brotan conidios que, una vez maduros, se convertirán en nuevos conidióforos (Figura 10) (Hemath et al., 2010). En total, de las tortillas de maíz se aislaron e identificaron tres hongos: *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* y *Penicillium sp.*

Figura 10

Estructuras de Penicillium sp.



Nota. (A) Estructura de *Penicillium sp.* con tinción azul de lactofenol aislado de las tortillas de maíz. (B) Métulas y fiálides, objetivo 40X.

Fuente: (Hemath et al., 2010).

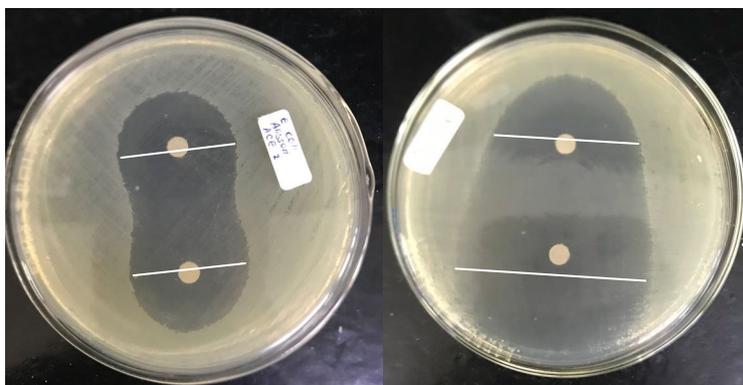
Halo de Inhibición

En la Figura 11 se muestran los resultados de inhibición del aceite esencial de tomillo con pureza de 99.3%. Las zonas claras representan la inhibición del crecimiento de *E. coli* producido por un disco que contiene el agente antimicrobiano, aceite esencial de tomillo. En promedio las zonas de inhibición fueron de 4.14 ± 1.04 cm y dos repeticiones mostraron un halo en toda la placa impidiendo su medición (Anexo A). Según Turki et al. (2023), la existencia y el tamaño de la región de inhibición reflejan la sensibilidad de las bacterias al aceite esencial. Si las zonas de inhibición tienen un diámetro menor de 0.7 cm, se considera que una muestra no tiene actividad contra las bacterias. Por otro lado, un diámetro de la zona de inhibición que supere los 1.2 cm señala un efecto inhibitorio satisfactorio. Los hallazgos de este estudio coinciden con los resultados reportados Turki et al. (2023), quienes observaron que la zona de inhibición para *E.coli* y *S. aureus* osciló en un rango de 1.74 a 4.13 cm, sin tener diferencias significativas entre ambos microorganismos. Según Rodríguez y Andino (2022), el aceite esencial de romero tuvo mayor efecto en bacterias gram positivas, esto debido a que la

7 membrana externa hidrofílica presente en las bacterias gram negativas impide la penetración de los aceites de naturaleza hidrofóbica. Otros estudios ratifican la inhibición efectiva tanto en bacterias gram positivas y negativas (Aguirre et al., 2013; Hosseini et al., 2015; Marqués et al., 2015). Lo que sugiere que no sólo los compuestos, sino la matriz de la que se liberan tiene un papel importante en la efectividad antimicrobiana del film (Marqués et al., 2015).

Figura 11

Muestra del halo de inhibición del aceite esencial de tomillo frente a E.coli.



Nota. Halos de inhibición aceite esencial de tomillo con pureza de 99.3%.

