



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ÁREA ACADÉMICA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL E
INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Diseño y caracterización de una película antimicrobiana de pectina-gelana, bacteriocinas y EDTA, para inhibir el desarrollo de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, en medios de cultivo a base de queso fresco.

TESIS

Que, para obtener el grado de:

Maestra en Ciencia de los Alimentos

Presenta:

L.Q.A. Perla Yesenia Jiménez Villeda

Dirección de Tesis:

Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández

Dr. Norberto Chavarría Hernández

Tulancingo de Bravo, Hgo., 2016





COORDINACION DE INVESTIGACION 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: "Diseño y caracterización de una película antimicrobiana de pectina-gelana, bacteriocinas y EDTA, para inhibir el desarrollo de Listeria monocytogenes, Escherichia coli y Staphylococcus aureus, en medios de cultivo a base de queso fresco", que desarrolló la estudiante Perla Yesenia Jiménez Villeda.

Asistentes:

- Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández
Dr. Norberto Chavarría Hernández
Dr. Apolonio Vargas Torres
M. en A. Melitón Jesús Franco Fernández

A. Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por la estudiante, comunicando a Perla Yesenia oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. La 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 la 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 8 de Diciembre de 2016.

Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández

Dr. Norberto Chavarría Hernández

Dr. Apolonio Vargas Torres

M. en A. Melitón Jesús Franco Fernández

Handwritten signatures on lines corresponding to the names above.

ccp. Archivo.



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



AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Biotecnología y Fisicoquímica del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la dirección de los Doctores: Adriana Inés Rodríguez Hernández y Norberto Chavarría Hernández. El trabajo formó parte de las actividades de los proyectos:

- a) CONACyT Apoyo al Fortalecimiento y Desarrollo de la Infraestructura Científica y Tecnológica 2014, Clave 230138, MÉXICO. Nombre del proyecto: Equipamiento para fortalecer al Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- b) Redes Temáticas de Colaboración PROMEP-SEP. Nombre de la red: Biotecnologías Basadas en Biomoléculas Funcionales para el Sector Agroalimentario. Nombre del proyecto: Diseño y Caracterización de Películas Alimentarias a base de Biopolímeros y Antimicrobianos Naturales. Periodo: 2014-2015.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca (621401) otorgada para realizar mis estudios de posgrado.

Mi más sincero agradecimiento a mi directora de tesis, Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y respeto, esenciales para el desarrollo y revisión de la presente investigación.

Al Dr. Norberto Chavarría Hernández, por el excelente asesoramiento que recibí en todas las etapas de esta investigación, así como también, por la fé que puso en mí al invitarme a ser parte de su grupo de trabajo. Mi agradecimiento y admiración para usted.

A la Dra. Ma. del Rocío López Cuellar, por su orientación y apoyo invaluable en el dominio de técnicas microbiológicas. Así como, por sus importantes sugerencias para mejorar este estudio.

Al Dr. Víctor Martínez Juárez, por sus importantes sugerencias para perfeccionar la presente investigación.

Al M en A. Melitón Jesús Franco Fernández, por facilitarme el acceso al taller de lácteos, ICAp y su asesoría durante la elaboración del queso fresco, empleado a lo largo la investigación.

Al Dr. Apolonio Vargas Torres, por aceptar formar parte de la comisión de tesis y la revisión de este manuscrito.

Dr. Gonzalo Velázquez, por su contribución para la realización de las pruebas mecánicas, dentro de las instalaciones del CICATA Querétaro.

A mis compañeros de laboratorio que indudablemente colaboraron de distintas maneras en esta investigación: Ana Laura, Karenina, Lorena, Ángel, Gerardo y Sixto. Mi agradecimiento para todos ellos.

De forma especial, a ti Lore, Por todas esas experiencias y anécdotas en el laboratorio, pero sobre todo por tu contribución significativa en este trabajo de investigación. Impulsándome siempre a seguir adelante, eternamente agradecida mi querida amiga.

DEDICATORIAS

A Díos.

Quién sabe guiarme en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente para seguir progresando y no desmayar en los problemas que se presentan, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la fe, ni desfallecer en el intento. Además de su infinita bondad y amor.

A mis padres.

*Por a verme dado la vida y un hogar lleno de amor y felicidad. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos. **Papá** eres un hombre que simplemente me hace llenar de orgullo y no va haber manera de devolverte tanto que me has ofrecido. **Mamá** eres el ser más maravilloso de todo el mundo, estás siempre conmigo, en momentos de alegría y tristeza, en mis triunfos y fracasos. Gracias por alentarme, corregirme, amarme y por llevarme en tus oraciones, porque estoy segura de que siempre lo haces. Los amo con todo mi corazón: Fermis y Came.*

A mi hermana y mi cuñado.

*Mi amada Brenda, eres el mejor ejemplo de hermana mayor, del cual he aprendido tanto y me enorgullece. **Brenda y Erik**, a ustedes que no titubearon en ofrecerme su hogar, por ayudarme en todo momento. Gracias por su tiempo, sabios consejos y amor.*

A mi hermano y mi cuñada.

***Diego y Dulce**, quienes me han brindado su cariño y apoyo constante. ¿Adivina qué? Eres el mejor hermano que una hermana pueda tener. Gracias por estar siempre presentes.*

A mí hermanita.

Grecia, la consentida de la casa. Por tu compañía, por tu amor, por ser la mujercita con los mejores sentimientos que conozco. Gracias por tu apoyo durante todo este tiempo, pero sobre todo por ser esa fuente de energía y alegría cuando más la necesito. ¡Te adoro hermosa!

A mí abuelita.

Por tus consejos, por el amor que me brindas y por esos platillos tan deliciosos que nos tenías preparados al regresar a casa. ¡Te quiero **mami!**

A mis sobrinas.

Vale y **Keny**, aunque aún no saben leer, un día van a aprender y por eso también les dedico esta tesis. Gracias por todas las expresiones de cariño, por esa alegría innata y contagiosa. ¡Las quiero mucho chaparritas!

A mí novío.

Por último y no menos importante, a ti **Carlitos**, por estar conmigo, ofreciéndome tu apoyo, tu atención, tus consejos, tu paciencia, por ser lo mejor que me ha podido pasar. Mi eterno agradecimiento por los momentos tan hermosos que vivimos juntos, por hacerme feliz, por comprender que esta tesis nos ha restado tiempo para estar juntos y por todo tu amor que día a día me brindas. Simplemente, ¡te amo!

Perlita.

	ÍNDICE
RESUMEN.....	xii
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 Empaques para alimentos.....	2
2.1.1 Empaques inteligentes.....	3
2.1.2 Empaques activos.....	4
2.2 Bioconservación.....	6
2.3 Antecedentes históricos de recubrimientos alimentarios.....	7
2.4 Empaques comestibles: Películas y recubrimientos.....	8
2.4.1 Recubrimiento comestible.....	8
2.4.2 Película comestible.....	8
2.5 Composición de películas y recubrimientos comestibles.....	9
2.5.1 Películas y recubrimientos constituidos a base de lípidos y ceras.....	9
2.5.2 Películas y recubrimientos constituidos a base de proteínas.....	10
2.5.3 Películas y recubrimientos constituidos a base de polisacáridos.....	11
2.5.4 Películas y recubrimientos constituidos a base de multicomponentes.....	18
2.5.5 Otros componentes: Plastificantes.....	19
2.6 Películas poliméricas con actividad antimicrobiana.....	20
2.6.1 Aceites esenciales.....	21
2.6.2 Aceites orgánicos.....	22
2.6.3 Bacteriocinas.....	22
2.7 Riesgos microbiológicos asociados al consumo de queso.....	30
2.8 Definición y origen del queso.....	37
2.8.1 Los quesos típicos mexicanos.....	38

3	JUSTIFICACIÓN.....	39
4	HIPÓTESIS	40
5	OBJETIVOS.....	41
5.1	Objetivo general.....	41
5.2	Objetivos específicos	41
6	MATERIALES Y MÉTODOS	42
6.1	Materiales.....	42
6.1.1	Biopolímeros	42
6.1.2	Agente antimicrobiano (CAM).....	42
6.1.3	Microorganismos	42
6.1.4	Medios de cultivo	43
6.2	Métodos	43
6.2.1	Producción de péptidos antimicrobianos por <i>Streptococcus infantarius</i>	43
6.2.2	Determinación de la actividad antimicrobiana de los péptidos producidos por <i>S. infantarius</i>	45
6.2.3	Determinación de la concentración inhibitoria mínima	46
6.2.4	Elaboración de las películas con agentes antimicrobianos.....	49
6.2.5	Acondicionamiento de las películas	51
6.2.6	Evaluación del efecto antimicrobiano de las películas contra tres microorganismos indicadores: <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>	51
6.2.7	Evaluación del efecto antimicrobiano de la película bioactiva en sistema modelo de queso fresco	53
6.2.8	Propiedades mecánicas de las películas con agentes antimicrobianos	56
6.2.9	Propiedades de barrera.....	58
6.3	Determinación de la solubilidad	60
6.4	Análisis Estadístico.....	60

7	RESULTADOS Y DISCUSIONES	61
7.1	Efecto del tiempo de fermentación en la actividad antimicrobiana de los péptidos producidos por <i>Streptococcus infantarius</i>	61
7.2	Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima	63
7.3	Descripción visual de las películas	69
7.4	Evaluación del efecto antimicrobiano de las películas contra tres microorganismos indicadores: <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	70
7.5	Evaluación del efecto antimicrobiano de la película bioactiva en medios de cultivo elaborados a base de queso fresco	75
7.6	Propiedades mecánicas de las películas con agentes antimicrobianos	85
7.7	Permeabilidad al oxígeno (PO ₂) de las películas con agentes antimicrobianos. ...	93
7.8	Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas con antimicrobianos	94
7.9	Determinación de la solubilidad	96
8	CONCLUSIONES.....	98
9	BIBLIOGRAFÍA.....	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Funciones de los empaques según Yam et al. (2005).	3
Figura 2. Materiales formadores de películas y recubrimientos comestibles (Modificado de Embuscado & Hube, 2009).	9
Figura 3. (a) Estructura química de ácido poligalacturónico y (b) estructura química representante de la pectina que muestra grupos de repetición típicos (Espitia-Pérez et al., 2014).	15
Figura 4. Representación del modelo de "caja de huevos". Cadenas de ácido poligalacturónico se representan por líneas negras, los iones de calcio y grupos carboxilo por círculos (Espitia-Pérez et al., 2014).	16
Figura 5. Estructura molecular de la goma gelana y la imagen de su película, elaborada a partir de una solución al 4%. Tomada de Nieto (2009).	17
Figura 6. Estructura molecular del glicerol.	20
Figura 7. 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 (Cotter et al., 2005).	26
Figura 8. Queso fresco estilo mexicano.	31
Figura 9. Técnica de producción de concentrado con actividad antimicrobiana por <i>Streptococcus infantarius</i>	44
Figura 10. Biorreactor MTB autoclavable de 3 L (Applikon Biotechnology).	45
Figura 11. Técnica de la difusión en agar por gota frente a <i>L. monocytogenes</i>	46
Figura 12. Esquema de inoculación para la determinación de la concentración mínima inhibitoria en placas de microtitulación de 96 pocillos.	48
Figura 13. Esquema de inoculación para la determinación de la concentración mínima inhibitoria en placas de microtitulación de 96 pocillos.	49
Figura 14. Representación gráfica de la elaboración de películas comestibles de pectina-gelana, CAM y EDTA.	51

