UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Desarrollo y caracterización de recubrimientos activos a base de nanofibras electrohiladas de policaprolactona, quitosano y extractos oleosos de propóleos colombianos para la conservación de filetes de lomo de cerdo.

Emeli Dayana Vargas Romero

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Posgrado de Ciencia y Tecnología de Alimentos

Bogotá, Colombia

2020

Desarrollo y caracterización de recubrimientos activos a base de nanofibras electrohiladas de policaprolactona, quitosano y extractos oleosos de propóleos colombianos para la conservación de filetes de lomo de cerdo.

Emeli Dayana Vargas Romero

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencia y Tecnología de alimentos

Director:

Héctor Suárez Mahecha MSc, Ph.D.

Línea de Investigación:

Diseño y desarrollo de nuevos productos

Grupo de Investigación:

Ciencia y tecnología de productos cárnicos y acuícolas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Bogotá, Colombia

2020

A mi padre, mi gran maestro, quien me enseñó el amor en cada momento de su vida.

La gratitud se da cuando la memoria se almacena en el corazón y no en la mente

Lionel Hampton

Agradecimientos

Agradezco profundamente todo este trabajo investigativo y lo aprendido durante estos años:

A toda mi familia, por su amor y apoyo incondicional incluso en la distancia; especialmente a mi madre, mi fiel confidente y motivante.

A mi tutor el profesor Héctor Suárez Mahecha, quien no solo fue un mentor académico durante mi proceso formativo, también fue un amigo quien me impulsó y me ayudó a hacer mis metas realidad.

A todo el equipo investigativo de la U. de Guelph, en particular a mis supervisores el Dr. Loong-Tak Lim y el Dr. Benjamin Bohrer quienes apoyaron fuertemente todo mi trabajo investigativo, por su amabilidad y disposición.

A todo el equipo investigativo de los laboratorios de microbiología, fisicoquímica, vegetales y lácteos del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia, en especial a María Cristina Lizarazo por su gran ayuda y entrega.

Estos años han sido un gran camino de crecimiento personal y profesional, no tengo palabras suficientes para expresar mi gratitud con todos aquellos que permitieron que este trabajo sea una realidad.

Resumen

Las tecnologías de envasado activo son estrategias prometedoras que permiten preservar la calidad de los productos cárnicos mediante la incorporación de compuestos activos con propiedades antimicrobianas u otras como antioxidantes en el empaque. Recientemente una nueva tecnología de envasado activo ha generado gran interés debido que presenta características mejoradas en comparación con los envases activos tradicionales, esta se desarrolla a base de estructuras fibrosas a nanoescala llamadas nanofibras, las cuales presentan una alta proporción de superficie-volumen y un gran potencial para la liberación de compuestos activos mientras se utiliza menos material de embalaje; siendo una tecnología de envasado eficiente y segura para contrarrestar los efectos negativos del deterioro de la carne de cerdo fresca. Por este motivo, este estudio desarrolló y caracterizó un empaque activo que contiene recubrimientos a base de nanofibras de policaprolactona (**PCL**) /quitosano (**CH**) y policaprolactona/quitosano y extractos oleosos de propóleos Colombianos (**EOP**) sobre una película de polietileno de baja densidad (**PEBD**) para preservar la calidad de filetes de lomo de cerdo durante 20 días de almacenamiento a 4ºC. Los EOP y las soluciones de electrohilado se estudiaron para producir nanofibras a gran escala con propiedades antioxidantes y antimicrobianas mediante el uso de una técnica de electrohilado de superficie libre. Los EOP se caracterizaron basándose en la actividad antioxidante y antimicrobiana y las soluciones de electrohilado se caracterizaron mediante pruebas de viscosidad, conductividad y tensión superficial, donde la adición de EOP mostró mejorar los parámetros de las soluciones como la viscosidad, la tensión superficial y la conductividad ($P < 0{,}001$) presentando fibras con mejor morfología que las nanofibras de PCL/CH. Las nanofibras desarrolladas presentaron una alta eficiencia de encapsulación de EOP y mejor actividad antimicrobiana cuando se adicionó EOP al 5%. Posteriormente, dos empaques activos de PEBD que contenían recubrimientos de nanofibras de PCL/CH y/o EOP fueron usados para empacar filetes de lomo de cerdo durante 20 días a 4ºC. Las

muestras de carne de cerdo fueron analizadas para pH, parámetros de color, pérdida de peso, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (**TBARS**) y conteo de bacterias aeróbicas mesófilas y psicrótrofas. Los resultados mostraron que la incorporación de EOP mejoró las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de las nanofibras de PCL/CH debido a una mejor protección del color con un valor estable de a* (5,31) a los 4 días, estabilidad en el pH durante todo el tiempo de almacenamiento y un efecto bactericida sinérgico que mostró extender hasta 7 días la calidad microbiana de la carne. Los resultados de este estudio demuestran que soluciones de PCL/CH/EOP pueden ser electrohiladas para generar nanofibras activas que permiten el desarrollo de empaques activos con el potencial de mantener la calidad y extender la vida útil de la carne de cerdo.

Palabras clave: nanotecnología, empaque activo, conservación, carne, vida útil

Abstract

Active packaging technologies are promising strategies that allow preserving the quality of meat products by incorporating active compounds with antimicrobial or other properties as antioxidants in the packaging. Recently a new active packaging technology has generated great interest because it has improved characteristics compared to traditional active packaging, this is developed based on nanoscale fibrous structures called nanofibers, which have a high surface-volume ratio and a large potential for the release of active compounds while using less packaging material; being an efficient and safe packaging technology to prevent the negative effects of the deterioration of fresh pork. For this reason, this study developed and characterized an active packaging containing nanofiber based coatings of polycaprolactone (PCL) / chitosan (CH) and polycaprolactone / chitosan and oily extracts of Colombian propolis (EOP) on a low density polyethylene film (LDPE) to preserve the quality of pork tenderloin fillets for 20 days of storage at 4 ° C. The EOP and electrospinning solutions were studied to produce large-scale nanofibers with antioxidant and antimicrobial properties through the use of a free-surface electrospinning technique. The EOP were characterized based on the antioxidant and antimicrobial activity and the electrospinning solutions were characterized by testing of viscosity, conductivity and surface tension, where

the addition of EOP showed improvement of the parameters of the solutions such as viscosity and surface tension ($P < 0.001$) presenting fibers with better morphology than PCL / CH nanofibers. The nanofibers developed showed high EOP encapsulation efficiency and better antimicrobial activity when 5% EOP was added. Subsequently, two active PEBD packages containing PCL/CH and / or EOP nanofiber coatings were used to wrap pork chops fillets for 20 days at 4 ° C. Pork samples were analyzed for pH, color parameters, weight loss, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and mesophilic and psychrotrophic aerobic bacteria count. The results showed that the incorporation of EOP improved the antioxidant and antimicrobial properties of PCL/CH nanofibers due to better color protection with a stable value of a * (5.31) at 4 days, pH stability during all the storage time and a synergistic bactericidal effect that showed extending the microbial quality of the meat up to 7 days. The results of this study demonstrate that PCL/CH/EOP solutions can be electrospun to generate active nanofibers that allow the development of active packaging with the potential to maintain quality and extend the shelf life of pork.

Keywords: nanotechnology, active packaging, preservation, meat, shelf life

Contenido

RESUMEN ..... **VII**

LISTA DE FIGURAS ..... **XIV**

LISTA DE TABLAS ..... **XVI**

LISTA DE ABREVIATURAS ..... **XVIII**

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA **21**

JUSTIFICACIÓN **24**

OBJETIVOS **26**

INTRODUCCIÓN **27**

1. VIDA ÚTIL DE LA CARNE DE CERDO Y LOS NUEVOS AVANCES EN EL ENVASADO ACTIVO DE PRODUCTOS CÁRNICOS A BASE DE NANOFIBRAS DESARROLLADAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELECTROHILADO. **30**

1.1. RESUMEN 30
1.2. ABSTRACT 31
1.3. INTRODUCCIÓN 31
1.4. PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ELECTROHILADO O "*ELECTROSPINNING*" 33
1.4.1. Técnica del electrohilado *33*
1.4.2. Electrohilado de superficie libre *35*
1.4.3. Factores físicos que rigen el electrohilado *36*
1.4.4. Parámetros que afectan el electrohilado *38*
1.4.4.1. Parámetros de la solución 38
1.4.4.2. Parámetros del proceso de electrohilado de alambre de superficie libre 40
1.4.4.3. Parámetros ambientales 41
1.5. ELECTROHILADO DE POLÍMEROS Y SUSTANCIAS BIOACTIVAS PARA LA INDUSTRIA DE EMPAQUES ALIMENTICIOS 42
1.5.1. Policaprolactona *43*
1.5.2. Quitosano *45*
1.5.3. Propóleos *47*
1.6. LIBERACIÓN CONTROLADA EN EMPAQUES ALIMENTICIOS ANTIMICROBIANOS 48
1.6.1. Liberación controlada por difusión *49*
1.6.2. Liberación controlada por hinchamiento *50*
1.6.3. Liberación controlada químicamente *51*
1.7. EMPAQUES ANTIMICROBIANOS A BASE DE NANOFIBRAS EN PRODUCTOS CÁRNICOS 52

1.7.1. Empaques antimicrobianos ... *52*
1.8. VIDA ÚTIL DE LA CARNE DE CERDO FRESCA ... 54
1.8.1. Oxidación de la mioglobina y el color de la carne ... *55*
1.8.2. Oxidación lipídica ... *57*
1.8.3. Microbiología de la carne de cerdo ... *59*
1.9. EMPAQUES USADOS PARA LA CARNE DE CERDO ... 63
1.9.1. Envasado en empaques de atmósfera modificada ... *63*
1.9.2. Envasado en empaques de atmósfera controlada ... *65*
1.9.3. Envasado al vacío ... *65*
1.9.4. Envasado activo ... *66*
1.10. CONCLUSIÓN ... 67
1.11. REFERENCIAS ... 68

2. DESARROLLO DE UN EMPAQUE ALIMENTICIO ACTIVO QUE CONTIENE NANOFIBRAS ELECTROHILADAS DE POLICAPROLACTONA, QUITOSANO Y EXTRACTOS OLEOSOS DE PROPÓLEOS COLOMBIANOS. . 89

2.1. RESUMEN ... 89
2.2. ABSTRACT ... 90
2.3. INTRODUCCIÓN ... 90
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS ... 93
2.4.1. Extracción y caracterización de los propóleos ... *93*
2.4.1.1. Obtención de los extractos oleosos de propóleos (EOP): ... 93
2.4.1.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos oleosos de propóleos (EOP) ... 94
2.4.1.3. Determinación de fenoles totales de los EOP ... 94
2.4.1.4. Determinación de la actividad antioxidante de los extractos oleosos de propóleos por el método de TEAC (decoloración del catión radical ABTS) ... 95
2.4.2. Preparación y caracterización de las soluciones de electrohilado ... *95*
2.4.2.1. Preparación de las soluciones para el electrohilado ... 95
2.4.2.2. Viscosidad de las soluciones para el electrohilado ... 96
2.4.2.3. Conductividad eléctrica y tensión superficial de las soluciones para el electrohilado ... 96
2.4.3. Desarrollo y caracterización de las nanofibras ... *96*
2.4.3.1. Técnica de electrohilado ... 96
2.4.3.2. Caracterización morfológica de las nanofibras ... 97
2.4.3.3. Evaluación de la presencia e interacción de los compuestos presentes en las nanofibras mediante Reflectancia Total Atenuada (ATR) Infrarrojos por Transformada de Fourier (FTIR*)* ... 97
2.4.3.4. Capacidad de carga (CC) y eficiencia de encapsulación (EE) ... 97
2.4.3.5. Evaluación antibacteriana de los empaques activos recubiertos con nanofibras de PCL/CH y PCL/CH/ EOP ... 98
2.4.4. Análisis estadístico ... *99*
2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN ... 99
2.5.1. Extracción de los extractos oleosos de propóleos ... *99*
2.5.1.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria-CMI de los extractos oleosos de propóleos ... 100
2.5.1.1. Determinación de fenoles totales y actividad antioxidante ABTS ... 101

2.5.2. Viscosidad de las soluciones para el electrohilado ... 102
2.5.3. Conductividad eléctrica y tensión superficial de las soluciones para el electrohilado ... 104
Desarrollo y caracterización de las nanofibras ... 106
2.5.4. Técnica de electrohilado ... 106
2.5.5. Efecto de la adición de extractos oleosos de propóleos en la morfología de las nanofibras ... 106
2.5.6. Evaluación de la presencia e interacción de los compuestos presentes en las nanofibras mediante reflectancia total atenuada (ATR) infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) ... 109
2.5.7. Capacidad de carga y eficiencia de encapsulación ... 112
2.5.8. Evaluación antibacteriana de los empaques activos recubiertos con nanofibras de PCL/CH y PCL/CH/ EOP ... 114
2.6. CONCLUSIÓN ... 115
2.7. REFERENCIAS ... 116

3. EFECTO DE NANOFIBRAS DE POLICAPROLACTONA QUE CONTIENEN QUITOSANO Y/O EXTRACTOS OLEOSOS DE PROPÓLEOS EN LA CONSERVACIÓN DE CARNE DE CERDO REFRIGERADA ... 127

3.1. RESUMEN ... 127
3.2. ABSTRACT ... 128
3.3. INTRODUCCIÓN ... 129
3.4. MATERIALES Y MÉTODOS ... 131
3.4.1. Preparación de las soluciones y proceso de electrohilado ... 131
3.4.2. Sistema de empaquetamiento de los filetes de lomo de cerdo ... 132
3.4.3. Medidas de Color ... 132
3.4.4. Determinación del pH ... 133
3.4.5. Pérdida de peso ... 133
3.4.6. Evaluación de la oxidación lipídica ... 134
3.4.7. Análisis microbiológico ... 134
3.4.8. Análisis estadístico ... 135
3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN ... 135
3.5.1. Cambios fisicoquímicos de la calidad de la carne ... 137
3.5.1.1. Parámetros de color y apariencia de los filetes de cerdo ... 137
3.5.1.2. Determinación del pH ... 140
3.5.1.3. Pérdida de peso ... 143
3.5.1.4. Oxidación lipídica ... 143
3.5.1.5. Análisis microbiológico ... 144
3.6. CONCLUSIÓN ... 148
3.7. REFERENCIAS ... 148

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES ... 156

4.1. CONCLUSIONES ... 156
4.2. RECOMENDACIONES ... 158

BIBLIOGRAFÍA..... 169

Lista de figuras

Figura 1-1 Diagrama esquemático de un equipo de electrohilado convencional[1] 35
Figura 1-2 Diagrama esquemático de un equipo de electrohilado de superficie libre de alambre.[1] 36
Figura 1-3 Diagrama esquemático que representa la relación entre las fuerzas de Coulombic (FC), campo eléctrico (FE), fuerza viscoelástica (FV), Tension superficial (FS), arrastre de aire (FA) y fuerzas gravitacionales (FG). Las flechas representan las direcciones en la que las fuerzas actuan sobre el chorro de la solución de electrohilado[1] 37
Figura 1-4 Estructura química de la policaprolactona[1] 43
Figura 1-5 Estructura química del quitosano[1] 45
Figura 1-6 Representación esquemática de los mecanismos de liberación controlada 49
Figura 1-7 Representación esquématica del uso de nanofibras electrohiladas en el envasado activo de alimentos[1] 54
Figura 1-8. Estados de oxidación-reducción de la mioglobina[1] 56
Figura 1-9. Mecanismo de peroxidación lipídica[1]. 58
Figura 2-1 Viscosidad de las soluciones de electrohilado a base de policaprolactona, quitosano y extractos oleosos de propóleos[1] 102
Figura 2-2 Morfología de las nanofibras SEM a. PCL/CH, b. PCL/CH/EOP5, c. PCL/CH/EOP10, d. PCL/CH/EOP20, e. PCL/CH/EOP30. Los histogramas muestran la distribución del diámetro de las nanofibras f. PCL/CH, g. PCL/CH/EOP5, h. PCL/CH/EOP10, i. PCL/CH/EOP20, j. PCL/CH/EOP30. 107

Figura 2-3 ART-FTIR nanofibras PCL/CH con diferentes concentraciones de EOP y compuesto puro de PCL, CH y EOP. 110
Figura 2-4. Desarrollo del empaque activo con nanofibras de PCL/CH/EOP **a**. Soluciones de electrohilado 1. PCL; 2. Solución PCL/CH8 3. Solución PCL/CH/EOP5; 4. Solución PCL14/CH8/P10, 5. Solución PCL14/CH8/P20, 6. Solución PCL14/CH8/P30. **b.** Solución y nanofibras desarrolladas de PCL/CH/ EOP 5 **c.** Empaque de polietileno recubierto con nanofibras de PCL/CH/EOP 5%; **d.** 20 mg de nanofibras disueltas en solución de AF/AA; 7. PCL/CH/EOP 5%; 8. PCL/CH/EOP 10%; 9. PCL/CH/EOP 20%; 10. PCL/CH/EOP 30% 113
Figura 2-5 Porcentaje de reducción bacteriana (*E.coli*) de los empaques activos recubiertos con nanofibras de PCL/CH y PCL/CH/EOP. 114
Figura 3-1 Desarrollo y comportamiento de los empaques activos de los filetes de lomo de cerdo a. Soluciones de electrohilado de PCL14/CH8 y PCL14/CH8/P5, b. Polietileno recubierto de nanofibras activas de PCL/CH/EOP5, c. morfología de las nanofibras de PCL/CH, d. morfología de las nanofibras de PCL/CH/EOP5, e. Tratamientos T1 empaque comercial de polietileno sin nanofibras; T2 empaque comercial recubierto con nanofibras de PCL/CH; T3 empaque de polietileno recubierto con nanofibras de PCL/CH/EOP5 con filetes de cerdo f. tratamiento T3; g. Empaque de PCL/CH/EOP5 después de su uso. 136
Figura 3-2 Filetes de lomo de cerdo empacados con los tratamientos a. T1, b. T2, c. T3, para el día 4 de almacenamiento a 4ºC 139
Figura 3-3 Efecto de los empaques activos y tiempo de almacenaje sobre la diferencia total del color (ΔE) de los filetes de carne de cerdo conservada a 4ºC. 140
Figura 3-4 Efecto de los empaques activos y tiempo de almacenamiento sobre el pH de la carne de cerdo a 4ºC. 141
Figura 3-5 Efecto de los empaques activos y tiempo de almacenamiento sobre el recuento de bacterias aeróbicas mesófilas en la carne de cerdo a 4ºC. 145
Figura 3-6 Efecto de los empaques activos y tiempo de almacenamiento sobre el recuento de bacterias aeróbicas psicrótrofas en la carne de cerdo a 4ºC. 146

Lista de tablas

Tabla 1-1 Parámetros principales que afectan el electrohilado de las soluciones poliméricas. 38

Tabla 2-1 Determinación antimicrobiana y antioxidante de extractos oleosos de propóleos de Santander, Colombia. a) CMI en mg/ml frente a los microorganismos: *S. aureus, E. coli* y *Salmonella enterica*. b) contenido de fenoles totales mg GAE/g EOP. c) actividad antioxidante ABTS µmol trolox/g EOP 100

Tabla 2-2 Viscosidad aparente de las soluciones de electrohilado a una velocidad de corte de 100 1/s 1 ……103

Tabla 2-3 Efecto de la adición de quitosano y extractos de propóleos en la conductividad y tensión superficial de las soluciones de policaprolactona1…….104

Tabla 2-4 Capacidad de carga y eficiencia de encapsulación de los extractos de propóleos en las nanofibras de PCL/CH1……...112

Tabla 3-1 Parámetros de color de los filetes de lomo de cerdo envueltos en empaques activos durante 20 días de almacenamiento a 4ºC 138

Tabla 3-2 Efecto de los empaques activos y tiempo de almacenamiento sobre la pérdida de peso (%) de la carne de lomo de cerdo conservada a 4ºC..... 143

Tabla 3-3. Efecto de los empaques activos y tiempo de almacenamiento sobre las sustancias reactivas al ácido 2- tiobarbitúrico (**TBARS**) de la carne de lomo de cerdo conservada a 4ºC 144

Lista de abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
ABTS	2,2′-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
ATR	Reflectancia total atenuada
CC	Capacidad de carga
CH	Quitosano
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CO	Monóxido de carbono
COMb	Carboximioglobina
DCM	Diclorometano
DMb	Desoximioglobina
EAC	Empaques de atmósfera controlada
EAM	Empaques de atmósfera modificada
EE	Eficiencia de encapsulación
EEP	Extracto etanólico de propóleos
EOP	Extractos oleosos de propóleos
EV	Envasado al vacío
FA	Arrastre aéreo
FC	Fuerzas de Coulombic
FE	Campo eléctrico
FG	Fuerzas gravitacionales

Abreviatura	Término
FS	Tensión superficial
FV	Fuerza viscoelástica
FTIR	Infrarrojos por transformada de Fourier
GAE	Ácido gálico
H_2S	Ácido sulfhídrico
HR	Humedad relativa
Mb	Mioglobina
MDA	Malondialdehido
MMb	Metamioglobina
NO	óxido nítrico
O2	Oxígeno
$^{\bullet}OH$	Radicales hidroxilo
OMb	Oximioglobina
PCL	Policaprolactona
PCL14	Soluciones de policaprolactona al 14%
PCL14CH8	Soluciones de policaprolactona al 14% quitosano al 8%
PCL14CH8P5	Soluciones de policaprolactona al 14% quitosano al 8% EOP5%
PCL14CH8P10	Soluciones de policaprolactona al 14% quitosano al 8% EOP10%
PCL14CH8P20	Soluciones de policaprolactona al 14% quitosano al 8% EOP20%
PCL14CH8P30	Soluciones de policaprolactona al 14% quitosano al 8% EOP30%
PCLCH	Nanofibras de policaprolactona y quitosano
PCLCHEOP5	Nanofibras de policaprolactona 14%, quitosano 8% y EOP5%
PCLCHEOP10	Nanofibras de policaprolactona 14%, quitosano 8% y EOP10%
PCLCHEOP20	Nanofibras de policaprolactona 14%, quitosano 8% y EOP20%
PCLCHEOP30	Nanofibras de policaprolactona 14%, quitosano 8% y EOP30%
PEBD	Polietileno de baja densidad
PEO	Poli (óxido de etileno)
PLA	Ácido poliláctico
PVA	Alcohol polivinílico
T1	Empaque comercial sin recubrimiento de nanofibras

Abreviatura	Término
T2	Empaque comercial con recubrimiento de nanofibras de PCL/CH
T3	Empaque comercial con recubrimiento de nanofibras de PCL/CH/EOP5
TBARS	Sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente a trolox
TFA	Trifluoroacetato
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
UFC	Unidades formadoras de colonia

Planteamiento del problema

Los empaques alimenticios han sido tradicionalmente usados para contener, aislar y comunicar el producto, siendo barreras inertes que no interaccionan con el alimento (Robertson, 2013). No obstante, la preocupación de la población en escoger alimentos más tiernos, nutritivos, saludables y seguros (Grunert y Valli, 2001) ha promovido el diseño y desarrollo de una nueva tecnología llamada envasado activo que permite el uso de una amplia variedad de materiales de embalaje que interactúan con el alimento y el ambiente alimentario para mantener la calidad e inocuidad de los alimentos por mayor tiempo y aumentar el atractivo del producto principalmente para los mercados minoristas y los consumidores.

Esta nueva tecnología ha generado gran interés sobre los alimentos cárnicos, dado que en estos, la calidad y las propiedades de seguridad son altamente dependientes de los materiales y tecnologías de embalaje aplicados, además, debido a su composición son altamente susceptibles a la oxidación y el deterioro microbiano, (Sun y Holley, 2012) siendo un desafío importante para la industria alimentaria (Alparslan y Baygar, 2017). Sin embargo, solo un número limitado de investigaciones se han realizado utilizando este tipo de tecnología en las carnes (Arvanitoyannis y Stratakos, 2012; Coma, 2008; Kerry, O'Grady, y Hogan, 2006; Quintavalla y Vicini, 2002; Realini y Marcos, 2014; Sun y Holley, 2012).

El sector porcícola ha experimentado un gran crecimiento a nivel mundial, debido al aumento en el consumo de la carne de cerdo, cabe resaltar que tan solo en Colombia en contraste con otras carnes, la carne de cerdo ha presentado el mayor crecimiento, con un 56% durante los últimos 6 años (Vega, 2018).

Sin embargo, la carne de cerdo fresca presenta importantes desafíos para su conservación ya que cuenta con una vida útil más corta que otras carnes rojas debido a factores genéticos, productivos y de composición como lo son: un estado higiénico más bajo durante la producción de la carne, agotamiento más rápido de glucógeno y glucosa y niveles más altos de ácidos grasos insaturados en relación con las carnes de rumiantes (Enser, Hallett, Hewitt, Fursey y Wood, 1996). Por estas razones, la carne de cerdo fresca es altamente susceptible al deterioro oxidativo de los lípidos y de la mioglobina que limita la distribución de los cortes frescos a largas distancias y por mayor tiempo de almacenaje (Viana, Gomide y Vanetti, 2005).

Debido a esto, varias estrategias como el empacado en atmósferas modificadas, principalmente mediante el uso de CO2 y el empacado al vacío, han permitido un avance en la conservación de la carne de cerdo fresca al controlar el crecimiento microbiano, a pesar de esto, la coloración de la carne se ha visto afectada y con ello las preferencias del consumidor. Otras alternativas han intentado utilizar empaques altos de O2 o en combinación con CO para preservar la calidad del color sin embargo promueven la oxidación y no poseen acción antimicrobiana (Viana et al., 2005).

Debido a esto, en las últimas dos décadas, las investigaciones están apuntando al uso de sustancias funcionales que puedan incorporarse en la pared del empaque dado que en comparación con otras metodologías donde las sustancias funcionales se agregan directamente sobre la superficie del producto o en la formulación, el uso empaques activos permite la liberación controlada de la sustancia manteniendo su función activa durante el tiempo afectando en menor medida las cualidades sensoriales del producto. Entre las sustancias funcionales de interés se encuentran extractos de hierbas o especias, oleorresinas, aceites esenciales y algunos polisacáridos que permiten sustituir los preservantes sintéticos en las carnes al controlar la contaminación microbiana y la oxidación de las proteínas y lípidos (Arvanitoyannis y Stratakos, 2012; Hayes, 2009; Quintavalla y Vicini, 2002). Como ejemplo, Xia, Kong, Xiong y Meng, (2007) utilizaron un recubrimiento de quitosano con extractos de especias que inhibió el crecimiento microbiano, la pérdida por goteo y mantuvo

el color de la carne de cerdo refrigerada extendiendo la vida útil del producto durante el tiempo de almacenamiento.

Dado que el uso del envasado activo promete ser una tecnología eficiente y segura para contrarrestar los efectos negativos del deterioro de la carne de cerdo fresca, este estudio pretende desarrollar y caracterizar un empaque activo que contiene una combinación de quitosano y extractos de propóleos Colombianos en forma de un recubrimiento de fibras electrohiladas; las cuales poseen efectos únicos y características mejoradas donde se destaca una alta eficiencia de encapsulación y la liberación controlada de las sustancias a través de una gran área de superficie (Anu Bhushani y Anandharamakrishnan, 2014; Augustin y Hemar, 2009); con el fin de generar una nueva alternativa de embalaje que permita controlar la oxidación y el crecimiento microbiano para con ello conservar las características deseadas en la carne de cerdo fresca.

Justificación

Esta investigación pretende contribuir con la ciencia y tecnología de alimentos mediante el desarrollo y caracterización de un envase activo que utiliza como bioactivos naturales quitosano y extractos de propóleos Colombianos para mantener la calidad fisicoquímica y microbiológica de la carne de cerdo durante el tiempo de almacenamiento en refrigeración debido que:

- La producción porcícola colombiana esta en continuo crecimiento, como consecuencia a las tendencias mundiales de la población de adquirir alimentos naturales y saludables que contengan un buen perfil nutricional; por lo tanto, para cumplir con esta demanda es de suma importancia entregar productos de alta calidad que satisfagan las exigencias de los consumidores. Debido a la susceptibilidad de la carne de cerdo fresca al deterioro químico y microbiológico, la investigación y el desarrollo de estrategias de conservación como el envasado activo son una gran opción para mantener la calidad fisicoquímica, microbiológica y nutricional de este tipo de alimentos durante el almacenamiento.

- Los propóleos tienen un amplio espectro de actividades biológicas altamente investigadas. Para los propóleos nacionales las pocas investigaciones desarrolladas han demostrado que las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de los mismos generan un efecto positivo sobre la conservación de los alimentos, sin embargo, su aplicación mediante el uso de nanofibras electrohiladas en la carne de cerdo y otras matrices alimentarias aún no se ha reportado.

- Los envases activos a base de fibras electrohiladas son una estrategia innovadora que recientemente ha generado gran interés ya que presentan características mejoradas en comparación con los envases activos tradicionales; no obstante, existen muy pocas investigaciones realizadas sobre este tipo de empaques en productos reales; en carne de cerdo no se han realizado estudios utilizando fibras electrohiladas que incluyan quitosano y propóleos colombianos.

Aprovechando las características antioxidantes y antibacterianas de los bioactivos utilizados más la necesidad de realizar investigaciones en el desarrollo, caracterización y efectividad in vivo de los envases activos a base de fibras electrohiladas; se desea con este estudio generar conocimiento práctico que aporte conocimiento innovador en la conservación de alimentos con el fin de mejorar la inocuidad y la calidad de la carne de cerdo fresca.

Objetivos

A. Objetivo General

Investigar la efectividad de dos empaques alimenticios que utilizan recubrimientos activos a base de nanofibras electrohiladas de policaprolactona, quitosano y/o extractos oleosos de propóleos colombianos para preservar la vida útil de filetes de lomo de cerdo.

B. Objetivos Específicos

1. Determinar el efecto antimicrobiano y antioxidante de los extractos oleosos de propóleos in vitro.
2. Caracterizar las soluciones de policaprolactona con quitosano y/o extractos oleosos de propóleos para ser electrohiladas.
3. Determinar las características morfológicas, químicas, encapsulantes y la actividad antimicrobiana de las fibras electrohiladas.
4. Evaluar la acción antioxidante y antimicrobiano de dos empaques de Polietileno de baja densidad que utilizan recubrimientos activos a base de nanofibras electrohiladas de policaprolactona, quitosano y/o extractos oleosos de propóleos colombianos sobre filetes de lomo de cerdo refrigerados durante un periodo de almacenamiento de 20 días.
5. Estudiar el efecto de dos empaques de Polietileno de baja densidad que utilizan recubrimientos activos a base de nanofibras electrohiladas de policaprolactona, quitosano y/o extractos oleosos de propóleos colombianos sobre la calidad fisicoquímica y microbiológica de los filetes de carne de lomo de cerdo.

Introducción

Dada la creciente globalización del comercio de alimentos y las preferencias del consumidor hacia productos más naturales y saludables, una nueva tecnología de envasado se ha desarrollado para desempeñar un papel activo en la preservación de los alimentos, a través de la absorción o la liberación de compuestos, conocida como envasado activo (Siripatrawan y Vitchayakitti, 2016).

El envasado activo interactúa con el ambiente interno para mejorar la conservación de los alimentos o las propiedades sensoriales, al tiempo que mantiene la calidad y la seguridad de los alimentos envasados. La atmósfera interna puede ser controlada por sustancias, que absorben o liberan compuestos, las cuales son incorporadas principalmente en matrices poliméricas debido a su capacidad inherente para permitir el paso principalmente de compuestos de bajo peso molecular ($\leq$ 800Da) . Algunos ejemplos de sistemas de envasado activo son los eliminadores de O2, emisores de CO2, reguladores de humedad y sistemas de liberación de sustancias bioactivas como antimicrobianos y antioxidantes (Félix, Jiménez, Romero, y Guerrero, 2016; Lucera, Conte, y Del Nobile, 2016; Rawdkuen, Punbusayakul, y Lee, 2016).

En los sistemas de liberación de bioactivos es importante la protección de estos compuestos para garantizar su funcionalidad, sin embargo, los métodos convencionales de manipulación de los polímeros implican generación de calor (Martínez-Abad, Ocio, y Lagaron, 2014) lo que aumenta el riesgo de degradación de los compuestos activos termosensibles. Para superar este problema, la técnica del electrohilado ha generado una alternativa interesante dentro de la industria (Drosou, Krokida, y Biliaderis, 2017) ya que se caracteriza por utilizar

la fuerza electrostática para transformar polímeros sintéticos y naturales en fibras ultrafinas, siendo una técnica simple, versátil y rentable, escalable para la producción industrial (Reneker y Yarin, 2008) que a diferencia de los procesos típicos de hilado por fusión funciona en condiciones ambientales deseables para la encapsulación de agentes térmicamente lábiles (Anu Bhushani y Anandharamakrishnan, 2014; Vega y Lim, 2009). Mediante esta técnica se pueden fabricar esteras 3D de fibras ultrafinas funcionales a través de la inmovilización o encapsulación de sustancias bioactivas como enzimas, vitaminas y antimicrobianos dentro de la matriz electrohilada (Senthil Muthu Kumar et al., 2019; Torres-Giner, 2011). Por otro lado, las fibras electrohiladas poseen un diámetro nanométrico o micrométrico que ofrece muchas ventajas sobre las fibras tradicionales, incluida una alta relación de área superficial/volumen, porosidad sintonizable y facilidad de manipulación de su composición y estructura química. Estas esteras actúan como una barrera pasiva en el envasado de alimentos y también puede exhibir una mayor actividad bioactiva, asimismo, la arquitectura de la estera y el diámetro de las fibras se pueden ajustar fácilmente variando los parámetros del proceso y del material, como el polímero, la viscosidad, la conductividad de la solución, el voltaje, la velocidad de flujo, la distancia del colector de boquilla y el método de recolección (Bhardwaj y Kundu, 2010). Investigaciones han demostrado el gran potencial que tienen las fibras electrohiladas en la conservación de alimentos por ejemplo, se han desarrollado esteras compuestas de fibras electrohiladas cargadas con diferentes sustancias activas como aceite esencial de canela y complejos de lisozima-quitosano que han permitido prolongar la vida útil de productos cárnicos (W. Huang et al., 2012; Wen et al., 2016), otros investigadores como Ceylan, Sengor, Sağdıç y Yilmaz, (2017a) han demostrado que recubrimientos a base de nanofibras de quitosano sobre filetes de pescado pueden retrasar efectivamente el crecimiento de microorganismos. Sin embargo, los estudios siguen siendo muy pocos.

El quitosano es un polisacárido catiónico con múltiples propiedades funcionales y bioactivas, tales como actividades antioxidantes, hipolipemiantes y antimicrobianas, además posee propiedades formadoras de película y gelificantes, que lo han convertido en un biopolímero de gran interés en la industria de alimentos (Gutiérrez, 2017). Por otro lado, los

propóleos son una sustancia resinosa ampliamente reconocida como un producto natural con diversas propiedades bioactivas que le han permitido su aplicación en alimentos como suplemento dietético y preservante alimenticio que permite proteger a los alimentos del deterioro oxidativo y microbiológico (Pobiega, Kraśniewska, y Gniewosz, 2019a). Por lo tanto, la combinación de propóleos y quitosano puede impartir capacidad antimicrobiana y antioxidante a los materiales de embalaje mejorando al mismo tiempo, algunas características fundamentales de los materiales de envasado como lo son las propiedades de barrera a gases, resistencia y elasticidad (Mascheroni et al., 2014; Rollini et al., 2017; Siripatrawan y Harte, 2010).

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, este trabajo investigativo pretende mediante el uso de nanofibras electrohiladas de policaprolactona, quitosano y/o extractos oleosos de propóleos colombianos desarrollar empaques activos que permitan extender o preservar la vida útil de filetes de lomo de cerdo. Para lograr estos objetivos, en el capítulo 1 se resume la información de interés de la investigación a través de una revisión literaria, en el capítulo 2 se evalua las soluciones de electrohilado a base de policaprolactona (**PCL**) que incorporan quitosano (**CH**) y/o extractos oleosos de propóleos colombianos (**EOP**) para desarrollar nuevas esteras de nanofibras electrohiladas que exhiban propiedades bioactivas relacionadas con la conservación de alimentos, como actividad antioxidante y antimicrobiana. En el tercer capítulo se evaluó la efectividad de estas esteras sobre filetes de lomo de cerdo refrigerados durante un periodo de almacenamiento de 20 días.

En base al conocimiento adquirido, este es el primer estudio que logra, mediante la técnica de electrohilado de superficie libre, fabricar nanofibras de PCL/CH y PCL/CH/EOP para desarrollar envases activos los cuales fueron evaluados sobre lomos de cerdo permitiendo extender la calidad de la carne.

1. Vida útil de la carne de cerdo y los nuevos avances en el envasado activo de productos cárnicos a base de nanofibras desarrolladas mediante la técnica de electrohilado.

1.1. Resumen

El electrohilado es una técnica simple, flexible y rentable que está generando un amplio interés entre los investigadores para la producción de nanofibras a partir de polímeros. Las nanofibras permiten la incorporación de sustancias bioactivas que se pueden liberar de manera controlada para mejorar la conservación de los alimentos. Además, gracias a su estructura nanométrica, morfología variable, estructura porosa y alta área de superficie son una alternativa que promete generar materiales de envasado con características y funcionalidades mejoradas. Sin embargo, la aplicación de nanofibras electrohiladas en el área del envasado de alimentos es un campo todavía inexplorado. Esta revisión integral se centra en los principios básicos del electrohilado, la liberación controlada de sustancias bioactivas, la aplicación de nanofibras electrohiladas en el envasado activo de los alimentos y los desarrollos y desafíos en el campo del envasado activo a base de nanofibras principalmente para productos cárnicos. Además, se describen los procesos principales del deterioro de la carne y los empaques utilizados para la carne de cerdo.

Palabras claves: electrohilado, conservación, nanofibras, bioactivos, envasado activo, carne de cerdo

1.2. Abstract

Electrospinning is a simple, flexible and cost-effective technique, which is generating wide interest among researchers for the production of nanofibers from biopolymers. Nanofibers allow the incorporation of bioactive substances that can be released in a controlled way to improve food preservation, also due to their nanometric structure, variable morphology, porous structure, and the high surface area; they are an alternative that promises to generate packaging materials with enhanced features and functionalities. However, the application of electrospun nanofibers in the area of food packaging is an unexplored field. This comprehensive review focuses on the basic principles of the electrospinning, the controlled release of bioactive substances and the application of electrospun nanofibers for active food packaging and the developments and challenges in the active packaging using nanofibers mainly for meat products. In addition, the main processes of the deterioration of meat and the packaging used for pork are described.

Key words: electrospinning, conservation, nanofibers, bioactive, active packaging, pork meat

1.3. Introducción

La carne de cerdo ha sido un alimento primordial en la dieta del ser humano. Sin embargo, la vida útil de la carne de cerdo es altamente sensible a procesos de degradación causados principalmente por procesos oxidativos y microbiológicos que se manifiestan principalmente con cambios de coloración, aparición de flavors y olores indeseados (Gram et al., 2002). No obstante, la calidad y las propiedades de seguridad de los productos carnícos son altamente dependientes de los materiales y tecnologías de embalaje aplicados, por lo tanto la investigación y el desarrollo de nuevas tecnologías de empaques son de suma importancia para mantener la calidad de estos alimentos.

Uno de los desarrollos recientes es el envasado activo de los alimentos el cual consiste en la incorporación de agentes activos dentro del material de envasado para aumentar la seguridad y la calidad de los alimentos. Dentro de esta tecnología los biopolímeros son los materiales de preferencia debido a sus propiedades funcionales y su capacidad para transportar y liberar de forma controlada los agentes activos (Félix et al., 2016), sin embargo los métodos convencionales de formación de películas poliméricas implican generación de calor (Martínez-Abad et al., 2014), lo que conlleva a la degradación de compuestos activos termosensibles ampliamente usados para alimentos tales como los aceites esenciales. Para superar este problema, la técnica del electrohilado ha generado una alternativa interesante dentro de la industria (Drosou et al., 2017) gracias a su capacidad de desarrollar fibras electrohiladas ultrafinas que pueden inmovilizar o encapsular sustancias bioactivas como enzimas, vitaminas y antimicrobianos sin necesidad de un proceso térmico, además, gracias a su estructura nanométrica pueden ser usadas como relleno de refuerzo para materiales de embalaje ecológico o para mejorar las propiedades fisicoquímicas, ópticas, mecánicas y catalíticas de los materiales de envasado convencionales moldeando su comportamiento y funcionalidad (Cockburn et al., 2012; Torres-Giner, 2011).

Los avances investigativos en el estudio de la técnica y de las soluciones de electrohilado, han permitido el desarrollo de nanofibras electrohiladas de una amplia gama de proteínas y carbohidratos con integridad estructural y biocompatibilidad completa (Noruzi, 2016) que pueden unir y atrapar una gama de ingredientes alimenticios bioactivos hidrófilos e hidrófobos mediante la interacción con sus grupos funcionales (Ghorani y Tucker, 2015) para proteger a los alimentos de la oxidación, la humedad, la luz y el deterioro microbiológico.

Sin embargo, el uso de las fibras electrohiladas en la industria alimentaria es relativamente muy bajo dada la complejidad de electrohilar biopolímeros como carbohidratos y proteínas que poseen estructuras químicas más complejas y una amplia gama de pesos moleculares (Rezaei, Nasirpour, y Fathi, 2015; Zhao et al., 2011). Adicionalmente, el uso comercial de los biopolímeros como materiales de envasado de alimentos se limita a sus bajas propiedades

mecánicas y de barrera en comparación con los materiales convencionales de envasado (Senthil Muthu Kumar et al., 2019).

Por lo tanto, es importante extender el conocimiento de esta técnica en aras de encontrar nuevas vías que permitan estandarizar y mejorar los procesos de electrohilado de los polímeros y su aplicación en el envasado activo para los alimentos cárnicos. Por tanto, el objetivo de esta revisión es describir los principios básicos del electrohilado, la liberación controlada de bioactivos, la aplicación de las fibras electrohiladas en los sistemas de envasado para productos cárnicos, además de detallar los principales procesos involucrados en el deterioro de la carne de cerdo y los sistemas de envasado desarrollados.

1.4. Principios básicos del electrohilado o "*electrospinning*"

1.4.1. Técnica del electrohilado

La técnica del electrohilado consiste en utilizar un campo eléctrico de alto voltaje para generar una serie de fibras ultrafinas, típicamente del orden de cientos de nanómetros, por medio del uso de polímeros sintéticos o naturales (Reneker y Yarin, 2008).

El proceso del electrohilado consiste en aplicar un potencial eléctrico sobre una hilera o superficie que recibe pequeñas gotas de una solución polimérica. Cuando las gotas entran en contacto son cargadas en su superficie desarrollando una forma cónica, comúnmente conocida como cono de Taylor (Taylor y Van Dyke, 1969), subsecuentemente, cuando la acumulación de repulsión de carga electrostática supera la tensión superficial de la solución, finos chorros son expulsados desde el vértice del cono de Taylor hacia el plato colector. Fenómenos como el cizallamiento de la solución (flujo extensional), el movimiento del chorro en dirección al campo eléctrico y la evaporación del solvente son generados a medida que el chorro permanece en el aire para generar las nanofibras que se solidifican y se recolectan en un sustrato o colector (Lim, 2015).

Equipos convencionales de electrohilado (**Fig.1-1**) utilizan una jeringa con solución polimérica que mediante una bomba de infusión permite que pequeñas gotas sean cargadas en la hilera (aguja), conectada a una fuente de alto voltaje (electrodo positivo o negativo) mientras que las nanofibras son recolectadas en un colector conectado a tierra. Este tipo de configuración tiene como desventaja un bajo rendimiento de producción (generalmente de 1 a 2 ml/ h), lo que dificulta su aplicación. Por este motivo, se han desarrollado equipos que incorporan múltiples hileras o una superficie libre que permite aumentar el rendimiento de producción de las nanofibras (Cengiz, Krucińska, Gliścińska, Chrzanowski, y Göktepe, 2009; Zhou, Gong, y Porat, 2009).

La técnica de electrohilado da como resultado una membrana no tejida de fibras continuas ubicadas una sobre otras con áreas superficiales extremadamente grandes, dotándolas de una mayor actividad de superficie, mayor capacidad para la unión superficial de grupos funcionales, alta porosidad y sensibilidad a los cambios ambientales que le confieren una buena respuesta de liberación de compuestos bioactivos previamente incorporados (Dai y Lim, 2015; Vega y Lim, 2012).

Esta tecnología ha generado amplio interés investigativo e industrial debido a su amplia aplicación en diferentes áreas como la filtración, los textiles, la ingeniería de tejidos, administración de fármacos, liberación controlada, encapsulación, empaques alimenticios, entre otros. (L. Huang, Manickam, y McCutcheon, 2013; Immich, Arias, Carreras, Boemo, y Tornero, 2013; Joshi y Adak, 2019; Li, Yin, Yu, y Ding, 2019; Torres-Giner, 2011; T. Wu et al., 2019).

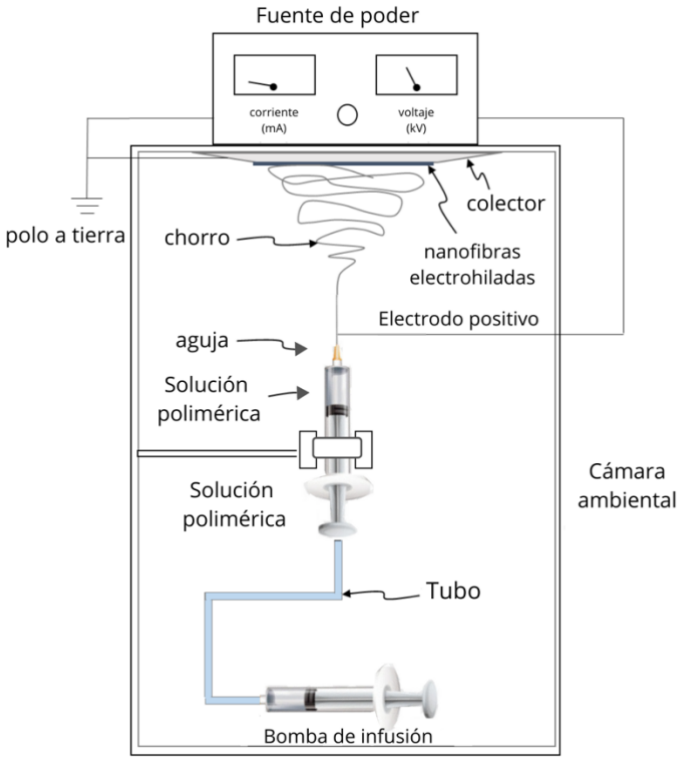


Figura 1-1 Diagrama esquemático de un equipo de electrohilado convencional[1]
[1] adaptado de (Lim, Mendes, y Chronakis, 2019)

1.4.2. Electrohilado de superficie libre

Consiste en una técnica de electrohilado modificada que permite la producción en masa de nanofibras usando una superficie libre como un tambor giratorio, disco, un eje de alambre, o burbujas gaseosas (Brettmann et al., 2012). Unidades comerciales llamadas "Nanospider" están actualmente disponibles a través de Elmarco (Liberec, República Checa), estas consisten en un electrodo de alambre estirado, desde el cual se expulsa el polímero generando multiples fibras de manera simultánea (**Fig. 1-2**). El electrodo de alambre está conectado a una fuente de alimentación de alto voltaje (hasta 80 kV) y el electrodo colector está conectado a tierra. La solución a electrohilar se carga en un carro que se desplaza hacia adelante y hacia atrás a lo largo del electrodo de alambre, el cual va depositando capas delgadas de solución sobre la superficie del electrodo de alambre, por el cual se expulsan múltiples chorros hacia el sustrato que se configura para moverse a cierta velocidad y

permitir la recolección continua de fibras. Adicionalmente, se mantiene un flujo de aire continuo dentro de la cámara para facilitar la evaporación de los solventes, así como el movimiento de las fibras hacia el sustrato. Las ventajas del electrohilado de alambre de superficie libre es su diseño simple, su fácil operatividad, la alta tasa de producción, así como la alta uniformidad de la fibra y la densidad del empaque (Brettmann et al., 2012).

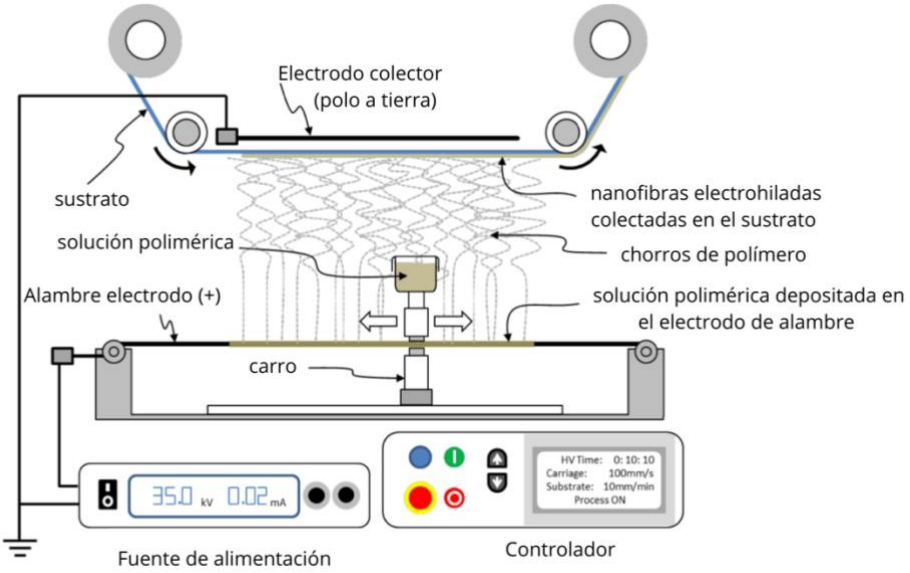


Figura 1-2 Diagrama esquemático de un equipo de electrohilado de superficie libre de alambre.[1]

[1] adaptado de (Lim et al., 2019)

1.4.3. Factores físicos que rigen el electrohilado

La formación de los chorros de polímero durante el electrohilado son afectados principalmente por las fuerzas de Coulombic (FC), campo eléctrico (FE), fuerza viscoelástica (FV) y tensión superficial (FS), mientras que el arrastre aéreo (FA) y las fuerzas gravitacionales (FG) son menos prominentes debido a la naturaleza ultrafina de las fibras (Feng, 2003; Lim, Mendes, y Chronakis, 2019).