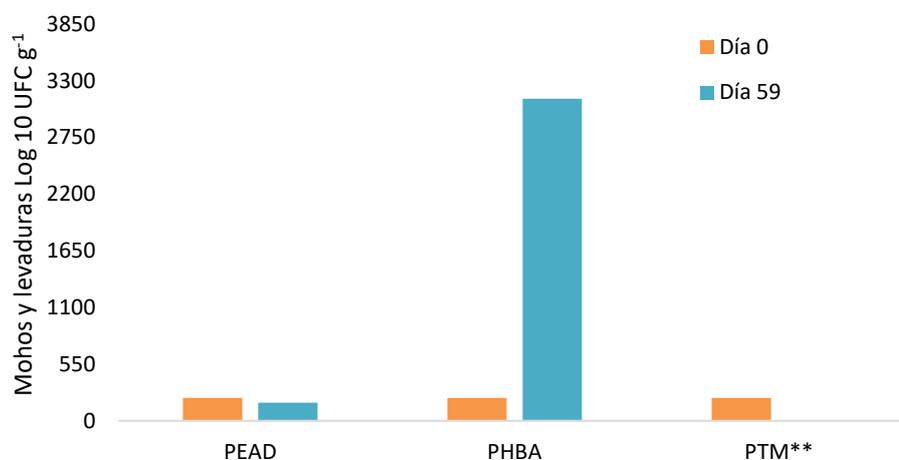
Capacidad Antimicrobiana

En el día 0, se realizó un conteo por triplicado de mohos y levaduras a las tortillas de maíz justo antes de ser envasadas (Figura 12). Debido a que no hubo crecimiento microbiano durante 56 días, se dedujo que la masa de las tortillas contenía conservantes, por lo que no fue posible seguir el plan de muestreo definido inicialmente (Figura 2). No obstante, en el día 59, se presume que el efecto del conservante llegó a su fin, ya que se evidenció el primer crecimiento de mohos y levaduras en las tortillas de los tres tipos de envases, pero no para BMA en el envase activo (PTM) (Figura 13). En el caso de MYL (Mohos y Levaduras) en las tortillas envasadas en la película PTM solo hubo crecimiento en una de las placas analizadas al mostrar un crecimiento superior a las otras placas y no cumplir con los rangos de conteo establecidos por la norma NOM Norma Oficial Mexicana -111-SSA1-1994 (1995),

se asume que se trata de una contaminación. En la Figura 12 se muestra el crecimiento de MYL en las tortillas envasadas en los envases PEAD, PHBA y PTM. A los 59 días, las tortillas contenidas en las bolsas de PEAD presentaron menos crecimiento de MYL que las tortillas en PHBA en comparación con el día cero. Mientras tanto, las tortillas envasadas en las bolsas PHBA registraron un aumento de MYL. Para el día 80, las tortillas envasadas en bolsas de PEAD y PHB presentaron una mayor evidencia de colonias de Mohos y levaduras en comparación con las tortillas empacadas en la película activa, como se ilustra en la Figura 14.

Figura 12

Comparación del efecto de la adición de AETM en películas sobre el crecimiento de mohos y levaduras en tortillas envasadas en bolsas de PEAD, PHBA y PTM.



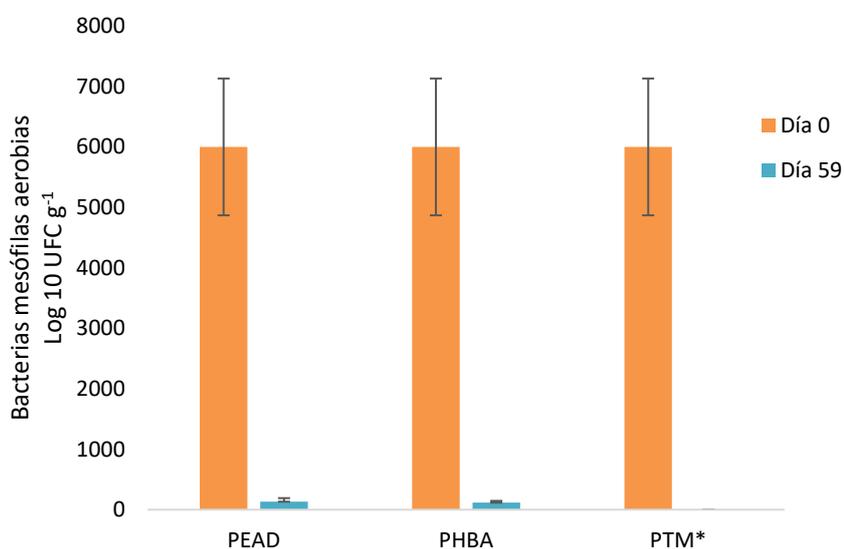
Nota. PEAD (Polietileno de alta densidad), tratamiento testigo. PHBA-polihidroxibutirato con aditivos, primer tratamiento. PTM Polihidroxibutirato con adición de aceite esencial de tomillo, tratamiento 2. **placa contaminada.

En el día cero, se analizaron por triplicado las tortillas justo antes de ser envasadas. Al llegar al día 59, se encontró que la reducción de BMA fue similar para los tres tratamientos ($P > 0.05$) como se muestra en la Figura 13. A pesar de que no se registraron diferencias significativas entre los