Figura 15. Técnica para la evaluación del efecto antimicrobiano de las películas biopoliméricas contra tres microorganismos indicadores: <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> en su respectivo medio selectivo/diferencial.	53
Figura 16. Diagrama de los tratamientos de estudio y sus controles, cada uno se realizó por triplicado.	55
Figura 17. Máquina universal (TA plus, Lloyd), CICATA, Querétaro.	56
Figura 18. Equipo VAC-V2 Permeability tester empleado en determinación de permeabilidad al oxígeno (PO ₂) de las biopelículas.	59
Figura 19. Halos de inhibición del crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> en placas de agar suave BHI. A) Efecto antimicrobiano del concentrado obtenido de <i>Streptococcus infantarius</i> a las 24 h de fermentación en la dilución 2 ⁵ y su réplica. B) Inhibición del concentrado obtenido de <i>Streptococcus infantarius</i> a las 12 h de fermentación en la dilución 2 ⁵ , así como su réplica. C) Efecto antimicrobiano del concentrado obtenido de la bacteria láctica <i>Streptococcus infantarius</i> a las 6 h de fermentación en la dilución 2 ⁷ y su réplica.	62
Figura 20. Efecto del concentrado antimicrobiano (CAM) producido por <i>Streptococcus infantarius</i> , EDTA y sus mezclas sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> durante la prueba de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).	64
Figura 21. Efecto del CAM producido por <i>Streptococcus infantarius</i> , EDTA y sus mezclas sobre el crecimiento de cepa de <i>S. aureus</i> durante la prueba de la concentración inhibitoria mínima.	65
Figura 22. Efecto del CAM producido por <i>Streptococcus infantarius</i> , EDTA y sus mezclas sobre el crecimiento de cepa de <i>L. monocytogenes</i> durante la prueba de la concentración inhibitoria mínima.	67
Figura 23. Películas elaboradas a partir del concentrado de la fermentación de <i>Streptococcus infantarius</i> (CAM), EDTA y biopolímeros (pectina, gelana). A) Película control (sólo biopolímeros). B) Película bioactiva (CAM, EDTA y biopolímeros).	69
Figura 24 Imágenes de cajas Petri inoculadas con <i>L. monocytogenes</i> en medio Oxford (A), <i>E. coli</i> en MacConkey (B) y <i>S. aureus</i> en Baird Parker (C). Se muestra el efecto de los distintos tratamientos (película control y películas Bioactivas) bajo condiciones de incubación a 25 °C.	72

Figura 25. Efecto de películas con y sin compuestos antimicrobianos en el crecimiento de <i>E. coli</i> en medios elaborados a base de Queso, en los distintos tratamientos bajo condiciones de incubación a 35 °C. Se muestran los resultados con sus tres réplicas. (PB = Película Bioactiva; CSPSI = Control sin película, sin inóculo; PC = Película Control; CSPCI = Control sin película, con inóculo).....	78
Figura 26. Efecto de películas con y sin compuestos antimicrobianos en el crecimiento de <i>S. aureus</i> en medios elaborados a base de Queso, en los distintos tratamientos bajo condiciones de incubación a 35 °C. Se muestran los resultados con sus tres réplicas. (PB = Película Bioactiva; CSPSI = Control sin película, sin inóculo; PC = Película Control; CSPCI = Control sin película, con inóculo).....	81
Figura 27. Efecto de películas con y sin compuestos antimicrobianos en el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> en medios elaborados a base de Queso, en los distintos tratamientos bajo condiciones de incubación a 35 °C. Se muestran los resultados con sus tres réplicas. (PB = Película Bioactiva; CSPSI = Control sin película, sin inóculo; PC = Película Control; CSPCI = Control sin película, con inóculo).	84
Figura 28. Ensayo de tensión en películas a) pectina-gelana, b) pectina-gelana, bacteriocinas y EDTA, en el que se observa la evolución de la tensión y la elongación hasta el momento de fractura. Determinaciones realizadas en CICATA-Querétaro.	87
Figura 29. Comportamiento mecánico de las películas de pectina-gelana en sus diferentes tratamientos después de ser sometidas a la prueba de tensión uniaxial.....	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Plásticos derivados del petróleo utilizados en el envasado de alimentos (Brunazzi, Parisi, & Pereno, 2014).	2
Tabla 2. Características de algunas bacteriocinas de bacterias lácticas (Deegan, Cotter, Hill, & Ross, 2006).....	23
Tabla 3. Clasificación de las bacteriocinas según (Cotter et al., 2005).	25
Tabla 4. Películas comestibles con la inclusión de distintos agentes antimicrobianos.	28
Tabla 5. Reporte de brotes de enfermedades de origen alimentario relacionados con quesos.	34
Tabla 6. Películas con antimicrobianos elaborados a partir de biopolímeros y su aplicación en la conservación de distintos tipos de quesos.....	35
Tabla 7. Quesos mexicanos más populares (Rodríguez-Lara, 2009)	38
Tabla 8. Formulaciones de las películas bioactivas.....	50
Tabla 9. Medios Selectivos/Diferenciales y Caldos de crecimiento para cada microorganismo indicador.....	52
Tabla 10. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de CAM producido por <i>Streptococcus infantarius</i> , EDTA o sus mezclas para los tres microorganismos de ensayo.	67
Tabla 11. Concentraciones inhibitorias mínimas de antimicrobianos naturales “in vitro” contra microorganismos patógenos.	68
Tabla 12. Propiedades mecánicas de películas elaboradas con pectina-gelana, 90 UA/mL CAM producido por <i>Streptococcus infantarius</i> , más 0.05 M EDTA.....	88
Tabla 13. Propiedades mecánicas de algunas películas biopoliméricas reportadas en la literatura.....	91
Tabla 14. Permeabilidad al oxígeno (PO ₂) de películas con y sin sustancias antimicrobianas.	93
Tabla 15. Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de películas de películas con agentes antimicrobianos	95
Tabla 16. Valores promedio de la solubilidad en agua de la película control y película bioactiva	97

NOTACIÓN

A (t)	Área transversal en cualquier instante	m ²
A ₀	Área inicial	m ²
AC	Ácido cítrico	
AL	Ácido láctico	
AM	Antimicrobiano de <i>Streptococcus infantarius</i>	
ANOVA	Análisis de varianza	
ASTM	Sociedad Americana de pruebas y materiales	
ATCC	American Type Culture Collection	
ATP	Adenosina trifosfato	
BAL	Bacteria ácido láctica	
BHI	Caldo Infusión Cerebro Corazón	
°C	Grados centígrados	
CAM	Concentrado antimicrobiano producido por <i>Streptococcus infantarius</i>	
CMC	Carboximetilcelulosa	
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima	
CSF	Nanofibrillas de quitina	
CO ₂	Dióxido de carbono	
CS	Caseinato de sodio	
CSPCI	Control sin película, con inóculo de microorganismo	
CSPSI	Control sin película, sin inóculo de microorganismo	
DS	Grado de sustitución	
% e	Porcentaje de elongación	
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control	
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetraacético	
EE.UU.	Estados Unidos de América	
F	Fuerza	N
FAO	Food and Agriculture Organization /World Health Organization	
FDA	Food Drug Administration	
GSE	Extracto de semilla de pomelo	

g	Gramos	
h	Horas	
HAP	Hidroxipatita	
HPC	Hidroxipropilcelulosa	
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulosa	
HR	Humedad relativa	%
Da	Dalton	
L	Litros	
L ₀	Altura o longitud inicial	m
L.a.	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
LDPE	Polietileno de baja densidad	
Lm	<i>Listeria monocytogenes</i>	
L.r.	<i>Lactobacillus reuteri</i>	
L _t	Altura o longitud en cada instante de tiempo	m
m	Metros	
M	Molaridad	moles/L
MC	Metilcelulosa	
ME	Módulo de Young	MPa
MRS	Caldo De Man Rogosa y Sharpe	
MS	Sustitución molar	
N	Newton	
Nis	Nisina	
No	Número	
O ₂	Oxígeno	
Pa	Pascal	
PB	Película bioactiva	
PC	Película control	
% p/p	Porcentaje peso/peso	
% p/v	Porcentaje peso/volumen	
% v/v	Porcentaje volumen/volumen	
pH	Potencial de hidrógeno	

PHOS	Oligosacáridos pécticos Haw	
pI	Punto isoeléctrico	
PLA	Ácido Poliláctico	
PO ₂	Permeabilidad al oxígeno	g m Pa^{-1} $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$
PS	Sorbato de potasio	
PVA	Permeabilidad al vapor de agua	g m Pa^{-1} $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$
®	Registrado	
s	Segundos	
SB	Benzoato de sodio	
SD	Diacetato de sodio	
SF	Solución filmogénica	
SL	Lactato de sodio	
SP	Partículas de aserrín	
T	Tiempo	
™	Trade Mark	
UA	Unidades arbitrarias de actividad	
UE	Unión Europea	
UFC	Unidades formadoras de colonias	
UI	Unidades Internacionales	
UV	Luz ultra violeta	
VTEC	Verotoxina	
WVTR	Índice de permeabilidad al vapor de agua	
ZEO	<i>Zataria multiflora</i> Boiss	
ZMO	<i>Zataria multiflora</i>	

PREFIJOS DEL SISTEMA INTERNACIONAL DE UNIDADES

M	mega	1×10^6
k	kilo	1×10^3
c	centi	1×10^{-2}
m	mili	1×10^{-3}
μ	micro	1×10^{-6}

LETRAS GRIEGAS

A	Ancho de la tira de película	m
ΔL	Diferencia de longitudes	m
Δx	Espesor de la tira de película	m
ϵ_H	Deformación de Hencky	(-)
ϵ_f	Deformación de Hencky en el punto de fractura	(-)
σ_f	Esfuerzo a la fractura	Pa
σ_T	Esfuerzo verdadero	Pa

RESUMEN

Los quesos frescos son muy apreciados en México y son alimentos altamente perecederos debido a sus características físicas, químicas y microbiológicas. Debido a esta problemática, en los últimos años se han incrementado los estudios sobre películas comestibles con compuestos antimicrobianos naturales para asegurar la inocuidad y calidad de estos alimentos. Además, estos empaques contribuyen a la conservación del medio ambiente por estar elaborados con polímeros biodegradables. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de una película a base de pectina, gelana, péptidos antimicrobianos y EDTA en la inhibición de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, para contribuir al desarrollo de tecnologías de barrera en la conservación de alimentos.

En la primera etapa se obtuvieron péptidos antimicrobianos (CAM) producidos por *Streptococcus infantarius* (bacteria ácido-láctica aislada del pozol) y se evaluó su actividad antimicrobiana. Se determinó que 90 UA/mL de CAM fue la concentración mínima inhibitoria contra *L. monocytogenes*, mientras que para inhibir el crecimiento de *E. coli* fue necesaria la mezcla de 90 UA/ mL de CAM y 0.05 M EDTA, y para inhibir el desarrollo de *S. aureus* fue suficiente 1×10^{-3} M de EDTA. En la segunda etapa, se elaboraron películas antimicrobianas a partir de pectina (1%), gelana (0.2%) y glicerol (0.5%) como plastificante. Estas películas en sinergia con CAM (75, 90 y 120 UA/mL) y EDTA (0.05 M), presentaron actividad antimicrobiana total sobre el desarrollo de *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli* en sus respectivos medios selectivos/diferenciales durante 30 días a 25 °C. En la tercera etapa, se determinó la actividad antimicrobiana de una película bioactiva (90 UA/mL CAM y 0.05 M EDTA) aplicada en medios de cultivo formulados a base de queso 'Panela', contaminados artificialmente (10^2 UFC/g) con los microorganismos indicadores. La película inhibió completamente la población de *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli*, durante 7 días a 35 °C. En contraste, las unidades control sin película, presentaron al final del experimento, 10^7 UFC/g de *L. monocytogenes*, 10^9 UFC/g de *S. aureus* y 10^8 UFC/g de *E. coli*.

Por último, estas películas se caracterizaron en sus propiedades mecánicas, de barrera y solubilidad. La inclusión de antimicrobianos generó películas más rígidas y menos elongables que la película control (sin antimicrobianos). La barrera al vapor de agua fue mayor en la película bioactiva, mientras que la permeabilidad al oxígeno no se modificó significativamente por efecto de compuestos antimicrobianos.

ABSTRACT

Mexican fresh cheeses are highly appreciated but greatly perishable foods due to their physical, chemical and microbiological characteristics. Because of this, natural antimicrobial edible films have been investigated for ensuring food safety and quality in recent years. In addition, these edible films contribute to the conservation of the environment due to they are produced from biodegradable polymers. The objective of this work was to evaluate the antimicrobial activity of a film based on pectin, gellan, antimicrobial peptides and EDTA in the inhibition of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, to contribute to the development of hurdle technology in food preservation.