Las magnitudes relativas de estas fuerzas dictan la morfología de las nanofibras originadas del proceso electrohidrodinámico, siendo las fuerzas de campo eléctrico y de Coulombic las promotoras del chorro mientras que las fuerzas de tensión viscoelástica y superficial tienden a contrarrestar su formación (Reneker, Yarin, Fong, y Koombhongse, 2000). Ejemplos claros se pueden evidenciar en soluciones poliméricas con baja viscosidad y alta tensión superficial que tienden a romperse en gotas de líquido debido a la inestabilidad de Rayleigh, formando partículas pulverizadas o fibras incrustadas con perlas a lo largo de su longitud (perlas en las fibras). Caso contrario sucede con soluciones de mayor viscosidad y baja tensión superficial que tienden a estabilizar el chorro de polímero a través de los enredos de la cadena inhibiendo la formación de las perlas.

Los efectos de estas fuerzas en la trayectoria del chorro de electrohilado pueden conceptualizarse en la Fig. 3.

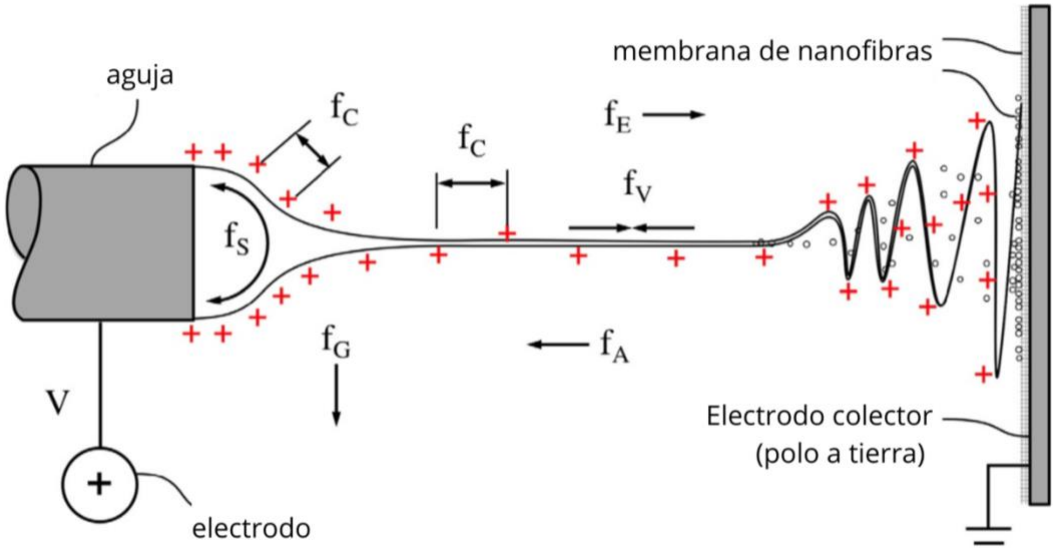


Figura 1-3 Diagrama esquemático que representa la relación entre las fuerzas de Coulombic (FC), campo eléctrico (FE), fuerza viscoelástica (FV), Tension superficial (FS), arrastre de aire (FA) y fuerzas gravitacionales (FG). Las flechas representan las direcciones en la que las fuerzas actuan sobre el chorro de la solución de electrohilado[1]

[1] adaptado de (Lim et al., 2019)

1.4.4. Parámetros que afectan el electrohilado

Para realizar el proceso de electohilado se necesita preparar una solución homogénea compuesta de un polímero, el compuesto bioactivo y un disolvente compatible. Los parámetros que afectan el proceso de electrohilado se clasifican en parámetros del proceso de electrohilado, parámetros intrínsecos de la solución y parámetros ambientales (**Tabla 1-1**).

Tabla 1-1 Parámetros principales que afectan el electrohilado de las soluciones poliméricas.

Parámetros de la solución	Parámetros del proceso	Parámetros ambientales
Viscosidad	Voltaje aplicado	Tasa de flujo de aire
Conductividad	Distancia entre los	Temperatura
Tensión superficial	electrodos	Humedad relativa (HR)
Solubilidad del polímero	Velocidad del carro	
Constante dieléctrica del solvente	Velocidad del sustrato	

1.4.4.1. Parámetros de la solución

La conductividad eléctrica, la viscosidad y la tensión superficial son las propiedades determinantes que dictan la capacidad del electrohilado de la solución (Rutledge y Fridrikh, 2007).

Para producir fibras continuas, las soluciones deben tener propiedades viscoelásticas óptimas que están influenciadas por el peso molecular, la morfología del polímero, la interacción polímero-solvente y su concentración. El aumento del peso molecular y la concentración del polímero promueve el enredo de la cadena polimérica que incrementa la viscosidad, estabiliza el chorro de polímero durante el electrohilado y evita la ruptura del chorro en gotas dando lugar a fibras uniformes (Deitzel, Kleinmeyer, Harris, y Beck

Tan, 2001) sin embargo una viscosidad demasiado alta genera una alta tensión en el sistema evitando que las soluciones de polímero se inyecten (Alborzi, Lim, y Kakuda, 2014).

Las afinidades polímero-polímero y polímero-disolvente también pueden afectar el grado de enredo de la cadena del polímero y como resultado, la morfología de las fibras. Además, la eficiencia de encapsulación (EE) de los bioactivos se ve afectada por las compatibilidades polímero-biactivo y disolvente-bioactivo, que pueden evaluarse mediante el cálculo de parámetros de solubilidad de Hildebrand y Scott, 1950. Por otro lado, una menor afinidad entre el polímero y el solvente puede disminuir la viscosidad, haciendo que la tensión superficial del solvente sea un factor dominante durante el electrohilado favoreciendo la formación de fibras con perlas (Moomand y Lim, 2015).

La conductividad eléctrica mide la capacidad de las cargas para migrar a la superficie de la gota de electrohilado y está determinada por el tipo de polímero, el disolvente utilizado y la disponibilidad de sales ionizables. La conductividad permite que la fuerza debida al campo eléctrico se transmita eficientemente al chorro y produzca fibras más delgadas (Carroll y Joo, 2006), sin embargo soluciones con alta conductividad eléctrica provocan una baja densidad de carga superficial por consecuente poca tracción para generar el chorro (Wang, Marcone, Barbut, y Lim, 2013). La mayoría de los polímeros naturales, como el quitosano y el alginato de sodio, son polielectrolíticos. La fuerza repulsiva entre los grupos iónicos dentro del esqueleto del polímero puede dificultar el enredamiento de las cadenas y la alta conductividad eléctrica puede reducir la fuerza de tracción en los chorros, lo que resulta en una pobre formación de la fibra (Lu, Zhu, Guo, Hu, y Yu, 2006)

Por otro parte, la tensión superficial de la solución debe ser vencida por la fuerza electrostática establecida en la superficie para iniciar el fenómeno de inyección y evitar la formación de perlas. La tensión superficial es el factor dominante cuando la solución presenta baja viscosidad y daría como resultado la ruptura de los chorros de polímero en gotas para formar fibras con perlas. Sin embargo, a medida que aumenta la viscosidad,

la tensión superficial puede ser menos importante en comparación con otros parámetros. La baja tensión superficial suele ser deseable en el electrohilado, lo que puede reducir la intensidad del campo eléctrico requerido para iniciar la formación de chorros de polímero (Vega y Lim, 2012).

1.4.4.2. Parámetros del proceso de electrohilado de alambre de superficie libre

El voltaje aplicado es un parámetro crítico en el proceso de electrohilado. Se requiere un voltaje de umbral para inducir una repulsión de carga suficiente en la superficie de la gota para iniciar la inyección desde el vértice del cono de Taylor; el aumento del voltaje puede generar fibras de menor diámetro debido al estiramiento de la solución de polímero en relación con la repulsión de carga dentro del chorro (fuerzas de Coulombic) (Zdraveva, Fang, Mijovic, y Lin, 2016), en cambio autores como Nazir et al., (2015) reportaron que un aumento en el voltaje disminuyó el tiempo de vuelo es decir, el tiempo de estiramiento de los chorros y produjo fibras más gruesas. Aunque el voltaje es necesario para la creación de fibras la aplicación de un voltaje más allá del valor crítico da como resultado el adelgazamiento excesivo del cono de Taylor y un aumento en la velocidad del chorro generando fibras con perlas (Zdraveva et al., 2016).

La velocidad del carro juega un papel importante en la morfología de la fibra. Una alta velocidad del carro permite el suministro frecuente de la solución sobre el alambre generando que más polímero sea afectado por las fuerzas electrostáticas formando fibras más gruesas con una mayor variación de diámetro. Por otro lado, la baja velocidad del carro puede inhibir el proceso de electrohilado debido al suministro insuficiente de la solución (Nazir et al., 2015)

La velocidad de movimiento del sustrato también afecta la morfología de la fibra en el electrohilado de alambre de superficie libre. La propiedad no conductiva del sustrato puede ralentizar la deposición de fibras, a medida que las fibras cargadas se acumulan en el sustrato repelen las fibras entrantes y aumentan su tiempo de vuelo (estiramiento)

formando fibras más delgadas, por el contrario, cuando la velocidad del sustrato aumenta genera fibras con diámetros aumentados (Nazir et al., 2015).

La distancia entre los electrodos afecta el tiempo de vuelo de los chorros, así como la intensidad del campo eléctrico. La disminución de la distancia disminuye el tiempo de vuelo del chorro aumentando el diámetro de la fibra. Por otro lado, la intensidad del campo eléctrico está relacionada negativamente con la distancia entre los electrodos (Reneker et al., 2000), una disminución en la distancia aumenta la intensidad del campo e induce más fuerza de estiramiento sobre los chorros para formar fibras más delgadas, sin embargo una distancia demasiado corta puede generar fusión de las fibras debido a la presencia de disolvente residual cuando los chorros de polímero aterrizan en el sustrato debido a la evaporación insuficiente del disolvente y la solidificación del polímero (Bhardwaj y Kundu, 2010).

1.4.4.3. Parámetros ambientales

La velocidad del flujo de aire, la temperatura y las condiciones de humedad relativa dentro de la cámara del electrohilado también afectan el proceso de electrohilado. El aumento en la velocidad del flujo de aire acelera la evaporación del solvente y la solidificación del polímero, aumentando la viscosidad de los chorros y por ende produciendo fibras más gruesas (Nazir et al., 2015). En cambio el aumento de la temperatura mejora el rendimiento de producción y disminuye el diámetro de la fibra, atribuido a la expansión entre las cadenas del polímero que disminuye la viscosidad de la solución (Bhardwaj y Kundu, 2010). Por otro lado el aumento de la humedad conduce a la formación de pequeños poros circulares en la superficie de las fibras (Casper, Stephens, Tassi, Chase, y Rabolt, 2004), sin embargo, humedades cercanas a la saturación dificultan el secado del solvente causando la fusión de las fibras, caso contrario sucede con el uso de humedades muy bajas que aceleran la velocidad de evaporación del solvente lo que puede causar la obstrucción del sistema.

1.5. Electrohilado de polímeros y sustancias bioactivas para la industria de empaques alimenticios

Tanto los polímeros naturales, sintéticos y mezclas de ellos se utilizan para la fabricación de nanofibras mediante el proceso de electrohilado, sin embargo la aplicación de nanofibras electrohiladas en el sector alimentario es relativamente baja debido al uso mayoritario de disolventes y polímeros de baja biocompatibilidad y sin grado alimenticio (Hu et al., 2014; Senthil Muthu Kumar et al., 2019). Por lo tanto, los materiales de preferencia para el envasado activo de materiales alimenticios mediante el uso de electrohilado son los polímeros naturales debido a su abundancia, bajo costo, diversidad química, actividades biológicas (García, Mendes, Jacobsen, y Chronakis, 2018; Mendes, Stephansen, y Chronakis, 2017a) y propiedades funcionales como la capacidad para transportar agentes activos y liberarlos controladamente (Félix et al., 2016).

Los biopolímeros más utilizados son los polisacáridos, conformados por unidades monoméricas repetitivas de monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos, y las proteínas, polipéptidos con secuencias de aminoácidos únicas; sin embargo su capacidad de electrohilado depende de sus propiedades químicas y de los ajustes que se deban realizar sobre las propiedades de las soluciones, para ello es necesario el uso de un disolvente compatible y en algunos casos polímeros coadyuvantes que permitan superar las dificultades del procesamiento y mejorar la morfología de las fibras resultantes (García et al., 2018; Lim et al., 2019). Los biopolímeros naturales tradicionalmente utilizados para el electrohilado incluyen la celulosa, la quitina, el quitosano, el colágeno, la gelatina, la seda y el almidón (Homayoni, Ravandi, y Valizadeh, 2009; Schiffman y Schauer, 2008; Senthil Muthu Kumar et al., 2019), mientras que los biopolímeros sintéticos más comunes son el ácido poliláctico (**PLA**), el poliglicolato, el polietilenglicol, el alcohol polivinílico (**PVA**), el poli (óxido de etileno) (**PEO**) y la policaprolactona (**PCL**) (Greiner y Wendorff, 2007; Mascheroni, Guillard, Nalin, Mora, y Piergiovanni, 2010; Senthil Muthu Kumar et al., 2019; Woodruff y Hutmacher, 2010).

Debido a sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas los compuestos de origen botánico como los flavonoides, los ácidos hidroxicinámicos, las antocianidinas, carotenoides y aceites esenciales se han estudiado como agentes activos para el desarrollo de envasados activos (Sanches-Silva et al., 2014). Sin embargo, la incorporación de estos bioactivos en los productos alimenticios conllevan un gran desafío dado a problemas de evaporación del activo durante la formación del empaque, alta sensibilidad de las moléculas a la oxidación, fotodegradación y reacción con los componentes de los alimentos; además estas pueden generar dificultades sensoriales como olor, color, o sabor indeseable en los alimentos (Senthil Muthu Kumar et al., 2019). Para superar estos problemas, los investigadores han explotado las técnicas de procesamiento electrohidrodinámico que permiten la encapsulación de estos compuestos bioactivos en la fibra electrohilada (Drosou et al., 2017).

A continuación, se describe brevemente los polímeros que fueron electrohilados en el transcurso de la presente investigación y los propóleos como agente bioactivo que fue encapsulado en las fibras electrohiladas para desarrollar los empaques activos.

1.5.1. Policaprolactona

La policaprolactona (PCL) es un poliéster sintético biodegradable producido a partir del petróleo crudo (**Fig. 1-4**).

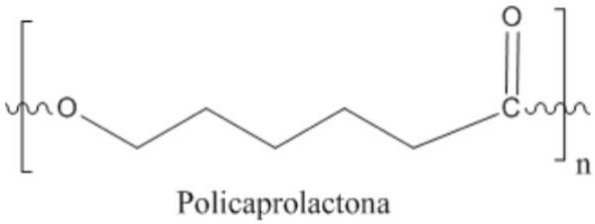


Figura 1-4 Estructura química de la policaprolactona[1]

[1] Adaptado de (Amaya, 2019)

La PCL es un polímero hidrofóbico, con buena resistencia al agua, aceite, solventes y cloro, es semicristalino; con una temperatura de transición vítrea de -60 ° C y un punto de fusión que oscila entre 59 y 64°C. Puede clasificarse de acuerdo a su peso molecular que oscila entre de 3000 a 90,000 g / mol y su cristalinidad tiende a disminuir con el aumento del peso molecular. La buena solubilidad de PCL, su bajo punto de fusión y su excepcional compatibilidad en mezclas han estimulado una extensa investigación de su potencial aplicación en el campo biomédico, empaques alimenticios, sistemas controlado de liberación de medicamentos, entre otros (Mohamed y Yusoh, 2015; Temtem, Casimiro, Mano, y Aguiar-Ricardo, 2008; Woodruff y Hutmacher, 2010).

La PCL se obtiene mediante la polimerización por apertura del anillo de un monómero (ε-caprolactona) usando una variedad de catalizadores aniónicos, catiónicos y de coordinación o por polimerización de apertura del anillo vía radicales libres de 2-metilen-1-3-dioxepano (Mohamed y Yusoh, 2015).

La degradación de PCL se puede hacer por la acción de microorganismos aeróbicos y anaeróbicos de varios ecosistemas, dando lugar a la formación de agua, dióxido de carbono, metano y sales minerales en solo unos pocos años (Mallakpour y Nouruzi, 2016; Murray, Thompson, Sayyar, y Wallace, 2015).

La PCL tiene la capacidad de formar mezclas compatibles con otros polímeros, medicamentos y sustancias externas permitiendo agregar grupos funcionales que pueden modificar algunas de sus propiedades como el incremento de la hidrofilicidad, adhesividad y biocompatibilidad, además, posee propiedades reológicas y viscoelásticas superiores a otros polímeros que le permiten una fácil manipulación y desarrollo de poros apropiados para la liberación controlada de sustancias dentro de su matriz (Luciani, Coccoli, Orsi, Ambrosio, y Netti, 2008; Zein, Hutmacher, Tan, y Teoh, 2002). Estos atributos han hecho que las nanofibras a base de PCL sean ampliamente usadas en la liberación controlada de fármacos (Woodruff y Hutmacher, 2010), apósitos para heridas, dispositivos de filtración, ingenería de tejidos y en otras áreas biomédicas (Cipitria, Skelton, Dargaville, Dalton, y

Hutmacher, 2011; Janmohammadi y Nourbakhsh, 2019). Aunque el uso de la PCL en alimentos ha sido poco explorada, la encapsulación de sustancias funcionales como el ácido carnósico y los polifenoles del té verde en nanofibras de PCL (Shao et al., 2011; J. Xiao et al., 2016) además de estudios como los realizados por Madhaiyan, Sridhar, Sundarrajan, Venugopal, y Ramakrishna, (2013) quienes encapsularon vitamina B12 en nanofibras de PCL para ser suministrada vía trasdérmica como suplemento energético y Cerkez, Sezer, y Bhullar, (2017) quienes realizaron nanofibras antimicrobianas a base de PCL demuestran el uso prometedor de la PCL en el área de alimentos.

1.5.2. Quitosano

El quitosano (**CH**) es un polisacárido alcalino catiónico derivado de la desacetilación de la quitina y conformado de unidades de glucosamina y N-acetil glucosamina (**Fig. 1-5**).

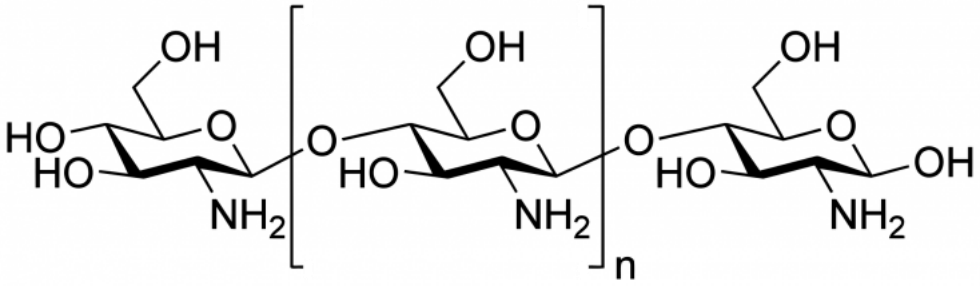


Figura 1-5 Estructura química del quitosano[1]

[1] (Li et al., 2018)

Este polímero ha recibido especial atención en la industria biomédica gracias a su amplia variedad de propiedades biológicas como alta biocompatibilidad, actividad antitumoral, actividad hemostática, entre otras (Kalantari, Afifi, Jahangirian, y Webster, 2019) y en la industria de alimentos además por su buena capacidad de formación de película, biodegradabilidad, actividad antibacteriana, antimicótica y antioxidante (Gutiérrez, 2017; Mohammad El-Aidie, 2018; Shahidi, Arachchi, y Jeon, 1999).

Sin embargo dada la naturaleza policatiónica de este polímero, las soluciones de quitosano son altamente viscosas y con una alta tensión superficial lo que complica su proceso de electrohilado (Homayoni et al., 2009). Más de 340 intentos de fabricación de nanofibras de quitosano electrohiladas han sido reportados, modificando condiciones del proceso o las propiedades fisicoquímicas del quitosano (Mendes, Stephansen, y Chronakis, 2017b), donde solo pocos reportes han electrohilado soluciones puras de quitosano comunmente al disolverlo en hexafluoroisopropanol, diclorometano (**DCM**) y trifluoroacetato (**TFA**) (Ceylan, Sengor, y Yilmaz, 2017; Chen et al., 2008; Ohkawa, Cha, Kim, Nishida, y Yamamoto, 2004), otra opción usualmente utilizada para mejorar su capacidad de electroespinabilidad es mezclar el quitosano con otros polímeros incluidos el PEO (Pakravan, Heuzey, y Ajji, 2011), PVA (Wu y Yin, 2013), PLA (Ignatova, Manolova, Markova, y Rashkov, 2009) y PCL (Hong y Kim, 2011; Qian, Zhang, Zheng, Song, y Zhao, 2014; Steyaert, Van Der Schueren, Rahier, y De Clerck, 2012).

El quitosano ha sido comúnmente utilizado en el envasado activo de alimentos en forma de recubrimiento y películas comestibles (Ganiari, Choulitoudi, y Oreopoulou, 2017; Piedrahíta, Fuenmayor, y Suárez, 2019; Siripatrawan y Vitchayakitti, 2016). Recientemente, las nanofibras con un alto contenido de quitosano se han estudiado en el envasado antibacteriano (Tian et al., 2019).

Ceylan, Sengor, Sağdıç y Yilmaz, (2017a) demostraron que un recubrimiento a base de nanofibras de quitosano sobre filetes de pescado puede retrasar efectivamente el crecimiento de microorganismos como bacterias, levaduras y mohos, posteriormente, Ceylan, Sengor, et al., (2017b) demostraron que la incorporación de timol en las nanofibras electrohiladas de quitosano mejoró la efectividad del recubrimiento, protegiendo la carne de pescado dorada (*Sparus aurata*) del rápido incremento del nitrógeno básico volátil total, la trimetilamina y el ácido tiobarbitúrico durante las condiciones de almacenamiento en frío. También Arkoun, Daigle, Heuzey y Ajji, (2017) encontraron que la acción antibacteriana de las nanofibras de CH/ PEO es causado por la proliferación de los grupos amino del CH que causan la permeabilización de las membranas bacterianas a través de la formación de poros.

Las nanofibras con quitosano han demostrado ser un prometedor nanomaterial que puede prolongar la vida útil de los alimentos débilmente ácidos que incluye los productos lácteos y cárnicos, dado que el CH puede inhibir el crecimiento de microorganismos a pH más bajo que su pKa (Arkoun, Daigle, Holley, Heuzey, y Ajji, 2018). Sin embargo, todavía hace falta estudios que permitan estandarizar y mejorar el proceso de electrohilado del quitosano evitando el uso de solvente tóxicos como el DCM/TFA y mejorar la estabilidad de sus nanofibras como material de empaque.

Otros usos que se presentan para las nanofibras a base de quitosano son la encapsulación de sustancias activas como la vitamina B12, el diclofenaco y la curcumina (Mendes, Gorzelanny, Halter, Schneider, y Chronakis, 2016).

1.5.3. Propóleos

Los propóleos son una sustancia resinosa natural recolectada por las abejas melíferas de diversas fuentes vegetales como brotes de los árboles, los flujos de savia, resinas; entre otros, es considerada una buena fuente natural de antioxidantes y antibacterianos (Bankova, 2005). Este producto natural es utilizado como defensa de las colmenas; debido a su naturaleza cerosa y sus propiedades mecánicas y activas (Zabaiou et al., 2017).

Los propóleos varían en composición, color, sabor y consistencia según el tipo de vegetación, ubicación geográfica y estación en que se recolectan las resinas. Se compone típicamente de 50% de resinas vegetales, 30% de ceras, 10% de aceites esenciales y aromáticos, 5% de pólenes y 5% de otras sustancias orgánicas (Bankova, 2005); los principales compuestos químicos son los polifenoles, sesquiterpenos, quininas, cumarinas, aminoácidos y compuestos inorgánicos (Falcão et al., 2010).

Los flavonoides, los ácidos aromáticos y otros compuestos fenólicos son los componentes activos más importantes de los propóleos, responsables de las actividades biológicas del mismo (Silici y Kutluca, 2005). Se ha informado que los propóleos poseen diversas

actividades biológicas, tales como propiedades antibacterianas, antivirales, antitumorales, antiinflamatorias, anticancerígenas y antifúngicas (Falcão et al., 2010), entre sus propiedades antibacterianas se ha reportado que tiene actividad contra bacterias gram-positivas como *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* y gram-negativas que incluyen *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorescence* (Silici y Kutluca, 2005; Siripatrawan, Vitchayakitti, y Sanguandeekul, 2013).

Debido a su amplia actividad bioactiva los propóleos han sido ampliamente estudiados en la industria de alimentos, comúnmente purificados en extractos obtenidos de propóleos en bruto (Pobiega, Kraśniewska, y Gniewosz, 2019b) y aplicados principalmente como conservante natural (Silici y Karaman, 2014; Viera et al., 2016). Los alimentos son sumergidos o adicionados con los extractos de propóleos o recubiertos con capas desarrolladas de polímeros que contienen los extractos. Estos métodos han probado mejorar la estabilidad microbiana y la calidad de los alimentos durante el almacenamiento (Ali, Kassem, y Atta-Alla, 2010; Luis-Villaroya et al., 2015) al reducir la microbiota presente en los alimentos y reducir los procesos oxidativos de productos cárnicos, pesqueros (Ali et al., 2010; C. Gutiérrez y Suárez, 2014; Piedrahíta et al., 2019), frutas y jugos de frutas durante el almacenamiento (Zahid, Ali, Siddiqui, y Maqbool, 2013).

También se han desarrollado esterillas antibacterianas incorporando propóleos en nanofibras electrohiladas de poliuretano (Kim, Pant, Sim, Lee, y Kim, 2014), PLA (Krit Sutjarittangtham et al., 2014), PCL (K. Sutjarittangtham et al., 2012), PVA (Arıkan y Solak, 2017) y polivinilpirrolidona (Asawahame et al., 2015), sin embargo investigaciones enfocadas en su aplicabilidad en alimentos han sido escasas.

1.6. Liberación controlada en empaques alimenticios antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos en el material de empaque se pueden liberar mediante procesos de difusión, hinchazón y/o control químico (**Figura 1-6**) (Arifin, Lee, y Wang, 2006;

Mastromatteo, Mastromatteo, Conte, y Nobile, 2010). La liberación controlada de los bioactivos es necesaria para evitar problemas sensoriales y garantizar el efecto deseado sobre el alimento.

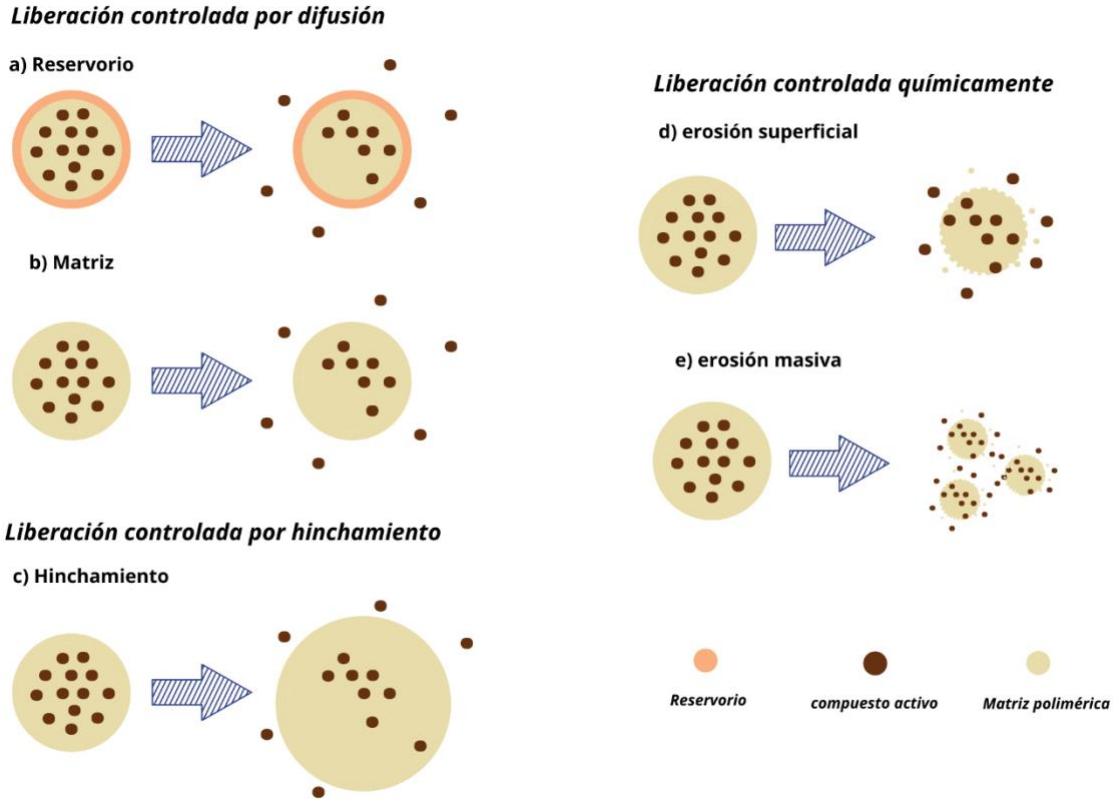


Figura 1-6 Representación esquemática de los mecanismos de liberación controlada

1.6.1. Liberación controlada por difusión

En esta los compuestos activos son liberados por medio del gradiente de concentración entre un portador reservorio o un portador de matriz y el entorno circundante; en el caso de los portadores reservorios (**Fig. 1-6a**) los agentes activos quedan atrapados dentro de una barrera polimérica y son liberados dependiendo del grosor y área superficial de la barrera además de su capacidad de difusividad y/o solubilidad de las moléculas a través del polímero (Bajpai, Shukla, Bhanu, y Kankane, 2008), por el contario en los portadores de matriz (**Fig. 1-6b**) los compuestos activos se disuelven uniformemente (si la concentración es inferior a la concentración saturada) o se dispersan (si la concentración es superior a la concentración

saturada) dentro de la matriz polimérica (Arifin et al., 2006), la tasa de liberación tiende a decrecer continuamente debido a la disminución de la concentración del bioactivo en la matriz (Bajpai et al., 2008; Mastromatteo et al., 2010).

1.6.2. Liberación controlada por hinchamiento

En este sistema los agentes biactivos se encuentran atrapados por su baja difusividad en una barrera polimérica en estado vítreo, sin embargo cuando el polímero se expone a un medio termodinámicamente compatible la matriz se hincha generando un aumento en la movilidad de las cadenas del polímero y una depresión en la temperatura de transición vítrea, la cual llega incluso a ser menor que la temperatura ambiental lo que genera el cambio del polímero a un estado elastomérico que desencadena la liberación de las moléculas activas como resultado de un aumento en la difusividad (**Fig. 1-6c**) (Mastromatteo et al., 2010). La velocidad de liberación depende de varios parámetros, incluido el grado de depresión de la temperatura de transición vítrea y el grado de hinchamiento de la matriz polimérica (Arifin et al., 2006).

Varios estudios han investigado la liberación controlada por hinchamiento en el envasado activo de alimentos a través de la absorción de humedad por parte del polímero. Los investigadores han encapsulado agentes antimicrobianos en vehículos poliméricos sensibles a la humedad, donde la sustancia activa permanece atrapada dentro del portador en condiciones secas pero que se libera cuando se expone a una humedad relativa elevada. Uno de los vehículos sensibles a la humedad que se han explorado son las esterillas a base de nanofibras electrohiladas, que por su alta relación superficie/volumen son sensibles al cambio ambiental y permiten la liberación controlada de las sustancias activas.

Estudios realizados por Vega y Lim, (2009) reportaron que la liberación de isotiocianato de alilo dentro de nanofibras electrohiladas de soya/ PLA aumentó en base al incremento de la HR atribuido principalmente al efecto plastificante del agua sobre las nanofibras que aumentó la movilidad de los compuestos antimicrobianos encapsulados. También

Fuenmayor et al., (2013) investigaron el comportamiento de liberación R - (+) - limoneno encapsulado en nanofibras electrohiladas de pullulan y β- ciclodextrina, la liberación de limoneno se desencadenó cuando se expuso al 90% de HR, atribuido al debilitamiento entre las interacciones de la β-ciclodextrina y el limoneno, además el agua absorbida también puedo provocar la inflamación de la estructura fibrosa, favoreciendo la difusión de compuestos antimicrobianos a través de la matriz fibrosa, por último Sánchez Cepeda et al., (2016) demostraron que la liberación controlada de clorhidrato de tiamina en nanofibras electrohiladas de PCL/CH se pudo producir tanto por hinchamiento como por la acción hidrolítica del agua sobre las nanofibras.

1.6.3. Liberación controlada químicamente

En este sistema los compuestos activos son unidos covalentemente a la superficie de la matriz de polímero y liberados por escisión hidrolítica o enzimática. La velocidad de liberación depende de la velocidad de la hidrólisis (Bajpai et al., 2008). Higueras Contreras, López-Carballo, Gavara, y Hernández-Muñoz, (2014) inmovilizaron cinamaldehído en películas de quitosano formando enlaces covalentes a través de la reacción entre el grupo carbonilo del cinamaldehído y el grupo amino primario del quitosano, la liberación de cinamaldehído se logró por la hidrólisis de los enlaces imino al sumergir las películas en una solución tamponada expuesta a diferentes temperaturas donde la liberación aumentó con el incremento de la temperatura, además, estas películas mostraron un efecto inhibidor contra el crecimiento de *L. monocytogenes* inoculada en la leche durante 12 días a 4 ° C.

Otro modo de liberación controlada químicamente es a través de la erosión de la matriz polimérica mediante reacciones hidrolíticas o enzimáticas que generan los procesos de erosión superficial o heterogénea (**Fig. 1-6d**), en la cual la tasa de degradación del polímero es más rápida que la tasa de difusión del agua en la matriz del polímero afectando principalmente las capas más externas con una velocidad de erosión idealmente constante; o la erosión masiva u homogénea (**Fig. 1-6e**), donde la difusión del agua es más rápida que la velocidad de degradación del polímero conllevando a la erosión no solo en la superficie

de la matriz sino también dentro de la matriz del polímero a una velocidad inconstante (Mastromatteo et al., 2010; von Burkersroda, Schedl, y Gopferich, 2002).

1.7. Empaques antimicrobianos a base de nanofibras en productos cárnicos

En las últimas décadas el envasado de alimentos ha evolucionado para proveer funciones adicionales a las originalmente propuestas (Han, 2005) para los productos cárnicos el envasado se está enfocando en proteger aspectos importantes como la conservación de la retención de agua, el color, la calidad microbiana, la estabilidad lipídica, el valor nutritivo y la palatabilidad (McMillin, 2017).

Dentro de las diferentes tecnologías que se están desarrollando el empacado activo es una de las más prometedoras. En el envasado activo el producto, el empaque y el entorno interactúan generando efectos positivos sobre los alimentos. A menudo, esto se logra mediante la incorporación de compuestos activos, generalmente de tamaño nanométrico, en la matriz del polímero o mediante la incrustación de partículas inorgánicas en la superficie del paquete que se pueden liberar de forma controlada para actuar sobre el alimento o que permiten la absorción de productos químicos de los alimentos o del entorno (Fang, Zhao, Warner, y Johnson, 2017). Los tipos de empaques activos más comunes para productos musculares incluyen los absorbedores de humedad, emisores de CO2, captadores de O2 y envases antimicrobianos o antioxidantes (Realini y Marcos, 2014).

Como se reporta anteriormente diferentes tecnologías han sido desarrolladas con el fin de preservar la calidad de los productos cárnicos, a continuación, se resalta los envases antimicrobianos a base de nanofibras electrohiladas.

1.7.1. Empaques antimicrobianos

Debido al creciente interés en la prevención de enfermedades transmitidas por los alimentos, tecnologías de procesamiento y envasado se han abordado recientemente. Dentro de los diferentes compuestos antimicrobianos que han sido investigados para el envasado activo se encuentran los agentes biológicos como los extractos de plantas, aceites esenciales, bacteriocinas y bacteriófagos (Aguirre et al., 2018; McMillin, 2017; Pobiega et al., 2019a), también existen otros tipos de sistemas que proporcionan efectos antimicrobianos como los sistemas de eliminación de oxígeno, sistemas de absorción y control de humedad, generación de dióxido de carbono, entre otros (Suppakul, Miltz, Sonneveld, y Bigger, 2003).

Las películas y recubrimientos a base de polímeros biodegradables y biopolímeros que contienen agentes activos, conforman una gran parte de los estudios basados en las tecnologías de envasado activo (Ganiari et al., 2017; No, Meyers, Prinyawiwatkul, y Xu, 2007; Quintavalla y Vicini, 2002). Sin embargo, la facilidad y versatilidad de la técnica de electrohilado ha ofrecido nuevas oportunidades para que los investigadores puedan mejorar las propiedades del envasado convencional aprovechando la capacidad de las nanofibras de reforzar y mejorar las propiedades del material de envasado (Huang, Zhang, Kotaki, y Ramakrishna, 2003) y su capacidad funcional de incorporar agentes bioactivos que pueden ser usadas de acuerdo con la funcionalidad deseada en el envasado de alimentos (**Fig 1-7**). A pesar de lo anterior, solo unas pocas investigaciones se han desarrollado usando nanocompuestos reforzados con nanofibras de polímeros electrohilados para la industria de alimentos. Neo et al., (2013) desarrollaron esteras compuestas de fibras electrohiladas cargadas con ácido gálico que demostraron actividad antibacteriana y propiedades aceptables para su uso como materiales activos en el envasado de alimentos. De forma similar, Wen et al., (2016) desarrollaron nanofibras electrohiladas de PLA incorporadas con un complejo de inclusión de aceite esencial de canela y ciclodextrina que prolongó la vida útil de la carne de cerdo por 4 días más. Huang et al., (2012) utilizaron la técnica de capa por capa para desarrollar esterillas nanofibrosas electrohiladas de acetato de celulosa e inmovilizar complejos de lisozima-quitosano los cuales mejoraron el grado de inhibición para las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y extendieron la vida útil de la carne de cerdo aproximadamente 3 días.

A pesar de las investigaciones realizadas, el envasado antimicrobiano se ha utilizado comercialmente de forma limitada, excepto los materiales antimicrobianos a base de plata (Realini y Marcos, 2014).

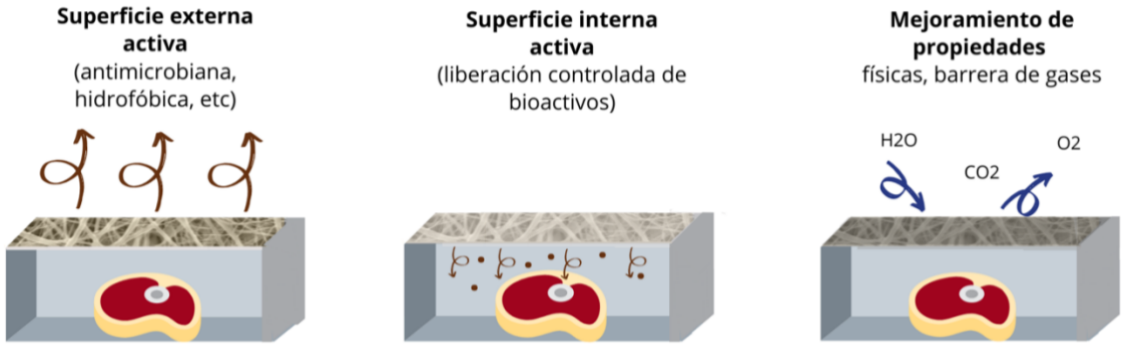


Figura 1-7 Representación esquématica del uso de nanofibras electrohiladas en el envasado activo de alimentos[1]
[1] Adaptado de (Torres-Giner, 2011)

1.8. Vida útil de la carne de cerdo fresca

La vida útil es definida como el tiempo durante el cual un alimento se mantiene inocuo; conserva las características sensoriales, químicas, físicas y microbiológicas deseadas y cumple con la declaración nutricional reportada en la etiqueta cuando es almacenado en las condiciones recomendadas (IFST, 1993).

La carne de cerdo ha sido un alimento primordial para el ser humano durante siglos, donde alrededor del 60% se consume en productos curados y un 35 % en productos frescos (NPD, 2003). Sin embargo, la vida útil de la carne de cerdo es altamente sensible a diversos factores como la carga microbiana, el pH, los pigmentos musculares, la capacidad de retención de agua, la manipulación, el envasado, el enfriamiento, la adición de conservantes, la iluminación en el punto de venta, entre otros.

Estos factores determinan los mecanismos de descomposición de la carne que se manifiestan principalmente con cambios de coloración, aparición de flavors y olores indeseados debido a reacciones químicas como la oxidación lipídica y de los pigmentos musculares o producto del crecimiento y metabolismo microbiano (Gram et al., 2002).

1.8.1. Oxidación de la mioglobina y el color de la carne

El color es la propiedad sensorial más importante que influye en la apariencia y la atracción de la carne de cerdo fresca (Faustman, Johnson, Cassens, y Doyle, 1990). Desafortunadamente, el color de la carne fresca es de corta duración y la decoloración de su superficie es rechazada por los consumidores, lo que hace que la estabilidad del color sea un tema relevante para la industria cárnica.

El color de las carnes rojas como la carne de cerdo es generada principalmente por un pigmento muscular llamado mioglobina (**Mb**). La Mb es un pigmento intracelular (sarcoplasmático) de color rojo que se encuentra en las fibras rojas de los vertebrados e invertebrados, el cual interviene en la cadena de fosforilación oxidativa del músculo (Moss, 1992). La Mb esta constituida por una apoproteína de 153 residuos de aminoácidos y por un grupo hemo porfirínico que contiene un átomo de hierro en estado ferroso (Fe^{+2}). Las propiedades químicas de Mb se centran en su capacidad para formar enlaces iónicos y covalentes con otras moléculas en el sexto ligando de coordinación del Fe (**Fig. 1-8**) (Fox, 1966). Por ejemplo, cuando el sexto ligando de coordinación está libre, la Mb generalmente se denomina desoximioglobina (**DMb**), de color púrpura, pero cuando este sitio está ocupado por oxígeno, el oxígeno y la Mb forman un complejo no covalente, denominado oximioglobina (**OMb**), de color cereza o rojo brillante (Lanari y Cassens, 1991), sin embargo, cuando el estado de oxidación del átomo de hierro se modifica al estado férrico (Fe^{+3}) y la sexta posición está ocupada por una molécula de agua, el Mb se denomina metamioglobina (**MMb**), de color marrón. Por lo tanto, el color de la carne es altamente dependiente no solo de la molécula que ocupa el sexto sitio de coordinación, sino también, del estado de oxidación del Fe, el tipo de enlace formado entre el ligando y el grupo hemo (covalente coordinado, iónico o ninguno), la condición de la proteína (forma nativa o

desnaturalizada) y el estado de la porfirina del grupo hemo (intacto, sustituido o degradado) (Pérez-Alvarez, 1996).

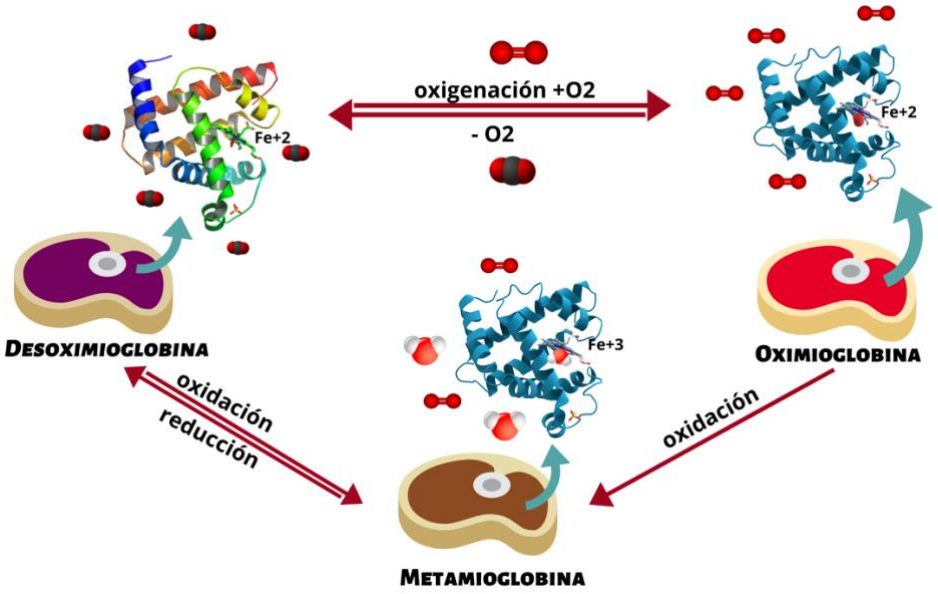


Figura 1-8. Estados de oxidación-reducción de la mioglobina[1]
[1] Adaptado de (Reyes, Jeiner, Rodríguez, y Totosaus, 2020)

Si bien el oxígeno puede unirse al Fe en estado ferroso (Fe^{+2}), muchos otros ligandos pueden unirse al Fe^{+2} o Fe^{+3} para producir una variedad de colores, como lo son el óxido nítrico (**NO**) y el monóxido de carbono (**CO**), los cuales son de importancia económica en la industria cárnica, otro ejemplo, son los agentes reductores tales como el ácido sulfhídrico (**H_2S**) y los ascorbatos que conducen a la formación de pigmentos indeseables de color verde que se denominan sulfomioglobina y colemioglobina, respectivamente, que se forman como resultado de la actividad bacteriana y un exceso de agentes reductores en el medio (Nollet, 2012).

La Mmb generada en el proceso de oxidación de la Mb produce colores indeseables que afectan la calidad de la carne. Existen diferentes causas para la generación de Mmb que incluyen la forma en que se obtiene, transforma o almacena la carne (Lee, Joo, Alderton, Hill, y Faustman, 2003; Mancini, Hunt, y Kropf, 2003), entre los factores más importantes están la presencia de oxígeno, el bajo pH, las altas temperaturas durante el procesamiento y el crecimiento y /o formación de metabolitos de la microbiota (Osborn, Brown, Adams, y Ledward, 2003; Renerre, 1990).

Como se mencionó previamente el uso de aditivos como NO o gases como el CO son comúnmente utilizados para estabilizar el color de las carnes, sin embargo, diferentes estrategias que van desde el uso de sustancias antioxidantes hasta envases activos o en atmósferas modificas se han utilizado para prevenir la oxidación de la Mb.

1.8.2. Oxidación lipídica

Recientemente, el uso de ácidos grasos poliinsaturados (**AGPI**) en la alimentación de los cerdos ha generado un aumento en la calidad nutricional de la carne de cerdo debido a la mayor concentración de AGPI resultante. Sin embargo, los AGPI también aumentan la susceptibilidad a la oxidación de los lípidos que ocurre en los dobles enlaces de estos ácidos grasos, donde se generan radicales libres que conducen no solo a la producción de sabores y olores desagradables sino que también reducen el valor nutritivo de la carne (Sheard et al., 2000)

La oxidación de lípidos es una reacción en cadena autocatalítica que ocurre en presencia de O2. Los mecanismos de oxidación de los lípidos son la autooxidación, fotooxidación y oxidación enzimática donde la autooxidación es el principal sistema de oxidación en las carnes y es iniciada cuando el oxígeno (**O_2**) se convierte en especies reactivas al oxígeno principalmente radicales hidroxilo (**$^{\bullet}OH$**) encargados de remover los átomos de hidrógeno de los AGPI que forman radicales libres y promueven una reacción en cadena que consta principalmente de tres etapas: iniciación, propagación y terminación (Min y Ahn, 2005).

Las etapas de la autoxidación lipídica se resumen en la **Fig. 1-9**, donde un radical lipídico libre reacciona rápidamente con el O2 formando un peroxi-radical el cual remueve otro hidrógeno de otra cadena lipídica que genera un hidroperóxido y un nuevo radical libre que continua la reacción en cadena (Frankel, 2005).