tratamientos en ese momento, se pudo observar una clara disminución en comparación con los niveles del día 0. En estudios anteriores se han reportado que la adición de aceites esenciales inciden en el crecimiento MYL al igual que en bacterias mesófilas aerobias (Ibarra Valenzuela, 2019; Turki et al., 2023). En el estudio realizado por Ibarra Valenzuela (2019), demostró la inhibición de *Escherichia coli*, *Penicillium sp* y *Aspergillus niger* en tortillas de maíz logrando extender la vida de anaquel en 8 a 10 días. Por otro lado, se prevé que el aceite logró desestabilizar la membrana celular, lo que facilitó aprovechar la propiedad lipofílica de los aceites en la interacción con las moléculas de la membrana del hongo. Las moléculas presentes en la pared celular, como la quitina, los glucanos y las proteínas, pueden interactuar con los aceites esenciales al formar puentes de hidrógeno. Esta interacción podría alterar la estructura de la pared celular, lo que a su vez podría interferir con el intercambio de iones necesarios para el crecimiento fúngico, resultando en la muerte de la célula (Maertens y Boogaerts, 2003; Pereira et al., 2020). Se ha propuesto que los aceites esenciales podrían actuar en bacterias a través de un mecanismo en el cual sus grupos funcionales interactúan con proteínas de la membrana celular. Esto podría resultar en un aumento en la permeabilidad de la célula y la reducción de componentes intracelulares vitales para el crecimiento bacteriano. Concentraciones elevadas de compuestos terpénicos podrían causar daño genético significativo, impidiendo la síntesis de elementos cruciales para la supervivencia de las bacterias y, en última instancia, conduciendo a la lisis celular (Oliveira et al., 2014). Otra hipótesis de la reducción en la tasa de crecimiento de microorganismos en la tortilla de maíz empaquetada en películas de PHB con aceite esencial de tomillo se debe al efecto de migración que ocurre desde el envase hacia el alimento según Ibarra Valenzuela (2019). Cuando se trata de aceites esenciales, la presencia del grupo hidroxilo en los compuestos terpénicos de estos aceites facilita la migración gracias a su carácter polar y su alta volatilidad; aunado a esto la afinidad con las moléculas de agua de las tortillas de maíz (Gastaldi, 2018; Ibarra Valenzuela, 2019).

Figura 13

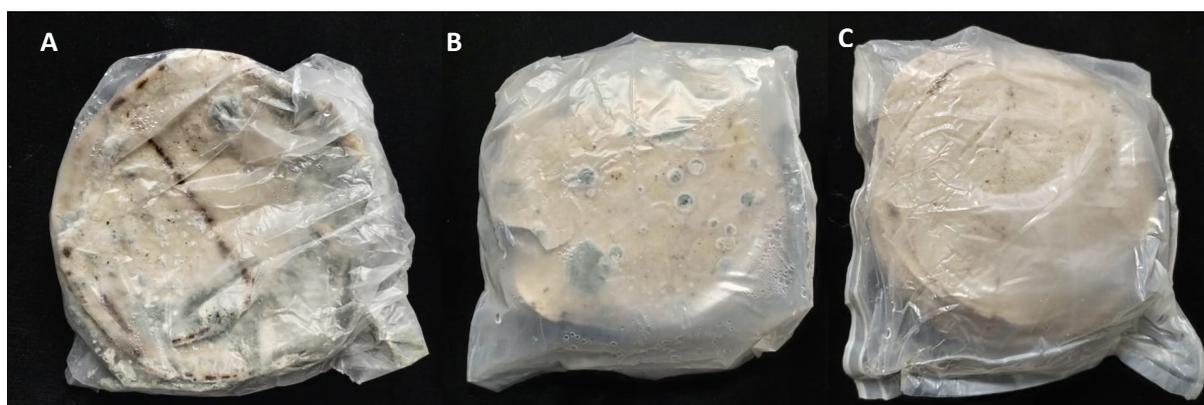
Comparación del efecto de la adición de AETM en películas sobre el crecimiento de bacterias mesófilas aerobias en tortillas envasadas en bolsas de PEAD, PHBA y PTM los días 0 y 59 a 5°C.



Nota. PEAD (Poliétileno de alta densidad), tratamiento testigo. PHBA (Polihidroxibutirato con adición de aditivos), tratamiento uno. PTM (Polihidroxibutirato con adición de aceite esencial de tomillo). PTM* no se registró crecimiento de BMA.

Figura 14

Crecimiento de microorganismos en tortillas de maíz empacadas en envases de PEAD, PHBA y PTM al día 80 de almacenamiento a 5°C.



