



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Agropecuarias

**Área Académica de Ingeniería Agroindustrial e
Ingeniería en Alimentos**

**PROPIEDADES FÍSICAS Y BIOACTIVIDAD DE
PELÍCULAS CON AGENTES
ANTIMICROBIANOS
PRODUCIDOS POR BACTERIAS
ÁCIDO-LÁCTICAS**

TESIS

Que para optar por el grado de

Maestro en Ciencia de los Alimentos

PRESENTA:

Ing. Ángel Guadalupe Calderón Aguirre

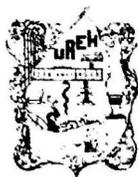
Dirección de Tesis:

Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández

Dr. Norberto Chavarría Hernández



Tulancingo de Bravo, Hidalgo, 2014



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO DEL ICAP

Acta de reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencias de los Alimentos

Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: "*Propiedades físicas y bioactividad de películas con agentes antimicrobianos producidos por bacterias ácido-lácticas*", que desarrolla el estudiante Ángel Guadalupe Calderón Aguirre.

Asistentes:

Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández

Dr. Norberto Chavarría Hernández

Dr. Apolonio Vargas Torres

M en C. Bethsua Mendoza Mendoza

A. Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por el estudiante, comunicando a Ángel Guadalupe oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. El estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que el estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE

"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

Tulancingo de Bravo, Hidalgo, a 18 de Noviembre de 2014.

Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández

Dr. Norberto Chavarría Hernández

Dr. Apolonio Vargas Torres

M en C. Bethsua Mendoza Mendoza



Rancho Universitario.
Av. Universidad Km. 1
Ex-Hda. de Aquetzalpa AP 32 CP 43600
Tulancingo, Hgo.



Este trabajo fue financiado por el Programa de Mejoramiento del Profesorado-SEP-2012-2014, México, en el marco del proyecto “Biotecnologías basadas en biomoléculas funcionales para el sector agroalimentario”; así como por FOMIX-CONACyT-HIDALGO-2008, México, proyecto 98184.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca (276631) otorgada para realizar mis estudios de Maestría.

Agradezco al Dr. René Salgado, del Instituto Tecnológico de Zacatepec, las facilidades otorgadas para la realización de los análisis de microscopía electrónica.

Agradezco al Dr. Gonzalo Velázquez, por la confianza brindada para la realización de las pruebas mecánicas, dentro de las instalaciones del CICATA Querétaro.

Agradezco el tiempo y sugerencias hechas por la M. en C. Bethsua Mendoza Mendoza. Con sus comentarios se pudo mejorar este escrito, gracias por todo.

A la Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández, gracias por confiar en mí, hacerme parte de su grupo de investigación y apoyarme siempre en el trabajo desarrollado, desde la parte experimental, así como durante el desarrollo y revisión del escrito, gracias por su paciencia y sus consejos, los cuales los tomo en cuenta para continuar en el ámbito de investigación.

Al Dr. Norberto Chavarría por su asesoría en microbiología y su apoyo en el desarrollo de los cálculos involucrados en este trabajo, así como por consejos y su valiosa amistad brindada durante estos dos que trabajé dentro del grupo.

Al Dr. Apolonio Vargas Torres, por facilitarme equipo y su asesoría durante la realización de las pruebas de permeabilidad al vapor de agua y microscopía electrónica de barrido (SEM).

Dedico este trabajo a cada una de las siguientes personas, las cuales intervinieron de forma diferente, en esta etapa de mi vida, gracias a ellos pude culminar una meta más de las muchas que me he planteado. A cada una de esas personas las quiero nombrar y agradecer de forma independiente dentro de un pequeño párrafo de este trabajo.

En primer lugar a mi mamá Cristina Aguirre Raya, quien sin su apoyo e infinita confianza que depositó en mí, no hubiera sido posible llegar a ver culminado mi sueño. Mami, te estoy muy agradecido por todo lo que me brindaste durante estos dos años y por todo lo que hasta la fecha me sigues brindado. A mi papá José Guadalupe Calderón, quien quizá no siempre estuvo de acuerdo en todo, pero sé que estará emocionado al ver un logro más en mi vida.

A mi hermana Mirella Calderón Aguirre, quien con sus críticas (en ocasiones un poco fuertes, debo decir), apoyo y buenas vibras dadas, me facilitaba el tomar impulso y continuar con fuerzas en esos momentos en que creía que todo estaba perdido, te quiero mucho “Sofó” a tí y a mi sobrina Tamara Andrade Calderón.

A mis tíos; Liliana Razo Calderón, Alicia Rangel Calderón, Guadalupe Razo Calderón, José Aguirre Raya, Aniceto Canchola, quienes estuvieron con migo apoyándome siempre cuando se los pedía, muchísimas gracias a todos, créanme que sin su apoyo no hubiera podido llegar a Pachuca, mucho menos a terminar la carrera.

A mis compañeros de grupo (Wendy Sánchez, Nancy Mora, Humberto Cortes, Lizbeth Gonzales, Alba, Elba, Eva, Cesar y Rafa), por su amistad, consejos y apoyo brindado. Recordaré siempre los momentos que pasamos juntos y espero que la amistad que se logró formar perdure por muchos años.

Índice general

ÍNDICE DE TABLAS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
NOTACIÓN	V
LETRAS GRIEGAS	VII
RESUMEN	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. BIOCONSERVACIÓN.....	3
2.2. HISTORIA DE LOS RECUBRIMIENTOS ALIMENTARIOS.....	4
2.3. PELÍCULAS Y RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES	5
2.3.1. <i>Película comestible</i>	5
2.3.2. <i>Recubrimiento comestible</i>	6
2.4. TIPOS DE MATERIALES USADOS PARA LA FABRICACIÓN DE PELÍCULAS Y RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES	7
2.4.1. <i>Películas a base de lípidos</i>	8
2.4.2. <i>Películas a base de proteínas</i>	8
2.4.2.1. Caseína	10
2.4.3. <i>Películas a base de polisacáridos</i>	11
2.4.3.1. Celulosa y derivados	11
2.4.3.2. Quitina y quitosano.....	12
2.4.3.3. Pectinas.....	13
2.4.3.4. Gelana.....	14
2.4.4. <i>Otros componentes</i>	16
2.4.5. <i>Mezclas</i>	17
2.5. MÉTODOS DE ELABORACIÓN DE PELÍCULAS Y RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES .	18
2.6. EMPAQUES PARA ALIMENTOS	19
2.6.1. <i>Empaques inteligentes</i>	20
2.6.2. <i>Empaques activos</i>	20
2.6.2.1. Películas poliméricas con actividad antimicrobiana.....	20
2.6.2.2. Aceites esenciales.....	22
2.6.2.3. Ácidos orgánicos	23
2.6.2.4. Bacteriocinas.....	24
3. JUSTIFICACIÓN	31
4. HIPÓTESIS.....	33

5. OBJETIVOS	34
5.1. OBJETIVOS GENERAL	34
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES	34
6. MATERIALES	35
6.1. MATERIALES.....	36
6.1.1. <i>Medios de cultivo</i>	36
6.1.2. <i>Microorganismos</i>	36
6.1.3. <i>Biopolímeros y agentes antimicrobianos</i>	36
6.2. MÉTODOS	37
6.2.1. <i>Producción de péptidos antimicrobianos por Streptococcus infantarius</i> 37	
6.2.2. <i>Determinación de la actividad antimicrobiana de los péptidos producidos por S. infantarius y nisina comercial</i>	38
6.2.3. <i>Elaboración de las películas con agentes antimicrobianos</i>	40
6.2.4. <i>Evaluación del efecto antimicrobiano de las películas bajo dos condiciones ambientales (T= 35 ± 10 °C y 32±10% HR y T= 4 ± 2 °C y 98±10% HR)</i>	42
6.2.5. <i>Acondicionamiento de las películas</i>	43
6.2.6. <i>Propiedades mecánicas de las películas con sustancias antimicrobianas</i>	43
6.2.7. <i>Propiedades de barrera</i>	45
6.2.7.1. <i>Permeabilidad al oxígeno (PO₂) de las películas con sustancias antimicrobianas</i>	45
6.2.7.2. <i>Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas con sustancias antimicrobianas</i>	46
6.2.8. <i>Propiedades físicas</i>	47
6.2.8.1. <i>Determinación del color a películas con y sin sustancias antimicrobianas</i>	47
6.2.8.2. <i>Determinación de la solubilidad en agua de películas de C y PG con y sin sustancias antimicrobianas</i>	48
6.2.9. <i>Microscopia electrónica de barrido</i>	49
7. RESULTADOS	50
7.1 . DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS PÉPTIDOS PRODUCIDOS POR <i>S. INFANTARIUS</i> Y DE NISINA COMERCIAL	50
7.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LAS PELÍCULAS	51
7.2.1 <i>Actividad antimicrobiana a 35 °C, 32% HR</i>	51
7.2.2 <i>Actividad antimicrobiana a 4 °C, 98% HR</i>	56

7.2. PROPIEDADES MECÁNICAS DE LAS PELÍCULAS CON SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS.....	63
7.3. PROPIEDADES DE BARRERA.....	71
7.3.1. <i>Permeabilidad al oxígeno (PO₂) de las películas con sustancias antimicrobianas</i>	71
7.3.2. <i>Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas con sustancias antimicrobianas</i>	73
7.4. PROPIEDADES FÍSICAS.....	75
7.4.1. <i>Determinación de color a películas con y sin sustancias antimicrobianas</i>	75
7.4.2. <i>Solubilidad en agua de películas de caseinato y pectina-gelana con y sin sustancias antimicrobianas</i>	77
7.5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	78
8. CONCLUSIONES.....	80
9. IMPLICACIONES.....	81
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA.....	82
11. ANEXOS.....	94
ANEXO 1. PERMEABILIDAD AL OXÍGENO (PO ₂).....	94
ANEXO 2: PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA (PVA).....	99

Índice de tablas

Cuadro 1. Funciones de las películas y recubrimientos comestibles en los alimentos, así como el tipo de película adecuado para tal fin.	6
Cuadro 2. Compuestos antimicrobianos de importancia en la industria de los alimentos.	22
Cuadro 3. Clasificación de las bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas (BAL).	25
Cuadro 4. Características de algunas bacteriocinas producidas por bacterias lácticas.	25
Cuadro 5. Aplicación de bacteriocinas a diferentes películas biopoliméricas para reducir el desarrollo de microorganismos patógenos en alimentos.	28
Cuadro 6. Formulaciones de las películas bioactivas.	41
Cuadro 7. Tratamientos de películas poliméricas con antimicrobianos.	42
Cuadro 8. Propiedades mecánicas evaluadas en películas con y sin sustancias antimicrobianas.	66
Cuadro 9. Propiedades mecánicas de algunas películas biopoliméricas reportadas en la literatura.	67
Cuadro 10. Permeabilidad al oxígeno (PO_2) de películas con y sin sustancias antimicrobianas.	72
Cuadro 11. Valores de Permeabilidad al Vapor de Agua (PVA) de películas con agentes antimicrobianos.	74
Cuadro 12. Parámetros de color de películas de caseinato (C) y pectina-gelana (PG) con agentes antimicrobianos.	76
Cuadro 13. Valores promedio de la solubilidad en agua de las películas caseinato y pectina-gelana con y sin sustancias antimicrobianas.	77

Índice de figuras

Figura 1.- Representación esquemática de las funciones de las películas y recubrimientos comestibles (Lin & Zhao, 2007).	6
Figura 2.- Materiales usados en la elaboración de películas y recubrimientos comestibles (Aguirre-Loredo, 2011; Debeaufort & Voilley, 2009).	8
Figura 3.- Estructura química del ácido galacturónico y de pectinas, (Bello-Gutiérrez, 2000).	13
Figura 4.- Modelo de caja de huevo para describir la gelificación de pectinas de bajo metoxilo (Voragen et al., 2009).	14
Figura 5.- Estructura química de la goma gelana en su forma desacilada (Yuguchi et al., 1999).	15
Figura 6.- Esquematación del modo de acción de las bacteriocinas. A) Modo de acción de la clase I cuyo representante es la nisina; muestra el ataque al lípido II en la pared celular, inhibición de la síntesis de peptidoglucano y formación de poros en la membrana celular. B) Modo de acción de la clase II como ejemplo se muestra la Lactococina A. Fuente: Cotter et. al., 2012.	27
Figura 7.- Esquematación general del proceso de elaboración de películas con sustancias antimicrobianas y pruebas correspondientes para su evaluación como empaques alimentarios. Nota: Permeabilidad al oxígeno (PO_2), Permeabilidad al vapor de agua (PVA), Esfuerzo a la fractura (σ_f), porcentaje de elongación (%e) y Módulo de Young (ME).	35
Figura 8.- Relación entre la masa de nisina en solución y los halos de inhibición mostrados contra <i>L. monocytogenes</i> . Prueba de “Difusión en agar por gota” para determinar unidades de actividad antimicrobiana.	40
Figura 9.- Vista frontal y superior de la celda de aluminio para determinar PVA. Se muestra una celda con una película, así como las dimensiones importantes para los cálculos de PVA.	46
Figura 10.- Equipo (desecador de gabinete) y condiciones utilizados en la PVA.	47

Figura 11.- Microscopio JEOL JSM 6010LA <i>Analytical Scanning Electron Microscope</i> , se ilustra el porta muestras utilizado en este trabajo.	49
Figura 12.- Halos de inhibición del crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> en placas de agar suave BHI. A. Diluciones base 2 de la solución de nisina comercial y B. Diluciones base 2 del concentrado AM.	50
Figura 13.- (A) Aspecto de las películas de caseinato adicionadas con antimicrobiano (AM) de <i>S. infantarius</i> (inferior derecha) o nisina (superior derecha). (B) Aspecto de películas de pectina-gelana con AM (superior derecha) y con nisina (inferior derecha).	51
Figura 14.- Efecto de películas con actividad antimicrobiana en el crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en medio Oxford, en los distintos tratamientos bajo condiciones de incubación a 35°C y 32% HR . Se muestran los resultados con su réplica.	53
Figura 15.- Imágenes de cajas Petri inoculadas con <i>Listeria monocytogenes</i> en medio Oxford. Se muestra el efecto de los distintos tratamientos (películas C y PG) en el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> (colonias oscuras) bajo condiciones de incubación a 35 °C y 32% HR . Flecha en coordenadas (PG-AM-blanco; 192 h) indica la aparición de colonias típicas del microorganismo indicador, para el blanco del tratamiento 3 (PG-AM).	55
Figura 16.- Efecto de películas con actividad antimicrobiana en el crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en medio Oxford, en los distintos tratamientos bajo condiciones de incubación a 4 °C y 98% HR . Se muestran los resultados con su réplica.	57
Figura 17.- Imágenes de cajas Petri inoculadas con <i>Listeria monocytogenes</i> en medio Oxford. Se muestra el efecto de los distintos tratamientos (películas C y PG) en el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> (colonias oscuras) bajo condiciones de refrigeración a 4°C y 98% HR	58
Figura 18.- Evaluación de la actividad antimicrobiana de soluciones de pectina (A), gelana (B) y mezclas 83% pectina-17% gelana (C). Prueba de difusión de gota en agar. Se muestran las concentraciones en donde fue evidente los halos de inhibición del crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en soluciones de pectina (6 a 10%) (A). En soluciones de gelana no se presentaron halos de inhibición (B). En la mezcla pectina-gelana fue evidente la presencia de halos de inhibición a partir de concentraciones de polímero del 6% (C).	60

Figura 19.- Reogramas representativos de las películas, A. Comportamiento mecánico de las películas de caseinato en su diferentes tratamientos después de ser sometidas a la prueba de tensión uniaxial, B. Comportamiento mecánico de películas pectina-gelana (PG).	65
Figura 20.- Micrografías (sección transversal y superficie) a escala de grises 2 kV, en resolución de 1000x de los diferentes tratamientos de películas evaluadas y sus respectivos blancos.	79
Figura 21.- Cámara de baja y alta presión del equipo VAC-V2 Permeability tester (Labthink®, China).	94
Figura 22.- Esquema de las cámaras del equipo Permeability tester (Labthink®, China). Se indican las diferentes presiones involucradas en la prueba de permeabilidad a gases.	97
Figura 23.- Esquema del arreglo experimental para la determinación de la Permeabilidad al Vapor de Agua (PVA) de las películas.....	100
Figura 24.- Diagrama del modelo experimental usado para determinar difusividad y permeabilidad de vapor de agua en las películas.....	101

Notación

		Unidades
$A_{(t)}$	Área transversal en cualquier instante	m^2
A_0	Área inicial	m^2
AC	Ácido cítrico	
Ae	Ácido estéarico	
AgNPs	Nanopartículas de plata	
AL	Ácido láctico	
AM	Antimicrobiano de <i>Streptococcus infantarius</i> aislado del pozol	
AM	Ácido málico	
An	Aceite esencial de naranja	
Ao	Ácido oleico	
ASTM	Sociedad Americana de pruebas y materiales	
ATCC	American Type Collection Culture	
aw	Actividad de agua	
BAL	Bacteria ácido láctica	
BHI	Caldo Infusión Cerebro Corazón	
C	Caseinato	
CABA	Cuerpo académico de Biotecnología Agroalimentaria	
CC	Caseinato de calcio	
CL	Aceite esencial de clavo	
CMC	Carboximetilcelulosa	
CMGe	Carboximetil-gelana	
CS	Caseinato de sodio	
$D_{H_2O\text{-aire}}$	Difusividad del agua gaseosa a través de la masa de aire estancado	m^2/s
$D_{H_2O\text{-f}}$	Difusividad del agua gaseosa a través de la película	m^2/s
$D_{O_2\text{-f}}$	Difusividad de oxígeno a través de la película	$m^2.s$
EC	Aceite esencial de canela	
EDTA	Ácido etinil diamino tetra-acético	
ESU	Extracto de semillas de uva	
F	Fuerza	N
Gel	Gelatina	
Gli	Glicerol	
HAP	Hidroxiapatita	
HEC	Hidroxietilcelulosa	
HPC	Hidroxipropilcelulosa	
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulosa	
HR	Humedad relativa	
J	Jengibre	

		Unidades
KC	Caseinato de potasio	
KG	Konjac glucomanano	
L ₀	Altura o longitud inicial	m
LDPE	Poliétileno de baja densidad	
Lim	Limoneno	
L _t	Altura o longitud en cada instante de tiempo	m
Lys	Lisozima	
MC	Metilcelulosa	
ME	Módulo de Young	MPa
MEO	<i>Mentha Pulegium</i>	
MRS	Caldo De Man Rogosa y Sharpe	
NA	No aplica	
NaC	Caseinato de sodio	
Nis	Nisina comercial	
No ₂	Flux molar de oxígeno	g.molO ₂ /m ² s
Ø	Diámetro	cm
p/p	Relación peso/peso	
p/v	Relación peso/volumen	
P ₀	Presión parcial de vapor de agua en la interfase sílica gel-aire dentro de la celda	Pa
P ₁	Presión parcial de vapor de agua en la superficie de la película hacia el interior de la celda	Pa
Pc	Película control	
PFSP	Peso final seco de la película	g
PG	Pectina-Gelana	
PISP	Peso inicial seco de la película	g
PLA	Ácido poliláctico	
PO ₂	Permeabilidad al oxígeno	g m Pa ⁻¹ s ⁻¹ m ⁻²
P _{O₂-f}	Permeabilidad de oxígeno a través de la película	g.mol m/ Pas m ²
P _{O₂-Lf}	Presión final en la cámara de baja presión	Pa
P _{O₂-Li}	Presión inicial en la cámara de baja presión	Pa
P _{Sat}	Presión de saturación	
P _T	Es la presión atmosférica en el sitio de experimentación (presión atmosférica de Tulancingo, Hidalgo)	81460 Pa
PVA	Permeabilidad al vapor de agua	g m Pa ⁻¹ s ⁻¹ m ⁻²
PVA	Polivinil alcohol	
Q	Quitano	
S	Sepiolita	
SEM	Microscopia electrónica de barrido	
SF	Solución filmogénica	
Soy	Soya	

		Unidades
T	Temperatura	°C
UA	Unidades de actividad	
UFC	Unidades formadoras de colonias	
UI	Unidades internacionales	
UV	Luz ultra violeta	
ZOE	<i>Zataria multiflora Boiss</i>	

Letras griegas

		Unidades
α	Ancho de la tira de película	m
ΔP_{O_2in}	Diferencia de presiones (media logarítmica)	Pa
ΔC_{O_2}	Diferencia de concentración de oxígeno	(g/m ³ ; mol/m ³)
ΔE	Diferencia total de color	
ΔL	Diferencia de longitudes	m
Δx	Espesor de la tira de película	m
ϵ_H	Deformación de Hencky	(-)
σ_f	Esfuerzo a la fractura	Pa
σ_T	Esfuerzo verdadero	Pa

Resumen

Las películas comestibles con compuestos antimicrobianos son empaques bioactivos, biodegradables y novedosos que pueden extender la vida útil de los alimentos a través de la inhibición de microorganismos patógenos que pudieran estar presentes en la superficie del mismo. En este trabajo se formularon dos tipos de películas antimicrobianas; 1) pectina-gelana (PG) (P = 1% p/p, G = 0.2% p/p, 5 mM CaCl₂) y 2) caseinato de sodio (C, 4% p/v), con glicerol como plastificante y dos tipos de bacteriocinas (93000 unidades de actividad (UA)/película): a) péptidos producidos por *Streptococcus infantarius*, bacteria ácido-láctica aislada del pozol y b) nisina comercial (Nis). Se evaluó la actividad antilisterial de las películas a lo largo del tiempo en dos condiciones ambientales: 35 °C, 32% HR y 4 °C, 98% HR, usando *Listeria monocytogenes* como microorganismo indicador. La finalidad fue establecer si la naturaleza de la matriz polimérica tiene efecto en la difusión del agente antimicrobiano y por lo tanto en la duración de la actividad de la película. Con estos estudios se espera contribuir a generar empaques activos diseñados para proteger productos alimentarios de la acción de microorganismos patógenos. Además de los análisis de actividad antimicrobiana, se evaluaron las propiedades mecánicas (ASTM D882), de permeabilidad al oxígeno (PO₂) (ASTM D1434) y permeabilidad al vapor de agua (PVA) (ASTM E96-00), así como las características de color, solubilidad y microestructura mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) de las películas para determinar el posible efecto del compuesto antimicrobiano en esas propiedades. A 35 °C, la caja control (sin película) presentó crecimiento de *L. monocytogenes* desde las 24 h. Las películas C inhibieron parcialmente el crecimiento de *L. monocytogenes*, siendo C-AM la que mostró la mayor actividad antimicrobiana (80% de inhibición) a partir de t=48 h. Las películas PG-AM y PG-Nis inhibieron completamente el crecimiento de *L. monocytogenes* hasta t=192 h. A 4 °C, las películas C-AM y C-Nis extendieron la fase lag del crecimiento del microorganismo indicador hasta 11 y 38 días, respectivamente. En contraste, las películas PG prácticamente inhibieron el crecimiento de *L. monocytogenes* durante el tiempo que duró en experimento (61

días). AM generó mayor actividad antimicrobiana que Nis, lo cual puede atribuirse a que AM se ha identificado como una bacteriocina del tipo II, con actividad antilisterial y peso molecular mayor que Nis, lo cual puede generar una difusión prolongada a través de la película, dando lugar a una actividad antilisterial que se prolonga a lo largo del tiempo. La incorporación de los compuestos antimicrobianos no generó diferencias significativas ($p > 0.05$) en las propiedades mecánicas, PVA, PO_2 , color y solubilidad. Las películas con AM presentaron menores valores del módulo de Young y mayor elongación que las que contenían Nis, lo cual se atribuye a un efecto de plastificación de AM. SEM evidenció películas lisas, homogéneas y sin irregularidades en sus cortes transversales.



Ángel Gpe. Calderón Aguirre

CABA

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas la población mundial se ha interesado en consumir alimentos libres de patógenos, con la menor cantidad de aditivos químicos, con valores nutricionales elevados y sensorialmente aceptables. Ha surgido el concepto de “alimentos saludables o funcionales”, en donde se incluyen alimentos que aportan características nutricionales adicionales para el mejoramiento de la calidad de vida (Arrieta et al., 2014; Giménez et al., 2012). Para conciliar las demandas de los consumidores por alimentos procesados, se han desarrollado tecnologías innovadoras enfocadas a la conservación de los alimentos de manera “natural”, con el fin de ofrecer al consumidor productos alimenticios con mayor vida útil y procesamiento mínimo (Aliabadi-Shojaee et al., 2014; Balciunas et al., 2013). Dentro de estas tecnologías destacan las que incluyen sistemas biológicos antimicrobianos como las bacterias ácido-lácticas y sus bacteriocinas (Favaro et al., 2014)

En las últimas dos décadas se han incrementado las investigaciones sobre bacteriocinas y sus aplicaciones en la bioconservación de alimentos. Dentro de las aplicaciones innovadoras de las bacteriocinas se encuentra su inclusión como agentes antimicrobianos en películas o recubrimientos para la conservación de alimentos (Cao-Hoang et al., 2010). La función que tienen estas películas y/o recubrimientos adicionados con agentes antimicrobianos es inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos causantes de deterioro de los alimentos, aumentar la vida de anaquel del producto envasado y/o reducir la aparición de cepas resistentes que son de alto riesgo para la salud (Ponce-Alquicira, 2008). Las investigaciones más recientes se han enfocado en el desarrollo de empaques antimicrobianos y biodegradables, es decir formulados a partir de ingredientes que en su mayoría proceden de fuentes renovables (polisacáridos, proteínas), evitando el uso de parafinas, aceites minerales, polietileno y plásticos derivados del petróleo. El desarrollo de estos empaques activos biodegradables promueve la reducción en la generación de residuos plásticos procedentes de alimentos procesados. Por otra parte, la adición directa de antimicrobianos (ácidos orgánicos, extractos de especias, agentes quelantes, enzimas, bacteriocinas, etc.)

a los alimentos, podría dar lugar a una pérdida de la actividad debido a la lixiviación en la matriz alimentaria y reacción cruzada con otros componentes de los alimentos, tales como lípidos o proteínas (Mauriello et al., 2005). Por lo tanto, el uso de películas comestibles que contienen agentes antimicrobianos, principalmente bacteriocinas, podría ser más eficiente en tecnologías de barreras aplicadas a la conservación de alimentos.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de dos bacteriocinas: a) péptidos producidos por bacterias ácido-lácticas aisladas del pozol (bebida ácida y refrescante de origen Maya obtenida del maíz a través de fermentaciones no alcohólicas y consumida en el suroeste de México, (Escalante et al., 2001; Wachter et al., 2000). y b) nisina comercial; en dos formulaciones de películas a base de biopolímeros. Se examinó la bioactividad de las películas a lo largo del tiempo en dos condiciones ambientales: 35 °C, 32% HR y 4 °C, 98% HR. La finalidad fue establecer si la naturaleza de la matriz polimérica tiene efecto en la difusión del agente antimicrobiano y por lo tanto en la duración de la actividad de la película. Con estos estudios se espera contribuir a generar empaques activos diseñados para proteger productos alimentarios de la acción de microorganismos patógenos. Además de los análisis de actividad antimicrobiana de las películas, en este trabajo se evaluaron las propiedades mecánicas y de barrera (permeabilidad al oxígeno y vapor de agua), así como las características de color y solubilidad de las películas para determinar el posible efecto del compuesto antimicrobiano en estas propiedades.



Ángel Gpe. Calderón Aguirre

CABA

2. *M*ARCO TEÓRICO

2.1. Bioconservación

La producción de alimentos menos procesados, “más naturales”, pero al mismo tiempo con altas expectativas en cuanto a su conservación, calidad e inocuidad, es una de las tendencias actuales de las empresas productoras de alimentos y motivo de muchas investigaciones alrededor del mundo (Balciunas et al., 2013; Bierhalz et al., 2012; Cosentino et al., 2012; Gorrasi et al., 2012; Pérez-Espitia et al., 2014). El poder satisfacer tal demanda representa un reto importante para los investigadores y para las empresas del ramo alimenticio, principalmente cuando lo que se quiere es la eliminación o disminución de conservadores químicos en los alimentos. Es por ello que para la industria alimentaria, la bioconservación ha logrado convertirse en el sustituto principal de la conservación química, tecnología aún vigente en muchos sectores de productos alimenticios.

La bioconservación se puede definir como la extensión de la vida útil e incremento de la seguridad de los alimentos, utilizando su microbiota natural o los metabolitos de ésta (Calo-Mata et al., 2007; Gao et al., 2014; García et al., 2010; Gialamas et al., 2010; López-López & Jiménez-Vera, 2008). El término microbiota hace referencia a la utilización de microorganismos capaces de producir sustancias inhibidoras que impidan el desarrollo de microorganismos que puedan afectar la calidad de los alimentos. Un ejemplo de bioconservación es la utilización de péptidos antimicrobianos producidos por bacterias ácido-lácticas (BAL), conocidas como “bacteriocinas”. Actualmente, el término “bacteriocina” se usa para describir a péptidos catiónicos pequeños, termoestables, sintetizados por bacterias Gram positivas, principalmente bacterias ácido-lácticas y que tienen un espectro amplio de inhibición (Cotter et al., 2012). Debido a que las bacterias ácido-lácticas tradicionalmente se asocian como seguras y están presentes en alimentos de forma natural, las bacteriocinas surgen como principal tópico en bioconservación de alimentos (García et al., 2010).

Las bacterias ácido-lácticas producen distintos compuestos con actividad antimicrobiana, dentro de los que destacan; ácidos orgánicos, diacetilo, acetoína, peróxido de hidrógeno, reuterina, reuteriicina y bacteriocinas (Gálvez et al., 2007). La estructura, clasificación y modo de acción de las bacteriocinas se discuten en secciones posteriores.

Numerosos estudios reportan ventajas del uso de bacteriocinas en sistemas alimentarios: I) extensión de la vida de anaquel de alimentos, II) proporcionan protección adicional a los tratamientos térmicos, III) disminuyen el riesgo de transmisión de microorganismos patógenos a través de la cadena alimentaria, IV) disminuyen las pérdidas económicas debido a contaminaciones alimentarias, V) reducen la aplicación de conservadores químicos, VI) permiten la aplicación de tratamientos químicos menos severos sin comprometer la seguridad alimentaria ni la conservación de nutrientes termolábiles ni las propiedades organolépticas, VII) permiten el desarrollo de nuevos alimentos (menos ácidos, con menos sal y con mayor contenido de humedad), VIII) se puede cumplir la demanda de alimentos mínimamente procesados, más frescos y listos para consumir (*ready-to-eat food*) (Gálvez et al., 2007). Otra innovación en el campo de las bacteriocinas es su uso en la elaboración de películas comestibles activas, en donde la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas se usa para impedir el desarrollo de bacterias patógenas sensibles a estos agentes en alimentos empacados con esas películas activas (Gialamas et al., 2010; Leroux et al., 2003).

2.2. Historia de los recubrimientos alimentarios

El uso de recubrimientos comestibles para alimentos, es una práctica antigua, algunos ejemplos son el recubrimiento a base de algas para empacar sushi, los empaques para embutidos, papel de arroz para empacar caramelos o golosinas pegajosas y los recubrimientos desarrollados para frutas o vegetales que imitan las cubiertas naturales. Existen reportes que datan de los siglos XII y XIII en los que se menciona que en China se utilizaban ceras para recubrir a los cítricos retardando su desecación (Baldwin et al., 2012; Debeaufort et al., 1998;

Greener & Fennema, 1994). Durante el siglo XVI se practicaba en Inglaterra el “enmantecado” (recubrimiento con grasa animal) de productos alimentarios para prevenir la pérdida de humedad de éstos. No fue hasta los años 50’s y mitad de los 80’s que se desarrollaron trabajos orientados al uso de películas y recubrimientos para extender la vida de anaquel y mejorar la calidad de los alimentos (frescos, congelados y procesados). Desafortunadamente esta tecnología es de valor limitado y tiene áreas de oportunidad, debido a las pobres propiedades de barrera que presentan estas películas y recubrimientos, esto se ha confirmado tanto en la literatura como en la práctica. En los últimos años se han desarrollado mezclas a base de aceites, ceras, distintos biopolímeros y otros aditivos, esto con el objetivo de conseguir buenas propiedades de barrera (baja permeabilidad al vapor de agua y gases) en alimentos (Campos et al., 2010; Martin-Belloso et al., 2009).

2.3. Películas y recubrimientos comestibles

Las películas y recubrimientos comestibles son sistemas que permiten mejorar la calidad de los alimentos, asegurando en los mismos una mayor vida de anaquel, además de mantener el valor nutricional, la sanidad, calidad, estabilidad y economía (Espinel et al., 2014). Sus usos se describen en el Cuadro 1, los cuales pueden ser como embalaje individual (materiales para contener o recubrir alimentos), para separar los compartimientos de ingredientes heterogéneos, además de que se les puede incorporar aditivos, agentes antimicrobianos, sabores, colores y otras sustancias que ayuden a mejorar las propiedades sensoriales e incrementen la vida de anaquel de un alimento (Martin-Belloso et al., 2009).