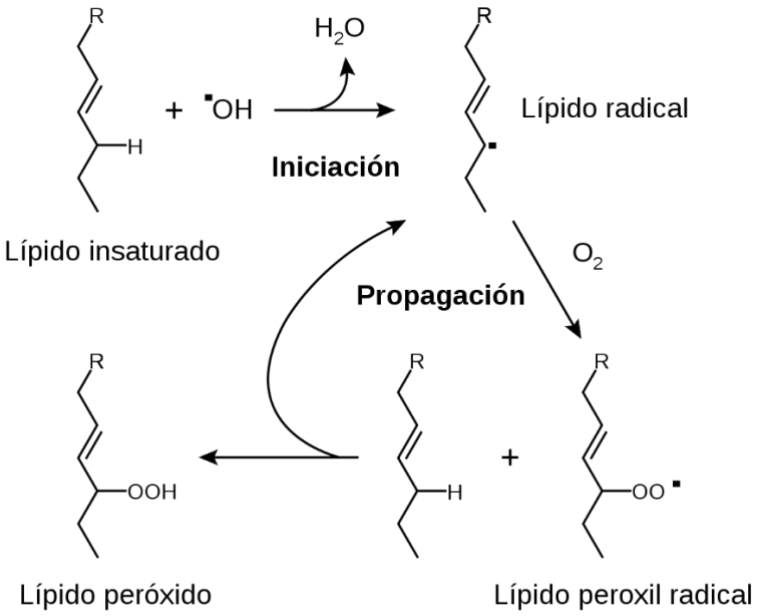


Figura 1-9. Mecanismo de peroxidación lipídica[1].
[1] Gráfico obtenido de (Vickers, 2007), adaptado de (Frankel, 2005)

La oxidación de los lípidos ocurre en el almacenamiento refrigerado o congelado de la carne de cerdo generando flavors y/o olores rancios además de generar pérdida del color, disminuyendo así la calidad y vida útil de la carne (Eleftheriadou, Samouris, Ioannidou, y Kasapidou, 2010; Faustman et al., 1990).

Para contrarrestar los efectos negativos de los procesos de oxidación, la industria cárnica ha utilizado antioxidantes sintéticos, sin embargo, dada las preocupaciones con respecto a la seguridad y la toxicidad de estos aditivos, en los últimos años se ha fomentado la investigación sobre antioxidantes naturales que puedan incluirse directamente en el alimento o en el empaque para reducir los procesos oxidativos tanto de los pigmentos musculares

como de los lípidos de las carnes (O'Grady, Maher, Troy, Moloney, y Kerry, 2006). Las hierbas, especias, las oleorresinas y los aceites esenciales extraídos de plantas, son ampliamente reconocidos como agentes poderosos para la preservación de la calidad de los alimentos (Janz, Morel, Wilkinson, y Purchas, 2007). Por ejemplo, Mc Carthy, Kerry, Kerry, Lynch, y Buckley, (2001) evaluaron las actividades antioxidantes de las catequinas del té en empanadas de cerdo frescas y previamente congeladas, demostrando que los productos presentaron una mejor estabilidad del color con un retraso en la oxidación lipídica. Otros estudios han utilizado extractos de romero, canela, clavo, semillas de uva, sésamo, hojas de olivo, entre otros, los cuales han resultado efectivos para prevenir la decoloración y la oxidación de los lípidos, aumentando la vida útil de los productos de cerdo (Carpenter, O'Grady, O'Callaghan, O'Brien, y Kerry, 2007; Fernández-López et al., 2003; Hayes, Stepanyan, Allen, O'Grady, y Kerry, 2011; Mc Carthy et al., 2001)

Otras estrategias utilizadas para contrarrestar la oxidación lipídica son el uso de antioxidantes como el α-tocoferol en las dietas de los animales o la aplicación de otros antioxidantes naturales como el extracto de romero por adición exógena al tejido muscular (O'Sullivan, Byrne, Martens, y Martens, 2007).

1.8.3. Microbiología de la carne de cerdo

La reducción de la contaminación microbiana de la carne de cerdo sigue siendo un desafío importante para la industria alimentaria. La presencia de patógenos y microorganismos de descomposición en la carne de cerdo puede ser un riesgo de seguridad significativo además de tener un impacto importante en las propiedades organolépticas de la carne de cerdo contribuyendo al desperdicio de los alimentos.

La carga microbiana inicial de la carne fresca es uno de los factores más importantes que afecta su vida útil, esta está directamente relacionada con las buenas prácticas de manejo durante el proceso de la faena, el tipo de envasado utilizado, las condiciones de almacenamiento y la manipulación por parte del consumidor. El deterioro microbiano produce sabores desagradables, decoloración, generación de gases, cambios en el pH,

formación de limo, degradación de componentes estructurales y por lo tanto cambios en la apariencia del producto (Dave y Ghaly, 2011; Lambert, Smith, y Dodds, 1991).

El crecimiento microbiano depende de factores intrínsecos de la carne como la actividad del agua, el pH, los nutrientes disponibles, la composición, tipo y grado de contaminación microbiana inicial y de factores extrínsecos siendo los más relevantes la temperatura y el ambiente de envasado (Koutsoumanis, Stamatiou, Skandamis, y Nychas, 2006).

Una variedad de microorganismos, incluidos patógenos como *Salmonella, Campylobacter, Escherichia coli, Yersinia, Listeria monocytogenes* y organismos de descomposición como *Lactobacillus* y *Pseudomonas* se detectan comúnmente en la carne de cerdo; además, parasitos como trichinella spiralis también han sido asociados. Según Borch, Kant-Muermans, y Blixt, (1996) reportaron que las bacterias predominantes en el deterioro de la carne de cerdo en condiciones refrigeradas son: *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium spp*, bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pseudomonas* spp. y *Shewanella putrefaciens*. Las cuales causan el desarrollo de flavors extraños, decoloración, producción de gas y limo.

Por otro lado, el método de empaque de la carne juega un papel importante en la flora bacteriana que se desarrollada, por ejemplo en los sistemas de envasado anaeróbicos las bacterias ácido lácticas (BAL) son las predominantes (Samelis, J., Kakouri, A. y Rementzis, 2000; Stolzenbach, Leisner, y Byrne, 2009); estas pueden producir bacteriocinas que inhiben otras bacterias incluso algunos microorganismos patógenos transmisores de enfermedades (O'Sullivan et al., 2007). No obstante, en sistemas de envasado aeróbicos las bacterias predominantes suelen ser más diversas donde se incluyen cepas aeróbicas gram-negativas como *Pseudomonas* spp y otras poblaciones bacterianas como *Brochothrix thermosphacta*, Enterobacteriaceae tolerantes al frío y BAL (Lambropoulou, Drosinos, y Nychas, 1996).

El pH es otro factor importante en el crecimiento bacteriano, el pH alto favorece el crecimiento de bacterias relacionadas con el deterioro de las carnes, sin embargo, las bacterias lácticas toleran valores bajos de pH (Egan, 1983). Cuando las bacterias agotan los

recursos de glucosa disponible en la superficie de la carne utilizan las proteínas como fuente de energía, la descomposición de los aminoácidos resulta en una variedad de subproductos que se detectan organolépticamente con olores y sabores putrefactos. Por ejemplo, el olor pútrido es causado por la formación de compuestos volátiles a partir de la degradación de las proteínas por las bacterias aeróbicas, incluidas *Brochothrix thermosphacta*, Enterobacteriaceae tolerantes al frío y *Pseudomonas*, mientras que los olores y sabores desagradables "agrios o ácidos" son causados por la actividad metabólica de LAB lo que genera una acumulación de ácido láctico, con presencia de exudados lechosos e hinchazón del paquete que a veces va acompañado de un enverdecimiento del producto (Samelis, J., Kakouri, A. y Rementzis, 2000). La vida útil en relación a la carga microbiana de la carne de cerdo fresca, se estima como el tiempo requerido por la población bacteriana para alcanzar un nivel de 10^7 ufc/g (Borch et al., 1996).

El interés en producir productos de carne de cerdo microbiológicamente estables y organolépticamente aceptables, han estimulado la investigación en tecnologías que permitan controlar el crecimiento microbiano. Dentro de las estrategias que se utilizan para disminuir la carga y el crecimiento microbiano se destacan la aplicación de soluciones y aditivos antimicrobianos y las tecnologías de envasado.

Según la regla de reducción de patógenos, análisis de riesgos y sistemas de puntos críticos de control (HACCP), publicada por el Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria los procesadores de carne de cerdo deben implementar planes HACCP y procedimientos estándares en las operaciones de saneamiento. El enfriamiento se ha citado como un punto de control crítico en el procesamiento de carne de cerdo, debido que temperaturas de almacenamiento más bajas se asocian típicamente con un menor crecimiento microbiano (Bolton et al., 2002). Las plantas de producción de carne de cerdo también deben evaluar los productos para *Escherichia coli* genérico como una médida de adecuación del control del proceso y cumplir con los estándares de *Salmonella* establecidos en la regla, el cual indica que no más de 6 muestras pueden ser positivas para *Salmonella* en un conjunto de 55 (USDA-FSIS, 2000).

El lavado y la desinfección son algunos de los métodos más utilizados para reducir las cargas microbianas en la carne de cerdo y otras carnes (Castelo, Kang, Siragusa, Koohmaraie, y Berry, 2001). Los cuales pueden incluir lavados con ácidos orgánicos antimicrobianos, por ejemplo, el ácido láctico, es uno de los descontaminantes ácidos ampliamente utilizados en la industria de la carne. Shrestha y Min, (2006) encontraron que la aplicación de ácido láctico en carne de cerdo fresca redujo la carga bacteriana, sin embargo, produjo una pérdida significativa del color, también se ha utilizado ácidos como el ácido acético, no obstante este tipo de aplicaciones han demostrado poseer efectos negativos sobre el color de las carnes. La adición de sales también ha sido probada para disminuir el recuento microbiano, como por ejemplo el ascorbato de sodio el cual minimizó los efectos perjudiciales sobre el color de la carne de cerdo; otras sales reportadas son el lactato de sodio o potasio (Brewer, Mckeith, Martin, Dallmier, y Meyer, 1991; Lin y Chuang, 2001; Tan y Shelef, 2002).

El uso de aditivos microbianos de origen vegetal tales como hierbas y especias también ha sido reportado. Martínez, Cilla, Antonio Beltrán, y Roncalés (2006) y Martinez, Cilla, Beltran, y Roncales (2006) evaluaron las características de calidad y la vida útil de las salchichas de cerdo frescas formuladas con una variedad de especias y hierbas y ácidos orgánicos que incluyeron extracto de pimienta de cayena negra, blanca, roja, dulce y picante, romero, raíz de remolacha roja, ácido láctico y ácido ascórbico. Todos los pimientos se asociaron con recuentos de psicrotrófos más bajos a los 8 y 12 días de almacenamiento a 2 ° C ± 1 ° C mientras que el pimiento rojo, la pimienta de cayena y el romero más el ácido ascórbico se asociaron con una mayor inhibición de la oxidación. Adicionalmente, tratamientos como la irradiación de la carne de cerdo y la aplicación de alta presión también han sido estudiados para la reducción microbiana. (Akbarian, Hadidi, Moayedi, y Akbarian, 2014; Nollet, 2012).

Por ultimo, los materiales y ambientes del envasado pueden tener efectos significativos en las cualidades microbiológicas y sensoriales de los productos de carne de cerdo. Uno de los ejemplos más conocidos a nivel comercial es el uso de CO2 como gas antimicrobiano dentro del empaque. Un ejemplo de esto fue reportado por Greer, Dilts, y Jeremiah, (1993), quienes

solo detectaron bacterias ácido lácticas en lomos de cerdo almacenados bajo CO2 a -1.5 ° C durante 24 semanas, con un máximo de 10^7 UFC a la novena semana, lo cual aumentó su vida útil.

1.9. Empaques usados para la carne de cerdo

El objetivo principal del envasado para las carnes frescas y procesadas es la protección del alimento ante factores externos tales como daños físicos y contaminantes externos incluidos organismos patógenos, mientras limita o retrasa los procesos de deterioro para mantener las características sensoriales óptimas dentro de la especificación de vida útil del producto. Además, debe presentar el producto de una manera estéticamente atractiva para el consumidor (Kerry y Ledward, 2009).

En general, hay cuatro sistemas diferentes de envasado para productos de carne de cerdo; los cuales son: empaques de atmósfera modificada con alto contenido de oxígeno (**EAM alto O2**); empaques de atmósfera modificada con bajo contenido de oxígeno (**EAM bajo O2**); empaques de atmósfera controlada (**EAC**) y el envasado al vacío (**EV**) (Gill y Gill, 2005). Diferentes productos se adaptan a diferentes formatos, sin embargo, los primeros tres formatos se usan para productos refrigerados, mientras que el EV se usa tanto para almacenamiento refrigerado como congelado.

Estos sistemas no solo extienden la vida útil, sino que también afectan la calidad sensorial de la carne de cerdo.

1.9.1. Envasado en empaques de atmósfera modificada

El envasado en EAM es uno de los formatos de envasado refrigerado más populares para la carne de cerdo. Este tipo de envasado consiste en colocar el producto en una bolsa o película con baja permeabilidad a los gases, a la cual se evacua el aire y se reemplaza por un solo gas o una mezcla de gases y finalmente se sella con calor. EL EAM generalmente contiene mezclas de dos o tres gases: O2 (para mejorar la estabilidad del color), CO2 (para inhibir el

crecimiento microbiológico) y N2 (para mantener la forma del empaque). Comúnmente las carnes rojas frescas se almacenan en EAM que contienen 80% de O2 y 20% de CO2 (Georgala y Davidson, 1970; Jakobsen y Bertelsen, 2000; Zakrys, O'Sullivan, Allen, y Kerry, 2009).

La mayoría de las bacterias aeróbicas son inhibidas por concentraciones de CO2 mayores al 10%, mientras que las bacterias anaerobias obligatorias son inhibidas por la presencia de incluso pequeñas cantidades de oxígeno (Ray, 2001). El color de la carne de cerdo se extiende por almacenamiento en condiciones de EAM. La alta concentración de oxígeno permite la formación de oximioglobina, creando el color rosado / rojo más deseable del cerdo fresco. Sin embargo, el uso de empaques con alto contenido de O_2 favorecen la presentación de la decoloración en las carnes durante las condiciones de exhibición debido a la función combinada de la oxidación del pigmento muscular (oximioglobina a metamioglobina) y la oxidación de los lípidos en la carne de cerdo (Lund, Lametsch, Hviid, Jensen, y Skibsted, 2007). En general, EAM altos en O2 mejoran a corto plazo la calidad del color de los productos de cerdo envasados, pero pueden afectar negativamente otras variables de calidad sensorial como el sabor, el aroma y la textura.

Los EAM bajos en O2 también se puede usar para empacar carnes frescas, como la carne de cerdo, pero el principal inconveniente se asocia con un cierto grado de oscurecimiento como resultado de la desoximioglobina. En estos casos, el uso de monóxido de carbono ha demostrado ser útil para prevenir este problema. El CO es un gas incoloro, inodoro e insípido, que puede usarse para prolongar la integridad del color de la carne (Sorheim, Nissen, y Nesbakken, 1999). El CO reacciona con la mioglobina para formar carboximioglobina (**COMb**), que es más resistente a la oxidación que la oximioglobina, y genera un color rojo deseado. Por ejemplo se ha reportado que el uso de EAM con bajas concentraciones de CO y altas concentraciones de CO2 mejora el color de la carne de res y de cerdo y otros rasgos de la calidad de la carne (Luño, Roncalés, Djenane, y Beltrán, 2000; Sorheim et al., 1999); como en el caso de lomos de cerdo empacados en EAM que

demostraron tener una vida útil de hasta 14 días (Jayasingh, Cornforth, Brennand, Carpenter, y Whittier, 2002).

1.9.2. Envasado en empaques de atmósfera controlada

Los productos de carne de cerdo también se pueden envasar en formatos refrigerados EAC los cuales son una clase de EAM libre de O_2. Estos usan combinaciones de 70–80% de nitrógeno y 20–30% de CO2 en el espacio de cabeza del empaque. Estos son usados en productos de cerdo como salchichas y jamón cocido en rodajas. Nuevamente, el CO2 está presente para prevenir el crecimiento de bacterias de descomposición y el N2 ayuda a mantener la forma del paquete (Jeremiah y Gibson, 1997).

Sin embargo, las altas concentraciones de CO2 en los productos cárnicos envasados pueden dar lugar a la formación de contaminación por CO2 en la cocción resultante. Esta mancha de CO2 es un sabor desagradable que el consumidor puede probar después de cocinar la carne (Nattress y Jeremiah, 2000).

1.9.3. Envasado al vacío

El EV extiende la vida útil de las carnes refrigeradas al mantener un ambiente deficiente en O2 dentro del empaque y se usa tanto para productos refrigerados como para congelados (Bell, Penney, y Moorhead, 1995). El EV consiste en la evacuación del aire del empaque antes del sellado y se usa ampliamente para el envasado de productos de carne de cerdo, principalmente para los mercados de exportación (McMillin, 2008).

El EV fue una de las primeras formas desarrolladas comercialmente y todavía se usa ampliamente para productos como cortes primarios de carnes rojas frescas y carnes curadas (Parry, 1993). De acuerdo con Holley, Peirson, Lam, y Tan, (2004), la vida de almacenamiento comercial alcanzable para la carne de cerdo envasada al vacío es de aproximadamente 8 semanas y las bacterias predominantes son las bacterias psicotrópicas ácido lácticas. La respiración de la carne en envases al vacío consumirá rápidamente cualquier residuo de O2, reemplazándolo con CO2, que eventualmente aumenta al 10-20% dentro del paquete (Gill y Gill, 2005; Parry, 1993).

La baja permeabilidad al O2 de la película del empaque provoca un cambio en el color de la carne de rojo a púrpura debido a la conversión de oximioglobina en desoximioglobina. Sin embargo, desde la perspectiva de los consumidores, estas formas de mioglobina se han considerado como colores de carne inaceptables (Parry, 1993). Por lo que la carne envasada al vacío no se considera adecuada para el mercado minorista. Además, el almacenamiento prolongado de carne en envases al vacío da como resultado la acumulación de goteo, lo que es muy poco atractivo para los consumidores (Greer et al., 1993; Parry, 1993).

1.9.4. Envasado activo

El envasado activo se está volviendo cada vez más significativo para extender la vida útil de la carne fresca. Este se ha definido como una tecnología que cambia la condición interna del empaque para extender la vida útil o mejorar la seguridad o las propiedades sensoriales mientras se mantiene la calidad de los alimentos (Quintavalla y Vicini, 2002; Vermeiren, Devlieghere, Beest, Kruijf, y Debever, 2000). Los sistemas de envasado activos pueden incluir captadores de oxígeno, captadores y emisores de dióxido de carbono, agentes de control de humedad y tecnologías de envasado antimicrobiano (Kerry, O'Grady, y Hogan, 2006). El objetivo del empaque activo es aumentar la vida útil de los productos envasados, manteniendo su calidad, seguridad y propiedades sensoriales sin la adición directa de los agentes activos al producto (Camo, Beltran, y Roncales, 2008).

La forma más frecuente de envasado activo en la industria cárnica se basa en la eliminación de oxígeno. Los eliminadores de oxígeno funcionan según el principio de unión del oxígeno libre presente en los empaques después del sellado para que este no esté disponible para el crecimiento de microorganismos aerobios y los procesos de oxidación de lípidos y pigmentos. Los emisores de CO2 funcionan sobre la base de suprimir el crecimiento microbiano, dado que la permeabilidad del CO2 es 3 a 5 veces mayor que la del oxígeno en la mayoría de las películas de plástico, debe producirse de manera continua para mantener la concentración deseada dentro del empaque (Ozdemir y Floros, 2004). Los eliminadores o absorbedores de CO2, se pueden usar para eliminar el CO2 durante el almacenamiento y evitar la ruptura del paquete (Kerry et al., 2006).

Por último, el envasado antimicrobiano es una forma prometedora de envasado activo en alimentos, en particular para productos cárnicos (Quintavalla y Vicini, 2002). El empaque antimicrobiano incluye sistemas como agregar una bolsita al empaque, dispersar agentes bioactivos en el empaque, recubrir agentes bioactivos en la superficie del material del empaque o utilizar macromoléculas antimicrobianas con propiedades de formación de película o matrices comestibles (Coma, 2008). Los materiales de envasado de alimentos antimicrobianos tienden que extender la fase de retraso y reducir la fase de crecimiento de los microorganismos para extender la vida útil y mantener la calidad y seguridad del producto. Por ejemplo, Xia, Kong, Xiong, y Meng, (2007) inhibieron el crecimiento microbiano y la pérdida por goteo y mantuvieron el color de la carne de cerdo refrigerada combinando un recubrimiento de quitosano con extractos de especias. Dentro de los antimicrobianos que se han estudiado se incluyen los ácidos orgánicos, fungicidas, bacteriocinas, proteínas, polisacáridos, gases inorgánicos, especias, zeolita sustituta de plata y enzimas (Cutter y Sumner, 2002; J. H. Han, 2005; Suppakul et al., 2003) y entre las sustancias funcionales que se consideran más adecuadas para su incorporación en la pared del paquete se encuentran los fitoquímicos, las vitaminas, las nanofibras y los prebióticos (Lopez-Rubio, Gavara, y Lagaron, 2006).

1.10. Conclusión

Esta revisión resumió el proceso de electrohilado haciendo énfasis en el electrohilado de superficie libre de alambre y la aplicación dirigida en alimentos de nanofibras de policaprolactona y quitosano, por otro lado, se explicaron los procesos de liberación controlada y el uso de las nanofibras como empaques activos en productos cárnicos. Adicionalmente, se discutieron los procesos asociados con la degradación de las carnes y las alternativas actuales de prevención enfocado en las tecnologías de empaques.

En conclusión, el electrohilado es una técnica simple, flexible y rentable que permite utilizar las fuerzas electrostáticas sobre una solución polimérica para producir fibras ultrafinas, las cuales pueden impulsar el crecimiento de la industria de alimentos en las áreas de encapsulación, envasado de alimentos y seguridad alimentaria, gracias a las múltiples

ventajas que poseen como diámetros de tamaño nanométrico; morfología variable, estructura porosa, área de superficie alta, excelente control de liberación y mejor eficiencia de encapsulación. Sin embargo, es necesario transformar el éxito del electrohilado en el laboratorio a escala industrial, por lo cual es necesario realizar más investigaciones de la efectividad de estas nanofibras en productos alimenticios.

Por último, el envasado activo ha demostrado ser una alternativa innovadora y eficaz para extender la vida útil de la carne fresca al prevenir y/o reducir los procesos oxidativos y el crecimiento microbiano, además, permiten el uso de aditivos naturales que pueden sustituir el uso de preservantes sintéticos.

1.11. Referencias

Aguirre, J., Leonzapata, M., Alvarezperez, O., Torres, C., Nieto-oropeza, D., Ventura-sobrevilla, J., … Elena, M. (2018). Packaging for Foods. In *Food Packaging and Preservation*. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811516-9/00001-4

Akbarian, A., Hadidi, M., Moayedi, F., y Akbarian, M. (2014). Effect of high pressure processing of food characteristics: a review of quality aspect. *International Journal of Biosciences*. https://doi.org/10.12692/ijb/4.10.193-205

Alborzi, S., Lim, L.-T., y Kakuda, Y. (2014). Release of folic acid from sodium alginate-pectin-poly(ethylene oxide) electrospun fibers under in vitro conditions. *LWT - Food Science and Technology*, *59*(1), 383–388. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.008

Ali, F. H., Kassem, G. M., y Atta-Alla, O. A. (2010). Propolis as a natural decontaminant and antioxidant in fresh oriental sausage. *Veterinaria Italiana*, *46*(2), 167–172.

Amaya, J. (2019). Estudio de la dosificación del almidón extraído del banano en un polímero de tipo termoplástico. *Revista Colombiana de Química*, *48*, 43–51. https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v48n1.74469

Arifin, D. Y., Lee, L. Y., y Wang, C.-H. (2006). Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. *Advanced Drug*

Delivery Reviews, *58*(12–13), 1274–1325. https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.007

Arıkan, H. K., y Solak, H. H. (2017). Propolis Extract-PVA Nanocomposites of Textile Design: Antimicrobial Effect on Gram Positive and Negative Bacterias. *International Journal of Secondary Metabolite*, *4*(1), 218–224. https://doi.org/10.21448/ijsm.371563

Arkoun, M., Daigle, F., Heuzey, M. C., y Ajji, A. (2017). Antibacterial electrospun chitosan-based nanofibers: A bacterial membrane perforator. *Food Science and Nutrition*, *5*(4), 865–874. https://doi.org/10.1002/fsn3.468

Arkoun, M., Daigle, F., Holley, R. A., Heuzey, M. C., y Ajji, A. (2018). Chitosan-based nanofibers as bioactive meat packaging materials. *Packaging Technology and Science*, *31*(4), 185–195. https://doi.org/10.1002/pts.2366

Asawahame, C., Sutjarittangtham, K., Eitssayeam, S., Tragoolpua, Y., Sirithunyalug, B., y Sirithunyalug, J. (2015). Antibacterial activity and inhibition of adherence of Streptococcus mutans by propolis electrospun fibers. *AAPS PharmSciTech*, *16*(1), 182–191. https://doi.org/10.1208/s12249-014-0209-5

Bajpai, A. K., Shukla, S., Bhanu, S., y Kankane, S. (2008). Responsive Polymers in Controlled Drug Delivery. *Progress in Polymer Science*, *33*, 1088–1118. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2008.07.005

Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, *100*(1), 114–117. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.004

Bell, R. G., Penney, N., y Moorhead, S. M. (1995). Growth of the psychrotrophic pathogens Aeromonas hydrophila, Listeria monocytogenes and Yersinia enterocolitica on smoked blue cod (Parapercis colias) packed under vacuum or carbon dioxide. *International Journal of Food Science y Technology*, *30*(4), 515–521. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb01398.x

Bhardwaj, N., y Kundu, S. C. (2010). Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, *28*(3), 325–347. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004

Bolton, D. J., Pearce, R. A., Sheridan, J. J., Blair, I. S., McDowell, D. A., y Harrington, D. (2002). Washing and chilling as critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point (HACCP) systems. *Journal of Applied Microbiology*, *92*(5),

893–902. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01599.x

Borch, E., Kant-Muermans, M.-L., y Blixt, Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, *33*(1), 103–120. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01135-X

Brettmann, B. K., Tsang, S., Forward, K. M., Rutledge, G. C., Myerson, A. S., y Trout, B. L. (2012). Free surface electrospinning of fibers containing microparticles. *Langmuir*, *28*(25), 9714–9721. https://doi.org/10.1021/la301422x

Brewer, M. S., Mckeith, F., Martin, S. E., Dallmier, A. W., y Meyer, J. (1991). Sodium Lactate Effects on Shelf-Life, Sensory, and Physical Characteristics of Fresh Pork Sausage. *Journal of Food Science*, *56*(5), 1176–1178. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb04727.x

Camo, J., Beltran, J. A., y Roncales, P. (2008). Extension of the display life of lamb with an antioxidant active packaging. *Meat Science*, *80*(4), 1086–1091. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.04.031

Carpenter, R., O'Grady, M. N., O'Callaghan, Y. C., O'Brien, N. M., y Kerry, J. P. (2007). Evaluation of the antioxidant potential of grape seed and bearberry extracts in raw and cooked pork. *Meat Science*, *76*(4), 604–610. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.01.021

Carroll, C. P., y Joo, Y. L. (2006). Electrospinning of viscoelastic Boger fluids: Modeling and experiments. *Physics of Fluids*, *18*(5), 53102. https://doi.org/10.1063/1.2200152

Casper, C. L., Stephens, J. S., Tassi, N. G., Chase, D. B., y Rabolt, J. F. (2004). Controlling Surface Morphology of Electrospun Polystyrene Fibers: Effect of Humidity and Molecular Weight in the Electrospinning Process. *Macromolecules*, *37*(2), 573–578. https://doi.org/10.1021/ma0351975

Castelo, M., Kang, D., Siragusa, G., Koohmaraie, M., y Berry, E. (2001). Evaluation of Combination Treatment Processes for the Microbial Decontamination of Pork Trim. *Journal of Food Protection*, *64*, 335–342. https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.3.335

Cengiz, F., Krucińska, I., Gliścińska, E., Chrzanowski, M., y Göktepe, F. (2009). Comparative analysis of various electrospinning methods of nanofibre formation. *Fibres and Textiles in Eastern Europe*, *72*(1), 13–19.

Cerkez, I., Sezer, A., y Bhullar, S. K. (2017). Fabrication and characterization of electrospun poly(e-caprolactone) fibrous membrane with antibacterial functionality. *Royal Society Open Science*, *4*(2). https://doi.org/10.1098/rsos.160911

Ceylan, Z., Sengor, G. F., Sağdıç, O., y Yilmaz, M. T. (2017a). A novel approach to extend microbiological stability of sea bass (Dicentrarchus labrax) fillets coated with electrospun chitosan nanofibers. *LWT - Food Science and Technology*, *79*, 367–375. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.062

Ceylan, Z., Sengor, G. F. U., y Yilmaz, M. T. (2017b). A Novel Approach to Limit Chemical Deterioration of Gilthead Sea Bream (Sparus aurata) Fillets: Coating with Electrospun Nanofibers as Characterized by Molecular, Thermal, and Microstructural Properties. *Journal of Food Science*, *82*(5), 1163–1170. https://doi.org/10.1111/1750-3841.13688

Chen, F., Li, X., Mo, X., He, C., Wang, H., y Ikada, Y. (2008). Electrospun chitosan-P(LLA-CL) nanofibers for biomimetic extracellular matrix. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, *19*(5), 677–691. https://doi.org/10.1163/156856208784089661

Cipitria, A., Skelton, A., Dargaville, T. R., Dalton, P. D., y Hutmacher, D. W. (2011). Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds - A review. *Journal of Materials Chemistry*, *21*(26), 9419–9453. https://doi.org/10.1039/c0jm04502k

Cockburn, A., Bradford, R., Buck, N., Constable, A., Edwards, G., Haber, B., … Wildemann, T. (2012). Approaches to the safety assessment of engineered nanomaterials (ENM) in food. *Food and Chemical Toxicology*, *50*(6), 2224–2242. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.12.029

Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*, *78*(1), 90–103. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.035

Cutter, C., y Sumner, S. (2002). *Application Of Edible Coatings On Muscle Foods*. 467–484. https://doi.org/10.1201/9781420031980.ch18

Dai, R., y Lim, L.-T. (2015). Release of allyl isothiocyanate from mustard seed meal powder entrapped in electrospun PLA–PEO nonwovens. *Food Research International*, *77*, 467–475. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.029

Dave, D., y Ghaly, A. E. (2011). Meat spoilage mechanisms and preservation techniques: A

critical review. *American Journal of Agricultural and Biological Science*, *6*(4), 486–510. https://doi.org/10.3844/ajabssp.2011.486.510

Deitzel, J. M., Kleinmeyer, J., Harris, D., y Beck Tan, N. C. (2001). The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer*, *42*(1), 261–272. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00250-0

Drosou, C. G., Krokida, M. K., y Biliaderis, C. G. (2017). Encapsulation of bioactive compounds through electrospinning/electrospraying and spray drying: A comparative assessment of food-related applications. *Drying Technology*, *35*(2), 139–162. https://doi.org/10.1080/07373937.2016.1162797

Egan, A. F. (1983). Lactic acid bacteria of meat and meat products. *Antonie van Leeuwenhoek*, *49*(3), 327–336. https://doi.org/10.1007/BF00399507

Eleftheriadou, A., Samouris, G., Ioannidou, M., y Kasapidou, E. (2010). Changes in lipid oxidation and fatty acid composition in pork and poultry meat during refrigerated and frozen storage. *Archiv Für Lebensmittelhygiene*, *61*, 173–178. https://doi.org/10.2376/0003-925X-61-173

Falcão, S. I., Vilas-Boas, M., Estevinho, L. M., Barros, C., Domingues, M. R. M., y Cardoso, S. M. (2010). Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *396*(2), 887–897. https://doi.org/10.1007/s00216-009-3232-8

Fang, Z., Zhao, Y., Warner, R. D., y Johnson, S. K. (2017). Active and intelligent packaging in meat industry. *Trends in Food Science y Technology*, *61*, 60–71. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.01.002

Faustman, C., Johnson, J. L., Cassens, R. G., y Doyle, M. . (1990). Color reversion in beef: Influence of psychotrophic bacteria. *Fleischwirt*, *70*, 676.

Félix, M., Jiménez, C., Romero, A., y Guerrero, A. (2016). PVA-based electrospun nanofiber mats of potential use in active packaging. *International Journal of Environmental y Agriculture Research*, *2*(8), 7–14.

Feng, J. J. (2003). Stretching of a straight electrically charged viscoelastic jet. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, *116*(1), 55–70. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0377-0257(03)00173-3

Fernández-López, J., Sevilla, L., Sayas-Barberá, E., Navarro, C., Marín, F., y Pérez-Alvarez, J. A. (2003). Evaluation of the Antioxidant Potential of Hyssop (Hyssopus officinalis L.) and Rosemary (Rosmarinus officinalis L.) Extracts in Cooked Pork Meat. *Journal of Food Science*, *68*(2), 660–664. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05727.x

Fox, J. B. (1966). Chemistry of Meat Pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *14*(3), 207–210. https://doi.org/10.1021/jf60145a003

Frankel, E. N. (2005). *Lipid Oxidation*. Oily Press.

Fuenmayor, C. A., Mascheroni, E., Cosio, M. S., Piergiovanni, L., Benedetti, S., Ortenzi, M., … Mannino, S. (2013). Encapsulation of R-(+)-limonene in edible electrospun nanofibers. *Chemical Engineering Transactions*, *32*, 1771–1776. https://doi.org/10.3303/CET1332296

Ganiari, S., Choulitoudi, E., y Oreopoulou, V. (2017). Edible and active films and coatings as carriers of natural antioxidants for lipid food. *Trends in Food Science y Technology*, *68*, 70–82. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.009

García-Moreno, P. J., Mendes, A. C., Jacobsen, C., y Chronakis, I. S. (2018). *Biopolymers for the Nano-microencapsulation of Bioactive Ingredients by Electrohydrodynamic Processing BT - Polymers for Food Applications* (T. J. Gutiérrez, Ed.). https://doi.org/10.1007/978-3-319-94625-2_17

Georgala, D. L., y Davidson, C. M. (1970). Food package. *British Patent*, *1*, 199–998.

Ghorani, B., y Tucker, N. (2015). Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. *Food Hydrocolloids*, *51*, 227–240. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.05.024

Gill, A. O., y Gill, C. O. (2005). 13 - Preservative packaging for fresh meats, poultry, and fin fish. In J. H. B. T.-I. in F. P. Han (Ed.), *Food Science and Technology* (pp. 204–226). https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012311632-1/50045-0

Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., y Givskov, M. (2002). Food spoilage--interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *78*(1–2), 79–97. https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00233-7

Greer, G. G., Dilts, B. D., y Jeremiah, L. E. (1993). Bacteriology and Retail Case Life of Pork After Storage in Carbon Dioxide. *Journal of Food Protection*, *56*, 689–693. https://doi.org/10.4315/0362-028X-56.8.689

Greiner, A., y Wendorff, J. H. (2007). Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers. *Angewandte Chemie International Edition*, *46*(30), 5670–5703. https://doi.org/10.1002/anie.200604646

Gutiérrez, C., y Suárez, H. (2014). Antimicrobial activity of propolis and its effect on the physicochemical and sensoral characteristics in sausages. *Vitae*, *21*(2), 90–96.

Gutiérrez, T. J. (2017). Chitosan Applications for the Food Industry. In *Chitosan*. https://doi.org/10.1002/9781119364849.ch8

Han, J. H. (2005). 1 - New technologies in food packaging: Overiew. In J. H. B. T.-I. in F. P. Han (Ed.), *Food Science and Technology* (pp. 3–11). https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012311632-1/50033-4

Hayes, J. E., Stepanyan, V., Allen, P., O'Grady, M. N., y Kerry, J. P. (2011). Evaluation of the effects of selected plant-derived nutraceuticals on the quality and shelf-life stability of raw and cooked pork sausages. *LWT - Food Science and Technology*, *44*(1), 164–172. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.05.020

Higueras Contreras, L., López-Carballo, G., Gavara, R., y Hernández-Muñoz, P. (2014). Reversible Covalent Immobilization of Cinnamaldehyde on Chitosan Films via Schiff Base Formation and Their Application in Active Food Packaging. *Food and Bioprocess Technology*, *8*, 526–538. https://doi.org/10.1007/s11947-014-1421-8

Hildebrand, J. H., y Scott, R. L. (1950). *The solubility of nonelectrolytes,*. New York: Reinhold Pub. Corp.

Holley, R. A., Peirson, M. D., Lam, J., y Tan, K. B. (2004). Microbial profiles of commercial, vacuum-packaged, fresh pork of normal or short storage life. *International Journal of Food Microbiology*, *97*(1), 53–62. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.029

Homayoni, H., Ravandi, S. A. H., y Valizadeh, M. (2009). Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization. *Carbohydrate Polymers*, *77*(3), 656–661. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.02.008

Hong, S., y Kim, G. (2011). Fabrication of electrospun polycaprolactone biocomposites reinforced with chitosan for the proliferation of mesenchymal stem cells. *Carbohydrate Polymers*, *83*(2), 940–946. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.09.002

Hu, X., Liu, S., Zhou, G., Huang, Y., Xie, Z., y Jing, X. (2014). Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. *Journal of Controlled Release*, *185*, 12–21. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.018

Huang, L., Manickam, S. S., y McCutcheon, J. R. (2013). Increasing strength of electrospun nanofiber membranes for water filtration using solvent vapor. *Journal of Membrane Science*, *436*, 213–220. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.12.037

Huang, W., Xu, H., Xue, Y., Huang, R., Deng, H., y Pan, S. (2012). Layer-by-layer immobilization of lysozyme-chitosan-organic rectorite composites on electrospun nanofibrous mats for pork preservation. *Food Research International*, *48*(2), 784–791. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.06.026

Huang, Z. M., Zhang, Y. Z., Kotaki, M., y Ramakrishna, S. (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, *63*(15), 2223–2253. https://doi.org/10.1016/S0266-3538(03)00178-7

IFST, I. of F. S. and T. (1993). *Shelf life of foods : guidelines for its determination and prediction / Institute of Food Science y Technology (UK)*. ondon : Institute of Food Science y Technology (UK).

Ignatova, M., Manolova, N., Markova, N., y Rashkov, I. (2009). Electrospun non-woven nanofibrous hybrid mats based on chitosan and PLA for wound-dressing applications. *Macromolecular Bioscience*, *9*(1), 102–111. https://doi.org/10.1002/mabi.200800189

Immich, A. P. S., Arias, M. L., Carreras, N., Boemo, R. L., y Tornero, J. A. (2013). Drug delivery systems using sandwich configurations of electrospun poly(lactic acid) nanofiber membranes and ibuprofen. *Materials Science and Engineering: C*, *33*(7), 4002–4008. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.05.034

Jakobsen, M., y Bertelsen, G. (2000). Colour stability and lipid oxidation of fresh beef. Development of a response surface model for predicting the effects of temperature, storage time, and modified atmosphere composition. *Meat Science*, *54*(1), 49–57. https://doi.org/10.1016/s0309-1740(99)00069-8

Janmohammadi, M., y Nourbakhsh, M. S. (2019). Electrospun polycaprolactone scaffolds for tissue engineering: a review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, *68*(9), 527–539.

https://doi.org/10.1080/00914037.2018.1466139

Janz, J., Morel, P., Wilkinson, B., y Purchas, R. (2007). Preliminary investigation of the effects of low-level dietary inclusion of fragrant essential oils and oleoresin on pig performance and pork quality. *Meat Science*, *75*, 350–355. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.06.027

Jayasena, D. D., y Jo, C. (2013). Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science y Technology*, *34*(2), 96–108. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.09.002

Jayasingh, P., Cornforth, D. P., Brennand, C. P., Carpenter, C. E., y Whittier, D. R. (2002). Sensory Evaluation of Ground Beef Stored in High-oxygen Modified Atmosphere Packaging. *Journal of Food Science*, *67*(9), 3493–3496. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb09611.x

Jeremiah, L. E., y Gibson, L. L. (1997). The influence of controlled atmosphere storage on the flavor and texture profiles of display-ready pork cuts. *Food Research International*, *30*(2), 117–129. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0963-9969(97)00025-2

Joshi, M., y Adak, B. (2019). *5.10 - Advances in Nanotechnology Based Functional, Smart and Intelligent Textiles: A Review* (D. L. Andrews, R. H. Lipson, y T. B. T.-C. N. and N. (Second E. Nann, Eds.). https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.10471-0

Kalantari, K., Afifi, A. M., Jahangirian, H., y Webster, T. J. (2019). Biomedical applications of chitosan electrospun nanofibers as a green polymer – Review. *Carbohydrate Polymers*, *207*(October 2018), 588–600. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.011

Kerry, J. P., y Ledward, D. (2009). *Improving the sensory and nutritional quality of fresh meat*.

Kerry, J. P., O'Grady, M. N., y Hogan, S. A. (2006). Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Science*, *74*(1), 113–130. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.04.024

Kim, J. I., Pant, H. R., Sim, H. J., Lee, K. M., y Kim, C. S. (2014). Electrospun propolis/polyurethane composite nanofibers for biomedical applications. *Materials*

Science and Engineering C, *44*, 52–57. https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.07.062

Koutsoumanis, K., Stamatiou, A., Skandamis, P., y Nychas, G.-J. E. (2006). Development of a Microbial Model for the Combined Effect of Temperature and pH on Spoilage of Ground Meat, and Validation of the Model under Dynamic Temperature Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(1), 124 LP – 134. https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.124-134.2006

Lambert, A. D., Smith, J. P., y Dodds, K. L. (1991). Shelf life extension and microbiological safety of fresh meat — a review. *Food Microbiology*, *8*(4), 267–297. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0740-0020(05)80002-4

Lambropoulou, K. A., Drosinos, E. H., y Nychas, G. J. (1996). The effect of glucose supplementation on the spoilage microflora and chemical composition of minced beef stored aerobically or under a modified atmosphere at 4 degrees C. *International Journal of Food Microbiology*, *30*(3), 281–291. https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)00954-3

Lanari, M., y Cassens, R. G. (1991). Mitochondrial Activity and Beef Muscle Color Stability. *Journal of Food Science*, *56*, 1476–1479. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb08619.x

Lee, S., Joo, S. T., Alderton, A. L., Hill, D. W., y Faustman, C. (2003). Oxymyoglobin and Lipid Oxidation in Yellowfin Tuna (Thunnus albacares) Loins. *Journal of Food Science*, *68*(5), 1664–1668. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb12310.x

Li, L., Guo, N., Zhang, X., Ou, W., Yang, S., Su, X., y Feng, Y. (2018). Reversible stability of emulsion and polymer latex controlled by oligochitosan and CO 2. *Polymers*, *10*(12). https://doi.org/10.3390/polym10121352

Li, Y., Yin, X., Yu, J., y Ding, B. (2019). Electrospun nanofibers for high-performance air filtration. *Composites Communications*, *15*, 6–19. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coco.2019.06.003

Lim, L. T. (2015). Encapsulation of bioactive compounds using electrospinning and electrospraying technologies. *Nanotechnology and Functional Foods: Effective Delivery of Bioactive Ingredients*, 297–317. https://doi.org/10.1002/9781118462157.ch18

Lim, L. T., Mendes, A. C., y Chronakis, I. S. (2019). Electrospinning and electrospraying

technologies for food applications. In *Advances in Food and Nutrition Research* (1st ed., Vol. 88). https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.005

Lin, K. W., y Chuang, C. H. (2001). Effectiveness of Dipping with Phosphate, Lactate and Acetic Acid Solutions on the Quality and Shelf-life of Pork Loin Chop. *Journal of Food Science*, *66*(3), 494–499. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb16138.x

Lopez-Rubio, A., Gavara, R., y Lagaron, J. M. (2006). Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials. *Trends in Food Science y Technology*, *17*(10), 567–575. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.04.012

Lu, J.-W., Zhu, Y.-L., Guo, Z.-X., Hu, P., y Yu, J. (2006). Electrospinning of sodium alginate with poly(ethylene oxide). *Polymer*, *47*(23), 8026–8031. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polymer.2006.09.027

Luciani, A., Coccoli, V., Orsi, S., Ambrosio, L., y Netti, P. A. (2008). PCL microspheres based functional scaffolds by bottom-up approach with predefined microstructural properties and release profiles. *Biomaterials*, *29*(36), 4800–4807. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.09.007

Luis-Villaroya, A., Espina, L., Garcia-Gonzalo, D., Bayarri, S., Perez, C., y Pagan, R. (2015). Bioactive properties of a propolis-based dietary supplement and its use in combination with mild heat for apple juice preservation. *International Journal of Food Microbiology*, *205*, 90–97. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.020

Lund, M., Lametsch, R., Hviid, M., Jensen, O., y Skibsted, L. (2007). High-oxygen packaging atmosphere influences protein oxidation and tenderness of porcine Longissimus dorsi during chill storage. *Meat Science*, *77*, 295–303. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.03.016

Luño, M., Roncalés, P., Djenane, D., y Beltrán, J. A. (2000). Beef shelf life in low O2 and high CO2 atmospheres containing different low CO concentrations. *Meat Science*, *55*(4), 413–419. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00170-9

Madhaiyan, K., Sridhar, R., Sundarrajan, S., Venugopal, J. R., y Ramakrishna, S. (2013). Vitamin B12 loaded polycaprolactone nanofibers: A novel transdermal route for the water soluble energy supplement delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, *444*(1–2), 70–76. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.01.040

Mallakpour, S., y Nouruzi, N. (2016). Effect of modified ZnO nanoparticles with biosafe molecule on the morphology and physiochemical properties of novel polycaprolactone nanocomposites. *Polymer*, *89*. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2016.02.038

Mancini, R. A., Hunt, M. C., y Kropf, D. (2003). Reflectance at 610 nanometers estimates oxymyoglobin content on the surface of ground beef. *Meat Science*, *64*, 157–162. https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00174-2

Martínez-Abad, A., Ocio, M. J., y Lagaron, J. M. (2014). Morphology, physical properties, silver release, and antimicrobial capacity of ionic silver-loaded poly(l-lactide) films of interest in food-coating applications. *Journal of Applied Polymer Science*, *131*(21). https://doi.org/10.1002/app.41001

Martínez, L., Cilla, I., Antonio Beltrán, J., y Roncalés, P. (2006). Effect of Capsicum annuum (Red Sweet and Cayenne) and Piper nigrum (Black and White) Pepper Powders on the Shelf Life of Fresh Pork Sausages Packaged in Modified Atmosphere. *Journal of Food Science*, *71*(1), S48–S53. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb12405.x

Martinez, L., Cilla, I., Beltran, J. A., y Roncales, P. (2006). Combined effect of modified atmosphere packaging and addition of rosemary (Rosmarinus officinalis), ascorbic acid, red beet root (Beta vulgaris), and sodium lactate and their mixtures on the stability of fresh pork sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(13), 4674–4680. https://doi.org/10.1021/jf060060+

Mascheroni, E., Guillard, V., Nalin, F., Mora, L., y Piergiovanni, L. (2010). Diffusivity of propolis compounds in Polylactic acid polymer for the development of anti-microbial packaging films. *Journal of Food Engineering*, *98*(3), 294–301. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.12.028

Mastromatteo, M., Mastromatteo, M., Conte, A., y Nobile, M. (2010). Advances in controlled release devices for food packaging applications. *Trends in Food Science y Technology*, *21*, 591–598. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.07.010

Mc Carthy, T. L., Kerry, J. P., Kerry, J. F., Lynch, P. B., y Buckley, D. J. (2001). Assessment of the antioxidant potential of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties. *Meat Science*, *57*(2), 177–184. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00090-5

McMillin, K. W. (2008). Where is MAP Going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. *Meat Science*, *80*(1), 43–65. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.05.028

McMillin, K. W. (2017). Advancements in meat packaging. *Meat Science*, *132*(February), 153–162. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.04.015

Mendes, A. C., Gorzelanny, C., Halter, N., Schneider, S. W., y Chronakis, I. S. (2016). Hybrid electrospun chitosan-phospholipids nanofibers for transdermal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, *510*(1), 48–56. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.06.016

Mendes, A. C., Stephansen, K., y Chronakis, I. S. (2017a). Electrospinning of food proteins and polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, *68*, 53–68. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.022

Mendes, A. C., Stephansen, K., y Chronakis, I. S. (2017b). Electrospinning of food proteins and polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, *68*, 53–68. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.022

Min, B., y Ahn, D. U. (2005). Mechanism of lipid peroxidation in meat and meat products - A review. *Food Sci. Biotechnol*, *14*, 152–163.

Mohamed, R. M., y Yusoh, K. (2015). A Review on the Recent Research of Polycaprolactone (PCL). *Advanced Materials Research*, *1134*, 249–255. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.1134.249

Mohammad El-Aidie, S. A.-A. (2018). a Review on Chitosan: Ecofriendly Multiple Potential Applications in the Food Industry. *International Journal of Advancement in Life Sciences Research*, *1*(1), 1–14. https://doi.org/10.31632/ijalsr.2018v01i01.001

Moss, B. W. (1992). Lean meat, animal welfare and meat quality. *The Chemistry of Muscle Based Foods (Eds D.A. Ledward, D.E. Johnston y M.K. Knight)*, *The Royal*, 62–76.

Murray, E., Thompson, B. C., Sayyar, S., y Wallace, G. G. (2015). Enzymatic degradation of graphene/polycaprolactone materials for tissue engineering. *Polymer Degradation and Stability*, *111*, 71–77. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2014.10.010

Nattress, F. M., y Jeremiah, L. E. (2000). Bacterial mediated off-flavors in retail-ready beef

after storage in controlled atmospheres. *Food Research International*, *33*, 743–748. https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00064-8

Nazir, A., Khenoussi, N., Schacher, L., Hussain, T., Adolphe, D., y Hekmati, A. H. (2015). Using the Taguchi method to investigate the effect of different parameters on mean diameter and variation in PA-6 nanofibres produced by needleless electrospinning. *RSC Advances*, *5*(94), 76892–76897. https://doi.org/10.1039/C5RA13649K

Neo, Y. P., Swift, S., Ray, S., Gizdavic-Nikolaidis, M., Jin, J., y Perera, C. O. (2013). Evaluation of gallic acid loaded zein sub-micron electrospun fibre mats as novel active packaging materials. *Food Chemistry*, *141*(3), 3192–3200. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.018

No, H. K., Meyers, S. P., Prinyawiwatkul, W., y Xu, Z. (2007). Applications of Chitosan for Improvement of Quality and Shelf Life of Foods: A Review. *Journal of Food Science*, *72*(5), R87–R100. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00383.x

Nollet, L. (2012). *Handbook of Meat, Poultry and Seafood Quality* (Second Edi; Wiley-Blackwell, Ed.). Ghent, Belgium.