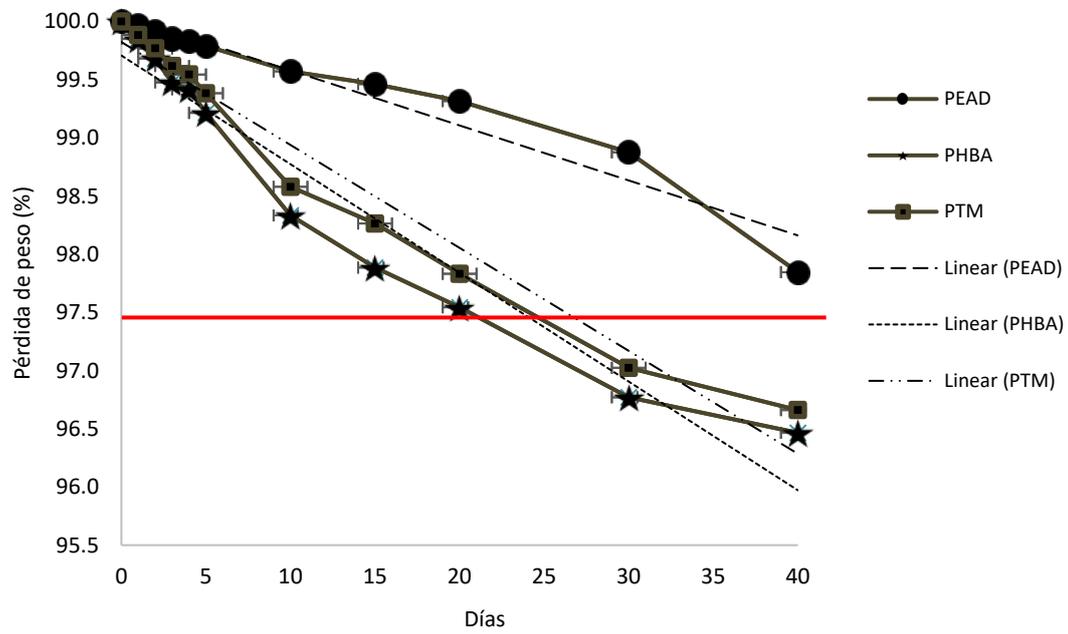
Nota. A (PEAD-Poliétileno de alta densidad), tratamiento testigo. B (PHBA-Polihidroxibutirato con adición de aditivos), tratamiento uno. C (PTM-Polihidroxibutirato con adición de aceite esencial de tomillo), tratamiento dos.

Pérdida de Peso

En la Figura 15 se presenta el porcentaje de pérdida de peso de las tortillas de maíz envasadas en tres tipos de películas: PEAD, PHBA y PTM. Las tortillas envasadas en la película PEAD hasta el día 40 de muestreo, mantuvieron una pérdida de agua inferior al 2.5%. Mientras que, las tortillas envasadas en las bolsas PHBA y PTM, superaron este límite al día 20 del muestreo. Para las tortillas envasadas en PEAD, con la ayuda de la ecuación de la recta (Anexo C) fue posible estimar que al día 52 de almacenamiento en refrigeración superaría el 2.5% de pérdida de su peso. Esta pérdida de peso se relacionó directamente con la baja WVTR del PEAD, que limita la transferencia de humedad desde y hacia el entorno exterior. Esto sugiere que a menor WVTR en el material de envasado, las tortillas tienen una mayor capacidad para conservar su textura y retardar la retrogradación. En el proceso de retrogradación las cadenas de almidón presente en el maíz, que fueron gelatinizadas durante la cocción para formar una masa flexible y suave, comienzan a recrystalizar y recuperar su estructura original durante el enfriamiento o almacenamiento de la tortilla. Este proceso de retrogradación puede hacer que la tortilla se vuelva más rígida y pierda su textura suave y flexible original (Wang et al., 2015). Siguiendo este criterio, y sin tomar en cuenta el crecimiento microbiano, se deduce que la vida de anaquel de las tortillas en PHBA y PTM almacenadas a 5°C fue de 22 y 25 días, respectivamente. Mientras que, las tortillas envasadas en PEAD fue mayor a 50 días en refrigeración.

Figura 15

Pérdida de peso de las tortillas de maíz envasadas a 5°C.



Nota. PEAD-Polietileno de alta densidad. PHBA-Polihidroxibutirato con aditivos. PTM-Polihidroxibutirato con aditivos y aceite esencial de tomillo. La palabra linear indica la línea de tendencia de cada curva.

Conclusiones

Se desarrolló un envase activo tipo bolsa con propiedades antimicrobianas y biodegradables de polihidroxibutirato con aditivos y aceite esencial de tomillo para envasar tortillas de maíz.

La incorporación del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) en la película PTM mejoró sus propiedades de barrera y mantuvo la migración global dentro los límites permitidos, lo que resultó en una vida de anaquel de 20 días para las tortillas envasadas en películas PHBA y PTM. Existió una disminución en las propiedades mecánicas de la película PTM respecto a PHB, sin embargo, las bolsas fabricadas no presentaron roturas, agrietamientos ni deformaciones.

Los microorganismos aislados de las tortillas de maíz evaluadas fueron los hongos *Penicillium* sp, *Rhizopus oryzae* y *Aspergillus niger*.

La adición de aceite esencial de tomillo a las películas PTM demostró ser eficaz en la inhibición del crecimiento de mohos y levaduras y bacterias mesófilas aerobias.

Recomendaciones

Realizar un análisis sensorial de las tortillas de maíz empacadas con los tres envases para determinar la aceptación general.