2.3.1. Película comestible

La película comestible puede ser definida como una matriz preformada delgada, que posteriormente será utilizada en forma de recubrimiento en el alimento o estará ubicada entre los componentes del mismo (Pérez-Espitia et al., 2014).

2.3.2. Recubrimiento comestible

Un recubrimiento comestible es una matriz delgada, continua que se estructura alrededor de un alimento, formada generalmente mediante la inmersión del mismo en una solución formadora de películas (Cagri et al., 2004; Ramos et al., 2012). Tanto las películas como los recubrimientos pueden cumplir muchos de los requisitos involucrados en la comercialización de alimentos (Cuadro 1), entre los que destacan el valor nutricional, la sanidad, calidad, estabilidad y economía. Pueden emplearse como barrera a los gases (CO_2 , O_2 y vapor de agua), formando un tipo de atmósfera modificada en la superficie del alimento (ver Figura 1). Un ejemplo de ello son los recubrimientos de frutas y hortalizas frescas, en donde la función primordial es la de restringir la pérdida de humedad de la fruta hacia el ambiente y reducir la absorción de oxígeno por la fruta para disminuir la tasa de actividad respiratoria evitando la oxidación del producto.

Cuadro 1. Funciones de las películas y recubrimientos comestibles en los alimentos, así como el tipo de película adecuado para tal fin.

Función	Película
Retardar la migración de humedad y solutos.	Lípidos
Retardar la migración de aceite y grasa.	Hidrocoloide
Retardar la pérdida de compuestos volátiles de sabor.	Hidrocoloide-lípido
Vehículo de aditivos alimentarios, valor nutricional.	Hidrocoloide-lípido

Nota: El término Hidrocoloide-lípido hace referencia a una película compuesta por la combinación de ambas sustancias. Fuente: (Cagri et al., 2004)

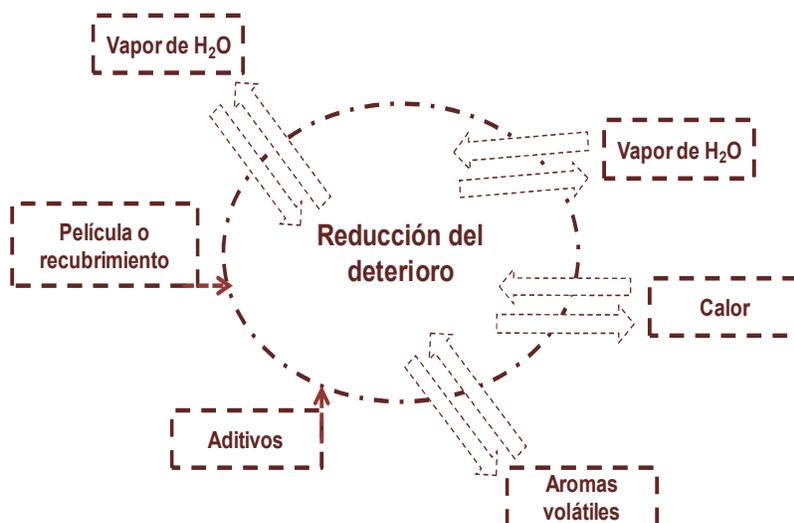


Figura 1.- Representación esquemática de las funciones de las películas y recubrimientos comestibles (Lin & Zhao, 2007).

En una película o recubrimiento comestible pueden actuar sinérgicamente otros materiales como los agentes plastificantes, agentes antimicrobianos, saborizantes, antioxidantes y pigmentos (Gialamas et al., 2010); cada uno con un propósito específico, como la mejora de las propiedades organolépticas del producto, el aumento la vida de anaquel del mismo, disminución de costos de producción, entre otros. Adicionalmente representan una alternativa a los materiales comerciales de empaque que se emplean actualmente en los productos alimentarios, desde un punto de vista de la protección al medio ambiente, se conciben menos costosos que los plásticos (ejemplo poliestireno o policloruro de vinilo), además su uso reduciría significativamente la basura asociada con alimentos frescos y procesados (Lin & Zhao, 2007).

2.4. Tipos de materiales usados para la fabricación de películas y recubrimientos comestibles

La elaboración de películas y recubrimientos comestibles involucra utilizar biopolímeros naturales de alto peso molecular que proporcionen una matriz macromolecular con alta cohesividad. Algunos autores (Olivas & Barbosa, 2009) clasifican a los componentes de las películas y recubrimientos comestibles en tres categorías: lípidos, hidrocoloides y mezclas (Figura 2).

Dentro de los hidrocoloides que se emplean para este propósito están las proteínas, celulosa y sus derivados, alginatos, pectinas, almidones y gomas, principalmente; los cuales debido a su naturaleza hidrofílica, suelen presentar valores altos para la permeabilidad al vapor de agua. Los lípidos incluyen; a las ceras, acilgliceroles y ácidos grasos, mientras que las mezclas incluyen hidrocoloides y lípidos. Los otros componentes en la formulación lo constituyen plastificantes, emulsificantes, agentes de superficie activa (tensoactivos), agentes con principio activo (péptidos antimicrobianos (PAM), aceites esenciales), lubricantes, etc., los cuales tienen que ser añadidos en la formulación para mejorar las propiedades de la película o recubrimiento.

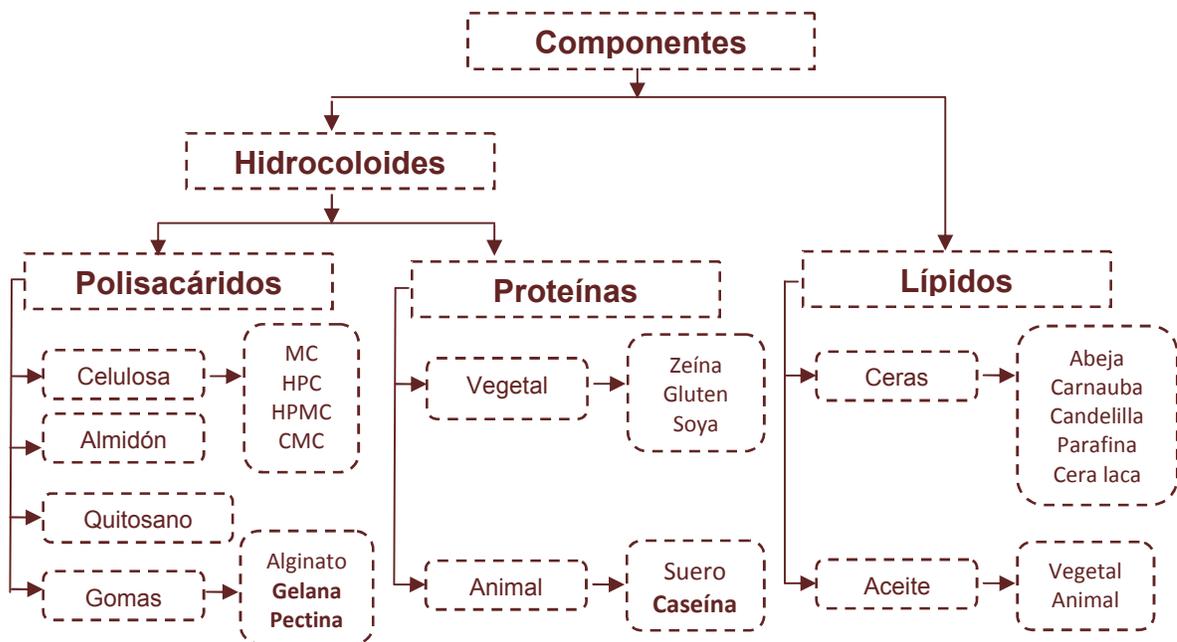


Figura 2.- Materiales usados en la elaboración de películas y recubrimientos comestibles (Aguirre-Loredo, 2011; Debeaufort & Voilley, 2009).

2.4.1. Películas a base de lípidos

Los lípidos para la fabricación de películas comestibles incluyen: ceras naturales (carnauba, candelilla y cera de abeja). Estos materiales al usarse solos presentan algunas limitaciones tales como propiedades mecánicas pobres e incluso mala apariencia (Gennadios et al., 1997). Sin embargo su baja polaridad y capacidad para formar una red molecular densa y ordenada les brinda excelentes propiedades de barrera contra la humedad; es por eso que los lípidos son mezclados con otras sustancias como polisacáridos, ya que estas combinaciones proporcionan al recubrimiento mayor estabilidad (Baldwin et al., 2012; Koelsch, 1994).

2.4.2. Películas a base de proteínas

Las películas y recubrimientos elaborados a base de proteínas consisten en redes macromoleculares continuas, de baja humedad y poco ordenadas. Debido a su estructura secundaria abierta, flexible, móvil y a su carácter iónico presentan mayor interacción molecular que los polisacáridos, facilitando de esta manera la

formación de películas a través de la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares, interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals, enlaces covalentes y puentes disulfuro; por lo tanto se favorece el incremento de la cohesión de la matriz macromolecular proteínica para formar la película, además de que ésta resulta con buena barrera al oxígeno. La probabilidad de formación de enlaces intermoleculares depende de la conformación de la proteína y las condiciones del proceso. La formación de una red macromolecular proteica requiere de tres pasos (Gennadios, 2002):

1. La ruptura de los enlaces o interacciones intermoleculares que estabilizan a los polímeros.
2. El reordenamiento y orientación de las cadenas poliméricas.
3. Formación de una estructura tridimensional estabilizada por interacciones intermoleculares después de la remoción del solvente.

Entre las proteínas formadoras de películas y recubrimientos comestibles se encuentran: caseína, proteínas del suero de leche, proteína de soja, zeína de maíz, colágeno, gluten de trigo, queratina, la proteína de cacahuate y albúmina de huevo. Las interacciones entre los aminoácidos que estructuran tales proteínas favorecen la creación de películas y recubrimientos con excelentes propiedades cohesivas, sin embargo este tipo de hidrocoloides tienen aplicación en los casos en los que el control de la migración del vapor de agua no es el objetivo principal, debido a la presencia de grupos polares, los cuales permiten la asociación de cadenas poliméricas con el agua mediante puentes de hidrógeno, aumentando así la afinidad de la película por el agua. Sin embargo, el desarrollo de cubiertas compuestas en las que se combinan proteínas con materiales hidrofóbicos, ofrecen muchas oportunidades para este propósito (Dangaran et al., 2009).

2.4.2.1. Caseína

La caseína es la principal proteína de la leche, representa el 80% del total de las proteínas de la leche, está conformada por 4 subunidades: α -s₁, α -s₂, β -caseína y kappa-caseína con los siguientes porcentajes: 38%, 10%, 36% y 13% (Audic et al., 2003). Debido a la presencia de prolina en su estructura, la caseína presenta buena capacidad emulsificante, lo que la hace de particular interés cuando se requiere desarrollar películas compuestas proteína-lípidos. La formación de películas comestibles a base de este tipo de proteína requiere el empleo preferente de caseinatos de sodio (NaC) o potasio (KC), debido a que éstos presentan mejor solubilidad en agua y logran películas con buenas características funcionales, las cuales se confieren por la composición de los aminoácidos en la estructura de la caseína (Fernández & Maté, 2011). Entre las características que proporcionan los aminoácidos de la proteína a las películas tenemos;

- Películas con resistencia a la desnaturalización térmica, y/o coagulación; las películas se mantienen estables en un rango amplio de pH, temperatura y concentración de sales.
- La matriz de caseína en las películas se forma de manera aleatoria y es poco compacta, problema que se mejora con la utilización de ultrasonido o microfluidización, procesos que involucran alto cizallamiento, lo cual provoca cambios en la estructura de las proteínas que favorecen las interacciones moleculares, logrando una emulsión estable y fina. Esta mayor organización molecular puede dar como resultado películas rígidas y con alta resistencia mecánica (Khwaldia et al., 2004).
- La formación de películas a partir de caseinato se facilita con la utilización de soluciones acuosas, éstas favorecen el entrecruzamiento y la formación de enlaces intermoleculares, incrementado así la cohesión de las películas (Mendoza-Mendoza, 2012)

- Las películas de caseinato son demasiado solubles en agua, lo cual se puede disminuir usando soluciones amortiguadoras con pH igual al punto isoeléctrico de las proteínas (Khwaldia et al., 2004).
- La naturaleza hidrofílica de las películas de caseína limita su capacidad para proveer una barrera a la humedad (Arrieta et al., 2013).

La formación del gel por parte de este tipo de proteínas se conforma básicamente por un conglomerado de micelas de caseína, mismas que resultan de interacciones hidrofóbicas y por la formación de complejos de fosfato de calcio con residuos de fosfoserina presentes en la estructura de la caseína (Fernández & Maté, 2011).

2.4.3. Películas a base de polisacáridos

Los hidratos de carbono o azúcares son los compuestos orgánicos más abundantes y a su vez los más usados en la industria de alimentos, se usan como estabilizantes, espesantes y gelificantes, además por sus propiedades filmogénicas, pueden ser utilizados en la elaboración de películas comestibles, las cuales presentan buenas propiedades mecánicas y son barrera eficiente contra compuestos de baja polaridad. Sin embargo, debido a su naturaleza hidrofílica presentan baja resistencia a la transferencia de vapor de agua (Arredondo-Ochoa, 2012). Los azúcares más evaluados en la formación de películas comestibles incluyen celulosa y sus derivados, quitina, quitosano, pectinas, goma gelana, almidón, pululano, alginato, entre otros; éstos tienen las características de ser polímeros de cadena larga, solubles en agua y de producir un fuerte aumento en la viscosidad al dispersarse en agua.

2.4.3.1. Celulosa y derivados

La celulosa se compone de unidades de D-glucosa vinculadas a través de enlaces glucosídicos β -1,4. Para aumentar la solubilidad al agua de este polímero, se recomienda someterlo a un tratamiento con álcali para hinchar su estructura, seguido de una reacción con ácido cloroacético, cloruro de metilo y

óxido de propileno. Este tipo de tratamientos además de buscar el aumento de la solubilidad del polímero, produce carboximetilcelulosa (CMC), metilcelulosa (MC), hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxietilcelulosa (HEC) e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), derivados que generan películas inodoras, insípidas, flexibles, con propiedades mecánicas moderadas, resistencia a aceites y grasas, transparentes y además presentan mejores propiedades de barrera frente al vapor de agua y al oxígeno (O₂); su permeabilidad es comparable con la permeabilidad que presenta el polietileno de baja densidad (LDPE), lo cual convierte a los derivados de celulosa en buenos candidatos para la formación de películas comestibles. Numerosas investigaciones se han realizado en cuanto a la fabricación de películas compuestas a base de MC e HPMC (Bello-Gutiérrez, 2000; Murray et al., 2000; Nieto, 2009).

2.4.3.2. Quitina y quitosano

La quitina es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa. Se encuentra en el exoesqueleto de los crustáceos, en las paredes celulares de los hongos y otros materiales biológicos. Su estructura es idéntica a la celulosa excepto que el hidroxilo secundario, en el segundo átomo de carbono de la unidad D-glucosa, se sustituye por un grupo acetamida. El quitosano se deriva de la quitina por desacetilación en presencia de álcali. Por lo tanto, el quitosano es un copolímero constituido por β -(1-4)-2-acetamido-D-glucosa y β -(1-4)-2-acetamida-D-glucosa, este último por lo general superior al 80%. El quitosano se describe en términos del grado de desacetilación, el peso molecular promedio y sus propiedades antimicrobianas. Es un polímero biodegradable, no tóxico, biocompatible, semipermeable, con propiedades filmogénicas y antimicrobianas, lo que lo convierte en un material versátil y con un gran potencial en la industria para la creación de empaques con las siguientes características: biodegradables, biocompatibles, delgadas, claras, resistentes, con propiedades antimicrobianas (dadas por la presencia del grupo amino en la posición C2), buenas propiedades de barrera frente al oxígeno, semipermeables y flexibles (Castañeda et al., 2011; Dutta et al., 2009). La mayoría de las

propiedades mecánicas de las películas de quitosano son comparables con las de varios polímeros comerciales de mediana fuerza (ejemplo derivados celulósicos). Dichas características pueden modificar la atmósfera, lo que retrasa la maduración y la disminución de las tasas de transpiración en las frutas y verduras (Aguirre-Loredo, 2011).

2.4.3.3. Pectinas

Las pectinas normalmente se localizan entre los espacios intercelulares de los tejidos vegetales de manzanas y cítricos. Son sustancias poliméricas de elevado peso molecular, cuya cadena principal se encuentra formada esencialmente por enlaces β -1,4 entre unidades (150 a 500) de ácido galacturónico (Figura 3), sus grupos carboxilos pueden estar parcialmente esterificados con metoxilos (Pérez-Espitia et al., 2014). En las cadenas laterales se pueden encontrar también unidades de galactosa, ramnosa y arabinosa (Bello-Gutiérrez, 2000).

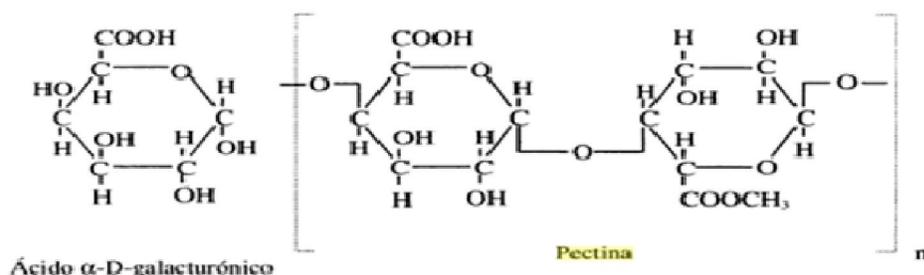


Figura 3.- Estructura química del ácido galacturónico y de pectinas, (Bello-Gutiérrez, 2000).

La aplicación principal de las pectinas en la industria radica en su capacidad de formar geles estables y firmes. Así, las pectinas ricas en grupos metoxilos (aquellas con más del 50% de los grupos carboxilos esterificados) gelifican tanto en medio acuoso como hidro-alcohólicos, siempre que sean ricos en azúcar (60-85%), además por tener 50% o menos de unidades de ácido galacturónico, no pueden reaccionar con iones calcio, formando geles sólo en medios ácidos dentro de un intervalo de pH de 2 a 3.5. En cambio, las pectinas pobremente metoxiladas

(20-40% de los grupos carboxilo esterificados) pueden gelificar pero a condición de que estén presentes iones calcio y un pH 2.8 a 6.5 (Bello-Gutiérrez, 2000); bajo estas condiciones forman lo que se conoce como una organización tipo “caja de huevo” (Figura 4), organización estructural que da inicio a la matriz filmogénica (Voragen et al., 2009).

Para la elaboración de películas comestibles se usan frecuentemente pectinas de bajo metoxilo, además de la adición de un agente plastificante y en algunos casos ácidos orgánicos. Las películas de pectinas poseen características similares a las películas de alginato, son transparentes, inodoras y sus propiedades mecánicas y de barrera son pobres (Olivas & Barbosa, 2009).

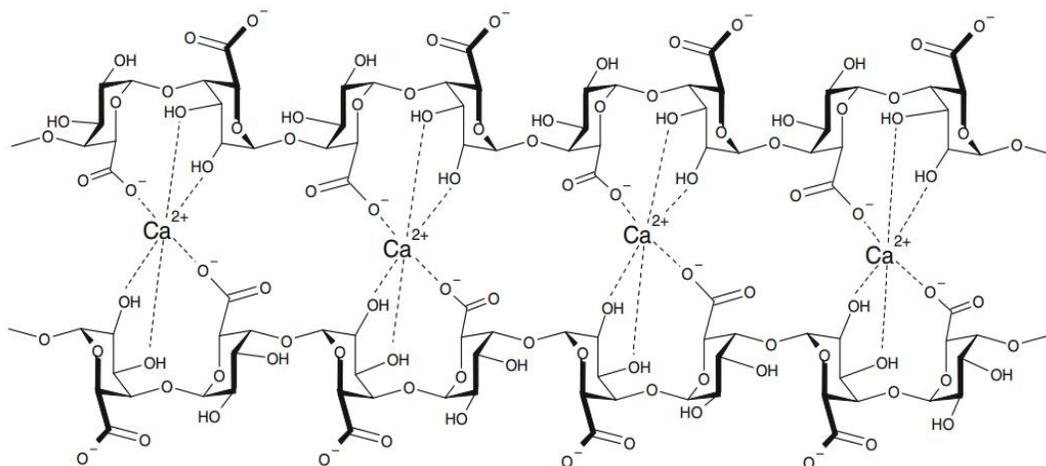


Figura 4.- Modelo de caja de huevo para describir la gelificación de pectinas de bajo metoxilo (Voragen et al., 2009).

2.4.3.4. Gelana

Es un exopolisacárido bacteriano, producido mediante fermentación aeróbica de la glucosa, por parte de la bacteria *Sphingomonas elodea* (Nieto, 2009; Zhu et al., 2014). La estructura básica es una molécula lineal aproximadamente de 500 kDa, formada por el tetrasacárido estructural: glucosa, ácido glucurónico, glucosa y ramnosa (Figura 5).

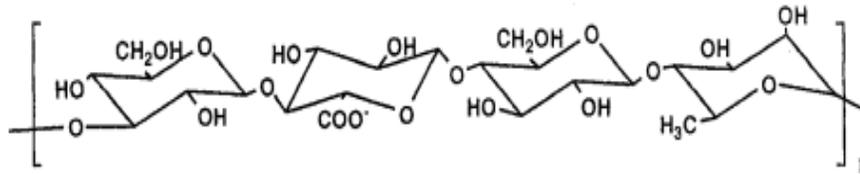


Figura 5.- Estructura química de la goma gelana en su forma desacilada (Yuguchi et al., 1999).

La hidratación de la goma, al ser un polisacárido aniónico, queda inhibida si existen iones divalentes en el medio como calcio o magnesio. El problema se soluciona utilizando secuestrantes de estos iones para que la goma pueda disolverse en agua fría. La temperatura de hidratación de la goma depende de la concentración iónica del medio, a mayor concentración se necesita mayor temperatura para su dispersión (Kirchmajer et al., 2014).

La formación de geles de gelana ocurre a partir de asociaciones iónicas entre las dobles hélices existentes cuando gelana se encuentra en disolución. Sus geles se comparan con los geles de carragenina y agar. Entre las características de gelana y sus geles están (Damodaran et al., 2008):

- Es un polvo blanquecino soluble en agua.
- El peso molecular de la goma gelana pueden variar desde 4×10^5 hasta aproximadamente 6×10^5 Daltones.
- Requiere de cationes para gelificar.
- Presenta diferencias en las temperaturas de gelificación/fusión (histéresis térmica).

La funcionalidad de la goma gelana depende de su grado de acilación (presencia de grupos acetilo o glicerilo en su estructura), gelana de alto acilogenere geles suaves, elásticos, transparentes y flexibles, mientras que los geles de gelana de bajo acilo resultan duros, no elásticos y quebradizos (Nieto, 2009). La goma gelana puede utilizarse en combinación con otros hidrocoloides como: goma xantana, alginato, goma guar, CMC, gelatina, carrageninas, agar,

pectinas o almidones modificados para generar una gama amplia de propiedades reológicas de sus geles (Osmalek et al., 2014).

2.4.4. Otros componentes

Frecuentemente a las formulaciones de películas y recubrimientos comestibles se adicionan otros componentes con el objetivo de modificar las propiedades mecánicas, ópticas, de barrera y proveerlas de actividad frente al medio ambiente. Estos compuestos pueden ser plastificantes, tensoactivos, antimicrobianos (AM), antioxidantes, pigmentos, vitaminas, etc. Entre los plastificantes más usados están los polioles (glicerol, sorbitol, manitol, propilenglicol y polietilenglicol 200 y 400) y azúcares (monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos). Los plastificantes se incorporan a las películas y recubrimientos comestibles con el objetivo de mejorar las propiedades mecánicas: incrementar la flexibilidad de la cubierta, lograr una película menos frágil y disminuir la formación de escamas y grietas. Sin embargo, pueden disminuir la capacidad de las películas y recubrimientos para actuar como barreras frente a la humedad, oxígeno y aromas, esto a causa de que el plastificante conlleva a disminuir las fuerzas intermoleculares a lo largo de las cadenas poliméricas, facilitando la movilidad molecular (Krochta, 2002).

Existe una hipótesis que supone que los grupos polares a lo largo de las cadenas del plastificante, desarrollan puentes de hidrógeno entre el polímero y el plastificante, remplazando así las interacciones polímero-polímero, lo que se traduce a una menor resistencia en la fuerza a la fractura y un aumento en la deformación (Aguilar-Mendez, 2005). Según Sothornvit y Krochta (2000) para la elección de este tipo de compuestos debe tenerse en cuenta su compatibilidad con el polímero, deben ser permanentes en el sistema y eficientes en conseguir las propiedades deseables de la película, como la protección contra la humedad (PVA), pues su naturaleza influye drásticamente en las propiedades de transferencia de masa, por ejemplo la adición de plastificantes hidrofílicos incrementa la permeabilidad al agua en la película en comparación con la adición

de plastificantes hidrofóbicos (Joshi & Petereit, 2013). El efecto de los plastificantes en las propiedades mecánicas y de barrera de películas a base de biopolímeros es ampliamente reportada en la literatura. Por ejemplo, Ziani et al., (2008) evaluaron el efecto de glicerol y de Tween® en las propiedades químicas y físicas de películas a base de quitosano con diferentes grados de deacetilación. Los autores encontraron que la presencia del plastificante disminuye la resistencia mecánica, proporciona elasticidad y vuelve más permeable a la película, estos resultados concuerdan con lo encontrado por Arrieta et al., (2013), quienes reportaron que la adición de diferentes concentraciones de glicerol en la película genera una disminución en sus módulos de Young y en los esfuerzos máximos a la tensión, pero incrementa el porcentaje de elongación de las películas. Por otra parte, en películas a base de quitosano, glicerol y ácido oleico se determinó que el incremento de la proporción glicerol/quitosano en las películas incrementa la permeabilidad al vapor de agua, indistintamente de la presencia o no de ácido (Aguirre-Loredo et al., 2014).

2.4.5. Mezclas

Con la intención de contrarrestar las deficiencias propias de cada componente y mejorar las propiedades mecánicas de películas a base de biopolímeros, se utilizan frecuentemente mezclas de éstos. Estas películas o recubrimientos compuestos usan dos o más materiales, mezclados en la formulación o en forma de laminados, lo cual permite mejorar las propiedades de intercambio gaseoso, adherencia y permeabilidad al vapor de agua (Campos et al., 2010).

En la literatura se reportan numerosas investigaciones de películas a base de mezclas. En algunas de estas mezclas se logran efectos sinérgicos en las propiedades mecánicas (Lee et al., 2004). De forma general, los principales retos en el desarrollo de películas biopoliméricas biodegradables incluyen:

- El desarrollo de formulaciones *ad hoc* para cada tipo de alimento
- Mejorar la estabilidad bioquímica, fisicoquímica, antimicrobiana de los alimentos empacados con este tipo de películas, sin efecto adverso en la calidad sensorial del alimento. Esto contribuirá a eliminar o disminuir el uso de conservadores químicos en alimentos.
- Películas inocuas para el consumo humano
- Películas con resistencia mecánica suficiente y costos competitivos para sustituir a los materiales sintéticos actuales.

Estas son las razones primordiales por las que se le ha llamado “La Tecnología de los Envases del Futuro” (Debeaufort et al., 1998).

2.5. Métodos de elaboración de películas y recubrimientos comestibles

Las películas comestibles multicomponentes se han ido perfeccionando para obtener las máximas ventajas de los componentes involucrados en su formulación, durante su elaboración se busca establecer la mejor interacción entre las macromoléculas que las componen, esto puede lograrse bajo la acción de tratamientos químicos o físicos. Algunos de los procesos de elaboración de películas biopoliméricas se reportan en numerosas publicaciones (Aguirre-Loredo et al., 2014; Dangaran et al., 2009; Gennadios, 2002; Greener & Fennema, 1994; Khwaldia et al., 2004; Nieto, 2009; Pérez-Espitia et al., 2014) y de forma general son:

- a. Técnica de vaciado;** en la cual el material (biopolímero) se disuelve en agua, alcohol, soluciones diluidas de ácidos o mezclas de solventes, en muchos de los casos es necesario someter la solución a un calentamiento, ajustar el pH, y posteriormente vaciar a un molde y evaporar el solvente.
- b. Coacervación simple;** en la que se consigue la formación de la película a partir del cambio de fase o precipitación de un hidrocoloide en disolución acuosa mediante modificación de alguna propiedad del disolvente (pH, carga

eléctrica, etc.) o por adición de otro disolvente en el cual el polímero es insoluble.

- c. **Coacervación compleja;** en la que dos soluciones de hidrocoloides con cargas opuestas se combinan, provocando la interacción y la precipitación de la mezcla de polímeros.
- d. **La eliminación del disolvente;** en el que la formación de una película sólida se lleva a cabo por la evaporación del disolvente en el que se encuentra. Para obtener una película con propiedades mecánicas adecuadas es necesario ajustar correctamente la temperatura y velocidad de secado.
- e. **La fusión y solidificación;** empleada en películas de naturaleza lipídica. Consiste en el calentamiento de la sustancia empleada por encima de su punto de fusión y su posterior enfriamiento.

En cada método pueden desarrollarse una serie de interacciones dependiendo del tipo de componentes utilizados para la formación de la película, algunas de ellas pueden ser:

- Reacción química (desnaturalización de proteínas por ácidos grasos).
- Dispersión de sustancias hidrofóbicas en la técnica de emulsificación.
- Recubrimiento sobre un soporte emulsificado.
- Adsorción sobre un soporte más o menos poroso.

Las diferencias en los métodos de elaboración de películas tendrán efecto en las propiedades de las mismas.

2.6. Empaques para alimentos

Los empaques para alimentos están diseñados para conseguir la conservación y entrega segura de productos alimenticios hasta su consumo, protegiendo a los alimentos contra el oxígeno, vapor de agua, luz, así como de la contaminación química y física. Actualmente se distinguen 2 grupos de empaques: (1) empaques inteligentes y (2) empaques activos.

2.6.1. Empaques inteligentes

Los empaques inteligentes son aquellos que poseen la habilidad para el monitoreo de las condiciones del alimento empacado, es decir proveen de información acerca de los diferentes factores que pudiesen dañar al alimento durante su transporte y almacenamiento. Para tal fin utilizan sensores o indicadores los cuales son colocados dentro o fuera del empaque. Algunos ejemplos de dichos sensores son sensores de tiempo, de temperatura, de niveles de oxígeno, de dióxido de carbono y de crecimiento microbiano (Drago et al., 2010).

2.6.2. Empaques activos

Son sistemas que están directamente relacionados con el proceso de conservación del producto, para ello existen diferentes compuestos activos que se adicionan al empaque, frecuentemente películas, lo cual depende del atributo de calidad que se desea mantener en el alimento, por ejemplo existen películas que modifican los procesos fisiológicos como la respiración en frutas y vegetales, proceso químicos como la oxidación de lípidos, físicos como la deshidratación; para tales efectos se adicionan al empaque alimentario compuestos removedores de humedad, removedores de oxígeno, de dióxido de carbono, etc. Dentro de los empaques activos se encuentran también aquellos a los cuales se les adicionan sustancias con actividad antimicrobiana, los cuales pueden funcionar como barrera al crecimiento de microorganismos patógenos o deterioradores (Pavlath-Orts, 2009).

2.6.2.1. Películas poliméricas con actividad antimicrobiana

Aunque la incorporación de compuestos antimicrobianos puede realizarse tanto en materiales sintéticos como naturales, la atención se ha enfocado hacia la incorporación de los mismos en empaques a base de biopolímeros, debido a que además de funcionar como barreras selectivas contra la transmisión de gases, vapores y solutos, son biodegradables (Ibarguren et al., 2010). Dentro de la clasificación de empaques activos, los empaques con actividad antimicrobiana son

los más prometedores. Estos empaques se han definido como “Materiales que extienden la fase lag y reducen la velocidad de crecimiento de microorganismos para prolongar la vida útil y mantener la calidad y seguridad de los alimentos” (Mauriello, 2008; Quintavalla & Loredana, 2002; Sanchez et al., 2010). Diversos autores (Appendini & Hotchkiss, 2002; Cooksey, 2001; Mangalassary, 2012) han usado distintas clasificaciones para describir los tipos de empaques con sustancias antimicrobianas. A continuación se mencionan tres categorías:

- (I) Los que contienen un agente antimicrobiano encapsulado que migra hacia la superficie del alimento durante el almacenamiento.
- (II) Los que actúan sobre los microorganismos presentes en la superficie del alimento sin que el agente antimicrobiano migre (empaques a los que la adición del agente antimicrobiano se realizó de manera directa).
- (III) Empaques con una matriz que actúa como vehículo para el agente antimicrobiano. Los agentes con actividad antimicrobiana de mayor uso son clasificados en 2 categorías; los sintetizados químicamente y los naturales (Cuadro 2), entre algunos de estos están: aceites esenciales y extractos de plantas, ácidos orgánicos, sistema lactoperoxidasa, polisacáridos como el quitosano, nitritos, sulfitos, enzimas y el uso de bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de productos como: productos lácteos, productos fermentados cárnicos, pescados y vegetales, utilizando las propiedades antibacterianas atribuidas a los productos finales de su metabolismo (peróxido de hidrógeno, ácido láctico, acético, reuterina y bacteriocinas, entre otros).