Noruzi, M. (2016). Electrospun nanofibres in agriculture and the food industry: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *96*(14), 4663–4678. https://doi.org/10.1002/jsfa.7737

NPD. (2003). National eating trends in-home/away from home combined; 2001/2002. Retrieved from www.porkfoodservice.com/documents/RAC-MEAL USAGE 2003.PPT

O'Grady, M. N., Maher, M., Troy, D. J., Moloney, A. P., y Kerry, J. P. (2006). An assessment of dietary supplementation with tea catechins and rosemary extract on the quality of fresh beef. *Meat Science*, *73*(1), 132–143. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.11.008

O'Sullivan, M., Byrne, D. V, Martens, H., y Martens, M. (2007). Data analytical methodologies in the development of a vocabulary for evaluation of meat quality. *Journal of Sensory Studies*, *17*, 539–558. https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.2002.tb00364.x

Ohkawa, K., Cha, D., Kim, H., Nishida, A., y Yamamoto, H. (2004). Electrospinning of Chitosan. *Macromolecular Rapid Communications*, *25*, 1600–1605.

https://doi.org/10.1002/marc.200400253

Osborn, H. M., Brown, H., Adams, J. B., y Ledward, D. A. (2003). High temperature reduction of metmyoglobin in aqueous muscle extracts. *Meat Science*, *65*(1), 631–637. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00258-9

Ozdemir, M., y Floros, J. D. (2004). Active food packaging technologies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *44*(3), 185–193. https://doi.org/10.1080/10408690490441578

Pakravan, M., Heuzey, M. C., y Ajji, A. (2011). A fundamental study of chitosan/PEO electrospinning. *Polymer*, *52*(21), 4813–4824. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2011.08.034

Parry, R. . (1993). *Principles and Applications of Modified Atmosphere Packaging of Foods*. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2137-2

Pérez-Alvarez, J. . (1996). *Contribución al estudio objetivo del color en productos cárnicos crudo-curados.* Universidad Politécnica de Valencia.

Piedrahíta, D. G., Fuenmayor, C. A., y Suárez, H. (2019). Effect of chitosan-propolis edible coatings on stability of refrigerated cachama (Piaractus brachypomus) vacuum-packed fish fillets. *Packaging Technology and Science*, *32*(3), 143–153. https://doi.org/10.1002/pts.2422

Pobiega, K., Kraśniewska, K., y Gniewosz, M. (2019a). Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality – A review. *Trends in Food Science and Technology*, *83*(October 2018), 53–62. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.007

Pobiega, K., Kraśniewska, K., y Gniewosz, M. (2019b). Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality – A review. *Trends in Food Science and Technology*, *83*(November 2018), 53–62. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.007

Qian, Y., Zhang, Z., Zheng, L., Song, R., y Zhao, Y. (2014). Fabrication and characterization of electrospun polycaprolactone blended with chitosan-gelatin complex nanofibrous mats. *Journal of Nanomaterials*, *2014*. https://doi.org/10.1155/2014/964621

Quintavalla, S., y Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat*

Science, *62*(3), 373–380. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00121-3

Ray, B. (2001). *Fundamental Food Microbiology* (2nd edn). CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.

Realini, C. E., y Marcos, B. (2014). Active and intelligent packaging systems for a modern society. *Meat Science*, *98*(3), 404–419. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.06.031

Reneker, D. H., y Yarin, A. L. (2008). Electrospinning jets and polymer nanofibers. *Polymer*, *49*(10), 2387–2425. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.02.002

Reneker, D. H., Yarin, A. L., Fong, H., y Koombhongse, S. (2000). Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. *Journal of Applied Physics*, *87*(9), 4531–4547. https://doi.org/10.1063/1.373532

Renerre, M. (1990). Factors involved in the discoloration of beef meat. *International Journal of Food Science y Technology*, *25*(6), 613–630. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1990.tb01123.x

Reyes, P., Jeiner, J., Rodríguez, P., y Totosaus, A. (2020). *RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE MIOGLOBINA Y OXIMIOGLOBINA CON EL COLOR DE CARNE FRESCA DE RES Y POLLO*.

Rezaei, A., Nasirpour, A., y Fathi, M. (2015). Application of Cellulosic Nanofibers in Food Science Using Electrospinning and Its Potential Risk. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *14*(3), 269–284. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12128

Rutledge, G. C., y Fridrikh, S. V. (2007). Formation of fibers by electrospinning. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *59*(14), 1384–1391. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.04.020

Samelis, J., Kakouri, A. y Rementzis, J. (2000). Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. *Food Microbiology*, *17*, 329–340.

Sanches-Silva, A., Costa, D., Albuquerque, T. G., Buonocore, G. G., Ramos, F., Castilho, M. C., … Costa, H. S. (2014). Trends in the use of natural antioxidants in active food packaging: a review. *Food Additives y Contaminants: Part A*, *31*(3), 374–395. https://doi.org/10.1080/19440049.2013.879215

Sánchez, Á. P., Vera, R., Muñoz, E. de J., Gómez, E., Bernad, M. J., Maciel, A., y Mu. (2016). Preparación y caracterización de membranas poliméricas electrohiladas de policaprolactona y quitosano para la liberación controlada de clorhidrato de tiamina. *Ciencia En Desarrollo*, *7*(2), 133. https://doi.org/10.19053/01217488.v7.n2.2016.4818

Schiffman, J. D., y Schauer, C. L. (2008). A Review: Electrospinning of Biopolymer Nanofibers and their Applications. *Polymer Reviews*, *48*(2), 317–352. https://doi.org/10.1080/15583720802022182

Senthil Muthu Kumar, T., Senthil Kumar, K., Rajini, N., Siengchin, S., Ayrilmis, N., y Varada Rajulu, A. (2019). A comprehensive review of electrospun nanofibers: Food and packaging perspective. *Composites Part B: Engineering*, *175*(July), 107074. https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2019.107074

Shahidi, F., Arachchi, J. K. V., y Jeon, Y. J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science and Technology*, *10*(2), 37–51. https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00017-5

Shao, S., Li, L., Yang, G., Li, J., Luo, C., Gong, T., y Zhou, S. (2011). Controlled green tea polyphenols release from electrospun PCL/MWCNTs composite nanofibers. *International Journal of Pharmaceutics*, *421*(2), 310–320. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.09.033

Sheard, P. R., Enser, M., Wood, J. D., Nute, G. R., Gill, B. P., y Richardson, R. I. (2000). Shelf life and quality of pork and pork products with raised n-3 PUFA. *Meat Science*, *55*(2), 213–221. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00145-X

Shrestha, S., y Min, Z. (2006). Effect of lactic acid pretreatment on the quality of fresh pork packed in modified atmosphere. *Journal of Food Engineering*, *72*(3), 254–260. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.12.004

Silici, S., y Karaman, K. (2014). Inhibitory Effect of Propolis on Patulin Production of Penicillium expansum in Apple Juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, *38*(3), 1129–1134. https://doi.org/10.1111/jfpp.12072

Silici, S., y Kutluca, S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*, *99*(1), 69–73.

https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.046

Siripatrawan, U., y Vitchayakitti, W. (2016). Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. *Food Hydrocolloids*, *61*, 695–702. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.001

Siripatrawan, U., Vitchayakitti, W., y Sanguandeekul, R. (2013). Antioxidant and antimicrobial properties of Thai propolis extracted using ethanol aqueous solution. *International Journal of Food Science y Technology*, *48*(1), 22–27. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03152.x

Sorheim, O., Nissen, H., y Nesbakken, T. (1999). The storage life of beef and pork packaged in an atmosphere with low carbon monoxide and high carbon dioxide. *Meat Science*, *52*(2), 157–164. https://doi.org/10.1016/s0309-1740(98)00163-6

Steyaert, I., Van Der Schueren, L., Rahier, H., y De Clerck, K. (2012). An alternative solvent system for blend electrospinning of polycaprolactone/chitosan nanofibres. *Macromolecular Symposia*, *321–322*(1), 71–75. https://doi.org/10.1002/masy.201251111

Stolzenbach, S., Leisner, J., y Byrne, D. (2009). Sensory shelf life determination of a processed meat product 'rullepøse' and microbial metabolites as potential indicators. *Meat Science*, *83*, 285–292. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.05.011

Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., y Bigger, S. W. (2003). Active Packaging Technologies with an Emphasis on Antimicrobial Packaging and its Applications. *Journal of Food Science*, *68*(2), 408–420. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05687.x

Sutjarittangtham, K., Sanpa, S., Tunkasiri, T., Rachtanapun, P., Chantawannakul, P., Intatha, U., … Eitssayeam, S. (2012). Preparation of polycaprolactone/ethanolic extract propolis nanofibers films. *Advanced Materials Research*, *506*, 226–229. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.506.226

Sutjarittangtham, Krit, Sanpa, S., Tunkasiri, T., Chantawannakul, P., Intatha, U., y Eitssayeam, S. (2014). Bactericidal effects of propolis/polylactic acid (PLA) nanofibres obtained via electrospinning. *Journal of Apicultural Research*, *53*(1), 109–115. https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.1.11

Tan, W., y Shelef, L. A. (2002). Effects of sodium chloride and lactates on chemical and

microbiological changes in refrigerated and frozen fresh ground pork. *Meat Science*, *62*, 27–32. https://doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00223-6

Taylor, G. I., y Van Dyke, M. D. (1969). Electrically driven jets. *Proceedings of the Royal Society of London. A. Mathematical and Physical Sciences*, *313*(1515), 453–475. https://doi.org/10.1098/rspa.1969.0205

Temtem, M., Casimiro, T., Mano, J. F., y Aguiar-Ricardo, A. (2008). Preparation of membranes with polysulfone/polycaprolactone blends using a high pressure cell specially designed for a CO2-assisted phase inversion. *The Journal of Supercritical Fluids*, *43*(3), 542–548. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.supflu.2007.07.012

Tian, J., Deng, H., Huang, M., Liu, R., Yi, Y., y Dong, X. (2019). Electrospun Nanofibers for Food and Food Packaging Technology. In *Electrospinning: Nanofabrication and Applications*. https://doi.org/10.1016/b978-0-323-51270-1.00015-7

Torres-Giner, S. (2011). Multifunctional and Nanoreinforced Polymers for Food Packaging. *Multifunctional and Nanoreinforced Polymers for Food Packaging*, 108–125. https://doi.org/10.1533/9780857092786.1.108

USDA-FSIS. (2000). HACCP implementation: First year Salmonella test results. U.S. Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service.

Vega-Lugo, A. C., y Lim, L. T. (2009). Controlled release of allyl isothiocyanate using soy protein and poly(lactic acid) electrospun fibers. *Food Research International*, *42*(8), 933–940. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.05.005

Vega, A.-C., y Lim, L.-T. (2012). Effects of poly(ethylene oxide) and pH on the electrospinning of whey protein isolate. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, *50*(16), 1188–1197. https://doi.org/10.1002/polb.23106

Vermeiren, L., Devlieghere, F., Beest, M., Kruijf, N., y Debever, J. (2000). Developments in the active packaging of foods. *J. Food Technol.*, *5*, 6–13.

Vickers, T. (2007). Radical chain reaction mechanism of lipid peroxidation. Retrieved from https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lipid_peroxidation-es.svg

Viera, V. B., Piovesan, N., Moro, K. I. B., Rodrigues, A. S., Scapin, G., Rosa, C. S. da, y Kubota, E. H. (2016). Preparation and microbiological analysis of Tuscan sausage with added propolis extract. *Food Science and Technology*, *36*, 37–41. Retrieved from

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttextypid=S0101-20612016000500037ynrm=iso

von Burkersroda, F., Schedl, L., y Gopferich, A. (2002). Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials*, *23*(21), 4221–4231. https://doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00170-9

Wang, S., Marcone, M. F., Barbut, S., y Lim, L.-T. (2013). Electrospun soy protein isolate-based fiber fortified with anthocyanin-rich red raspberry (Rubus strigosus) extracts. *Food Research International*, *52*(2), 467–472. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.036

Wen, P., Zhu, D.-H., Feng, K., Liu, F.-J., Lou, W.-Y., Li, N., … Wu, H. (2016). Fabrication of electrospun polylactic acid nanofilm incorporating cinnamon essential oil/β-cyclodextrin inclusion complex for antimicrobial packaging. *Food Chemistry*, *196*, 996–1004. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.043

Woodruff, M. A., y Hutmacher, D. W. (2010). The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, *35*(10), 1217–1256. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002

Wu, J., y Yin, F. (2013). Sensitive enzymatic glucose biosensor fabricated by electrospinning composite nanofibers and electrodepositing Prussian blue film. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, *694*, 1–5. https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2013.02.003

Wu, T., Ding, M., Shi, C., Qiao, Y., Wang, P., Qiao, R., … Zhong, J. (2019). Resorbable polymer electrospun nanofibers: History, shapes and application for tissue engineering. *Chinese Chemical Letters*. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cclet.2019.07.033

Xia, X., Kong, B., Xiong, Y. L., y Meng, X. (2007). *Extending the Shelf-Life of Chilled Pork By Combination of Chitosan Coating With Spice Extracts*. 7–8.

Xiao, J., Shi, C., Zheng, H., Shi, Z., Jiang, D., Li, Y., y Huang, Q. (2016). Kafirin Protein Based Electrospun Fibers with Tunable Mechanical Property, Wettability, and Release Profile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(16), 3226–3233. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00388

Xiao, Q., y Lim, L. T. (2018). Pullulan-alginate fibers produced using free surface electrospinning. *International Journal of Biological Macromolecules*, *112*, 809–817.

https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.005

Zabaiou, N., Fouache, A., Trousson, A., Baron, S., Zellagui, A., Lahouel, M., y Lobaccaro, J.-M. A. (2017). Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. *Chemistry and Physics of Lipids*, *207*(Pt B), 214–222. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.04.005

Zahid, N., Ali, A., Siddiqui, Y., y Maqbool, M. (2013). Efficacy of ethanolic extract of propolis in maintaining postharvest quality of dragon fruit during storage. *Postharvest Biology and Technology*, *79*, 69–72. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.01.003

Zakrys, P. I., O'Sullivan, M. G., Allen, P., y Kerry, J. P. (2009). Consumer acceptability and physiochemical characteristics of modified atmosphere packed beef steaks. *Meat Science*, *81*(4), 720–725. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.10.024

Zdraveva, E., Fang, J., Mijovic, B., y Lin, T. (2016). Electrospun nanofibers. In *Structure and Properties of High-Performance Fibers*. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100550-7.00011-5

Zein, I., Hutmacher, D. W., Tan, K. C., y Teoh, S. H. (2002). Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials*, *23*(4), 1169–1185. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00232-0

Zhao, L.-M., Shi, L.-E., Zhang, Z.-L., Chen, J.-M., Shi, D.-D., Yang, J., y Tang, Z.-X. (2011). Preparation and application of chitosan nanoparticles and nanofibers. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, *28*, 353–362. Retrieved from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttextypid=S0104-66322011000300001ynrm=iso

Zhou, F.-L., Gong, R.-H., y Porat, I. (2009). Mass production of nanofibre assemblies by electrostatic spinning. *Polymer International*, *58*(4), 331–342. https://doi.org/10.1002/pi.2521

2. Desarrollo de un empaque alimenticio activo que contiene nanofibras electrohiladas de policaprolactona, quitosano y extractos oleosos de propóleos colombianos.

2.1. Resumen

Un nuevo empaque activo fue desarrollado a base de nanofibras de policaprolactona, quitosano y extractos oleosos de propóleos colombianos. Los extractos oleosos de propóleos colombianos (**EOP**) y las soluciones de electrohilado se estudiaron para producir nanofibras a gran escala con propiedades antioxidantes y antimicrobianas mediante el uso de una técnica de electrohilado de superficie libre. Los extractos de propóleos colombianos mantuvieron un buen contenido de compuestos fenólicos totales con 1186 ± 52 µmol/g EOP de radical ABTS como indicador de actividad antioxidante, además mostraron un efecto bactericida significativo contra bacterias Gram-positivas y un efecto moderado para las bacterias Gram-negativas con una concentración mínima inhibitoria de 0.15 mg / ml y ≥ 10 mg / ml respectivamente. La caracterización de los parámetros de viscosidad, conductividad y tensión superficial de las soluciones de policaprolactona (**PCL**)/quitosano (**CH**) con adiciones de 5, 10, 20 y 30% de EOP, demostró que la adición de EOP en la solución disminuyó la tensión superficial, conductividad y la viscosidad (P <0,001), lo que resulta en la mejora del electrohilado de las soluciones de PCL/CH. Finalmente, las soluciones se electrohilaron sobre una película comercial de polietileno lineal de baja densidad donde las nanofibras desarrolladas con 5% de EOP fueron suaves, con pocos defectos y un diámetro de 111.84 ± 61 nm, además, mostraron una alta eficiencia de encapsulación de EOP el cual incrementó los efectos antimicrobianos de las nanofibras de PCL/CH.

Palabras claves: Bioempaques, Nanofibras electrohiladas, alimentos, antimicrobianos.

2.2. Abstract

A novel food packaging was development based on nanofibers of polycaprolactone, chitosan and extracts of Colombian propolis. The Colombian propolis extracts (**PE**) and the electrospinning solutions were studied to produce large-scale nanofibers with antioxidant and antimicrobials properties by using a free surface electrospinning technique. The Colombian propolis extracts kept a good content of total phenolic compounds with 1186 ± 52 µmol/g ABTS radicals as indicators the antioxidant activity, besides showed a significant bactericidal effect for Gram-positive bacteria and a moderate effect for Gram- negative bacteria with a minimum inhibitory concentration of 0.15 mg/ml and ≥ 10 mg/ml respectively. The characterization of the parameters of viscosity, conductivity and surface tension of polycaprolactone (**PCL**)/ chitosan (**CH**) solutions with additions of 5, 10, 20, and 30% of **PE**, proved that the addition of PE in the solution decreased the surface tension, conductivity and the viscosity*(P* < 0,001), resulting in improving the electrospinning of the PCL/CH solutions. Finally, the solutions were electrospun on a commercial Linear low-density polyethylene film where the nanofibers development with 5% of PE were smooth, with few defects, and a diameter of 111.84 ± 61 nm, besides, showed a high efficiency of encapsulation of PE that increasing the antimicrobial effects of the PCL/CH nanofibers.

Keywords: Active food packaging, electrospun nanofibers, bioactives, electrospinning

2.3. Introducción

Los sistemas de envasado activo, a diferencia de los sistemas de envasado pasivo, no solo restringen el intercambio de gases (es decir, O2, CO2), vapor de agua y compuestos aromáticos entre los alimentos y el ambiente exterior; también proporcionan protección antimicrobiana o antioxidante mediante la incorporación de sustancias activas. Estas sustancias se pueden liberar lentamente en los alimentos para evitar el crecimiento microbiano, la oxidación y otras reacciones de degradación, lo que permite preservar la calidad del producto y extender su vida útil (Arkoun et al., 2018).

Uno de los métodos más eficientes para producir nanofibras es la técnica de electrohilado (Li y Xia, 2004) que consiste en someter una solución polimérica a un campo eléctrico que permite expulsar un chorro del polímero a medida que el solvente se evapora creando fibras continuas no tejidas recogidas en un sustrato (Xiao y Lim, 2018). Estas fibras electrohiladas han sido una forma innovadora de desarrollar sistemas de envasado activos eficientes debido a su capacidad de cargar altas concentraciones de mezclas de materiales naturales y sintéticos con compuestos bioactivos que se pueden liberar controladamente (Sarhan y Azzazy, 2015). Los sistemas de envasado activo basados en fibras electrohiladas tienen efectos únicos y características mejoradas en comparación con los empaques activos tradicionales, como la morfología controlable, la alta porosidad, la alta eficiencia de encapsulación, la estabilidad térmica y la liberación controlada de sustancias bioactivas a través de una gran área de superficie que aumenta sus efectos (Anu Bhushani y Anandharamakrishnan, 2014; Augustin y Hemar, 2009). Para que este proceso sea posible, la solución de electrohilado debe poseer parámetros óptimos, tales como conductividad eléctrica, tensión superficial y viscosidad (Vega y Lim, 2012).

Para aumentar la producción de nanofibras, se han desarrollado diferentes tecnologías, como el electrohilado de superficie libre. El electrohilado de superficie libre puede producir fibras ultrafinas a gran escala debido a un mayor rendimiento de producción y una arquitectura más simple en comparación con el electrohilado convencional (Nazir et al., 2015; Q. Xiao y Lim, 2018).

La policaprolactona (PCL) es un poliéster alifático biodegradable, ampliamente utilizado como vehículo para la encapsulación y liberación de ingredientes funcionales (Tian et al., 2019). Por ejemplo, se ha demostrado que las nanofibras de PCL incorporan vitamina B12 utilizadas como suplemento energético (Madhaiyan, Sridhar, Sundarrajan, Venugopal, y Ramakrishna, 2013). Otras sustancias funcionales como el ácido carnósico y los polifenoles obtenidos del té verde se han incorporado en nanofibras de PCL para sistemas de liberación controlada (Shao et al., 2011; J. Xiao et al., 2016). Además, se ha informado que nanofibras de PCL con cloruro de plata inhiben el crecimiento de *S. aureus* y *E. coli* O157: H7,

principales bacterias patógenas en los alimentos (Cerkez, Sezer, y Bhullar, 2017). Sin embargo, la aplicación de PCL en los sistemas alimentarios rara vez se ha explorado.

El quitosano (CH) es un polisacárido catiónico alcalino que ha sido ampliamente investigado en la industria alimentaria debido a su capacidad de formación de película, biodegradabilidad y actividad antimicrobiana (Tian et al., 2019). Sin embargo, su naturaleza catiónica da como resultado una baja capacidad de electrohilado (Homayoni, Ravandi, y Valizadeh, 2009), por lo tanto, el uso de solventes tóxicos (Homayoni et al., 2009; Steyaert, Van Der Schueren, Rahier, y De Clerck, 2012; Su et al., 2011) o la mezclas de polímeros, que permiten la aplicación de solventes más biocompatibles, son comunes en el electrohilado de CH (Liao et al., 2011; Qian et al., 2014).

Los propóleos son una sustancia natural recolectada y procesada por las abejas melíferas y compuesta de una mezcla de resinas, gomas y bálsamos (Ghisalberti, 1979). Su composición química es variable y depende del origen botánico, el área geográfica, el clima y las condiciones ambientales (López, Schmidt, Eberlin, y Sawaya, 2014; Sawaya, Barbosa da Silva Cunha, y Marcucci, 2011). El potencial de los extractos de propóleos como conservante natural en los alimentos ha sido reportado en diferentes estudios. Por ejemplo, los extractos etanólicos de propóleos colombianos se han utilizado como aditivo antioxidante en salchichas (Gutiérrez y Suárez, 2014). Además mezclas de CH y estos extractos utilizados como recubrimientos han demostrado aumentar la vida útil de los productos alimenticios, como en el caso de Barrera, Gil, Restrepo, Mosquera, y Durango, (2015) que mostraron propiedades antimicóticas y antimicrobianas de estos recubrimientos en papayas, también Piedrahíta, Fuenmayor y Suárez, (2019) demostraron que estos recubrimientos pueden aumentar la vida útil de los filetes del pescado cachama envasados al vacío. Sin embargo, la inclusión de extractos de propóleos en los alimentos se ha visto fuertemente obstaculizada por su fuerte olor y sabor residual, que reducen la evaluación organoléptica de los productos (Pobiega, Kraśniewska, y Gniewosz, 2019). Por lo tanto, se han aplicado diversas estrategias, como la encapsulación, el uso de bajas concentraciones ($\leq$ 0.5%) y la inclusión en películas y recubrimientos comestibles para compensar las

desventajas del propóleo (Jonaidi Jafari, Kargozari, Ranjbar, Rostami, y Hamedi, 2018; Reis et al., 2017; Shavisi, Khanjari, Basti, Misaghi, y Shahbazi, 2017).

Con el fin de facilitar la capacidad de electrohilado y las propiedades mecánicas del CH usando solventes adecuados para alimentos, se desarrollaron y caracterizaron soluciones de una mezcla de PCL, CH y EOP para ser electrohiladas. Además, este estudio tuvo el objetivo de elaborar un sistema de envasado activo que utiliza nanofibras electrohiladas en forma de recubrimientos que permiten la encapsulación de EOP, como bioactivo previamente caracterizado en base a su actividad antioxidante y antimicrobiana.

2.4. Materiales y métodos

2.4.1. Extracción y caracterización de los propóleos

2.4.1.1. Obtención de los extractos oleosos de propóleos (EOP):

Para la extracción de los EOP fueron pesados 60g de propóleos crudos provenientes del municipio de Oiba, departamento de Santander, Colombia. Se mezclaron con 600 ml de una solución de éter/ etanol (60:40), fueron colocados en baño de ultrasonido durante 1 hora y centrifugados a 10 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante fue filtrado al vacío con papel filtro Whatman #1, el extracto se dejó en reposo durante 2 horas en refrigeración (4ºC), seguido de una segunda centrifugación (10rpm/ 5min); finalmente el extracto fue rotaevaporado a 60ºC utilizando un rotaevaporador (IKA, RV 10 digital V, CDMX, México).
El rendimiento de extracción fue calculado acorde a la ecuación (**1**);

Ec. (1). Rendimiento (%) = $\frac{We}{Wr}$ X 100

Donde We es el peso (g) del extracto y Wr es el peso (g) de los propóleos crudos.

2.4.1.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos oleosos de propóleos (EOP)

La concentración mínima inhibitoria de los extractos oleosos de propóleos (EOP) se realizó por medio de la técnica de microdilución descrita por (Bonou et al., 2016). Brevemente, 317 µl de los extractos de propóleos se disolvieron en 3664 µl de caldo Mueller Hinton y 16 µl de tween 80 para alcanzar una concentración final de 80 mg/ml. Microplacas de 96 pozos se usaron para la determinación visual del crecimiento microbiano, diluciones sucesivas de 2 fueron realizadas con la solución stock y posteriormente fueron inoculadas con 10_6 UFC de bacteria. Se realizó un control positivo (bacteria + medio) y un control negativo (EOP + medio). El microplato fue cubierto e incubado a 37ºC por 24 horas. Las cepas bacterianas utilizadas fueron microorganismos de control de calidad *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* ATCC 13076 (Thermo Scientific™ Culti-Loops, ™ MA, USA), siguiendo la Norma ISO 20776-1(ISO, 2006)

2.4.1.3. Determinación de fenoles totales de los EOP

El contenido total de fenoles de los extractos de propóleos fue determinado según el método descrito por Folin-Ciocalteau (Singleton, Orthofer, y Lamuela-Raventós, 1999) y adaptada por (Siripatrawan y Vitchayakitti, 2016). En resumen, 0.1 ml del extracto se disolvió en 9,9 ml de etanol al 96%, posteriormente, 0.1ml de la solución se agregó a 7 ml de agua milli-Q y 0.5 ml de reactivo Folin- Ciocatleau, luego de 2 minutos, 1.5 ml de carbonato de sodio al 20% y 0.9 ml de agua milli-Q fue adicionado y homogenizado. La reacción fue leída a 765 nm usando un espectrofotómetro (Evolution 60s, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) 2 horas después.

El contenido total de fenoles en los extractos fue expresado como equivalente de ácido gálico (mg ácido gálico (GAE)/g extracto), se calculó usando una regresión lineal obtenida de la curva de calibración de ácido gálico y siguiendo la siguiente ecuación (**2**):

Ec (2). F= fV/m

Donde F: contenido de fenoles totales (mg de GAE/g de muestra), f: concentración de ácido gálico (mg/ml) establecido en la curva de calibración, V: volumen final del extracto y m: peso del extracto.

2.4.1.4. Determinación de la actividad antioxidante de los extractos oleosos de propóleos por el método de TEAC (decoloración del catión radical ABTS)

1.1.1 Para la determinación de la actividad antioxidante se siguió el método descrito por (Moon y Shibamoto, 2009). Una solución stock de 38.41 mg de sal diamonio de ABTS (7 mM) y 6.63 mg de persulfato de potasio (2.45 mM) fue diluida con etanol al 96% hasta alcanzar una absorbancia de 0,7 a 0,9 a 734 nm (tiempo 0). Posteriormente, 10 µL de EOP se adicionó a 1 ml de la solución stock diluida y se dejó reaccionar durante 6 min. La absorbancia fue leída a 734 nm usando un espectrofotómetro (Evolution 60s, Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Los resultados fueron expresados como equivalente de µmol Trolox/g de EOP obtenidos de la diferencia de las absorbancias medidas a tiempo cero y transcurridos 6 minutos vs la curva de la concentración de trolox (mM).

2.4.2. Preparación y caracterización de las soluciones de electrohilado

2.4.2.1. Preparación de las soluciones para el electrohilado

Debido a la toxicidad de los solventes usualmente utilizados para el electrohilado de la PCL (N,N-dimetilformamida y diclorometano) (Mochane, Motsoeneng, Sadiku, Mokhena, y Sefadi, 2019) y CH (ácido trifluoroacético) (Lim et al., 2019); las soluciones fueron preparadas usando una mezcla binaria de ácido fórmico/ácido acético propuesta por (Steyaert et al., 2012) solventes seguros para su aplicación en el envasado de alimentos.

Por lo tanto, las soluciones poliméricas para electrohilado fueron preparadas utilizando Policaprolactona (PCL) (PM= 80.000 Da) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) Chitosano (CH) de bajo peso molecular (50.000-190.000 Da), grado de desacetilación (DD) 75-85% (Sigma-

Aldrich, Missouri, USA) y diferentes concentraciones de EOP. 14% (w/v) de PCL fue disuelto en una solución de ácido fórmico 88% (Fisher Scientific, New Hampshire, USA) /ácido acético glacial (Fisher Scientific, New Hampshire, USA) proporción (60:40). Posteriormente, el quitosano al 8% (w/w en relación a la PCL) y diferentes concentraciones de EOP 5, 10, 20 y 30% (w/w en relación al peso total de los polímeros CH + PCL) fueron agregados a la mezcla y homogenizados con barra magnética durante 18 horas.

2.4.2.2. Viscosidad de las soluciones para el electrohilado

La viscosidad aparente de las soluciones se estudió utilizando un reómetro (Advanced Rheometer AR 1000, TA instruments, New Castle, USA). 1 ml de cada solución se colocó debajo de un plato geométrico de 30 mm con una frecuencia de 6 a 66 rad/s y una velocidad de corte de 100 a 1000 1/seg. Los datos se recopilaron en 20 puntos. Las pruebas se realizaron a 25 ± 1 °C durante 16 minutos.

2.4.2.3. Conductividad eléctrica y tensión superficial de las soluciones para el electrohilado

La conductividad eléctrica de las soluciones se determinó utilizando un medidor de conductividad (Accumet® XL20, Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canadá). La tensión superficial dinámica de las soluciones se determinó usando un tensiómetro de presión de burbuja (SITA pro line f10, SITA Messtechnik GmbH, Dresden, Alemania), equipado con un capilar que expulsa burbujas de aire en la solución de polímero a una frecuencia fija de 1 Hz. Todas las pruebas se realizaron a 21 ± 2 °C.

2.4.3. Desarrollo y caracterización de las nanofibras

2.4.3.1. Técnica de electrohilado

Las soluciones fueron electrohiladas utilizando un electrospinning de superficie libre de alambre, (Nanospider, Elmarco, República Checa) bajo un voltaje constante de 80 kV, la solución se cargó en un carro de 10 ml, que se desliza hacia adelante y hacia atrás cubriendo

el electrodo de alambre con gotas de la solución de 0.7 mm de diámetro de manera uniforme. La velocidad de movimiento del carro y la distancia entre el electrodo de alambre y el sustrato se ajustaron a 50 mm s^{-1} y 180 mm respectivamente. Todos los experimentos se realizaron a 21 ± 2 °C y 45% de humedad relativa. Las fibras electrohiladas se depositaron sobre un sustrato comercial de polietileno lineal de baja densidad (Glad® Food Pro, California, USA).

2.4.3.2. Caracterización morfológica de las nanofibras

Para la caracterización morfológica de las fibras fue utilizada la microscopia electrónica de barrido (SEM) (Modelo FEI Quanta FEG 250, Termo Fischer, New Hampshire, USA), a un voltaje de aceleración de 10 kV, para evaluar la morfología y el diámetro de las fibras electrohiladas. Las fibras se recubrieron con 20 nm de oro usando un recubrimiento por pulverización catódica (Modelo Denton desk V TSC, Denton vacuum, New Jersey, USA). Se utilizó el software de análisis de imagen Image J (National Institutes of Health, USA) para determinar el diámetro promedio de las fibras electrohiladas midiéndolas en 200 puntos diferentes para cada imagen.

2.4.3.3. Evaluación de la presencia e interacción de los compuestos presentes en las nanofibras mediante Reflectancia Total Atenuada (ATR) Infrarrojos por Transformada de Fourier (FTIR*)*

Las nanofibras de PCL/CH/EP se analizaron usando un espectrómetro FTIR (IRPrestige21, Shimadzu Corp., Kyoto, Japón), equipado con una célula ATR (Pike Technologies, Madison, Wisconsin, EE. UU.). Antes de analizar cada muestra, se realizó una medición utilizando aire como fondo. Luego, las muestras se montaron en el cristal de zafiro ATR, se comprimieron con una prensa y se escanearon entre 600 y 4000 cm^{-1} con una resolución de 2 cm^{-1}. Se tomó un promedio de 40 scaners para cada espectro.

2.4.3.4. Capacidad de carga (CC) y eficiencia de encapsulación (EE)

Fueron disueltas 20 mg nanofibras de PCL/CH/EOP en una solución de ácido fórmico/ácido acético (60:40) durante 24 horas a temperatura ambiente. El contenido de fenoles en las

nanofibras se cuantificó mediante el método de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999), modificado por (Siripatrawan y Vitchayakitti, 2016), utilizando una curva de calibración de ácido gálico (R = 0,99), la concentración de EOP en las nanofibras fue determinada usando una curva de calibración con concentraciones definidas de EOP vs concentración de fenoles (R2=0,99), construida mediante el uso de la curva de ácido gálico.

La capacidad de carga y la eficiencia de encapsulación se calcularon usando las siguientes ecuaciones (**3 y 4**):

Ec.(3) CC (%) $=\frac{mp}{mf}$ X 100

Ec. (4) EE (%) = $\frac{mp}{mt}$ X 100

Donde mp es la cantidad de propóleos dentro de las nanofibras (mg), mf es el peso de la nanofibra (mg), y mt es la carga teórica de propóleos en la solución de electrohilado (mg).

2.4.3.5. Evaluación antibacteriana de los empaques activos recubiertos con nanofibras de PCL/CH y PCL/CH/ EOP

La pérdida de viabilidad antibacteriana se analizó de acuerdo con el método de agitación en frasco descrito en la norma ASTM E2149 modificado por Son, Yeom, Song, Lee, y Hwang, (2009). Brevemente, bacterias de *Escherichia coli* ATCC 25922 fueron cultivadas en caldo LB, Miller (Fisher Scientific, New Hampshire, USA) a 37ºC por 24 horas. Los empaques activos con nanofibras de PCL/CH y PCL/CH/EOP (10 mm × 20 mm), previamente esterilizados usando luz ultravioleta por 15 min, fueron puestos en tubos falcon estériles que contenían 4 ml de una solución isotónica de 0.9% NaCl y 0.5 ml de un inóculo de *E. coli* ajustado a 10_6UFC. Las suspensiones se agitaron a 200 rpm en un agitador orbital mantenido a 37ºC durante 30, 90 y 180 min. Se realizaron diluciones en serie usando una solución estéril de agua peptona buferada al 0.1% (Thermo Scientific, ™ MA, USA) donde 0.1 ml de cada dilución se sembró en placas de agar MacConkey (Thermo Scientific, ™ MA, USA) las cuales fueron incubadas a 37ºC durante 24 h. El conteo microbiológico fue expresado

como logaritmo del número de unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra (log ufc/ml).

El porcentaje de reducción bacteriana debido al contacto con los empaques activos se determinó usando la ecuación (**5**),

Ec. (5) Reducción bacteriana (%) = $\frac{B-A}{B}$ X 100

Donde A representa el recuento de bacterias log10 para el frasco que contiene el empaque activo después del tiempo de contacto especificado y B representa el recuento de bacterias log10 del frasco control (sin empaque) después del tiempo de contacto especificado.

2.4.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico de las diferentes variables se llevó a cabo utilizando el software SAS 9.4. Los datos fueron sujetos a un test de normalidad usando el procedimiento UNIVARIATE PLOT. Posteriormente, se realizó un ANOVA usando un modelo lineal general (SAS 9.4) y test de Tukey empleando diferencia significativa ($P < 0,05$).

2.5. Resultados y Discusión

2.5.1. Extracción de los extractos oleosos de propóleos

El rendimiento calculado de extracción, de acuerdo con la ecuación. (1), se encontró del 9,5%. Los rendimientos de extracción varían según el solvente y la técnica utilizada, por ejemplo Carrillo, Castillo y Mauricio, (2011) realizaron extracciones de propóleos con solvente mediante la técnica de soxhlet obteniendo rendimientos del 41 al 55 %, sin embargo otros autores han reportados rendimientos tan bajos de hasta 0.04% para la extracción de aceites esenciales de propóleos mediante la técnica de hidrodestilación (Ioshida, Young, y Lago, 2010). Para los extractos etanólicos de propóleos (**EEP**) los rendimientos reportados a nivel mundial varían desde 2.6 al 27.6% (Talero, Hernandéz, y Figueroa, 2012) mientras

que para los EEP Colombianos se ha reportado rendimientos del 2,72 al 9.17% (Bastos, Guzmán, Judith, Tello, y Scoaris, 2011).

Los propóleos crudos no pueden usarse directamente como materia prima debido a su alto contenido de contaminantes principalmente ceras y resinas (Pobiega et al., 2019a), por lo tanto es necesario el uso de solventes que puedan extraer los componentes activos polares y no polares de propóleos. En este estudio se utilizó como solventes etanol y éter debido que pueden extraer los principales compuestos activos de los propóleos como polifenoles, flavonoides, terpenoides y ácidos grasos (Fokt, Pereira, Ferreira, Cunha, y Almeida Aguiar, 2010).

2.5.1.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria-CMI de los extractos oleosos de propóleos

La **Tabla.2-1** presenta los resultados obtenidos sobre la actividad antimicrobiana de los EOP contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* ATCC 13076.

Tabla-2-1 Determinación antimicrobiana y antioxidante de extractos oleosos de propóleos de Santander, Colombia. a) CMI en mg/ml frente a los microorganismos: *S. aureus, E. coli* y *Salmonella enterica*. b) contenido de fenoles totales mg GAE/g EOP. c) actividad antioxidante ABTS µmol trolox/g EOP

	a. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de extractos oleosos de propóleos de Oiba, Santander, Colombia **(mg/ml)**			b. Contenido de Fenoles Totales ± DE (mg GAE/g de EOP)	c. ABTS TEAC ± DE (µmol Trolox/g EOP)
	Staphylococcus aureus	*Escherichia Coli*	*Salmonella enterica*		
Propóleos de Santander	0.15	20	10	82,6 ± 2	1186 ± 52

Los resultados de los EOP muestran tener un gran efecto bactericida para bacterias Gram positivas con una CMI de 0.15 mg/ml, estos resultados coinciden con lo reportado para extractos etanólicos de propóleos de diferentes regiones geográficas (Anjum et al., 2018;

Aysun, 2017; Fokt et al., 2010; Harfouch, 2017). Sin embargo, los EOP santandereanos muestran una moderada acción contra bacterias Gram negativas con una CMI superior a 10 mg/ml, resultados semejantes contra *E. coli* fueron descritos por Tosi, Ré, Ortega, y Cazzoli, (2007) los cuales identificaron una CMI de 19.2 ± 3.5 mg/ml en propóleos argentinos con cantidades importantes de quercetina, galangina, ácido cafeico y crisina. De manera similar, Gutiérrez y Suárez, (2014) también encontraron efectos bactericidas moderados contra bacterias Gram negativas en extractos etanólicos de propóleos santandereanos, sin embargo, algunos propóleos colombianos de otras regiones han mostrado una actividad limitada contra bacterias Gram negativas (Martínez, Garcia, Durango, y Gil, 2012).

La acción antimicrobiana de los propóleos depende de la interacción de sus compuestos fenólicos con otros como terpenos y terpenoides los cuales actúan como agentes bactericidas al bloquear la división celular, la síntesis de proteínas (Machado et al., 2017) y al destruir la pared celular y citoplasmática de las bacterias (Parolia, Thomas, Mala, y Mohan, 2010).

2.5.1.1. Determinación de fenoles totales y actividad antioxidante ABTS

Para los EOP se encontró concentraciones de fenoles totales de 82,6 ± 2mg GAE/g (**Tabla. 2-1b**) y la actividad antioxidante captadora de radicales ABTS de 1186 ± 52 µmol/g (**Tabla. 2-1c**) fue superior a las reportada para propóleos de otras regiones colombianas (Palomino G, García P, Gil G, Rojano, y Durango R, 2009; Salamanca, Correa, y Principal, 2007), lo que puede sugerir que los EOP de esta región del país contienen mayor concentración de compuestos activos, lo que se correlaciona con una actividad antimicrobiana superior.

La actividad antioxidante y antirradical son características muy importantes de los propóleos, atribuida generalmente a sus compuestos fenólicos (Bankova et al., 2016), estos compuestos pueden interrumpir la oxidación lipídica (Torel, Cillard, y Cillard, 1986), capturando especies reactivas de oxígeno (Bors, Heller, Michel, y Saran, 1990).

Efecto de la adición de quitosano y extractos oleosos de propóleos en los párametros de la solución

2.5.2. Viscosidad de las soluciones para el electrohilado

La **figura 2-1** y en la **tabla 2-2** se presentan los resultados de la viscosidad de las soluciones de electrohilado a base de policaprolactona, quitosano y extractos oleosos de propóleos.

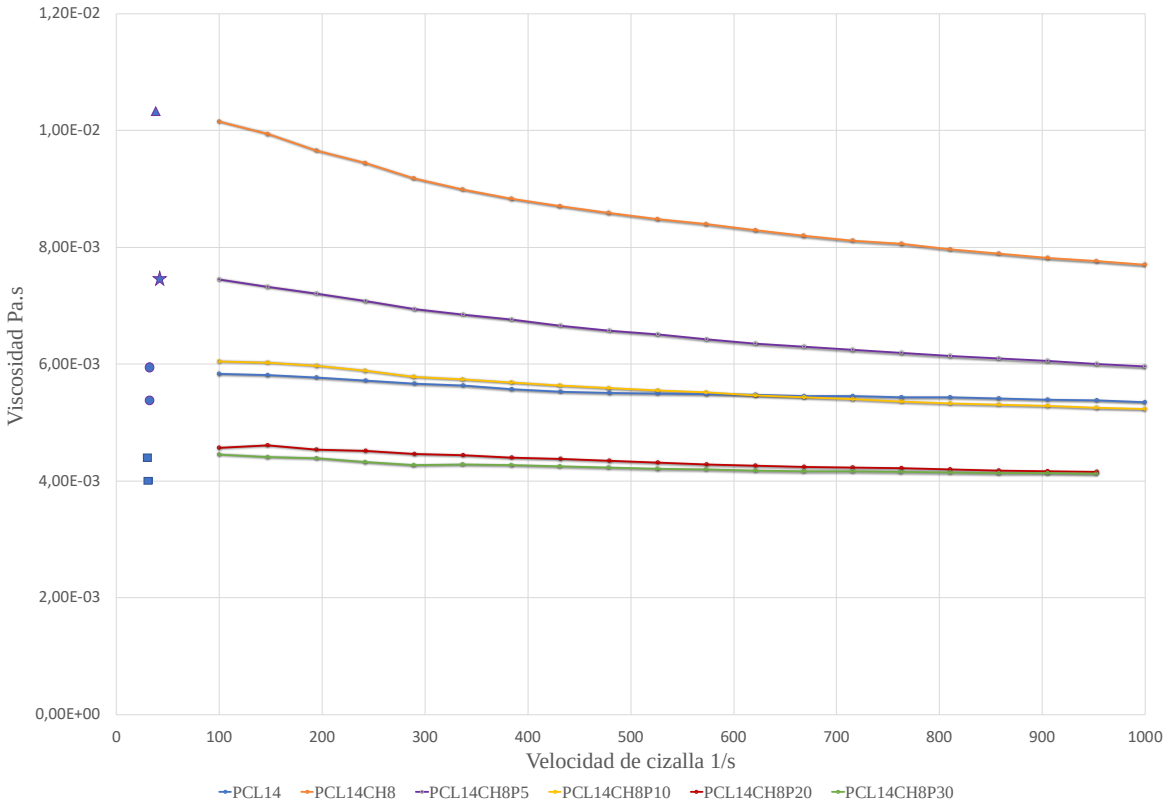


Figura 2-1 Viscosidad de las soluciones de electrohilado a base de policaprolactona, quitosano y extractos oleosos de propóleos[1]

[1] Valores con símbolos diferentes son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

n = 3

PCL14: solución de Policaprolactona al 14% (w/v); PCL14CH8: solución de policaprolactona 14% y quitosano al 8% (w/w), PCL14CH8P5: solución de policaprolactona 14% , quitosano al 8% y extracto oleoso de propóleos al 5% (w/w); PCL14CH8P10: solución de policaprolactona 14%, quitosano al 8%y extracto oleoso de propóleos al 10% (w/w); PCL14CH8P20: solución de policaprolactona 14%, quitosano al 8%y extracto oleoso de propóleos al 20% (w/w); PCL14CH8P30: solución de policaprolactona 14% , quitosano al 8%y extracto oleoso de propóleos al 30% (w/w).

Tabla 2-2. Viscosidad aparente de las soluciones de electrohilado a una velocidad de corte de 100 1/s [1]

Muestras [2]	Pa.s
PCL14	5.83 E-03 ± 0.007 c
PCL14CH8	9.24 E-03 ± 0.01 a
PCL14CH8P5	7.45 E-03 ± 0.01 b
PCL14CH8P10	6.25 E-03 ± 0.008 c
PCL14CH8P20	4.57 E-03 ± 0.01 d
PCL14CH8P30	4.45 E-03 ± 0.002d
SEM	0.0002
P-value	<0.001

Valores con superíndices diferentes dentro de cada columna son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

[1] n = 3

[2] PCL14: solución de Policaprolactona al 14% (w/v); PCL14CH8: solución de policaprolactona 14% y quitosano al 8% (w/w), PCL14CH8P5: solucion de policaprolactona 14% , quitosano al 8% y extracto oleoso de propóleos al 5% (w/w); PCL14CH8P10: solución de policaprolactona 14%, quitosano al 8%y extracto oleoso de propóleos al 10% (w/w); PCL14CH8P20: solución de policaprolactona 14%, quitosano al 8%y extracto oleoso de propóleos al 20% (w/w); PCL14CH8P30: solución de policaprolactona 14% , quitosano al 8%y extracto oleoso de propóleos al 30% (w/w).

Pa.s: Pascal/segundo.

Los resultados del análisis de viscosidad mostraron que todas las soluciones tienen un comportamiento no newtoniano (**Figura 2-1**), debido que el índice de comportamiento de flujo: "n" fue de 0.9; el cual debe ser menor a 1 en los fluidos pseudoplásticos *(*Hiemenz., 1984*)*. La viscosidad aparente de las soluciones aumentó significativamente con la adición de CH ($P < 0.001$), mientras que la adición de EOP generó una disminución en la viscosidad de las soluciones con CH (**Tabla 2-2**).

Todas las soluciones experimentaron una disminución de la viscosidad con el aumento de la velocidad de corte. Es posible que este comportamiento de las soluciones sea una consecuencia del desenredo de las cadenas de polímero debido a una estructura conformacional más flexible debido al efecto de los solventes (Arkoun et al., 2018).

La viscosidad de las soluciones es un parámetro crítico que afecta el proceso de electrohilado y la morfología de las fibras electropunzadas, este parámetro está relacionado con la concentración de polímero y el peso molecular.

2.5.3. Conductividad eléctrica y tensión superficial de las soluciones para el electrohilado

En la tabla 2-3 son presentados los resultados del efecto de la adición del CH y EOP en la conductividad y tensión superficial de las soluciones de policaprolactona.