Evaluar y contrastar el tamaño del halo de inhibición en bacterias gram positivas y hongos ante variadas concentraciones del aceite esencial de tomillo.

Evaluar la capacidad antimicrobiana con discos de las películas fabricadas.

Fabricar películas utilizando mayores concentraciones de aceite esencial de tomillo.

Asegurar que las tortillas en las que se prueben las bolsas no contengan agentes conservantes.

Referencias

Abarca, L. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana De Micología*, 17(3), 79–84. <http://www.reviberoammicol.com/2000-17/S79S84.pdf>

Aguirre, A., Borneo, R. y León, A. E. (2013). Antimicrobial, mechanical and barrier properties of triticale protein films incorporated with oregano essential oil. *Food Bioscience*, 1(17), 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2012.12.001>

Allende Molar, R., Picos, P., Márquez Zequera, I., Carrillo Fasio, J. A., García Estrada, R. S. y León Félix, J. (2013). Identificación morfológica y molecular de *Penicillium oxalicum* causante de pudrición de tallos y frutos de tomate. *Revista Mexicana De Fitopatología*, 30, 13–19. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092013000100002

American Society for Testing Materials (ASTM) (2010). *Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials E96/E96M – 10*. (Norma). <https://cdn.standards.iteh.ai/samples/76081/68abc4a297f040bc9f87aa477960c649/ASTM-E96-E96M-10.pdf>

American Society for Testing Materials (ASTM) (2012). *Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting*. (Norma, ASTM D882-12). <https://www.astm.org/d0882-12.html>

Antonio, G., Mejía, G. y Zanabria, K. (2018). *Determinación de microorganismos en el aire de los laboratorios de microbiología de la Universidad Continental-2018* [Trabajo de investigación para obtener el grado académico de bachiller en Tecnología médica]. Universidad Continental, Huancayo. http://repositoriodemo.continental.edu.pe/bitstream/20.500.12394/7198/3/IV_FCS_508_TI_Acosta_Mejia_Zanabria_2018.pdf

Asgher, M., Qamar, S. A., Bilal, M. y Iqbal, H. M. N. (2020). Bio-based active food packaging materials: Sustainable alternative to conventional petrochemical-based packaging materials. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 137, 109625. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109625>

Astudillo, M. y Olmedo, L. (2021). *Obtención de Polihidroxitirato (PHB) a partir del subproducto glicerol procedente de la transformación de aceites usados de palma a biodiesel* [Tesis]. Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/21448/1/UPS-CT009430.pdf>

Bhargava, N., Sharanagat, V. S., Mor, R. S. y Kumar, K. (2020). Active and intelligent biodegradable packaging films using food and food waste-derived bioactive compounds: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 105(6–7), 385–401. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.015>

Biradar, G. G., Shivasharana, C. T. y Kaliwal, B. B. (2018). Characterization of Polyhydroxybutyrate (PHB) Produced by Novel Bacterium *Lysinibacillus sphaericus* BBKGBS6 Isolated From Soil. *Journal of Polymers and the Environment*, 26(4), 1685–1701. <https://doi.org/10.1007/s10924-017-1054-x>

Cabrera Meraz, J., Maldonado, L., Bianchini, A. y Espinal, R. (2021). Incidence of aflatoxins and fumonisins in grain, masa and corn tortillas in four municipalities in the department of Lempira, Honduras. *Heliyon*, 7(12), e08506. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08506>

Carpaena, M., Nuñez Estevez, B., Soria López, A., García Oliveira, P. y Prieto, M. A. (2021). Essential Oils and Their Application on Active Packaging Systems: A Review. *Resources*, 10(1), 7. <https://doi.org/10.3390/resources10010007>

Castro, J. I., Valencia Llano, C. H., Valencia Zapata, M. E., Restrepo, Y. J., Mina Hernandez, J. H., Navia Porras, D. P., Valencia, Y., Valencia, C. y Grande Tovar, C. D. (2021). Chitosan/polyvinyl Alcohol/Tea Tree Essential Oil Composite Films for Biomedical Applications. *Polymers*, 13(21). <https://doi.org/10.3390/polym13213753>

Chouhan, S., Sharma, K. y Guleria, S. (2017). Antimicrobial Activity of Some Essential Oils-Present Status and Future Perspectives. *Medicines (Basel, Switzerland)*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>

Cruz Lachica, I., Márquez Zequera, I., García Estrada, R. S., Carrillo Fasio, J. A., León Félix, J. y Allende Molar, R. (2017). Identificación de hongos mucorales causantes de la pudrición blanda en frutos de papaya (*Carica papaya* L.) en México. *Revista Mexicana De Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 35(3). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1611-3>

Elgarhi, H., Abu, H., Elewa, N. y Galal, E. (2020). Morphological characteristics of fungi species isolated from dairy products in Fayoum governorate. *Egyptian Journal of Food Science*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.21608/EJFS.2020.28797.1051>

El-Naggar, M. E., Hasanin, M., Youssef, A. M., Aldalbahi, A., El-Newehy, M. H. y Abdelhameed, R. M. (2020). Hydroxyethyl cellulose/bacterial cellulose cryogel dopped silver@titanium oxide nanoparticles: Antimicrobial activity and controlled release of Tebuconazole fungicide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165(Pt A), 1010–1021. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.09.226>.