In the first step, antimicrobial peptides (CAM) produced by *Streptococcus infantarius* (acid-lactic bacteria isolated from pozol) were obtained and their antimicrobial activity was evaluated. It was determined that 90 AU/mL of CAM was the minimum inhibitory concentration against *L. monocytogenes*. It was necessary to mix 90 AU/mL CAM and 0.05 M EDTA to inhibit the growth of *E. coli* and to inhibit the development of *S. aureus* was enough 10^{-3} M EDTA. In the second stage, antimicrobial films were prepared from pectin (1%), gellan (0.2%) and glycerol (0.5%) as plasticizer. These films in synergy with CAM (75, 90 and 120 UA / mL) and EDTA (0.05 M) showed total antimicrobial activity on the development of *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *E. coli* in their respective selective/differential media during 30 days at 25 °C. In the third stage, the antimicrobial effect of a bioactive film (90 AU/mL CAM plus 0.05 M EDTA) was determined on agar based on fresh cheese 'Panela', artificially contaminated (10^2 UFC/g) with the target microorganisms. The film completely inhibited the *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *E. coli* growth for 7 days at 35 ° C. In contrast, in control units without films, at the end of the examination, there were 10^7 UFC/g of *L. monocytogenes*, 10^9 UFC/g of *S. aureus* and 10^8 UFC/g of *E. coli*.

Finally, the films were characterized in their mechanical and permeability a properties. The inclusion of antimicrobials produced more rigid and less elongate films than the control film (without antimicrobials). The water vapor permeability was lower in the bioactive film, while the oxygen permeability was not significantly modified due to the presence of antimicrobial compounds.

1 INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente, los empaques han sido útiles como una barrera “inerte” que protege a los alimentos frente al medio ambiente. Anteriormente, la selección de los mismos se realizaba considerando únicamente la estabilidad de los sustratos a los que protegían. Sin embargo, la demanda creciente por alimentos sanos, seguros y frescos dio origen al desarrollo de empaques que además de brindar protección frente al medio ambiente, oxígeno y humedad, mantuvieran la calidad sensorial, nutricional y microbiológica del producto empacado. Esta nueva generación de empaques es conocida como “empaques activos” (Dury-Brun, Chalier, Desobry, & Voilley, 2007). Una versión de los empaques activos son los empaques con actividad antimicrobiana, los cuales pueden elaborarse mediante la adición de agentes antimicrobianos tales como ácidos orgánicos, antimicóticos, extractos de especias, con el sistema lactoperoxidasa y recientemente la incorporación de bacteriocinas, entre otros. En este contexto, una gran parte de los reportes se enfocan en la incorporación de la nisina, lo cual probablemente se debe al hecho de ser la única bacteriocina aprobada para su uso en alimentos por la Food and Drug Administration (FDA) desde 1988 (Cotter, Hill, & Ross, 2005). No obstante, existen otras bacteriocinas que debido a su gran estabilidad frente al pH, temperatura, además de su actividad antilisterial poseen un gran potencial para ser empleadas en la bioconservación productos alimenticios.

Por otra parte, con el objeto de reducir la cantidad de desechos generados por los empaques sintéticos de los alimentos, recientemente los científicos han fijado su atención en el desarrollo de empaques, llámese películas o recubrimientos, biodegradables y/o comestibles a partir de polímeros naturales tales proteínas, incluyendo caseína, gelatina, soya, gluten, zeína y proteínas aisladas del suero de leche. Con base en lo anterior, en este trabajo se evaluó la actividad y la eficacia antimicrobiana de bacteriocinas producidas por *Streptococcus infantarius*, incorporadas en una matriz mixta de biopolímeros: a) pectina bajo metoxilo y b) gelana de bajo acilo, para generar películas bioactivas en el control de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en un sistema modelo lácteo (agar a base de queso fresco).

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Empaques para alimentos

Durante años el empaque cumplía tres funciones básicas: contener, conservar y proteger a los alimentos de una serie de agentes externos procedentes del medio ambiente como son el calor, la luz, humedad, oxígeno, olores indeseables, microorganismos, insectos, suciedad y partículas de polvo o emisiones de gases, entre otros, que ponían en cuestión su calidad y/o seguridad (Restuccia et al., 2010). Los materiales empleados comúnmente para el envasado de alimentos y bebidas son los plásticos sintéticos, que se clasifican en siete categorías tal y como se observa en la Tabla 1. Estos polímeros sintéticos se utilizan por las múltiples ventajas que presentan, como ser químicamente inertes, ligeros, resistentes, cómodos e higiénicos, y por su versatilidad de forma, tamaño, etc. (Boonnattakorn, Chonhenchob, Siddiq, & Singh, 2015). Sin embargo, al ser compuestos sintéticos, no biodegradables y derivados del petróleo, su utilización crea serios problemas ecológicos debido principalmente a la contaminación medioambiental que causan.

Tabla 1. Plásticos derivados del petróleo utilizados en el envasado de alimentos (Brunazzi, Parisi, & Pereno, 2014).

Tipo	Material	Abreviatura	Aplicaciones
1	Polietileno tereftalato	PET	Botellas
2	Polietileno de Alta Densidad	PEAD	Botellas, bandejas
3	Policloruro de Vinilo	PVC	Películas flexibles
4	Polietileno de Baja Densidad	PEBD	Películas, bolsas
5	Polipropileno	PP	Películas, bolsas
6	Poliestireno	PS	Bandejas, tarrinas
7	Otros	Policarbonatos, resinas, epoxi, etc.	

Con el paso del tiempo, esas funciones tradicionales se han visto modificadas con otras tantas exigencias como que presenten comportamientos físico-químicos específicos en relación con el producto contenido, que se adecúen a los requisitos de la distribución comercial, que cumplan con las nuevas reglamentaciones y legislaciones relacionadas con los alimentos o con el medio ambiente, que sus costos sean adecuados al producto final y, entre otras cosas, presenten un cierto atractivo para captar la atención del consumidor.

Las funciones actuales de un empaque se puede clasificar en 4 categorías que son: protección, presentar o informar al consumidor sobre el estado de los alimentos, conveniencia y contención, esto de acuerdo a lo ilustrado en la Figura 1 (Yam, Takhistov, & Miltz, 2005). Siguiendo con este marco de exigencias ha surgido una nueva generación de empaques: a) empaques inteligentes y b) empaques activos que participan en el mantenimiento o incluso mejoran la calidad del alimento contenido (Biji, Ravishankar, Mohan, & Srinivasa Gopal, 2015).

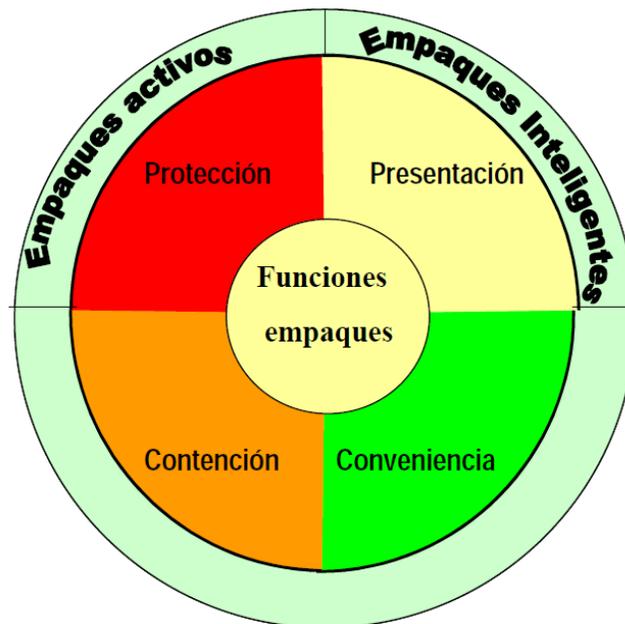


Figura 1. Funciones de los empaques según Yam et al. (2005).

2.1.1 Empaques inteligentes

Un “empaque inteligente” es aquel sistema que cuenta con la habilidad para monitorear las condiciones en las que se encuentran los alimentos empacados para proporcionar información acerca del producto durante el transporte y almacenamiento. Dicha información es a través de sensores o indicadores que se encuentran ya sea dentro o fuera del envase. Por mencionar algunos ejemplos se encuentran: sensores de tiempo, de temperatura, de niveles de oxígeno, de dióxido de carbono y de crecimiento microbiano (Aday & Yener, 2015; Ahvenainen, 2003).

2.1.2 *Empaques activos*

Un “empaque activo” se define como un sistema que trata de potenciar y aprovechar las interacciones alimento/empaque/ambiente para mejorar la calidad e inocuidad del alimento envasado y prolongar así su vida útil. Éstos pueden ser la modificación de procesos fisiológicos como es el caso de la respiración en frutas y vegetales, procesos químicos como la oxidación de lípidos, procesos físicos como la deshidratación, e incluso microbiológicos y de infestación. Para cumplir con el proceso de conservación, generalmente los empaques activos contienen aditivos que desempeñan funciones específicas dentro del empaque con el objeto de modificar los procesos ya enunciados (Aday & Yener, 2015; Prasad & Kochhar, 2014).

Dentro de los empaques activos se encuentran los sistemas absorbedores y de liberación. Por ejemplo en los absorbedores se encuentran los secuestradores de oxígeno, de humedad, de malos olores (aminas y aldehídos), de luz UV, control de la generación de CO₂ y etileno, entre otros (Higueras, Lopez-Carballo, Hernandez-Munoz, Catala, & Gavara, 2014). Los sistemas de liberación, incluyen emisores de CO₂, etileno, dióxido de azufre, sabores y pesticidas. Adicionalmente, existen sistemas liberadores de agentes antioxidantes y antimicrobianos (Dobrucka & Cierpiszewski, 2014). Estos últimos pueden elaborarse mediante la adición ya sea de ácidos orgánicos y sus sales, lisozima, antibióticos, alcoholes, sistema lactoperoxidasa, la lactoferrina, aceites esenciales, y desde luego, bacteriocinas (Guilbert Stephane, 2011).

Existen actualmente diferentes e innovadoras estrategias que prolonguen la vida útil de los alimentos o incluso aumenten la calidad o seguridad de los mismos con una mayor eficacia que las tecnologías tradicionales (pasteurización, irradiación, refrigeración, atmósferas modificadas, etc.). En este sentido han ido surgiendo diversas tecnologías, como las altas presiones, fluidos supercríticos, altas frecuencias, pulsos luminosos, pulsos eléctricos, ultrasonido y envases activos, cuya aplicación en la industria son una realidad, aunque los productos tratados con estas tecnologías todavía no son muy numerosos, al menos con algunas de ellas. La novedad en sí principalmente reside en la utilización conjunta de algunas de estas tecnologías para mejorar su efectividad sin que su tratamiento sea muy

drástico, retomando así el concepto de tecnologías de barrera y de mínimo procesado (Prasad & Kochhar, 2014).

Entre estas tecnologías, los envases activos han cobrado gran protagonismo en los últimos años. Para el diseño y desarrollo de envases activos se utilizan como base materiales no comestibles (papel, cartón, plásticos, metales o una combinación de ellos) y materiales comestibles (biopolímeros) (Kruijf et al., 2010), aunque en este último caso en menor escala.

Es importante señalar que el envase bioactivo comestible se diferencia del envase activo en que aquel tiene además una repercusión sobre la salud del consumidor, ya que da lugar a alimentos más saludables. Algunos ejemplos de envases bioactivos son las películas o recubrimientos que contienen vitaminas, fibra dietética, fitoquímicos, prebióticos, enzimas o probióticos (Martín-Belloso, Rojas-Graü, & Soliva-Fortuny, 2009), que contienen compuestos con reconocido efecto positivo en el organismo del consumidor.

Los agentes activos con o sin propiedades bioactivas se incorporan a la formulación del envase comestible de tal forma que la liberación de éstos se realice por contacto directo entre la película y el alimento. Una vez liberado el compuesto debe ejercer su acción biológica sobre el alimento. Dicho así parece una tarea sencilla, pero no lo es tanto porque en ocasiones los componentes de la formulación del envase dificultan la liberación del principio activo, mientras que también puede suceder que el principio activo no difunda porque interacciona con el alimento, etc. Así por ejemplo, para la selección de los principios activos que formarán parte del envase comestible se debe tener en cuenta no sólo su efectividad frente al microorganismo diana sino también las posibles interacciones entre el principio activo, envase y los componentes del alimento. Estas interacciones pueden modificar la actividad antimicrobiana o antioxidante, la liberación o difusión del principio activo o modificar las características finales de los envases comestibles (Aday & Yener, 2015).