Tabla 2-3. Efecto de la adición de quitosano y extractos de propóleos en la conductividad y tensión superficial de las soluciones de policaprolactona[1]

Muestras [2]	Conductividad, µS/cm	Tensión superficial, mN/m
PCL14	180.2 ± 1.15^{d}	33.2 ± 0.36^{f}
PCL14CH8	639.9 ± 5.55^{a}	56.4 ± 0.5^{a}
PCL14CH8P5	592.9 ± 6.45^{b}	52.2 ± 0.37^{b}
PCL14CH8P10	585.3 ± 2.5^{b}	48.5 ± 0.43^{c}
PCL14CH8P20	566.7 ± 4.8^{c}	47.5 ± 0.37^{d}
PCL14CH8P30	567.4 ± 1.35^{c}	45.6 ± 0.3^{e}
SEM	4.180	0.230
P-value	<0.001	<0.001

Valores con superíndices diferentes dentro de cada columna son significativamente diferentes ($p < 0.05$).
[1] n = 3
[2] PCL14: solución de Policaprolactona al 14% (w/v); PCL14CH8: solución de policaprolactona 14% y quitosano al 8% (w/w), PCL14CH8P5: solucion de policaprolactona 14% , quitosano al 8% y extracto oleoso de propóleos al 5% (w/w); PCL14CH8P10: solución de policaprolactona 14%, quitosano al 8%y extracto oleoso de propóleos al 10% (w/w); PCL14CH8P20: solución de policaprolactona 14%, quitosano al 8%y extracto oleoso de propóleos al 20% (w/w); PCL14CH8P30: solución de policaprolactona 14% , quitosano al 8%y extracto oleoso de propóleos al 30% (w/w).
µS/cm: microsiemens /centímetro; mN/m: milinewton/ metro

La conductividad eléctrica mide la capacidad de las cargas para migrar a la superficie de la gota, lo cual es esencial para desarrollar la repulsión de Coulombic e iniciar el fenómeno de inyección. Como se muestra en la tabla 2-3**,** la conductividad eléctrica de la solución de PCL

aumentó con la adición del quitosano de 180.2 ± 1.15 a 639.9 ± 5.55 µS/ cm^{-1}, debido a la naturaleza policatiónica del CH; aunque la adición de EOP disminuyó la conductividad de las soluciones, concentraciones de EOP al 30% no tienen diferencia significativa sobre este parámetro, posiblemente debido a la saturación de los sitios activos del quitosano. La baja conductividad de la solución de PCL pura, puede explicar el hecho por el cual no fue posible su electrohilado.

La fuerza electrostática establecida en la superficie de la gota debe superar la tensión superficial para iniciar el fenómeno de inyección, así como evitar la formación de perlas (Alborzi, Lim, y Kakuda, 2010). En los resultados de la tabla 2-3, la tensión superficial de las soluciones aumentó con la adición de CH (33.3 ±0.3 a 56.4 ± 0.5 mN/m) y disminuyó con la adición de EP (56.4 ± 0.5 a 45.6 ± 0.3 mN/m). Este resultado demuestra la fuerte influencia del CH sobre las soluciones de PCL y el efecto positivo de la adición de EOP en el electrohilado de las soluciones.

El aumento de la viscosidad, la tensión superficial y la conductividad en las soluciones con quitosano, se debe a que los grupos aminos libres del quitosano son cagados positivamente en presencia de ácido; la protonación del quitosano lo transforma en un polielectrolito que permite el desarrollo de soluciones viscosas dada la expansión del volumen hidrodinámico generado por las altas repulsiones electrostáticas entre los grupos protonados $NH3^+$ (Arkoun et al., 2018), que así mismo, aumentan la tensión superficial y la conductividad (Homayoni et al., 2009).

Desarrollo y caracterización de las nanofibras

2.5.4. Técnica de electrohilado

Experimentos previos demostraron que soluciones puras de PCL y quitosano no lograron ser electropunzadas, sin embargo, una concentración de PCL al 14% mezclada con concentraciones del 4 al 8% de quitosano fueron electropunzables utilizando la tecnología de superficie libre de alambre (El Marco, Nanospider).

Todas las soluciones que contenían EOP fueron fácilmente electropunzadas generando una membrana adherida a la película de PEBD.

2.5.5. Efecto de la adición de extractos oleosos de propóleos en la morfología de las nanofibras

La figura 2-2 presenta la morfología, el promedio y la distribución de los diámetros de las nanofibras realizadas con las diferentes soluciones.

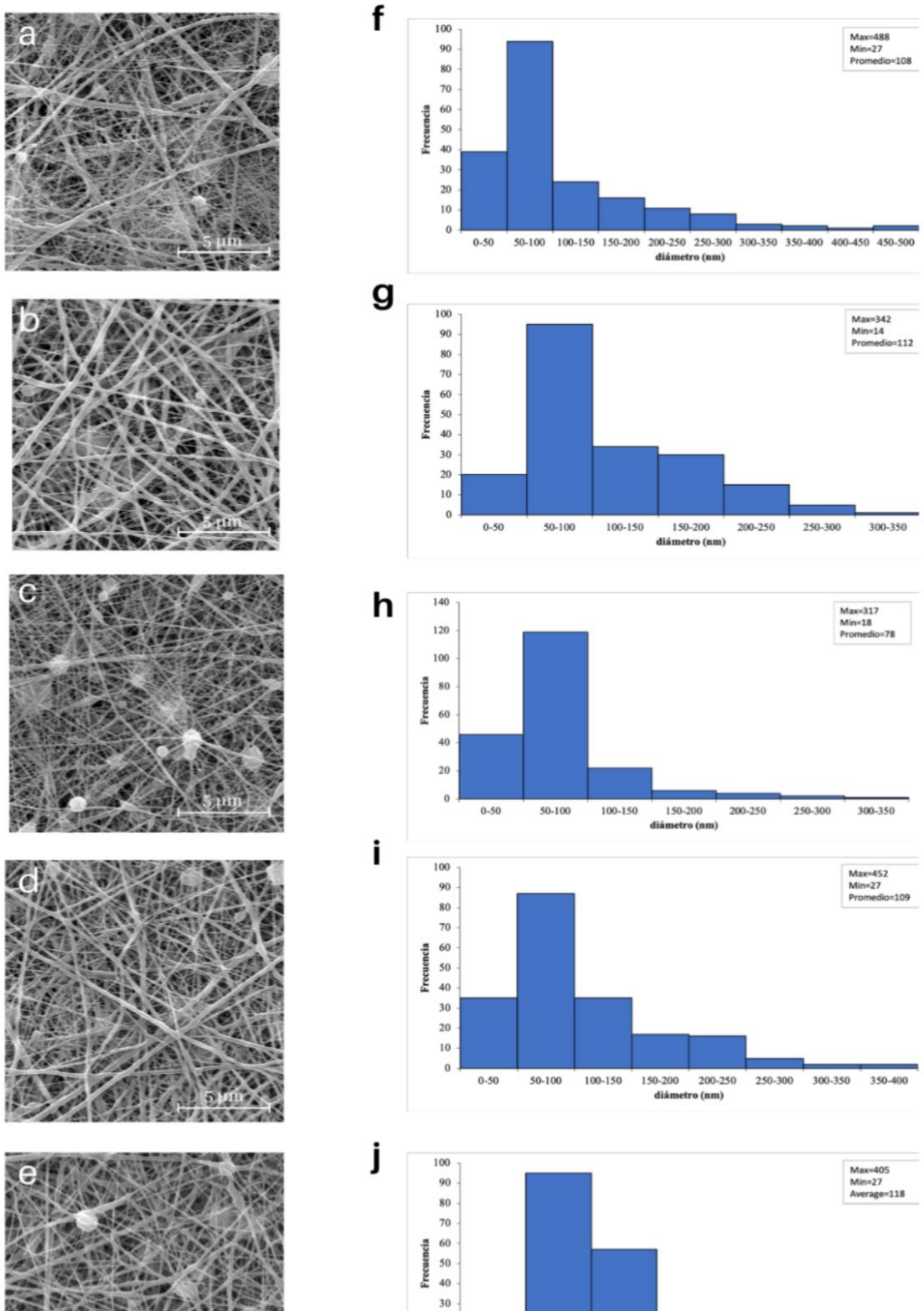


Figura 2-2 Morfología de las nanofibras SEM a. PCL/CH, b. PCL/CH/EOP5, c. PCL/CH/EOP10, d. PCL/CH/EOP20, e. PCL/CH/EOP30. Los histogramas muestran la distribución del diámetro de las nanofibras f. PCL/CH, g. PCL/CH/EOP5, h. PCL/CH/EOP10, i. PCL/CH/EOP20, j. PCL/CH/EOP30.
PCL=Policaprolactona; CH=quitosano; EOP= Extractos oleosos de propóleos

Las nanofibras de PCL/CH poseen un diámetro promedio de 107.9 ± 84 nm, el cual es menor a lo reportado por otros autores (Prabhakaran et al., 2008; Steyaert et al., 2012; Sultana, Amirian, Park, Lee, y Lee, 2017; X. Yang, Chen, y Wang, 2009), sin embargo, otros autores reportan comportamientos similares con lo encontrado en este estudio (Steyaert et al., 2012 y Yang et al., 2009) donde el aumento en la concentración de quitosano genera fibras más delgadas, el adelgazamiento de la fibra puede atribuirse a los cambios en las propiedades de la solución generado por el marcado aumento de la viscosidad y la densidad de carga de las soluciones, por lo tanto, las fuerzas repulsivas entre las cargas positivas de la superficie del chorro serán mayores permitiendo que las fibras sean sometidas a mayores fuerzas de alargamiento durante el proceso de electrohilado efecto que disminuye el diámetro de la fibra (Sultana et al., 2017). Sin embargo, las soluciones de PCL con 8% de quitosano generan nanofibras con alta formación de perlas, que puede deberse al aumento marcado de la tensión superficial de la solución, debido a los fuertes enlaces de hidrógeno intermoleculares del quitosano que forman una red tridimensional y evitan el movimiento de las cadenas poliméricas tras la exposición a un campo eléctrico (Neamnark, Rujiravanit, y Supaphol, 2006), generando la fragmentación del filamento incluso con viscosidades altas.

La adición de EOP en la solución de PCL/CH reduce la rigidez de las cadenas de CH y facilita el electrohilado debido al desarrollo de nuevas interacciones intermoleculares entre los grupos hidroxilo y amino del quitosano y los grupos funcionales de EOP (Siripatrawan y Vitchayakitti, 2016), generando el enmascaramiento de las cargas positivas del quitosano y por lo tanto una disminución de la viscosidad, la tensión superficial y la conductividad. Estos cambios generados en la solución tienen efectos notorios en la morfología de las nanofibras, donde se evidencia una disminución en la formación de perlas dada la disminución de la tensión superficial y diámetros más delgados de las fibras en concentraciones de EOP al 10% (diámetro promedio 78.4 ± 45.4 nm) posiblemente generada por la disminución de la viscosidad de la solución. Sin embargo, concentraciones mayores al 10% generaron un aumento en el diámetro de las nanofibras debido a la disminución de las repulsiones electrostáticas y la conductividad, independientemente de la viscosidad reducida. Otros trabajos también reportan comportamientos similares donde el diámetro de

las fibras disminuyeron en concentraciones de propóleos al 4% y aumentaron a concentraciones mayores del 8% en fibras de PCL (Sutjarittangtham et al., 2012). Igualmente estudios realizados con polivinilpirrolidona mostrarón un aumento en el diámetro de las fibras al ser adicionadas con propóleos (Adomavičiūté et al., 2016; Asawahame et al., 2015; Moghaddam, Shirvani, Aroon, y Nazari, 2018).

Las nanofibras con concentraciones de EOP al 5% mostraron fibras lisas, homogéneas y con pocos defectos, con un diámetro promedio de 111 ± 61 nm indicando que la adición de EOP facilita el electrohilado de las soluciones y disminuye los defectos presentados en las nanofibras adicionadas con quitosano.

Sin embargo concentraciones mayores al 5% de EOP generaron aparición de perlas posiblemente inducida por la posible evaporación limitada de los disolventes debido a las propiedades de adhesión de los EOP en la solución de electrohilado (Kim et al., 2014).

2.5.6. Evaluación de la presencia e interacción de los compuestos presentes en las nanofibras mediante reflectancia total atenuada (ATR) infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)

En la figura 2-3 son presentados los análisis de espectroscopía FTIR.

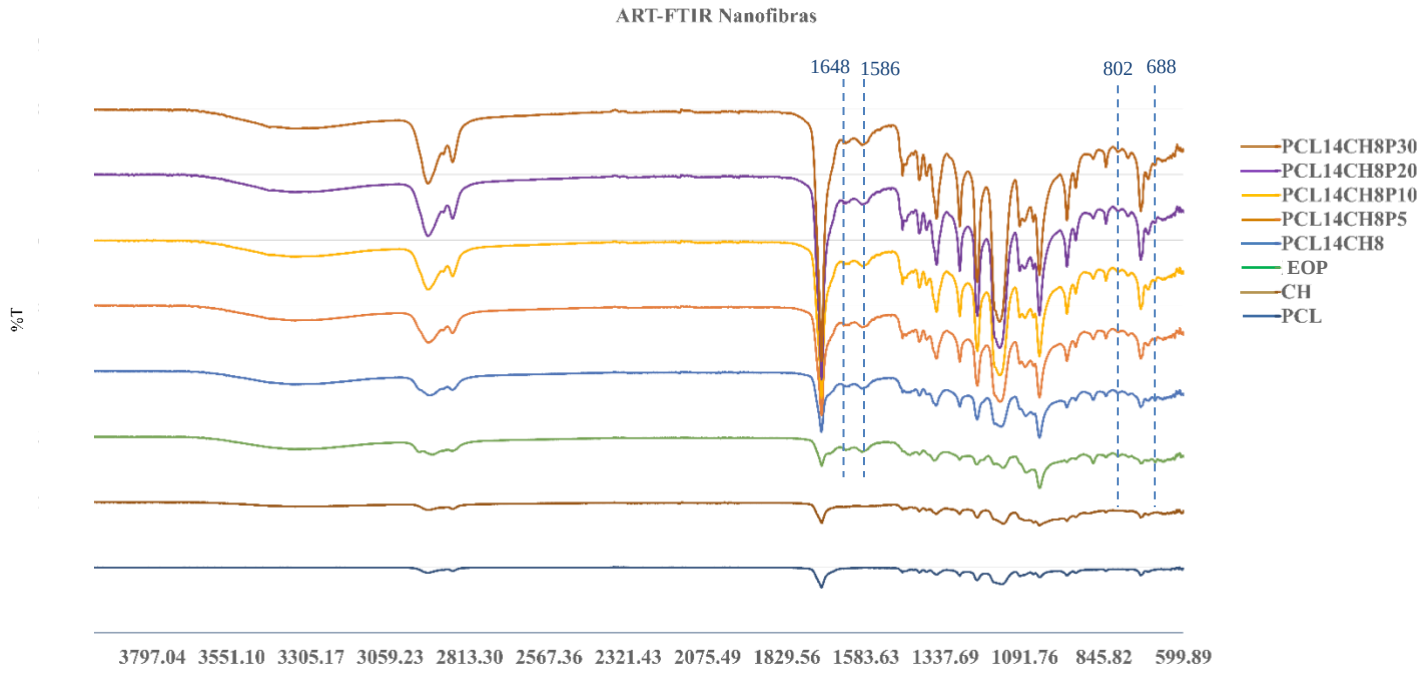


Figura 2-3 ART-FTIR nanofibras PCL/CH con diferentes concentraciones de EOP y compuesto puro de PCL, CH y EOP.

La espectroscopía FTIR se realizó para indicar la presencia y caracterizar la interacción intermolecular entre los diferentes compuestos. Las nanofibras muestran un patrón similar de espectros FTIR, pero con diferentes intensidades de transmitancia en ciertos picos.

En la figura 2-3 se puede confirmar la presencia de la PCL, CH y EOP en las nanofibras PCL/CH/EOP. Los espectros indican la presencia de bandas características de la PCL, el CH y EOP, entre las cuales se destacan para la PCL las bandas 1722, 2941, and 1240 cm^{-1} atribuidas al estiramiento del enlace carbonilo C=O (Hong y Kim, 2011; Jana, Leung, Chang, y Zhang, 2014), las bandas 2941 y 2864 cm^{-1} representan el estiramiento de los enlaces C-H y la banda 1170 cm-1 se atribuye a los enlaces simple C-O conjugado con el doble enlace C = O en el grupo funcional éster (Semnani et al., 2017). Para el quitosano las señales relacionadas fueron 1648 y 1586 cm^{-1} correspondientes a los enlaces amida-I y amida-II (Jana et al., 2014), banda 1396 cm^{-1} (vibraciones simétricas y asimétricas del enlace C-H), la banda 1108 cm^{-1} (tensión del enlace C-N) (Bi et al., 2019) y la banda 1046 tensión del enlace C-O.

La adición de los EOP presenta una disminución en el porcentaje de transmitancia de los sitios cristalinos de la PCL como la banda 1293.3 cm^{-1} (enlace C-C, C-O) y la banda 1722 lo que indica una disminución de la cristalinidad de la PLC (Sutjarittangtham et al., 2012). Adicionalmente, los espectros con EOP poseen cambios en las bandas 1648 y 1586 correlacionadas con el estiramiento del enlace C=O de compuestos flavonoides y del enlace C=C dentro del anillo aromático. Además, aparecieron dos bandas nuevas en 802 y 688 cm^{-1}, también presentes en el espectro infrarrojo de los extractos oleosos de propóleos vinculados al enlace C-H del anillo aromático de los propóleos (Siripatrawan y Vitchayakitti, 2016), indicando la presencia de grupos funcionales del EOP en las nanofibras.

Estos resultados demuestran la existente interacción intermolecular entre los grupos hidroxilo y amino de la matriz del quitosano y los grupos funcionales del EOP. Resultados comparables fueron reportados por Curcio et al., (2009) y Siripatrawan y Vitchayakitti, (2016) donde reportan la formación de enlaces de hidrógeno y enlaces covalentes entre

compuestos polifenoles y grupos amina e hidroxilo del quitosano lo que explica los cambios encontrados en las soluciones de electrohilado y morfología de las nanofibras.

2.5.7. Capacidad de carga y eficiencia de encapsulación

En la tabla 2-4 son presentados los resultados del análisis de la capacidad de carga y eficiencia de encapsulación de los extractos oleosos de propóleos en las nanofibras de PCL/CH.

Tabla 2-4. Capacidad de carga y eficiencia de encapsulación de los extractos de propóleos en las nanofibras de PCL/CH[1]

Muestras [2]	CC, % [3]	EE, % [4]
PCL14CH8P5	17.97 ± 0.09 ^{a}	97.23 ± 0.5^{a}
PCL14CH8P10	18.96 ± 0.18^{b}	70.94 ± 0.69^{b}
PCL14CH8P20	20.54 ± 0.55^{c}	40.24 ± 1.09^{c}
PCL14CH8P30	22.25 ± 0.37^{d}	31.40 ± 0.52^{d}
SEM	0.248	0.526
P-value	0.001	<0.001

Valores con superíndices diferentes dentro de cada columna son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

[1] n = 3

[2] PCL14CH8P5: solución de policaprolactona 14%, quitosano al 8% y extracto oleoso de propóleos al 5% (w/w); PCL14CH8P10: solución de policaprolactona 14%, quitosano al 8%y extracto oleoso de propóleos al 10% (w/w); PCL14CH8P20: solución de policaprolactona 14%, quitosano al 8% y extracto oleoso de propóleos al 20% (w/w); PCL14CH8P30: solución de policaprolactona 14%, quitosano al 8% y extracto oleoso de propóleos al 30% (w/w).

[3] CC= Capacidad de carga

[4] EE = Eficiencia de encapsulación

El aumento en la concentración del EOP mostró un incremento en la capacidad de carga, pero disminución marcada en la eficiencia de encapsulación (**Tabla 2-4**). Este hallazgo se puede atribuir a la capacidad reducida de los polímeros para encapsular EOP a concentraciones mayores del 10%, debido a la naturaleza resinosa del EOP este tiende a adherirse en el alambre de electrohilado generando pérdidas significativas del bioactivo. Adicionalmente, estos resultados pueden indicar que el quitosano ayuda a mejorar la

encapsulación del EOP en las nanofibras de PCL, al interaccionar con los compuestos fenólicos, lo que indica que cuando los sitios activos del quitosano se saturan empieza a disminuir el porcentaje de encapsulación de los extractos oleosos de propóleos.

En la figura 2-4 se presenta el desarrollo de los empaques activos con nanofibras de PCL, CH y EOP.

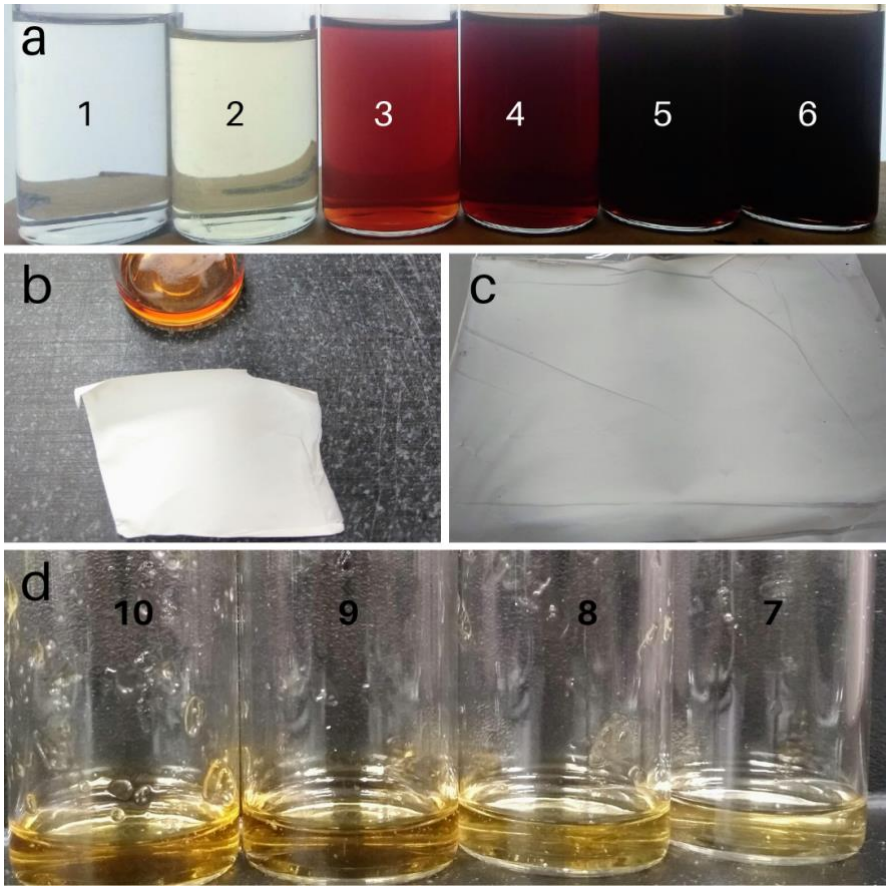


Figura 2-4. Desarrollo del empaque activo con nanofibras de PCL/CH/EOP **a**. Soluciones de electrohilado 1. PCL; 2. Solución PCL/CH8 3. Solución PCL/CH/EOP5; 4. Solución PCL14/CH8/P10, 5. Solución PCL14/CH8/P20, 6. Solución PCL14/CH8/P30. **b.** Solución y nanofibras desarrolladas de PCL/CH/ EOP 5 **c.** Empaque de polietileno recubierto con nanofibras de PCL/CH/EOP 5%; **d.** 20 mg de nanofibras disueltas en solución de AF/AA; 7. PCL/CH/EOP 5%; 8. PCL/CH/EOP 10%; 9. PCL/CH/EOP 20%; 10. PCL/CH/EOP 30%

Como se muestra en la figura 2-4 las nanofibras electrohiladas preservan el color característico de la PCL, mostrando una diferencia entre el color de las soluciones y el de las nanofibras; además es importante recalcar que cuando las fibras fueron disueltas, reafirmaron los resultados obtenidos en los espectros infrarrojos demostrando la inclusión

de EOP con un aumento en la capacidad de carga a mayores concentraciones de EOP pero una relación inversamente proporcional con respecto a la eficiencia de encapsulación.

2.5.8. Evaluación antibacteriana de los empaques activos recubiertos con nanofibras de PCL/CH y PCL/CH/ EOP

En la figura 2-5 se observa que los empaques activos pueden inhibir el crecimiento de *E.coli* gracias a la incorporación de CH y EOP en las nanofibras de PCL. Hasta los 90 minutos de agitación se puede observar que las nanofibras de PCL/CH muestran una reducción significativamente mayor ($P < 0.001$) del crecimiento microbiano en comparación con las otras muestras.

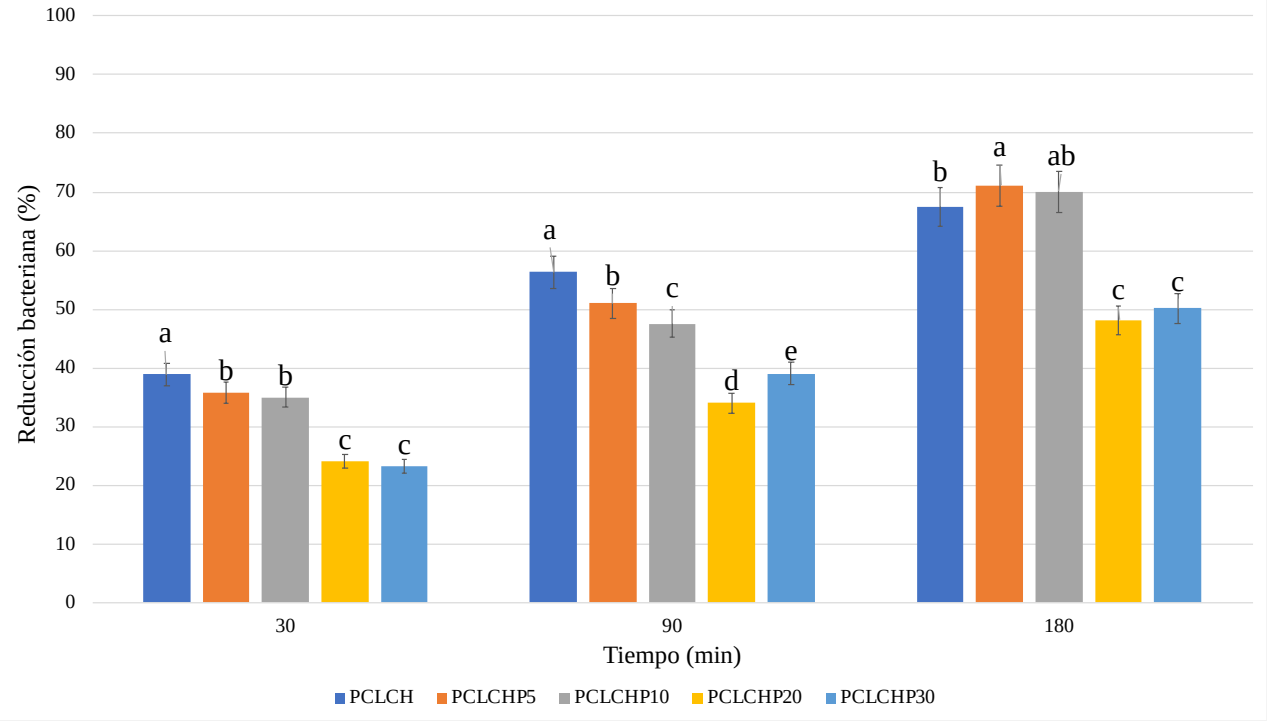


Figura 2-5 Porcentaje de reducción bacteriana (*E.coli*) de los empaques activos recubiertos con nanofibras de PCL/CH y PCL/CH/EOP.
Valores con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).
n = 3
PCLCH: Empaque activo con nanofibras de policaprolactona 14% y quitosano al 8% (w/w), PCLCHP5: Empaque activo con nanofibras de policaprolactona 14%, quitosano al 8% y extracto oleoso de propóleos al 5% (w/w); PCLCHP10: Empaque activo con nanofibras de policaprolactona 14%, quitosano al 8% y extracto oleoso de propóleos al 10% (w/w); PCLCHP20: Empaque activo con nanofibras de policaprolactona 14% , quitosano al 8% y extracto oleoso de propóleos al 20% (w/w); PCLCHP30: Empaque activo con nanofibras de policaprolactona 14%, quitosano al 8% y extracto oleoso de propóleos al 30% (w/w).

Estos resultados concuerdan con otros autores que han reportado una buena actividad antibacteriana de nanofibras con quitosano en contra de *E. coli* (An, Zhang, Zhang, Zhao, y Yuan, 2009; Rieger y Schiffman, 2014; Son et al., 2009), la actividad antibacteriana de las nanofibras con quitosano es atribuida a sus grupos amina libres con carga positiva, que dañan la capacidad de la membrana bacteriana de funcionar como barrera (Arkoun, Daigle, Heuzey, y Ajji, 2017; Rieger y Schiffman, 2014; Tian et al., 2019). Sin embargo, la adición de EOP disminuyen la acción antibacteriana del quitosano durante los primeros 90 minutos, posiblemente causado por las interacciones intermoleculares entre grupos funcionales del CH y de los EOP, como se evidencia en los espectros inflarojos. Esta interacción disminuye los grupos aminas libres cargados positivamente y con ello el efecto antimicrobiano del CH, siendo más evidente en las nanofibras con concentraciones altas de EOP (20 y 30%).

A pesar de ello, a los 180 minutos se puede observar un aumento significativo del % de reducción bacteriana en los empaques activos con EOP al 5%, posiblemente causado por la liberación de EOP de las nanofibras generando un efecto sinérgico entre el CH y EOP gracias a las propiedades microbiológicas de los propóleos (Gutiérrez y Suárez, 2014; Tosi et al., 2007) igualmente estos resultados pueden sugerir una liberación lenta de los EOP; según Sánchez et al., (2016) quienes incorporaron tiamina en nanofibras de PCL/CH la liberación sostenida de la tiamina se llevó alrededor de las 15 horas, estos resultados también indican que el uso de nanofibras de PCL puede controlar y retrasar la liberación del bioactivo como se indica en otros estudios (Madhaiyan et al., 2013; Woodruff y Hutmacher, 2010).

2.6. Conclusión

Los resultados obtenidos no solo confirmaron la posibilidad de incorporar extractos oleosos de propóleos colombianos con buena respuesta antioxidante y antimicrobiana en nanofibras de PCL/CH, sino también, se reporta por primera vez que la inclusión de EOP facilita el electrohilado de las soluciones de PCL con quitosano y mejoran la morfología de las nanofibras desarrolladas. Además, las nanofibras desarrolladas de PCL/CH y PCL/CH/EOP demostraron propiedades antibacterianas en contra de *E. coli*, mostrando un posible efecto sinérgico entre el CH y EOP cuando este es liberado. El uso de la técnica de electrohilado de superficie libre de alambre permite la creación de nanofibras no tejidas a gran escala, en

comparación a la técnica de electrohilado convencional, abriendo la posibilidad de crear empaques activos que permitan la conservación de los productos alimenticios. Este es el primer estudio que comprueba la posibilidad del desarrollo a gran escala de un empaque activo de polietileno lineal de baja densidad recubierto con nanofibras que incorporan compuestos bioactivos.

Las fibras desarrolladas con PCL/CH y 5% de EOP fueron seleccionadas debido al alto porcentaje de encapsulación, buena morfología y acción antimicrobiana para desarrollar un estudio práctico de su efectividad en filetes de lomo de cerdo (capítulo 3).

2.7. Referencias

Adomavičiūté, E., Stanys, S., Žilius, M., Juškaite, V., Pavilonis, A., y Briedis, V. (2016). Formation and Biopharmaceutical Characterization of Electrospun PVP Mats with Propolis and Silver Nanoparticles for Fast Releasing Wound Dressing. *BioMed Research International*, *2016*. https://doi.org/10.1155/2016/4648287

Alborzi, S., Lim, L.-T., y Kakuda, Y. (2010). Electrospinning of sodium alginate-pectin ultrafine fibers. *Journal of Food Science*, *75*(1), C100-7. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01437.x

An, J., Zhang, H., Zhang, J., Zhao, Y., y Yuan, X. (2009). Preparation and antibacterial activity of electrospun chitosan/poly(ethylene oxide) membranes containing silver nanoparticles. *Colloid and Polymer Science*, *287*(12), 1425–1434. https://doi.org/10.1007/s00396-009-2108-y

Anjum, S. I., Ullah, A., Khan, K. A., Attaullah, M., Khan, H., Ali, H., … Dash, C. K. (2018). Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.08.013

Anu Bhushani, J., y Anandharamakrishnan, C. (2014). Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food based applications. *Trends in Food Science y Technology*,

38(1), 21–33. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.03.004

Arkoun, M., Daigle, F., Heuzey, M. C., y Ajji, A. (2017). Antibacterial electrospun chitosan-based nanofibers: A bacterial membrane perforator. *Food Science and Nutrition*, *5*(4), 865–874. https://doi.org/10.1002/fsn3.468

Arkoun, M., Daigle, F., Holley, R. A., Heuzey, M. C., y Ajji, A. (2018). Chitosan-based nanofibers as bioactive meat packaging materials. *Packaging Technology and Science*, *31*(4), 185–195. https://doi.org/10.1002/pts.2366

Asawahame, C., Sutjarittangtham, K., Eitssayeam, S., Tragoolpua, Y., Sirithunyalug, B., y Sirithunyalug, J. (2015). Antibacterial activity and inhibition of adherence of Streptococcus mutans by propolis electrospun fibers. *AAPS PharmSciTech*, *16*(1), 182–191. https://doi.org/10.1208/s12249-014-0209-5

ASTM, E 2149. Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions.

Augustin, M. A., y Hemar, Y. (2009). Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*, *38*(4), 902–912. https://doi.org/10.1039/B801739P

Aysun. (2017). Effects of Propolis on Eggshell. In *Egg innovations and strategies for improvements*. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800879-9/00014-7

Bankova, V., Bertelli, D., Borba, R., Conti, B. J., da Silva Cunha, I. B., Danert, C., … Zampini, C. (2016). Standard methods for Apis mellifera propolis research. *Journal of Apicultural Research*, *58*(2), 1–49. https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1222661

Barrera, E., Gil, J., Restrepo, A., Mosquera, K., y Durango, D. (2015). A coating of chitosan and propolis extract for the postharvest treatment of papaya (Carica papaya L. cv. Hawaiiana). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, *68*(2), 7667–7678. https://doi.org/10.15446/rfnam.v68n2.50982

Bastos, E., Guzmán, D., Judith, F., Tello, J., y Scoaris, D. (2011). CARACTERIZACIÓN

ANTIMICROBIANA Y FISICOQUÍMICA DE PROPÓLEOS DE Apis mellifera L. (HYMENOPTERA: APIDAE) DE LA REGIÓN ANDINA COLOMBIANA Antimicrobial and Physico-Chemical Characterization of Propolis of Apis mellifera L. (Hymenoptera: Apidae) from the Colom. *Acta Biologica Colombiana*, *16*, 175–184.

Bi, F., Zhang, X., Bai, R., Liu, Y., Liu, J., y Liu, J. (2019). Preparation and characterization of antioxidant and antimicrobial packaging films based on chitosan and proanthocyanidins. *International Journal of Biological Macromolecules*, *134*, 11–19. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.042

Bonou, J., Ahouandjinou, H., F.Baba-Moussa, Adéoti, Z., Metongnon, I., V.Dougnon, … And, F. T. (2016). Assessment of the antimicrobial activity of essential oils from some Beninese medicinal plants : Influence of different tweens. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, *4*(September), 43–49. Retrieved from http://dx.doi.org/10.15739/ibspr.16.006

Bors, W., Heller, W., Michel, C., y Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*, *186*, 343–355. https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86128-i

Carrillo, M. L., Castillo, L. N., y Mauricio, R. (2011). Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Extractos de Propóleos de la Huasteca Potosina (México). *Inf. Tecnol. [Online].*, *22*, 21–28. Retrieved from http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttextypid=S0718-07642011000500004ynrm=iso

Cerkez, I., Sezer, A., y Bhullar, S. K. (2017). Fabrication and characterization of electrospun poly(e-caprolactone) fibrous membrane with antibacterial functionality. *Royal Society Open Science*, *4*(2). https://doi.org/10.1098/rsos.160911

Curcio, M., Puoci, F., Iemma, F., Parisi, O. I., Cirillo, G., Spizzirri, U. G., y Picci, N. (2009). Covalent Insertion of Antioxidant Molecules on Chitosan by a Free Radical Grafting Procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(13), 5933–5938.

https://doi.org/10.1021/jf900778u

Fokt, H., Pereira, A., Ferreira, A., Cunha, A., y Almeida Aguiar, C. (2010). How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, *1*.

Ghisalberti, E. L. (1979). Propolis: A Review. *Bee World*, *60*(2), 59–84. https://doi.org/10.1080/0005772X.1979.11097738

Gutiérrez, C., y Suárez, H. (2014). Antimicrobial activity of propolis and its effect on the physicochemical and sensoral characteristics in sausages. *Vitae*, *21*(2), 90–96.

Harfouch, R. (2017). ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SYRIAN PROPOLIS EXTRACT AGAINST SEVERAL STRAINS OF BACTERIA IN VITRO. *WORLD JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES*, *6*, 42–46. https://doi.org/10.20959/wjpps20172-8162

Hiemenz, P.C. "Polymer Chemistry-The Basic Concepts", Marcel Dekker,Inc. New. York and Bassel pp. *Chapter 2 "The viscous state*" 75-87 (1984).

Homayoni, H., Ravandi, S. A. H., y Valizadeh, M. (2009). Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization. *Carbohydrate Polymers*, *77*(3), 656–661. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.02.008

Hong, S., y Kim, G. (2011). Fabrication of electrospun polycaprolactone biocomposites reinforced with chitosan for the proliferation of mesenchymal stem cells. *Carbohydrate Polymers*, *83*(2), 940–946. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.09.002

Ioshida, M. D. M., Young, M. C. M., y Lago, J. H. G. (2010). Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil from Brazilian Propolis. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *13*(5), 633–637. https://doi.org/10.1080/0972060X.2010.10643873

ISO, U. C. (2006). *UNE-EN ISO 20776-1*.

Jana, S., Leung, M., Chang, J., y Zhang, M. (2014). Effect of nano- and micro-scale

topological features on alignment of muscle cells and commitment of myogenic differentiation. *Biofabrication*, *6*(3). https://doi.org/10.1088/1758-5082/6/3/035012

Jonaidi Jafari, N., Kargozari, M., Ranjbar, R., Rostami, H., y Hamedi, H. (2018). The effect of chitosan coating incorporated with ethanolic extract of propolis on the quality of refrigerated chicken fillet. *Journal of Food Processing and Preservation*, *42*(1), e13336. https://doi.org/10.1111/jfpp.13336

Kim, J. I., Pant, H. R., Sim, H. J., Lee, K. M., y Kim, C. S. (2014). Electrospun propolis/polyurethane composite nanofibers for biomedical applications. *Materials Science and Engineering C*, *44*, 52–57. https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.07.062

Li, D., y Xia, Y. (2004). Electrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel? *Advanced Materials*, *16*(14), 1151–1170. https://doi.org/10.1002/adma.200400719

Liao, H., Qi, R., Shen, M., Cao, X., Guo, R., Zhang, Y., y Shi, X. (2011). Improved cellular response on multiwalled carbon nanotube-incorporated electrospun polyvinyl alcohol/chitosan nanofibrous scaffolds. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, *84*(2), 528–535. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.02.010

Lim, L. T., Mendes, A. C., y Chronakis, I. S. (2019). Electrospinning and electrospraying technologies for food applications. In *Advances in Food and Nutrition Research* (1st ed., Vol. 88). https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.005

López, B. G.-C., Schmidt, E. M., Eberlin, M. N., y Sawaya, A. C. H. F. (2014). Phytochemical markers of different types of red propolis. *Food Chemistry*, *146*, 174–180. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.063

Machado, B. S., Pulcino, T. N., Silva, A. L., Melo, D. T., Silva, R. G., y Mendonça, I. G. (2017). Propolis as an alternative in prevention and control of dental cavity. *Journal of Apitherapy*, *1*(2), 47–50. https://doi.org/10.5455/ja.20160726115117

Madhaiyan, K., Sridhar, R., Sundarrajan, S., Venugopal, J. R., y Ramakrishna, S. (2013). Vitamin B12 loaded polycaprolactone nanofibers: A novel transdermal route for the

water soluble energy supplement delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, *444*(1–2), 70–76. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.01.040

Martínez, J., Garcia, C., Durango, D., y Gil, J. (2012). Caracterización de propóleos provenientes del municipio de Caldas obtenido por dos métodos de recolección. *Revista MVZ Cordoba*, *17*(1), 2861–2869. https://doi.org/10.21897/rmvz.254

Mochane, M. J., Motsoeneng, T. S., Sadiku, E. R., Mokhena, T. C., y Sefadi, J. S. (2019). Morphology and properties of electrospun PCL and its composites for medical applications: A mini review. *Applied Sciences (Switzerland)*, *9*(11), 1–17. https://doi.org/10.3390/app9112205

Moghaddam, A. B., Shirvani, B., Aroon, M. A., y Nazari, T. (2018). Physico-chemical properties of hybrid electrospun nanofibers containing polyvinylpyrrolidone (PVP), propolis and aloe vera. *Materials Research Express*, *5*(12). https://doi.org/10.1088/2053-1591/aae0bf

Moon, J.-K., y Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(5), 1655–1666. https://doi.org/10.1021/jf803537k

Nazir, A., Khenoussi, N., Schacher, L., Hussain, T., Adolphe, D., y Hekmati, A. H. (2015). Using the Taguchi method to investigate the effect of different parameters on mean diameter and variation in PA-6 nanofibres produced by needleless electrospinning. *RSC Advances*, *5*(94), 76892–76897. https://doi.org/10.1039/C5RA13649K

Neamnark, A., Rujiravanit, R., y Supaphol, P. (2006). Electrospinning of hexanoyl chitosan. *Carbohydrate Polymers*, *66*(3), 298–305. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.03.015

Palomino G, L. R., García P, C. M., Gil G, J. H., Rojano, B. A., y Durango R, D. L. (2009). Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae*, *16*(3), 388–395.

Parolia, A., Thomas, M., Mala, K., y Mohan, M. (2010). Propolis and its potential uses in oral health. *International Journal of Medicine and Medical Sciences*, *2*, 210–215.

Piedrahíta, D. G., Fuenmayor, C. A., y Suárez, H. (2019). Effect of chitosan-propolis edible coatings on stability of refrigerated cachama (Piaractus brachypomus) vacuum-packed fish fillets. *Packaging Technology and Science*, *32*(3), 143–153. https://doi.org/10.1002/pts.2422

Pobiega, K., Kraśniewska, K., y Gniewosz, M. (2019a). Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality – A review. *Trends in Food Science and Technology*, *83*(October 2018), 53–62. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.007

Pobiega, K., Kraśniewska, K., y Gniewosz, M. (2019b). Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality – A review. *Trends in Food Science and Technology*, *83*(November 2018), 53–62. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.007

Prabhakaran, M. P., Venugopal, J. R., Chyan, T. Ter, Hai, L. B., Chan, C. K., Lim, A. Y., y Ramakrishna, S. (2008). Electrospun biocomposite nanofibrous scaffolds for neural tissue engineering. *Tissue Engineering. Part A*, *14*(11), 1787–1797. https://doi.org/10.1089/ten.tea.2007.0393

Qian, Y., Zhang, Z., Zheng, L., Song, R., y Zhao, Y. (2014). Fabrication and characterization of electrospun polycaprolactone blended with chitosan-gelatin complex nanofibrous mats. *Journal of Nanomaterials*, *2014*. https://doi.org/10.1155/2014/964621

Reis, A. S. dos, Diedrich, C., Moura, C. de, Pereira, D., Almeida, J. de F., Silva, L. D. da, … Carpes, S. T. (2017). Physico-chemical characteristics of microencapsulated propolis co-product extract and its effect on storage stability of burger meat during storage at −15 °C. *LWT - Food Science and Technology*, *76*, 306–313. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.033

Rieger, K. A., y Schiffman, J. D. (2014). Electrospinning an essential oil: Cinnamaldehyde

enhances the antimicrobial efficacy of chitosan/poly(ethylene oxide) nanofibers. *Carbohydrate Polymers*, *113*, 561–568. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.075

Salamanca, G., Correa, I. L., y Principal, J. (2007). Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootecnia Tropical*, *25*(2).

Sánchez, Á. P., Vera, R., Muñoz, E. de J., Gómez, E., Bernad, M. J., Maciel, A., y Mu. (2016). Preparación y caracterización de membranas poliméricas electrohiladas de policaprolactona y quitosano para la liberación controlada de clorhidrato de tiamina. *Ciencia En Desarrollo*, *7*(2), 133. https://doi.org/10.19053/01217488.v7.n2.2016.4818

Sarhan, W. A., y Azzazy, H. M. E. (2015). High concentration honey chitosan electrospun nanofibers: Biocompatibility and antibacterial effects. *Carbohydrate Polymers*, *122*, 135–143. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.051

Sawaya, A. C. H. F., Barbosa da Silva Cunha, I., y Marcucci, M. C. (2011). Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chemistry Central Journal*, *5*(1), 1–10. https://doi.org/10.1186/1752-153X-5-27

Semnani, D., Naghashzargar, E., Hadjianfar, M., Dehghan Manshadi, F., Mohammadi, S., Karbasi, S., y Effaty, F. (2017). Evaluation of PCL/chitosan electrospun nanofibers for liver tissue engineering. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, *66*(3), 149–157. https://doi.org/10.1080/00914037.2016.1190931

Shao, S., Li, L., Yang, G., Li, J., Luo, C., Gong, T., y Zhou, S. (2011). Controlled green tea polyphenols release from electrospun PCL/MWCNTs composite nanofibers. *International Journal of Pharmaceutics*, *421*(2), 310–320. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.09.033

Shavisi, N., Khanjari, A., Basti, A. A., Misaghi, A., y Shahbazi, Y. (2017). Effect of PLA films containing propolis ethanolic extract, cellulose nanoparticle and Ziziphora clinopodioides essential oil on chemical, microbial and sensory properties of minced beef. *Meat Science*, *124*, 95–104. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.10.015

Singleton, V. L., Orthofer, R., y Lamuela-Raventós, R. M. B. T.-M. in E. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Oxidants and Antioxidants Part A* (Vol. 299, pp. 152–178). https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1

Siripatrawan, U., y Vitchayakitti, W. (2016). Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. *Food Hydrocolloids*, *61*, 695–702. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.001

Son, B., Yeom, B.-Y., Song, S. H., Lee, C.-S., y Hwang, T. S. (2009). Antibacterial electrospun chitosan/poly(vinyl alcohol) nanofibers containing silver nitrate and titanium dioxide. *Journal of Applied Polymer Science*, *111*(6), 2892–2899. https://doi.org/10.1002/app.29233

Steyaert, I., Van Der Schueren, L., Rahier, H., y De Clerck, K. (2012). An alternative solvent system for blend electrospinning of polycaprolactone/chitosan nanofibres. *Macromolecular Symposia*, *321–322*(1), 71–75. https://doi.org/10.1002/masy.201251111

Su, P., Wang, C., Yang, X., Chen, X., Gao, C., Feng, X., … Gou, Z. (2011). Electrospinning of chitosan nanofibers: The favorable effect of metal ions. *Carbohydrate Polymers*, *84*, 239–246. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.031

Sultana, T., Amirian, J., Park, C., Lee, S. J., y Lee, B. T. (2017). Preparation and characterization of polycaprolactone–polyethylene glycol methyl ether and polycaprolactone–chitosan electrospun mats potential for vascular tissue engineering. *Journal of Biomaterials Applications*, *32*(5), 648–662. https://doi.org/10.1177/0885328217733849

Sutjarittangtham, K., Sanpa, S., Tunkasiri, T., Rachtanapun, P., Chantawannakul, P., Intatha, U., … Eitssayeam, S. (2012). Preparation of polycaprolactone/ethanolic extract propolis nanofibers films. *Advanced Materials Research*, *506*, 226–229. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.506.226

Talero, C., Hernandéz, D., y Figueroa, J. (2012). CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE PROPÓLEO CRUDO Y SÓLIDOS SOLUBLES DE EXTRACTOS DE PROPÓLEOS DE Apis mellifera EN COLOMBIA. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, *59*(II), 109–118.

Tian, J., Deng, H., Huang, M., Liu, R., Yi, Y., y Dong, X. (2019). Electrospun Nanofibers for Food and Food Packaging Technology. In *Electrospinning: Nanofabrication and Applications*. https://doi.org/10.1016/b978-0-323-51270-1.00015-7

Torel, J., Cillard, J., y Cillard, P. (1986). Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry*, *25*(2), 383–385. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85485-0

Tosi, E. A., Ré, E., Ortega, M. E., y Cazzoli, A. F. (2007). Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon Escherichia coli. *Food Chemistry*, *104*(3), 1025–1029. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.011

Vega, A.-C., y Lim, L.-T. (2012). Effects of poly(ethylene oxide) and pH on the electrospinning of whey protein isolate. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, *50*(16), 1188–1197. https://doi.org/10.1002/polb.23106

Woodruff, M. A., y Hutmacher, D. W. (2010). The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, *35*(10), 1217–1256. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002

Xiao, J., Shi, C., Zheng, H., Shi, Z., Jiang, D., Li, Y., y Huang, Q. (2016). Kafirin Protein Based Electrospun Fibers with Tunable Mechanical Property, Wettability, and Release Profile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(16), 3226–3233. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00388

Xiao, Q., y Lim, L. T. (2018). Pullulan-alginate fibers produced using free surface electrospinning. *International Journal of Biological Macromolecules*, *112*, 809–817. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.005

Yang, X. chuan, Chen, X., y Wang, H. (2009). Acceleration of osteogenic differentiation of preosteoblastic cells by chitosan containing nanofibrous scaffolds. *Biomacromolecules*, *10*(10), 2772–2778. https://doi.org/10.1021/bm900623j

3. Efecto de nanofibras de policaprolactona que contienen quitosano y/o extractos oleosos de propóleos en la conservación de carne de cerdo refrigerada

3.1. Resumen

Las carnes son alimentos altamente perecederos que necesitan de tecnologías de envasado que permitan la preservación y extensión de su vida útil. Por este motivo, se investigó la efectividad de dos empaques activos que se elaboraron usando un film comercial de polietileno lineal de baja densidad (**PEBD**) recubierto con nanofibras de policaprolactona (PCL)/ quitosano (**CH**) para el primer empaque y nanofibras de PCL, CH y extractos oleosos de propóleos colombianos (**EOP**) para el segundo, el objetivo fue preservar la calidad fisicoquímica y microbiológica de los filetes de lomo de cerdo durante el almacenamiento en refrigeración a 4ºC durante 20 días. Los lomos de cerdo comerciales se envolvieron directamente en los empaques recubiertos con nanofibras los cuales mostraron los filmes translúcidos. Las muestras de la carne de cerdo fueron analizadas para pH, parámetros de color, pérdida de peso, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (**TBARS**) y conteo de bacterias aeróbicas mesófilas y psicrótrofas. Los resultados mostraron que la incorporación de EOP mejoró las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de las nanofibras de PCL/CH debido a una mejor protección del color con un valor estable de a* (5,31) a los 4 días, estabilidad en el pH durante todo el tiempo de almacenamiento y un efecto bactericida sinérgico que mostró extender hasta 7 días la calidad microbiana de la carne de acuerdo con el límite máximo aceptado de 10^7 ufc/g. Este estudio sugiere que los empaques desarrollados con recubrimientos de nanofibras de PCL/CH/EOP tienen el potencial para ser utilizados en

empaques activos antimicrobianos para mantener la seguridad, la calidad y extender la vida útil de la carne de cerdo.