Cuadro 2. Compuestos antimicrobianos de importancia en la industria de los alimentos.

Antimicrobianos sintetizados químicamente	Antimicrobianos naturales
Ácidos orgánicos e inorgánicos	Lactoferrina
Tiosulfatos	Enzimas
Antibióticos	Bacteriocinas
Fungicidas	Aceites esenciales de plantas y especias
Nitritos	Quitosano
Isotiocianatos	Porfirinas
Agentes quelantes	Metales

Fuente: Lagarón et al., 2012.

La eficacia de estos compuestos con actividad antimicrobiana se ha demostrado en diversos trabajos.

2.6.2.2. Aceites esenciales

En el desarrollo de películas comestibles activas, los aceites esenciales (AE) de hierbas y especias han sido ampliamente utilizados. Son definidos como “líquidos aceitosos aromáticos obtenidos de la planta individual o de sus componentes que la integran: flores, brotes, semillas, hojas, ramas, cortezas, hierbas, madera, frutos y raíces”. Su composición química depende fuertemente de la parte de la planta, el momento de la cosecha (antes, durante o después de la floración), la temporada de cosecha y las fuentes geográficas (Campos et al., 2010). Los componentes principales de los AE son sustancias fenólicas (monoterpenos), las cuales se cree son responsables de las propiedades antimicrobianas, sin embargo, se ha reportado en algunos trabajos (Arrieta et al., 2013; Rocha et al., 2014; Zahedi et al., 2010) que algunos de los componentes menores actúan sinérgicamente con otros componentes de la matriz del alimento, como las proteínas y grasas, lo que repercute en la actividad antimicrobiana y antioxidante de los AE.

Algunos de los aceites esenciales utilizados en la fabricación de películas comestibles antimicrobianas son extraídos de plantas y especias, ejemplo; canela, pimienta, clavo de olor, cassia, ajo, salvia, orégano, pimienta, tomillo, romero, hierba de limón y scutellaria (Du et al., 2009). El modo de acción de estos compuestos se atribuye a su contenido en monoterpenos, los cuales debido a su carácter lipófilo y su coeficiente de partición específica se acumulan en la bicapa lipídica de la membrana citoplasmática de las células bacterianas, provocando la interrupción de la estructura de la misma, es decir logran que pierda su permeabilidad para los protones y los iones más grandes. Algunas desventajas del empleo de AE en la elaboración de películas comestibles son: su procedencia (plantas desconocidas y no comestibles), baja solubilidad en agua y una mala distribución en la solución filmogénica (Campos et al., 2010). No obstante, se ha mostrado que la acción antimicrobiana de este tipo de compuestos puede ser eficiente para la eliminación o reducción de microorganismos patógenos en alimentos.

2.6.2.3. Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos tales como ácido láctico, málico y cítrico, son comúnmente incorporados en las soluciones formadoras de películas y recubrimientos comestibles. Su actividad antimicrobiana contra las principales bacterias patógenas de los alimentos se basa en la reducción del pH y la fuerza motriz de protones, alterando así el transporte de nutrientes, lo que se traduce en la muerte de la bacteria (Campos et al., 2010). La incorporación de estos compuestos puede producir cambios en las características y propiedades físicas de la película, tales como espesor y permeabilidad al vapor de agua. Esta tendencia puede ser relacionada en parte a que los ácidos pueden ejercer un efecto plastificante por contener grupos hidroxilo, los cuales pueden tomar parte en las interacciones polímero-polímero, mediante el desarrollo de puentes de hidrógeno (Cagri et al., 2001).

2.6.2.4. Bacteriocinas

Son sustancias de origen proteico con actividad antimicrobiana, producidas por bacterias lácticas. Los géneros reportados como productores de este tipo de péptidos incluyen; *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, y *Bifidobacterium* (Ghanbari & Jami, 2013). Las bacteriocinas se clasifican en 4 clases (Papagianni, 2003), (Cuadro 3): Clase I constituida por péptidos pequeños generalmente menores a 5 kDa, termoestables, caracterizados por la presencia de aminoácidos no esenciales (lantionina, dehidroalanina, dehidrobutirina, β -metil-lantionina). La clase II son bacteriocinas no modificadas o no lantibióticos, la representante de esta clase es la pediocina, dentro de la clase III encontramos un grupo de bacteriocinas producidas por *Lactobacillus helveticus* y *Enterococcus faecium*, las cuales se caracterizan por ser termolábiles y por poseer un peso generalmente mayor a 30 kDa y la clase IV bacteriocinas complejas que llevan restos lipídicos e hidratos de carbono.

Las bacteriocinas se caracterizan por presentar un efecto antagónico contra especies de microorganismos taxonómicamente relacionados, ya sean patógenos o causantes de deterioro, contienen entre 20 y 60 aminoácidos (ver Cuadro 4), son moléculas catiónicas, hidrofóbicas o anfifílicas, presentan estructuras hélices α o bien hoja plegada β , pueden ser ricas en tirosina o histidina, además de presentar puentes disulfuro, tioéter o grupos tiol libres, presentan puntos isoeléctricos en un intervalo de pH 8.6 a 10.4, su actividad antibacteriana no se destruye por tratamientos con ácidos orgánicos, se favorece a pH ácidos, son destruidas con pH por arriba de 10, se inactivan por proteasas incluyendo aquellas de origen pancreático tales como la tripsina y α quimotripsina (Papagianni, 2003).

Cuadro 3. Clasificación de las bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas (BAL).

Categoría	Características y subclases
Clase I. Lantibióticos	Incluyen uno o dos péptidos lantibióticos. Su peso molecular es aproximadamente de 2 a 5 kDa. Tipo A: Moléculas grandes y flexibles. Tipo B: Moléculas globulares sin carga o carga neta negativa.
Clase II. No lantibióticos	Péptidos estables al calor, con peso molecular aproximadamente <10kDa.
Clase III. No lantibióticos	Proteínas termolábiles, de peso molecular arriba de 30 kDa.
Clase IV	Bacteriocinas complejas, las cuales contienen restos de lípidos o carbohidratos.

Fuente: Papagianni, 2003.

Cuadro 4. Características de algunas bacteriocinas producidas por bacterias lácticas.

Bacteriocina	Número de aminoácidos	Peso molecular (kDa)	PI	Cargas positivas a pH.			
				4	5	6	7
Nisina A	34	3.5	10.1	5	5	3	3
Lacticina 481	27	3.8	NA	3	2	0	0
Lactocina S	37	3.9	NA	3	2	0	0
Pediciona Achf	44	4.6	9.6	6	6	3	3
Enterocina A	47	4.8	8.9	5	5	4	4
Divercina V41	43	4.5	8.6	3	3	3	3
Leucocina A	37	3.9	9.5	5	4	2	2
Sakacina A	41	4.3	10.0	4	3	3	3
Carnobacteriocina B2	48	5.0	10.4	5	4	4	4
Lactococina B	47	5.3	9.1	4	3	2	2
Carnobacteriocina A	53	5.1	9.3	1	1	1	1
Lactococina	55	5.8	8.6	4	4	1	1

Fuente: Ray et. al., 2001 citado en Quintero, 2006, Nota: PI: punto isoeléctrico, NA = no aplica.

Las bacteriocinas han tenido un papel importante en la industria de los alimentos porque intervienen en la preservación y mejora de la calidad higiénica de los mismos, inhibiendo la flora competitiva, la cual incluye microorganismos patógenos. Además, su incorporación en productos alimentarios coadyuva en la reducción de conservadores químicos así como en la utilización de tratamientos

térmicos menos severos. Para ello, estos compuestos deben cumplir con lo siguiente (Ruiz et al., 2006):

- Ser producidas por bacterias de grado alimentario (con estatus GRAS), es decir no deben llevar asociado ningún riesgo para la salud humana.
- Ser termorresistentes.
- Tener actividad bactericida contra bacterias patógenas o alterantes del alimento.
- Su adición debe conllevar un efecto beneficioso, como puede ser un aumento de la seguridad, la calidad o la conservación del aroma y propiedades organolépticas del alimento, y nunca se han de adicionar en concentraciones superiores a las encontradas en sus fuentes naturales.
- Poseer una actividad altamente específica.

Existen numerosos tipos de bacteriocinas (Cuadro 4), las más importantes son; nisina y pediocina. La primera es un miembro de la familia de los lantibióticos (clase I, por poseer el aminoácido lantionina), es definida como un péptido pequeño de 34 aminoácidos, termorresistente, catiónico, producido por *Lactococcus lactis*; su uso está permitido en más de 50 países y su aplicación en sistemas alimentarios ha sido ampliamente estudiada (Cuadro 5), se ha probado en productos cárnicos, lácteos y vegetales, se ha utilizado en películas fabricadas a base de almidón de tapioca (Sanjurjo et al., 2006), proteína de suero (Pintado et al., 2009), caseinato de sodio (Kristo et al., 2008), derivados de celulosa (Cha et al., 2003), glucomananos (Xu et al., 2007), quitosano (Cé et al., 2012), entre otras. Por ser péptido catiónico el modo de acción de esta bacteriocina es básicamente desestabilizar y permeabilizar la membrana citoplasmática de bacterias gram positivas, por medio de la formación de poros transitorios o canales iónicos que causan la disipación o reducción de la fuerza motriz de la célula debido a la interacción con polímeros aniónicos que constituyen la pared celular, por lo general fosfolípidos (Figura 6). Como anteriormente se había mencionado, la actividad antimicrobiana de la nisina y de algunos otros compuestos con actividad

antimicrobiana en películas y recubrimientos depende de la composición del sistema, de las condiciones de su uso y del método empleado para su elaboración. En estudios realizados por Herman & Garro (2006) se evaluó el efecto de tratamientos térmicos en la concentración mínima inhibitoria (CIM) de nisina. En este trabajo se reportó que la nisina tratada térmicamente muestra una CIM de 65 ppm, mientras que la no tratada térmicamente, su CIM fue igual a 4 ppm. Estudios menos recientes (Richard, 1993, citado en Suárez, (1997) se reportaron posibles cambios en la estructura de la nisina, mismos que ocurren durante el proceso de esterilización por el método de HTST (*High Temperature Short Time*), los cuales posiblemente reducen la actividad listericida de nisina.

En cuanto a efectos del pH en la actividad de la nisina, se ha reportado que a valores de pH 5.5, presenta poca solubilidad, estabilidad y su actividad antimicrobiana disminuye, por ser una molécula catiónica. Esto lo han verificado otros estudios, Sanjurjo et al, (2006) evaluaron la bioactividad de películas de almidón incorporadas con 1322 UI/cm² de nisina, las cuales se sumergieron en soluciones con diferentes valores de pH, observándose una reducción en la liberación de la nisina en las películas que se sumergieron en soluciones de pH 6.5 – 7.2. La liberación de nisina se favoreció cuando las películas se sumergieron en soluciones con pH de 5.5. En soluciones de pH alcalino (>7) los grupos hidroxilo son capaces de provocar ataques nucleofílicos a los aminoácidos lantibióticos (deshidroalanina y deshidrobutirina) lo que explica la inestabilidad y descenso de la solubilidad de la nisina (Lagarón et al., 2012).

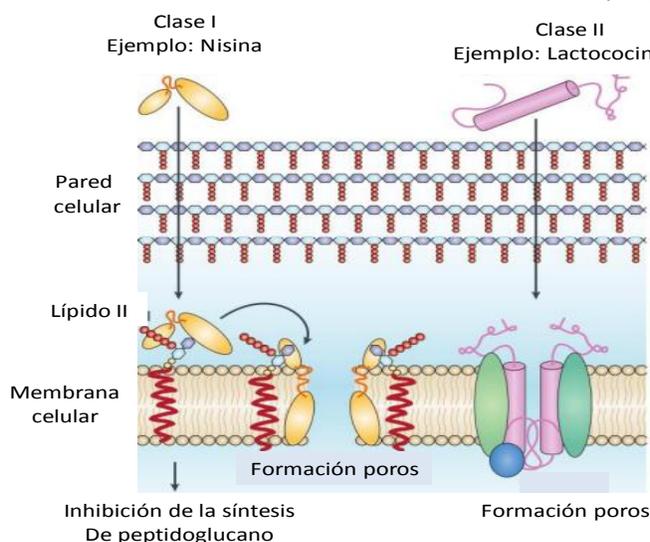


Figura 6.- Esquematización del modo de acción de las bacteriocinas. A) Modo de acción de la clase I cuyo representante es la nisina; muestra el ataque al lípido II en la pared celular, inhibición de la síntesis de peptidoglicano y formación de poros en la membrana celular. B) Modo de acción de la clase II como ejemplo se muestra la Lactococina A. Fuente: Cotter et al., 2012.

Cuadro 5. Aplicación de bacteriocinas a diferentes películas biopoliméricas para reducir el desarrollo de microorganismos patógenos en alimentos

Biopolímero	Bacteriocina, antimicrobiano	Carga de antimicrobiano en la película	Microorganismo o indicador	Observaciones	Referencias
Ácido poliláctico (PLA) partículas aserrín (PA)	Pediocina PA-1/Ach (P)	No indica la cantidad final del péptido en la película, sólo indica la solución madre preparada inicialmente 0.2% p/v de Pediocina.	<i>Listeria monocytogenes</i> (ATT19115)	La incorporación de pediocina a las películas elaboradas a base de PLA+PA mostró tener una alta actividad anti-listeria, aproximadamente del 99%. La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó a 37 °C por 24 h.	Woraprayote et al., 2013
Aislado de proteína de suero	Nisina	6-18 ×10 ³ UI/g	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Escherichia coli</i> O157:H7 y <i>Salmonella typhimurium</i>	Fue inefectivo contra <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> O157:H7. Inhibió el crecimiento de <i>Salmonella typhimurium</i> . Los tratamientos se evaluaron por 28 días a 4°C.	Gadang et al., 2008
Aislado de proteína de soya	Extracto de semilla de uva (ESU), nisina EDTA	ESU= 1% p/p Nisina = 1×10 ³ UI/g EDTA= 0.16% p/p	<i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella typhimurium</i> y <i>Listeria monocytogenes</i>	Los resultados muestran una reducción contra <i>Escherichia coli</i> O157:H7 y <i>Salmonella typhimurium</i> igual a 1.8 y 0.6 log UFC/mL, respectivamente; mientras que para <i>Listeria monocytogenes</i> la reducción fue mayor (2.9 log UFC/mL). Los tratamientos se evaluaron a 37 °C por 48 h.	Sivarooban et al., 2008
Alginato	Nisina	0, 500-1000 UI/mL _{SF}	<i>Staphylococcus aureus</i> .	Los resultados demuestran que después de 7 días de almacenamiento a 4 °C, se observó una reducción de 0.91 y 1.86 log CFU/cm ² , utilizando películas con una concentración de 500-1000 IU/mL _{SF} .	Millette et al., 2007
Almidón de tapioca	Nisina	2000, 3000 y 5000 UI/mL _{SF} (881, 1322, 2204 UI/cm ²).	<i>Listeria innocua</i> (CIP 8011, CCMA 29)	La bacteriocina inhibió el crecimiento de <i>L. innocua</i> , mostrando un efecto mayor al aumentar la concentración de nisina. La película con 2,204 IU/cm ² , pH: 5.5 redujo 4 ciclos log la cuenta viable de <i>Listeria innocua</i> durante 240 min a 28 °C.	Sanjurjo et al., 2006

Biopolímero	Bacteriocina, antimicrobiano	Carga de antimicrobiano en la película	Microorganismo o indicador	Observaciones	Referencias
Caseinato de sodio	Nisina	0.05 a 0.5 mg/película	<i>Listeria monocytogenes</i>	Nisina mostró mayor efectividad que lactato de sodio y sorbato de potasio para reducir el crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> durante 10 días a 10 °C. Sin embargo la inclusión de antimicrobianos modificó negativamente las propiedades mecánicas de las películas.	Kristo et al., 2008
Caseinato de sodio	Nisina	6.25 mg/g (1000 UI/cm ²)	<i>Listeria innocua</i>	Nisina redujo 1.1 log UFC/g de <i>L. innocua</i> en queso fresco inoculado en la superficie y almacenado por 7 días a 4 °C. Nisina mostró mayor actividad antilisterial en la superficie del queso que hacia el interior de éste.	Cao-Hoang et al., 2010
Caseinato de sodio y metilcelulosa	Cepas: <i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Lactobacillus reuteri</i>	Bacteriocinas producidas por las cepas al inicio del experimento: 238 a 272 mg/mL _{SF} en películas de caseinato 294 a 301 mg/mL _{SF} en películas de metilcelulosa	<i>Listeria innocua</i>	La presencia de cepas productoras de bacteriocinas en películas de caseinato y metilcelulosa generó actividad antilisterial, ya que al final de la prueba (12 días de almacenamiento a 5 °C) lograron una reducción de aproximadamente 1.5 ciclos Log con respecto al control. Cabe mencionar que el crecimiento de <i>L. innocua</i> se favoreció en películas de caseinato logrando alcanzar una población de 10 ⁷ UFC/cm ² .	Sánchez et al., 2014
Hidroxipropil-metilcelulosa	Nisaplin (nisina)	166.7 µg mL ⁻¹	<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341 (<i>Micrococcus luteus</i>).	Se realizó el modelado de la desorción de nisina de las películas. El pH no mostró efecto en la cinética de desorción, el incremento en la concentración de NaCl de 0.8 a 3.2% disminuyó el coeficiente de desorción y el incremento en la temperatura (10 °C a 28 °C) lo aumentó.	Guiga et al., 2009
Konjac glucomanano (KG)	Nisina (Nis) y quitosano (Q)	Q-KG: 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9 p/p, Nis=1050 UI/mg	<i>Streptococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Bacillus cereus</i> y <i>Escherichia coli</i> .	La película control de KG no mostró tener inhibición hacia ningún patógeno, la mezcla KG, Nis y Q no mostró efecto contra <i>Escherichia coli</i> , sin embargo la incorporación de nisina (42000 IU/g película) en la película KG-Q generó actividad antimicrobiana contra <i>Streptococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Bacillus cereus</i> . Se presentó una sinergia entre quitosano y nisina. Las películas Q-nisina y KG-nisina mostraron menor actividad antimicrobiana que KG-Q-nisina.	Li et al., 2006

Biopolímero	Bacteriocina, antimicrobiano	Carga de antimicrobiano en la película	Microorganismo o indicador	Observaciones	Referencias
KG y goma gelana	Nisina	No se especifica, se usó nisina con actividad de 1050 UI/mg	<i>Staphylococcus aureus</i>	La incorporación de nisina en las películas, mostró tener efecto antimicrobiano contra <i>Staphylococcus aureus</i> , así mismo se observó que conforme aumentó la concentración de gelana en la película, los halos de inhibición se incrementaron.	Xu et al., 2007
Pectina y ácido poliláctico (PLA)	Nisina	500 UI/mg película	<i>Listeria monocytogenes</i>	Se obtuvo una reducción significativa de <i>L. monocytogenes</i> en las primeras 4 h de incubación a 24 °C en los tratamientos con películas PLA/pectina/nisina, comparados con el control. Las películas PLA/nisina y PLA/pectina sin nisina no mostraron efecto en la reducción del microorganismo indicador. En todos los tratamientos, <i>L. monocytogenes</i> se recupera a partir de t=8h.	Jin et al., 2009
Proteína de suero	Nisina, ácido málico (AM), láctico (AL) y cítrico (AC)	50 UI/mL _{SF} nisina 1.5-3% de cada uno de los ácidos	<i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Listeria innocua</i>	Resultados indican que después de 24 h de incubación a 37 °C la incorporación de nisina (50 UI/mL) AM, AL y AC en películas mostró actividad contra los microorganismos indicadores utilizados. Dicho efecto podría atribuirse a los valores de pH resultantes en las películas después de la adición de los ácidos.	Pintado et al., 2009
Metilcelulosa y nanopartículas de óxido de zinc (ZnO)	Pediocina	15%, 20%, 33%, 45%, 50% p/p	<i>Streptococcus aureus</i> (ATCC 6538) y <i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 15313)	Los tratamientos fueron incubados por 24 h a 35 °C, mostraron tener actividad contra los microorganismos indicadores utilizados. Se observó una alta actividad por parte de la pediocina contra las bacterias gram positivas utilizadas en el estudio.	Pérez-Espitia et al., 2013

Nota: SF= Solución filmogénica



Ángel Gpe. Calderón Aguirre

CABA

3. *J*USTIFICACIÓN

Debido a la creciente demanda de los consumidores por productos libres de conservadores químicos, pero a la vez con altas expectativas en cuanto a su conservación, calidad e inocuidad, la industria continúa la búsqueda de agentes antimicrobianos naturales, entre los que destacan: aceites esenciales (mentol, eugenol, fenoles, mentona, borneol, tirpineno, pineno, etc.) (Holley & Dhaval, 2005), enzimas (peroxidasa y lisozima) (Cissé et al., 2013; Lee & Sea., 2014; Lee & Min., 2013) y bacteriocinas (nisina, pediocina, enterocina, latococina, etc.) (Cissé et al., 2013; Iseppi et al., 2008; Jin et al., 2009; Quintero, 2006; Teixeira-Barbosa., 2013; Woraprayote et al., 2013).

Las bacteriocinas son sustancias sintetizadas a nivel ribosomal por bacterias ácido lácticas, las cuales poseen la capacidad de actuar selectivamente contra el crecimiento de microorganismo patógenos relacionados o no con el deterioro de alimentos, tales como *Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus* y *Bacillus spp.* (Appendini & Hotchkiss, 2002; Millette et al., 2007; Sanjurjo et al., 2006). Estos parámetros determinan la solubilidad, bioactividad, estabilidad y difusividad en matrices alimentarias (Guiga et al., 2009; Guiga et al., 2010).

En la última década se han desarrollado películas activas antimicrobianas a base de bacteriocinas (Begonya et al., 2007; Bonilla et al., 2014; Cao-Hoang et al., 2010; Espinel et al., 2014; Gadang et al., 2008; Gandhi & Chikindas, 2007; Gniewosz et al., 2014; Guo et al., 2014; Lee & Sea., 2014; Lee & Min., 2013; Pérez-Espitia et al., 2014; Sánchez et al., 2014; Yen et al., 2014). La efectividad de estos compuestos antimicrobianos en películas biopoliméricas se ha evaluado y en muchos casos ésta depende de la matriz polimérica, la cual tiene un papel fundamental en la difusión del compuesto activo a través de la película y en la desorción de éste hacia el alimento (Guiga et al., 2009). Una liberación rápida del agente antimicrobiano proveerá de una actividad antimicrobiana efectiva en las primeras horas de elaboración de las películas, disminuyendo ésta paulatinamente, por efecto de dilución, interacción con componentes del alimento o degradación proteolítica, lo cual afecta la vida de anaquel del producto (da Silva Malheiros et al., 2010).

Por lo tanto, son necesarios más estudios para diseñar películas bioactivas contra microorganismos patógenos de interés en alimentos. En dichos estudios se considera importante evaluar la actividad antimicrobiana de las películas, en función del tiempo y de distintas condiciones ambientales. Es fundamental diseñar matrices poliméricas biodegradables (biopoliméricas), que permitan una liberación controlada del agente antimicrobiano sin detrimento de las propiedades mecánicas y de permeabilidad de las películas. Esto permitirá avanzar en el estudio de los bioplásticos activos alimentarios necesarios para el desarrollo sustentable de la industria de los alimentos.



Ángel Gpe. Calderón Aguirre

CABA

4.5 IPÓTESIS

Es posible formular películas biopoliméricas a partir de dos formulaciones: 1) caseinato de sodio y 2) una mezcla a base de pectina-gelana, con actividad antimicrobiana debida a la inclusión de metabolitos de bacterias ácido lácticas. La inclusión de estos compuestos antimicrobianos no afectará significativamente las propiedades de barrera ni las propiedades mecánicas de las películas formuladas, las cuales serán una alternativa para la conservación de alimentos sensibles a *Listeria monocytogenes*.



Ángel Gpe. Calderón Aguirre

CABA

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivos general

Caracterizar películas de caseinato de sodio y pectina-gelana adicionadas con péptidos antimicrobianos producidos por *Streptococcus infantarius*, para contribuir en el desarrollo de empaques alimentarios biodegradables activos contra *Listeria monocytogenes*.

5.2. Objetivos particulares

- Determinar el efecto de la matriz polimérica en la actividad antimicrobiana de la película durante su vida de anaquel, a través de la evaluación de la actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, en función del tiempo y de dos condiciones ambientales.
- Evaluar el efecto del agente antimicrobiano (péptido producido por *Streptococcus infantarius*) en las propiedades de transferencia de masa (vapor de agua y O₂) de las películas bioactivas, a través de pruebas de permeabilidad.
- Evaluar el efecto del agente antimicrobiano en las propiedades mecánicas de las películas bioactivas, a través de pruebas de tensión uniaxial.



Ángel Gpe. Calderón Aguirre

CABA

6. *m*MATERIALES

Y MÉTODOS

En la Figura 7 se muestra el esquema general de la ejecución del proyecto, el cual involucra ensayos preliminares, teniendo en cuenta la normatividad ASTM y protocolos experimentales establecidos en trabajos del grupo de investigación (Aguirre-Loredo, 2011; Aguirre-Loredo et al., 2014; López-Ortega, 2011; Mendoza-Mendoza, 2012; Terrazas-Hernández, 2011).

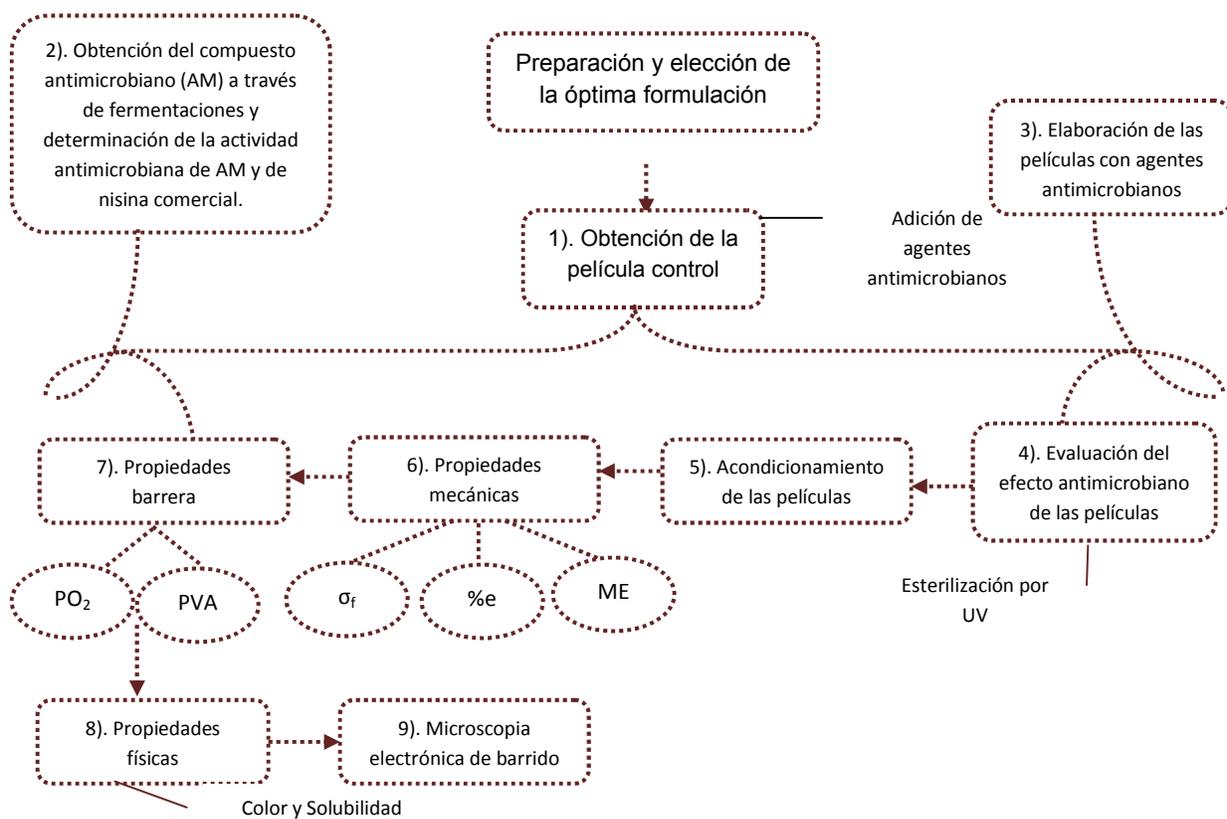


Figura 7.- Esquematación general del proceso de elaboración de películas con sustancias antimicrobianas y pruebas correspondientes para su evaluación como empaques alimentarios. Nota: Permeabilidad al oxígeno (PO_2), Permeabilidad al vapor de agua (PVA), Esfuerzo a la fractura (σ_f), porcentaje de elongación (%e) y Módulo de Young (ME).

6.1. Materiales

6.1.1. Medios de cultivo

Para la preparación de viales de conservación y activación de microorganismos se usó caldo De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (BD Dibico México®) para las bacterias ácido-lácticas, y caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) (Bioxon México®) para *L. monocytogenes*. Para las pruebas de actividad antimicrobiana, “difusión en agar por gota”, se utilizó BHI-agar suave formulado con una mezcla de 1.5% p/v caldo BHI y 0.8% p/v bacto-agar (BD™ DIFCO, Francia). En las pruebas de crecimiento selectivo y diferencial de *L. monocytogenes*, así como en la prueba de actividad antimicrobiana de las películas se utilizó medio Oxford (Dibico, México).

6.1.2. Microorganismos

Bacteria ácido láctica, *Streptococcus infantarius*: Aislada de la bebida fermentada “pozol” del sureste de México. La bacteria fue aislada y donada por el grupo de investigación de la Dra. Carmen Wachter de la Facultad de Química de la UNAM. La bacteria se conservó a -80 °C en viales de 1.5 mL, los cuales contenían 0.3 mL de glicerol y 1.3 mL de la cepa crecida en caldo MRS.

Microorganismo indicador *Listeria monocytogenes* (CFQ-B-104): Donado por la Dra. Gloria Díaz Ruiz del Cerapio FQ de la UNAM. La bacteria se conservó a -80 °C, en viales de 1.5 mL, los cuales contenían 0.3 mL de glicerol y 1.3 mL de la cepa crecida en caldo BHI.

6.1.3. Biopolímeros y agentes antimicrobianos

Pectina cítrica (GENU® Pectin, DE=36%, CP-Kelco, Estados Unidos de América), gelana (Kelcogel, CP-Kelco, Estados Unidos de América), glicerol (Química Meyer, México), CaCl₂ (JT Baker, México), caseinato de sodio (Lactonat EN, LactoProt, Alemania), nisina (NISIN, MP Biomedicals). Los agentes antimicrobianos utilizados en esta investigación fueron dos bacteriocinas: a)

péptidos producidos por la bacteria ácido láctica (BAL) *Streptococcus infantarius*, que en lo sucesivo se le denominará “antimicrobiano de BAL del pozol” (AM) (Sánchez-Reyes, 2014) y b) nisina comercial (2.5% nisina en sólidos de leche, NISIN MP Biomedicals®).

6.2. Métodos

6.2.1. Producción de péptidos antimicrobianos por *Streptococcus infantarius*

Se realizaron fermentaciones a nivel matraz, para ello se activaron en 5 mL de caldo MRS estéril, 50 μ L de un vial de conservación de *S. infantarius*. El cultivo se incubó a 30 °C durante 24 h, posteriormente 250 mL de caldo MRS estéril se inocularon (1% v/v) con el cultivo activado de *S. infantarius*, el cual se incubó a 30 °C, 130 rpm, durante 6 h en una incubadora con agitación orbital (Thermo Scientific, SHKE5000-7). El tiempo de incubación se seleccionó con base a los estudios de producción del compuesto antimicrobiano realizados por (López-Ortega, 2014), en donde se muestra que la máxima actividad antilisterial de los compuestos antimicrobianos producidos se obtiene en fermentaciones con 6 h de edad.

Concluida la fermentación, se separó la biomasa del caldo de cultivo a través de centrifugación (6000 rpm, 30 min a 4 °C). El sobrenadante se recuperó y su pH se ajustó a 6.5 con una solución de NaOH 5 N; en seguida se concentró en un rotavapor con controlador de vacío (BUCHI R-215; 60 °C a 35 rpm; 72 mbar), el factor de concentración fue 2.58, es decir, por cada 80 mL de sobrenadante se eliminaron por evaporación 49 mL de agua. Para inactivar la acción de proteasas, el concentrado se sometió a un tratamiento térmico, 110°C durante 10 min. Una vez frío, el concentrado antimicrobiano (AM) se colocó en tubos Corning® estériles y se almacenó a -80 °C.