A pesar de ello, la incorporación de compuestos activos a través de los envases comestibles ofrece una mayor ventaja que la aplicación directa del compuesto ya que en este último caso se requiere mayor cantidad de conservante en contacto con el alimento para producir el mismo efecto protector. Asimismo, la adición de agentes activos a los envases

comestibles permite controlar la velocidad de difusión, por ejemplo del agente antimicrobiano, de tal manera que se consiguen concentraciones altas de los compuestos activos en la superficie del producto (donde la contaminación es frecuente) durante un periodo de tiempo más largo.

La protección de un alimento mediante el empleo de envases activos comestibles se realiza abordando diferentes estrategias, dependiendo del tipo de deterioro o daño que queramos evitar (oxidación, pardeamiento, degradación de grasas o proteínas, contaminación microbiológica, cambios de textura, etc.), y en base a esto se seleccionan los materiales y agentes activos más convenientes para alcanzarlo. Por lo tanto, las posibilidades que ofrecen las películas y recubrimientos para el diseño de envases activos con diferentes propiedades funcionales son enormes (Prasad & Kochhar, 2014).

2.2 Bioconservación

En los últimos años ha surgido un gran interés por parte de los consumidores por alimentos inocuos, con una mayor vida de anaquel, fáciles de consumir, de empaques degradables, más naturales, impulsando así a la investigación para el desarrollo de nuevas alternativas alrededor del mundo (Balciunas et al., 2013). Representando un reto en este ámbito, pues cada vez se es más consciente de los problemas de salud que acarrear los aditivos alimentarios y la preferencia por los alimentos sin conservadores. En este sentido se considera a la bioconservación como la opción más viable dentro de la industria alimentaria (Antonio; Gálvez, Burgos, López, & Pulido, 2014).

Se entiende por bioconservación como el proceso de manipulación que retrase o evite el deterioro de los alimentos, empleando microorganismos y/o sus metabolitos que potencialicen la seguridad alimentaria mediante la producción de sustancias que inhiban el desarrollo de otros microorganismos que pongan en cuestión la calidad de los productos alimenticios (Sundh & Melin, 2011).

Dentro de la bioconservación se encuentran las bacteriocinas como la nisina, pediocina y enterocina. Péptidos catiónicos pequeños, termoestables, sintetizados por bacterias Gram positivas con un efecto inhibitorio sobre otros microorganismos. Dentro de éstas la más

común y aplicada es la nisina producida por *Lactococcus lactis*, con un peso molecular de 3.4 kDa, se encuentra conformada por 34 aminoácidos, con residuos deshidratados (dehidrolanina y dehidrobutirina) y cinco anillos de lantionina, de muy baja efectividad contra bacterias Gram negativas (Huss, Jeppesen, Johansen, & Gram, 2014).

Algunos de los beneficios del uso de bacteriocinas en los productos alimenticios son:

1. Resistentes a tratamientos térmicos.
2. Alargan la vida de anaquel.
3. Evitan la contaminación alimentaria, reduciendo costos.
4. Previenen la transmisión de enfermedades por alimentos contaminados con patógenos.
5. Con su inclusión permite el desarrollo de alimentos innovadores.
6. Elaboración de películas comestibles con antimicrobianos (Antonio; Gálvez et al., 2014).

2.3 Antecedentes históricos de recubrimientos alimentarios

El uso de películas comestibles con el fin de extender la vida de anaquel de un alimento no es una práctica nueva, existen reportes que datan de los siglos XII y XIII. En China se utilizaban la inmersión de cítricos (naranjas y limas) en cera retardando su desecación. En el Siglo XVI los recubrimientos se hacían con parafinas previniendo la deshidratación del alimento (Pavlat & Orts, 2009) y en Inglaterra surgía el “enmantecado” (recubrimiento con grasa animal) para evitar la pérdida de humedad, mientras que en el S. XIX se conservaban productos cárnicos con películas a de base gelatina.

Desde hace más de 50 años se han reportado trabajos de investigación sobre películas y recubrimientos para una vida de anaquel mayor de alimentos, mejorando la calidad de alimentos frescos, congelados y procesados. Sin embargo, se siguen estudiando para potencializar sus propiedades de barrera con el desarrollo de mezclas de aceites, ceras, biopolímeros, antimicrobianos, entre otros (Campos, Gerschenson, & Flores, 2010).

2.4 Empaques comestibles: Películas y recubrimientos

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 (Lavoine, Desloges, Manship, & Bras, 2015). Sus usos 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 (Higueras et al., 2014).

2.4.1 Recubrimiento comestible

Un recubrimiento comestible es aquel que se aplica sobre un sistema alimenticio como una solución que genera una película superficial al secarse (Espitia-Pérez, Du, Jesús;Avena-Bustillos, Soares, & McHugh, 2014). Los recubrimientos comestibles están formulados con aditivos permitidos para el uso alimentario. Entre los cuales se encuentran: goma arábica, goma xantana, glicerol, pectinas, celulosa y sus derivados.

Se hace referencia a una delgada capa de material por inmersión, pulverización o envoltura continua aplicada sobre la superficie del alimento y poder ser consumido como parte de él (Embuscado & Hube, 2009).

2.4.2 Película comestible

Las películas comestibles se definen como una delgada capa de un material que puede ser consumido y genera una barrera contra el oxígeno, la migración de ciertos solutos al alimento y la humedad. Generalmente pueden proporcionar la esterilidad de la superficie evitando la pérdida de otros componentes importantes; su espesor es menor de 0.3 mm. Puede ser colocada (lo que implica que debe ser preformada) sobre o entre los componentes del alimento (Espitia et al., 2014).

2.5 Composición de películas y recubrimientos comestibles.

Las películas y recubrimientos comestibles se constituyen principalmente de biopolímeros de alto peso molecular que propician una matriz de alta cohesividad. Se utilizan polisacáridos o proteínas que por su carácter hidrófilo son sensibles al agua. Otros constituyentes mayoritarios son los lípidos y resinas (Figura 2) (Ibarguren, Vivas, Bertuzzi, Apella, & Audisio, 2010).

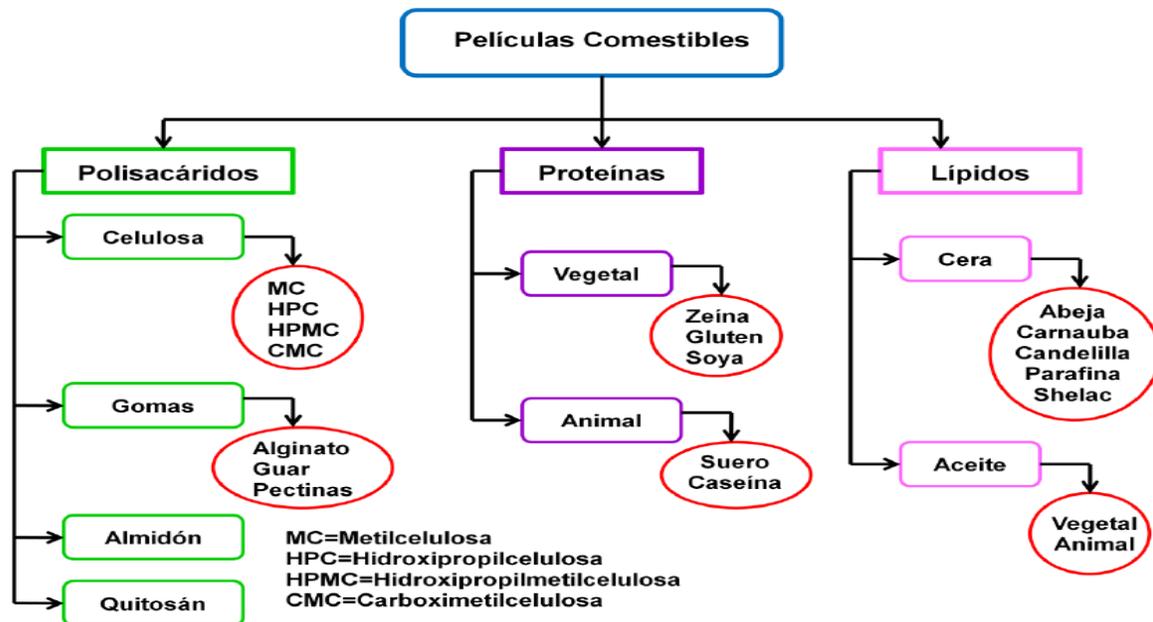


Figura 2. Materiales formadores de películas y recubrimientos comestibles (Modificado de Embuscado & Hube, 2009).

2.5.1 Películas y recubrimientos constituidos a base de lípidos y ceras.

Algunos de los ingredientes de los recubrimientos a base de lípidos son ceras y aceites de parafina, cera de abeja, cera de candelilla, aceite mineral, aceite vegetal, monoglicéridos acetilados, ácidos esteárico, ácido láurico o ésteres de ácidos grasos-sacarosa. Éstos cuentan con excelentes propiedades de barrera contra la humedad debido a su baja polaridad y a su capacidad para formar una red molecular densa, sin embargo alguno de sus inconvenientes es que proporcionan un mal aspecto, de características mecánicas débiles, no se adhieren a superficies de naturaleza hidrófila. Por estas características es conveniente mezclarlos con

otras sustancias para generar una mayor estabilidad en la película (Jiménez, Fabra, Talens, & Chiralt, 2012).

2.5.2 Películas y recubrimientos constituidos 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 (Pavlath & Orts, 2009):

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 soya, 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 (Embuscado & Hube, 2009).

2.5.3 Películas y recubrimientos constituidos 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 (Calderón-Aguirre, 2014) . 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.

Las características de las películas preparadas a partir de este tipo de materiales vienen determinadas también por la estructura del polisacárido, ya que influye el número de enlaces de hidrógeno intermoleculares establecidos entre las cadenas del polímero. El peso molecular del polisacárido también juega un papel importante en las propiedades finales de las películas. Los polímeros lineales de altos pesos moleculares y no iónicos forman películas fuertes, como es el caso del agar y la metilcelulosa. En cambio, los polisacáridos más ramificados, con o sin carga aniónica, forman películas más débiles (Nieto, 2009).

En general, los polisacáridos forman películas con buenas propiedades mecánicas y de barrera al O₂ y CO₂, pero no a la humedad (al igual que las proteínas) debido a que son también muy hidrofílicos (Guilbert Stephane, 2011); también, es cierto que su resistencia al agua es menor que la de películas basadas en proteínas.

2.5.3.1 Celulosa

La celulosa es la sustancia orgánica más abundante en la naturaleza. Es el principal componente de las paredes celulares de plantas, en estado natural es difícil de purificar ya que es insoluble en disolventes tradicionales, se requieren tratamientos alcalinos para poder remover ceras, proteínas y ligninas. Para la obtención de éteres de celulosa se llevan a cabo extracciones alcalinas para eliminar polisacáridos de bajo peso molecular denominados hemicelulosas e incrementar la fracción de celulosa pura (Lavoine et al., 2015).

La celulosa cuenta con monómeros de D-glucosa unidos por medio de enlaces glucosídicos β -1,4. A diferencia del almidón que son α -1,4 existiendo una gran diferencia en sus propiedades funcionales. Por su configuración β -1,4 le confiere una estructura lineal y rígida al polímero. La relativa abundancia de grupos hidroxilo y la tendencia a formar puentes de hidrógeno tanto intra como intermoleculares son la causa de la formación de agregados lineales, los cuales contribuyen a la rigidez de las paredes celulares y a la relativa insolubilidad de la celulosa en los solventes comunes, particularmente el agua.

Por sus diversas modificaciones químicas, la celulosa da origen a numerosos derivados, entre los más conocidos se encuentran: la carboximetilcelulosa, metilcelulosa e hidroxipropil metilcelulosa. Todos los derivados de la celulosa son obtenidos básicamente de la misma forma, se contemplan tres etapas principales: obtención del álcali de celulosa, alquilación o hidroxialquilación y purificación final del producto (Takala et al., 2013).

El peso molecular de estos polímeros se manifiesta en la viscosidad de sus soluciones. Así, a medida que el peso molecular disminuye, la viscosidad disminuye. Para estos derivados de celulosa, por lo tanto, el peso molecular es una importante información (Martín-Belloso et al., 2009).