Palabras claves: Conservación, empaques antimicrobianos, policaprolactona, propóleos, quitosano, vida útil,

3.2. Abstract

Meat foods are highly perishable which need packaging technologies that allow the preservation and extension of their shelf life, that is why the effectiveness of two active packaging was investigated based on a commercial film of linear low-density polyethylene (LLDPE) coated with polycaprolactone (PCL) / chitosan (CH) nanofibers and PCL/CH/ Oily extracts of Colombian propolis (EOP) nanofibers to preserve the quality of pork fillets during refrigeration storage (4ºC, 20 days). Commercial pork loins were wrapped directly in nanofiber-coated packages showing a slight opacity of the film. The meat samples were analyzed for pH, color parameters, weight loss, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and mesophilic and psychrotrophic aerobic bacteria count. The results showed that the incorporation of Colombian propolis improved the antioxidant and antimicrobial properties of PCL/CH nanofibers due to better color protection with a stable value of a * (5.31) for 4 days, pH stability during all the storage time and a synergistic bactericidal effect that showed to extend up to 7 days the microbial quality of the meat according to the maximum accepted limit of 10_7 cfu/g. This study suggests that packages developed with PCL/CH/EOP nanofiber coatings have the potential to be applied as active antimicrobial packages to maintain safety, quality and extend the shelf life of pork meat.

Key words: Antimicrobial packaging, nanofibers, propolis, chitosan, polycaprolactone, shelf life.

3.3. Introducción

La carne de cerdo es un alimento altamente perecedero por lo tanto requiere de sistemas adecuados de procesamiento, envase y almacenamiento. El rápido deterioro se debe principalmente al contenido de grasa, proteína y alta humedad que permite la activación de reacciones biológicas como la oxidación de la mioglobina en metamioglobina generando coloraciones marrones y la oxidación lipídica que conduce a olores rancios (Sun y Holley, 2012), adicionalmente otros factores intrínsecos de la carne como la actividad de agua y el pH favorecen el crecimiento de una amplia gama de microorganismos los cuales participan activamente en el deterioro y putrefacción del alimento, conllevando a riesgos en la salud humana y perdidas económicas (Alparslan y Baygar, 2017; Jayasena y Jo, 2013; Kaewprachu, Osako, Benjakul, y Rawdkuen, 2015; Schlegelová et al., 2010).

Según la resolución 2690 del 2015, Colombia (Ministerio de salud y protección social, 2015) por el cual se establecen las directrices para la formulación del programa de verificación microbiológica del sistema oficial de inspección, vigilancia y control de la carne y productos cárnicos comestibles, como mínimo los microorganismos indicadores o patógenos que deben incluirse son: *E. coli* (genérica), *Campylobacter spp*, *Salmonella spp*, *E. coli* O 157: H7 y *E. coli* STEC (productores de toxina shiga), de igual manera, a nivel internacional también se reporta según la agencia de gobierno de los Estados Unidos de administración de alimentos y medicamentos (FDA, 2013) dentro de las bacterias a monitorear para carnes crudas: *E. coli*, *Staphylococcus* coagulasa positiva y *Salmonella spp.*

En las últimas décadas, dada la necesidad de ofrecer productos alimenticios mínimamente procesados, saludables y con una vida útil más larga se han desarrollado estrategias innovadoras dentro del área de envasado de alimentos, donde se destacan los empaques activos que se basan en las interacciones del empaque con el alimento o el ambiente alimentario (Dainelli, Gontard, Spyropoulos, Zondervan-van den Beuken, y Tobback, 2008) mediante la incorporación de compuestos intencionalmente agregados que se liberan o absorben sustancias que favorecen la conservación del alimento (Ahmed et al., 2017). Dentro de estos sistemas, los empaques antimicrobianos han cobrado gran interés debido

que pueden reducir el crecimiento microbiano en el alimento gracias a la inclusión de agentes antimicrobianos en el empaque (Ahmed et al., 2017; X. Feng, Ng, Mikš-Krajnik, y Yang, 2017; Jayasena y Jo, 2013; H. Yang, Hewes, Salaheen, Federman, y Biswas, 2014).

El uso de nanotecnología, a base de nanofibras electrohiladas, es una alternativa promisoria en el desarrollo de empaques antimicrobianos ya que permite la encapsulación y protección de las sustancias antimicrobianas ante condiciones externas, evitando una posible neutralización por parte de los componentes del alimento, igualmente, permite la liberación controlada de los compuestos funcionales. Además, las nanofibras poseen ventajas adicionales únicas como propiedades fisicoquímicas y mecánicas mejoradas, que incluyen nanoporosidad y alta relación superficie/volumen (Mendes et al., 2017a).

El quitosano (**CH**) es un polisacárido derivado de la quitina que ha sido de gran interés investigativo por su potencial uso en alimentos debido a su amplia actividad antibacteriana (Cui, Wu, Li, y Lin, 2017; Zhu et al., 2015), capacidad de formación de película y biodegradabilidad (Tian et al., 2019), por otro lado la policaprolactona (**PCL**) es un poliéster alifático biodegradable, hidrofóbico, ampliamente utilizado en sistemas de liberación controlada de sustancias activas (Woodruff y Hutmacher, 2010) como polifenoles del té, ácido carnósico y cloruro de plata (Cerkez et al., 2017; Shao et al., 2011; J. Xiao et al., 2016).

Por otra parte, los propóleos son una sustancia resinosa natural recolectada por las abejas melíferas, conformado por una gran variedad de compuestos químicos de los cuales se destacan los polifenoles, flavonoides y sesquiterpenos que le confieren una amplia actividad biológica (Bankova, 2005; Falcão et al., 2010; Silici y Kutluca, 2005). Los extractos etanólicos de propóleos de origen colombiano se han destacado como conservante natural gracias a sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antifúngicas. (Barrera et al., 2015; C. Gutiérrez y Suárez, 2014; Piedrahíta et al., 2019).

Hasta el momento la incorporación de quitosano y extractos oleosos de propóleos colombianos en nanofibras de PCL y la aplicación de estas en un sistema alimenticio real (carne de cerdo) no se han estudiado previamente. En el estudio anterior (capítulo 2) se prepararon y caracterizaron con éxito nanofibras de PCL/CH y PCL/CH/EOP que fueron utilizadas como recubrimientos en empaques comerciales de PEBD, por lo tanto, el objetivo de este capítulo fue explorar las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de estos empaques para extender las características de calidad de los filetes de lomo de cerdo.

3.4. Materiales y métodos

3.4.1. Preparación de las soluciones y proceso de electrohilado

Los extractos oleosos de propóleos colombianos (**EOP**) fueron obtenidos del municipio de Oiba, departamento de Santander, Colombia. Fue realizada una purificación de los propóleos crudos por medio de una mezcla mixta de eter/etanol (60:40), posteriormente fue realizada una serie de filtraciones y centrifugaciones del extracto y eliminación del solvente mediante rotaevaporación a 60ºC.

Las soluciones de electrohilado fueron preparadas utilizando policaprolactona (PCL) (PM= 80.000 Da, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) Chitosano (CH) de bajo peso molecular (50.000-190.000 Da), grado de desacetilación (DD) 75-85% (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) y extractos oleosos de propóleos colombianos. PCL al 14%(w/v) fue disuelta en una solución mixta de ácido fórmico 88% (Fisher Scientific, New Hampshire, USA) /Ácido acético glacial (Fisher Scientific, New Hampshire, USA) proporción (60:40). Posteriormente CH al 8% (w/w en relación con la PCL) fue homogenizada mediante barra magnética durante 18 hrs. Para las soluciones con EOP se adicionó a la mezcla anterior un 5% (w/ w en relación con el peso total de los polímeros CH + PCL).

Para la realización de los empaques activos se utilizó un film comercial de polietileno lineal de baja densidad (Glad® Food Pro, California, USA), el cual se usó como sustrato de recolección de las nanofibras electrohiladas que fueron desarrolladas al colocar sobre un

carro en movimiento gotas de la solución polimérica con 0.7 mm de diámetro sobre una superficie de alambre a un voltaje constante de 80 kV, velocidad de movimiento del carro de 50 mm s^{-1} y distancia entre los electrodos de 180 mm mediante el uso de un equipo de electrospinning de superficie libre de alambre, (Nanospider, Elmarco, República Checa). Todos los empaques se elaboraron a 21 ± 2 ° C y 45% HR durante 35 minutos. Posteriormente fueron almacenados a 25ºC durante 24 horas antes de su aplicación.

3.4.2. Sistema de empaquetamiento de los filetes de lomo de cerdo

Un total de 6 lomos de cerdo (*longissimus dorsi*), con el mismo número de lote fueron comprados a Kirkland Signature en Guelph, Canadá. De cada lomo se cortaron 9 filetes de 1 pulgada de grosor. Un total de 54 filetes fueron pesados y distribuidos al azar para ser envueltos en 3 tratamientos diferentes, tratamiento 1: empaque comercial sin nanofibras (T1); tratamiento 2: empaque comercial recubierto con nanofibras de PCL/CH (T2) y tratamiento 3: empaque comercial recubierto con nanofibras de PCL/CH/EOP (T3). Los filetes empacados fueron puestos dentro de bolsas Ziploc debidamente cerradas y almacenados en cuarto frío a una temperatura de 4 ± 1ºC. Los análisis fueron realizados los días 0, 4, 8, 12, 16 y 20. Para el día 0, las muestras se empacaron y almacenaron para realizar las mediciones 4 horas después. Adicionalmente para todos los lomos se realizaron medidas de pH utilizando un pH metro (HANNA instruments, HI 3779BE, Laval, Quebec, Canadá) y color utilizando un colorímetro (Konica Minolta, Chroma Meter CR-400, Osaka, Japón).

3.4.3. Medidas de Color

El color de la superficie de los filetes de cerdo fue medido mediante el uso de un colorímetro Chroma Meter CR-400 con 10° de ángulo de visión y un D65 iluminador (Konica Minolta, Osaka Japón), la escala CIE L* a*b* fue aplicada, los parámetros de luminosidad (L*), a* (rojo a verde) y b* (amarillo a azul) fueron medidos. La saturación del color, croma (C*), el ángulo del tono (h^o) y el cambio de color (ΔE) fueron calculados utilizando las ecuaciones (Ec.1, Ec.2, Ec. 3). Los análisis se tomaron en tres puntos diferentes para cada filete.

Ec. 1. $C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$

Ec. 2. $h^o = \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right)$

Ec. 3. $\Delta E = \sqrt{((L^* - L')^2 + (a - a')^2 + (b - b')^2)}$

Donde L, a y b denotan los valores de L* (luminosidad) a*(rojo a verde) y b* (amarillo a azul) de los lomos de cerdo antes del envasado y L', a', b' los valores obtenidos en los días 0, 4, 8, 12, 16 y 20 de almacenamiento.

3.4.4. Determinación del pH

El pH interior de los filetes de cerdo fue medido utilizando un pH metro portátil (Hanna Instruments; HI 3779BE, Laval, Quebec, Canadá,), después de una previa calibración del pH metro con soluciones buffer de pH =4, pH=7 y pH=9. El pH interno se midió mediante la penetración de la sonda a una profundidad de 2.0 cm por debajo de la superficie de cada filete. Cada filete fue medido en 3 sitios diferentes.

3.4.5. Pérdida de peso

La pérdida de peso de los filetes (WL) se determinó acorde al método seguido por (Herring, Jonnalongadda, Narayanan, y Coleman, 2010) siguiendo la Ec 4.

Ec 4. $\%\ WL = \frac{(w_0 - w_\prime)\ X\ 100}{w_0}$

Donde W_0 es el peso inicial del filete de cerdo y W' el peso final después del almacenamiento.

3.4.6. Evaluación de la oxidación lipídica

Finalizado el tiempo de almacenamiento una porción de cada muestra fue empacada al vacío y congelada a – 20ºC hasta el momento de realización del análisis. La determinación del contenido de las sustancias reactivas al ácido 2- tiobarbitúrico (**TBARS**) se llevó a cabo para determinar la oxidación lipídica de los filetes. Cinco (5) g de cada filete se molieron y homogenizaron con 1ml de Butil hidroxitolueno y 45.5 ml de ácido tricloroacético/ácido fosfórico, la solución obtenida fue filtrada en papel filtro Watman No. 1 y adicionada con 5ml de ácido tiobarbitúrico para ser incubada por 22.5 horas en oscuridad. La curva estándar se realizó utilizando diluciones de 1,1,3,3, tetraethoxypropano a 25 µM. La reacción obtenida fue leída en un espectrofotómetro para microplacas (BioTek, ® Winooski, Vermont, USA) a 530nm. Los resultados fueron reportados como la cuantificación de malondialdehido (**MDA**) por kilogramo (**Kg**) de carne.

3.4.7. Análisis microbiológico

Finalizado el tiempo de almacenamiento una porción de cada muestra permaneció en el empaque original, cuidando de realizar cualquier manipulación que pudiera contaminar la muestra, esta fue empacada al vacío y congelada a – 20ºC hasta el momento de la realización de la prueba microbiológica. Fueron pesados 10 gramos de cada filete de lomo de cerdo y homogenizados en 90 ml de solución estéril de agua peptona buferada al 0.1% (Thermo Scientific, ™ MA, USA) usando un stomacher (Seward Stomacher® 400 Circulator, Lab Blender, Thomas Scientific, New Jersey, USA) por 2 min a 300 rpm. Diluciones seriadas de (1:10) fueron preparadas y homogenizadas usando 0.1% de agua peptona estéril. Posteriormente, fue sembrado 0.1 ml de cada dilución en placas de agar PCA (plate count agar, BD Difco™, Thermo Scientific, MA, USA). Para el recuento de microorganismos aerobios mesófilos las placas fueron incubadas a 30ºC/48h, mientras que para el recuento de microorganismos aerobios psicrótrofos, las placas se incubaron a 4ºC durante 10 días. El conteo microbiológico fue expresado como logaritmo del número de unidades

formadoras de colonias por gramo de muestra (**log ufc/g**). Los análisis microbiológicos se llevaron a cabo por triplicado durante el periodo de almacenamiento.

3.4.8. Análisis estadístico

Se utilizaron 6 lomos de diferentes animales, de cada lomo 9 filetes fueron obtenidos (n=54); se probaron 2 tratamientos experimentales diferentes y un tratamiento control. Se realizó un diseño experimental completamente al azar en bloques incompletos balanceados, las medidas fueron realizadas por triplicado. La normalidad de los datos fue determinada usando el procedimiento UNIVARIATE plot SAS (V9.4). Posteriormente, las medidas de color, pH, pérdida de peso, oxidación lipídica y recuento microbiológico fueron sometidas a un ANOVA con el empaque (T1, T2, T3) y tiempo de almacenamiento (0,4,8,12,16,20) como factores fijos utilizando la prueba TUKEY mediante los procedimientos de modelo lineal general de SAS (V 9.4). La significancia se declaró en $P < 0.05$.

3.5. Resultados y discusión

Los empaques recubiertos de nanofibras se caracterizaron por tener un color blanco (**Fig 3-1b**), sin embargo, al contacto con los filetes generaron un cambio en su aspecto y color (**Fig 3-1g**) que se observó como empaques translúcidos (**Fig 3-1e**). Finalizando el tiempo de almacenamiento el recubrimiento de nanofibras permaneció adherido al filme comercial de PEBD conservando los filetes libres del material de empaque (**Fig 3-1f**).

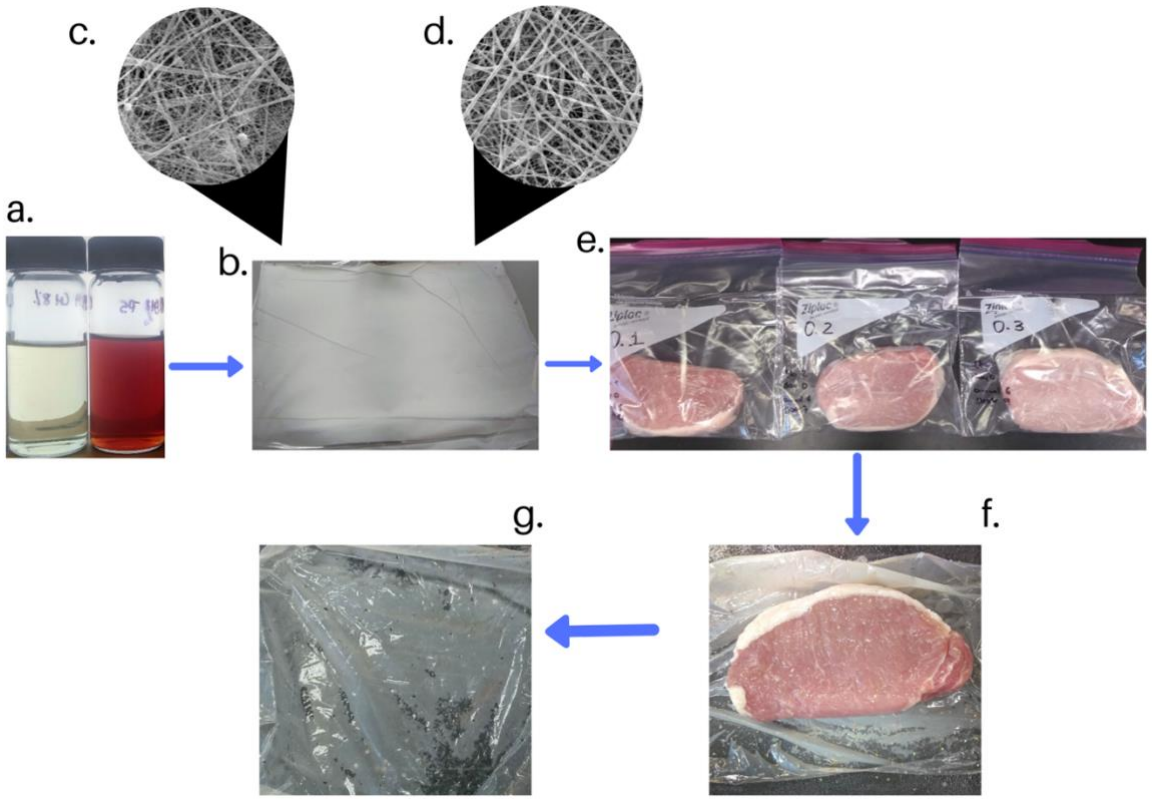


Figura 3-1 Desarrollo y comportamiento de los empaques activos de los filetes de lomo de cerdo a. Soluciones de electrohilado de PCL14/CH8 y PCL14/CH8/P5, b. Polietileno recubierto de nanofibras activas de PCL/CH/EOP5, c. morfología de las nanofibras de PCL/CH, d. morfología de las nanofibras de PCL/CH/EOP5, e. Tratamientos T1 empaque comercial de polietileno sin nanofibras; T2 empaque comercial recubierto con nanofibras de PCL/CH; T3 empaque de polietileno recubierto con nanofibras de PCL/CH/EOP5 con filetes de cerdo f. tratamiento T3; g. Empaque de PCL/CH/EOP5 después de su uso.

El cambio en el color blanco de los recubrimientos puede haber sido causado por la transformación de la PCL de un estado vítreo inicial a un estado elastomérico. La humedad de la muestra de carne podría haber causado esta transformación. Además, las bajas diferencias en los índices de refracción entre fibra-aire versus fibra-líquido del material compuesto dentro del espacio libre podrían hacer que la película se vuelva translúcida (Yano et al., 2005). Según lo informado por Sánchez et al. (2016), la absorción de humedad de las fibras de PCL puede disminuir su temperatura de transición vítrea por debajo de la

temperatura de prueba. El fenómeno de plastificación podría haber mejorado la flexibilidad de los recubrimientos, evitando una ruptura sobre los filetes.

3.5.1. Cambios fisicoquímicos de la calidad de la carne

3.5.1.1. Parámetros de color y apariencia de los filetes de cerdo

El color es un indicador de calidad de las carnes, cambios en este puede indicar procesos de oxidación y contaminación microbiológica del alimento (Mancini y Hunt, 2005). En la tabla 3-1 se resumen los parámetros de luminosidad (L*), coordenadas de color (a*, b*), ángulo de tonalidad (h^o) y croma (C*) de los filetes de cerdo durante los 20 días de almacenamiento a 4ºC.

Tabla 3-1 Parámetros de color de los filetes de lomo de cerdo envueltos en empaques activos durante 20 días de almacenamiento a 4ºC

Tratamientos	0	4	8	12	16	20
				a*		
T1	7.01 ± 1.46 A	4.68 ± 1.12 B	4.90 ± 1.35 B	2.73 ± 0.90 C,b	3.62 ± 0.56BC	4.00 ± 0.76 B
T2	7.53 ± 1.77 A	4.89 ± 0.31BC	4.82 ± 1.33 BC	5.37 ± 0.93 B,a	3.90 ± 0.71 C	4.09 ± 0.93 BC
T3	5.94 ± 0.43 A	5.31 ± 1.03 AB	3.89 ± 0.74 BC	5.59 ± 0.13 AB,a	4.19 ± 0.80C	4.02 ± 0.84C
				b*		
T1	4.34 ±2.62 ab	3.24 ± 0.92	3.27 ± 0.20	2.81 ± 0.24b	4.24 ± 2.04	3.44 ± 1.29
T2	5.07 ± 2.37 A,a	3.48 ± 0.90AB	3.78 ± 1.50 AB	4.28 ± 1.88AB,a	2.83 ± 0.59B	4.61 ± 1.53A
T3	2.61 ± 0.97 b	4.29 ± 2,28	3.83 ± 1.24	3.29 ± 0.36ab	3.50 ± 1.39	3.46 ± 1.39
				L*		
T1	47.35 ± 1.93 B	47.90 ± 1.85AB	49.43 ± 2.23 AB,b	50.33 ± 2.75A	50.36 ± 2.02A	47.90 ± 0.85AB
T2	46.69 ± 2.31B	48.25 ± 2.05AB	49.16 ± 1.19AB,b	49.67 ± 1.59A	49.21 ± 1.13AB	49.00 ± 2.55AB
T3	45.40 ± 2.16	49.38 ± 2.97	52.20 ± 0.92a	48.35 ± 0.49	48.28 ± 1.77	49.45 ± 1.95
				Croma (C*)		
T1	8.34 ± 2.57 A,ab	5.83 ± 1.42B	5.13 ± 0.70BC	3.99 ± 0.64 C,b	5.65 ± 1.71B	5.35 ± 1.15BC
T2	9.15 ± 2.66 A,a	6.10 ± 0.94BC	6.24 ± 1.79BC	7.02 ± 1.74 B,a	4.88 ± 0.77C	6.24 ± 1.49BC
T3	6.66 ± 1.25AB,b	6.97 ± 1.43A	6.21 ± 1.58AB	6.52 ± 0.80AB,a	5.51 ± 1.42B	5.43 ± 0.85B
				Tono (hº)		
T1	29.67 ± 9.15C	35.76 ± 13.09BC	40.61 ± 7.97AB	46.74 ± 11.0 A,a	46.97 ± 10.7 A,a	39.86 ± 9.59 ABC
T2	32.75 ± 8.26B	35.58 ± 10.37B	36.99 ± 8.68B	37.25 ± 12,09 B,ab	35.79 ± 9.52 B,b	47.51 ± 10.27 A
T3	25.68 ± 5.95B	37.36 ± 11.80 A	38.16 ± 7.94A	30.34 ± 6,03 AB,b	38.87 ± 8.64 A,ab	39.97 ± 12.47 A

ABC Valores de la misma fila con superíndices diferentes son significativamente diferentes ($P < 0.05$).
abc Valores de la misma columna con superíndices diferentes son significativamente diferentes ($P < 0.05$).
N = 3. Las muestras fueron analizadas por triplicado,
T1: filetes control empacados en un film comercial de PEBD; T2: filetes empacados en un film comercial de PEBD recubierto con nanofibras de PCL/CH; T3: filetes empacados en un film comercial de PEBD recubierto con nanofibras de PCL/CH/EOP

El valor de enrojecimiento a*, indicador de frescura para las carnes rojas, disminuyó a través del tiempo de almacenamiento para todas las muestras analizadas, sin embargo para el tratamiento 3 los filetes mantuvieron el enrojecimiento inicial alrededor de 4 días más que los demás tratamientos (**tabla 3-1, fig. 3-2**), además los tratamientos 2 y 3 también mostraron mayor estabilidad en el cambio del ángulo de tono (hº), previniendo el color amarillento en los filetes que puede ser causado por la acumulación de metamioglobina (Škrlep y Čandek - Potokar, 2007), por otro lado el tratamiento 3 no mostró cambios significativos de los valores L* y b*($P > 0.05$) durante todo el tiempo de almacenamiento.

Estos resultados sugieren que las propiedades antioxidantes de los propóleos pueden prevenir la oxidación de la mioglobina pigmentaria en metamioglobina la cual es la principal causa de reducción del valor a * (Mancini y Hunt, 2005). Otros estudios también han confirmado que la adición de propóleos colombianos ya sea de forma directa o sobre películas comestibles en otras matrices cárnicas poseen un efecto protector sobre el deterioro oxidativo (C. Gutiérrez y Suárez, 2014; Piedrahíta et al., 2019).

Figura 3-2 Filetes de lomo de cerdo empacados con los tratamientos a. T1, b. T2, c. T3, para el día 4 de almacenamiento a 4ºC

La figura 3-3 muestra la diferencia total de color (ΔE) de los filetes de lomo de cerdo, únicamente el tratamiento control tiene cambios significativos a través del tiempo de almacenamiento ($P < 0.05$) con un ΔE dos veces mayor en comparación con los filetes del tratamiento 3, estos hallazgos corroboran los resultados obtenidos en los parámetros de color, indicando que los empaques bioactivos principalmente los empaques adicionados con EOP permiten la protección del color de los filetes de lomo de cerdo durante los 20 días de almacenamiento a 4ºC.

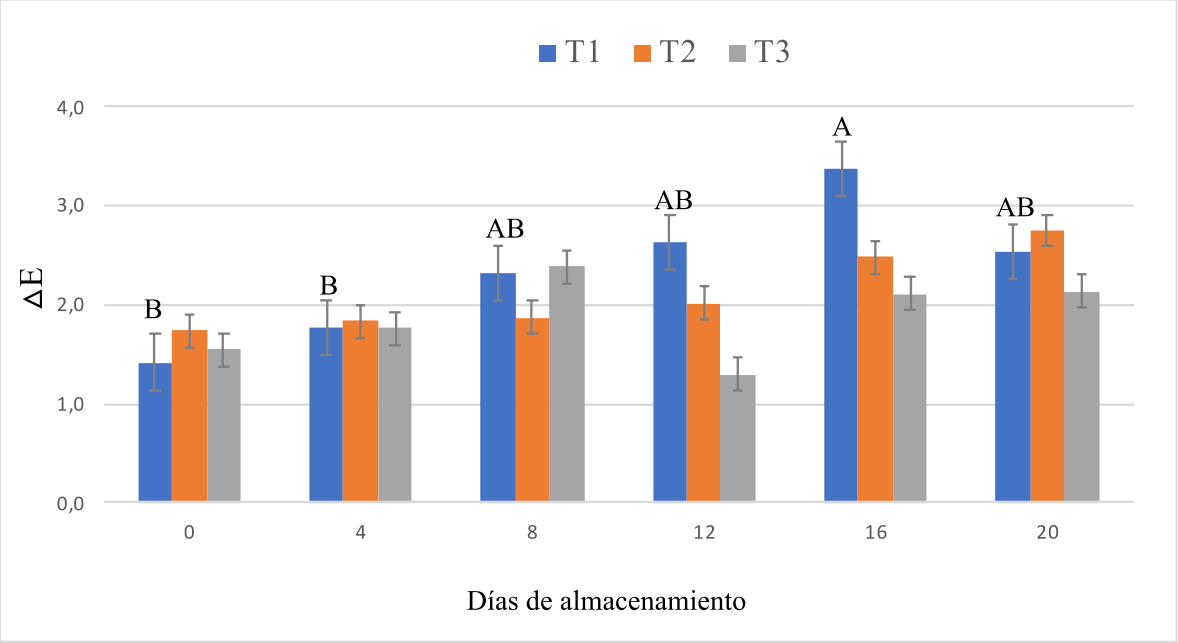


Figura 3-3 Efecto de los empaques activos y tiempo de almacenaje sobre la diferencia total del color (ΔE) de los filetes de carne de cerdo conservada a 4ºC.
A,B Letras diferentes muestran diferencias significativas (P<0.05)
N = 3. Las muestras fueron analizadas por triplicado,
T1: filetes control empacados en un film de polietileno comercial PEBD; T2: filetes empacados en un film comercial de PEBD recubierto con nanofibras de PCL/CH; T3: filetes empacados en un film comercial de PEBD recubierto con nanofibras de PCL/CH/EOP

3.5.1.2. Determinación del pH

Los cambios en el pH de todos los filetes de cerdo durante los 20 días de almacenamiento en frío se muestran en la figura 3-4.

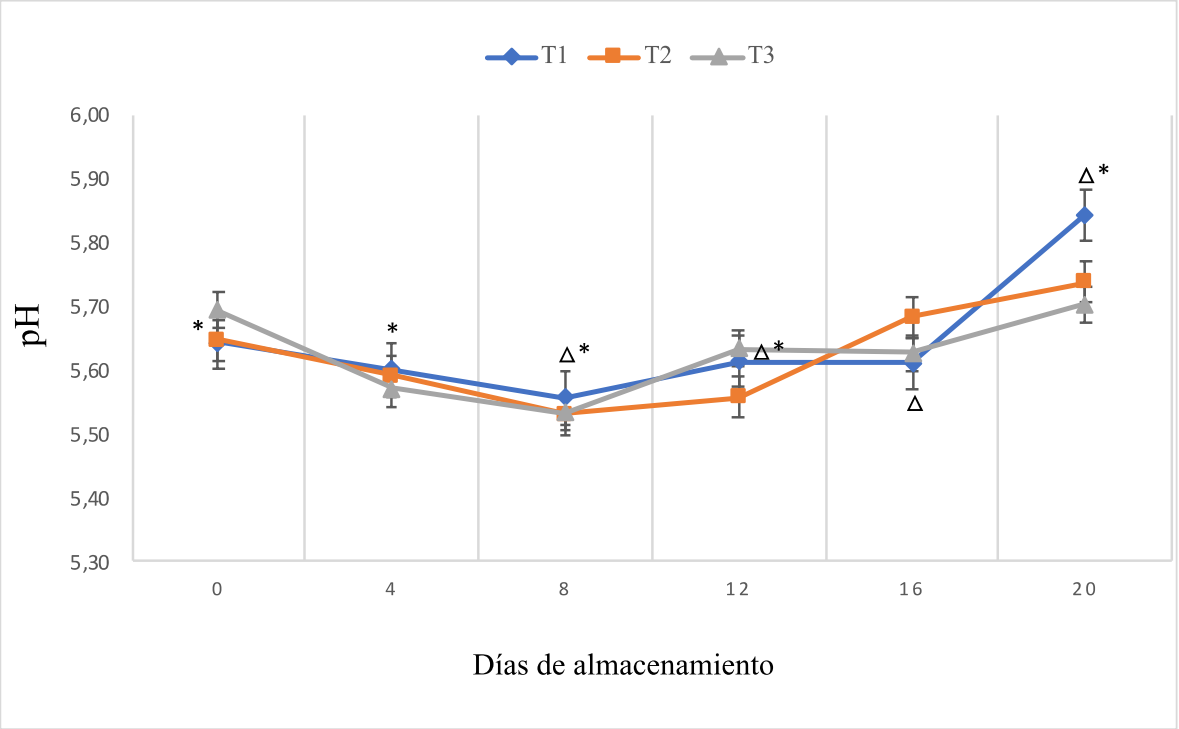


Figura 3-4 Efecto de los empaques activos y tiempo de almacenamiento sobre el pH de la carne de cerdo a 4ºC.
*Δ símbolos diferentes muestran diferencias significativas (P<0.05)
N = 3. Las muestras fueron analizadas por triplicado,
T1: filetes control empacados en un film comercial de PEBD; T2: filetes empacados en un film comercial de PEBD recubierto con nanofibras de PCL/CH; T3: filetes empacados en un film comercial de PEBD recubierto con nanofibras de PCL/CH/EOP

Todas las muestran obtuvieron valores de pH mayores para el día 20 de almacenamiento. La razón principal para el aumento en el pH de las carnes se debe a la acumulación de moléculas de nitrógeno básico volátil debido a la acción de microorganismos (Miao et al., 2015) o de proteasas endógenas de la carne (Fan et al., 2009; Lorenzo, Batlle, y Gómez, 2014), sin embargo, como se ha demostrado en otros estudios, el uso de empaques antimicrobianos puede retrasar el efecto deteriorante de las bacterias ácido lácticas, incrementando así el pH de la carne (Sharafati Chaleshtori y Sharafati Chaleshtori, 2017; Valle et al., 2018); autores como Cao, Warner, y Fang, (2019) y Wang et al., (2016) también han reportado un aumento del pH de la carne de cerdo al recubrirla con quitosano durante el almacenamiento en frío.

Como se muestra en la figura 3-4 en las muestras del tratamiento 3 se observa una disminución continua del pH hasta el día 8 con un posterior incremento para el día 20, este comportamiento puede indicar un crecimiento potencial de bacterias ácido lácticas durante la primera semana de almacenamiento debido a una baja liberación del EOP, sin embargo el incremento del pH para los días posteriores puede sugerir una liberación significativa del EOP en la matriz cárnica, en cambio para las muestras del tratamiento 2 no se observaron cambios significativos del pH a través de tiempo, causado posiblemente a una rápida acción antimicrobiana del quitosano (fig. 3-5 y 3-6) que no permite una disminución significativa del pH en los primeros días de almacenamiento. Por el contrario, para las muestras control se evidenció un aumento significativo del pH para el día 20 de almacenamiento ($P < 0.05$), comportamiento que no se evidencia en los demás tratamientos, este resultado puede sugerir que los empaques recubiertos de nanofibras con quitosano y/o extractos oleosos de propóleos pueden moderar el aumento del pH de las carnes a lo largo del tiempo de almacenamiento en frío.

3.5.1.3. Pérdida de peso

La pérdida de peso de las muestras aumentó a lo largo del tiempo de almacenamiento (Tabla 3-2). Se observó un aumento en la pérdida de peso en el tratamiento T1 a partir del día 4 de almacenamiento, mientras que el aumento significativo de la pérdida de peso de los tratamientos T2 y T3 comenzó a partir del día 8 del período de almacenamiento.

Tabla 3-2 Efecto de los empaques activos y tiempo de almacenamiento sobre la pérdida de peso (%) de la carne de lomo de cerdo conservada a 4ºC

TTO	0	4	8	12	16	20
	Pérdida de peso (%)					
T1	0.87 ± 0.52 ^{B}	3.18 ± 0.98 ^{A}	3.62 ± 1.21 ^{A}	4.23 ± 0.81 ^{A}	4.33 ± 1.54^{A}	4.37 ± 0.45 ^{A}
T2	1.20 ± 0.62 ^{B}	2.55 ± 0.48 ^{B}	4.05 ± 1.01 ^{A}	4.06 ± 0.26 ^{A}	4.31 ± 0.60 ^{A}	5.10 ± 1.22 ^{A}
T3	1.57 ± 0.44 ^{D}	2.37 ± 0.32 ^{D}	4.34 ± 0.11 ^{C}	4.54 ± 0.54 ^{BC}	5.30 ± 0.41^{AB}	5.59 ± 0.77 ^{A}

^{ABC} Valores de la misma fila con superíndices diferentes son significativamente diferentes ($P < 0.05$).
^{abc} Valores de la misma columna con superíndices diferentes son significativamente diferentes ($P < 0.05$).
N = 3. Las muestras fueron analizadas por triplicado,
T1: filetes control empacados en un film comercial de PEBD; T2: filetes empacados en un film comercial de PEBD recubierto con nanofibras de PCL/CH; T3: filetes empacados en un film comercial de PEBD recubierto con nanofibras de PCL/CH/P

El retraso en la pérdida de peso de los tratamientos T2 y T3 podría ser causado por el diámetro ultrafino de las fibras electrohiladas PCL / CH que permiten un contacto líquido-sólido más pequeño y un área de contacto aire-líquido más grande (Sánchez et al., 2016). Por otro lado, la presencia de los EOP en las nanofibras puede reducir la naturaleza hidrofílica del CH (Siripatrawan y Vitchayakitti, 2016) que al repeler el agua permite la retención de la humedad dentro de los filetes de cerdo.

3.5.1.4. Oxidación lipídica

La tabla 3-3 detalla los resultados obtenidos para la oxidación lipídica de los filetes de cerdo. Durante los 20 días de almacenamiento todas las muestras estuvieron por debajo del umbral de rancidez detectable de 0,5 mg de MDA / kg propuesto por Sheard et al., (2000).

Tabla 3-3. Efecto de los empaques activos y tiempo de almacenamiento sobre las sustancias reactivas al ácido 2- tiobarbitúrico (**TBARS**) de la carne de lomo de cerdo conservada a 4ºC

TTO	TBARS (mgMDA/Kg de carne)					
T1	0.023 ± 0.001^{AB}	0.024 ± 0.002 ^{A}	0.023 ± 0.001 ^{B,b}	0.025 ± 0.001^{A}	0.024 ± 0.001^{A}	0.024 ± 0.001^{AB}
T2	0.023 ± 0.002^{C}	0.025 ± 0.002 ^{ABC}	0.026 ± 0.001 ^{AB,a}	0.026 ± 0.003^{A}	0.023 ± 0.001^{BC}	0.025 ± 0.001^{ABC}
T3	0.023 ± 0.002	0.024 ± 0.001	0.024 ± 0.001 ^{ab}	0.026 ± 0.001	0.024 ± 0.001	0.024 ± 0.001

Los empaques bioactivos no presentaron pruebas significativas ($P > 0.05$) de prevenir la oxidación lipídica de los filetes. Estos resultados concuerdan con lo reportado por López-Caballero, Gómez-Guillén, Pérez-Mateos, y Montero, (2005) que no encontraron efectos significativos de revestimientos de gelatina-quitosano sobre la prevención de la oxidación lipídica de filetes de bacalao. Sin embargo, estos resultados difieren de otros estudios que han comprobado actividad antioxidante del quitosano (Cao et al., 2019; Kanatt, Rao, Chawla, y Sharma, 2013) y de los propóleos en el contenido lipídico de alimentos cárnicos (Pobiega et al., 2019a). Este hallazgo no significativo puede deberse a una concentración insuficiente de las sustancias bioactivas para tener un efecto protector en la oxidación lipídica de los filetes de cerdo, dado que la acción antioxidante del quitosano es reportada principalmente cuando este se usa como recubrimiento principal o en adición directa en los alimentos (No et al., 2007), caso similar ha sido reportado para extractos etanólicos de propóleos que son adicionados de manera directa, microencapsulados o en recubrimientos comestibles (Gutiérrez y Suárez, 2014; Piedrahíta et al., 2019; Reis et al., 2017). Las diferencias ($P < 0.05$) entre los tratamientos en el día 8 puede deberse principalmente a un cambio en el contenido lipídico de las muestras testeadas.

3.5.1.5. Análisis microbiológico

Los filetes tuvieron un recuento bacteriano de mesófilos aeróbicos totales de 4.6 log ufc/g, (**Fig. 3-5**) y de bacterias aeróbicas psicrótrofas de 4.7 log ufc/g al inicio del experimento (**Fig. 3-6**). Para ambas pruebas los recuentos bacterianos aumentaron durante el tiempo de

almacenamiento, sin embargo, los filetes empacados en el tratamiento 3 retrasaron el crecimiento bacteriano 4 días más que los otros tratamientos.

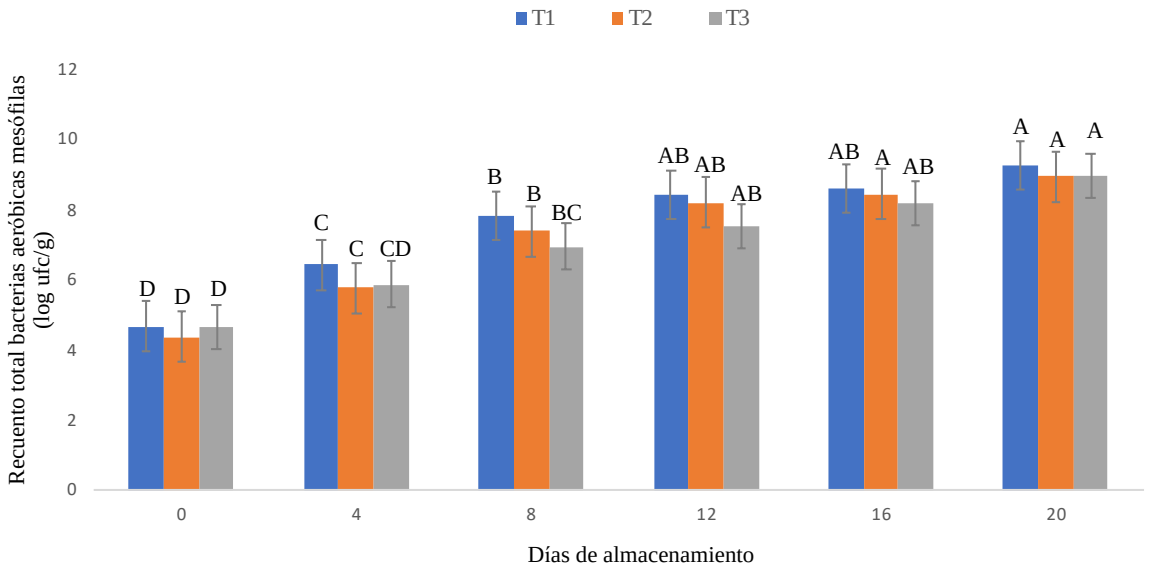


Figura 3-5 Efecto de los empaques activos y tiempo de almacenamiento sobre el recuento de bacterias aeróbicas mesófilas en la carne de cerdo a 4ºC.
A,B,C,D Letras diferentes muestran diferencias significativas (P<0.05)
N = 3. Las muestras fueron analizadas por triplicado,
T1: filetes control empacados en un film comercial de PEBD; T2: filetes empacados en un film comercial de PEBD recubierto con nanofibras de PCL/CH; T3: filetes empacados en un film comercial de PEBD recubierto con nanofibras de PCL/CH/EOP

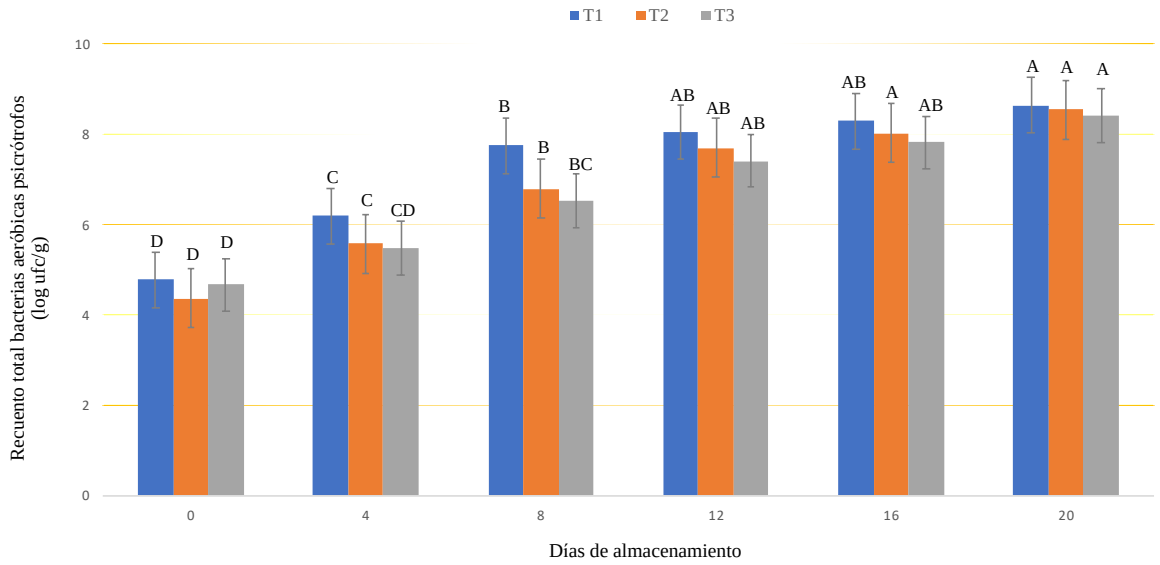


Figura 3-6 Efecto de los empaques activos y tiempo de almacenamiento sobre el recuento de bacterias aeróbicas psicrótrofas en la carne de cerdo a 4ºC.
A,B,C,D Letras diferentes muestran diferencias significativas (P<0.05)
N = 3. Las muestras fueron analizadas por triplicado,
T1: filetes control empacados en un film comercial de PEBD; T2: filetes empacados en un film comercial de PEBD recubierto con nanofibras de PCL/CH; T3: filetes empacados en un film comercial de PEBD recubierto con nanofibras de PCL/CH/EOP

Cabe resaltar que después de 4 horas de almacenamiento (día 0) se puede evidenciar una leve disminución del recuento bacteriano (4.3 ufg/g) (Fig. 3-5 y 3-6) para las muestras empacadas con el tratamiento 2, este resultado podría sugerir una pronta respuesta antimicrobiana del quitosano sobre las bacterias mesófilas y psicrótrofas de los filetes de cerdo causado principalmente por las cargas positivas de los grupos amino; estos grupos protonados influyen en la permeabilidad de las membranas celulares bacterianas debido a la formación de poros que causan la fuga del contenido celular y posterior muerte del microorganismo (Arkoun et al., 2018; Sudarshan, Hoover, y Knorr, 1992; Tian et al., 2019), sin embargo el tratamiento 3 presenta recuentos bacterianos similares al control para el día 0, este fenómeno se puede explicar debido a que la adición de propóleos sobre las soluciones de electrohilado genera una serie de interacciones intermoleculares entre grupos hidroxilo y/o amino de la matriz del quitosano y los grupos funcionales de los extractos de propóleos

(Curcio et al., 2009; Siripatrawan y Vitchayakitti, 2016) enmascarando las cargas positivas del quitosano y con ello neutralizando su efecto antimicrobiano.

Sin embargo como se puede observar en las figuras 3-5 y 3-6 hasta el día 12 de almacenamiento los recuentos bacterianos del tratamiento 3 son menores e iguales al límite máximo permitido que garantiza la calidad microbiológica de las carnes: log 7 ufc/g, (Dong et al., 2017), lo que indica que la adición del extracto oleosos de propóleos en las nanofibras del PCL/CH pueden conservar alrededor de 7 días más la calidad microbiología de los filetes de lomo de cerdo. Estos resultados concuerdan con otros estudios que reportan un efecto antimicrobiano mejorado del quitosano con la adición de extractos etanólicos de propóleos (Siripatrawan y Vitchayakitti, 2016; Torlak y Sert, 2013), y un comportamiento sinérgico de los propóleos al combinarse con otros antimicrobianos (Orsi, Sforcin, Cunha Funari, Fernandes, y Bankova, 2006; Orsi, Fernandes, Bankova, y Sforcin, 2012).

La adición de extractos de propóleos también ha permitido el desarrollado de diferentes nanofibras antimicrobianas de PCL y otros polímeros como polivinilpirrolidona, poliuretano, ácido poliláctico y zeína (Ahi, Renkler, Gul Seker, y Tuzlakoglu, 2019; Asawahame et al., 2015; Kim et al., 2014; Moradkhannejhad, Abdouss, Nikfarjam, Mazinani, y Heydari, 2018; Krit Sutjarittangtham et al., 2014), gracias a la actividad bactericida de los propóleos, atribuida a la capacidad que tienen sus compuestos químicos activos de detener la división de las células bacterianas, destruir la pared celular, el citoplasma bacteriano (Parolia et al., 2010) e interrumpir la síntesis de proteínas (Machado et al., 2017).

Adicionalmente los hallazgos reportados por Mascheroni, Guillard, Nalin, Mora, y Piergiovanni, (2010) sobre la migración de polifenoles de propóleos desde películas poliméricas a matrices alimenticias húmedas y Durán, Marcato, Buffo, De Azevedo, y Esposito, (2007) acerca del aumento significativo de la acción activa de los propóleos al ser encapsulados en micropartículas de PCL, permite sugerir que el efecto antimicrobiano del tratamiento 3 se debe a una acción sinérgica entre el quitosano y los propóleos debido a la liberación y acción de los compuestos activos de los EOP sobre los filetes de cerdo.