6.2.2. Determinación de la actividad antimicrobiana de los péptidos producidos por *S. infantarius* y nisina comercial

La actividad antimicrobiana del extracto concentrado del medio de producción de *S. infantarius* y nisina comercial, se determinó adaptando el método de difusión en agar por gota (Nuñez, et al., 1996), usando como microorganismo indicador *Listeria monocytogenes*. En primera instancia, se realizó la activación de *L. monocytogenes* en caldo BHI. Se preparó BHI-agar suave y se colocaron 10 mL de este agar recién preparado y aún sin gelificar en tubos de cultivo de vidrio, los cuales se esterilizaron (121 °C, 15 min) y se enfriaron. En la campana de flujo laminar, se adicionaron 58 µL del cultivo activo de *L. monocytogenes* a cada tubo, se mezclaron suavemente y el contenido de cada tubo se vertió en una caja de Petri estéril, gelificando bajo la campana de flujo laminar.

El método de “Difusión en agar por gota” consiste en evaluar halos de inhibición del crecimiento de un microorganismo indicador (*L. monocytogenes*, en este trabajo) por efecto del agente antimicrobiano el cual se dosifica en gotas de volumen y concentración conocidos. Este método utiliza diluciones base dos del agente antimicrobiano (Nuñez et al., 1996). Se elaboraron hasta un total de 8 diluciones (2^8). Posteriormente, en sentido contrario a las manecillas del reloj se colocó una gota de 10 µL de cada dilución sobre BHI-agar suave (10 mL), el cual previamente había sido inoculado con 58 µL de cultivo de *L. monocytogenes* (10^9 UFC/Caja). Una gota de AM sin diluir se colocó en el centro de cada caja inoculada con *L. monocytogenes*. Las cajas se incubaron a 35 °C durante 24 h. Al término de la incubación se observaron los halos de inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* presentes en cada dilución. Los halos se midieron con un vernier (Fowler, México) con 0.01 mm de exactitud.

Con la finalidad de avanzar en el proyecto global de investigación, “Diseño y caracterización de películas alimentarias a base de biopolímeros y antimicrobianos naturales”, en el marco del cual se realiza el presente trabajo, se decidió usar en las formulaciones de las películas, la misma cantidad de AM que la usada en el

mejor tratamiento de un trabajo previo (Mendoza-Mendoza, 2012); es decir, 3.84 mL de AM en cada 20 mL de solución filmogénica, lo cual da lugar a una película. Sin embargo, el método que usó Mendoza-Mendoza (2012) para determinar actividad antimicrobiana de AM fue diferente. Por lo tanto se determinó, a partir del método de difusión en agar por gota, el valor de Unidades de Actividad (UA) que corresponden a 3.84 mL de AM. Este valor se usó para determinar la masa de nisina comercial equivalente a ese valor de UA. En este trabajo se consideró que 1 UA es equivalente a 1 mm de diámetro en los halos de inhibición del microorganismo indicador (Suárez-Gea, 1997). Para determinar las UA de los agentes antimicrobianos (AM y nisina) se consideró el recíproco a la máxima dilución a la cual se obtiene una zona clara de inhibición del microorganismo indicador (Nuñez et al., 1996). Para el cálculo de UA/mg de nisina, se determinó la correlación entre la masa de nisina en las distintas diluciones usadas y el diámetro de inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* (Figura 8).

La correlación generada (Ec. 1) se usó para determinar las unidades de actividad (UA) de la nisina comercial usada en este estudio.

$$\ln(D) = 0.1307 (\ln(mn)) + 2.5700 \quad (1)$$

Donde:

D= Diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* (mm)

mn= masa de nisina (mg).

Conocido el valor de UA/mL de AM, se calculó la masa de nisina equivalente en UA's a 3.84 mL de AM (volumen de AM adicionado en 20 mL de solución filmogénica (SF) que da origen a una película). (Nuñez et al., 1996).

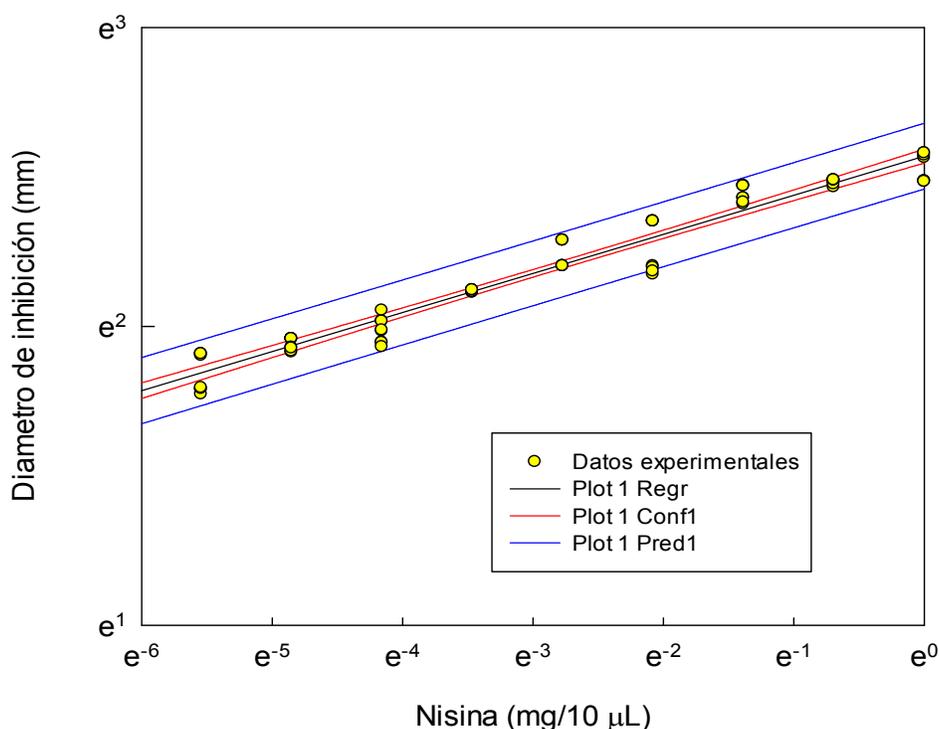


Figura 8.- Relación entre la masa de nisina en solución y los halos de inhibición mostrados contra *L. monocytogenes*. Prueba de “Difusión en agar por gota” para determinar unidades de actividad antimicrobiana.

6.2.3. Elaboración de las películas con agentes antimicrobianos.

Para la elaboración de películas bioactivas se siguió la técnica de vaciado en placa descrita por López-Ortega (2011) y Mendoza-Mendoza (2012). Se elaboraron 2 tipos de películas, las cuales involucraron la utilización de los siguientes polímeros: mezcla de pectina-gelana (PG) y caseinato de sodio (C). Se utilizó agua desionizada como disolvente y como agente plastificante, glicerol. Se evaluó la actividad antilisterial del agente antimicrobiano producido por *Streptococcus infantarius* y de nisina comercial, ambos adicionados a las películas con la misma dosis de unidades de actividad (UA). En el Cuadro 6 se muestran las formulaciones de los distintos tratamientos. Cada tratamiento contó con una película control, formulada con todos los componentes a excepción del péptido antimicrobiano (AM de *S. infantarius* o nisina).

Cuadro 6. Formulaciones de las películas bioactivas

Componentes	Películas			
	Caseinato (C)		Pectina-gelana (PG)	
	1	2	1	2
Polímero	4% p/v	4% p/v	Pectina=1% p/v Gelana=0.2% p/v	Pectina=1% p/v Gelana=0.2% p/v
Glicerol	0.6% p/v	0.6% p/v	0.25% p/v	0.25% p/v
CaCl₂	0	0	5 mM	5 mM
Nisina	0.059 mg/20 mL _{SF}	0	0.059 mg/20 mL _{SF}	0
AM	0	3.84 mL _{AM} /20mL _{SF}	0	3.84 mL _{AM} /20mL _{SF}

Nota: SF: solución filmogénica, p/v: relación peso volumen; AM: concentrado del medio de producción de *S. infantarius* aislado del Pozol.

Los polímeros fueron disueltos en agua desionizada con agitación constante. Las formulaciones de las películas de caseinato (C) se mantuvieron a temperatura ambiente mientras que las formulaciones pectina-gelana (PG) se calentaron hasta 60-65 °C durante 40 minutos. Una vez mezclados los polímeros, se adicionó el agente plastificante. En las películas pectina-gelana se adicionó CaCl₂ en solución y la temperatura de la mezcla se incrementó hasta 75 °C. Las soluciones filmogénicas se mantuvieron en agitación por 30 min, posteriormente se mezclaron a 2500 rpm durante 10 min con un homogenizador de alta cizalla (Polytron-Aggregate Luzarrerstrasse 147 CH-6014 Litta/luzern), se adicionó la cantidad correspondiente de cada compuesto antimicrobiano (AM o nisina) de acuerdo a lo indicado en el Cuadro 6. Una vez preparada la solución filmogénica, ésta fue vertida en cajas Petri desechables estériles de poliestireno cristal (Ø = 9.28 cm), colocando 20 mL_{SF} por caja. Las cajas se secaron en horno de convección a 35°C durante 17 h. Se examinaron 4 tratamientos, cada uno con su respectivo blanco o película control (Cuadro 7).

Cuadro 7. Tratamientos de películas poliméricas con antimicrobianos.

Tratamientos	Blancos
1. Caseinato Antimicrobiano (C-AM)	Caseinato Antimicrobiano (C-AM-blanco)
2. Caseinato Nisina (C-Nis)	Caseinato Nisina (C-Nis-blanco)
3. Pectina-Gelana Antimicrobiano (PG-AM)	Pectina-Gelana Antimicrobiano (PG-AM-blanco)
4. Pectina-Gelana Nisina (PG-Nis)	Pectina-Gelana Nisina (PG-Nis-blanco)

Los blancos, C-AM-blanco y PG-AM-blanco, se elaboraron adicionando 3.84 mL de caldo MRS, por cada 20 mL de solución filmogénica. El caldo MRS utilizado fue sometido a todo el proceso de la fermentación y concentración pero sin inóculo, en otras palabras, presenta los ingredientes del medio de cultivo pero carece del compuesto antimicrobiano producido por la BAL; mientras que los blancos para las películas con nisina (C-Nis-blanco y PG-Nis-blanco), se elaboraron adicionando 59.33 μ L de buffer de acetatos estéril en cada 20 mL de solución filmogénica.

6.2.4. Evaluación del efecto antimicrobiano de las películas bajo dos condiciones ambientales (T= 35 \pm 10 $^{\circ}$ C y 32 \pm 10% HR y T= 4 \pm 2 $^{\circ}$ C y 98 \pm 10% HR)

Para la evaluación de la actividad antilisterial de la películas en primera instancia se activó *Listeria monocytogenes* (ver sección 6.2.2). De un cultivo de *L. monocytogenes* de 24 h de edad se tomaron 50 μ L y se colocaron en 5 mL de caldo BHI, los cuales se incubaron a 35 $^{\circ}$ C por 6 h. De este cultivo se realizaron diluciones decimales y de la dilución adecuada (dilución 10^{-7}) se tomaron 600 μ L, los cuales se sembraron por extensión en superficie en medio Oxford (BD Difco) para obtener 60 UFC/caja. Una vez fraguado el inóculo en el medio Oxford, bajo la campana de flujo laminar y en condiciones asépticas, se colocó una película con el mismo diámetro que la caja a manera de cubrir toda la superficie del medio. Posteriormente las cajas fueron incubadas a:

- 1) T= 35 \pm 10 $^{\circ}$ C y 32 \pm 10% HR
- 2) T=4 \pm 2 $^{\circ}$ C y 98 \pm 10% HR.

Es importante mencionar que, previo a su utilización para esta prueba, las películas fueron sometidas a esterilización por luz UV en una campana de flujo laminar por 24 h. En cada una de las condiciones se inocularon dos cajas por tratamiento, teniendo un total de 36 cajas, mismas que fueron monitoreadas cada día hasta cumplir un total de 8 días para la condición 1 y 61 días para la condición 2.

6.2.5. Acondicionamiento de las películas.

Previo a someter las películas a pruebas mecánicas, de barrera y físicas, éstas recibieron un acondicionamiento, el cual se realizó de acuerdo con el método de la ASTM D882 (ASTM, 2010) y consistió en colocar las películas durante al menos 48 h, en un desecador a temperatura de 23 ± 2 °C, el cual contenía una solución saturada de $Mg(NO_3)_2$ que generó un ambiente de 50-55% HR.

Finalizado el periodo de acondicionamiento, en cinco diferentes puntos de la película (orillas y centro), se midió el grosor, utilizando un micrómetro electrónico digital (TRUPER®). El promedio del grosor de cada película se utilizó en los cálculos de propiedades mecánicas y de barrera.

6.2.6. Propiedades mecánicas de las películas con sustancias antimicrobianas.

La ejecución de estas pruebas se realizó bajo el método estándar ASTM D882 (ASTM, 2010) en una maquina universal (TA plus, Lloyd). Después de 48 h del acondicionamiento de las películas (50-55% HR, 25 °C), éstas fueron cortadas en tiras de 9 cm de largo por 1 cm de ancho, las cuales se sujetaron entre las pinzas de tensión dejando un espacio de 5 cm entre las pinzas. La velocidad de extensión fue de 1.5 mm/s. Se obtuvieron datos de fuerza y distancia, a partir de los cuales se determinó el perfil de esfuerzo verdadero vs. deformación de Hencky (ϵ_H). El análisis de propiedades mecánicas utilizando estos parámetros, elimina diferencias en los resultados de un mismo tratamiento debidas a variaciones en el

área transversal y la longitud inicial de las muestras. Se tensaron 20 tiras de cada tratamiento y se eligieron 7 réplicas para realizar los cálculos, descartando las pruebas en donde las muestras no se fracturaron en el centro.

Para calcular la deformación de Hencky o deformación verdadera se usó la Ecuación 2;

$$\varepsilon_H = \ln \left[\frac{L_t}{L_0} \right] = \ln L_t - \ln L_0 = \ln \frac{L_t}{L_0} \quad (2)$$

Donde:

ε_H : deformación de Hencky (-)

L_0 : altura o longitud inicial (m)

L_t : altura o longitud en cada instante de tiempo t (m)

Para calcular los esfuerzos a los que se somete la muestra en cada instante de tensión, se usó el concepto de esfuerzo verdadero, σ_T (Ecuación 3), que usa el área transversal del espécimen en cada instante de deformación. Por lo tanto, considerado que el volumen del espécimen es constante, se determinó el área transversal en cualquier instante ($A(t)$) a partir de la Ecuación 4.

$$\sigma_T = \frac{F}{A_{(t)}} \quad (3)$$

$$A_0 = (\Delta x) * (\alpha)$$

$$A_{(t)} = \frac{A_0 L_0}{L} \quad (4)$$

Donde;

F= fuerza (N)

Δx =Espesor de la tira de película (m)

α = Ancho de la tira de película (m)

$A_{(t)}$ = Área transversal en cualquier instante (m^2)

A_0 = Área inicial en (m^2)

El porcentaje de elongación (%e) fue calculado de la siguiente manera:

$$\%e = \frac{\Delta L}{L_0} \times 100 \quad (5)$$

Donde:

%e= Porcentaje de elongación

ΔL = Diferencia de longitudes ($L - L_0$, m)

El esfuerzo a la fractura (σ_f), porcentaje de elongación (%e) y Módulo de Young (ME), son las propiedades mecánicas más comúnmente determinadas en películas. El esfuerzo a la fractura es un parámetro importante en el diseño de envases, mide el esfuerzo máximo que un material puede resistir antes de su ruptura, este parámetro se obtiene a través de las curvas esfuerzo-deformación, como el valor del esfuerzo máximo soportado por las películas en el instante previo a su ruptura; mientras que el porcentaje de elongación revela el incremento total de la longitud de la película sometida a tensión, hasta el punto de ruptura.

Finalmente el Módulo de Young representa la rigidez del material cuando se le aplica una fuerza, entre más grande sea la rigidez mayor será la fuerza o esfuerzo necesario para causar una deformación. Este valor se calculó determinando la pendiente de la zona lineal de las curvas esfuerzo-deformación.

6.2.7. Propiedades de barrera

6.2.7.1. Permeabilidad al oxígeno (PO₂) de las películas con sustancias antimicrobianas.

La permeabilidad al oxígeno se determinó en el equipo VAC-V2 Permeability tester (Labthink®, China) que funciona de acuerdo al principio manométrico descrito en los estándares de la ASTM D1434-82 (ASTM, 1998). Se trabajaron 5 réplicas por tratamiento, las películas previamente acondicionadas (50-55% HR, 25 °C), se cortaron en círculos de 9.8 cm de diámetro (previo al análisis se obtuvo un promedio de su espesor, tomando mediciones en 5 puntos aleatoriamente seleccionados). Las películas se colocaron en las cámaras del

equipo VAC-V2. La presión de entrada del gas permeante fue de $1.01 \text{ kg}_f/\text{cm}^2$. La temperatura de las determinaciones se controló a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, a través de un baño de recirculación. Se obtuvieron gráficos de la presión del gas permeante (Pa) en función del tiempo (s). El cálculo de la difusividad y permeabilidad al oxígeno de las películas se muestran en el Anexo 1.

6.2.7.2. Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas con sustancias antimicrobianas.

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas se determinó realizando modificaciones al método gravimétrico ASTM E96-00 (ASTM, 2000), cuyo fundamento se basa en la ganancia de masa de agua de una celda en donde la película actúa como membrana en la interfase de dos ambientes con diferentes humedades relativas. En este trabajo, las películas se colocaron en celdas de aluminio con cierre hermético (Figura 9). En las celdas se colocaron 70 g de sílica gel como agente absorbente, dejando un espacio libre de aproximadamente 0.0168 m (X_1-X_0) desde la sílica hasta la superficie de la película. Previo a la colocación de las películas, las celdas con la sílica gel fueron secadas en una estufa a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ / 24 h y las películas fueron acondicionadas y medidas en su grosor.

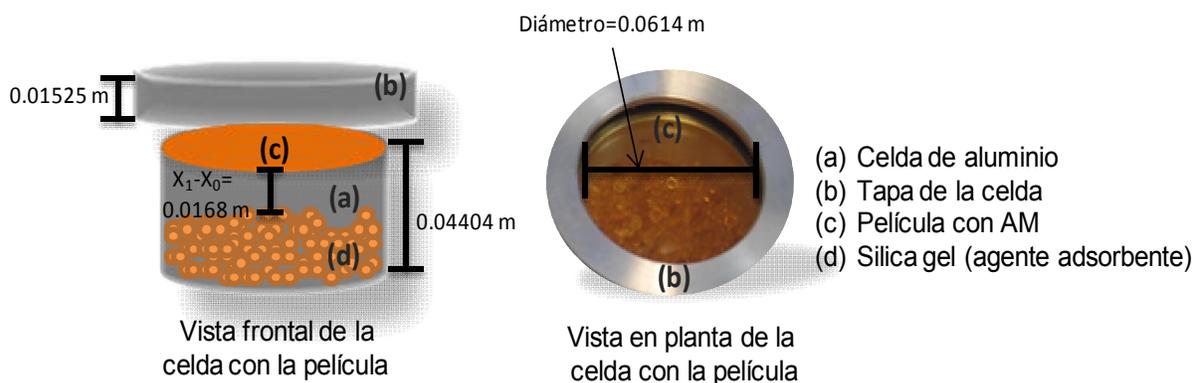


Figura 9.- Vista frontal y superior de la celda de aluminio para determinar PVA. Se muestra una celda con una película, así como las dimensiones importantes para los cálculos de PVA.

La PVA de las películas se determinó usando un gradiente de humedad 65%-0%, para tal motivo, las celdas con las películas se colocaron en un desecador de gabinete el cual tenía una solución saturada de NaCl, para mantener un ambiente de $65\pm 5\%$ HR y una temperatura de 23 ± 2 °C (Figura 10). Las celdas se pesaron en una balanza analítica (aeADAM, sensibilidad 0.0001 g) cada hora durante 8 h, para obtener el flux de masa de agua transferido a través de la película. Con el dato de flux de vapor de agua y las condiciones experimentales de la prueba (HR, temperatura, difusividad del vapor de agua en el aire, etc) se calcularon valores de difusividad y permeabilidad al vapor de agua de las películas con y sin sustancias antimicrobianas, los cálculos se realizaron como se muestra en el Anexo 2. Se trabajaron 3 réplicas por tratamiento.

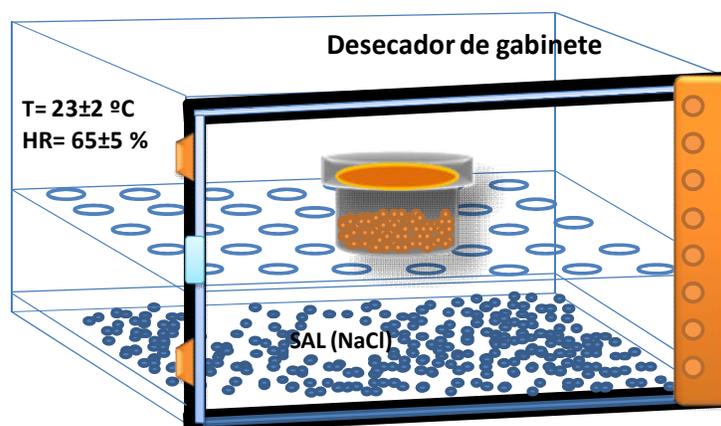


Figura 10.- Equipo (desecador de gabinete) y condiciones utilizados en la PVA.

6.2.8. Propiedades físicas

6.2.8.1. Determinación del color a películas con y sin sustancias antimicrobianas

La determinación de color se realizó con un colorímetro (Konica Minolta CM-512m3). Las películas obtenidas en este trabajo son totalmente traslúcidas, por lo tanto se siguió la siguiente metodología para determinar diferencias en el color de éstas. Las películas, previamente acondicionadas, se colocaron en la superficie de una hoja blanca, posteriormente se colocó el colorímetro sobre la

película para registrar los valores de L^* , a^* , b^* . La diferencia total de color (ΔE) se calculó con la siguiente ecuación.

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \quad (6)$$

Donde $\Delta L=L^*- L_0^*$; $\Delta a=a^*- a_0^*$; y $\Delta b=b^*- b_0^*$; donde L_0^* , a_0^* y b_0^* son los valores correspondientes a la hoja blanca que sirvió de fondo en cada película y L^* , a^* y b^* son los valores registrados para cada película. El parámetro L^* corresponde a la claridad, a^* y b^* a la cromaticidad. Concretamente a^* define el componente rojo-verde; rojo para valores positivos y verde para valores negativos. El parámetro b^* define el componente amarillo-azul, amarillo para valores positivos y azul para valores negativos (Aguilar-Mendez, 2005, Mendoza-Mendoza, 2012).

6.2.8.2. Determinación de la solubilidad en agua de películas de C y PG con y sin sustancias antimicrobianas

La solubilidad en agua de las películas, está definida como el porcentaje de materia seca disuelta después de un tiempo determinado de inmersión en agua. El porcentaje de solubilidad de las películas se determinó bajo la metodología descrita por García et al., (2004) con algunas modificaciones: se cortaron piezas de 2×3 cm de cada tratamiento, mismas que se almacenaron por 7 días en un desecador con pentóxido de difósforo-anhídrido para mantener una humedad relativa cercana a 0%. Después de ese tiempo, las muestras fueron pesadas en una balanza analítica y cada una fue colocada en vasos de precipitados de 100 mL, a los cuales se adicionó 80 mL de agua destilada, se colocó un agitador magnético, posteriormente se colocaron en una parrilla de agitación (CORNING Stirrer Multiple Position 9×250 mL) a temperatura ambiente (≈ 25 °C) durante 1 h. Transcurrido el tiempo de agitación, el contenido total del vaso fue filtrado a través de papel filtro (Whatman No. 1), llevado previamente a peso constante en un horno de convección ($3 \text{ h}/95 \pm 5$ °C). El papel filtro con los restos no disueltos de la película se secó en un horno de convección Shel Lab (modelo 11308FX) a 60

°C durante 2 h, se registró el peso y el porcentaje de materia soluble de la película se calculó por diferencia con la siguiente ecuación.

$$\% \text{Solubilidad} = \left(\frac{\text{PISP} - \text{PFSP}}{\text{PISP}} \right) \times 100 \quad (7)$$

Donde:

PISP= Peso inicial seco de la película (g)

PFSP= Peso final seco de la película (g)

6.2.9. Microscopia electrónica de barrido

Las técnicas de microscopia han sido herramientas útiles para conocer la arquitectura y microestructura de películas comestibles a escalas micro y nanométrica. La microscopia de la superficie y de la sección transversal de los diferentes películas estudiadas en este trabajo fue examinada con un microscopio electrónico (JEOL JSM 6010LA *Analytical Scanning Electron Microscope*, Figura 11), el cual opera en “modo ambiental”, es decir permite examinar especímenes biológicos sin que haya una preparación especial de la muestra. Para este trabajo, las películas fueron congeladas en nitrógeno líquido y fracturadas repentinamente para generar cortes transversales adecuados para su observación al microscopio. Muestras de películas fracturadas de aproximadamente 2 mm² fueron fijadas sobre un porta-muestras de 4 cilindros usando cinta de carbono de doble cara. Las micrografías de las películas tanto de la superficie como de la sección transversal fueron observadas en escala de grises a 2 kV y a diferentes magnificaciones 350×, 650× y 1000×.



Figura 11.- Microscopio JEOL JSM 6010LA *Analytical Scanning Electron Microscope*, se ilustra el porta muestras utilizado en este trabajo.



Ángel Gpe. Calderón Aguirre

CABA

7. RESULTADOS

Y DISCUSIONES

7.1. Determinación de la actividad antimicrobiana de los péptidos producidos por *S. infantarius* y de nisina comercial

La Figura 12 muestra los halos de inhibición de *L. monocytogenes* por la presencia del compuesto antimicrobiano (AM) producido por *Streptococcus infantarius* (Figura 12A) y por nisina (Figura 12B), durante la prueba difusión en agar por gota. Se obtuvieron halos de inhibición claros hasta de 7.29 mm de radio en la dilución 2^6 para el caso de nisina y hasta de 7.58 mm de diámetro en la misma dilución para el caso de AM.

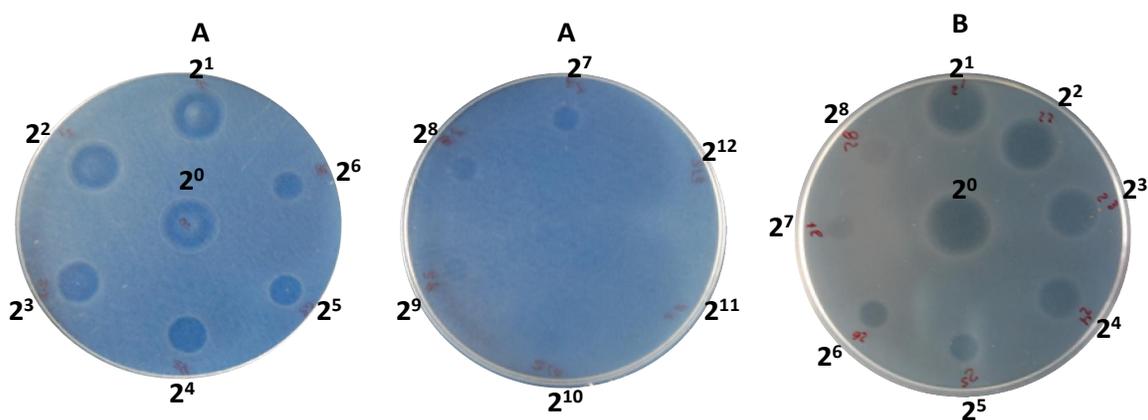


Figura 12.- Halos de inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* en placas de agar suave BHI. **A.** Diluciones base 2 de la solución de nisina comercial y **B.** Diluciones base 2 del concentrado AM.

Los datos obtenidos de la medición de halos de inhibición de ambos compuestos antimicrobianos y la concentración de la máxima dilución en donde se observaron halos definidos fueron usados para determinar las unidades de actividad (UA) de ambos compuestos antimicrobianos, AM y nisina. De esta forma, 3.84 mL de AM presentó 93000 UA. La masa de nisina con unidades de actividad equivalente fue 0.05933 mg. Por lo tanto, cada película, la cual se elabora con 20 mL de solución filmogénica, contendrá 93000 UA de antimicrobiano (AM o nisina).

7.2. Evaluación del efecto antimicrobiano de las películas

Las películas resultantes fueron delgadas, con fácil desmolde, flexibles y transparentes (Figura 13).

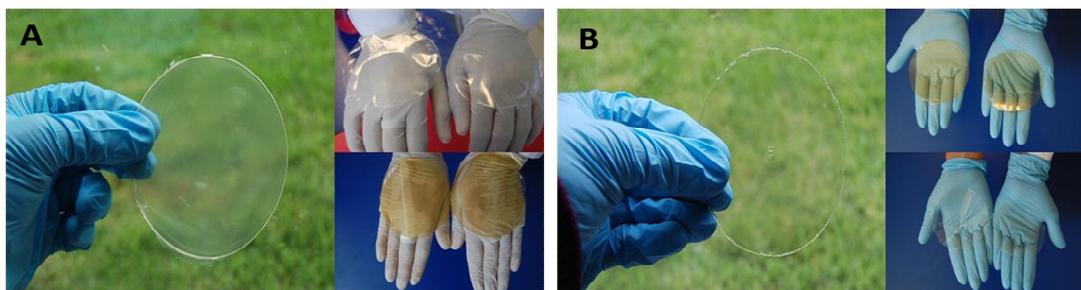


Figura 13.- (A) Aspecto de las películas de caseinato adicionadas con antimicrobiano (AM) de *S. infantarius* (inferior derecha) o nisina (superior derecha). (B) Aspecto de películas de pectina-gelana con AM (superior derecha) y con nisina (inferior derecha).

En la literatura, es común reportar la actividad antimicrobiana de películas mediante la inhibición de un microorganismo indicador, a través del tamaño de los halos de inhibición (Xu et al., 2007) o por la reducción de la unidades formadoras de colonias (UFC) (Lee et al., 2012; Sivarooban et al., 2008). En esta investigación, la actividad antimicrobiana de las películas a dos condiciones ambientales (1) $T=35\pm 10$ °C y $HR=32\pm 10\%$, 2) $T=4\pm 2$ °C y $HR=98\pm 10\%$, se evaluó a través del monitoreo de UFC's de *L. monocytogenes* a lo largo del tiempo.

7.2.1 Actividad antimicrobiana a 35 °C, 32% HR

Las Figuras 14 y 15 muestran el comportamiento de *L. monocytogenes* en presencia de películas con y sin compuestos antimicrobianos. La caja testigo, en la cual no se colocó película alguna, presentó crecimiento evidente de *L. monocytogenes* a partir de las 24 h, hasta alcanzar 53 UFC/caja en 48 h. Esta cuenta permaneció constante hasta el término de las observaciones. Estos resultados son comparables con los obtenidos por Mendoza-Mendoza (2012) quien reportó la aparición de colonias de *L. monocytogenes* en la caja testigo (caja sin película) a las 19 h bajo las mismas condiciones de incubación. El tratamiento C-AM mostró colonias del microorganismo indicador hasta las 48 h de iniciada la

incubación y la cuenta de colonias se mantuvo sin cambio (i.e. 10 UFC/caja) hasta el término del experimento. Comparando este resultado con la caja testigo, fue evidente el efecto antimicrobiano de AM, el cual logró inhibir el 80% del crecimiento de *L. monocytogenes*. La película C-AM-blanco, la cual contenía todos los componentes presentes en C-AM a excepción del antimicrobiano producido por *S. infantarius*, presentó menor actividad antimicrobiana, en ella fue evidente el desarrollo de colonias típicas del microorganismo indicador a las 24 h de incubación con 22-23 UFC/caja, y este crecimiento también se mantuvo invariable hasta concluir el experimento (i.e. 192 h). Fue notorio que aún sin agente antimicrobiano, la película C-AM-blanco, logró disminuir cerca del 60% el crecimiento del microorganismo indicador. Este efecto de inhibición parcial puede ser atribuido a la barrera al oxígeno que presenta la película de caseinato por sí misma. *L. monocytogenes* es una bacteria anaerobia facultativa, con capacidad de crecer en condiciones de baja concentración de oxígeno y con temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C (Gandhi & Chikindas, 2007). Por lo tanto, es posible su crecimiento aun con una barrera al oxígeno; considerando además que los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura óptima para su crecimiento.