2.5.3.2 Hidroxipropil metilcelulosa

La hidroxipropil metilcelulosa (HPMC) es un derivado de la celulosa que presenta en su cadena grupos metilo e hidroxipropilos. Existen diversos pesos moleculares, viscosidad, grado de sustitución (DS) y sustitución molar (MS). En la cadena de celulosa, los grupos

hidroxipropilos son hidrofílicos y los grupos metilos son parte de las zonas hidrofóbicas. Estos sustituyentes le confieren las propiedades de surfactante. Son de importancia los éteres no iónicos de celulosa por su capacidad de formar películas interfaciales, formación de geles, espesantes y su actividad de superficie. Las interacciones polímero-polímero tienen lugar debido a interacciones entre los grupos hidrofóbicos, generando así una red infinita que provoca un aumento brusco en la viscosidad y en la turbidez en caso de que la concentración sea relativamente alta (Dashipour et al., 2015).

Los derivados de celulosa forman películas inodoras, insípidas, flexibles, con propiedades mecánicas moderadas, con cierta resistencia a aceites y grasas, transparentes y además presentan buenas propiedades de barrera frente al vapor de agua y al oxígeno; 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 (Zhu, Sheng, & Tong, 2014).

2.5.3.3 *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 (Shen &

Kamdem, 2015; Wang et al., 2015). 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 (Marin et al., 2015).

2.5.3.4 *Pectina*

La pectina es un polisacárido que es extraído de fuentes naturales, que poco a poco va generando mayor importancia, tanto por investigadores como por consumidores. La pectina es ampliamente utilizada en la industria alimentaria por sus propiedades gelificantes. Es extraída comercialmente a partir de la cáscara de los cítricos y de pomaza de manzana bajo condiciones ácidas o alcalinas.

Como se puede apreciar en la Figura 3, la estructura polimérica de la pectina está conformada principalmente de ácido galacturónico unido por enlaces β -1,4 y ésteres de metilo, en sus cadenas lineales. Estos ácidos urónicos tienen grupos carboxilo, algunos de los cuales se encuentran en la naturaleza como metil éster, mientras que otros son tratados con amonio para producir grupos carboxilamida. Debajo de un 50% del grado de esterificación se generan pectinas de bajo metoxilo. La pectina, posee carga eléctrica negativa a pH neutro.

Además del ácido galacturónico, la pectina posee azúcares neutros como rammnosa, arabinosa, galactosa y xilosa, en sus cadenas laterales (Willats, Knox, & Mikkelsen, 2006). La solubilidad de la molécula de pectina está determinada por la distribución global de los grupos hidrofílicos e hidrofóbicos.

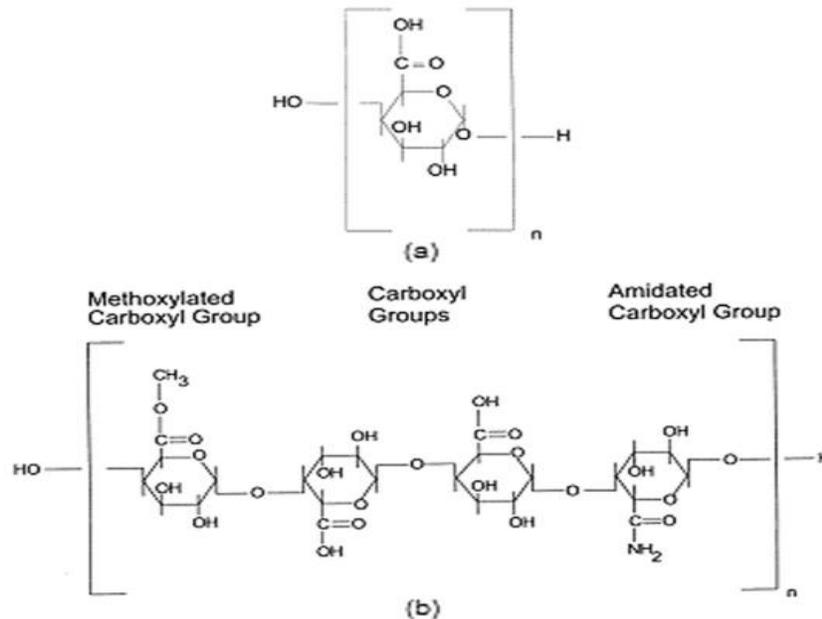


Figura 3. (a) Estructura química de ácido poligalacturónico y (b) estructura química representante de la pectina que muestra grupos de repetición típicos (Espitia-Pérez et al., 2014).

Una de las propiedades de mayor importancia de las pectinas es la capacidad de formar geles en presencia de cationes Ca^{2+} . La asociación de las cadenas de pectina (bloques de galacturonato) a través de cationes Ca^{2+} , conduce a la formación de una red tridimensional de pectato de calcio. La estructura resultante tiene forma similar a la de “caja de huevo”, Figura 4. Además de la formación de enlaces iónicos, las pectinas amidadas promueven asociaciones entre dímeros a través de enlaces de hidrógeno e interacciones electroestáticas (Willats et al., 2006).

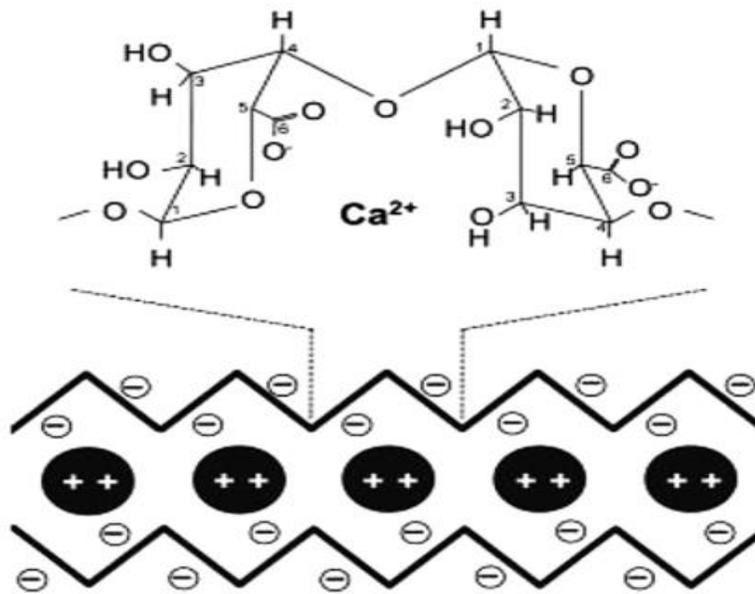


Figura 4. Representación del modelo de "caja de huevos". Cadenas de ácido poligalacturónico se representan por líneas negras, los iones de calcio y grupos carboxilo por círculos (Espitia-Pérez et al., 2014).

La concentración de pectina, tipo de pectina, sólidos solubles, rango de pH, la concentración de sales y cationes divalentes son factores decisivos para la formación de geles. Un gel viscoelástico se forma con un balance adecuado entre la concentración de pectina y de calcio. Se produce un gel quebradizo y menos elástico con exceso de calcio, con la probabilidad de generar sinéresis o precipitación (Nieto, 2009).

Las pectinas amidadas han podido ser desterificadas con amonio; parte de los grupos éster son reemplazados por grupos amida, modificándose así sus propiedades gelificantes. Las pectinas amidadas pueden formar geles en independencia relativa del contenido de sólidos solubles y rango de pH; además con pequeñas concentraciones de calcio, la pectina comienza a formar enlaces y si la concentración incrementa, puede formarse un gel (Campos et al., 2010).

Por sus propiedades gelificantes, de formación de películas, propiedades ligantes, biocompatibilidad y no toxicidad, la pectina es un biopolímero útil para la formación de vehículos de liberación, en forma de geles, matrices tridimensionales, películas y micro o

nano-partículas. En los sistemas antes mencionados pueden ser incorporadas diferentes sustancias bioactivas, con una alta eficiencia de atrapamiento y mediante procedimientos simples. Para algunas aplicaciones específicas las pectinas pueden mejorar su funcionalidad con modificaciones químicas. Los derivados de pectina de elevada densidad de carga (grupos amino primarios positivos o grupos carboxilo negativos), son capaces de penetrar a profundidad en tejidos, y así prolongar el tiempo residual para incorporar los activos y mejorar su penetración (McWilliams, 2012).

En películas comestibles se usan frecuentemente pectinas de bajo metoxilo, adicionando un agente plastificante y para ciertos 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 competentes (Espitia-Pérez et al., 2014).

2.5.3.5 Gelana

La gelana es un exopolisacárido bacteriano, producido mediante fermentación aeróbica de la glucosa, por la bacteria *Sphingomonas elodea* (Zhu, Sheng, Li, & Tong, 2013). Es una molécula lineal de aproximadamente 500 kDa, su estructura es un tetrasacárido de glucosa, ácido glucurónico, glucosa y ramnosa (Figura 5).

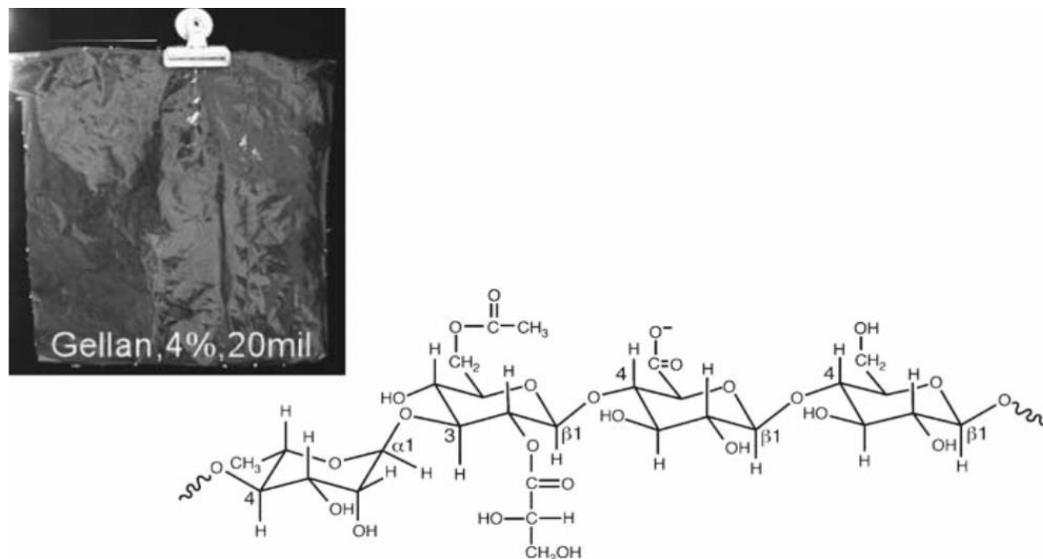


Figura 5. Estructura molecular de la goma gelana y la imagen de su película, elaborada a partir de una solución al 4%. Tomada de Nieto (2009).

Los iones divalentes como calcio o magnesio inhiben la hidratación de la goma, al ser un polisacárido aniónico. Esto se puede revertir al emplear 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 (Xiao et al., 2011). La formación de geles de gelana ocurre a partir de asociaciones iónicas entre las dobles hélices cuando la goma se encuentra en disolución. Los geles de carragenina y agar pueden ser comparados con los que forma la gelana.

Las principales características de gelana y sus respectivos geles se enuncian a continuación:

- Polvo blanquecino soluble en agua.
- Requiere de cationes para gelificar.
- Posee distintas temperaturas de gelificación.

Depende del grado de acilación (presencia de grupos acetilo o glicerilo) la funcionalidad de la goma. La gelana de alto acilo presenta geles suaves, elásticos, transparentes y flexibles, mientras que los geles de bajo acilo son en contraste duros, no elásticos y quebradizos. La goma gelana puede utilizarse en combinación con otros hidrocoloides como: goma xantana, alginato, goma guar, carboximetilcelulosa, pectina, carrageninas, agar, gelatinas o almidones modificados para generar una amplia gama de propiedades reológicas de sus geles (McWilliams, 2012).

2.5.4 Películas y recubrimientos constituidos a base de multicomponentes

Es una práctica común elaborar formulaciones mixtas, de hidrocoloides y lípidos, para películas y recubrimientos, las cuales permiten mejorar sus propiedades y disminuir sus inconvenientes. Los hidrocoloides proporcionan permeabilidad selectiva al oxígeno y al bióxido de carbono, durabilidad e integridad; los lípidos generan una buena barrera al vapor de agua.

Otros de los compuestos que forman parte de las soluciones que darán origen a las películas o recubrimientos son los plastificantes y emulsificantes. Los emulsificantes favorecen la formación de la emulsión ayudando a su estabilización debido a su naturaleza (una parte polar y otra apolar) orientándose en la interface y disminuyendo así la tensión interfacial. Los plastificantes aumentan la flexibilidad de la película reduciendo la formación de grietas y escamas (Embuscado & Hube, 2009).