3.6. Conclusión

La aplicación de un recubrimiento a base de nanofibras de policaprolactona/quitosano y policaprolactona, quitosano y extractos oleosos de propóleos sobre una película de PEBD, permite extender la calidad fisicoquímica y microbiológica de la carne de cerdo de 4 a 7 días más durante el almacenamiento en refrigeración. La inclusión de propóleos colombianos mejoró la acción antimicrobiana e antioxidante de las nanofibras desarrolladas con quitosano ya que ayudó a controlar los procesos de deterioro de la carne al retrasar la oxidación proteíca y el crecimiento microbiano de bacterias mesófilas y psicrótrofas, lo cual, mantuvo el color, pH y la calidad microbiológica por más tiempo que los otros tratamientos. Sin embargo, las concentraciones de EOP y CH en los empaques activos no fueron suficientes para mostrar un control sobre la oxidación lipídica de los filetes. Por otro lado, el contacto directo del empaque con el filete de cerdo demostró tener un efecto positivo sobre la apariencia del empaque al verse translúcido y al mejorar la estabilidad de los recubrimientos que permanecieron adheridos a la película de PEBD durante todo el tiempo de almacenamiento. Por ultimo, los resultados obtenidos sugieren que el sistema de envasado permitió la liberación y acción de los agentes bioactivos.

3.7. Referencias

Ahi, Z. B., Renkler, N. Z., Gul Seker, M., y Tuzlakoglu, K. (2019). Biodegradable Polymer Films with a Natural Antibacterial Extract as Novel Periodontal Barrier Membranes. *International Journal of Biomaterials*, *2019*. https://doi.org/10.1155/2019/7932470

Ahmed, I., Lin, H., Zou, L., Brody, A. L., Li, Z., Qazi, I. M., … Lv, L. (2017). A comprehensive review on the application of active packaging technologies to muscle foods. *Food Control*, *82*, 163–178. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.06.009

Alparslan, Y., y Baygar, T. (2017). Effect of Chitosan Film Coating Combined with Orange Peel Essential Oil on the Shelf Life of Deepwater Pink Shrimp. *Food and Bioprocess Technology*, *10*(5), 842–853. https://doi.org/10.1007/s11947-017-1862-y

Arkoun, M., Daigle, F., Holley, R. A., Heuzey, M. C., y Ajji, A. (2018). Chitosan-based nanofibers as bioactive meat packaging materials. *Packaging Technology and Science*, *31*(4), 185–195. https://doi.org/10.1002/pts.2366

Asawahame, C., Sutjarittangtham, K., Eitssayeam, S., Tragoolpua, Y., Sirithunyalug, B., y Sirithunyalug, J. (2015). Antibacterial activity and inhibition of adherence of Streptococcus mutans by propolis electrospun fibers. *AAPS PharmSciTech*, *16*(1), 182–191. https://doi.org/10.1208/s12249-014-0209-5

Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, *100*(1), 114–117. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.004

Barrera, E., Gil, J., Restrepo, A., Mosquera, K., y Durango, D. (2015). A coating of chitosan and propolis extract for the postharvest treatment of papaya (Carica papaya L. cv. Hawaiiana). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, *68*(2), 7667–7678. https://doi.org/10.15446/rfnam.v68n2.50982

Cao, Y., Warner, R. D., y Fang, Z. (2019). Effect of chitosan/nisin/gallic acid coating on preservation of pork loin in high oxygen modified atmosphere packaging. *Food Control*, *101*(February), 9–16. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.02.013

Cerkez, I., Sezer, A., y Bhullar, S. K. (2017). Fabrication and characterization of electrospun poly(e-caprolactone) fibrous membrane with antibacterial functionality. *Royal Society Open Science*, *4*(2). https://doi.org/10.1098/rsos.160911

Cui, H., Wu, J., Li, C., y Lin, L. (2017). Improving anti-listeria activity of cheese packaging via nanofiber containing nisin-loaded nanoparticles. *LWT - Food Science and Technology*, *81*, 233–242. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.003

Curcio, M., Puoci, F., Iemma, F., Parisi, O. I., Cirillo, G., Spizzirri, U. G., y Picci, N. (2009). Covalent Insertion of Antioxidant Molecules on Chitosan by a Free Radical Grafting Procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(13), 5933–5938. https://doi.org/10.1021/jf900778u

Dainelli, D., Gontard, N., Spyropoulos, D., Zondervan-van den Beuken, E., y Tobback, P. (2008). Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Trends in Food Science and Technology*, *19*(SUPPL. 1), S103–S112. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.09.011

Dong, T., Song, S., Liang, M., Wang, Y., Qi, X., Zhang, Y., … Jin, Y. (2017). Gas Permeability and Permselectivity of Poly(L-Lactic Acid)/SiOx Film and Its Application in Equilibrium-Modified Atmosphere Packaging for Chilled Meat. *Journal of Food Science*, *82*(1), 97–107. https://doi.org/10.1111/1750-3841.13560

Durán, N., Marcato, P. D., Buffo, C. M. S., De Azevedo, M. M. M., y Esposito, E. (2007). Poly(ε-caprolactone)/propolis extract: Microencapsulation and antibacterial activity evaluation. *Pharmazie*, *62*(4), 287–290. https://doi.org/10.1691/ph.2007.4.6058

Falcão, S. I., Vilas-Boas, M., Estevinho, L. M., Barros, C., Domingues, M. R. M., y Cardoso, S. M. (2010). Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *396*(2), 887–897. https://doi.org/10.1007/s00216-009-3232-8

Fan, W., Sun, J., Chen, Y., Qiu, J., Zhang, Y., y Chi, Y. (2009). Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. *Food Chemistry*, *115*(1), 66–70. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.060

FDA. (2013). *Revised guidelines for the assesment of microbiological quality of processes foods*.

Feng, X., Ng, V. K., Mikš-Krajnik, M., y Yang, H. (2017). Effects of Fish Gelatin and Tea Polyphenol Coating on the Spoilage and Degradation of Myofibril in Fish Fillet During Cold Storage. *Food and Bioprocess Technology*, *10*(1), 89–102. https://doi.org/10.1007/s11947-016-1798-7

Gutiérrez, C., y Suárez, H. (2014). Antimicrobial activity of propolis and its effect on the physicochemical and sensoral characteristics in sausages. *Vitae*, *21*(2), 90–96.

Herring, J. L., Jonnalongadda, S. C., Narayanan, V. C., y Coleman, S. M. (2010). Oxidative stability of gelatin coated pork at refrigerated storage. *Meat Science*, *85*(4), 651–656. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.03.019

Jayasena, D. D., y Jo, C. (2013). Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science y Technology*, *34*(2), 96–108. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.09.002

Kaewprachu, P., Osako, K., Benjakul, S., y Rawdkuen, S. (2015). Quality attributes of minced pork wrapped with catechin–lysozyme incorporated gelatin film. *Food*

Packaging and Shelf Life, *3*. https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2014.11.002

Kanatt, S. R., Rao, M. S., Chawla, S. P., y Sharma, A. (2013). Effects of chitosan coating on shelf-life of ready-to-cook meat products during chilled storage. *LWT - Food Science and Technology*, *53*(1), 321–326. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.01.019

Kim, J. I., Pant, H. R., Sim, H. J., Lee, K. M., y Kim, C. S. (2014). Electrospun propolis/polyurethane composite nanofibers for biomedical applications. *Materials Science and Engineering C*, *44*, 52–57. https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.07.062

López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Pérez-Mateos, M., y Montero, P. (2005). A chitosan–gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids*, *19*(2), 303–311. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.06.006

Lorenzo, J. M., Batlle, R., y Gómez, M. (2014). Extension of the shelf-life of foal meat with two antioxidant active packaging systems. *LWT - Food Science and Technology*, *59*(1), 181–188. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.061

Machado, B. S., Pulcino, T. N., Silva, A. L., Melo, D. T., Silva, R. G., y Mendonça, I. G. (2017). Propolis as an alternative in prevention and control of dental cavity. *Journal of Apitherapy*, *1*(2), 47–50. https://doi.org/10.5455/ja.20160726115117

Mancini, R. A., y Hunt, M. C. (2005). Current research in meat color. *Meat Science*, *71*(1), 100–121. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.03.003

Mascheroni, E., Guillard, V., Nalin, F., Mora, L., y Piergiovanni, L. (2010). Diffusivity of propolis compounds in Polylactic acid polymer for the development of anti-microbial packaging films. *Journal of Food Engineering*, *98*(3), 294–301. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.12.028

Mendes, A. C., Stephansen, K., y Chronakis, I. S. (2017). Electrospinning of food proteins and polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, *68*, 53–68. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.022

Miao, J., Peng, W., Liu, G., Chen, Y., Chen, F., y Cao, Y. (2015). Biopreservative effect of the natural antimicrobial substance from Lactobacillus paracasei subsp. tolerans FX-6 on fresh pork during chilled storage. *Food Control*, *56*, 53–56. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.013

Ministerio de salud y protección social. (2015). *Resolución 2690. Por la cual se establecen las directrices para la formulación del Programa de Verificación Microbiológica del*

Sistema Oficial de Inspección, Vigilancia y Control de la Carne y Productos Cárnicos Comestibles. Retrieved from https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resolución 2690 de 2015.pdf

Moradkhannejhad, L., Abdouss, M., Nikfarjam, N., Mazinani, S., y Heydari, V. (2018). Electrospinning of zein/propolis nanofibers; antimicrobial properties and morphology investigation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *29*(11). https://doi.org/10.1007/s10856-018-6174-x

No, H. K., Meyers, S. P., Prinyawiwatkul, W., y Xu, Z. (2007). Applications of Chitosan for Improvement of Quality and Shelf Life of Foods: A Review. *Journal of Food Science*, *72*(5), R87–R100. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00383.x

Orsi, R. D. O., Sforcin, J. M., Cunha Funari, S. R., Fernandes, A., y Bankova, V. (2006). Synergistic effect of propolis and antibiotics on the Salmonella typhi. *Brazilian Journal of Microbiology*, *37*(2), 108–112. https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000200002

Orsi, R. O., Fernandes, A., Bankova, V., y Sforcin, J. M. (2012). The effects of Brazilian and Bulgarian propolis in vitro against Salmonella Typhi and their synergism with antibiotics acting on the ribosome. *Natural Product Research*, *26*(5), 430–437. https://doi.org/10.1080/14786419.2010.498776

Parolia, A., Thomas, M., Mala, K., y Mohan, M. (2010). Propolis and its potential uses in oral health. *International Journal of Medicine and Medical Sciences*, *2*, 210–215.

Piedrahíta, D. G., Fuenmayor, C. A., y Suárez, H. (2019). Effect of chitosan-propolis edible coatings on stability of refrigerated cachama (Piaractus brachypomus) vacuum-packed fish fillets. *Packaging Technology and Science*, *32*(3), 143–153. https://doi.org/10.1002/pts.2422

Pobiega, K., Kraśniewska, K., y Gniewosz, M. (2019). Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality – A review. *Trends in Food Science and Technology*, *83*(November 2018), 53–62. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.007

Reis, A. S. dos, Diedrich, C., Moura, C. de, Pereira, D., Almeida, J. de F., Silva, L. D. da, … Carpes, S. T. (2017). Physico-chemical characteristics of microencapsulated propolis co-product extract and its effect on storage stability of burger meat during

storage at −15 °C. *LWT - Food Science and Technology*, *76*, 306–313. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.033

Sánchez, Á. P., Vera, R., Muñoz, E. de J., Gómez, E., Bernad, M. J., Maciel, A., y Mu. (2016). Preparación y caracterización de membranas poliméricas electrohiladas de policaprolactona y quitosano para la liberación controlada de clorhidrato de tiamina. *Ciencia En Desarrollo*, *7*(2), 133. https://doi.org/10.19053/01217488.v7.n2.2016.4818

Schlegelová, J., Babák, V., Holasová, M., Konstantinová, L., Necidová, L., Šišák, F., … Jaglic, Z. (2010). Microbial contamination after sanitation of food contact surfaces in dairy and meat processing plants. *Czech Journal of Food Sciences*, *28*(5), 450–461. https://doi.org/10.17221/65/2009-cjfs

Shao, S., Li, L., Yang, G., Li, J., Luo, C., Gong, T., y Zhou, S. (2011). Controlled green tea polyphenols release from electrospun PCL/MWCNTs composite nanofibers. *International Journal of Pharmaceutics*, *421*(2), 310–320. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.09.033

Sharafati Chaleshtori, F., y Sharafati Chaleshtori, R. (2017). Antimicrobial activity of chitosan incorporated with lemon and oregano essential oils on broiler breast meat during refrigerated storage. *Nutrition yamp; Food Science*, *47*(3), 306–317. https://doi.org/10.1108/NFS-08-2016-0123

Sheard, P. R., Enser, M., Wood, J. D., Nute, G. R., Gill, B. P., y Richardson, R. I. (2000). Shelf life and quality of pork and pork products with raised n-3 PUFA. *Meat Science*, *55*(2), 213–221. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00145-X

Silici, S., y Kutluca, S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*, *99*(1), 69–73. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.046

Siripatrawan, U., y Vitchayakitti, W. (2016). Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. *Food Hydrocolloids*, *61*, 695–702. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.001

Škrlep, M., y Čandek - Potokar, M. (2007). PORK COLOR MEASUREMENT AS AFFECTED BY BLOOM TIME AND MEASUREMENT LOCATION. *Journal of Muscle Foods*, *18*(1), 78–87. https://doi.org/10.1111/j.1745-4573.2007.00067.x

Sudarshan, N. R., Hoover, D. G., y Knorr, D. (1992). Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*, *6*(3), 257–272. https://doi.org/10.1080/08905439209549838

Sun, X. D., y Holley, R. A. (2012). Antimicrobial and Antioxidative Strategies to Reduce Pathogens and Extend the Shelf Life of Fresh Red Meats. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *11*(4), 340–354. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2012.00188.x

Sutjarittangtham, K., Sanpa, S., Tunkasiri, T., Chantawannakul, P., Intatha, U., y Eitssayeam, S. (2014). Bactericidal effects of propolis/polylactic acid (PLA) nanofibres obtained via electrospinning. *Journal of Apicultural Research*, *53*(1), 109–115. https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.1.11

Tian, J., Deng, H., Huang, M., Liu, R., Yi, Y., y Dong, X. (2019). Electrospun Nanofibers for Food and Food Packaging Technology. In *Electrospinning: Nanofabrication and Applications*. https://doi.org/10.1016/b978-0-323-51270-1.00015-7

Torlak, E., y Sert, D. (2013). Antibacterial effectiveness of chitosan-propolis coated polypropylene films against foodborne pathogens. *International Journal of Biological Macromolecules*, *60*, 52–55. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.05.013

Valle, P., Garcia Armesto, M., Campos Fernández, J., Posado, A., Arriaga, D., y Rúa, J. (2018). Antimicrobial effects of gallic acid, octyl gallate and propyl gallate on carnobacterium divergens and leuconostoc carnosum originating from meat. *Journal of Food and Nutrition Research*, *57*, 76–86.

Wang, Y., Xia, Y., Zhang, P., Ye, L., Wu, L., y He, S. (2016). Physical Characterization and Pork Packaging Application of Chitosan Films Incorporated with Combined Essential Oils of Cinnamon and Ginger. *Food and Bioprocess Technology*, *10*(3), 503–511. https://doi.org/10.1007/s11947-016-1833-8

Woodruff, M. A., y Hutmacher, D. W. (2010). The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, *35*(10), 1217–1256. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002

Xiao, J., Shi, C., Zheng, H., Shi, Z., Jiang, D., Li, Y., y Huang, Q. (2016). Kafirin Protein Based Electrospun Fibers with Tunable Mechanical Property, Wettability, and Release Profile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(16), 3226–3233.

https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00388

Yang, H., Hewes, D., Salaheen, S., Federman, C., y Biswas, D. (2014). Effects of blackberry juice on growth inhibition of foodborne pathogens and growth promotion of Lactobacillus. *Food Control*, *37*, 15–20. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.042

Zhu, X., Wu, H., Yang, J., Tong, J., Yi, J., Hu, Z., … Fan, L. (2015). Antibacterial activity of chitosan grafting nisin: Preparation and characterization. *Reactive and Functional Polymers*, *91–92*, 71–76. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2015.04.009

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1. Conclusiones

- Los extractos oleosos de propóleos del departamento de Santander se destacaron por su alta actividad antimicrobiana contra bacterias gram positivas. Adicionalmente, estos extractos mostraron una acción moderada contra bacterias gram negativas, lo cual es superior a lo reportado por otros estudios.

- Los extractos oleosos de propóleos del departamento de Santander también mostraron un alto contenido de fenoles totales y una actividad antioxidante captadora de radicales ABTS superior a las reportadas para propóleos de otras regiones colombianas.

- La adición de quitosano en las soluciones de electrohilado aumentó la viscosidad, conductividad y tensión superficial generando amplios defectos en las nanofibras resultantes, sin embargo, les concedió acción antimicrobiana.

- La adición de EOP en las soluciones de electrohilado disminuyó su viscosidad, conductividad y tensión superficial mejorando las condiciones del electrohilado y con ello la morfología de las nanofibras.

- La adición de los EOP generó una interacción intermolecular entre los grupos funcionales del quitosano y los EOP mostrando cambios en las características de las soluciones y de las nanofibras, como el enmascarando de la actividad antimicrobiana

del quitosano, sin embargo, los EOP presentaron un efecto sinérgico antimicrobiano cuando este fue liberado.

- La técnica de electrohilado de superficie libre de alambre permitió el electrohilado de las soluciones de PCL/CH/EOP para desarrollar recubrimientos a base de nanofibras con alta eficiencia de encapsulación y utilizando poca materia prima con el fin de desarrollar empaques activos para alimentos.

- La aplicación de los empaques activos que contienen nanofibras de PCL/CH y PCL/CH/EOP permitió extender la calidad de la carne de cerdo durante el almacenamiento en refrigeración.

- La inclusión de EOP mejoró la acción antimicrobiana y antioxidante de las nanofibras desarrolladas con quitosano, manteniendo el color, pH y la calidad microbiológica de la carne de cerdo hasta 7 días más.

- El empaquetamiento directo del empaque sobre los filetes de cerdo mejoró la estabilidad de los recubrimientos y permitió la liberación y acción de los compuestos activos.

- En base a nuestro conocimiento, este es el primer estudio realizado a nivel internacional que demuestra que las soluciones de PCL/CH y/o EOP son exitosamente electrohiladas mediante el uso de una técnica de electrohilado de superficie libre.

- El desarrollo de un sistema de envasado activo que utiliza un film de polietileno lineal de baja densidad recubierto con nanofibras del PCL/CH que incorporan EOP colombianos permitió preservar las características de calidad de la carne de cerdo durante más tiempo.

4.2. Recomendaciones

- Se precisa estudios adicionales que permitan la caracterización química de los extractos oleosos de propóleos del departamento de Santander, para poder identificar sus principales compuestos activos y con ello avanzar en la estandarización y caracterización de los propóleos nacionales.

- Es necesario realizar estudios adicionales que mediante el uso de diferentes concentraciones de los polímeros y los bioactivos, a la vez que se varían los parámetros de electrohilado permitan estandarizar las soluciones para desarrollar nanofibras sin defectos que puedan ser usadas directamente como envases activos de alimentos.

- Es necesario estudios precisos de liberación controlada de las nanofibras de PCL/CH que permitan determinar el tiempo y el comportamiento preciso de liberación de los EOP.

- Debido que el empaque demostró una liberación lenta del EOP, se recomienda la realización de pruebas que detecten la acción antimicrobiana del empaque durante un tiempo más prolongado.

- Se recomienda realizar más estudios que utilicen nanofibras con EOP colombianos para determinar todas sus propiedades bioactivas incluidas propiedades antitumorales, antiinflamatorias, entre otras, que han sido reportadas para los propóleos colombianos y que permitan la aplicación de estas nanofibras en otros campos científicos.

- Se precisa el desarrollo de investigaciones que utilicen otras matrices alimentarias para determinar la eficiencia de estas nanofibras en el envasado activo de alimentos

- Se recomienda determinar si existen alteraciones sensoriales en los productos a través de la realización de pruebas de textura, cocción y sensoriales sobre los productos envasados en estos empaques activos.

A. Anexo: Ponencia modalidad póster científico congreso 9º shelf life international meeting

SLiM 2019
SHELF LIFE INTERNATIONAL MEETING

9° Shelf Life International Meeting

CERTIFICATE OF *ATTENDANCE*

Naples, Italy
June 17 - 20th 2019
Congress Center Federico II

We hereby confirm that

"Development and physicochemical caracterización of chitosan films containing Colombian essential oil of propolis: potencial as a antimicrobial and antioxidant carrier for packaging" by Emeli Vargas, Héctor Suárez, Loong-Tak Lim

was presented in the congress

9° SHELF LIFE INTERNATIONAL MEETING
17-20 June 2019 | Naples, Italy

organized by

GSICA
GRUPPO SCIENTIFICO ITALIANO DI CONFEZIONAMENTO ALIMENTARE

GSICA President
Prof. Luciano Piergiovanni

Università degli Studi di Napoli Federico II

Department of Agricultural Science
Prof. Elena Torrieri

IPCB Istituto per i Polimeri Compositi e Biomateriali
Consiglio Nazionale delle Ricerche

Institute of Polymers, Composites and Biomaterials
Dr. Giovanna G. Buonocore

PNM45-Development and physicochemical characterization of chitosan films containing Colombian essential oil of propolis: Potential as an antimicrobial and antioxidant carrier for packaging.

Emeli Vargas[1]*, *Héctor Suárez*[1], *Loong-tak Lim*[2].

[1] Institute of Food Science and Technology (ICTA), National University of Colombia. Bogotá, Av. Kr. 30 # 45-03, 111321 Colombia.
[2] Department of Food Science, University of Guelph, Guelph, ON N1G2W1, Canada
* Corresponding author: edvargasr@unal.edu.co

Abstract:

Nowadays healthy, nutritional and mildly processed products are highly demanded by consumers. These requirements have led that edible films had remarkable growth investigative in recent years due they can increase shelf life and enhance food quality, stability, and safety. The chitosan has been used for food packaging due its excellent properties, besides it has been used the addition of antimicrobial compounds and/or antioxidants in the film enhance its effectiveness. The antimicrobial activity of films-based chitosan has been studied by using different active components such as essential oils of cinnamon, cloves, lemon, thyme et others. However, there aren't studies related to the design of the chitosan films with essential oil of propolis (EOP). The EOP are comprising fixed and volatile constituents, propolis has a highly variable chemical composition, depending on local vegetation. Colombian EOP (CEOP) have not been investigated yet, despite the relative scarcity of studies on the EOP from different world regions had demonstrated to have antifungal and antibacterial properties that not associated with induction of DNA damage, thus suggesting the potential utility of employing as natural preservative. Therefore, the aims of this work were to investigate the physical, mechanical barrier and antibacterial properties of chitosan-based films with CEOP. Concentrations: 0.5, 1, and 1.5% of CEOP were incorporated into the chitosan-based film formulation, the characterization of the films were done using test for: film thickness, moisture, water vapour permeability, optical, tensile properties and antimicrobial activity. The CEOP proved to have antimicrobial activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria with a good antioxidant response. Chitosan based films with CEOP did not show adverse effect in tensile and optical properties, the EOP improved water vapor permeability and antimicrobial activity of Chitosan based films. In conclusion, the application of CEOP to Chitosan based films provide microbiological and antioxidant properties and improve water vapor permeability, the use of these oils generates opportunities to develop edible films in real products that it can provide a novel way to enhance the safety and shelf-life in food systems which is expected to have an important impact on the food market in the following years.

Keywords: *Colombian essential oil of propolis, chitosan, films, antimicrobial activity.*

Development and physicochemical characterization of chitosan films containing Colombian essential oil of propolis:

Potential as an antimicrobial and antioxidant carrier for packaging

Emeli Vargas*[1], Héctor Suárez[1], Loong-Tak Lim[2]

[1] Institute of Food Science and Technology (ICTA), National University of Colombia. Bogotá, Av. Kr. 30 # 45-03, 111321 Colombia
[2] Department of Food Science, University of Guelph, Guelph, ON N1G2W1, Canada
* Corresponding author: edvargasr@unal.edu.co

Introduction

Active food packaging use

- Bio-based functional packaging materials
- Natural active compounds
- To enhance food quality and safety

Chitosan

- Linear polysaccharide
- The second most abundant in the nature
- Antimicrobial and antioxidant properties
- Natural food preservative

Propolis

- Natural resinous substance collected by honeybees
- Antimicrobial and antioxidant properties
- Contains a variety of chemical compounds that depend on the geographical area of production
- Mainly polyphenols, sesquiterpene quinines, coumarins, amino acids and inorganic compounds

Incorporation of propolis as an active agent in chitosan films

Objective

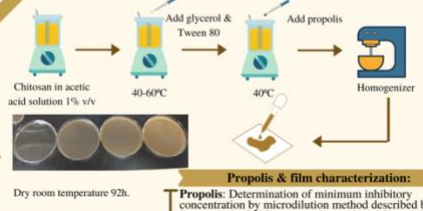
Develop and characterize chitosan films with enhanced functional properties for active food packaging by incorporating Colombian propolis essential oil into chitosan

Materials & Methods

Colombian propolis essential oil: Obtained using a solvent extraction method described by Li, et al. (2011) with modifications.

Film production: Blending of low and medium molecular weight chitosan (2%, w/v) in 1% (v/v) acetic acid solution with constant agitation. Glycerol and Tween 80 were added at 30% (w/w of chitosan). Finally, 5, 10 and 20% (w/w of chitosan) propolis were added. Air bubbles in the film forming solutions were removed using a vacuum pump and then dried at room temperature over 92h.

Preparation of solution for the coatings



Propolis & film characterization:

Propolis: Determination of minimum inhibitory concentration by microdilution method described by Bonou et al. (2016) on propolis produced from 4 different regions of Colombia, against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia Coli* ATCC 25922, *Salmonella spp.*

Film: Thickness, moisture content, swelling degree as described by Bajić et al. (2019).
Water vapour permeability was determined based on ASTM E96.
Total phenolic content was measured by Folin-Ciocalteu method Singleton et al.(1999).
Optical properties were evaluated using CIELAB scales.

Statistical analysis

One-way analysis of variance (ANOVA) at confidence level of 95% ($p < 0.05$) followed by Fisher's test.

Results

Antimicrobial properties of Colombian essential oil of propolis

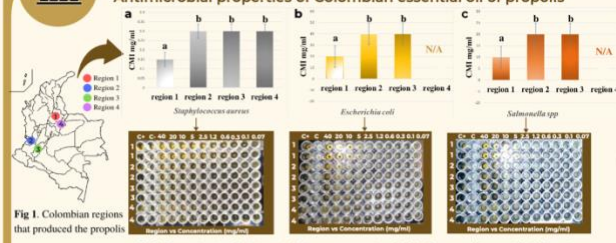


Fig 1. Colombian regions that produced the propolis

Fig 2. Determination of minimum inhibitory concentration of Colombian propolis essential oil from 4 different regions on a) *Staphylococcus aureus;* b) *Escherichia coli;* c) *Salmonella spp.*

Water vapor permeability & Thickness of chistosan-based films

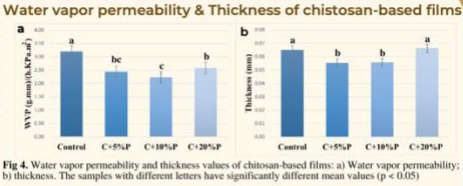


Fig 4. Water vapor permeability and thickness values of chitosan-based films: a) Water vapor permeability; b) thickness. The samples with different letters have significantly different mean values ($p < 0.05$)

Total phenolic content of chistosan-based films

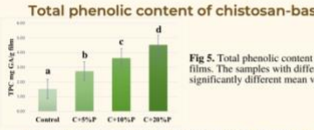


Fig 5. Total phenolic content (TPC) of chitosan-based films. The samples with different letters have significantly different mean values ($p < 0.05$)

Moisture content & swelling degree of chistosan-based films

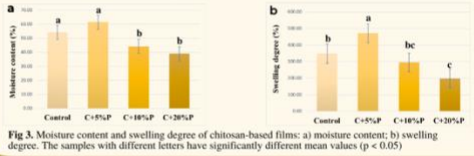


Fig 3. Moisture content and swelling degree of chitosan-based films: a) moisture content; b) swelling degree. The samples with different letters have significantly different mean values ($p < 0.05$)

Optical properties of chistosan-based films

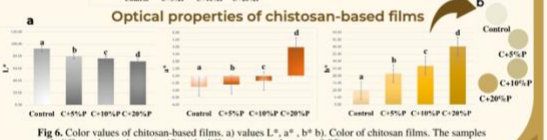


Fig 6. Color values of chitosan-based films. a) values L*, a* , b* b). Color of chitosan films. The samples with different letters have significantly different mean values ($p < 0.05$)

Conclusions & Future Work

- Propolis oils of different origins showed different antimicrobial activities. Propolis oils were more effective against gram-positive bacteria
- Moisture content, swelling degree and WVP values decreased when chitosan film was incorporated with propolis, due to the existence of intermolecular interactions between polymer and propolis oils
- The incorporation of propolis oils has led to increased the hydrophobic character of films
- Phenolic content improved as propolis oils increased
- Increasing propolis concentration resulted in brown color films as compared to light yellow control films
- An active chitosan film with propolis oils could be used as antimicrobial and antioxidant packaging materials, such as for extending the shelf life of meat products

References

1. Anjum, S.I., et al. Saudi Journal of Biological Sciences. In press (2018)
2. Siripatrawan, U., et al. Food Hydrocolloids, 61 (2016) 695-702
3. Bajić, M., et al. Carbohydrate Polymers, 219 (2019) 261-268
4. Pastor, C., et al. Carbohydrate Polymers, 82 (2010) 1174-1183
5. Bonou, J., et al. Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research, 4 (2016) 43-49
6. Mujtaba, M., et al. International Journal of Biological Macromolecules, 121 (2019) 889–904
7. Li, Y-J., Human and Experimental Toxicology, 2 (2012)157–165

Acknowledgements

The authors acknowledge the supports from the universities, departments and workers of the research laboratories

B. Estancia de investigación en la Universidad de Guelph, Canadá. Department of Food Science

UNIVERSITY of GUELPH

ONTARIO AGRICULTURAL COLLEGE

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE

10 Sep 2018

Re: Support Letter for Dr. Emeli Vargas Romero's Research Visit

To whom it may concern:

This letter is to confirm our intent to host Dr. Emeli Vargas Romero's visit here in the Department of Food Science at the University of Guelph, Canada. The University of Guelph is located in Guelph, Ontario and from a research standpoint, ranks as a top-tier agricultural and food university in North America.

Emeli's visit is to be supported by a grant from the Universidad Nacional de Colombia, focusing on the development of chitosan edible film, incorporated with propolis essential oil, for the preservation of meat fillets. Dr. Lim will support her research on the development and characterization of the proposed composite films, while the efficacy of the antimicrobial films/coatings on meat will be evaluated in Dr. Bohrer's laboratory.

Specific duties that we would ask of Emeli include, but are not limited to: experimental design and execution of research, analysis of research results using critical thinking and statistically-valid approaches, and communication of research results through scientific writing and oral presentation.

Dr. Romero's visit is expected to begin in 1 February 2019 and be completed on 31 July 2019. If you have any questions regarding Dr. Romero's visit, kindly contact us.

Sincerely,

Benjamin M. Bohrer

Benjamin Bohrer, PhD.
Email: bbohrer@uoguelph.ca

Loong-Tak Lim, PhD.
Email: llim@uoguelph.ca

Department of Food Science
50 Stone Road East
Guelph, Ontario, Canada N1G 2W1
T 519-824-4120 x56934
example@uoguelph.ca
uoguelph.ca/foodscience

IMPROVE LIFE.

UNIVERSITY of GUELPH

ONTARIO AGRICULTURAL COLLEGE

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE

August 30, 2019

Re: Support Letter for Emeli Vargas Romero's Research Visit

To whom it may concern:

This letter is to confirm my intent to host Emeli Vargas Romero's visit here in the Department of Food Science at the University of Guelph, Canada. The University of Guelph is located in Guelph, Ontario and from a research standpoint, ranks as a top-tier agricultural and food university in North America.

The purpose of Emeli's visit is to complete a research project focusing on the evaluation of the efficacy of antimicrobial films/coatings on meat products. Emeli will work in my lab under the supervision and direction of me during the time period of October 10, 2019 to November 29, 2019.

Specific duties for Emeli will include, but are not limited to:

- Experimental design and execution of research
- Analysis of research findings using critical thinking and statistically-valid approaches
- Communication of research findings through scientific writing and oral presentation

If you have any questions regarding Emeli's visit, please do not hesitate to contact me directly.

Sincerely,

Benjamin M. Bohrer

Benjamin Bohrer, PhD.
Email: bbohrer@uoguelph.ca
Phone: 1-519-824-4120 ext. 52486

Department of Food Science
50 Stone Road East
Guelph, Ontario, Canada N1G 2W1
T 519-824-4120 x56934
example@uoguelph.ca
uoguelph.ca/foodscience

IMPROVE LIFE.

Bibliografía

Adomavičiūté, E., Stanys, S., Žilius, M., Juškaite, V., Pavilonis, A., & Briedis, V. (2016). Formation and Biopharmaceutical Characterization of Electrospun PVP Mats with Propolis and Silver Nanoparticles for Fast Releasing Wound Dressing. *BioMed Research International*, *2016*. https://doi.org/10.1155/2016/4648287

Aguirre, J., Leonzapata, M., Alvarezperez, O., Torres, C., Nieto-oropeza, D., Ventura-sobrevilla, J., … Elena, M. (2018). Packaging for Foods. In *Food Packaging and Preservation*. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811516-9/00001-4

Ahi, Z. B., Renkler, N. Z., Gul Seker, M., & Tuzlakoglu, K. (2019). Biodegradable Polymer Films with a Natural Antibacterial Extract as Novel Periodontal Barrier Membranes. *International Journal of Biomaterials*, *2019*. https://doi.org/10.1155/2019/7932470

Ahmed, I., Lin, H., Zou, L., Brody, A. L., Li, Z., Qazi, I. M., … Lv, L. (2017). A comprehensive review on the application of active packaging technologies to muscle foods. *Food Control*, *82*, 163–178. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.06.009

Akbarian, A., Hadidi, M., Moayedi, F., & Akbarian, M. (2014). Effect of high pressure processing of food characteristics: a review of quality aspect. *International Journal of Biosciences*. https://doi.org/10.12692/ijb/4.10.193-205

Alborzi, S., Lim, L.-T., & Kakuda, Y. (2010). Electrospinning of sodium alginate-pectin ultrafine fibers. *Journal of Food Science*, *75*(1), C100-7. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01437.x

Alborzi, S., Lim, L.-T., & Kakuda, Y. (2014). Release of folic acid from sodium alginate-pectin-poly(ethylene oxide) electrospun fibers under in vitro conditions. *LWT - Food Science and Technology*, *59*(1), 383–388. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.008

Ali, F. H., Kassem, G. M., & Atta-Alla, O. A. (2010). Propolis as a natural decontaminant

and antioxidant in fresh oriental sausage. *Veterinaria Italiana*, *46*(2), 167–172.

Alparslan, Y., & Baygar, T. (2017). Effect of Chitosan Film Coating Combined with Orange Peel Essential Oil on the Shelf Life of Deepwater Pink Shrimp. *Food and Bioprocess Technology*, *10*(5), 842–853. https://doi.org/10.1007/s11947-017-1862-y

Amaya, J. (2019). Estudio de la dosificación del almidón extraído del banano en un polímero de tipo termoplástico. *Revista Colombiana de Química*, *48*, 43–51. https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v48n1.74469

An, J., Zhang, H., Zhang, J., Zhao, Y., & Yuan, X. (2009). Preparation and antibacterial activity of electrospun chitosan/poly(ethylene oxide) membranes containing silver nanoparticles. *Colloid and Polymer Science*, *287*(12), 1425–1434. https://doi.org/10.1007/s00396-009-2108-y

Anjum, S. I., Ullah, A., Khan, K. A., Attaullah, M., Khan, H., Ali, H., … Dash, C. K. (2018). Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.08.013

Anu Bhushani, J., & Anandharamakrishnan, C. (2014). Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food based applications. *Trends in Food Science & Technology*, *38*(1), 21–33. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.03.004

Arifin, D. Y., Lee, L. Y., & Wang, C.-H. (2006). Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *58*(12–13), 1274–1325. https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.007

Arıkan, H. K., & Solak, H. H. (2017). Propolis Extract-PVA Nanocomposites of Textile Design: Antimicrobial Effect on Gram Positive and Negative Bacterias. *International Journal of Secondary Metabolite*, *4*(1), 218–224. https://doi.org/10.21448/ijsm.371563

Arkoun, M., Daigle, F., Heuzey, M. C., & Ajji, A. (2017). Antibacterial electrospun chitosan-based nanofibers: A bacterial membrane perforator. *Food Science and Nutrition*, *5*(4), 865–874. https://doi.org/10.1002/fsn3.468

Arkoun, M., Daigle, F., Holley, R. A., Heuzey, M. C., & Ajji, A. (2018). Chitosan-based nanofibers as bioactive meat packaging materials. *Packaging Technology and Science*, *31*(4), 185–195. https://doi.org/10.1002/pts.2366

Arvanitoyannis, I. S., & Stratakos, A. C. (2012). Application of Modified Atmosphere Packaging and Active/Smart Technologies to Red Meat and Poultry: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, *5*(5), 1423–1446. https://doi.org/10.1007/s11947-012-0803-z

Asawahame, C., Sutjarittangtham, K., Eitssayeam, S., Tragoolpua, Y., Sirithunyalug, B., & Sirithunyalug, J. (2015). Antibacterial activity and inhibition of adherence of Streptococcus mutans by propolis electrospun fibers. *AAPS PharmSciTech*, *16*(1), 182–191. https://doi.org/10.1208/s12249-014-0209-5

Augustin, M. A., & Hemar, Y. (2009). Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*, *38*(4), 902–912. https://doi.org/10.1039/B801739P

Aysun. (2017). Effects of Propolis on Eggshell. In *Egg innovations and strategies for improvements*. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800879-9/00014-7

Bajpai, A. K., Shukla, S., Bhanu, S., & Kankane, S. (2008). Responsive Polymers in Controlled Drug Delivery. *Progress in Polymer Science*, *33*, 1088–1118. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2008.07.005

Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, *100*(1), 114–117. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.004

Bankova, V., Bertelli, D., Borba, R., Conti, B. J., da Silva Cunha, I. B., Danert, C., … Zampini, C. (2016). Standard methods for Apis mellifera propolis research. *Journal of Apicultural Research*, *58*(2), 1–49. https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1222661

Barrera, E., Gil, J., Restrepo, A., Mosquera, K., & Durango, D. (2015). A coating of chitosan and propolis extract for the postharvest treatment of papaya (Carica papaya L. cv. Hawaiiana). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, *68*(2), 7667–7678. https://doi.org/10.15446/rfnam.v68n2.50982

Bastos, E., Guzmán, D., Judith, F., Tello, J., & Scoaris, D. (2011). CARACTERIZACIÓN ANTIMICROBIANA Y FISICOQUÍMICA DE PROPÓLEOS DE Apis mellifera L. (HYMENOPTERA: APIDAE) DE LA REGIÓN ANDINA COLOMBIANA Antimicrobial and Physico-Chemical Characterization of Propolis of Apis mellifera L. (Hymenoptera: Apidae) from the Colom. *Acta Biologica Colombiana*, *16*, 175–184.

Bell, R. G., Penney, N., & Moorhead, S. M. (1995). Growth of the psychrotrophic pathogens Aeromonas hydrophila, Listeria monocytogenes and Yersinia enterocolitica on smoked blue cod (Parapercis colias) packed under vacuum or carbon dioxide. *International Journal of Food Science & Technology*, *30*(4), 515–521. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb01398.x

Bhardwaj, N., & Kundu, S. C. (2010). Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, *28*(3), 325–347. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004

Bi, F., Zhang, X., Bai, R., Liu, Y., Liu, J., & Liu, J. (2019). Preparation and characterization of antioxidant and antimicrobial packaging films based on chitosan and proanthocyanidins. *International Journal of Biological Macromolecules*, *134*, 11–19. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.042

Bolton, D. J., Pearce, R. A., Sheridan, J. J., Blair, I. S., McDowell, D. A., & Harrington, D. (2002). Washing and chilling as critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point (HACCP) systems. *Journal of Applied Microbiology*, *92*(5), 893–902. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01599.x

Bonou, J., Ahouandjinou, H., F.Baba-Moussa, Adéoti, Z., Metongnon, I., V.Dougnon, … And, F. T. (2016). Assessment of the antimicrobial activity of essential oils from some Beninese medicinal plants : Influence of different tweens. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, *4*(September), 43–49. Retrieved from http://dx.doi.org/10.15739/ibspr.16.006

Borch, E., Kant-Muermans, M.-L., & Blixt, Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, *33*(1), 103–120. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01135-X

Bors, W., Heller, W., Michel, C., & Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*, *186*, 343–355. https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86128-i

Brettmann, B. K., Tsang, S., Forward, K. M., Rutledge, G. C., Myerson, A. S., & Trout, B. L. (2012). Free surface electrospinning of fibers containing microparticles. *Langmuir*,

28(25), 9714–9721. https://doi.org/10.1021/la301422x

Brewer, M. S., Mckeith, F., Martin, S. E., Dallmier, A. W., & Meyer, J. (1991). Sodium Lactate Effects on Shelf-Life, Sensory, and Physical Characteristics of Fresh Pork Sausage. *Journal of Food Science*, *56*(5), 1176–1178. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb04727.x

Camo, J., Beltran, J. A., & Roncales, P. (2008). Extension of the display life of lamb with an antioxidant active packaging. *Meat Science*, *80*(4), 1086–1091. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.04.031

Cao, Y., Warner, R. D., & Fang, Z. (2019). Effect of chitosan/nisin/gallic acid coating on preservation of pork loin in high oxygen modified atmosphere packaging. *Food Control*, *101*(February), 9–16. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.02.013

Carpenter, R., O'Grady, M. N., O'Callaghan, Y. C., O'Brien, N. M., & Kerry, J. P. (2007). Evaluation of the antioxidant potential of grape seed and bearberry extracts in raw and cooked pork. *Meat Science*, *76*(4), 604–610. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.01.021

Carrillo, M. L., Castillo, L. N., & Mauricio, R. (2011). Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Extractos de Propóleos de la Huasteca Potosina (México). *Inf. Tecnol. [Online].*, *22*, 21–28. Retrieved from http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642011000500004&nrm=iso

Carroll, C. P., & Joo, Y. L. (2006). Electrospinning of viscoelastic Boger fluids: Modeling and experiments. *Physics of Fluids*, *18*(5), 53102. https://doi.org/10.1063/1.2200152

Casper, C. L., Stephens, J. S., Tassi, N. G., Chase, D. B., & Rabolt, J. F. (2004). Controlling Surface Morphology of Electrospun Polystyrene Fibers: Effect of Humidity and Molecular Weight in the Electrospinning Process. *Macromolecules*, *37*(2), 573–578. https://doi.org/10.1021/ma0351975

Castelo, M., Kang, D., Siragusa, G., Koohmaraie, M., & Berry, E. (2001). Evaluation of Combination Treatment Processes for the Microbial Decontamination of Pork Trim. *Journal of Food Protection*, *64*, 335–342. https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.3.335

Cengiz, F., Krucińska, I., Gliścińska, E., Chrzanowski, M., & Göktepe, F. (2009). Comparative analysis of various electrospinning methods of nanofibre formation.

Fibres and Textiles in Eastern Europe, *72*(1), 13–19.

Cerkez, I., Sezer, A., & Bhullar, S. K. (2017). Fabrication and characterization of electrospun poly(e-caprolactone) fibrous membrane with antibacterial functionality. *Royal Society Open Science*, *4*(2). https://doi.org/10.1098/rsos.160911

Ceylan, Z., Sengor, G. F., Sağdıç, O., & Yilmaz, M. T. (2017). A novel approach to extend microbiological stability of sea bass (Dicentrarchus labrax) fillets coated with electrospun chitosan nanofibers. *LWT - Food Science and Technology*, *79*, 367–375. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.062

Ceylan, Z., Sengor, G. F. U., & Yilmaz, M. T. (2017). A Novel Approach to Limit Chemical Deterioration of Gilthead Sea Bream (Sparus aurata) Fillets: Coating with Electrospun Nanofibers as Characterized by Molecular, Thermal, and Microstructural Properties. *Journal of Food Science*, *82*(5), 1163–1170. https://doi.org/10.1111/1750-3841.13688

Chen, F., Li, X., Mo, X., He, C., Wang, H., & Ikada, Y. (2008). Electrospun chitosan-P(LLA-CL) nanofibers for biomimetic extracellular matrix. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, *19*(5), 677–691. https://doi.org/10.1163/156856208784089661

Cipitria, A., Skelton, A., Dargaville, T. R., Dalton, P. D., & Hutmacher, D. W. (2011). Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds - A review. *Journal of Materials Chemistry*, *21*(26), 9419–9453. https://doi.org/10.1039/c0jm04502k

Cockburn, A., Bradford, R., Buck, N., Constable, A., Edwards, G., Haber, B., … Wildemann, T. (2012). Approaches to the safety assessment of engineered nanomaterials (ENM) in food. *Food and Chemical Toxicology*, *50*(6), 2224–2242. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.12.029

Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*, *78*(1), 90–103. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.035

Cui, H., Wu, J., Li, C., & Lin, L. (2017). Improving anti-listeria activity of cheese packaging via nanofiber containing nisin-loaded nanoparticles. *LWT - Food Science and*

Technology, *81*, 233–242. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.003

Curcio, M., Puoci, F., Iemma, F., Parisi, O. I., Cirillo, G., Spizzirri, U. G., & Picci, N. (2009). Covalent Insertion of Antioxidant Molecules on Chitosan by a Free Radical Grafting Procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(13), 5933–5938. https://doi.org/10.1021/jf900778u

Cutter, C., & Sumner, S. (2002). *Application Of Edible Coatings On Muscle Foods*. 467–484. https://doi.org/10.1201/9781420031980.ch18

Dai, R., & Lim, L.-T. (2015). Release of allyl isothiocyanate from mustard seed meal powder entrapped in electrospun PLA–PEO nonwovens. *Food Research International*, *77*, 467–475. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.029

Dainelli, D., Gontard, N., Spyropoulos, D., Zondervan-van den Beuken, E., & Tobback, P. (2008). Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Trends in Food Science and Technology*, *19*(SUPPL. 1), S103–S112. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.09.011

Dave, D., & Ghaly, A. E. (2011). Meat spoilage mechanisms and preservation techniques: A critical review. *American Journal of Agricultural and Biological Science*, *6*(4), 486–510. https://doi.org/10.3844/ajabssp.2011.486.510

Deitzel, J. M., Kleinmeyer, J., Harris, D., & Beck Tan, N. C. (2001). The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer*, *42*(1), 261–272. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00250-0

Dong, T., Song, S., Liang, M., Wang, Y., Qi, X., Zhang, Y., … Jin, Y. (2017). Gas Permeability and Permselectivity of Poly(L-Lactic Acid)/SiOx Film and Its Application in Equilibrium-Modified Atmosphere Packaging for Chilled Meat. *Journal of Food Science*, *82*(1), 97–107. https://doi.org/10.1111/1750-3841.13560

Drosou, C. G., Krokida, M. K., & Biliaderis, C. G. (2017). Encapsulation of bioactive compounds through electrospinning/electrospraying and spray drying: A comparative assessment of food-related applications. *Drying Technology*, *35*(2), 139–162. https://doi.org/10.1080/07373937.2016.1162797

Durán, N., Marcato, P. D., Buffo, C. M. S., De Azevedo, M. M. M., & Esposito, E. (2007). Poly(ε-caprolactone)/propolis extract: Microencapsulation and antibacterial activity evaluation. *Pharmazie*, *62*(4), 287–290. https://doi.org/10.1691/ph.2007.4.6058

Egan, A. F. (1983). Lactic acid bacteria of meat and meat products. *Antonie van Leeuwenhoek*, *49*(3), 327–336. https://doi.org/10.1007/BF00399507

Eleftheriadou, A., Samouris, G., Ioannidou, M., & Kasapidou, E. (2010). Changes in lipid oxidation and fatty acid composition in pork and poultry meat during refrigerated and frozen storage. *Archiv Für Lebensmittelhygiene*, *61*, 173–178. https://doi.org/10.2376/0003-925X-61-173

Enser, M., Hallett, K., Hewitt, B., Fursey, G. A. J., & Wood, J. D. (1996). Fatty acid content and composition of english beef, lamb and pork at retail. *Meat Science*, *42*(4), 443–456. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0309-1740(95)00037-2

Falcão, S. I., Vilas-Boas, M., Estevinho, L. M., Barros, C., Domingues, M. R. M., & Cardoso, S. M. (2010). Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *396*(2), 887–897. https://doi.org/10.1007/s00216-009-3232-8

Fan, W., Sun, J., Chen, Y., Qiu, J., Zhang, Y., & Chi, Y. (2009). Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. *Food Chemistry*, *115*(1), 66–70. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.060

Fang, Z., Zhao, Y., Warner, R. D., & Johnson, S. K. (2017). Active and intelligent packaging in meat industry. *Trends in Food Science & Technology*, *61*, 60–71. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.01.002

Faustman, C., Johnson, J. L., Cassens, R. G., & Doyle, M. . (1990). Color reversion in beef: Influence of psychotrophic bacteria. *Fleischwirt*, *70*, 676.

FDA. (2013). *Revised guidelines for the assesment of microbiological quality of processes foods*.

Félix, M., Jiménez, C., Romero, A., & Guerrero, A. (2016). PVA-based electrospun nanofiber mats of potential use in active packaging. *International Journal of Environmental & Agriculture Research*, *2*(8), 7–14.