Por otra parte, las películas de caseinato con nisina (C-Nis) y su control (C-Nis-blanco) mostraron una evolución similar del crecimiento de *L. monocytogenes*, ambas películas mostraron crecimiento a partir de las 24 h, con cuentas de colonias de *L. monocytogenes* ligeramente superiores (12 a 15 UFC/caja) a C-AM. Aunque ambos antimicrobianos, AM y nisina, generaron un efecto antilisteria, AM incrementó en 24 h la fase lag del crecimiento del microorganismo indicador.

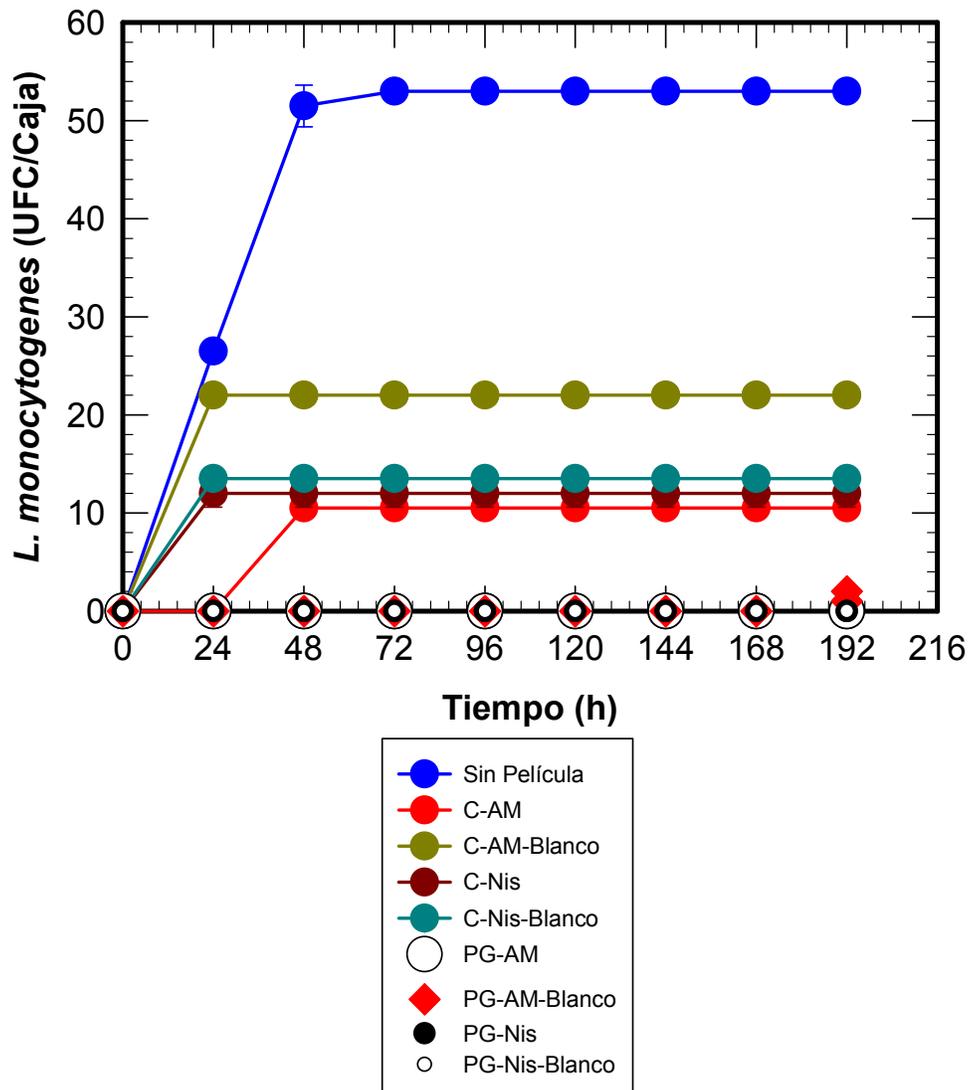


Figura 14.- Efecto de películas con actividad antimicrobiana en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en medio Oxford, en los distintos tratamientos bajo condiciones de incubación a **35°C y 32% HR**. Se muestran los resultados con su réplica.

Las diferencias encontradas en el número de UFC en las películas control, C-AM-blanco y C-Nis-blanco, puede ser debida a diferencias en las matrices estructurales de las películas. Aunque ambas están constituidas por caseinato, se adicionaron péptidos de distinta naturaleza, AM es un extracto concentrado no purificado conformado de péptidos antimicrobianos de peso molecular superior a nisina (Sánchez-Reyes, 2014) y con remanentes de medio de cultivo, los cuales pueden interferir en la cristalinidad de la película y por ende en su permeabilidad y

en los fenómenos de difusión-desorción de compuestos a través de ella. Se debe considerar que aunque ambos compuestos antimicrobianos se adicionaron para generar la misma actividad antimicrobiana (93000 UA/película), el volumen o masa de cada uno de ellos fue distinto, el volumen de AM fue de 3.84 mL/20 mL_{SF}, mientras que la nisina fue incorporada en 59.33 µL de solución buffer de acetatos, es decir un volumen pequeño comparado con el volumen adicionado de AM, lo que posiblemente pudo afectar estructuralmente la matriz polimérica.

Los tratamientos correspondientes a películas de pectina-gelana (Figura 14 y 15) no mostraron crecimiento alguno durante el tiempo de incubación evaluado, sólo la película PG-AM-blanco presentó 1 UCF/caja en t = 192 horas (8 días después de iniciada la incubación), lo cual muestra un efecto sinérgico entre los componentes de la película y los agentes antimicrobianos adicionados.

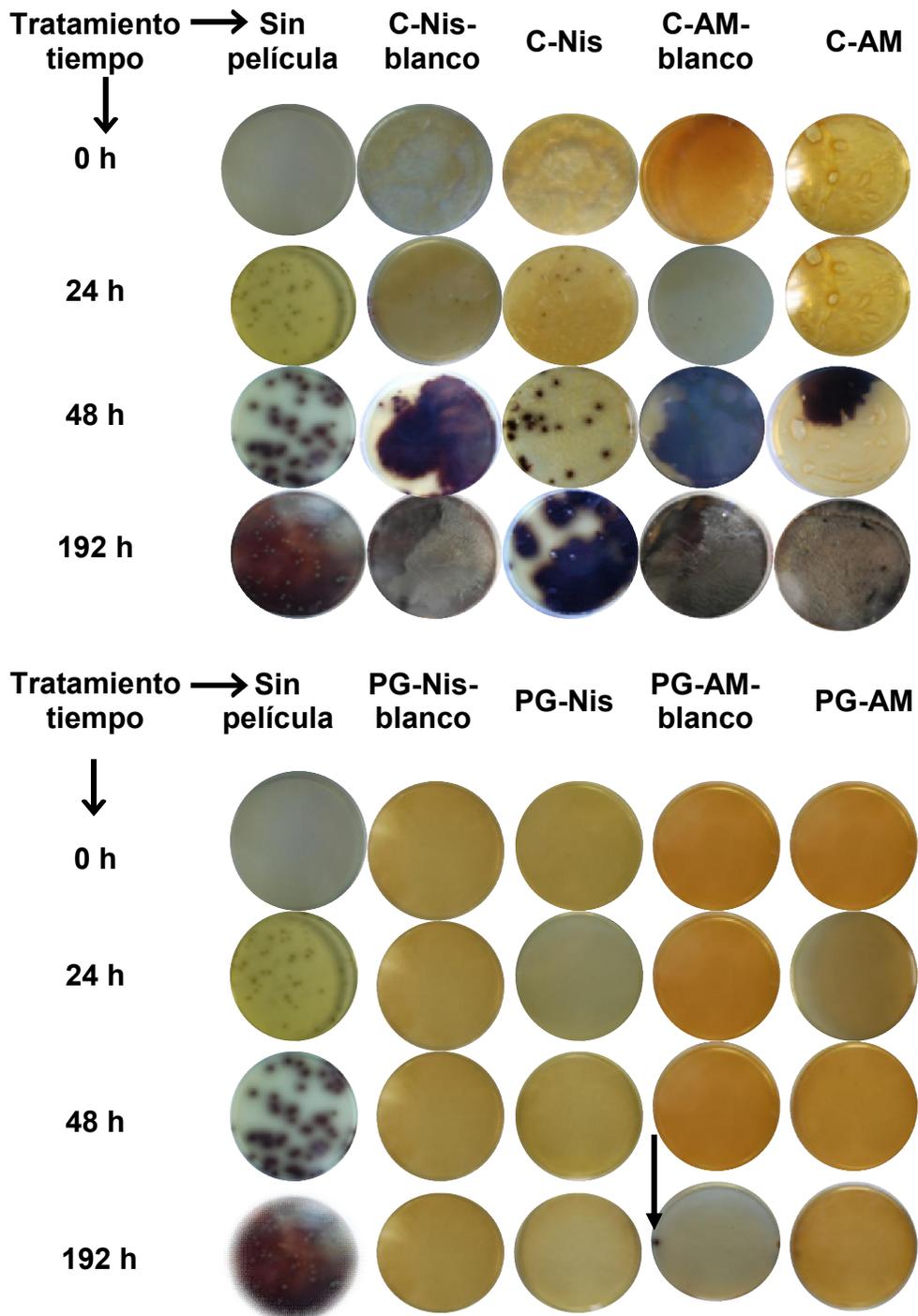


Figura 15.- Imágenes de cajas Petri inoculadas con *Listeria monocytogenes* en medio Oxford. Se muestra el efecto de los distintos tratamientos (películas C y PG) en el crecimiento de *L. monocytogenes* (colonias oscuras) bajo condiciones de incubación a **35 °C y 32% HR**. Flecha en coordenadas (PG-AM-blanco; 192 h) indica la aparición de colonias típicas del microorganismo indicador, para el blanco del tratamiento 3 (PG-AM).

7.2.2 Actividad antimicrobiana a 4 °C, 98% HR

La Figura 16 muestra la evolución del crecimiento del microorganismo indicador con las películas bioactivas en condiciones de refrigeración (4 °C y 98% HR). La caja Petri sin película presentó 46 - 48 UFC/placa, siete días después de iniciarse el experimento (168 h) y esta cuenta se mantuvo constante hasta el final de las observaciones (i.e. 61 días). Para películas C-Nis el crecimiento del microorganismo indicador fue evidente a las 264 h, mientras que para C-AM el crecimiento inició en t=912 h. C-Nis y C-AM extendieron la fase lag del crecimiento de *L. monocytogenes* en 11 y 38 días, respectivamente, y las UFC's se mantuvieron sin cambio hasta el término del experimento. De acuerdo a lo observado en la Figura 16 es evidente que AM mostró mayor actividad antilisterial que nisina, con películas C-AM se desarrollaron sólo 6 UFC/placa mientras que con C-Nis se generó un crecimiento de 18 UFC/placa. Por otra parte, si se comparan los tratamientos con sus blancos, las películas C-AM mostraron una reducción importante en el crecimiento del microorganismo indicador, comparado con el efecto generado por la película sin compuesto bioactivo (i.e. C-AM-blanco). C-AM presentó 6 UFC/placa mientras que su control o blanco (C-AM-blanco) presentó 30 UFC/placa, al finalizar el experimento. Comparando C-Nis y C-Nis-blanco, se observa que nisina presentó sólo un efecto marginal en la actividad antilisterial de las películas, su efecto se presentó principalmente en las primeras horas, C-Nis incrementó un día la fase lag de crecimiento bacteriano de *L. monocytogenes* (ver Figura 16).

Por otra parte, las cajas Petri inoculadas con *Listeria monocytogenes* y en presencia de películas PG no presentaron crecimiento de esta bacteria indicadora durante el tiempo que duró la observación (i.e. 61 días). La Figura 17 muestra los aspectos de las cajas en distintos tiempos de observación. Estos resultados muestran nuevamente que las películas PG tienen mayor actividad antilisterial, lo cual puede atribuirse a algún tipo de sinergismo existente entre los componentes, de la película (pectina y/o gelana) y los péptidos antimicrobianos adicionados o incluso a actividad antilisterial de alguno o ambos biopolímeros, ya que las

películas “blanco”, sin agente antimicrobiano adicionado, tampoco presentaron crecimiento microbiano durante los 61 días que duró la evaluación.

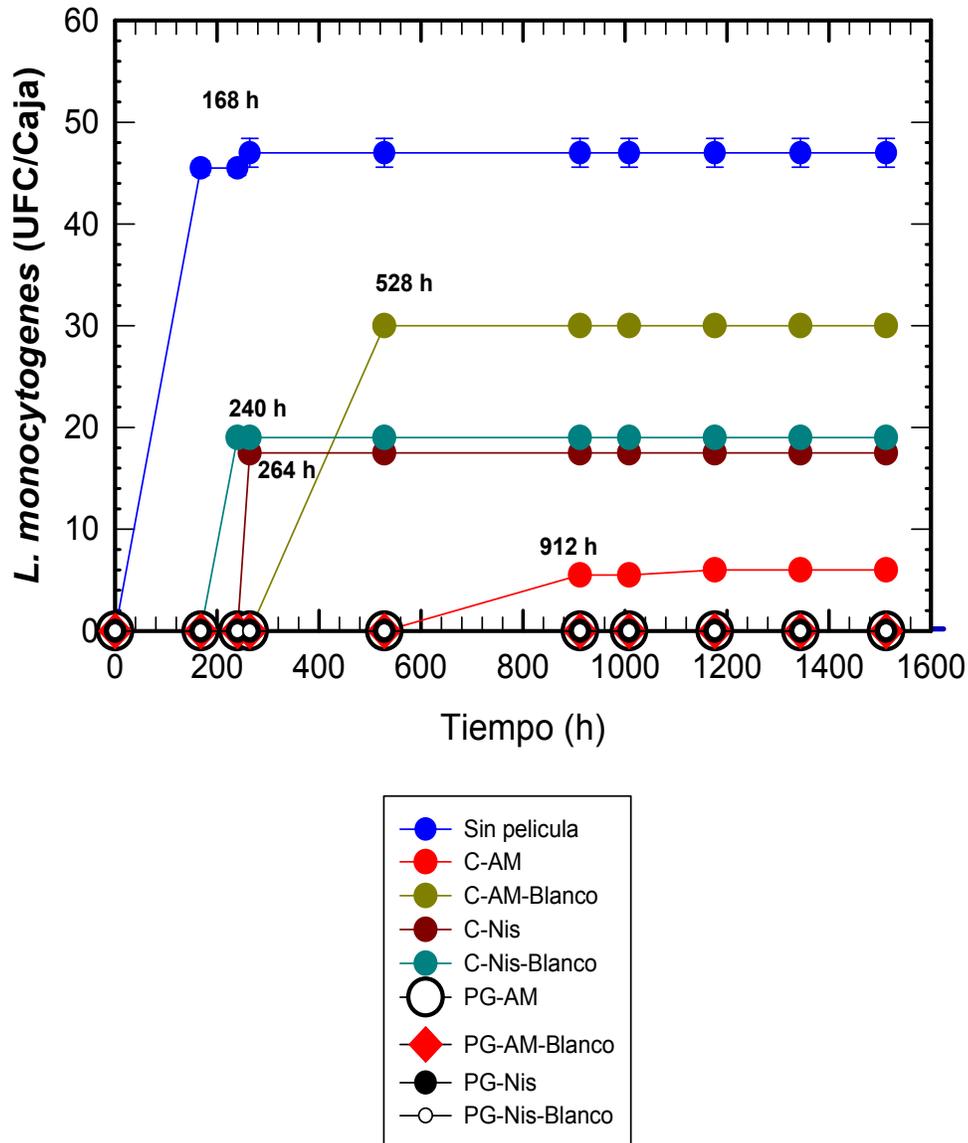


Figura 16.- Efecto de películas con actividad antimicrobiana en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en medio Oxford, en los distintos tratamientos bajo condiciones de incubación a 4 °C y 98% HR. Se muestran los resultados con su réplica

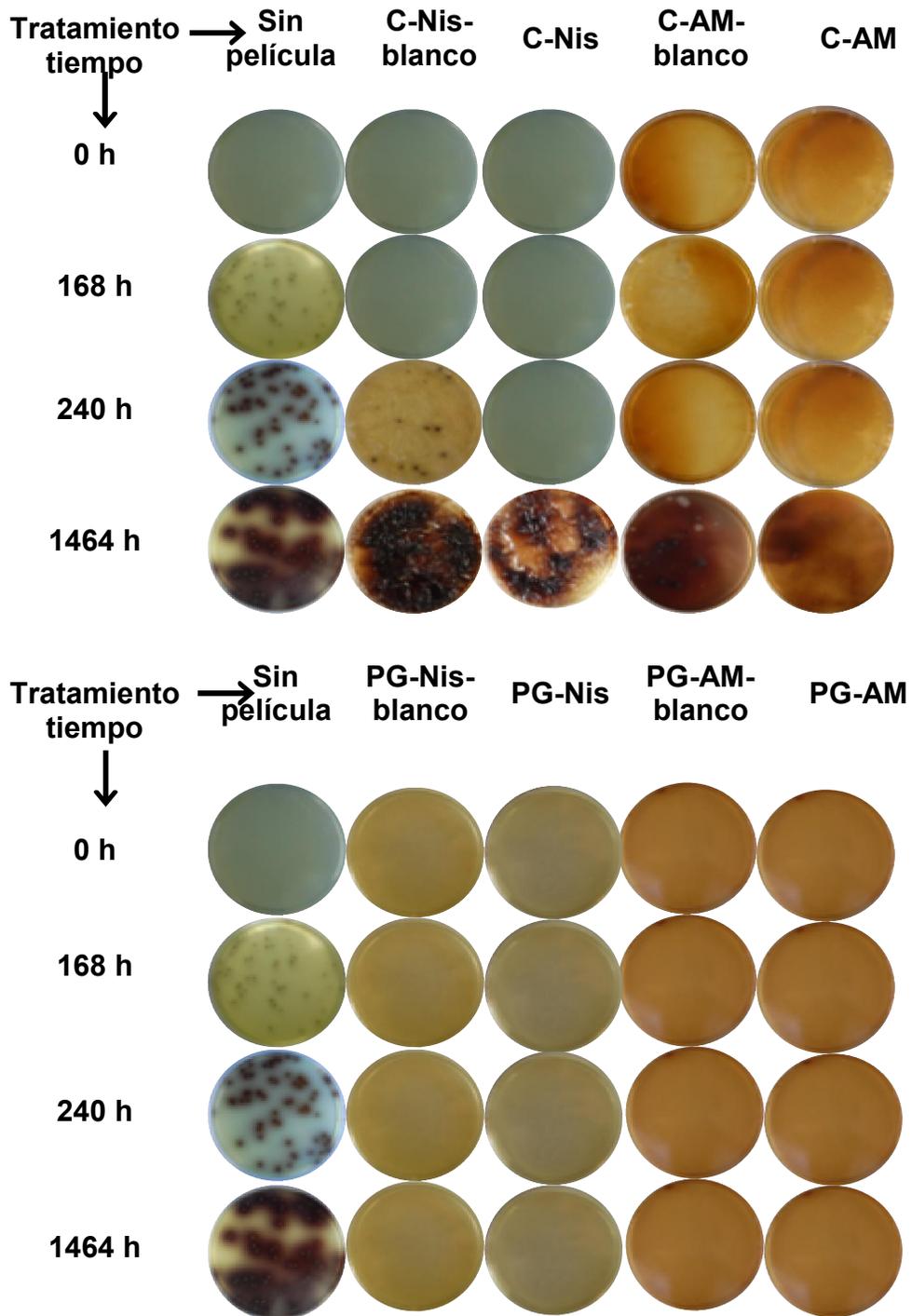


Figura 17.- Imágenes de cajas Petri inoculadas con *Listeria monocytogenes* en medio Oxford. Se muestra el efecto de los distintos tratamientos (películas C y PG) en el crecimiento de *L. monocytogenes* (colonias oscuras) bajo condiciones de refrigeración a 4°C y 98% HR.

La diferencia en actividad antilisterial entre las películas de caseinato y las de pectina-gelana puede ser atribuida al pH de las soluciones filmogénicas y por lo tanto de las películas, éste fue de 6.48 para las películas a base de caseinato, el cual favorece el crecimiento del microorganismo indicador y no es el pH óptimo para la actividad antimicrobiana de AM y nisina. Las soluciones filmogénicas a base de pectina-gelana presentaron pH ácido (≈ 2.43), el cual se debe a que ambos biopolímeros presentan azúcares ácidos en su composición, ácido galacturónico en el caso de pectina y ácido glucurónico para gelana. El pH ácido de películas pectina-gelana pudo inhibir el desarrollo de *Listeria monocytogenes* (Gandhi & Chikindas, 2007), además de favorecer la actividad antimicrobiana de AM y nisina en los tratamientos que las incluyeron (i.e. C-Nis, C-AM, PG-Nis, PG-AM), ya que las bacteriocinas tienen una mejor actividad cuando se disuelven en soluciones con pH ácidos, mostrando mejor actividad a pH=5.5 y decreciendo con el aumento del mismo (Deegan et al., 2006; Sanjurjo et al., 2006; Suárez-Gea, 1997).

El efecto antimicrobiano ejercido por pectina y/o gelana se evaluó con la prueba de difusión de gota en agar, utilizando soluciones de cada polímero y de su mezcla en la misma proporción (83% pectina, 17% gelana) a la usada en las películas. La Figura 18 muestra los halos de inhibición del microorganismo indicador en contacto de distintas concentraciones de soluciones de pectina (Figura 18 A) y gelana (Figura 18 B) por separado y la mezcla de ambos (Figura 18 C). Los resultados mostraron que concentraciones entre 6 y 10% p/v de pectina tienen efecto antimicrobiano contra *L. monocytogenes*, mientras que soluciones de gelana en concentraciones similares no presentaron efecto. Por otra parte, la mezcla pectina-gelana al 6% p/v en agua, mostró actividad antimicrobiana incipiente (Figura 18C). Concentraciones altas de los polímeros, así como de la mezcla, impidieron realizar correctamente la prueba, pues al momento de colocar la gota de solución biopolimérica en la superficie del agar, ésta gelificaba muy rápido. Sin embargo, es evidente que las películas tienen concentraciones más elevadas de estos polímeros. Por lo tanto, de acuerdo a estos hallazgos, las

películas PG-blancos, presentaron actividad antilisterial debido a la pectina en su formulación (83% base seca).

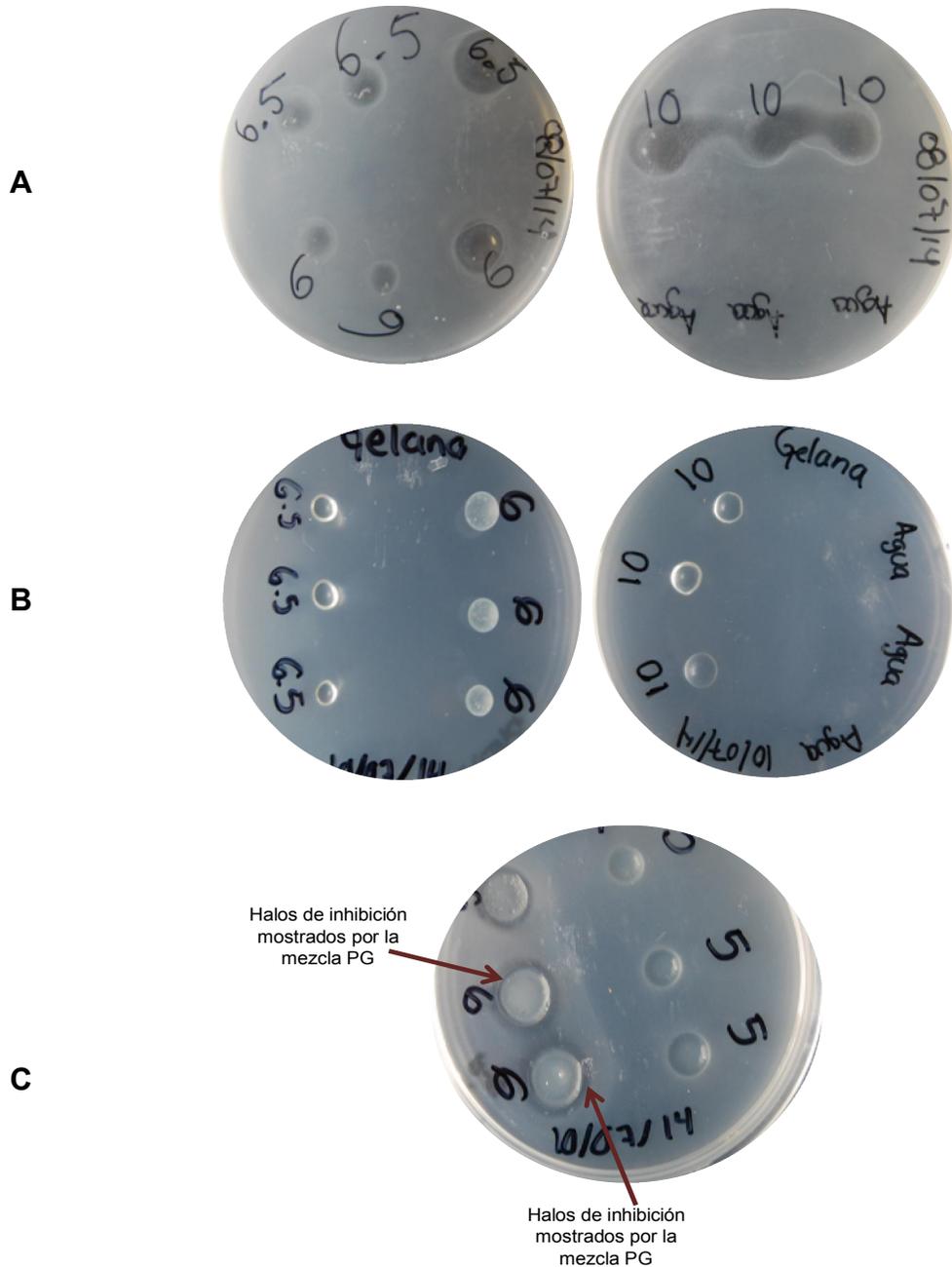


Figura 18.- Evaluación de la actividad antimicrobiana de soluciones de pectina (A), gelatina (B) y mezclas 83% pectina-17% gelatina (C). Prueba de difusión de gota en agar. Se muestran las concentraciones en donde fue evidente los halos de inhibición del crecimiento de *Listeria monocytogenes* en soluciones de pectina (6 a 10%) (A). En soluciones de gelatina no se presentaron halos de inhibición (B). En la mezcla pectina-gelatina fue evidente la presencia de halos de inhibición a partir de concentraciones de polímero del 6% (C).

Los resultados encontrados para la prueba de difusión en agar por gota para el caso de gelana difieren a lo encontrado por Xu et. al. (2007) quienes evaluaron y caracterizaron películas a base de konjac glucomanano y goma gelana. Para ello prepararon distintas formulaciones de soluciones filmogénicas, variando las concentraciones de konjac glucomanano y gelana (1:9, 3:7, 5:5, 7:3 y 9:1), a cada una de las cuales se les adicionó 1050 UI/mg de nisina. La actividad antimicrobiana de las películas se evaluó por el método de difusión en agar, usando como microorganismo indicador *Staphylococcus aureus*. Los resultados de este trabajo demostraron que el efecto antimicrobiano de las películas aumentaba con la concentración de gelana.

Por otro lado, la actividad antimicrobiana exhibida por la pectina se respalda con el estudio realizado por Gopi et. al. (2014). En dicho estudio se evaluó la síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita (HAP, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) en presencia de pectina de piel de banana. Al someter 4 volúmenes diferentes de HAP (25, 50, 70 y 100 μL) a la prueba de actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *E. coli* encontraron que las nanopartículas de HAP sintetizadas en presencia de una concentración óptima de pectina (0.15%) mostraron tener mejor actividad antimicrobiana que las nanopartículas sintetizadas en ausencia de pectina, concluyendo entonces que la pectina extraída de la banana posee actividad antimicrobiana, la cual es debida a la presencia de algunos componentes orgánicos como ácidos urónicos, polifenoles e incluso minerales tales como K^+ , Na^+ y Mg^+ . En otros estudios también se ha confirmado actividad antimicrobiana de pectinas; Jindal et. al. (2013) al realizar la prueba de actividad antimicrobiana incluida dentro de la caracterización de pectina extraída de *Aegle marmelos*, comúnmente llamado “Bael”, encontraron que conforme aumenta la concentración de pectina, incrementa también el efecto antimicrobiano de la misma. Utilizaron como microorganismos indicadores *Bacillus cereus* y *Escherichia coli*. Por otra parte, Bayarri et. al. (2014) demostraron que la actividad antimicrobiana de lisozima disminuye al disminuir la concentración de pectina de bajo metoxilo. La actividad antimicrobiana de pectina se muestra también en los estudios de Jin et.

al. (2009) quienes observaron una actividad antilisterial baja en películas de pectina y ácido poliláctico. De forma similar, Olano et al. (2003) demostraron que los oligosacáridos pécticos (obtenidos a través de hidrólisis enzimática de pectinas) en concentraciones de 10 mg/mL, son suficientes para neutralizar la toxina shiga de *Escherichia coli*.

Los resultados de actividad antimicrobiana en las películas estudiadas en este trabajo muestran que el péptido producido por *Streptococcus infantarius* aislado del pozol (AM), presenta mayor actividad contra *L. monocytogenes* que nisina. Esto indica que el péptido de AM puede ser una bacteriocina del tipo II A, ya que este tipo de péptidos se caracterizan por poseer una actividad antilisterial mayor que nisina (Balciunas et al., 2013). Esto se respalda con los resultados de caracterización bioquímica de AM que están en proceso en el Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria. Dentro de estos destacan los hallazgos de Sánchez-Reyes (2014), quien comprobó que AM está conformado por péptidos termoestables (121 °C/15 min) con peso molecular cercano a 9 kDa y una actividad antilisterial importante, lo cual es característico de las bacteriocinas tipo IIA.

La actividad antimicrobiana de las películas de este trabajo en condiciones de refrigeración ($T=4\pm 2$ °C y $HR=98\pm 10\%$), resultó ser superior a la reportada en películas a base de metilcelulosa con aceites esenciales (Takala et al., 2013), las cuales fueron efectivas para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* en floretes de brócoli (hasta 4 días a 4 °C para *L. monocytogenes* y *E. coli*, y hasta 12 días a la misma temperatura para *S. typhimurium*). Existen pocos reportes en la literatura en donde se evalúe actividad antimicrobiana de películas biopoliméricas usando tiempos de observación superiores a una semana.

7.2. Propiedades mecánicas de las películas con sustancias antimicrobianas

El Cuadro 8 muestra los parámetros que describen el comportamiento mecánico de las películas. En general, no se encontró diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) entre cada tratamiento y su respectivo blanco. El módulo de Young (ME), el cual describe la rigidez de la película, no presentó diferencia estadística significativa entre tratamientos y su blanco pero sí entre tratamientos, lo que indica que aun tratándose de la misma matriz polimérica, la adición de distintos compuestos antimicrobianos pueden dar lugar a diferencias microestructurales que se manifiestan en las propiedades mecánicas. Las películas a base de caseinato presentaron valores menores de ME que sus contrapartes a base de pectina-gelana. Esta diferencia se atribuye a la organización microestructural que adoptan los biopolímeros durante la gelificación y/o proceso de secado de la solución filmogénica. Se ha reportado que gelana de bajo acilo en presencia de calcio forma geles muy reticulados aún a bajas concentraciones de este biopolímero (Pérez-Campos et al., 2012). De acuerdo a estudios reológicos de gelana y gelana con mezclas de biopolímeros (Pérez-Campos et al., 2012; Rodríguez-Hernández et al., 2006; Rodríguez-Hernández et al., 2003), las concentraciones de gelana (0.2% p/v) y calcio (5 mM) usadas en este trabajo para la formulación de películas se consideran lo suficientemente grandes para generar redes de gelana fuertes, capaces de albergar pectina y el resto de los componentes (glicerol, agentes antimicrobianos) en sus espacios intersticiales. Los valores más pequeños para ME los presentaron las películas a base de caseinato C-AM (64.42 ± 13.32) y su blanco (137.69 ± 21.49). La razón del resultado puede ser que las sustancias antimicrobianas de AM actúan como plastificantes adicionales y su efecto es mayor que nisina debido a que AM está adicionado en un volumen considerablemente mayor de agua, el cual incluye también remanentes del medio de cultivo donde creció *Streptococcus infantarius*. Estos componentes y los péptidos antimicrobianos pueden disminuir la cohesión de la película al disminuir las fuerzas de interacción entre las cadenas de los

polímeros que conforman la matriz estructural, provocando que las cadenas tengan menos restricciones para relajarse, dando lugar a películas más flexibles, menos rígidas. Este efecto posiblemente sea minimizado en películas del mismo polímero pero con adición de nisina, pues la concentración en masa de esta bacteriocina fue mucho menor que la adición del concentrado de la BAL (AM). Resultados similares fueron reportados por Atares et. al. (2010) en películas de caseinato de sodio con aceites esenciales de canela y jengibre; Arrieta et al. (2014) en películas de caseinato de sodio y calcio con carvacrol, y por Giménez et. al. (2012) en películas de gelatina-clara de huevo y aceite esencial de clavo. Las películas PG con nisina presentaron los valores más altos de ME, los cuales fueron superiores a 1000 MPa, fueron películas rígidas cuyos valores de ME son comparables a los reportados para películas de caseinato de sodio con aceites esenciales dentro de nanoliposomas (Jiménez et al., 2014).