Las películas multicomponentes pueden ser formuladas como monocapa o bicapa. Para las películas monocapa es necesario una emulsión, aceite disperso en una fase hidrofílica (o/w) la cual contiene la disolución del hidrocoloide y posteriormente esta emulsión es secada. Es probable que se produzca una separación de fases, debido a la baja capacidad estabilizante del polímero que actúa como matriz soporte por lo que se realiza un proceso de cremado de los lípidos (Campos et al., 2010). Las películas bicapa son elaboradas en dos pasos, en el primero se forma la base de polisacárido o proteína y en la segundo, se aplica el lípido sobre la base que se formó previamente (Drago et al., 2010).

La efectividad de estas películas depende básicamente de la proporción de los componentes, su estado físico, la distribución que alcancen en la estructura final, la preparación y la composición de sus ingredientes de partida (Arrieta, 2011).

2.5.5 Otros componentes: Plastificantes

Con el fin de mejorar las propiedades mecánicas de las películas y los recubrimientos, es decir, generar una cubierta más flexible, evitando la formación de escamas y grietas se adicionan a las formulaciones otros componentes como son los plastificantes.

Los plastificantes se adicionan para perfeccionar las características de los películas y recubrimientos, sin embargo, reducen la capacidad de actuar como barreras frente a la humedad, oxígeno y aromas, debido a que debilitan las fuerzas intermoleculares a lo largo de las cadenas poliméricas (Irkin & Esmer, 2015). Entre los plastificantes más utilizados se encuentran los polioles como el glicerol, sorbitol, manitol, propilenglicol y polietilenglicol 200 y 400. Los plastificantes afectan la capacidad de atracción de agua del sistema y

aumentan la permeabilidad al oxígeno de las películas o recubrimientos (Suput, Lazic, Popovic, & Hromis, 2015).

El glicerol es de naturaleza química similar a la del polímero formador de la película o recubrimiento. Habitualmente se requiere del glicerol como plastificante en las formulaciones a base de polisacáridos y proteína, puede aumentar la flexibilidad debido a que incrementa el volumen libre o la movilidad molecular de los polímeros por la reducción de enlaces de hidrógeno internos entre las cadenas de polímeros. El glicerol es un líquido viscoso, sin olor ni color de sabor ligeramente dulce también conocido como glicerina, sus tres grupos hidroxilo son responsables de su solubilidad en agua y su naturaleza higroscópica (Figura 6). Es el componente principal de algunos lípidos. El decremento de la rigidez en las películas y recubrimientos es por la sustitución de las interacciones polímero-polímero por interacciones plastificante-polímero. El tamaño molecular, la configuración y el número total de grupos hidroxilo funcionales del plastificante, así como también su compatibilidad con el polímero, afectan el tipo y cantidad de interacciones entre el plastificante y las cadenas poliméricas (Lei et al., 2014).

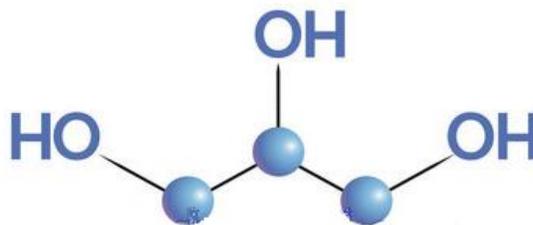


Figura 6. Estructura molecular del glicerol.

2.6 Películas poliméricas con actividad antimicrobiana

Dentro de la clasificación de los empaques activos, los empaques con actividad antimicrobiana son los más prometedores según Suppakul, Miltz, Sonneveld & Bigger (2003). Éstos son sistemas capaces de inhibir microorganismos patógenos o causantes del deterioro que podrían afectar a un alimento. Su mecanismo de acción se basa en la extensión de la fase de latencia y la reducción de la velocidad de crecimiento de los microorganismos,

lo cual prolonga la vida de anaquel y mantienen la inocuidad de los alimentos (Han, 2000). Los empaques antimicrobianos se clasifican en 2 grupos: los que contienen un agente antibacteriano que migra hacia la superficie del alimento o los que actúan sobre los microorganismos presentes en la superficie del alimento sin que el agente antimicrobiano migre (Suppakul et al., 2003).

Aunque la incorporación de compuestos antibacterianos puede realizarse tanto en materiales sintéticos como naturales, la atención se ha enfocado más hacia su incorporación en biopolímeros, ya que éstos, además de funcionar como barreras selectivas contra la transmisión de gases, vapores, solutos, pueden proporcionar protección mecánica y funcionar como acarreadores de aditivos, antioxidantes, nutrientes y compuestos antibacterianos, además de que tienen la ventaja adicional de ser sustratos biodegradables (Khwaldia, Perez, Banon, Desobry, & Hardy, 2004).

2.6.1 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son una mezcla compleja de varios compuestos aromáticos como son terpenos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y fenoles. Por ejemplo, procedente de la canela el cinamaldehído, del clavo de olor el eugenol, a partir del orégano el carvacrol, del tomillo el timol, entre otros más (Burt, 2004).

Los aceites esenciales poseen propiedades antimicrobianas y pueden ser incluidos en las matrices de las películas comestibles, para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos presentes en los alimentos, bien por su implicación en infecciones alimentarias, o por su capacidad de alterar las propiedades organolépticas y de conservación de los alimentos (Sánchez-González, Cháfer, Chiralt, & González-Martínez, 2010).

Diversos aceites esenciales son extraídos de plantas y especias como la canela, pimienta, clavo de olor, mostaza, orégano, romero, tomillo, pimienta, ajo, salvia y hierba de limón. Su mecanismo de acción es debido a su carácter lipofílico y su coeficiente de partición específico hace que se acumulen en la bicapa lipídica de la membrana citoplasmática de las células bacterianas, desestabilizando la estructura de la misma, perdiendo la permeabilidad para los protones y los iones más grandes (Burt, 2004).

2.6.2 Aceites orgánicos

Los ácidos orgánicos son los agentes más comúnmente empleados en la industria de alimentos como conservadores para inhibir el crecimiento microbiano. Algunos de estos ácidos orgánicos como: cítrico, málico, laurino, propiónico, tartárico, benzoico, sórbico y láctico, han sido incorporados en películas y recubrimientos comestibles, de manera directa o en forma de sales. Su espectro de acción antimicrobiana es muy amplio, va desde una disminución directa del pH del sustrato o del medio de crecimiento debido a un aumento de la concentración de protones, hasta la alteración de la permeabilidad de la membrana celular debido a la interacción con proteínas de la membrana, las cuales afectan su funcionamiento (Irkin & Esmer, 2015). Además, la forma no disociada de los ácidos orgánicos débiles puede penetrar la bicapa lipídica de la membrana celular de los microorganismos con mayor facilidad, y una vez dentro, la molécula de ácido es forzada a disociarse en aniones y protones cargados, debido al pH cercano a la neutralidad del citoplasma celular, y causar inactivación celular por daño en la señalización celular, transporte activo y material genético (Cowan, 1999).

2.6.3 Bacteriocinas

Algunas bacterias ácido lácticas (BAL) poseen la capacidad de producir péptidos antimicrobianos denominados bacteriocinas, en los últimos años han resultado de gran interés a investigadores por presentar un efecto antagónico contra especies de microorganismos taxonómicamente relacionadas, ya sean patógenos y/o causantes de deterioro y su aplicación en la conservación de alimentos (Omar et al., 2013). Dentro de los géneros de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas se encuentran *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Enterococcus* (Nes, 2011).

El término “colicina” se asignó en 1925 a proteínas antibacterianas de alto peso molecular producidas por bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*. Más tarde el término bacteriocina fue empleado para designar a los péptidos antimicrobianos producidos por bacterias lácticas. En 1969, la nisina fue valorada como segura para su uso en alimentos por la FAO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). En 1983 fue

incorporada en la lista de aditivos para alimentos de la Unión Europea (Beshkova & Frengova, 2012).

Las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas son péptidos pequeños que contienen entre 20 y 60 aminoácidos sintetizados ribosomalmente con actividad bactericida o bacteriostática. Son moléculas catiónicas, hidrofóbicas o anfifílicas (Papagianni & Anastasiadou, 2009). Presentan estructuras α -hélice o bien β -plegada y pueden ser ricas en tirosina o histidina, además de presentar puentes disulfuro, tioéter o grupos tiol libres (Garsa, Kumariya, Sood, Kumar, & Kapila, 2014; Gautam & Sharma, 2009). En la Tabla 2 se presentan los puntos isoeléctricos en un intervalo de pH 8.6 a 10.4 de algunas bacteriocinas.

Tabla 2. Características de algunas bacteriocinas de bacterias lácticas (Deegan, Cotter, Hill, & Ross, 2006)

Bacteriocina	Núm. 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
Pediocina AcH	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
Skacina P	43	4.4	8.8	4	4	2	2
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 A	55	5.8	8.6	4	4	1	1

*NA: no disponible. pI: punto isoeléctrico.

Por otra parte, la actividad antibacteriana de las bacteriocinas es mayor a valores de pH ácidos. Estos compuestos son destruidos a pH por arriba de 10. Su carga neta varía con el pH. Debido a su naturaleza hidrofóbica presentan tendencia a agregarse, especialmente cuando se almacenan a altas concentraciones o durante periodos largos de tiempo. Son relativamente estables al calor, pero parcialmente destruidas por arriba de los 100 °C, no se

afectan por tratamientos con ácidos orgánicos. Debido a su naturaleza proteica, se inactivan por proteasas incluyendo aquéllas de origen pancreático tales como la tripsina y α -quimotripsina, así como las de origen gástrico como la pepsina, de ahí que se inactiven durante su paso por el tracto gastrointestinal, sin ser absorbidos como compuestos activos (Reis, Paula, Casarotti, & Penna, 2012). Con respecto al espectro de inhibición, su actividad está dirigida hacia especies Gram-positivas bajas en guanina y citosina, desestabilizando la función de la membrana. No obstante, pueden presentar actividad contra microorganismos Gram-negativos siempre y cuando haya sido dañada la integridad de su membrana (Cotter et al., 2005).

2.6.3.1 Clasificación

Hace algunos años las bacteriocinas se clasificaban en 3 o 4 grupos con base en su espectro de inhibición, mecanismo de acción, naturaleza proteica, estructura química, tamaño y resistencia a la temperatura y presencia de receptores sobre la superficie de la célula para la adhesión (Papagianni & Anastasiadou, 2009). Sin embargo, en la Tabla 3 se observa una nueva clasificación propuesta por Cotter et al. (2005) en donde se dividen a las bacteriocinas en dos categorías: las que contienen lantibióticos (clase I), y las que no contienen lantibióticos (clase II).

En esta nueva clasificación se ha sugerido el nombre de “bacteriolisinas” para los péptidos antimicrobianos anteriormente clasificados dentro de la clase III y que se caracterizan por poseer un peso molecular >30 kDa, con actividad hidrolítica y que además son termolábiles. Otra característica de esta clasificación es que no se incluye a aquellos péptidos que podrían clasificarse dentro de la clase IV, debido a que su existencia no ha sido totalmente demostrada.

Tabla 3. Clasificación de las bacteriocinas según (Cotter et al., 2005).

Clasificación*	Características	Ejemplos
<i>Clase I</i>	Incluye de 1 a 2 péptidos lantibióticos.	Un único péptido: nisina, mersacidina, lacticina 481.
Contiene lantionina Bacteriocinas/lantibióticos	11 subclases han sido propuestas	Dos péptidos: lacticina 3147, citolisina.
<i>Clase II</i>	Clase heterogénea de péptidos pequeños	Clase IIa: pediocina PA, Leucocina A
Bacteriolisinas	IIa: tipo pediocina	Clase IIb: lacticina F
Proteínas no bacteriolíticas**	IIb: dos péptidos	Clase IIc: enterocina AS48, reuterina 6
	IIc: cíclicas, formalmente clase V	Clase IId: lactococina A, divergicina A
	IId: péptido lineal no tipo pediocina.	Proteínas grandes, termolábiles, muchas veces, hidrolasas.