Esparza, A. (2008). *Sistemas de alta barrera en empaques flexibles* [Caso de estudio]. Centro de Investigación en Química Aplicada, Coahuila. <https://ciqa.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1025/340/1/Ana%20Leonor%20Esparza%20Garces.pdf>

Espejel García, M., Mora Flores, J., García Salazar, J., Pérez Elizalde, S. y García Mata, R. (2016). Caracterización del consumidor de tortilla en el Estado de México. *Agricultura, Sociedad Y Desarrollo*(13), 371–384. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-54722016000300371#B8

Garde, G. (2013). *Cuantificación de la retención de Carvacrol y Eugenol durante la formación de películas comestibles activas* [Tesis]. Universidad Pública de Navarra. <https://academica-e.unavarra.es/xmlui/bitstream/handle/2454/6907/577985.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Garde, J. A., Catalá, R., Gavara, R. y Hernandez, R. J. (2001). Characterizing the migration of antioxidants from polypropylene into fatty food simulants. *Food Additives and Contaminants*, 18(8), 750–762. <https://doi.org/10.1080/02652030116713>

Garrido, K. (2018). *Bionanocompuestos de Polihidroxibutirato/Almidón con propiedades antimicrobianas y/o antioxidantes* [Tesis doctoral]. Universidad de Concepción, Chile. http://repositorio.udec.cl/bitstream/11594/3495/6/Tesis_Binanocompuestos_de_polihidroxibutirato_almidon.Image.Marked.pdf

Gastaldi, B. (2018). *Análisis de los compuestos fenólicos y volátiles de plantas medicinales y aromáticas del noroeste de la Patagonia Argentina, estudio de las actividades antioxidante y citotóxica*. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Argentina. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/82836>

Gómez, M., León, J. y Rodríguez, C. (2018). Producción de láminas de hongos para la enseñanza. *Hechos De Microbiología*, 9, 20–27. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/hm/article/view/332002/20794055>

Góngora, J. (2014). La industria del plástico en México y el mundo. *Revista Bancomex*, 64(5), 6–9. 36. http://revistas.bancomext.gob.mx/rce/magazines/761/3/la_industria_del_plastico.pdf

Hemath, K., Gaurav, K., Karthik, L. y Bhaskara, K. (2010). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the filamentous fungus *Penicillium sp.* *Archives of Applied Science Research*, 2(6), 161–167. <https://www.scholarsresearchlibrary.com/articles/extracellular-biosynthesis-of-silver-nanoparticles-using-the-filamentous-fungus-penicillium-sp.pdf>

Hernández, S., Reyes, M., García, G [Gerardo], Mayek, N., Reyes y Augusto (2007). Incidencia de hongos potencialmente toxígenos en maíz (*Zea mays* L.) almacenado y cultivado en el norte de Tamaulipas, México. *Revista Mexicana De Fitopatología*, 25(2), 127–133. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092007000200006

Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M. y Farahmandghavi, F. (2015). Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare* L. essential oil. *Industrial Crops and Products*, 67, 403–413. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.062>

Hosseinzadeh, S., Jafarikukhdan, A., Hosseini, A. y Armand, R. (2015). The Application of Medicinal Plants in Traditional and Modern Medicine: A Review of *Thymus vulgaris*. *International Journal of Clinical Medicine*, 06(09), 635–642. <https://doi.org/10.4236/ijcm.2015.69084>

Ibarra Valenzuela, A. P. (2019). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de dos envases activos con aceite esencial de azahar (Citrus aurantium) en la vida de anaquel de las tortillas de maíz* [Tesis de maestría]. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, Sonora. https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/1097/1/Ibarra%20Valenzuela%20Ana%20Patricia_MC%202019.pdf

Kavitha, G., Rengasamy, R. y Inbakandan, D. (2018). Polyhydroxybutyrate production from marine source and its application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.155>

Kuusipalo, J. (2000). PHB/V in Extrusion Coating of Paper and Paperboard—Study of Functional Properties. Part II. *Journal of Polymers and the Environment*, 8(2), 49–57. <https://doi.org/10.1023/A:1011565519440>

Maertens, J. y Boogaerts, M. (2003). Caspofungin in the treatment of candidosis and aspergillosis. *International Journal of Infectious Diseases : IJID : Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 7(2), 94–101. [https://doi.org/10.1016/S1201-9712\(03\)90003-8](https://doi.org/10.1016/S1201-9712(03)90003-8)