El esfuerzo a la fractura (σ_f) tampoco fue diferente entre cada tratamiento y su película blanco a excepción del tratamiento PG-Nis, en donde la película con nisina requirió mayor esfuerzo para fracturarse (35.38 ± 10.04 MPa) que su película blanco (23.86 ± 6.38 MPa). Comparando el efecto de las dos bacteriocinas usadas (i.e. nisina y AM) en σ_f , en los dos tipos de películas estudiadas (C y PG), la adición de AM o medio de cultivo sin péptidos bioactivos (películas AM-blancos), generó una disminución en dicho parámetro. Por otra parte, los valores de elongación fueron congruentes con EM y σ_f , las películas menos rígidas (valores menores de EM) y con menores valores de σ_f fueron las más extensibles (i.e. C-AM y C-AM-blanco) con valores cercanos al 50%, mientras que las más rígidas apenas se deforman hasta un 4% con respecto a su longitud inicial (Cuadro 8). La Figura 19 muestra los reogramas representativos de las películas. Es evidente una zona plástica más pronunciada para las películas que contienen en su formulación AM. En contraste las películas con nisina fueron menos plásticas (deformaciones pequeñas antes de la fractura) y más rígidas (pendientes mayores en la zona lineal esfuerzo-deformación). Por lo tanto, AM actuó como un plastificante adicional en las películas.

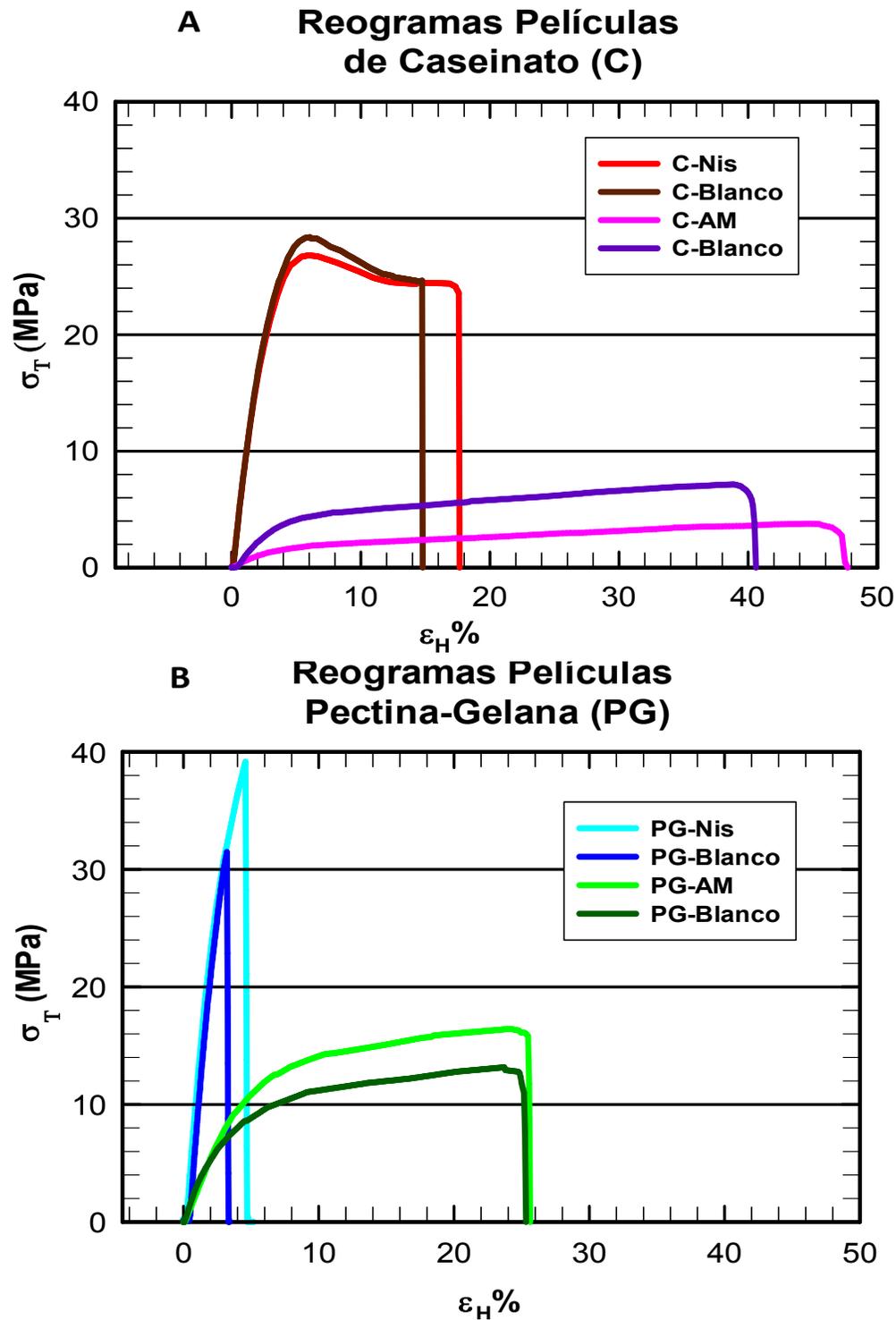


Figura 19.- Reogramas representativos de las películas, **A.** Comportamiento mecánico de las películas de caseinato en su diferentes tratamientos después de ser sometidas a la prueba de tensión uniaxial, **B.** Comportamiento mecánico de películas pectina-gelana (PG).

Cuadro 8. Propiedades mecánicas evaluadas en películas con y sin sustancias antimicrobianas.

Tratamiento	Módulo de Young (ME, MPa)	Esfuerzo a la fractura (σ_f , MPa)	Elongación (%e)
1. C-AM	64.42±13.32 ^d	4.01±1.06 ^e	49.71±18.36 ^a
C-AM-Blanco	137.69±21.49 ^d	7.35±0.85 ^{de}	49.08±9.04 ^a
2. C-Nis	761.70±63.98 ^b	21.24±2.71 ^{bc}	12.31±3.33 ^{cd}
C-Nis-Blanco	752.53±63.21 ^b	21.52±2.87 ^{bc}	15.77±3.43 ^{bcd}
3. PG-AM	303.76±43.93 ^c	14.22±1.28 ^{cd}	24.94±4.78 ^{bc}
PG-AM-Blanco	292.68±19.37 ^c	12.74±0.90 ^{cd}	25.85±4.43 ^b
4. PG-Nis	1323.92±106.32 ^a	35.38±10.04 ^a	4.25±1.93 ^d
PG-Nis-Blanco	1400.41±104.20 ^a	23.86±6.38 ^b	2.33±0.73 ^d

Valores promedio de 7 determinaciones \pm desviación estándar. Letras diferentes entre las columnas indican diferencia estadística significativa (ANOVA, seguida de comparación de medias prueba Tukey; $p < 0.05$).

El Cuadro 9 presenta algunos resultados representativos de propiedades mecánicas de películas biopoliméricas, reportados recientemente. Es evidente en la información recabada en Cuadro 9 que las condiciones experimentales (velocidad de tensión, tamaño de película, temperatura) difieren aun cuando el método usado en la mayoría de los casos es el ASTM D882. Estas diferencias experimentales y el método de análisis de los datos generan diferencias importantes en los valores de las propiedades mecánicas, lo cual dificulta hacer comparaciones entre resultados de distintos grupos de investigación. De acuerdo a los resultados resumidos en Cuadro 9, los valores del módulo de Young de las películas C-AM fueron del mismo orden de magnitud que los reportados para películas de caseinato de sodio con carvacrol (Arrieta et al., 2013) y caseinato con aceites esenciales de canela y jengibre (Atarés et al., 2010), mientras que las películas C-Nis fueron más rígidas con valores del módulo de Young en el mismo orden de magnitud a los reportados también para películas de caseinato de sodio con bacteriocinas y metilcelulosa con bacteriocinas (Sánchez et al., 2014).

Cuadro 9. Propiedades mecánicas de algunas películas biopoliméricas reportadas en la literatura

Película	Condiciones de la prueba	Tratamientos	Grosor (μm)	Módulo de Young (MPa)	Esfuerzo a la fractura σ_f (MPa)	Elongación (%)	Referencia
Kappa-carragenina, con diferentes concentraciones de aceite esencial de <i>Zataria multiflora Boiss</i> (ZOE) y <i>Mentha Pulegium</i> (MEO)	Método: ASTM D882-12 Equipo: Máquina testométrica (M350-10CT, Testometric Co., Ltd., Rochdale, Lancs., UK). Tiras: 1.5 × 10 cm T= 25 °C HR= 53 % v: 50 mm/min	Control ZOE1 ZOE2 ZOE3 MEO1 MEO2 MEO3	31.33±1.15 37.44±1.53 41.12±2.89 62.33±3.79 32.56±1.52 38.18±5.69 48.67±4.51	—	26.29±2.93 15.86±3.14 12.75±1.54 10.34±2.90 25.81±4.54 22.22±1.61 17.17±3.29	36.46±1.04 37.43±1.56 39.75±4.19 44.74±5.91 36.09±3.45 37.67±2.60 41.25±6.25	Aliabadi-Shojaee et al., 2014
Caseinato de sodio (SC), caseinato calcio (CC), con carvacol (CRV) y glicerol (G) como plastificante	Método: ASTM D882-01 (ASTM 2001) Tiras: 10×100 mm HR= 50% v: 25 mm/min	SC:G-CRV 1:0.15:0 1:0.25:0 1:0.35:0 1:0.15:0.10 1:0.25:0.10 1:0.35:0.10 CC:G-CRV 1:0.15:0 1:0.25:0 1:0.35:0 1:0.15:0.10 1:0.25:0.10 1:0.35:0.10	—	178±80 31±10 7±1 82±15 29±8 8±2 424±15 272±6 39±3 137±2 61±7 36±6	1.50±0.20 0.62±0.19 0.14±0.06 0.73±0.08 0.42±0.15 0.09±0.02 1.78±0.09 0.54±0.01 0.50±0.02 3.02±0.04 1.20±0.05 0.26±0.03	17±6 32±1 79±11 27±5 81±3 62±11 6±2 9±2 36±2 5±2 20±3 33±8	Arrieta et al., 2013

Película	Condiciones de la prueba	Tratamientos	Grosor (µm)	Módulo de Young (MPa)	Esfuerzo a la fractura σ_f (MPa)	Elongación (%)	Referencia
Caseinato de sodio (CS), con aceites esenciales canela (EC) y jengibre (J)	Método: ASTM D882 (ASTM 2001) Tiras: 25×100 mm HR= 33-53% v: 50 mm/min	SC SC-EC _{0.025} SC-EC _{0.075} SC-G _{0.025} SC-G _{0.075}	—	180±45 156±44 160±33 154±55 170±37	11±2 10.2±1.6 11.4±1.8 10±2 11.6±1.7	67±17 67±19 76±21 57±24 72±28	Atarés et al., 2010
Quitosano (Q) con polivinil-alcohol (PVA)	Método: UNI ISO 527-1 (ISO, 2012) Equipo: Máquina Universal (Digital Lloyd Instrument) Tiras: 1×5 cm HR= 53% v: 50 mm/min	PVA100 PVA90:Q10 PVA80:Q20 PVA70:Q30 Q100	250±50 190±40 240±30 310±40 39±2	263±35 172±15 1390±68 1090±30 533±15	23±3 28±4 43±5 24±2 20±7	265±17 173±20 81±6 32±7 6±2	Bonilla et al., 2014
Películas de caseinato de sodio (CS) con glicerol (Gli) ácido estéarico (Ae) y oleico (Ao), así como incorporación de aceite esencial de <i>Zataria multiflora Boiss</i> y una proteína / lípido	Método: ASTM D882-3 Equipo: texturómetro (M350-10CT, type DBB MTCL, Testometric Co. Rochdale, England). Tiras: 25×80 mm HR= 50±5% v: 10 mm/s	CS-Gli CS-Gli-Ao CS-Gli-EO-Ao	140±10 200±30 200±30	1.99±0.17 0.31±0.05 0.95±0.19	9.27±0.29 2.23±0.20 1.94±0.15	322±21 745±48 212±41	Broumand et al., 2011
Una mezcla de clara de huevo-gelatina, aceite esencial de clavo (CL) y sepiolita (S). Película control (C)	Método: ASTM D882-3 Equipo: texturómetro (TA.XT2i, SMS, Surrey, UK) Tiras: 2 × 5cm v: 100mm/min	C C-S C-CL C-CL-S	—	67.94±2.72 101.9±17.8 10.51±1.83 4.51±0.70	5.57±0.97 12.39±2.34 3.84±0.29 1.63±0.16	337.6±28.7 37.8±3.0 426.9±31.3 227.3±5.7	Giménez et al., 2012

Película	Condiciones de la prueba	Tratamientos	Grosor (µm)	Módulo de Young (MPa)	Esfuerzo a la fractura σ_f (MPa)	Elongación (%)	Referencia
Caseinato de sodio (CS) y metilcelulosa (MC), con adición de dos bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas (BAL) <i>Lactobacillus acidophilus</i> (L. a) y <i>Lactobacillus reuteri</i> (L. r)	Método: ASTM D-882 Equipo: texturómetro Analyser TA-XT-plus Tiras: 24.5 × 100 mm T= 5 °C HR=75 % v: 50 mm/min	CS CS + L. a CS + L. r MC MC+ L. a MC+ L. r	—	345±79 318±34 252±23 532±25 332±35 328±21	11.2±1.2 10.0±0.8 6.9±0.5 31.6±0.8 30.7±0.8 24±24	6.0±0.3 5.8±0.2 6.3±0.2 29±7 32.9±1.3 33±2	Sánchez et al., 2014
Caseinato de sodio-almidón con aceites esenciales de naranja (An) y limoneno (Lim) dentro de nanoliposomas de soya (Soy). Película control (Pc).	Método: ASTM D882 (ASTM 2001) Tiras: 2.5 × 10 cm T= 25 °C HR=53 % v: 50 mm/min	Control Pc Pc-Lim Pc-An Soy Soy-Lim Soy-An	55±8 63±8 76±11 89±12 66±7 71±11 81±9	1900±200 1300±200 700±100 900±200 900±100 1000±100 860±70	27.6±1.5 8±0.7 7.8±0.4 7.1±1.8 9.6±1.9 11±2 9.6±0.3	2.9±0.5 0.8±0.2 2.0±0.2 1.0±0.3 1.7±0.6 1.8±0.6 1.7±0.1	Jiménez et al., 2014
Película preparada a base de gelatina (Gel), nanopartículas de plata (AgNPs) y órgano arcilla (Cloisite 30B).	Método: ASTM-828-88 Equipo: Máquina Universal Instron (modelo 5565, Instron Engineering corporation, Canton MA, USA), v: 50 mm/min.	Galatina Gel/Arcilla Gel/AgNPs Gel/AgNPs/Arcilla	86±5 110±12 93±10 105±10	430.9±192.6 386.4±157.0 303.7±88.4 533.1±72.8	15.5±3.9 19.5±4.3 15.3±3.5 20.8±3.1	48.1±12.4 34.2±8.7 72.6±6.6 47.3±6.2	Kanmani & Whan, 2014
Caseinato de sodio (CS) incorporadas con Lisozima (Lys) y glicerol (Gli).	Método: ASTM D882 (ASTM 1992) Tiras: 2.54×8 cm T= 25 °C HR= 50-70% v: 25 mm/min	CS CSLys CS pH 4.6 CS pH 4.6 LysCSGli (0.5%) CSGli (0.5%) Lys	—	0.22±0.09 0.18±0.09 0.33±0.08 0.48±0.08 0.58±0.09 0.61±0.09	3.7±0.7 3.4± 0.5 3.5±0.5 4.1±0.4 4.0±0.3 3.8±1.3	125±11 111±9 115±8 105±22 123±8 78±25	Mendes de Souza, et al., 2010

Película	Condiciones de la prueba	Tratamientos	Grosor (μm)	Módulo de Young (MPa)	Esfuerzo a la fractura σ_f (MPa)	Elongación (%)	Referencia
Película de quitosano (q)-aceite esencial de hoja de canela (EC), con y sin ácido oleico (Ao).	Método: ASTM-D882, 2001 Equipo: Máquina Universal (TA. XT plus Stable Micro Systems, Haslemre, Englad) v: 50 mm/min	Q	42 \pm 12	1674 \pm 49	44 \pm 6	20 \pm 5	Perdones et al., 2014
		Q ₁ :Ao _{0.25} :EC _{0.25}	51 \pm 5	1421 \pm 80	43 \pm 9	21 \pm 6	
		Q ₁ :EC _{0.5}	48 \pm 4	1455 \pm 89	37 \pm 3	17 \pm 3	
		Q ₁ :Ao _{0.5} :EC _{0.5}	64 \pm 3	1047 \pm 161	39 \pm 4	29 \pm 5	
		Q ₁ :EC ₁	60 \pm 3	962 \pm 68	38 \pm 6	27 \pm 4	
		Q ₁ :Ao ₁	74 \pm 3	848 \pm 24	33 \pm 4	11 \pm 5	
Carboximetil-gelana (CMGe) y pululano (Pu) con adición de glicerol (Gli)	Método: ASTM D882-02 (ASTM 2002) Tiras: 20 \times 80 mm T= 25 °C HR= 50-70% v: 1-60 mm/s	CMGe/Pu					Zhu et al., 2014
		4/0 (p/p)	190 \pm 40		27.65 \pm 2.06	9.80 \pm 1.20	
		3/1 (p/p)	160 \pm 10		23.95 \pm 1.87	15.83 \pm 0.93	
		2/2 (p/p)	210 \pm 30	—	14.63 \pm 1.93	23.93 \pm 1.68	
		1/3 (p/p)	210 \pm 30		13.22 \pm 0.64	26.17 \pm 1.44	
		0/4 (p/p)	170 \pm 40		10.60 \pm 2.43	33.50 \pm 1.82	

7.3. Propiedades de barrera

7.3.1. Permeabilidad al oxígeno (PO₂) de las películas con sustancias antimicrobianas

El Cuadro 10 muestra los valores de PO₂ determinados en las películas de los diferentes tratamientos estudiados en este trabajo. No existió diferencia estadística significativa entre cada tratamiento y su respectivo blanco. Por lo tanto la adición de los péptidos antimicrobianos no afectó la permeabilidad al oxígeno de las películas. Es notable la diferencia en magnitud entre PO₂ de películas de caseinato y PG, las primeras fueron hasta dos órdenes de magnitud mayores y la inclusión de AM o nisina sí tuvo efecto en el valor de PO₂. Las películas PG presentaron los valores más pequeños de PO₂, sin diferencia estadística significativa por la adición de los dos tipos de bacteriocinas. Los resultados de PO₂ de películas C-AM y C-Nis fueron comparables con los reportados para películas de caseinato con antioxidantes (PO₂ = 56 a 83×10⁻¹⁴ g m s⁻¹m⁻² Pa⁻¹) (Fabra et al., 2011), quitosano-ácido esteárico (PO₂ = 34.9×10⁻¹⁴ g m s⁻¹m⁻² Pa⁻¹) (Srinivasa et al., 2007) y quitosano-ácido oleico (PO₂ = 14 a 46×10⁻¹⁴ g m s⁻¹m⁻² Pa⁻¹) (Aguirre, et. al., 2014). Por otra parte, los valores bajos de PO₂ obtenidos en las películas PG son similares a los reportados para películas de metilcelulosa y metilcelulosa-ácido esteárico (PO₂ = 6 a 7.8×10⁻¹⁴ g m s⁻¹m⁻² Pa⁻¹) (Ayranci & Tunc, 2003), zeína-ácido oleico (PO₂ = 7.3×10⁻¹⁴ g m s⁻¹m⁻² Pa⁻¹) (Rakotonirainy & Pauda, 2001) e incluso plásticos sintéticos como polipropileno (PO₂ = 2.46×10⁻¹⁴ g m s⁻¹m⁻² Pa⁻¹) polietileno de baja densidad (PO₂ = 3.08×10⁻¹⁴ g m s⁻¹m⁻² Pa⁻¹) y polietileno de alta densidad (PO₂ = 0.4×10⁻¹⁴ g m s⁻¹m⁻² Pa⁻¹) (Singh & Heldman, 2009).

Las diferencias en los valores de PO₂, entre los distintos tratamientos evaluados en este trabajo, pueden atribuirse a las características propias de cada matriz estructural de la película y a posibles interacciones existentes entre los biopolímeros estructurales y los compuestos antimicrobianos, agua e incluso iones presentes, lo cual pudo generar matrices biopoliméricas con distintas proporciones

de zonas amorfas/cristalinas. Se ha reportado que la plastificación de las películas genera un incremento en la movilidad de las cadenas poliméricas y este fenómeno puede disminuir la resistencia a la transmisión de gases a través de la película. Sin embargo, en condiciones de humedad relativa intermedia o alta (50% HR o mayor), los microcanales de la película pueden estar ocupados con agua, obstruyendo el transporte de moléculas gaseosas a través de la película (Srinivasa et al., 2007), lo cual puede explicar los valores más bajos de PO_2 en películas C-AM, más plastificadas que C-Nis (ver Cuadro 10). Los bajos valores de PO_2 en películas PG puede atribuirse a una microestructura más compacta generada por la gelificación fuerte de gelana (Pérez-Campos et al., 2012), lo cual da lugar a una red menos porosa y por lo tanto menos permeable. Esto permite visualizar a las películas PG como una alternativa viable para empaques alimentarios biodegradables por sus propiedades de barrera al oxígeno, mecánicas y antimicrobianas, estas últimas discutidas en secciones previas.

Cuadro 10. Permeabilidad al oxígeno (PO_2) de películas con y sin sustancias antimicrobianas

Tratamiento	$PO_2 \times 10^{14}$ (g m Pa ⁻¹ s ⁻¹ m ⁻²)
1. C-AM	40.5 ± 5.79 ^b
C-AM-Blanco	39.6 ± 5.74 ^b
2. C-Nis	188.4 ± 6.75 ^a
C-Nis-Blanco	184.6 ± 20.8 ^a
3. PG-AM	8.3 ± 0.61 ^c
PG-AM-Blanco	7.5 ± 0.87 ^c
4. PG-Nis	1.8 ± 0.80 ^c
PG-Nis-Blanco	2.1 ± 0.67 ^c

Se muestra el promedio ± desviación estándar de cuatro determinaciones. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P > 0.05$).

7.3.2. Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas con sustancias antimicrobianas

Los valores de PVA de las distintas películas estudiadas en este trabajo se muestran en el Cuadro 11. No se observó diferencia significativa entre cada tratamiento y su correspondiente blanco, por lo que la inclusión del agente antimicrobiano no generó cambios en la permeabilidad al vapor de agua de las películas, posiblemente por las bajas concentraciones de compuestos bioactivos usadas en los dos tipos de películas. Estos resultados coinciden con lo reportado por Ko et. al., (2001) quienes observaron que la inclusión de nisina (4.0 a 160 UI/película) no generó efecto en los valores de PVA de películas de distintas proteínas: aislado de proteína de suero de leche, proteína de soya, proteína de huevo y gluten de trigo.

Las películas C-AM y C-AM-blanco mostraron los valores más altos de PVA. El resto de los tratamientos mostraron valores estadísticamente iguales, independientemente del tipo de biopolímero estructural o antimicrobiano usado. Estos resultados sugieren que AM probablemente genera redes de caseína menos densas, más plastificadas que nisina. AM está contenida en un volumen mayor (3.84 mL/película) de agua que nisina (59.33 μ L o 0.059 mg/película). Adicional a los péptidos bioactivos y al agua, AM contiene algunos componentes del medio de cultivo que pueden actuar como plastificantes, incrementando el espacio intermolecular polímero-polímero y favoreciendo la movilidad de cadenas poliméricas, lo cual da como resultado el comportamiento predominantemente plástico discutido en la sección de propiedades mecánicas y una estructura más permeable, con mayor afinidad al agua por la naturaleza de los componentes de AM.

Cuadro 11. Valores de Permeabilidad al Vapor de Agua (PVA) de películas con agentes antimicrobianos

Tratamiento		Condiciones experimentales		PVA× 10 ⁻¹¹ (g ms ⁻¹ Pa ⁻¹ m ⁻²)
		T (°C)	HR (%)	
1	C-AM	24	62	16.57±1.23 ^a
	C-AM-Blanco			15.65±1.56 ^a
2	C-Nis			7.23±0.48 ^b
	C-Nis-Blanco			6.68±0.62 ^b
3	PG-AM			8.86±0.14 ^b
	PG-AM-Blanco			7.77±0.47 ^b
4	PG-Nis			8.76 ±0.60 ^b
	PG-Nis-Blanco			8.62±0.90 ^b

Se muestran los valores promedio de cuatro determinaciones ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey, P>0.05).

Las películas estudiadas en este trabajo fueron menos permeables que algunas reportadas en la literatura. Por ejemplo, se han reportado valores de PVA de 40.2 a 67×10⁻¹¹g m s⁻¹m⁻²Pa⁻¹ para películas de proteína con nisina (Ko et. al., 2001), PVA=18.6 a 23.1×10⁻¹¹g m s⁻¹m⁻²Pa⁻¹ para películas de carboximetilcelulosa con ácido oleico (Ghanbarzadeh & Almasi, 2011); PVA = 98×10⁻¹¹g m s⁻¹m⁻²Pa⁻¹ para películas caseinato-nisina (Kristo et al., 2008); PVA = 37 a 73×10⁻¹¹g m s⁻¹m⁻²Pa⁻¹ para películas de carboximetil-gelana, pululano y sus mezclas (Zhu et al., 2014). En muchos de estos estudios, atribuyen al glicerol (plastificante usado en las películas) la alta permeabilidad al vapor de agua de las películas. En general, se ha reportado que las películas a base de proteínas presentan mejores propiedades de barrera a la humedad que las películas a base de polisacáridos (Aguilar-Mendez, 2005; Aloui et al., 2011; Bourtoom, 2008). Sin embargo, en este trabajo esta tendencia no fue observada. Esto puede ser atribuido a la organización microestructural que presenta gelana-pectina, que da lugar a matrices menos permeables tanto al agua como al oxígeno. Esta microestructura deberá ser motivo de estudios posteriores para esclarecer las diferencias en permeabilidades observadas entre películas de caseinato y de pectina-gelana. Los resultados de PVA de películas PG son similares a los obtenidos en películas de

mucílago de semilla de membrillo con aceite esencial de orégano (PVA=7.6 a $17 \times 10^{-11} \text{ g m s}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ Pa}^{-1}$) (Jouki et al., 2014), películas de almidón de maíz/caseinato de sodio (PVA = 5.4 a $14.5 \times 10^{-11} \text{ g m s}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ Pa}^{-1}$) (Arvanitoyannis et al., 1996); películas a base de proteína de pescado/gelatina de pescado/aceites esenciales/nanopartículas de óxido de zinc (PVA = 1.63 a $3.06 \times 10^{-11} \text{ g m s}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ Pa}^{-1}$) (Arfat et al., 2014) y películas de gelana (2%) entrecruzadas con calcio (por inmersión en 5% CaCl_2) (PVA = $8.31 \times 10^{-11} \text{ g m s}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ Pa}^{-1}$) (Yang et al., 2010). En este último estudio, se observó que las películas de gelana tratadas con CaCl_2 mejoraron sus propiedades mecánicas y de barrera por la reacción de entrecruzamiento de cadenas de gelana a través de iones calcio. De acuerdo a Yang et. al., (2010), los iones calcio generaron enlaces intermoleculares más fuertes y más cortos, fortaleciendo la estructura de la película y disminuyendo la movilidad de ésta, lo cual resultó en menores valores de PVA. Estas observaciones pueden explicar los resultados de PVA, PO_2 y propiedades mecánicas de las películas PG.

7.4. Propiedades físicas

7.4.1. Determinación de color a películas con y sin sustancias antimicrobianas

Se obtuvieron películas homogéneas (libres de burbujas y grumos), delgadas, flexibles y transparentes en cada uno de los tratamientos. Una vez extraídas las películas de los moldes y después de determinarles el grosor, se observó que la inclusión de compuestos con actividad antimicrobiana producidos por *S. infantarius* (AM), produce películas más gruesas (200 μm) que las películas a las cuales se les adicionó nisina (90-107 μm). Se observó también que las películas de los tratamientos a los cuales se les adicionó AM mostraron una coloración ámbar, mientras que los tratamientos a los cuales se les adicionó nisina resultaron transparentes con valores L^* , a^* y b^* cercanos a la hoja de papel Bond color blanco que sirvió de fondo o “background” para las mediciones de color de las películas ($L_0^* = 88.62$, $a_0^* = 1.43$ y $b_0^* = -6.75$).

Las películas C-AM y C-AM-blanco redujeron notablemente su claridad (parámetro L^*) y los valores para la cromaticidad aumentaron, es decir predominó una tonalidad rojo-amarillo ($a^*=10.52$ y 10.83 ; $b^*=29.55$ y 29.29). Por otra parte, en las películas C-Nis y C-Nis-blanco, el parámetro L^* permaneció sin cambios significativos comparado con el fondo (hoja blanca), mientras que en los valores de cromaticidad resaltó el color azul con valores de -3.17 ± 1.35 y -2.99 ± 1.21 , y amarillo, con valores de $b^*=0.83 \pm 0.15$ y 0.80 ± 0.18 . Tendencias similares fueron encontradas para películas de pectina y gelana, pero en esas películas se observó un menor decremento en los valores de claridad (L^*) por la incorporación de AM. El Cuadro 12 muestra los parámetros de color y los valores del cambio de color (ΔE) de cada película, considerando como valor de referencia el fondo usado para realizar las mediciones (hoja blanca). Por lo tanto valores bajos de ΔE indican películas más transparentes y con menor cromacidad, que en este estudio correspondieron a las películas con nisina en su formulación.

Cuadro 12. Parámetros de color de películas de caseinato (C) y pectina-gelana (PG) con agentes antimicrobianos.

Tratamiento	Parámetros			ΔE
	L^*	a^*	b^*	
Fondo (hoja blanca)	88.61 ± 0.005	1.43 ± 0	-6.75 ± 0	
1. C-AM	59.43 ± 0.53^a	10.52 ± 0.51^a	29.55 ± 0.34^a	47.55 ± 0.15^a
C-AM-Blanco	59.76 ± 0.15^a	10.83 ± 0.09^a	29.29 ± 0.70^a	49.97 ± 0.64^a
2. C-Nis	87.46 ± 0.19^b	0.83 ± 0.15^b	-3.17 ± 1.35^b	3.81 ± 1.35^b
C-Nis-Blanco	87.27 ± 0.10^b	0.80 ± 0.18^b	-2.99 ± 1.21^b	4.05 ± 1.16^b
3. PG-AM	69.55 ± 0.35^c	3.80 ± 0.81^c	27.05 ± 0.87^{ac}	38.88 ± 0.98^c
PG-AM-Blanco	69.45 ± 0.28^c	3.45 ± 0.11^c	26.71 ± 0.18^c	38.61 ± 0.30^c
4. PG-Nis	87.17 ± 0.10^b	0.84 ± 0.080^b	-3.50 ± 0.65^b	3.61 ± 0.56^b
PG-Nis-Blanco	87.62 ± 0.07^b	0.74 ± 0.14^b	-2.59 ± 1.05^b	4.33 ± 1.04^b

Se muestra el promedio de tres determinaciones \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey, $P > 0.05$).

7.4.2. Solubilidad en agua de películas de caseinato y pectina-gelana con y sin sustancias antimicrobianas

La solubilidad en agua de las películas es un factor importante a considerar para determinar las posibles aplicaciones industriales de las mismas. En algunas aplicaciones se requiere que los materiales de empaque que estarán en contacto con alimentos de alta humedad tengan una baja solubilidad para poder asegurar la integridad del producto. Por otra parte, la solubilidad de las películas en agua favorece su biodegradabilidad, aspecto importante en este tipo de materiales. Los valores de solubilidad en agua de las distintas películas evaluadas en este trabajo se muestran en el Cuadro 13. Como en las otras propiedades de las películas, no se observó diferencia estadística significativa entre cada tratamiento y su película “blanco”.

Cuadro 13. Valores promedio de la solubilidad en agua de las películas caseinato y pectina-gelana con y sin sustancias antimicrobianas

Tratamiento	Solubilidad
1. C-AM	97.05±1.88 ^a
C-AM-Blanco	97.82±1.05 ^a
2. C-Nis	73.04±0.59 ^c
C-Nis-Blanco	73.83±0.65 ^c
3. PG-AM	93.19±0.90 ^b
PG- AM-Blanco	93.58±0.05 ^b
4. PG-Nis	54.31±0.40 ^d
PG-Nis-Blanco	53.91±0.60 ^d

Se muestra el promedio de tres determinaciones ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey, P>0.05).