*Bacteriocinas clase IV sin fracción proteica no son incluidas porque aún no han sido demostradas

**Sugiere que éstas no han logrado ser consideradas como bacteriocinas.

2.6.3.2 Mecanismo de acción

Las bacteriocinas poseen actividad bactericida y bacteriolítica y ejercen su acción contra bacterias Gram-positivas, las cuales pierden su viabilidad rápidamente incluso a concentraciones tan bajas como 0.01 µg/mL (Drosinos, Mataragas, & Paramithiotis, 2008). Estas concentraciones pueden variar con la composición de lípidos en la membrana de la célula sensible y con el pH del medio (Gautam & Sharma, 2009). Su actividad antibacteriana se atribuye a la desestabilización de las funciones de la membrana citoplásmica. Particularmente los lantibióticos, inhiben a las células sensibles o blanco a través de la formación de poros en la membrana lo cual afecta al potencial transmembranal y/o el gradiente de pH. Esto afecta la permeabilidad ocasionando que moléculas pequeñas salgan del citoplasma y que el ATP no pueda ser sintetizado (Duhan, Nehra, Gahlawat, Saharan, & Surekha, 2013).

Las bacteriocinas de la clase I pueden inducir la formación de poros de acuerdo con el modelo de cuña y las bacteriocinas clase II pueden funcionar creando poros tipo barril, orientando péptidos paralelos a la superficie de la membrana. Por su parte, las bacteriocinas

clase II tienen una estructura anfifílica y helicoidal, lo cual permite a éstas insertarse dentro de la membrana de la célula sensible, ocasionando la muerte celular (Figura 7). Por otra parte, dado que las bacteriocinas son moléculas cargadas positivamente que poseen secciones hidrofóbicas, se ha observado que interacciones electrostáticas establecidas con los grupos fosfato (los cuales actúan como receptores primarios para las bacteriocinas) cargados negativamente sobre la célula sensible, contribuyan para la unión inicial con las membranas para la iniciación de formación de poros (H. Chen & Hoover, 2003). Asimismo, se cree que es probable que la porción hidrofóbica insertada dentro de la membrana forme poros (Cleveland, Montville, Nes, & Chikindas, 2001).

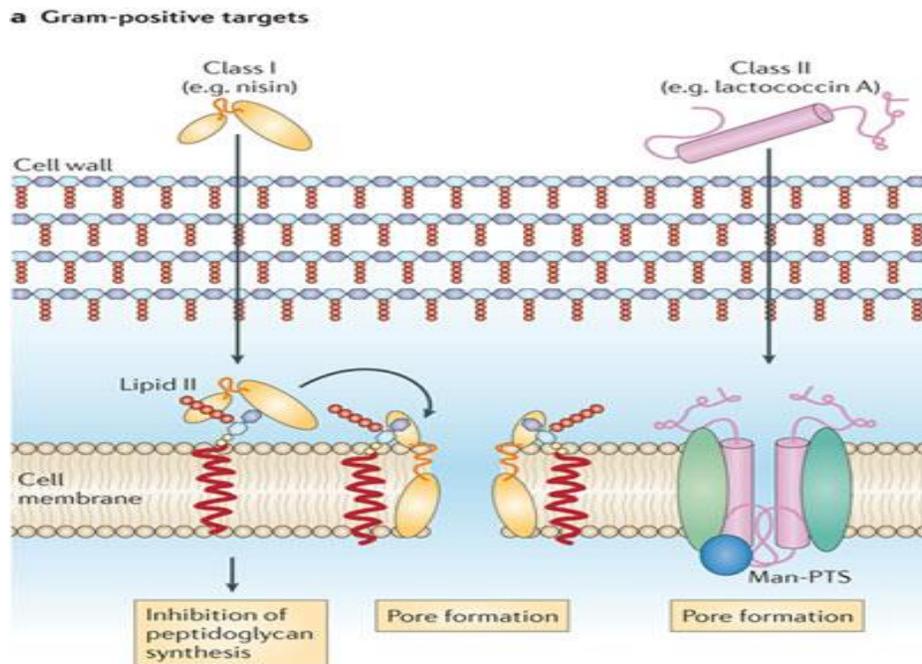


Figura 7. Esquemización del modo de acción de las bacteriocinas. a) Modo de acción de la clase I cuyo representante es la nisina; muestra el ataque al lípido II en la pared celular, inhibición de la síntesis de peptidoglicano y formación de poros en la membrana celular. b) Modo de acción de la clase II como ejemplo se muestra la Lactococina A (Cotter et al., 2005).

Finalmente, es importante hacer notar que los microorganismos productores de bacteriocinas también poseen genes que codifican para mecanismos de inmunidad, los cuales distinguen entre el microorganismo productor y el no productor (Cotter et al., 2005). Esta inmunidad que presentan las bacterias bacteriocinogénicas contra sus propias bacteriocinas es un fenómeno que distingue a las bacteriocinas de los antibióticos (Cleveland et al., 2001).

En general, para la elaboración de envases activos comestibles, la tendencia es elegir antimicrobianos seguros (no tóxicos) y procedentes de fuentes naturales, debido en parte a que muchos consumidores demandan productos más frescos, poco o nada procesados, seguros y más saludables, pero con una menor cantidad de aditivos sintéticos. Por otra parte, los compuestos con propiedades antimicrobianas se utilizan para aumentar la vida útil o seguridad de los alimentos mediante el control de la microbiota, ya sea propia o adquirida. Entre los antimicrobianos más comúnmente empleados destacan los ácidos orgánicos, quitosano, polipéptidos como la nisina, sistema lactoperoxidasa, extractos de plantas y aceites esenciales. En la Tabla 4 se presentan algunas investigaciones reportadas sobre envases comestibles con actividad antimicrobiana (Devlieghere, Vermeiren, & Debevere, 2004). En este sentido, los antimicrobianos de origen natural son preferibles a los sintéticos para el diseño de envases comestibles, ya que al ser compuestos naturales están menos asociados a efectos adversos ocasionados por los conservantes sintéticos. Sin embargo, la toxicidad de los agentes activos naturales empleados en este tipo de tecnologías (envasado activo comestible) debe evaluarse igualmente (Vásconez, Flores, Campos, Alvarado, & Gerschenson, 2009).

Tabla 4. Películas comestibles con la inclusión de distintos agentes antimicrobianos.

Biopolímero	Antimicrobiano	Microorganismo indicador	Resultados	Referencias
Carboximetilcelulosa (CMC)	Aceite esencial: <i>Zataria multiflora</i> Boiss (1, 2, y 3% (v/v))	<i>S. aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>Salmonella typhimurium</i>	Películas de carboximetilcelulosa incorporadas con el aceite esencial de <i>Zataria multiflora</i> Boiss en todas las concentraciones probadas fueron eficaces contra las bacterias seleccionadas (tanto Gram-positivas y Gram-negativa) en comparación con la película de control (sin ZEO).	Dashipour et al. (2015)
Caseinato de sodio	Cepas: <i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Lactobacillus reuteri</i>	<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-González, Quintero Saavedra, & Chiralt (2014)
Gelatina de bovino	Aceite esencial <i>Zataria multiflora</i> (2, 4, 6 y 8% p/p)	Gram-negativas <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> . Gram-positivas <i>S.aureus</i> y <i>B. subtilis</i>	La incorporación del aceite esencial de <i>Zataria multiflora</i> Boiss en las películas de gelatina provocó una disminución significativa en la hinchazón y la absorción de agua y el aumento de la solubilidad y PVA. Exhibió excelentes propiedades antibacterianas contra bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas.	Kavoosi, Rahmatollahi, Dadfar, & Purfard (2014)
Metilcelulosa y nanopartículas de óxido de zinc (ZnO)	Pediocina	<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.	Espitia et al. (2013)
Hidroxipropilmetilcelulosa	Nisaplin (nisina)	<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)

Proteína de suero	Nisina, ácido málico (AM), láctico (AL) y cítrico (AC)	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Listeria innocua</i>	Los 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, Ferreira, & Sousa (2009)
Pectina Ácido Poliláctico (PLA)	Nisina	<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, Liu, Zhang, & Hicks (2009)

2.7 Riesgos microbiológicos asociados al consumo de queso.

Los quesos son alimentos listos para consumir. La contaminación por microorganismos patógenos y/o deterioradores puede ocurrir en cualquiera de las etapas de elaboración. Por lo tanto, es necesario controlar las principales fuentes de patógenos y los posibles mecanismos de contaminación de la cadena lechera.

Los patógenos transmitidos por los alimentos de interés en el presente estudio fueron: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Estos, fueron seleccionados porque está bien documentado que brotes de origen alimentario han sido causados por consumo de distintos tipos de quesos (Araújo, Pagliares, Queiroz, & Freitas-Almeida, 2002; Conedera et al., 2004; Foschino, Invernizzi, Barucco, & Stradiotto, 2002; Rudolf & Scherer, 2001). La presencia de estas bacterias patógenas en quesos contaminados después de la pasteurización, representan una amenaza para la salud humana debido al incremento de casos y la gravedad de los síntomas (Tompkin, 2002).

L. monocytogenes es causante de la listeriosis, una enfermedad grave infecciosa transmitida por los alimentos, es caracterizada por una alta tasa de mortandad y de gran impacto económico derivado de los brotes asociados con el consumo de alimentos. *L. monocytogenes* es un bacilo Gram-positivo, anaerobio facultativo, con capacidad de sobrevivir a diferentes temperaturas (> 0 a 45 °C), pH extremo (9.6) y altas concentraciones de sal (>20%), características que le permiten crecer en suelo, cuerpos de agua, agua residual y alimentos (Lundén, Tolvanen, & Korkeala, 2004). La contaminación de los alimentos es, por lo general, el resultado de eventos simultáneos que se presentan en varios puntos de la cadena alimentaria, entre los que se incluyen: a) alimentos y fuentes de contaminación del medio ambiente; b) condiciones que favorecen el crecimiento del patógeno y c) falta de buenas prácticas de higiene y de programas de monitoreo en la cadena alimentaria (Donnelly, 2001).

La listeriosis humana es una enfermedad con tasa de mortalidad alta (20 a 30%), que incluye padecimientos severos como la meningitis, septicemias y abortos; afecta principalmente a personas inmunocomprometidas e inmunodeficientes, así como a embarazadas, ancianos y niños. La forma gastrointestinal ocurre en personas sin trastornos inmunes y el curso de la infección que provoca se da en las 20 horas posteriores a la ingestión

del alimento. Ésta se caracteriza por náuseas, fiebre, vómitos y diarrea. Aunque *L. monocytogenes* se transmite por diferentes vías (fecal-oral, animal-hombre y madre-feto), la principal fuente de transmisión son los alimentos contaminados. La dosis infectiva se estima entre 10^4 - 10^6 UFC/g de alimento ingerido, pero puede ser menor (0.3 UFC/g) en personas susceptibles (Donnelly, 2001). En cualquiera de los casos, la dosis dependerá del alimento, la virulencia de la cepa y la susceptibilidad del hospedero (Carpentier & Cerf, 2011).

Algunos casos de listeriosis se han asociado al consumo de quesos de pasta blanda y de leche no pasteurizada. En 2012, de las 32 encuestas llevadas a cabo en la Unión Europea (UE) y citadas por el ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) en su informe anual (ECDC, 2014) cuatro de ellas estuvieron relacionadas con *L. monocytogenes* y en dos de ellas se identificó el queso como causa de la infección. Del mismo modo, se han reportado varios brotes vinculados al consumo de productos lácteos en Estados Unidos, el último de ellos sucedió en marzo de 2014. En el resumen de casos de listeriosis ocurridos en Estados Unidos y reportados por el sistema de vigilancia de infecciones alimentarias indican que de los 28 brotes registrados en este periodo, en los que enfermaron 359 personas y fallecieron 38, los productos lácteos, concretamente los quesos frescos *Mexican style* (Figura 8), estuvieron implicados en cuatro de los brotes y en tres de ellos se demostró que este alimento había sido fabricado a partir de leche no pasteurizada (Cartwright et al., 2013).



Figura 8. Queso fresco estilo mexicano.

S. aureus es una causa importante de intoxicaciones de origen alimentario en todo el mundo. Es una bacteria anaerobia facultativa, Gram-positiva, productora de coagulasa,

catalasa, inmóvil y no esporulada que se encuentra ampliamente distribuida, estimándose que una de cada tres personas se hallan colonizadas, aunque no infectadas por ella (Cervantes-García, García-González, & Salazar-Schettino, 2014).