Maldonado, A., López, L., Lores, S. y Osorio, E. (2017). Identificación morfológica de hongos y bacterias en lodos de extracción de gas natural y de tratamiento de aguas residuales. *Temas De Ciencia Y Tecnología*, 21(62), 3–12. <http://repositorio.utm.mx:8080/bitstream/123456789/348/1/2017-TCyT-AMT.pdf>

Marqués, J., Chiralt, A. y Requena, R. (2015). *Incorporación de aceites esenciales en films bicapa de PHBV y análisis de sus propiedades físicas antimicrobianas* [Tesis]. Universitat Politècnica de Valencia, Valencia. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/54490/MARQU%c3%89S%20%20INCORPORACI%c3%93N%20DE%20ACEITES%20ESENCIALES%20EN%20FILMS%20BICAPA%20DE%20PHBV%20Y%20AN%c3%81LISIS%20DE%20SUS%20PROPIEDAD...pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Martínez, R., García, G [Genoveva] y Melgarejo, J. (2003). Inspección de aflatoxinas en maíz cultivado, almacenado y transportado en Tamaulipas, México, en 1998. *Anales Del Instituto De Biología. Serie Botánica*, 74(2), 313–321.

Martínez Flores, H., Gaytán Martínez, M., Figueroa Cárdenas, Juan de D., Martínez Bustos, F., Reyes Vega, María de la L. y Rodríguez Vidal, A. (2004). Effect of some preservatives on shelf-life of corn tortillas obtained from extruded masa. *Agrociencia*, 38(3), 285–292. <https://www.redalyc.org/pdf/302/30238303.pdf>

Meléndez Pastrana, I. Y., Rodríguez Morachis, M. A., Rodríguez Medina, M. A. y Zorrilla Briones, F. (2021). Determinación de la vida útil de la tortilla de maíz adicionada con aceite esencial de tomillo a través de pruebas de vida acelerada. *RIDE Revista Iberoamericana Para La Investigación Y El Desarrollo Educativo*, 12(23). <https://doi.org/10.23913/ride.v12i23.1017>

Modi, S., Koelling, K. y Vodovotz, Y. (2011). Assessment of PHB with varying hydroxyvalerate content for potential packaging applications. *European Polymer Journal*, 47(2), 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.11.010>

Moura, A., Lima, L. d. P., Steffen, S. y Santana, R. (2017). *Avaliação comparativa das propriedades mecânicas e morfológica de compósitos de polihidroxibutirato reforçado com fibras de coco e pó de itaúba* [Congresso Brasileiro de Polímeros]. <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/237580/001089506.pdf?sequence=1>

NOM Norma Oficial Mexicana -111-SSA1-1994 (1995). *Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos*. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4881226&fecha=13/09/1995#gsc.tab=0

NOM Norma Oficial Mexicana-092-SSA1-1994 (1995). *Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa*. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4886029&fecha=12/12/1995#gsc.tab=0

NOM Norma Oficial Mexicana-093-SSA1-1994 (1994, 29 de julio). *Bienes y servicios. Preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. Especificaciones sanitarias. Cédula de verificación*. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4721115&fecha=29/07/1994&print=true#:~:text=Cuenta%20total%20de%20meses%20de%20ADlicos%20aerobios,%3C%203%20NMP%20Fg%20o%20ml.

NOM Norma Oficial Mexicana-110-SSA1-1994 (1994). *Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico*. <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69533.pdf>

Oliveira, S. A. C., Zambrana, J. R. M., Di Iorio, F. B. R., Pereira, C. A. y Jorge, A. O. C. (2014). The antimicrobial effects of Citrus limonum and Citrus aurantium essential oils on multi-species biofilms. *Brazilian Oral Research*, 28, 22–27. <https://doi.org/10.1590/S1806-83242013005000024>

Pal, T., Pramanik, S., Verma, K. D., Naqvi, S. Z., Manna, P. K. y Kar, K. K. (Eds.). (2022). *Fly ash-reinforced polypropylene composites: Characterization* (Vol. 9). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817686-3.00021-9>

Pawar, P. y Purwar, A. (2013). Biodergradable Polymers in Food Packaging. *American Journal of Engineering Research (AJER)*, 02(05), 151–164.