Las películas adicionadas con AM y sus películas “blanco” presentaron los valores más altos de solubilidad (93 a 97%). Esto puede atribuirse a las posibles interacciones moleculares entre AM y los biopolímeros (plastificación de la matriz estructural), generando una matriz flexible, menos compacta y con mayor afinidad hacia compuestos polares como el agua. Se observó un comportamiento totalmente distinto para matrices de los mismos polímeros pero con adición de nisina, C-Nis, PG-Nis y sus correspondientes blancos, estas formulaciones

generaron películas con menores valores de solubilidad, atribuible a la formación de redes más compactas, menos plastificadas y por lo tanto con menor capacidad de hinchamiento por sorción de agua. Este comportamiento es congruente con los resultados de las propiedades mecánicas y de permeabilidad de las películas.

7.5. Microscopia electrónica de barrido

Los componentes de las películas pueden organizarse de maneras muy diferentes en la matriz polimérica durante el secado de la película. La microestructura de las películas se estudió cualitativamente mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) bajo modo ambiental, es decir no fue necesario realizar tratamientos laboriosos en las muestras, sólo se acondicionaron en un desecador con sílica gel ($\approx 0\%$ HR). La Figura 20 muestra las micrográficas obtenidas tanto de la sección transversal como de la superficie de cada uno de los cuatro tratamientos evaluados así como de sus correspondientes blancos.

De forma general, las secciones transversales de las películas se observaron compactas, homogéneas con cierta rugosidad que puede ser debida al corte de la película (trituration de películas congeladas en nitrógeno líquido). Es notoria la presencia de agregados o “grumos” de película en la superficie de C-AM, los cuales son polvos microscópicos de la misma película que quedaron adheridos a su superficie después del proceso de trituración en una licuadora. Desafortunadamente no fue posible realizar una réplica de este tratamiento, pero macroscópicamente fue evidente la presencia de polvos adheridos en esa película, la cual fue la más flexible (más plástica y difícil de fracturar) y más higroscópica. Es importante enfatizar que los tratamientos evaluados generaron películas con estructuras compactas, indicativo de compatibilidad entre los componentes de la misma (Espinell et. al., 2014), y que los agentes antimicrobianos no generaron imperfecciones o irregularidades en la estructura de la película, lo cual respalda el hecho de que los agentes antimicrobianos usados en este trabajo, no tuvieron efectos en las propiedades físicas de las películas.

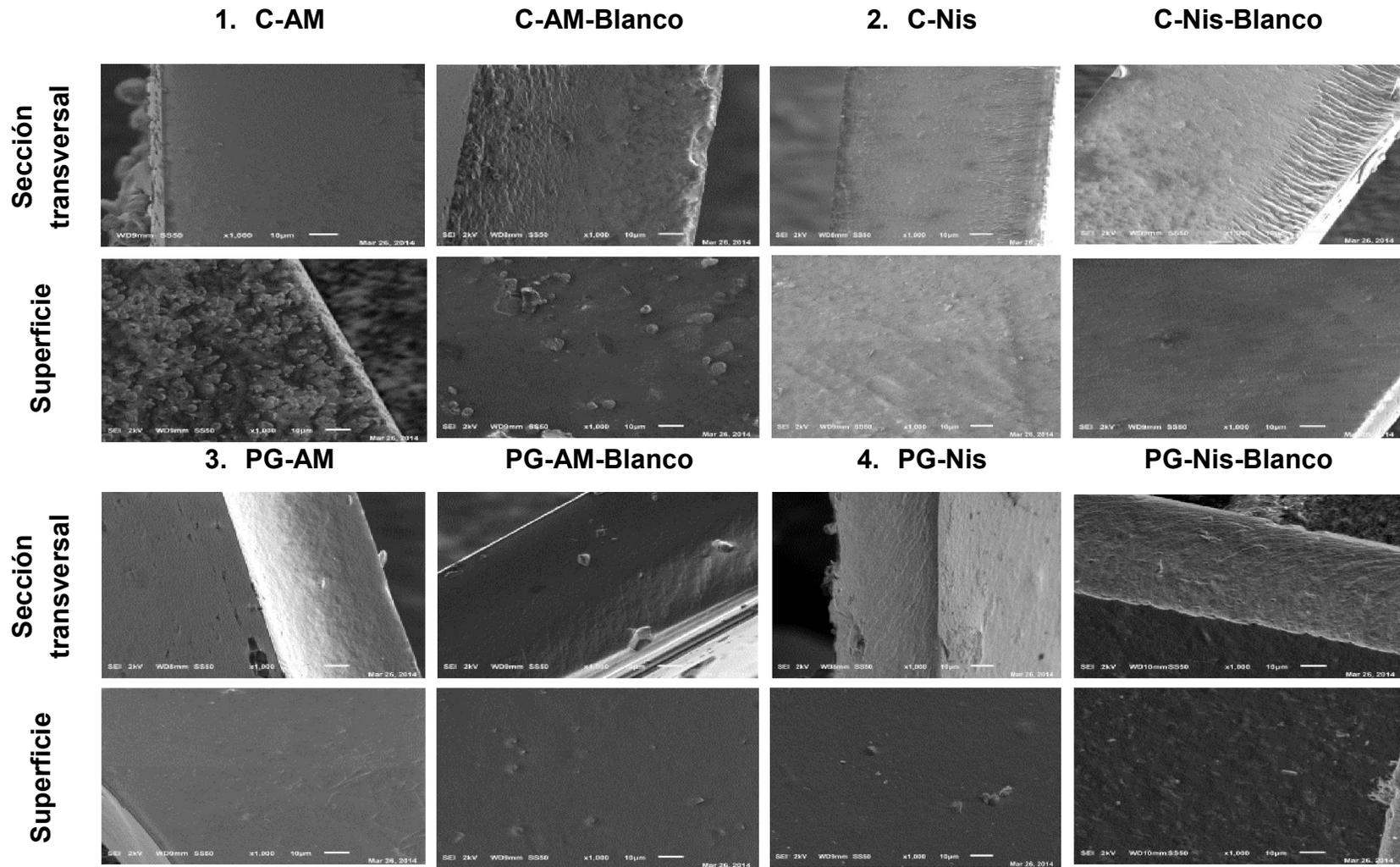


Figura 20.- Micrográficas (sección transversal y superficie) a escala de grises 2 kV, en resolución de 1000x de los diferentes tratamientos de películas evaluadas y sus respectivos blancos.



Ángel Gpe. Calderón Aguirre

CABA

8. CONCLUSIONES

Con base en los resultados generados en este trabajo se concluye que los compuestos antimicrobianos producidos por *Streptococcus infantarius*, bacteria aislada del pozol, tienen mayor actividad antilisterial que nisina comercial en películas de caseinato, en las concentraciones estudiadas. La actividad antilisterial fue más efectiva a 4 °C y 98% HR (condiciones de refrigeración). En esas condiciones la fase de latencia del crecimiento microbiano se extendió hasta 38 días y después de ese tiempo el 90% de la población de listeria fue inhibida hasta el término de la evaluación (61 días).

En las películas pectina-gelana se detectó un efecto sinérgico entre pectina y ambos antimicrobianos (AM y Nis). Se comprobó que pectina presenta actividad antilisterial en las concentraciones usadas en las películas y la combinación pectina-gelana-antimicrobiano inhibió totalmente el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, tanto a 35 °C como a 4°C.

En condiciones de refrigeración, las películas PG-AM fueron eficaces para inhibir completamente *L. monocytogenes* durante periodos prolongados de almacenamiento. Por lo tanto, estas películas representan una opción viable para prolongar la conservación de alimentos susceptibles a *Listeria monocytogenes*.

La incorporación de compuestos antimicrobianos (AM o Nis) no generó diferencias significativas en las propiedades mecánicas y de barrera (PVA, PO₂) de las películas. AM actuó como plastificante adicional, generando películas menos rígidas, con mayor capacidad de deformarse sin fractura (comportamiento plástico) y más solubles en agua. Las películas PG fueron menos permeables tanto al agua como al oxígeno, que las películas de caseinato, lo cual se puede atribuirse a diferencias en la organización micro-estructural de la matriz polimérica.

La visualización de la microestructura de las películas con SEM confirmó estructuras compactas, homogéneas, indicativo de compatibilidad entre los componentes de la película.



Ángel Gpe. Calderón Aguirre

CABA

9. **IMPLICACIONES**

En investigaciones futuras sobre el tema se sugiere:

- Usar Microscopía Confocal para estudiar la organización microestructural de las películas evaluadas en este trabajo. Esta técnica permitiría estudiar secciones ópticas a lo largo de la sección transversal y generar imágenes tridimensionales de la morfología de la muestra, generando conclusiones más robustas acerca de las diferencias microestructurales entre películas PG y C que dan lugar a diferencias en las propiedades de barrera y mecánicas.
- Prolongar la prueba de actividad antimicrobiana en películas PG con sustancias antimicrobianas a 35 °C, estableciendo técnicas que permitan mantener una humedad relativa superior a la evaluada en este estudio (32%) y evitar de esta forma la deshidratación del medio de cultivo (agar Oxford), que fue la limitante para un monitoreo prolongado en esta prueba.
- Evaluar el comportamiento antimicrobiano de las películas estudiadas en alimentos inoculados con *Listeria monocytogenes* y otros microorganismos indicadores de importancia en la industria de los alimentos.
- Producir y evaluar matrices (PG y C), inoculadas con concentraciones más bajas de AM, es decir con la concentración mínima inhibitoria reportada para este compuesto en otros estudios realizados dentro del Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria (CABA).
- Estudiar el comportamiento antimicrobiano de pectinas, para establecer el posible modo de acción de estos polímeros contra microorganismos patógenos. Por ejemplo: a) producir mediante hidrólisis enzimática oligosacáridos de pectina y adicionarlos a películas de pectina, para de esta forma evaluar su actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos o deterioradores de alimentos, así como sus toxinas (ejemplo toxina Shiga producida por *Escherichia coli*), b) producir derivados catiónicos de pectina mediante la utilización de sustancias químicas y llevar a cabo su caracterización en cuanto a actividad antimicrobiana.



Ángel Gpe. Calderón Aguirre

CABA

10. *R*EFERENCIAS BIBLIOGRAFICA

- Aguilar-Mendez, M. A. (2005). *Propiedades físicas y mecánicas de películas biodegradables y su empleo en el recubrimiento de frutos de aguacate*. Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional, México D.F.
- Aguirre-Loredo, R. Y. (2011). *Efecto del ácido oleico sobre las propiedades de transferencia de masa de películas biodegradables de Quitosano*. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Reynosa, Tamaulipas, México.
- Aguirre-Loredo, R. Y., Rodríguez-Hernández, A.I., & Chavarría-Hernández, N. (2014). Physical properties of emulsified films based on chitosan and oleic acid. *CyTA - Journal of Food*, 12 (4), 305-312; doi: 10.1080/19476337.2013.853207.
- Aguirre, A., Borneo, R., & León, A. E. (2013). Antimicrobial, mechanical and barrier properties of triticale protein films incorporated with oregano essential oil. *Food Bioscience*, 1, 2-9. doi: 10.1016/j.fbio.2012.12.001.
- Aliabadi-Shojaee, S., Hosseini, H., Mohammadifar, A., Mohammadi, A., Ghasemlou, M., Hosseini, M. S., & Khaksar, R. (2014). Characterization of κ-carrageenan films incorporated plant essential oils with improved antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers*, 101, 582-591.
- Aloui, H., Khwaldia, K., Ben Slama, M., & Hamdi, M. (2011). Effect of glycerol and coating weight on functional properties of biopolymer-coated paper. *Carbohydrate Polymers*, 86, 1063-1072.
- Appendini, P., & Hotchkiss, J. H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3(2), 113-126. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1466-8564\(02\)00012-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1466-8564(02)00012-7).
- Arfat, Y. A., Benjakul, S., Prodpran, T., Sumpavapol, P., & Songtipya, P. (2014). Properties and antimicrobial activity of fish protein isolate/fish skin gelatin film containing basil leaf essential oil and zinc oxide nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 41, 265-273. doi: 10.1016/j.foodhyd.2014.04.023.
- Arredondo-Ochoa, T. (2012). *Diseño de empaques comestibles activos a base de almidón modificado para su posible aplicación en alimentos en fresco*. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, Qro. México.
- Arrieta, M. P., Peltzer, M. A., Garrigós, M. D. C., & Jiménez, A. (2013). Structure and mechanical properties of sodium and calcium caseinate edible active films with carvacrol. *Journal of Food Engineering*, 114(4), 486-494. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2012.09.002.
- Arrieta, P. M., Peltzer, A. M., López, J., Garrigós, M. d. C., Valente, A. J. M., & Jiménez, A. (2014). Functional properties of sodium and calcium caseinate antimicrobial active films containing carvacrol. *Journal of Food Engineering*, 121, 94-101.
- Arvanitoyannis, I., Psomiadou, E., & Nakayama, A. (1996). Edible films made from sodium caseinate, starches, sugars or glycerol. Part 1 *Carbohydrate Polymers*, 31, 179-192.
- ASTM (1998). Standard test method for determining gas permeability characteristics of plastic film and sheeting. D1434-82. Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia, PA: *American Society for Testing and Materials*.

- ASTM (2000). Standard methods for water vapor transmission of material. E96-00. Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia, PA: *American Society for Testing and Materials*.
- ASTM (2010). Standard Test Method for Tensile Properties of thin plastic sheeting, D882-10. Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia, PA: *American Society for Testing and Materials*.
- Atarés, L., Bonilla, J., & Chiralt, A. (2010). Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*, 100(4), 678-687, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2010.05.018.
- Audic, J.-L., Chaufer, B., & Daufin, G. (2003). Non-food applications of milk components and dairy co-products: A review. *Le Lait*, 83(6), 417-438. doi: 10.1051/lait:2003027.
- Ayranci, E., & Tunc, S. (2003). A method for the measurement of the oxygen permeability and the development of edible films to reduce the rate of oxidative reactions in fresh foods. *Food Chemistry*, 80, 423-431.
- Balciunas, E. M., Castillo, M. F. A., Todorov, S. D., Franco, B. D. G. D. M., Converti, A., & Oliveira, R. P. D. S. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 32(1), 134-142, doi: 10.1016/j.foodcont.2012.11.025.
- Baldwin, E. A., & Hagenmaier, R. D. (2012). Introducción. En "Edible coatings and films to improve food quality", E. A. Baldwin, R. D. Hagenmaier & J. Bai (Eds.), CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton. Florida, Estados Unidos de América. pp. 1-9.
- Bayarri, M., Oulahal, N., Degraeve, P., & Gharsallaoui, A. (2014). Properties of lysozyme low methoxyl (LM) pectin complexes for antimicrobial edible food packaging. *Journal of Food Engineering*, 131, 18-25.
- Begonya, M., Aymerich, T., Monfort, J. M., & Garriga, M. (2007). Use of antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during storage of cooked ham. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 152-158.
- Bello-Gutiérrez, J. (2000). Ciencia bromatológica principios generales de los alimentos. Ediciones Díaz de Santos, 596 p.
- Bierhalz, A., Cristiane. Krause, da Silva, M. A., & Kieckbusch, T. G. (2012). Natamycin release from alginate/pectin films for food packaging applications. *Journal of Food Engineering*, 110(1), 18-25. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2011.12.016
- Bird, R. B., Stewart, W. E., & Lightfoot, E. N. (1987). Fenómenos de Transporte, Editorial Reverté. México, D.F. México, pp 17-4 a 17-8.
- Bonilla, J., Fortunati, E., Atarés, L., Chiralt, A., & Kenny, J. M. (2014). Physical, structural and antimicrobial properties of poly vinyl alcohol-chitosan biodegradable films. *Food Hydrocolloids*, 35, 463-470. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.07.002.
- Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 15(3), 1-12.

- Broumand, A., Emam, D. Z., Hamed, M., & Hadi, R. S. (2011). Antimicrobial, water vapour permeability, mechanical and thermal properties of casein based Zataria multiflora Boiss. Extract containing film. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 2316-2323.
- Cagri, A., Ustunol, Z., & Ryser, E. T. (2001). Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier Properties of low pH whey protein-based edible films containing p-aminobenzoic or sorbic acids. *Journal of Food Science*, 66(6), 865-870.
- Cagri, A., Ustunol, Z., & T., R. E. (2004). Antimicrobial Edible Films and Coatings. *Journal of Food Protection*, 67(4), 833-848.
- Calo-Mata, P., Arlindo, S., Boehme, K., de Miguel, T., Pascoal, A., & Barros-Velazquez, J. (2007). Current Applications and Future Trends of Lactic Acid Bacteria and their Bacteriocins for the Biopreservation of Aquatic Food Products. *Food and Bioprocess Technology*, 1(1), 43-63. doi: 10.1007/s11947-007-0021-2.
- Campos, A. C., Gerschenson, N. L., & Flores, K. S. (2010). Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 849-875. doi: 10.1007/s11947-010-0434-1.
- Cao-Hoang, L., Chaîne, A., Gregoire, L., & Wache, Y. (2010). Potential of nisin-incorporated sodium caseinate films to control *Listeria* in artificially contaminated cheese. *Food Microbiology*, 27(7), 940-944, doi: 10.1016/j.fm.2010.05.025.
- Castañeda, R. C., de la Fuente, S. N. M., Pacheco, C. R. D., Ortiz, R. T., & Barboza, C. J. E. (2011). Potencial de los quitosano-oligosacáridos generados de quitina y quitosano. *Acta Universitaria, Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado*, 21(3), 14-23.
- Cé, N., Noreña, C. P. Z., & Brandelli, A. (2012). Antimicrobial activity of chitosan films containing nisin, peptide P34, and natamycin. *CyTA - Journal of Food*, 10(1), 21-26. doi: 10.1080/19476337.2010.537371.
- Cissé, M., Kouakou, C. A., Montet, D., Loiseau, G., & Ducamp, C. M. N. (2013). Antimicrobial and physical properties of edible chitosan films enhanced by lactoperoxidase system. *Food Hydrocolloids*, 30(2), 576-580, doi: 10.1016/j.foodhyd.2012.07.018.
- Cooksey, K. (2001). Antimicrobial food packaging materials *Additives for Polymers*, 8, 6-10.
- Cosentino, S., Fadda, M., Elisabetta., Deplano, M., Melis, R., Pomata, R., & Pisano, M. B. (2012). Antilisterial activity of nisin-like bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from traditional Sardinian dairy products. *Journal Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 1-8. doi: 10.1155/2012/376428.
- Cotter, D., Paul., Ross, R. P., & Hill, C. (2012). Bacteriocins a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, 11(2), 95-105. doi: 10.1038/nrmicro2937.
- Cha, D. S., Cooksey, K., Chinnan, M. S., & Park, H. J. (2003). Release of nisin from various heat-pressed and cast films. *LWT - Food Science and Technology*, 36(2), 209-213. doi: 10.1016/s0023-6438(02)00209-8

- da Silva Malheiros, P., Serafini, M., Y. M., da Silveira, N. P., & Brandelli, A. (2010). Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin. *Food Research International*, 43(4), 1198-1203. doi: 10.1016/j.foodres.2010.02.015.
- Dangaran, K., Tomasula, P. M., & Qi, P. (2009). Structure and function of protein-based edible films and coatings. En "Edible films and coatings for food applications", M. E. Embuscado & K. C. Huber (Eds.), Springer, Estados Unidos de América; pp. 25-56. doi: 10.1007/978-0-387-92824-1_2.
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J. A., & Voilley, A. (1998). Edible films and coatings: tomorrow's packagings: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(4), 299-313. doi: 10.1080/10408699891274219.
- Debeaufort, F., & Voilley, A. (2009). Lipid-based edible films and coatings. En "Edible films and coatings for food applications", M. E. Embuscado & K. C. Huber (Eds.), Springer, Estados Unidos de América; pp. 135-168. doi: 10.1007/978-0-387-92824-1_5.
- Deegan, H. L., Cotter, D., P., Hill, C., & Ross, P. (2006). Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16, 150-1071.
- Drago, H., Marín, G. H., Sturla, F., Roque, G., Mártire, K., Díaz-Aquino, V., Lamonega, R., Gardiner, C., Ichim, T., Riordan, N., Raimondi, J.C., Bossi, S., Samadikuchaksararei, A., van Leeuwen, M., Tau, J.M., Núñez, L., Larse, G., Spretz, R., Mansilla, E. (2010). The Next generation of burns treatment: Intelligent films and matrix, controlled enzymatic debridement, and adult Stem cells. *Transplantation Proceedings*, 42 (1), 345–349.
- Du, W. X., Olsen, C. W., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H., Levin, C. E., & Friedman, M. (2009). Effects of allspice, cinnamon, and clove bud essential oils in edible apple films on physical properties and antimicrobial activities. *Journal of Food Science: Food Microbiology and Safety*, 74(7), 372-378. doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01282.x
- Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, J. (2009). Review. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114(4), 1173-1182. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.11.047
- Escalante, A., Wachter, C., & Farré, A. (2001). Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 21-31.
- Espinel, V. A. R., Flores, K. S., & Gerschenson, N. L. (2014). Biopolymeric antimicrobial films: Study of the influence of the hydroxypropyl methylcellulose, tapioca starch and glycerol contents on physical properties. *Materials Science & Engineering C*, 36, 108-117.
- Fabra, M. J., Hambleton, A., Talens, P., Debeaufort, F., & Chiralt, A. (2011). Effect of ferulic acid and α -tocopherol antioxidants on properties of sodium caseinate edible films. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1441-1447. doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.01.012
- Favaro, L., Basaglia, M., Casella, S., Hue, I., Doussent, X., Gombossy, D. M. F. B. D., & Todorov, D. S. (2014). Bacteriocinogenic potential and safety

- evaluation of non-starter *Enterococcus faecium* strains isolated from home made white brine cheese. *Food Microbiology*, 38, 228-239.
- Fernández, P. I., & Maté, C. J. I. (2011). Películas y recubrimientos comestibles como herramienta emergente para la industria alimentaria. En "La Innovación Tecnológica en la industria alimentaria", Universidad de Burgos, España, 27-50. ISBN: 978-84-92681-44-0.
- Gadang, V. P., Hettiarachchy, N. S., Johnson, M. G., & Owens, C. (2008). Evaluation of antibacterial activity of whey protein isolate coating incorporated with nisin, grape seed extract, malic acid, and EDTA on a turkey frankfurter system. *JFS Food Microbiology and Safety*, 73(8), 389-394. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00899.x
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, L. R., & Nabil, B. O. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 51-70.
- Gandhi, M., & Chikindas, M. L. (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. [Review]. *International Journal of Food Microbiology*, 113(1), 1-15. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.008.
- Gao, Y., Li, D., & Liu, X. (2014). Bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* C2 as starter culture in fermented sausages. *Food Control*, 35, 1-6.
- Garcia, A. M., Pinotti, A., Martino, N. M., & Zaritzky, E. N. (2004). Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydrate Polymers*, 56(3), 339-345. doi: 10.1016/j.carbpol.2004.03.003
- García, P., Rodríguez, L., Rodríguez, A., & Martínez, B. (2010). Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science & Technology*, 21(8), 373-382. doi: 10.1016/j.tifs.2010.04.010.
- Gennadios, A., Hanna, M. A., & Kurth, L. B. (1997). Application of Edible Coatings on Meats, Poultry and Seafoods: A Review. *Lebensm Wiss u Technology*, 30, 337-350.
- Gennadios, P. D. A. (2002). Protein-based films and coatings. CRC Press. Boca Ratón, Florida, Estados Unidos de América, ISBN 1-58716-107-9.
- Ghanbari, M., & Jami, M. (2013). Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: A Promising Approach to Seafood Biopreservation. En "Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes", Marcelino Kongo (Ed.), ISBN 978-953-51-0955-6, INTECH-Open Science. 381-404, doi: 10.5772/50705.
- Ghanbarzadeh, B., & Almasi, H. (2011). Physical properties of edible emulsified films based on carboxymethyl cellulose and oleic acid. *International Journal Biological Macromolecules*, 48(1), 44-49. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2010.09.014
- Gialamas, H., Zinoviadou, G. K., Biliaderis, G. C., & Koutsoumanis, P. K. (2010). Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-caseinate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. *Food Research International*, 43(10), 2402-2408. doi: 10.1016/j.foodres.2010.09.020.

- Giménez, B., Gómez-Guillén, M.C., López-Caballero, M.E., Gómez-Estaca, J., & Montero, P. (2012). Role of sepiolite in the release of active compounds from gelatine-egg white films. *Food Hydrocolloids*, 27, 475-486. doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.09.003.
- Gniewosz, M., Synowiec, A., Kraśniewska, K., Przybył, J. L., Bączek, K., & Węglarz, Z. (2014). The antimicrobial activity of pullulan film incorporated with meadowsweet flower extracts (*Filipendulae ulmariae flos*) on postharvest quality of apples. *Food Control*, 37, 351-361. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.09.049
- Gopi, D., Kanimozhi, K., Bhuvaneshwari, N., Indira, J., & Kavitha, L. (2014). Novel banana peel pectin mediated green route for the synthesis of hydroxyapatite nanoparticles and their spectral characterization. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 118, 589-597. doi: 10.1016/j.saa.2013.09.034
- Gorrasi, G., Bugatti, V., & Vittoria, V. (2012). Pectins filled with LDH-antimicrobial molecules: Preparation, characterization and physical properties. *Carbohydrate Polymers*, 89, 132-137.
- Greener, D. I., & Fennema, O. (1994). Edible film and coatings: characteristics, formation, definitions, and testing methods. En "Edible coatings and films to improve food quality", J. M. Krochta, E. A. Baldwin & N. M. Carriedo (Eds.), (CRC PRESS, Estados Unidos de América, pp. 5-17).
- Guiga, W., Galland, S., Peyrol, E., Degraeve, P., Carnet-Pantiez, A., & Sebti, I. (2009). Antimicrobial plastic film: Physico-chemical characterization and nisin desorption modeling. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2), 203-207. doi: 10.1016/j.ifset.2008.09.006.
- Guiga, W., Swesi, Y., Galland, S., Peyrol, E., Degraeve, P., & Sebti, I. (2010). Innovative multilayer antimicrobial films made with Nisaplin® or nisin and cellulosic ethers: Physico-chemical characterization, bioactivity and nisin desorption kinetics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(2), 352-360. doi: 10.1016/j.ifset.2010.01.008.
- Guo, M., Jin, T. Z., Wang, L., Scullen, O. J., & Sommers, C. H. (2014). Antimicrobial films and coatings for inactivation of *Listeria innocua* on ready-to-eat deli turkey meat. *Food Control*, 40, 64-70. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.11.018.
- Herman, C., & Oscar, G. A. (2006). Efecto de la temperatura de esterilización de la nisina en su actividad sobre *Lactobacillus fructivorans*. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, 2006, 1-3.
- Holley, R. A., & Dhaval, P. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22(4), 273-292. doi: 10.1016/j.fm.2004.08.006.
- Ibarguren, C., Leticia, V., Alejandra Bertuzzi, M., Apella, M. C., & Carina Audisio, M. (2010). Edible films with anti-*Listeria monocytogenes* activity. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(7), 1443-1449. doi: 10.1111/j.1365-2621.2010.02286.x.
- Iseppi, R., Pilati, F., Marini, M., Toselli, M., de Niederhausern, S., Guerrieri, E., Messi, P., Sabia, C., Manicardi G., Anacarso, I. & Bondi, M. (2008). Anti-

- listerial activity of a polymeric film coated with hybrid coatings doped with Enterocin 416K1 for use as bioactive food packaging. *International Journal Food Microbiology*, 123(3), 281-287. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.015.
- Jiménez, A., Sánchez, G. L., Desobry, S., Chiralt, A., & Arab, T. E. (2014). Influence of nanoliposomes incorporation on properties of film forming dispersions and films based on corn starch and sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 35, 159-169.
- Jin, T., LinShu, L., Howard, Z., & Kevin, H. (2009). Antimicrobial activity of nisin incorporated in pectin and polylactic acid composite films against *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(2), 322-329. doi: 10.1111/j.1365-2621.2008.01719.x
- Jindal, M., Kumar, V., Rana, V., & Tiwary, A. K. (2013). *Aegle marmelos* fruit pectin for food and pharmaceuticals: Physico-chemical, rheological and functional performance. *Carbohydrate Polymers*, 93(2), 386-394. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.12.012.
- Joshi, S., & Petereit, H. U. (2013). Film coatings for taste masking and moisture protection. *International Journal of Pharmaceutics*, 457, 395-406.
- Jouki, M., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., & Koocheki, A. (2014). Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. *Food Hydrocolloids*, 36, 9-19. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.08.030.
- Kanmani, P., & Whan, R., Jong. (2014). Physical, mechanical and antimicrobial properties of gelatin based active nanocomposite films containing AgNps and nanoclay. *Food Hydrocolloids*, 35, 644-652.
- Khwaldia, K., Perez, C., Banon, S., Desobry, S., & Hardy, J. (2004). Milk proteins for edible films and coatings. [Review]. *Critical Reviews Food Science Nutrition*, 44(4), 239-251. doi: 10.1080/10408690490464906.
- Kirchmajer, D. M., Steinhoff, B., Warren, H., Clark, R., & in het Panhuis, M. (2014). Enhanced gelation properties of purified gellan gum. *Carbohydrate Research*, 388, 125-129. doi: 10.1016/j.carres.2014.02.018
- Ko, S., M. E, J., N. S, H., & M. G, J. (2001). Physical and Chemical Properties of edible Films Containing Nisin and their Action Against *Listeria Monocytogenes* *JFS: Food Microbiology and Safety*, 66, 1006-1011.
- Koelsch, C. (1994). Edible water vapor barriers: properties and promise- A Review. *Trends in Food Science & Technology*, 51, 76-81.
- Kristo, E., Koutsoumanis, K. P., & Biliaderis, C. G. (2008). Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids*, 22(3), 373-386. doi: 10.1016/j.foodhyd.2006.12.003
- Krochta, J. M. (2002). Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status, and opportunities. En "Protein-based films and coatings" A. Gennadios (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, Estados Unidos de América. ISBN: 978-1-58716-107-0, pp. 1-32.