Feng, J. J. (2003). Stretching of a straight electrically charged viscoelastic jet. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, *116*(1), 55–70. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0377-0257(03)00173-3

Feng, X., Ng, V. K., Mikš-Krajnik, M., & Yang, H. (2017). Effects of Fish Gelatin and Tea Polyphenol Coating on the Spoilage and Degradation of Myofibril in Fish Fillet During Cold Storage. *Food and Bioprocess Technology*, *10*(1), 89–102. https://doi.org/10.1007/s11947-016-1798-7

Fernández-López, J., Sevilla, L., Sayas-Barberá, E., Navarro, C., Marín, F., & Pérez-Alvarez, J. A. (2003). Evaluation of the Antioxidant Potential of Hyssop (Hyssopus officinalis L.) and Rosemary (Rosmarinus officinalis L.) Extracts in Cooked Pork Meat. *Journal of Food Science*, *68*(2), 660–664. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05727.x

Fokt, H., Pereira, A., Ferreira, A., Cunha, A., & Almeida Aguiar, C. (2010). How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, *1*.

Fox, J. B. (1966). Chemistry of Meat Pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *14*(3), 207–210. https://doi.org/10.1021/jf60145a003

Frankel, E. N. (2005). *Lipid Oxidation*. Oily Press.

Fuenmayor, C. A., Mascheroni, E., Cosio, M. S., Piergiovanni, L., Benedetti, S., Ortenzi, M., … Mannino, S. (2013). Encapsulation of R-(+)-limonene in edible electrospun nanofibers. *Chemical Engineering Transactions*, *32*, 1771–1776. https://doi.org/10.3303/CET1332296

Ganiari, S., Choulitoudi, E., & Oreopoulou, V. (2017). Edible and active films and coatings as carriers of natural antioxidants for lipid food. *Trends in Food Science & Technology*, *68*, 70–82. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.009

García-Moreno, P. J., Mendes, A. C., Jacobsen, C., & Chronakis, I. S. (2018). *Biopolymers for the Nano-microencapsulation of Bioactive Ingredients by Electrohydrodynamic Processing BT - Polymers for Food Applications* (T. J. Gutiérrez, Ed.). https://doi.org/10.1007/978-3-319-94625-2_17

Georgala, D. L., & Davidson, C. M. (1970). Food package. *British Patent*, *1*, 199–998.

Ghisalberti, E. L. (1979). Propolis: A Review. *Bee World*, *60*(2), 59–84. https://doi.org/10.1080/0005772X.1979.11097738

Ghorani, B., & Tucker, N. (2015). Fundamentals of electrospinning as a novel delivery

vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. *Food Hydrocolloids*, *51*, 227–240. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.05.024

Gill, A. O., & Gill, C. O. (2005). 13 - Preservative packaging for fresh meats, poultry, and fin fish. In J. H. B. T.-I. in F. P. Han (Ed.), *Food Science and Technology* (pp. 204–226). https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012311632-1/50045-0

Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., & Givskov, M. (2002). Food spoilage--interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *78*(1–2), 79–97. https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00233-7

Greer, G. G., Dilts, B. D., & Jeremiah, L. E. (1993). Bacteriology and Retail Case Life of Pork After Storage in Carbon Dioxide. *Journal of Food Protection*, *56*, 689–693. https://doi.org/10.4315/0362-028X-56.8.689

Greiner, A., & Wendorff, J. H. (2007). Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers. *Angewandte Chemie International Edition*, *46*(30), 5670–5703. https://doi.org/10.1002/anie.200604646

Grunert, K. G., & Valli, C. (2001). Designer-made meat and dairy products: consumer-led product development. *Livestock Production Science*, *72*(1), 83–98. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0301-6226(01)00269-X

Gutiérrez, C., & Suárez, H. (2014). Antimicrobial activity of propolis and its effect on the physicochemical and sensoral characteristics in sausages. *Vitae*, *21*(2), 90–96.

Gutiérrez, T. J. (2017). Chitosan Applications for the Food Industry. In *Chitosan*. https://doi.org/10.1002/9781119364849.ch8

Han, J. H. (2005). 1 - New technologies in food packaging: Overiew. In J. H. B. T.-I. in F. P. Han (Ed.), *Food Science and Technology* (pp. 3–11). https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012311632-1/50033-4

Harfouch, R. (2017). ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SYRIAN PROPOLIS EXTRACT AGAINST SEVERAL STRAINS OF BACTERIA IN VITRO. *WORLD JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES*, *6*, 42–46. https://doi.org/10.20959/wjpps20172-8162

Hayes, E. B. (2009). Zika virus outside Africa. *Emerging Infectious Diseases*, *15*(9), 1347–

1350. https://doi.org/10.3201/eid1509.090442

Hayes, J. E., Stepanyan, V., Allen, P., O'Grady, M. N., & Kerry, J. P. (2011). Evaluation of the effects of selected plant-derived nutraceuticals on the quality and shelf-life stability of raw and cooked pork sausages. *LWT - Food Science and Technology*, *44*(1), 164–172. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.05.020

Herring, J. L., Jonnalongadda, S. C., Narayanan, V. C., & Coleman, S. M. (2010). Oxidative stability of gelatin coated pork at refrigerated storage. *Meat Science*, *85*(4), 651–656. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.03.019

Hiemenz, P.C. "Polymer Chemistry-The Basic Concepts", Marcel Dekker,Inc. New. York and Bassel pp. *Chapter 2 "The viscous state*" 75-87 (1984).

Higueras Contreras, L., López-Carballo, G., Gavara, R., & Hernández-Muñoz, P. (2014). Reversible Covalent Immobilization of Cinnamaldehyde on Chitosan Films via Schiff Base Formation and Their Application in Active Food Packaging. *Food and Bioprocess Technology*, *8*, 526–538. https://doi.org/10.1007/s11947-014-1421-8

Hildebrand, J. H., & Scott, R. L. (1950). *The solubility of nonelectrolytes,*. New York: Reinhold Pub. Corp.

Holley, R. A., Peirson, M. D., Lam, J., & Tan, K. B. (2004). Microbial profiles of commercial, vacuum-packaged, fresh pork of normal or short storage life. *International Journal of Food Microbiology*, *97*(1), 53–62. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.029

Homayoni, H., Ravandi, S. A. H., & Valizadeh, M. (2009). Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization. *Carbohydrate Polymers*, *77*(3), 656–661. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.02.008

Hong, S., & Kim, G. (2011). Fabrication of electrospun polycaprolactone biocomposites reinforced with chitosan for the proliferation of mesenchymal stem cells. *Carbohydrate Polymers*, *83*(2), 940–946. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.09.002

Hu, X., Liu, S., Zhou, G., Huang, Y., Xie, Z., & Jing, X. (2014). Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. *Journal of Controlled Release*, *185*, 12–21. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.018

Huang, L., Manickam, S. S., & McCutcheon, J. R. (2013). Increasing strength of electrospun

nanofiber membranes for water filtration using solvent vapor. *Journal of Membrane Science*, *436*, 213–220. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.12.037

Huang, W., Xu, H., Xue, Y., Huang, R., Deng, H., & Pan, S. (2012). Layer-by-layer immobilization of lysozyme-chitosan-organic rectorite composites on electrospun nanofibrous mats for pork preservation. *Food Research International*, *48*(2), 784–791. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.06.026

Huang, Z. M., Zhang, Y. Z., Kotaki, M., & Ramakrishna, S. (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, *63*(15), 2223–2253. https://doi.org/10.1016/S0266-3538(03)00178-7

IFST, I. of F. S. and T. (1993). *Shelf life of foods : guidelines for its determination and prediction / Institute of Food Science & Technology (UK)*. ondon : Institute of Food Science & Technology (UK).

Ignatova, M., Manolova, N., Markova, N., & Rashkov, I. (2009). Electrospun non-woven nanofibrous hybrid mats based on chitosan and PLA for wound-dressing applications. *Macromolecular Bioscience*, *9*(1), 102–111. https://doi.org/10.1002/mabi.200800189

Immich, A. P. S., Arias, M. L., Carreras, N., Boemo, R. L., & Tornero, J. A. (2013). Drug delivery systems using sandwich configurations of electrospun poly(lactic acid) nanofiber membranes and ibuprofen. *Materials Science and Engineering: C*, *33*(7), 4002–4008. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.05.034

Ioshida, M. D. M., Young, M. C. M., & Lago, J. H. G. (2010). Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil from Brazilian Propolis. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *13*(5), 633–637. https://doi.org/10.1080/0972060X.2010.10643873

ISO, U. C. (2006). *UNE-EN ISO 20776-1*.

Jakobsen, M., & Bertelsen, G. (2000). Colour stability and lipid oxidation of fresh beef. Development of a response surface model for predicting the effects of temperature, storage time, and modified atmosphere composition. *Meat Science*, *54*(1), 49–57. https://doi.org/10.1016/s0309-1740(99)00069-8

Jana, S., Leung, M., Chang, J., & Zhang, M. (2014). Effect of nano- and micro-scale

topological features on alignment of muscle cells and commitment of myogenic differentiation. *Biofabrication*, *6*(3). https://doi.org/10.1088/1758-5082/6/3/035012

Janmohammadi, M., & Nourbakhsh, M. S. (2019). Electrospun polycaprolactone scaffolds for tissue engineering: a review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, *68*(9), 527–539. https://doi.org/10.1080/00914037.2018.1466139

Janz, J., Morel, P., Wilkinson, B., & Purchas, R. (2007). Preliminary investigation of the effects of low-level dietary inclusion of fragrant essential oils and oleoresin on pig performance and pork quality. *Meat Science*, *75*, 350–355. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.06.027

Jayasena, D. D., & Jo, C. (2013). Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *34*(2), 96–108. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.09.002

Jayasingh, P., Cornforth, D. P., Brennand, C. P., Carpenter, C. E., & Whittier, D. R. (2002). Sensory Evaluation of Ground Beef Stored in High-oxygen Modified Atmosphere Packaging. *Journal of Food Science*, *67*(9), 3493–3496. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb09611.x

Jeremiah, L. E., & Gibson, L. L. (1997). The influence of controlled atmosphere storage on the flavor and texture profiles of display-ready pork cuts. *Food Research International*, *30*(2), 117–129. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0963-9969(97)00025-2

Jonaidi Jafari, N., Kargozari, M., Ranjbar, R., Rostami, H., & Hamedi, H. (2018). The effect of chitosan coating incorporated with ethanolic extract of propolis on the quality of refrigerated chicken fillet. *Journal of Food Processing and Preservation*, *42*(1), e13336. https://doi.org/10.1111/jfpp.13336

Joshi, M., & Adak, B. (2019). *5.10 - Advances in Nanotechnology Based Functional, Smart and Intelligent Textiles: A Review* (D. L. Andrews, R. H. Lipson, & T. B. T.-C. N. and N. (Second E. Nann, Eds.). https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.10471-0

Kaewprachu, P., Osako, K., Benjakul, S., & Rawdkuen, S. (2015). Quality attributes of minced pork wrapped with catechin–lysozyme incorporated gelatin film. *Food Packaging and Shelf Life*, *3*. https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2014.11.002

Kalantari, K., Afifi, A. M., Jahangirian, H., & Webster, T. J. (2019). Biomedical applications of chitosan electrospun nanofibers as a green polymer – Review. *Carbohydrate Polymers*, *207*(October 2018), 588–600. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.011

Kanatt, S. R., Rao, M. S., Chawla, S. P., & Sharma, A. (2013). Effects of chitosan coating on shelf-life of ready-to-cook meat products during chilled storage. *LWT - Food Science and Technology*, *53*(1), 321–326. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.01.019

Kerry, J. P., & Ledward, D. (2009). *Improving the sensory and nutritional quality of fresh meat*.

Kerry, J. P., O'Grady, M. N., & Hogan, S. A. (2006). Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Science*, *74*(1), 113–130. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.04.024

Kim, J. I., Pant, H. R., Sim, H. J., Lee, K. M., & Kim, C. S. (2014). Electrospun propolis/polyurethane composite nanofibers for biomedical applications. *Materials Science and Engineering C*, *44*, 52–57. https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.07.062

Koutsoumanis, K., Stamatiou, A., Skandamis, P., & Nychas, G.-J. E. (2006). Development of a Microbial Model for the Combined Effect of Temperature and pH on Spoilage of Ground Meat, and Validation of the Model under Dynamic Temperature Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(1), 124 LP – 134. https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.124-134.2006

Lambert, A. D., Smith, J. P., & Dodds, K. L. (1991). Shelf life extension and microbiological safety of fresh meat — a review. *Food Microbiology*, *8*(4), 267–297. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0740-0020(05)80002-4

Lambropoulou, K. A., Drosinos, E. H., & Nychas, G. J. (1996). The effect of glucose supplementation on the spoilage microflora and chemical composition of minced beef stored aerobically or under a modified atmosphere at 4 degrees C. *International Journal of Food Microbiology*, *30*(3), 281–291. https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)00954-3

Lanari, M., & Cassens, R. G. (1991). Mitochondrial Activity and Beef Muscle Color

Stability. *Journal of Food Science*, *56*, 1476–1479. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb08619.x

Lee, S., Joo, S. T., Alderton, A. L., Hill, D. W., & Faustman, C. (2003). Oxymyoglobin and Lipid Oxidation in Yellowfin Tuna (Thunnus albacares) Loins. *Journal of Food Science*, *68*(5), 1664–1668. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb12310.x

Li, D., & Xia, Y. (2004). Electrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel? *Advanced Materials*, *16*(14), 1151–1170. https://doi.org/10.1002/adma.200400719

Li, L., Guo, N., Zhang, X., Ou, W., Yang, S., Su, X., & Feng, Y. (2018). Reversible stability of emulsion and polymer latex controlled by oligochitosan and CO 2. *Polymers*, *10*(12). https://doi.org/10.3390/polym10121352

Li, Y., Yin, X., Yu, J., & Ding, B. (2019). Electrospun nanofibers for high-performance air filtration. *Composites Communications*, *15*, 6–19. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coco.2019.06.003

Liao, H., Qi, R., Shen, M., Cao, X., Guo, R., Zhang, Y., & Shi, X. (2011). Improved cellular response on multiwalled carbon nanotube-incorporated electrospun polyvinyl alcohol/chitosan nanofibrous scaffolds. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, *84*(2), 528–535. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.02.010

Lim, L. T. (2015). Encapsulation of bioactive compounds using electrospinning and electrospraying technologies. *Nanotechnology and Functional Foods: Effective Delivery of Bioactive Ingredients*, 297–317. https://doi.org/10.1002/9781118462157.ch18

Lim, L. T., Mendes, A. C., & Chronakis, I. S. (2019). Electrospinning and electrospraying technologies for food applications. In *Advances in Food and Nutrition Research* (1st ed., Vol. 88). https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.005

Lin, K. W., & Chuang, C. H. (2001). Effectiveness of Dipping with Phosphate, Lactate and Acetic Acid Solutions on the Quality and Shelf-life of Pork Loin Chop. *Journal of Food Science*, *66*(3), 494–499. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb16138.x

López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Pérez-Mateos, M., & Montero, P. (2005). A chitosan–gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids*, *19*(2), 303–311. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.06.006

Lopez-Rubio, A., Gavara, R., & Lagaron, J. M. (2006). Bioactive packaging: turning foods

into healthier foods through biomaterials. *Trends in Food Science & Technology*, *17*(10), 567–575. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.04.012

López, B. G.-C., Schmidt, E. M., Eberlin, M. N., & Sawaya, A. C. H. F. (2014). Phytochemical markers of different types of red propolis. *Food Chemistry*, *146*, 174–180. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.063

Lorenzo, J. M., Batlle, R., & Gómez, M. (2014). Extension of the shelf-life of foal meat with two antioxidant active packaging systems. *LWT - Food Science and Technology*, *59*(1), 181–188. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.061

Lu, J.-W., Zhu, Y.-L., Guo, Z.-X., Hu, P., & Yu, J. (2006). Electrospinning of sodium alginate with poly(ethylene oxide). *Polymer*, *47*(23), 8026–8031. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polymer.2006.09.027

Lucera, A., Conte, A., & Del Nobile, M. A. (2016). *Chapter 25 - Volatile Compounds Usage in Active Packaging Systems* (J. B. T.-A. F. P. Barros-Velázquez, Ed.). https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00025-5

Luciani, A., Coccoli, V., Orsi, S., Ambrosio, L., & Netti, P. A. (2008). PCL microspheres based functional scaffolds by bottom-up approach with predefined microstructural properties and release profiles. *Biomaterials*, *29*(36), 4800–4807. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.09.007

Luis-Villaroya, A., Espina, L., Garcia-Gonzalo, D., Bayarri, S., Perez, C., & Pagan, R. (2015). Bioactive properties of a propolis-based dietary supplement and its use in combination with mild heat for apple juice preservation. *International Journal of Food Microbiology*, *205*, 90–97. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.020

Lund, M., Lametsch, R., Hviid, M., Jensen, O., & Skibsted, L. (2007). High-oxygen packaging atmosphere influences protein oxidation and tenderness of porcine Longissimus dorsi during chill storage. *Meat Science*, *77*, 295–303. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.03.016

Luño, M., Roncalés, P., Djenane, D., & Beltrán, J. A. (2000). Beef shelf life in low O2 and high CO2 atmospheres containing different low CO concentrations. *Meat Science*, *55*(4), 413–419. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00170-9

Machado, B. S., Pulcino, T. N., Silva, A. L., Melo, D. T., Silva, R. G., & Mendonça, I. G. (2017). Propolis as an alternative in prevention and control of dental cavity. *Journal of Apitherapy*, *1*(2), 47–50. https://doi.org/10.5455/ja.20160726115117

Madhaiyan, K., Sridhar, R., Sundarrajan, S., Venugopal, J. R., & Ramakrishna, S. (2013). Vitamin B12 loaded polycaprolactone nanofibers: A novel transdermal route for the water soluble energy supplement delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, *444*(1–2), 70–76. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.01.040

Mallakpour, S., & Nouruzi, N. (2016). Effect of modified ZnO nanoparticles with biosafe molecule on the morphology and physiochemical properties of novel polycaprolactone nanocomposites. *Polymer*, *89*. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2016.02.038

Mancini, R. A., & Hunt, M. C. (2005). Current research in meat color. *Meat Science*, *71*(1), 100–121. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.03.003

Mancini, R. A., Hunt, M. C., & Kropf, D. (2003). Reflectance at 610 nanometers estimates oxymyoglobin content on the surface of ground beef. *Meat Science*, *64*, 157–162. https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00174-2

Martínez-Abad, A., Ocio, M. J., & Lagaron, J. M. (2014). Morphology, physical properties, silver release, and antimicrobial capacity of ionic silver-loaded poly(l-lactide) films of interest in food-coating applications. *Journal of Applied Polymer Science*, *131*(21). https://doi.org/10.1002/app.41001

Martínez, J., Garcia, C., Durango, D., & Gil, J. (2012). Caracterización de propóleos provenientes del municipio de Caldas obtenido por dos métodos de recolección. *Revista MVZ Cordoba*, *17*(1), 2861–2869. https://doi.org/10.21897/rmvz.254

Martínez, L., Cilla, I., Antonio Beltrán, J., & Roncalés, P. (2006). Effect of Capsicum annuum (Red Sweet and Cayenne) and Piper nigrum (Black and White) Pepper Powders on the Shelf Life of Fresh Pork Sausages Packaged in Modified Atmosphere. *Journal of Food Science*, *71*(1), S48–S53. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb12405.x

Martinez, L., Cilla, I., Beltran, J. A., & Roncales, P. (2006). Combined effect of modified atmosphere packaging and addition of rosemary (Rosmarinus officinalis), ascorbic acid, red beet root (Beta vulgaris), and sodium lactate and their mixtures on the stability of fresh pork sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(13), 4674–

4680. https://doi.org/10.1021/jf060060+

Mascheroni, E., Figoli, A., Musatti, A., Limbo, S., Drioli, E., Suevo, R., … Rollini, M. (2014). An alternative encapsulation approach for production of active chitosan–propolis beads. *International Journal of Food Science & Technology*, *49*(5), 1401–1407. https://doi.org/10.1111/ijfs.12442

Mascheroni, E., Guillard, V., Nalin, F., Mora, L., & Piergiovanni, L. (2010). Diffusivity of propolis compounds in Polylactic acid polymer for the development of anti-microbial packaging films. *Journal of Food Engineering*, *98*(3), 294–301. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.12.028

Mastromatteo, M., Mastromatteo, M., Conte, A., & Nobile, M. (2010). Advances in controlled release devices for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, *21*, 591–598. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.07.010

Mc Carthy, T. L., Kerry, J. P., Kerry, J. F., Lynch, P. B., & Buckley, D. J. (2001). Assessment of the antioxidant potential of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties. *Meat Science*, *57*(2), 177–184. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00090-5

McMillin, K. W. (2008). Where is MAP Going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. *Meat Science*, *80*(1), 43–65. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.05.028

McMillin, K. W. (2017). Advancements in meat packaging. *Meat Science*, *132*(February), 153–162. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.04.015

Mendes, A. C., Gorzelanny, C., Halter, N., Schneider, S. W., & Chronakis, I. S. (2016). Hybrid electrospun chitosan-phospholipids nanofibers for transdermal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, *510*(1), 48–56. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.06.016

Mendes, A. C., Stephansen, K., & Chronakis, I. S. (2017a). Electrospinning of food proteins and polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, *68*, 53–68. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.022

Mendes, A. C., Stephansen, K., & Chronakis, I. S. (2017b). Electrospinning of food proteins

and polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, *68*, 53–68. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.022

Miao, J., Peng, W., Liu, G., Chen, Y., Chen, F., & Cao, Y. (2015). Biopreservative effect of the natural antimicrobial substance from Lactobacillus paracasei subsp. tolerans FX-6 on fresh pork during chilled storage. *Food Control*, *56*, 53–56. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.013

Min, B., & Ahn, D. U. (2005). Mechanism of lipid peroxidation in meat and meat products -A review. *Food Sci. Biotechnol*, *14*, 152–163.

Ministerio de salud y protección social. (2015). *Resolución 2690. Por la cual se establecen las directrices para la formulación del Programa de Verificación Microbiológica del Sistema Oficial de Inspección, Vigilancia y Control de la Carne y Productos Cárnicos Comestibles*. Retrieved from https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resolución 2690 de 2015.pdf

Mochane, M. J., Motsoeneng, T. S., Sadiku, E. R., Mokhena, T. C., & Sefadi, J. S. (2019). Morphology and properties of electrospun PCL and its composites for medical applications: A mini review. *Applied Sciences (Switzerland)*, *9*(11), 1–17. https://doi.org/10.3390/app9112205

Moghaddam, A. B., Shirvani, B., Aroon, M. A., & Nazari, T. (2018). Physico-chemical properties of hybrid electrospun nanofibers containing polyvinylpyrrolidone (PVP), propolis and aloe vera. *Materials Research Express*, *5*(12). https://doi.org/10.1088/2053-1591/aae0bf

Mohamed, R. M., & Yusoh, K. (2015). A Review on the Recent Research of Polycaprolactone (PCL). *Advanced Materials Research*, *1134*, 249–255. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.1134.249

Mohammad El-Aidie, S. A.-A. (2018). a Review on Chitosan: Ecofriendly Multiple Potential Applications in the Food Industry. *International Journal of Advancement in Life Sciences Research*, *1*(1), 1–14. https://doi.org/10.31632/ijalsr.2018v01i01.001

Moon, J.-K., & Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(5), 1655–1666. https://doi.org/10.1021/jf803537k

Moradkhannejhad, L., Abdouss, M., Nikfarjam, N., Mazinani, S., & Heydari, V. (2018).

Electrospinning of zein/propolis nanofibers; antimicrobial properties and morphology investigation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *29*(11). https://doi.org/10.1007/s10856-018-6174-x

Moss, B. W. (1992). Lean meat, animal welfare and meat quality. *The Chemistry of Muscle Based Foods (Eds D.A. Ledward, D.E. Johnston & M.K. Knight)*, *The Royal*, 62–76.

Murray, E., Thompson, B. C., Sayyar, S., & Wallace, G. G. (2015). Enzymatic degradation of graphene/polycaprolactone materials for tissue engineering. *Polymer Degradation and Stability*, *111*, 71–77. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2014.10.010

Nattress, F. M., & Jeremiah, L. E. (2000). Bacterial mediated off-flavors in retail-ready beef after storage in controlled atmospheres. *Food Research International*, *33*, 743–748. https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00064-8

Nazir, A., Khenoussi, N., Schacher, L., Hussain, T., Adolphe, D., & Hekmati, A. H. (2015). Using the Taguchi method to investigate the effect of different parameters on mean diameter and variation in PA-6 nanofibres produced by needleless electrospinning. *RSC Advances*, *5*(94), 76892–76897. https://doi.org/10.1039/C5RA13649K

Neamnark, A., Rujiravanit, R., & Supaphol, P. (2006). Electrospinning of hexanoyl chitosan. *Carbohydrate Polymers*, *66*(3), 298–305. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.03.015

Neo, Y. P., Swift, S., Ray, S., Gizdavic-Nikolaidis, M., Jin, J., & Perera, C. O. (2013). Evaluation of gallic acid loaded zein sub-micron electrospun fibre mats as novel active packaging materials. *Food Chemistry*, *141*(3), 3192–3200. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.018

No, H. K., Meyers, S. P., Prinyawiwatkul, W., & Xu, Z. (2007). Applications of Chitosan for Improvement of Quality and Shelf Life of Foods: A Review. *Journal of Food Science*, *72*(5), R87–R100. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00383.x

Nollet, L. (2012). *Handbook of Meat, Poultry and Seafood Quality* (Second Edi; Wiley-Blackwell, Ed.). Ghent, Belgium.

Noruzi, M. (2016). Electrospun nanofibres in agriculture and the food industry: a review.

Journal of the Science of Food and Agriculture, *96*(14), 4663–4678. https://doi.org/10.1002/jsfa.7737

NPD. (2003). National eating trends in-home/away from home combined; 2001/2002. Retrieved from www.porkfoodservice.com/documents/RAC-MEAL USAGE 2003.PPT

O'Grady, M. N., Maher, M., Troy, D. J., Moloney, A. P., & Kerry, J. P. (2006). An assessment of dietary supplementation with tea catechins and rosemary extract on the quality of fresh beef. *Meat Science*, *73*(1), 132–143. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.11.008

O'Sullivan, M., Byrne, D. V, Martens, H., & Martens, M. (2007). Data analytical methodologies in the development of a vocabulary for evaluation of meat quality. *Journal of Sensory Studies*, *17*, 539–558. https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.2002.tb00364.x

Ohkawa, K., Cha, D., Kim, H., Nishida, A., & Yamamoto, H. (2004). Electrospinning of Chitosan. *Macromolecular Rapid Communications*, *25*, 1600–1605. https://doi.org/10.1002/marc.200400253

Orsi, R. D. O., Sforcin, J. M., Cunha Funari, S. R., Fernandes, A., & Bankova, V. (2006). Synergistic effect of propolis and antibiotics on the Salmonella typhi. *Brazilian Journal of Microbiology*, *37*(2), 108–112. https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000200002

Orsi, R. O., Fernandes, A., Bankova, V., & Sforcin, J. M. (2012). The effects of Brazilian and Bulgarian propolis in vitro against Salmonella Typhi and their synergism with antibiotics acting on the ribosome. *Natural Product Research*, *26*(5), 430–437. https://doi.org/10.1080/14786419.2010.498776

Osborn, H. M., Brown, H., Adams, J. B., & Ledward, D. A. (2003). High temperature reduction of metmyoglobin in aqueous muscle extracts. *Meat Science*, *65*(1), 631–637. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00258-9

Ozdemir, M., & Floros, J. D. (2004). Active food packaging technologies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *44*(3), 185–193. https://doi.org/10.1080/10408690490441578

Pakravan, M., Heuzey, M. C., & Ajji, A. (2011). A fundamental study of chitosan/PEO electrospinning. *Polymer*, *52*(21), 4813–4824.

https://doi.org/10.1016/j.polymer.2011.08.034

Palomino G, L. R., García P, C. M., Gil G, J. H., Rojano, B. A., & Durango R, D. L. (2009). Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae*, *16*(3), 388–395.

Parolia, A., Thomas, M., Mala, K., & Mohan, M. (2010). Propolis and its potential uses in oral health. *International Journal of Medicine and Medical Sciences*, *2*, 210–215.

Parry, R. . (1993). *Principles and Applications of Modified Atmosphere Packaging of Foods*. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2137-2

Pérez-Alvarez, J. . (1996). *Contribución al estudio objetivo del color en productos cárnicos crudo-curados.* Universidad Politécnica de Valencia.

Piedrahíta, D. G., Fuenmayor, C. A., & Suárez, H. (2019). Effect of chitosan-propolis edible coatings on stability of refrigerated cachama (Piaractus brachypomus) vacuum-packed fish fillets. *Packaging Technology and Science*, *32*(3), 143–153. https://doi.org/10.1002/pts.2422

Pobiega, K., Kraśniewska, K., & Gniewosz, M. (2019a). Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality – A review. *Trends in Food Science and Technology*, *83*(November 2018), 53–62. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.007

Pobiega, K., Kraśniewska, K., & Gniewosz, M. (2019b). Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality – A review. *Trends in Food Science and Technology*, *83*(October 2018), 53–62. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.007

Prabhakaran, M. P., Venugopal, J. R., Chyan, T. Ter, Hai, L. B., Chan, C. K., Lim, A. Y., & Ramakrishna, S. (2008). Electrospun biocomposite nanofibrous scaffolds for neural tissue engineering. *Tissue Engineering. Part A*, *14*(11), 1787–1797. https://doi.org/10.1089/ten.tea.2007.0393

Qian, Y., Zhang, Z., Zheng, L., Song, R., & Zhao, Y. (2014). Fabrication and characterization of electrospun polycaprolactone blended with chitosan-gelatin

complex nanofibrous mats. *Journal of Nanomaterials*, *2014*. https://doi.org/10.1155/2014/964621

Quintavalla, S., & Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*, *62*(3), 373–380. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00121-3

Rawdkuen, S., Punbusayakul, N., & Lee, D. S. (2016). *Chapter 17 - Antimicrobial Packaging for Meat Products* (J. B. T.-A. F. P. Barros-Velázquez, Ed.). https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00017-6

Ray, B. (2001). *Fundamental Food Microbiology* (2nd edn). CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.

Realini, C. E., & Marcos, B. (2014). Active and intelligent packaging systems for a modern society. *Meat Science*, *98*(3), 404–419. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.06.031

Reis, A. S. dos, Diedrich, C., Moura, C. de, Pereira, D., Almeida, J. de F., Silva, L. D. da, … Carpes, S. T. (2017). Physico-chemical characteristics of microencapsulated propolis co-product extract and its effect on storage stability of burger meat during storage at −15 °C. *LWT - Food Science and Technology*, *76*, 306–313. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.033

Reneker, D. H., & Yarin, A. L. (2008). Electrospinning jets and polymer nanofibers. *Polymer*, *49*(10), 2387–2425. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.02.002

Reneker, D. H., Yarin, A. L., Fong, H., & Koombhongse, S. (2000). Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. *Journal of Applied Physics*, *87*(9), 4531–4547. https://doi.org/10.1063/1.373532

Renerre, M. (1990). Factors involved in the discoloration of beef meat. *International Journal of Food Science & Technology*, *25*(6), 613–630. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1990.tb01123.x

Reyes, P., Jeiner, J., Rodríguez, P., & Totosaus, A. (2020). *RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE MIOGLOBINA Y OXIMIOGLOBINA CON EL COLOR DE CARNE FRESCA DE RES Y POLLO*.

Rezaei, A., Nasirpour, A., & Fathi, M. (2015). Application of Cellulosic Nanofibers in Food Science Using Electrospinning and Its Potential Risk. *Comprehensive Reviews in Food*

Science and Food Safety, *14*(3), 269–284. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12128

Rieger, K. A., & Schiffman, J. D. (2014). Electrospinning an essential oil: Cinnamaldehyde enhances the antimicrobial efficacy of chitosan/poly(ethylene oxide) nanofibers. *Carbohydrate Polymers*, *113*, 561–568. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.075

Robertson, G. L. (2013). *Food Packaging: Principles and Practice, Third Edition* (Third Edit). Retrieved from https://books.google.com.co/books?id=y27tL_7ZJFUC

Rollini, M., Mascheroni, E., Capretti, G., Coma, V., Musatti, A., & Piergiovanni, L. (2017). Propolis and chitosan as antimicrobial and polyphenols retainer for the development of paper based active packaging materials. *Food Packaging and Shelf Life*, *14*(August), 75–82. https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.08.011

Rutledge, G. C., & Fridrikh, S. V. (2007). Formation of fibers by electrospinning. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *59*(14), 1384–1391. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.04.020

Salamanca, G., Correa, I. L., & Principal, J. (2007). Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootecnia Tropical*, *25*(2).

Samelis, J., Kakouri, A. & Rementzis, J. (2000). Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. *Food Microbiology*, *17*, 329–340.

Sanches-Silva, A., Costa, D., Albuquerque, T. G., Buonocore, G. G., Ramos, F., Castilho, M. C., … Costa, H. S. (2014). Trends in the use of natural antioxidants in active food packaging: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, *31*(3), 374–395. https://doi.org/10.1080/19440049.2013.879215

Sánchez, Á. P., Vera, R., Muñoz, E. de J., Gómez, E., Bernad, M. J., Maciel, A., & Mu. (2016). Preparación y caracterización de membranas poliméricas electrohiladas de policaprolactona y quitosano para la liberación controlada de clorhidrato de tiamina. *Ciencia En Desarrollo*, *7*(2), 133. https://doi.org/10.19053/01217488.v7.n2.2016.4818

Sarhan, W. A., & Azzazy, H. M. E. (2015). High concentration honey chitosan electrospun nanofibers: Biocompatibility and antibacterial effects. *Carbohydrate Polymers*, *122*, 135–143. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.051

Sawaya, A. C. H. F., Barbosa da Silva Cunha, I., & Marcucci, M. C. (2011). Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chemistry Central Journal*, *5*(1), 1–10. https://doi.org/10.1186/1752-153X-5-27

Schiffman, J. D., & Schauer, C. L. (2008). A Review: Electrospinning of Biopolymer Nanofibers and their Applications. *Polymer Reviews*, *48*(2), 317–352. https://doi.org/10.1080/15583720802022182

Schlegelová, J., Babák, V., Holasová, M., Konstantinová, L., Necidová, L., Šišák, F., … Jaglic, Z. (2010). Microbial contamination after sanitation of food contact surfaces in dairy and meat processing plants. *Czech Journal of Food Sciences*, *28*(5), 450–461. https://doi.org/10.17221/65/2009-cjfs

Semnani, D., Naghashzargar, E., Hadjianfar, M., Dehghan Manshadi, F., Mohammadi, S., Karbasi, S., & Effaty, F. (2017). Evaluation of PCL/chitosan electrospun nanofibers for liver tissue engineering. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, *66*(3), 149–157. https://doi.org/10.1080/00914037.2016.1190931

Senthil Muthu Kumar, T., Senthil Kumar, K., Rajini, N., Siengchin, S., Ayrilmis, N., & Varada Rajulu, A. (2019). A comprehensive review of electrospun nanofibers: Food and packaging perspective. *Composites Part B: Engineering*, *175*(July), 107074. https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2019.107074

Shahidi, F., Arachchi, J. K. V., & Jeon, Y. J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science and Technology*, *10*(2), 37–51. https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00017-5

Shao, S., Li, L., Yang, G., Li, J., Luo, C., Gong, T., & Zhou, S. (2011). Controlled green tea polyphenols release from electrospun PCL/MWCNTs composite nanofibers. *International Journal of Pharmaceutics*, *421*(2), 310–320. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.09.033

Sharafati Chaleshtori, F., & Sharafati Chaleshtori, R. (2017). Antimicrobial activity of chitosan incorporated with lemon and oregano essential oils on broiler breast meat during refrigerated storage. *Nutrition & Food Science*, *47*(3), 306–317. https://doi.org/10.1108/NFS-08-2016-0123

Shavisi, N., Khanjari, A., Basti, A. A., Misaghi, A., & Shahbazi, Y. (2017). Effect of PLA

films containing propolis ethanolic extract, cellulose nanoparticle and Ziziphora clinopodioides essential oil on chemical, microbial and sensory properties of minced beef. *Meat Science*, *124*, 95–104. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.10.015

Sheard, P. R., Enser, M., Wood, J. D., Nute, G. R., Gill, B. P., & Richardson, R. I. (2000). Shelf life and quality of pork and pork products with raised n-3 PUFA. *Meat Science*, *55*(2), 213–221. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00145-X

Shrestha, S., & Min, Z. (2006). Effect of lactic acid pretreatment on the quality of fresh pork packed in modified atmosphere. *Journal of Food Engineering*, *72*(3), 254–260. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.12.004

Silici, S., & Karaman, K. (2014). Inhibitory Effect of Propolis on Patulin Production of Penicillium expansum in Apple Juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, *38*(3), 1129–1134. https://doi.org/10.1111/jfpp.12072

Silici, S., & Kutluca, S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*, *99*(1), 69–73. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.046

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. B. T.-M. in E. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Oxidants and Antioxidants Part A* (Vol. 299, pp. 152–178). https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1

Siripatrawan, U., & Harte, B. R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, *24*(8), 770–775. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.04.003

Siripatrawan, U., & Vitchayakitti, W. (2016). Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. *Food Hydrocolloids*, *61*, 695–702. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.001

Siripatrawan, U., Vitchayakitti, W., & Sanguandeekul, R. (2013). Antioxidant and antimicrobial properties of Thai propolis extracted using ethanol aqueous solution.

International Journal of Food Science & Technology, *48*(1), 22–27. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03152.x

Škrlep, M., & Čandek - Potokar, M. (2007). PORK COLOR MEASUREMENT AS AFFECTED BY BLOOM TIME AND MEASUREMENT LOCATION. *Journal of Muscle Foods*, *18*(1), 78–87. https://doi.org/10.1111/j.1745-4573.2007.00067.x

Son, B., Yeom, B.-Y., Song, S. H., Lee, C.-S., & Hwang, T. S. (2009). Antibacterial electrospun chitosan/poly(vinyl alcohol) nanofibers containing silver nitrate and titanium dioxide. *Journal of Applied Polymer Science*, *111*(6), 2892–2899. https://doi.org/10.1002/app.29233

Sorheim, O., Nissen, H., & Nesbakken, T. (1999). The storage life of beef and pork packaged in an atmosphere with low carbon monoxide and high carbon dioxide. *Meat Science*, *52*(2), 157–164. https://doi.org/10.1016/s0309-1740(98)00163-6

Steyaert, I., Van Der Schueren, L., Rahier, H., & De Clerck, K. (2012). An alternative solvent system for blend electrospinning of polycaprolactone/chitosan nanofibres. *Macromolecular Symposia*, *321–322*(1), 71–75. https://doi.org/10.1002/masy.201251111

Stolzenbach, S., Leisner, J., & Byrne, D. (2009). Sensory shelf life determination of a processed meat product 'rullepøse' and microbial metabolites as potential indicators. *Meat Science*, *83*, 285–292. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.05.011

Su, P., Wang, C., Yang, X., Chen, X., Gao, C., Feng, X., … Gou, Z. (2011). Electrospinning of chitosan nanofibers: The favorable effect of metal ions. *Carbohydrate Polymers*, *84*, 239–246. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.031

Sudarshan, N. R., Hoover, D. G., & Knorr, D. (1992). Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*, *6*(3), 257–272. https://doi.org/10.1080/08905439209549838

Sultana, T., Amirian, J., Park, C., Lee, S. J., & Lee, B. T. (2017). Preparation and characterization of polycaprolactone–polyethylene glycol methyl ether and polycaprolactone–chitosan electrospun mats potential for vascular tissue engineering. *Journal of Biomaterials Applications*, *32*(5), 648–662. https://doi.org/10.1177/0885328217733849

Sun, X. D., & Holley, R. A. (2012). Antimicrobial and Antioxidative Strategies to Reduce Pathogens and Extend the Shelf Life of Fresh Red Meats. *Comprehensive Reviews in*

Food Science and Food Safety, *11*(4), 340–354. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2012.00188.x

Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., & Bigger, S. W. (2003). Active Packaging Technologies with an Emphasis on Antimicrobial Packaging and its Applications. *Journal of Food Science*, *68*(2), 408–420. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05687.x

Sutjarittangtham, K., Sanpa, S., Tunkasiri, T., Rachtanapun, P., Chantawannakul, P., Intatha, U., … Eitssayeam, S. (2012). Preparation of polycaprolactone/ethanolic extract propolis nanofibers films. *Advanced Materials Research*, *506*, 226–229. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.506.226

Sutjarittangtham, Krit, Sanpa, S., Tunkasiri, T., Chantawannakul, P., Intatha, U., & Eitssayeam, S. (2014). Bactericidal effects of propolis/polylactic acid (PLA) nanofibres obtained via electrospinning. *Journal of Apicultural Research*, *53*(1), 109–115. https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.1.11

Talero, C., Hernandéz, D., & Figueroa, J. (2012). CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE PROPÓLEO CRUDO Y SÓLIDOS SOLUBLES DE EXTRACTOS DE PROPÓLEOS DE Apis mellifera EN COLOMBIA. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, *59*(II), 109–118.

Tan, W., & Shelef, L. A. (2002). Effects of sodium chloride and lactates on chemical and microbiological changes in refrigerated and frozen fresh ground pork. *Meat Science*, *62*, 27–32. https://doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00223-6

Taylor, G. I., & Van Dyke, M. D. (1969). Electrically driven jets. *Proceedings of the Royal Society of London. A. Mathematical and Physical Sciences*, *313*(1515), 453–475. https://doi.org/10.1098/rspa.1969.0205

Temtem, M., Casimiro, T., Mano, J. F., & Aguiar-Ricardo, A. (2008). Preparation of membranes with polysulfone/polycaprolactone blends using a high pressure cell specially designed for a CO2-assisted phase inversion. *The Journal of Supercritical Fluids*, *43*(3), 542–548. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.supflu.2007.07.012

Tian, J., Deng, H., Huang, M., Liu, R., Yi, Y., & Dong, X. (2019). Electrospun Nanofibers

for Food and Food Packaging Technology. In *Electrospinning: Nanofabrication and Applications*. https://doi.org/10.1016/b978-0-323-51270-1.00015-7

Torel, J., Cillard, J., & Cillard, P. (1986). Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry*, *25*(2), 383–385. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85485-0

Torlak, E., & Sert, D. (2013). Antibacterial effectiveness of chitosan-propolis coated polypropylene films against foodborne pathogens. *International Journal of Biological Macromolecules*, *60*, 52–55. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.05.013

Torres-Giner, S. (2011). Multifunctional and Nanoreinforced Polymers for Food Packaging. *Multifunctional and Nanoreinforced Polymers for Food Packaging*, 108–125. https://doi.org/10.1533/9780857092786.1.108

Tosi, E. A., Ré, E., Ortega, M. E., & Cazzoli, A. F. (2007). Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon Escherichia coli. *Food Chemistry*, *104*(3), 1025–1029. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.011

USDA-FSIS. (2000). HACCP implementation: First year Salmonella test results. U.S. Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service.

Valle, P., Garcia Armesto, M., Campos Fernández, J., Posado, A., Arriaga, D., & Rúa, J. (2018). Antimicrobial effects of gallic acid, octyl gallate and propyl gallate on carnobacterium divergens and leuconostoc carnosum originating from meat. *Journal of Food and Nutrition Research*, *57*, 76–86.

Vega-Lugo, A. C., & Lim, L. T. (2009). Controlled release of allyl isothiocyanate using soy protein and poly(lactic acid) electrospun fibers. *Food Research International*, *42*(8), 933–940. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.05.005

Vega, A.-C., & Lim, L.-T. (2012). Effects of poly(ethylene oxide) and pH on the electrospinning of whey protein isolate. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, *50*(16), 1188–1197. https://doi.org/10.1002/polb.23106

Vega, J. P. (2018). No Title. Retrieved from La republica website: https://www.larepublica.co/economia/consumo-de-carne-de-cerdo-en-el-pais-crecio-56-en-los-ultimos-cinco-anos-2710218

Vermeiren, L., Devlieghere, F., Beest, M., Kruijf, N., & Debever, J. (2000). Developments

in the active packaging of foods. *J. Food Technol.*, *5*, 6–13.

Viana, E., Gomide, L., & Vanetti, M. (2005). Effect of modified atmospheres on microbiological, color and sensory properties of refrigerated pork. *Meat Science*, *71*, 696–705. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.05.013

Vickers, T. (2007). Radical chain reaction mechanism of lipid peroxidation. Retrieved from https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lipid_peroxidation-es.svg

Viera, V. B., Piovesan, N., Moro, K. I. B., Rodrigues, A. S., Scapin, G., Rosa, C. S. da, & Kubota, E. H. (2016). Preparation and microbiological analysis of Tuscan sausage with added propolis extract. *Food Science and Technology*, *36*, 37–41. Retrieved from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612016000500037&nrm=iso

von Burkersroda, F., Schedl, L., & Gopferich, A. (2002). Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials*, *23*(21), 4221–4231. https://doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00170-9

Wang, S., Marcone, M. F., Barbut, S., & Lim, L.-T. (2013). Electrospun soy protein isolate-based fiber fortified with anthocyanin-rich red raspberry (Rubus strigosus) extracts. *Food Research International*, *52*(2), 467–472. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.036

Wang, Y., Xia, Y., Zhang, P., Ye, L., Wu, L., & He, S. (2016). Physical Characterization and Pork Packaging Application of Chitosan Films Incorporated with Combined Essential Oils of Cinnamon and Ginger. *Food and Bioprocess Technology*, *10*(3), 503–511. https://doi.org/10.1007/s11947-016-1833-8

Wen, P., Zhu, D.-H., Feng, K., Liu, F.-J., Lou, W.-Y., Li, N., … Wu, H. (2016). Fabrication of electrospun polylactic acid nanofilm incorporating cinnamon essential oil/β-cyclodextrin inclusion complex for antimicrobial packaging. *Food Chemistry*, *196*, 996–1004. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.043

Woodruff, M. A., & Hutmacher, D. W. (2010). The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, *35*(10), 1217–1256. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002

Wu, J., & Yin, F. (2013). Sensitive enzymatic glucose biosensor fabricated by electrospinning composite nanofibers and electrodepositing Prussian blue film. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, *694*, 1–5. https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2013.02.003

Wu, T., Ding, M., Shi, C., Qiao, Y., Wang, P., Qiao, R., … Zhong, J. (2019). Resorbable polymer electrospun nanofibers: History, shapes and application for tissue engineering. *Chinese Chemical Letters*. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cclet.2019.07.033

Xia, X., Kong, B., Xiong, Y. L., & Meng, X. (2007). *Extending the Shelf-Life of Chilled Pork By Combination of Chitosan Coating With Spice Extracts*. 7–8.

Xiao, J., Shi, C., Zheng, H., Shi, Z., Jiang, D., Li, Y., & Huang, Q. (2016). Kafirin Protein Based Electrospun Fibers with Tunable Mechanical Property, Wettability, and Release Profile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(16), 3226–3233. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00388

Xiao, Q., & Lim, L. T. (2018). Pullulan-alginate fibers produced using free surface electrospinning. *International Journal of Biological Macromolecules*, *112*, 809–817. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.005

Yang, H., Hewes, D., Salaheen, S., Federman, C., & Biswas, D. (2014). Effects of blackberry juice on growth inhibition of foodborne pathogens and growth promotion of Lactobacillus. *Food Control*, *37*, 15–20. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.042

Yang, X. chuan, Chen, X., & Wang, H. (2009). Acceleration of osteogenic differentiation of preosteoblastic cells by chitosan containing nanofibrous scaffolds. *Biomacromolecules*, *10*(10), 2772–2778. https://doi.org/10.1021/bm900623j

Yano, H., Sugiyama, J., Nakagaito, A. N., Nogi, M., Matsuura, T., Hikita, M., & Handa, K. (2005). Optically transparent composites reinforced with networks of bacterial nanofibers. *Advanced Materials*, *17*(2), 153–155. https://doi.org/10.1002/adma.200400597

Zabaiou, N., Fouache, A., Trousson, A., Baron, S., Zellagui, A., Lahouel, M., & Lobaccaro, J.-M. A. (2017). Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. *Chemistry and Physics of Lipids*, *207*(Pt B), 214–222. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.04.005

Zahid, N., Ali, A., Siddiqui, Y., & Maqbool, M. (2013). Efficacy of ethanolic extract of propolis in maintaining postharvest quality of dragon fruit during storage. *Postharvest Biology and Technology*, *79*, 69–72. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.01.003

Zakrys, P. I., O'Sullivan, M. G., Allen, P., & Kerry, J. P. (2009). Consumer acceptability and physiochemical characteristics of modified atmosphere packed beef steaks. *Meat Science*, *81*(4), 720–725. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.10.024

Zdraveva, E., Fang, J., Mijovic, B., & Lin, T. (2016). Electrospun nanofibers. In *Structure and Properties of High-Performance Fibers*. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100550-7.00011-5

Zein, I., Hutmacher, D. W., Tan, K. C., & Teoh, S. H. (2002). Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials*, *23*(4), 1169–1185. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00232-0

Zhao, L.-M., Shi, L.-E., Zhang, Z.-L., Chen, J.-M., Shi, D.-D., Yang, J., & Tang, Z.-X. (2011). Preparation and application of chitosan nanoparticles and nanofibers. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, *28*, 353–362. Retrieved from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66322011000300001&nrm=iso

Zhou, F.-L., Gong, R.-H., & Porat, I. (2009). Mass production of nanofibre assemblies by electrostatic spinning. *Polymer International*, *58*(4), 331–342. https://doi.org/10.1002/pi.2521

Zhu, X., Wu, H., Yang, J., Tong, J., Yi, J., Hu, Z., … Fan, L. (2015). Antibacterial activity of chitosan grafting nisin: Preparation and characterization. *Reactive and Functional Polymers*, *91–92*, 71–76. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2015.04.009