Pereira, A., Rangel, D. y Souza, C. de (2020). Perfil químico y actividad antifúngica del aceite esencial de la flor de Bauhinia rufa (Bong.) Steud. *Revista Cubana De Farmacia*, 2(53). <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubfar/rcf-2020/rcf202d.pdf>

Ramos, M., Beltrán, A., Peltzer, M., Valente, A. J. y Garrigós, M. d. C. (2014). Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films. *LWT - Food Science and Technology*, 58(2), 470–477. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.019>

Ríos, A., González, G. y Flores, O. (2023). Mucor: el ascenso y caída de un antiguo patógeno en tiempos de COVID-19. *Univerdad Autónoma De Nuevo León, Monterrey, México*.(119), 44-19. https://cienciauanl.uanl.mx/wp-content/uploads/2023/05/119_Academico2.pdf

Rivas, L. F., Casarin, S. A., Nepomuceno, N. C., Alencar, M. I., Agnelli, J. A. M., Medeiros, E. S. d., Wanderley Neto, A. d. O., Oliveira, M. P. d., Medeiros, A. M. d. y Santos, A. S. F. e. (2017). Reprocessability of PHB in extrusion: ATR-FTIR, tensile tests and thermal studies. *Polímeros*, 27(2), 122–128. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.2406>

Rodríguez, K. y Andino, P. (2022). *Elaboración de una película a partir de quitosano extraído de exuvia de Hermetia illucens reforzada con aceite esencial de romero como agente antimicrobiano* [Proyecto especial de graduación]. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/e683bcb3-8f02-43d5-b081-809ffdddb3b2/content>

Rooney, L. W. y Serna Saldivar, S. O. (2016). Tortillas: Módulo de Referencia en Ciencia de los Alimentos. *Elsevier*, 41, 624. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00124-4>

Safari, S. y van de Ven, T. G. M. (2015). Effect of crystallization conditions on the physical properties of a two-layer glassine paper/polyhydroxybutyrate structure. *Journal of Materials Science*, 50(10), 3686–3696. <https://doi.org/10.1007/s10853-015-8929-9>

Secretaría de Agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. (2017). *Planeación Agrícola Nacional 2017-2030*. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256429/B_sico-Ma_z_Grano_Blanco_y_Amarillo.pdf

Suppakul, P., Sonneveld, K., Bigger, S. W. y Miltz, J. (2011). Loss of AM additives from antimicrobial films during storage. *Journal of Food Engineering*, 105(2), 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.02.031>

Tejeda, C., García, A., Torres, B. y Olgún, J. (2017). Alternativa Agroecológica para el Manejo de Atta mexicana en Puebla, México. *Southwestern Entomologist*, 42(1), 261–273. <https://doi.org/10.3958/059.042.0123>

Topala, C. y Tataru, L. (2016). ATR-FTIR Study of Thyme and Rosemary Oils Extracted by Supercritical Carbon Dioxide. *Revista De Chimie*, 67(5). <https://bch.ro/pdfRC/TOPALA%20C%20%205%2016.pdf>

Torres Sombra, J. (2018). La tortilla de maíz mexicana. Un símbolo milenario., 69–94. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/biogenesis/article/view/336224/20791753>

Turki, A., Asma, E. O. y Slah, M. (2023). Characterization and Antimicrobial Activity Studies of Agave Sheets with Thymol and Clove Oil for Active Packaging. *Journal of Natural Fibers*, 20(1), Artículo 2178583. <https://doi.org/10.1080/15440478.2023.2178583>

Reglamento sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos., Diario Oficial de la Unión Europea (2011). <https://www.boe.es/doue/2011/012/L00001-00089.pdf>.

Vignola, M. B., Serra, M. A. y Andreatta, A. E. (2020). Actividad Antimicrobiana de Diversos Aceites Esenciales en Bacterias Benéficas, Patógenas y Alterantes de Alimentos. *Revista Tecnología Y Ciencia*(37), 92–100. <https://doi.org/10.33414/rtyc.37.92-100.2020>

Wang, S [Shujun], Li, C., Copeland, L., Niu, Q. y Wang, S [Shuo] (2015). Starch Retrogradation: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(5), 568–585. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12143>

Anexos**Anexo A**

Proceso para determinar migración global de compuestos desde el envase hacia el alimento.



Anexo B

*Zona de inhibición de discos de papel filtro impregnados con gotas de aceite esencial de tomillo
frente a E. coli.*

Halo de inhibición de <i>E. coli</i>	
	Halo de inhibición cm \pm D. E
R1	4.80 \pm 0.72
R2	3.15 \pm 0.07
R3	El halo se mostró en toda la placa
R4	El halo se mostró en toda la placa

Nota. Cm: centímetros. D.E.: Desviación estándar.

Anexo C

Ecuación de la recta obtenida con regresión lineal para cada tratamiento

Tratamiento	Ecuación de la recta	R ²
PEAD	$y = -0.0473x + 100.05$	0.9449
PHBA	$y = -0.0934x + 99.708$	0.9442
PTM	$y = -0.0885x + 99.824$	0.9665

Nota. R². Explica variabilidad de los datos.