- Lagarón, J. M., Ocio, J. M., & López, R. A. (2012). Antimicrobial packaging polymers. En "Antimicrobial polymers", J. M. Lagarón, J. M. Ocio & R. A. López (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., Canada, pp 1-22.
- Lee, H., & Sea., C. M. (2014). Development of antimicrobial defatted soybean meal-based edible films incorporating the lactoperoxidase system by heat pressing. *Journal of Food Engineering*, 120, 183-190.
- Lee, H. B., & Min., S. C. (2013). Antimicrobial edible defatted soybean meal-based films incorporating the lactoperoxidase system. *LWT - Food Science and Technology*, 54(1), 42-50. doi: 10.1016/j.lwt.2013.05.012
- Lee, H. B., Noh, B. S., & Min, S. C. (2012). *Listeria monocytogenes* inhibition by defatted mustard meal-based edible films. *International Journal of Food Microbiology*, 153(1-2), 99-105. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.022
- Lee, Y. K., Shim, J., & Gyu, L. H. (2004). Mechanical properties of gellan and gelatin composite films. *Carbohydrate Polymers*, 56, 251-254. doi: 10.1016/j.carbpol.2003.04.001
- Leroux, J., Langendorft, V., Schick, G., Vaishnav, V., & Mazoyer, J. (2003). Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocolloids*, 17, 455-462. doi: 10.1016/S0268-005X(03)00027-4
- Li, B., Kennedy, J. F., Peng, J. L., Yie, X., & Xie, B. J. (2006). Preparation and performance evaluation of glucomannan–chitosan–nisin ternary antimicrobial blend film. *Carbohydrate Polymers*, 65(4), 488-494. doi: 10.1016/j.carbpol.2006.02.006
- Lin, D., & Zhao, Y. (2007). Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6, 60-75.
- López-López, A., & Jiménez-Vera, R. (2008). Bioconservación de carne molida de res y cerdo. *Revista de la Facultad de Ingeniería Química*, 47.
- López-Ortega, M. A. (2011). *Propiedades mecánicas y de transferencia de masa de películas comestibles elaboradas con polisacáridos pécticos de xoconostle (Opuntia sp.), gelana y cera de candelilla*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Tulancingo de Bravo, Hidalgo. México.
- López-Ortega, M. A. (2014). *Producción de sustancias con actividad antimicrobiana de uso potencial en la industria de alimentos, mediante el cultivo de bacterias ácido lácticas usando medios de cultivo alternativos*. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo de Bravo, Hidalgo. México.
- Mangalassary, S. (2012). Antimicrobial Food Packaging to Enhance Food Safety: Current Developments and Future Challenges. *Journal of Food Processing & Technology*, 3(05), 2-3. doi: 10.4172/2157-7110.1000e103
- Martin-Belloso, O., Rojas, G. M. A., & Robert., S.-F. (2009). Delivery of flavor and active ingredients using edible films and coatings. En "Edible films and coatings for food applications", M. E. Embuscado & K. C. Huber (Eds.), Springer, Estados Unidos de América; pp. 295-313, USA. doi: 10.1007/978-0-387-92824-1_10

- Mauriello, G. (2008). *Desarrollo y aplicación de empaques antimicrobianos para alimentos*. Tesis de Doctorado, Universidad Degli Studi Di Napoli Federico II, Italia.
- Mauriello, G., De Luca, E., La Stora, A., Villani, F., & Ercolini, D. (2005). Antimicrobial activity of a nisin-activated plastic film for food packaging. *Letters Applied Microbiology*, 41(6), 464-469. doi: 10.1111/j.1472-765X.2005.01796.x
- Mendes de Souza, P., Fernandez, A., López, C. G., Gavara, R., & Hernández-Muñoz, P. (2010). Modified sodium caseinate films as releasing carriers of lysozyme. *Food Hydrocolloids*, 24, 300-306. doi: 10.1016/j.foodhyd.2009.10.005
- Mendoza-Mendoza, B. (2012). *Caracterización de recubrimientos a base de caseinato de sodio, con la inclusión de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas aisladas de pozol*. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Hidalgo, Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México.
- Millette, M., Le Tien, C., Smoragiewicz, W., & Lacroix, M. (2007). Inhibition of *Staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modified alginate films and beads. *Food Control*, 18(7), 878-884. doi: 10.1016/j.foodcont.2006.05.003.
- Murray, J. F. C., Limited, H., & Reigate. (2000). Cellulose. En "Handbook of hydrocolloids", G. O. Phillips & P. A. Williams (Ed.), CRC Press, Cambridge, Inglaterra, pp. 219-245.
- Nieto, M. B. (2009). Structure and function of polysaccharide gum-based edible films and coatings. En "Edible films and coatings for food applications", M. E. Embuscado & K. C. Huber (Eds.), Springer, Estados Unidos de América; pp. 57-112. doi: 10.1007/978-0-387-92824-1_3
- Núñez, M., Tomillo, P., & Medina, M. (1996). Bacteriocin quantification by the critical dilution method: a comparison of arbitrary units with diameter and area of the zone of growth inhibition, *Milchwissenschaft*, 51 (1).
- Olano, M. E., Williams, R. M., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2003). Pectins and pectic-oligosaccharides inhibit *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin as directed towards the human colonic cell line HT29. *FEMS Microbiology Letters*, 218, 101-105.
- Olivas, G. I. I., & Barbosa, C. G. (2009). Edible Films and Coatings for Fruits and Vegetables. En "Edible films and coatings for food applications", M. E. Embuscado & K. C. Huber (Eds.), Springer, Estados Unidos de América; pp. 211-244). doi: 10.1007/978-0-387-92824-1_7
- Osmalek, T., Froelich, A., & Tasarek, S. (2014). Application of gellan gum in pharmacy and medicine. *International Journal of Pharmaceutics*, 466(1-2), 328-340. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.03.038
- Papagianni, M. (2003). Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnology Advances*, 21(6), 465-499. doi: 10.1016/S0734-9750(03)00077-6.
- Pavlath, A. E., & Orts, W. (2009). Edible Films and Coatings: Why, What, and How? En "Edible films and coatings for food applications", M. E. Embuscado

- & K. C. Huber (Eds.), Springer, Estados Unidos de América; pp. 1-23. doi: 10.1007/978-0-387-92824-1_1.
- Perdones, Á., Vargas, M., Atarés, L., & Chiralt, A. (2014). Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan-cinnamon leaf oil films as affected by oleic acid. *Food Hydrocolloids*, 36, 256-264. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.10.003.
- Pérez-Campos, S. J., Chavarría-Hernández, N., Tecante, A., Ramírez-Gilly, M., & Rodríguez-Hernández, A. I. (2012). Gelation and microstructure of dilute gellan solutions with calcium ions. *Food Hydrocolloids*, 28(2), 291-300. doi: 10.1016/j.foodhyd.2012.01.008.
- Pérez-Espitia, P. J., Ferreira, S., N de F., Teofilo, R. F., dos Reis Coimbra, J. S., Vitor, M. D., Andrade Batista, R., Olavo Ferreira, S., de Andrade, N.J. & Alves Medeiros, E. A. (2013). Physical-mechanical and antimicrobial properties of nanocomposite films with pediocin and ZnO nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 94(1), 199-208. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.01.003.
- Pérez-Espitia, P. J., Wen-Xian, D., Avena-Bustillos, R. d. J., Ferreira, S., Nilda de Fatima., & McHugh, T., H. (2014). Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties - A review. *Food Hydrocolloids*, 35, 1-10. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.06.005.
- Pintado, M., B, S, C., Ferreira, A., S, S, M., & Sousa, I. (2009). Properties of whey protein-based films containing organic acids and nisin to control *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 72(9), 1891-1896.
- Ponce-Alquicira, E. (2008). *Evaluación de propiedades fisicoquímicas y antimicrobianas de películas comestibles adicionadas con nisina y/o glucosa oxidasa*. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F. México.
- Quintavalla, S., & Loredana, V. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*, 62, 373-380.
- Quintero, S. B. (2006). *Incorporación de la pediocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK133 en películas y recubrimientos comestibles*. Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, México, D.F. México.
- Rakotonirainy, A. M., & Pauda, W. G. (2001). Effects of lamination and coating with drying oils on tensile and barrier properties of zein films. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 49, 2860-2863.
- Ramos, Ó. L., Santos, A. C., Leão, M. V., Pereira, J. O., Silva, S. I., Fernandes, J. C., Franco, M.I., Pintado, M.E. & Malcata, F. X. (2012). Antimicrobial activity of edible coatings prepared from whey protein isolate and formulated with various antimicrobial agents. *International Dairy Journal*, 25(2), 132-141. doi: 10.1016/j.idairyj.2012.02.008
- Rocha, M. D., Loiko, M. R., Tondo, E. C., & Prentice, C. (2014). Physical, mechanical and antimicrobial properties of Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) protein films incorporated with organic acids. *Food Hydrocolloids*, 37, 213-220. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.10.017

- Rodríguez-Hernández, A. I., Durand, S., Garnier, C., Tecante, A., & Doublier, J. L. (2006). Rheology-structure properties of waxy maize starch-gellan mixtures. *Food Hydrocolloids*, 20(8), 1223-1230. doi: 10.1016/j.foodhyd.2006.01.007
- Rodríguez-Hernández, A. I., Durand, S., Garnier, C., Tecante, A., & Doublier, J. L. (2003). Rheology-structure properties of gellan systems: evidence of network formation at low gellan concentrations. *Food Hydrocolloids*, 17(5), 621-628. doi: 10.1016/s0268-005x(02)00123-6
- Ruiz, L. F., Rojo, B. B., Saenz, Y., Navarro, L., Diez, L., Zaragoza, M., & Torres, C. (2006). Bacteriocinas para la estabilización microbiológica y reducción de la dosis de SO₂. *Departamento de Agricultura y Alimentación. Facultad de Ciencias Universidad de la Roja*, 1-13.
- Sánchez-Reyes, W. Y. (2014). *Producción de sustancias con actividad antimicrobiana de uso potencial en la industria alimentaria, mediante el cultivo de la bacteria ácido láctica, Streptococcus infantarius, en medios complejos que contienen melazas* Tesis de Maestría, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo de Bravo Hidalgo, México.
- Sánchez, G. L., Quintero, S. J. I., & Chiralt, A. (2014). Antilisterial and physical properties of biopolymer films containing lactic acid bacteria. *Food Control*, 35, 200-206.
- Sanchez, G. M. D., Lopez, R., A., & Lagaron, M. J. (2010). Natural micro and nanobiocomposites with enhanced barrier properties and novel functionalities for food biopackaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, 21(11), 528-536. doi: 10.1016/j.tifs.2010.07.008
- Sanjurjo, K., Flores, S., Gerschenson, L., & Jagus, R. (2006). Study of the performance of nisin supported in edible films. *Food Research International*, 39(6), 749-754. doi: 10.1016/j.foodres.2006.01.016
- Singh, R. P., & Heldman, D. P. (2009). *Introduction to Food Engineering*. Cuarta Edición. Academic Press. Elsevier. San Diego California, Estados Unidos de América, pp. 751-752.
- Sivarooan, T., Hettiarachchy, N. S., & Johnson, M. G. (2008). Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Research International*, 41(8), 781-785. doi: 10.1016/j.foodres.2008.04.007
- Sothornvit, R., & Krochta, J. M. (2000). Plasticizer Effect on Oxygen Permeability of α -Lactoglobulin Films. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 48, 6298-6302.
- Srinivasa, P. C., Ramesh, M. N., & Tharanathan, R. N. (2007). Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 21(7), 1113-1122. doi: 10.1016/j.foodhyd.2006.08.005
- Súarez-Gea, A. M. (1997). *Producción de anticuerpos frente a la nisina A: estrategias de inmunización y desarrollo de inmunoensayos*. Tesis de Doctorado, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Takala, P. N., Vu, K. D., Salmieri, S., Khan, R. A., & Lacroix, M. (2013). Antibacterial effect of biodegradable active packaging on the growth of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in

- fresh broccoli stored at 4 °C. *LWT - Food Science and Technology*, 53(2), 499-506. doi: 10.1016/j.lwt.2013.02.024
- Teixeira-Barbosa, A. A., Silva de Araujo, H. G., Matos, N., P., Carnelossi, G., M. A., & Almeida de Castro, A. (2013). Effects of nisin-incorporated films on the microbiological and physicochemical quality of minimally processed mangoes. *International Journal of Food Microbiology*, 164(2-3), 135-140. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.04.004.
- Terrazas-Hernández, J. A. (2010). *Evaluación de las propiedades mecánicas y de transferencia de masa de recubrimientos comestibles elaborados con polisacáridos pécticos de tuna*. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo de Bravo, Hidalgo. México.
- Voragen, A. G. J., Coenen, G.-J., Verhoef, R. P., & Schols, H. A. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, 20(2), 263-275. doi: 10.1007/s11224-009-9442-z
- Wacher, C., Cañas, A., Bárzana, E., Lappe, P., Ulloa, M., & Owens, D. (2000). Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentations. *Food Microbiology*, 17, 251-256.
- Woraprayote, W., Kingcha, Y., Amonphanpokin, P., Kruenate, J., Zedo, T., Sonomoto, K., & Visessanguan, W. (2013). Anti-listeria activity of poly (lactic acid)/sawdust particle biocomposite film impregnated with pediocin PA-1/AcH and its use in raw slice pork. *International Journal of Food Microbiology*, 167, 229-235.
- Xu, X., Li, B., Kennedy, J. F., Xie, B. J., & Huang, M. (2007). Characterization of konjac glucomannan–gellan gum blend films and their suitability for release of nisin incorporated therein. *Carbohydrate Polymers*, 70(2), 192-197. doi: 10.1016/j.carbpol.2007.03.017
- Yang, L., Paulson, A. T., & Nickerson, M. T. (2010). Mechanical and physical properties of calcium-treated gellan films. *Food Research International*, 43(5), 1439-1443. doi: 10.1016/j.foodres.2010.04.010
- Yen, S. S., Lee, T. S., Soo, T., B., Rahmat, A. R., & Rahman, W. A. W. A. (2014). Control of bacteria growth on ready-to-eat beef loaves by antimicrobial plastic packaging incorporated with garlic oil. *Food Control*, 39, 214-221. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.11.020
- Yuguchi, Y., Urakawa, H., Kitamura, S., Wataoka, I., & Kajiwara, K. (1999). The sol-gel transition of gellan gum aqueous solutions in the presence of various metal salts. *Colloid Polymer Science*, 114, 41-47.
- Zahedi, Y., Ghanbarzadeh, B., & Sedaghat, N. (2010). Physical properties of edible emulsified films based on pistachio globulin protein and fatty acids. *Journal of Food Engineering*, 100(1), 102-108. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2010.03.033
- Zhu, G., Sheng, L., & Tong, Q. (2014). Preparation and characterization of carboxymethyl-gellan and pullulan blend films. *Food Hydrocolloids*, 35, 341-347. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.06.009.
- Ziani, K., Osés, J., Coma, V., & Maté, J. I. (2008). Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. *LWT - Food Science and Technology*, 41(10), 2159-2165. doi: 10.1016/j.lwt.2007.11.023



Ángel Gpe. Calderón Aguirre

CABA

11. *ANEXOS*

ANEXO 1. Permeabilidad al oxígeno (PO_2)

Para la determinación de la permeabilidad al oxígeno de películas plásticas se usó el equipo VAC 2, Labthink® (China) que opera bajo el principio manométrico de acuerdo a las normas ASTM D1434, ISO 2556 y ISO 15105-1. Las películas fueron cortadas en círculos de 9.8 cm de diámetro, posteriormente se fijaron con grasa para alto vacío entre las dos cámaras del equipo (cámara de baja y alta presión, ver Figura 21). Se suministró oxígeno de alta pureza a través de la cámara de alta presión, permitiendo el paso de moléculas de oxígeno, a través de la película, de la cámara de alta presión a la cámara de baja (previamente colocada a presión cercana a 0 Pa). En la cámara de baja presión existe un sensor que permite registrar la presión a lo largo del tiempo, logrando así determinar la velocidad de transmisión del gas a través de la película. La temperatura de las pruebas se controló a 25 °C usando un recirculador de agua. Los siguientes datos fueron importantes para el cálculo de la permeabilidad y se mantuvieron constantes durante la prueba: área de transferencia ($A=38.48 \text{ cm}^2$), presión de la cámara de alta presión (101325 Pa), volumen de la cámara de baja presión (219 cm^3). Al término de la prueba, se dispone de la siguiente información:

Presión inicial en la cámara de baja presión (P_{O_2-Li})

Presión final en la cámara de baja presión (P_{O_2-Lf})

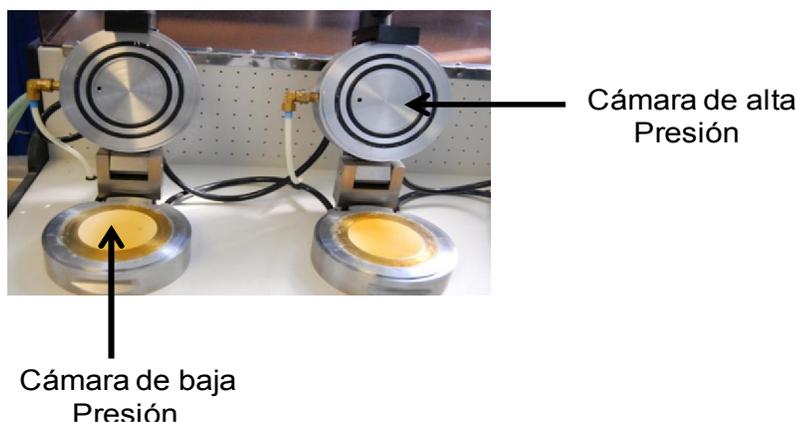


Figura 21.- Cámara de baja y alta presión del equipo VAC-V2 Permeability tester (Labthink®, China).

Los datos colectados del equipo fueron utilizados en los cálculos de difusividad y permeabilidad de oxígeno en la película.

Para el cálculo de permeabilidad se partió de la primera Ley de Fick para la difusión:

$$N_{O_2} = D_{O_2-f} \frac{dc_{O_2}}{dx} \quad (8)$$

Donde:

N_{O_2} = Flux molar de oxígeno (g.molO₂/m²s)

D_{O_2-f} = Difusividad de oxígeno a través de la película (m².s)

$\frac{dc_{O_2}}{dx}$ = Gradiente de concentración molar de oxígeno en la película (g molO₂/m³ m)

Despejando D_{O_2-f} de la Ecuación 8:

$$D_{O_2-f} = \frac{N_{O_2}}{\Delta C_{O_2}} \Delta x \quad (9)$$

Donde

$$\Delta C_{O_2} = C_{O_2-i} - C_{O_2-f} \quad (10)$$

$\Delta x = dx$, es decir el espesor de la película (m).

ΔC_{O_2} = Concentración de oxígeno

C_{O_2-i} = Concentración inicial de oxígeno

C_{O_2-f} = Concentración final de oxígeno

La concentración molar de oxígeno se calcula despejando n (número de moles) de la ecuación de los gases ideales (Ec. 11)

$$PV = nRT$$

$$C_{O_2} = \frac{n}{V} = \frac{P_{O_2}}{RT} \quad (11)$$

Por lo tanto

$$\Delta C_{O_2} = \frac{\Delta P_{O_2}}{RT} \quad (12)$$

Donde:

n = Número de moles de oxígeno (mol)

P_{O_2} = Presión de oxígeno (Pa)

V = Volumen de la cámara de baja presión ($V_c = 219 \text{ cm}^3$)

R = Constante Universal de los gases ideales ($8.31434 \text{ m}^3\text{Pa}/(\text{g mol K})$)

T = Temperatura absoluta a la que se realizó la prueba (298 K)

Sustituyendo la Ec. 12 en Ec. 9:

$$D_{O_2-f} = \frac{N_{O_2}}{\frac{\Delta P_{O_2}}{RT}} \Delta x = \frac{N_{O_2} RT \Delta x}{\Delta P_{O_2}} \quad (13)$$

$$\Delta P_{O_2} = P_{O_2-i} - P_{O_2-f} \quad (14)$$

Donde:

P_{O_2-i} = Presión inicial de oxígeno (Pa)

P_{O_2-f} = Presión final de oxígeno (Pa)

El cálculo de ΔP_{O_2} requiere de la aplicación de una media logarítmica, debido a la intervención de tres presiones en las dos cámaras del equipo (Figura 22).

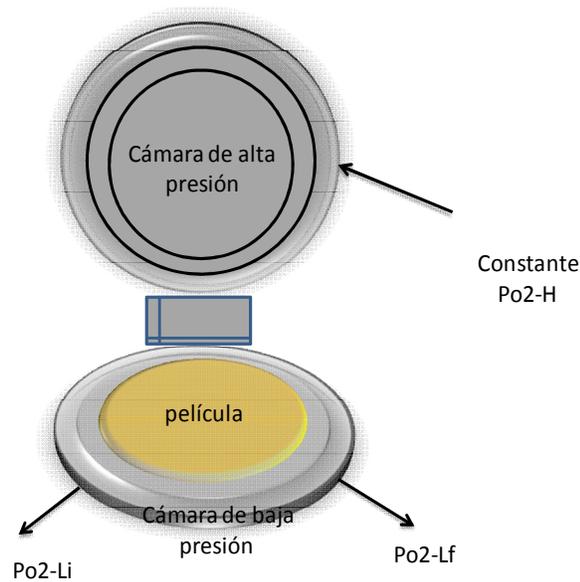


Figura 22.- Esquema de las cámaras del equipo Permeability tester (Labthink®, China). Se indican las diferentes presiones involucradas en la prueba de permeabilidad a gases.

Por lo que la media logarítmica para el cálculo de ΔP_{O_2} es:

$$\Delta P_{O_{2ln}} = \frac{(P_{O_2-H} - P_{O_2-Li}) - (P_{O_2-H} - P_{O_2-Lf})}{\ln \left(\frac{P_{O_2-H} - P_{O_2-Li}}{P_{O_2-H} - P_{O_2-Lf}} \right)} \quad (15)$$

Donde:

$\Delta P_{O_{2ln}}$ = Diferencia de presiones (media logarítmica, Pa)

P_{O_2-H} = Presión de oxígeno en la cámara de alta presión (101325 Pa)

P_{O_2-Li} = Presión de oxígeno en la cámara de baja presión al inicio de la prueba (Pa)

P_{O_2-Lf} = Presión de oxígeno en la cámara de baja presión al final de la prueba (Pa)

Sustituyendo la Ecuación 15 en la Ec. 13:

$$D_{O_2-f} = \frac{N_{O_2}RT\Delta x}{\Delta P_{O_{2ln}}} \quad (16)$$

Donde:

D_{O_2-f} = Difusividad de oxígeno en la película (m^2/s).

El flux de oxígeno a través de la película durante la prueba se obtiene aplicando la siguiente ecuación:

$$N_{O_2} = \frac{n_{O_2}}{(A) (t)} \quad (17)$$

Donde:

N_{O_2} = Número de moles de oxígeno que permearon a través de la película (mol)

A = Área de transferencia de masa (proporcionado por el manual del equipo, 0.003848 m²)

t = tiempo de la prueba, se obtiene del gráfico *P vs t* generado durante la prueba en el equipo (s)

El valor de n_{O_2} se obtiene aplicando la Ley de los gases ideales.

$$n_{O_2} = \frac{(P_{O_2-Lf} - P_{O_2-Li})(Vc)}{RT}$$

Donde:

Vc = Volumen de la cámara de baja presión (0.000219 m³)

Sustituyendo n_{O_2} en la Ec.7.

$$N_{O_2} = \frac{(P_{O_2-Lf} - P_{O_2-Li})(Vc)}{RT(A) (t)} \quad (18)$$

La difusividad en la película se calcula con la Ecuación 16, mientras que la permeabilidad del oxígeno en la película está dada por:

$$P_{O_2-f} = \frac{N_{O_2} \Delta x}{\Delta P_{O_2In}} \quad (19)$$

Donde:

P_{O_2-f} = Permeabilidad de oxígeno a través de la película (gmol m / (Pa s m²))

ANEXO 2: Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

La permeabilidad al vapor de agua se determinó usando el método ASTM E96-00 (ASTM, 2000). Se usaron celdas o copas de aluminio (diámetro igual a 61 mm y una altura de 44 mm) provistas de tapa con sello hermético, las cuales permiten un área de transferencia al vapor de agua de 0.0029 m^2 . La Figura 9, en la sección de materiales y métodos muestra una fotografía de las celdas utilizadas en este trabajo.

Las películas a ensayar fueron ensambladas en las celdas de aluminio, asegurando el sello correcto de las celdas con las películas. Previamente se colocó sílica gel seca ($\approx 0\%$ HR) en las celdas, dejando un espacio libre entre la superficie de la sílica gel y el borde superior de las celdas. Las celdas con las películas se pesaron en una balanza analítica (aeADAM, sensibilidad 0.0001 g) y posteriormente se colocaron en un desecador de gabinete el cual contenía una solución saturada de NaCl (Figura 23). La ganancia de masa de agua de las celdas fue monitoreada cada hora durante 8 h. Se graficaron los valores ganancia en peso de agua contra tiempo de cada celda con la película a evaluar. El tiempo ensayado fue suficiente para obtener el estado estacionario de la velocidad de transmisión de vapor de agua a través de la película. En cada gráfico (ganancia de agua vs tiempo) se determinó la pendiente a través de regresión lineal y la PVA fue calculada como se indica continuación. La Figura 23 y 24 muestra el arreglo experimental y las principales variables usadas en la determinación de PVA.

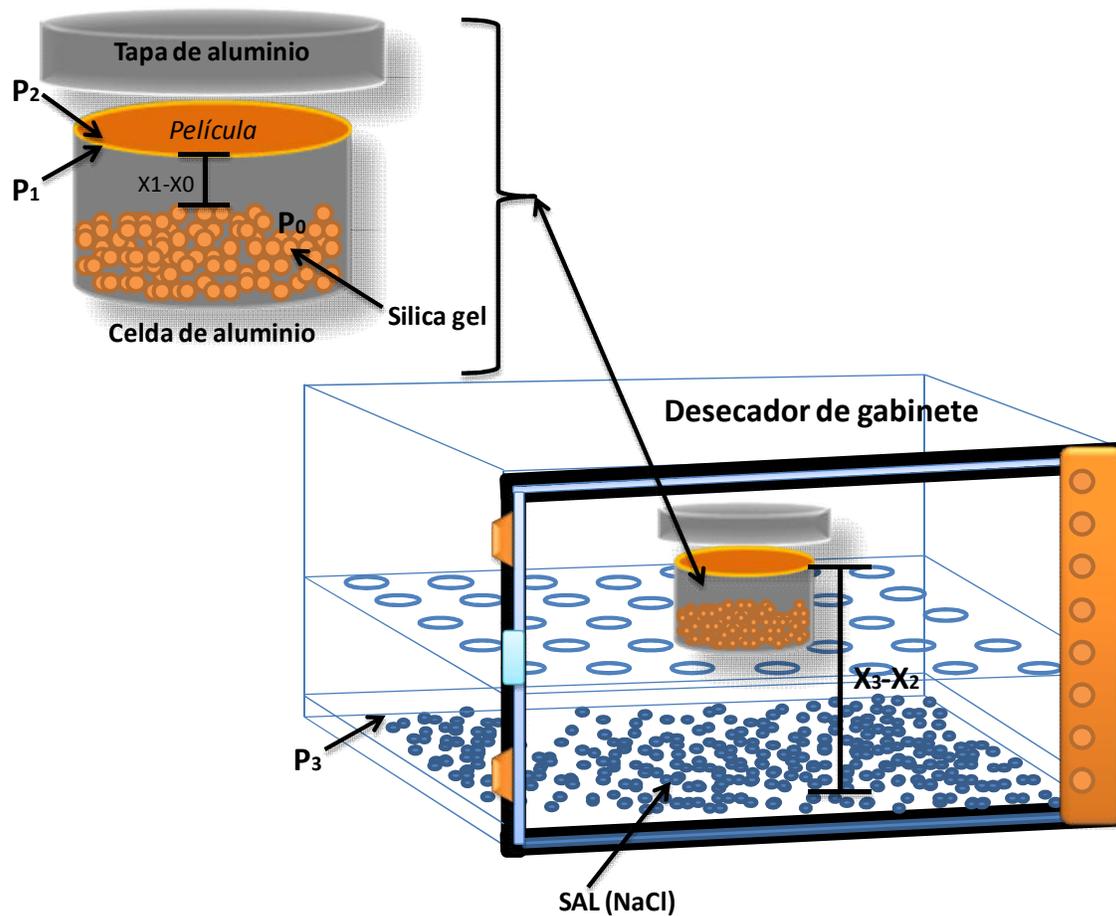


Figura 23.- Esquema del arreglo experimental para la determinación de la Permeabilidad al Vapor de Agua (PVA) de las películas.

El flux de masa de agua gaseosa (N_{H_2O} , $g/(s\ m^2)$) que permeó en cada película se calculó a través de la pendiente (m , g/s) determinada durante el monitoreo de ganancia en peso de la celda con la película y el área de transferencia de masa. Se consideró que la temperatura y HR en el desecador usado como cámara ambiental permanecieron constantes hasta el término de la prueba.

Para el cálculo de PVA se consideró la primera Ley de Fick de la difusión:

$$N_{H_2O} = \frac{D_{H_2O-f}}{RT} \frac{dp}{dx} \quad (20)$$

Donde D_{H_2O-f} es la difusividad de vapor de agua a través de la película y $\frac{dp}{dx}$ es el gradiente de presiones parciales de vapor de agua existente en la película, es decir:

$$\frac{dp}{dx} = \frac{P_2 - P_1}{(x_2 - x_1)}$$

En donde $(x_2 - x_1)$ es el espesor de la película.

P_2 y P_1 deben ser calculadas considerando la difusión del vapor de agua a través de una película de aire estancado (espacios x_3-x_2 y x_0-x_1) (Figura 24).

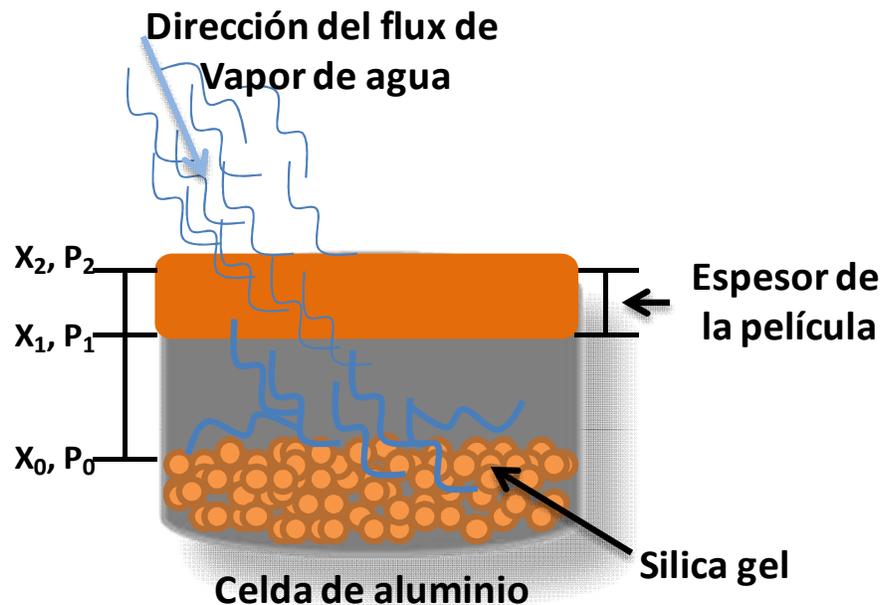


Figura 24.- Diagrama del modelo experimental usado para determinar difusividad y permeabilidad de vapor de agua en las películas.

Para este análisis se adoptó la solución teórica que reportan Bird et al. (1987). De acuerdo a estos autores, el flux de vapor de agua que difunde a través de la masa de aire estancado en el espacio (x_0-x_1) se determina con:

$$N_{H_2O} = \frac{D_{H_2O-aire}}{(x_0 - x_1)} \frac{P_T}{RT} \ln \left(\frac{P_1}{P_0} \right) \quad (21)$$

Donde

N_{H_2O} = Flux molar de agua gaseosa que se difunde a través de la película y del espacio de aire estancado (mol $H_2O/(m^2 s)$)

$D_{H_2O\text{-aire}}$ = Difusividad del agua gaseosa a través de la masa de aire estancado (m^2/s)

P_T = Es la presión atmosférica en el sitio de experimentación (presión atmosférica de Tulancingo, Hidalgo = 81460 Pa)

R = Constante Universal de los gases ideales = 8.314472 $m^3Pa/mol K$

T = Temperatura absoluta a la que se realizó la prueba = 299 K

$(x_0 - x_1)$ = Longitud del espacio de aire estancado a través del cual se difunde el vapor de agua (m)

P_1 = Presión parcial de vapor de agua en la superficie de la película hacia el interior de la celda (Pa)

P_0 = Presión parcial de vapor de agua en la interfase sílica gel-aire dentro de la celda (Pa)

Con la Ecuación 21 es posible determinar P_1 :

$$P_1 = \frac{P_0}{\exp\left(\frac{N_{H_2O} (x_1 - x_0) RT}{P_T D_{H_2O\text{-aire}}}\right)} \quad (22)$$

Donde $D_{H_2O\text{-aire}}$ es la difusividad del agua gaseosa a través del espacio de aire estancado. Ésta se calcula con la Ecuación 23 (Bird et al., 1987), en donde T es la temperatura absoluta del sistema.

$$D_{H_2O} = 0.26 \left[\frac{T}{298} \right]^{1.8} \quad (23)$$

P_0 es la presión parcial de vapor de agua que existe en la interfase sílica gel-espacio de aire delimitado por x_1-x_0 . P_0 se consideró cercano a cero, ($P_0=1$ Pa).

Con un análisis similar se determinó P_2 :

$$P_2 = (P_{B3}) \exp\left(\frac{N_{H_2O} (x_3 - x_2)RT}{(P_T)(D_{H_2O-aire})}\right) \quad (24)$$

Con P_3 determinada con:

$$P_3 = a_w P_{Sat} \quad (25)$$

Donde:

a_w = Actividad de agua de la solución saturada de $NaCl_2$ usada en el desecador para generar el gradiente de humedad en el sistema ($a_w=0.75$)

P_{Sat} = Presión de saturación de vapor de agua a la temperatura del sistema (Obtenida de Tablas de Vapor= 3360 Pa)

Determinadas las presiones de vapor de agua en ambos lados de la película, P_1 y P_2 , se determinó la difusividad de vapor de agua a través de la película ($D_{H_2O,f}$) con la Ecuación 20 y la permeabilidad del vapor de agua a través de la película biopolimérica (PVA) se obtiene con la Ecuación 26:

$$N_{H_2O} = PVA \frac{(P_2 - P_1)}{(x_2 - x_1)} \quad (26)$$

AMDIQ

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, A. C.
"La Interdisciplinariedad en la Ingeniería Química"

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a:

Ángel Calderón Aguirre, Norberto Chavarría Hernández, Apolonio Vargas Torres, Bethsua
Mendoza Mendoza, Adriana Inés Rodríguez Hernández

Por la presentación del trabajo:

**"PROPIEDADES DE BARRERA Y BIOACTIVIDAD DE PELÍCULAS BIOPOLIMÉRICAS CON
AGENTES ANTIMICROBIANOS PRODUCIDOS POR BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS"**

ID: 363

XXXV Encuentro Nacional
Puerto Vallarta, Jalisco México, 6 al 9 de Mayo de 2014


Dr. Juan Gabriel Segovia Hernández
PRESIDENTE DE AMDIQ


Dr. Tomás Méndez García
PRESIDENTE DEL COMITÉ TÉCNICO