La intoxicación alimentaria estafilocócica es causada por la ingestión de alimentos que contienen una o más enterotoxinas preformadas producidas por *S. aureus*. Los síntomas tienen un inicio rápido e incluyen náuseas, vómitos y diarreas (Boerema, Clemens, & Brightwell, 2006). *S. aureus* es considerado como la tercera causa más importante de enfermedad en el mundo entre las enfermedades transmitidas por los alimentos (Kousta, Mataragas, Skandamis, & Drosinos, 2010; Normanno et al., 2005).

En un estudio realizado por Tondo, Guimaraes, Henriques & Ayub (2000) a una planta de procesamiento de productos lácteos, con el fin de examinar la presencia de *S. aureus* e identificar posibles fuentes de contaminación, identificaron el 90.4% (19/21) de las muestras de leche cruda fueron contaminados con *S. aureus* y el 35.2% (19/51) de los manipuladores de alimentos eran portadores asintomáticos de *S. aureus*. En el mismo estudio, la leche cruda se estableció como la principal fuente de contaminación con *S. aureus* para cuatro productos finales contaminados y los manipuladores de alimentos eran una posible fuente de contaminación para otro producto final.

Escherichia coli es un patógeno de transmisión alimentaria incluyendo queso; presente habitualmente en el aparato digestivo de los animales sanos por lo que su presencia en la leche cruda suele indicar una contaminación de origen fecal ya sea directa o indirecta. Del mismo modo este microorganismo puede ser excretado con la leche en el caso de una mastitis. Sus propiedades de virulencia, sus mecanismos de patogenicidad y el síndrome clínico que ocasionan algunas cepas y serotipos de *Escherichia coli* han determinado su clasificación en distintos grupos (enteropatogénico, enterotoxigénico, enteroinvasivo, enteroagregativo y enterohemorrágico). Algunas de las cepas son capaces de producir verotoxinas (VTEC). Entre las cepas de VTEC patógenas para el hombre la más frecuente es el serotipo O157:H7 (VTEC O157). Este serotipo y otros de menor frecuencia se han aislado con frecuencia de leche cruda de vaca, con tasas de contaminación comprendidas entre el 1 y el 33.5 %. En la Unión Europea (UE), en 2012 se notificaron 5671 casos de infecciones

alimentarias ocasionadas por *E. coli*, relacionándose a la leche en los casos notificados en los que se detectó el alimento portador (Stephan et al., 2008).

Staphylococcus aureus es considerado uno de los patógenos más frecuentes que causan infecciones intra-mamarias de las vacas lecheras. Y puede ser excretado en la leche en concentraciones de hasta 8 log UFC/mL. Por otro lado, *L. monocytogenes* ha sido también asociada a infección por mastitis (inflamación de la glándula mamaria que provoca cambios en la composición bioquímica de la leche y en el tejido de la glándula) persistente y los reportes de la concentración varían de 3 a 6 log UFC/mL. La incidencia de mastitis intra-mamaria por *E. coli* es baja, además de no ser documentada (Nickerson, 2002).

De acuerdo con estudios, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., y *Yersinia enterocolitica* son los agentes identificados con mayor frecuencia relacionados en los brotes con el consumo de leche cruda o productos derivados de la misma (Claeys et al., 2013). La Tabla 5, aporta una recopilación entre 1985 y 2004 de brotes por *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli* ocasionados por el consumo de quesos. Desafortunadamente, la investigación epidemiológica en México sobre la incidencia y formas clínicas de estos patógenos es muy escasa y no es algo normal.

Los estudios reconocen que la leche cruda puede transmitir microorganismos patógenos procedentes en muchos casos de las heces de animales considerados sanos y de los materiales y ambiente relacionados con el proceso de obtención y conservación de la misma. El uso extremado de prácticas higiénicas durante la ordeña y el manejo posterior de la leche cruda puede reducir, pero no eliminar el riesgo de la contaminación láctea, por lo que la pasteurización es el único método eficaz que garantizar la eliminación. Sin embargo, en muchos casos ocurre una contaminación post-procesamiento aumentando así, el riesgo de infecciones alimentarias transmitidas por el consumo de leche y sus derivados. Particularmente para aquellos grupos que pueden ser considerados como vulnerables, tales como niños, ancianos, embarazadas y consumidores con sistema inmunitario deprimido.

Tabla 5. Reporte de brotes de enfermedades de origen alimentario relacionados con quesos.

Tipo de Queso	Patógeno	No. de casos (muertes)	Año	País de origen	Referencia
Queso de pasta blanda estilo mexicano	<i>L. monocytogenes</i>	142 (48)	1985-1987	EE.UU.	Linnan, Mascola, Lou, Goulet, & May, 1988
Queso mexicano hecho con leche cruda	<i>L. monocytogenes</i>	13	2000	EE.UU.	MacDonald et al. (2005)
Queso suave	<i>L. monocytogenes</i>	33	2001	Suecia	Carrique-Mas et al. (2003)
Queso de cabra no pasteurizado	<i>E. coli</i> O157:H7	3	2004	Francia	Espie et al. (2006)
Queso Gouda	<i>E. coli</i> O157: H7	13	2002-2003	Canadá	Honish et al. (2005)
Queso artesanal	<i>S. aureus</i>	7	1994	Brasil	Evenson, Ward, Bernstein, & Bergdoll, 1988

Para ello recientemente en materia de conservación alimentaria el tema de películas y recubrimientos comestibles con actividad antimicrobiana han despertado un especial interés, debido a que pueden extender la vida útil, mejorar la calidad y seguridad de los alimentos. En la Tabla 6 se presentan algunos reportes científicos sobre elaboración de películas comestibles con la adición de distintos agentes antimicrobianos, aplicadas en quesos, como una solución potencial a estos problemas. Es relevante hacer mención que son realmente pocos los reportes en la literatura y sobre todo en México, en los que se haya formulado una biopelícula aplicada en la conservación de los quesos. Siendo de esta manera la presente investigación científica, de vital importancia para lograr extender la vida de anaquel de los quesos y sobre todo ofrecer al consumidor la total y entera confianza de que el producto es seguro e inocuo.

Tabla 6. Películas con antimicrobianos elaborados a partir de biopolímeros y su aplicación en la conservación de distintos tipos de quesos.

Producto	Biopolímero	Antimicrobiano	Resultados	Referencias
Queso Gouda	Proteína de suero de leche	Lisozima modificada y EDTA	La adición de lisozima modificada y EDTA en la biopelícula mostró una disminución estable a 2 log UFC/g para <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella typhi</i> . El recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> permaneció estable a 4 log UFC/g. El experimento se llevó a cabo durante 8 semanas a 10 °C y 85 % HR.	Haniyah, Eka, Thohari, Setyowati, & Manab, 2016
Queso fresco en rodajas	Algas rojas	Extracto de semillas de pomelo/toronja (1 % p/p)	Fue probada esta película para inhibir el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> O157: H7 y <i>Listeria monocytogenes</i> , las muestras fueron almacenadas a 4 °C durante 15 días. La película redujo la población de <i>E. coli</i> O157: H7 por 1.21 log UFC/g en comparación con el control y 0.85 log UFC/g para el caso de <i>L. monocytogenes</i> . Siendo las biopelículas un material útil para extender la vida de anaquel del queso.	Shin, Song, Seo, & Song, 2012
Queso Ricotta	Galactomananos de <i>Gleditsia triacanthos</i>	Nisina (50 UI/g)	La película antimicrobiana se evaluó contra <i>L. monocytogenes</i> (10 ⁶ UFC/mL) probado en muestras de queso Ricotta. Se logró reducir la concentración bacteriana a 2.2 log UFC g ⁻¹ durante 28 días de almacenamiento a 4 °C.	Martins, Cerqueira, Souza, Carmo Avides, & Vicente, 2010
Queso Mini Babybel® rojo	Caseinato de sodio	Nisina (1000 UI/cm ²)	La presencia de la película activa redujo 1.1 log UFC/g los recuentos de <i>Listeria innocua</i> en muestras de queso después de una semana de almacenamiento a 4 °C en comparación con las muestras control.	Cao-Hoang, Chaine, Gregoire, & Wache, 2010

Queso Castelo Branco	Proteína de suero de leche	Nisina (50 IU/mL) Natamicina Ácido málico	La natamicina y el ácido málico mejoraron la actividad inhibidora de la nisina contra <i>L. monocytogenes</i> en un monitoreo de 7 días a 4 °C.	Pintado, Ferreira, & Sousa, 2010
Queso Mozzarella	Quitosano	Lisozima (60 % p/p)	Se obtuvo una reducción en el queso tratado de 0.43 a 1.25 log en <i>Escherichia coli</i> , de 0.40 a 1.40 log en el caso de <i>Pseudomonas fluorescens</i> y de 0.32 a 1.35 log en <i>Listeria</i> durante 14 días de almacenamiento a 10 °C.	Duan, Park, Daeschel, & Zhao, 2007
Queso Gorgonzola	Celulosa	Natamicina (0, 0.2, 0.5, 1, 2 y 4 % p/p)	No hubo crecimiento significativo de <i>Penicillium roqueforti</i> (7.8×10^4 UFC/mL) en las concentraciones de 2 y 4% después de 15 días a 25 °C.	de Oliveira, de Fátima Ferreira Soares, Pereira, & de Freitas Fraga, 2007

2.8 Definición y origen del queso

Es probable que el queso fuera hecho en primera instancia por accidente, tal vez se obtuvo durante la transportación de la leche en los estómagos de animales y que debido a la acción de enzimas coagulantes convirtieron la leche acidificada en una masa sólida. De esta manera se descubrió que el queso poseía mayor durabilidad que la leche original y así se podían obtener alimentos adecuados para las largas jornadas, en muchas regiones su fabricación ha sido artesanal, pero gracias a su alto valor nutritivo su proceso se ha industrializado (Wagh, Pushpadass, Emerald, & Nath, 2014).

El origen de la elaboración del queso no se sabe con certeza, pero existen referencias de que se consumía desde tiempos bíblicos, en aquel entonces, la coagulación de la leche se conseguía de muchas maneras desde utilizar los cuajos de liebre y cabrito, así como la savia de una rama de higuera y el vinagre, hasta usar la flor de cardo, la semilla de azafrán silvestre, el tomillo y extractos de piña verde (de S. Medeiros et al., 2013).

El término queso se le da a un amplio grupo de productos lácteos elaborados en todo el mundo bajo una amplia variedad de formas, tamaños y sabores. El principal objetivo en la elaboración de estos productos es conservar los principales componentes de la leche. Existe una gran diversidad en la clasificación de los quesos, el más común es aquel que tiene en cuenta la textura que está relacionada directamente con el contenido de humedad y grasa, es así que los podemos encontrar como duros, semiduros y blandos. Algunos otros criterios tienen en cuenta la especie animal de la cual se obtiene la leche, el método de coagulación, el tiempo de maduración, el origen del queso y la flora predominante durante la maduración (Kampf & Nussinovitch, 2000).

La leche es el componente principal en la elaboración de los quesos, ésta ha sido definida como el producto destinado para el consumo humano proveniente de la secreción natural de las glándulas mamarias de los mamíferos sanos y bien alimentados, debe de estar libre de calostro, es de composición compleja, color blanquecino y opaco, con un pH cercano al neutro y de sabor dulce, además debe de cumplir con las características físicas, microbiológicas e higiénicas establecidas. Su finalidad es la alimentación de la cría durante sus primeros meses de vida (Camacho, 2011).

2.8.1 Los quesos típicos mexicanos

Los quesos suaves son probablemente los más reconocidos de los quesos hispanos. Son quesos blancos que no funden cuando son calentados, característica ideal para platillos sometidos a cocción, manteniendo su forma o posición, y no fluye. Por otro lado, son muy utilizados como botanas, en sopas y ensaladas. Un ejemplo de un queso hispano suave es el queso fresco (Gonzalez-Cordova et al., 2016).

Algunos de los quesos típicos mexicanos considerados como quesos suaves son: el queso tradicional ranchero, el queso panela y el requesón. Los quesos frescos son principalmente quesos de pasta fresca, salada, sin madurar y constituyen los quesos de mayor consumo en México. Sin embargo, estos quesos pueden tener problemas de consistencia y retención de humedad si no se procesan adecuadamente. Los quesos frescos deben consumirse en pocos días y su transporte y conservación se deben hacer a temperaturas entre 2 a 4 °C. Los quesos mexicanos más populares y de mayor consumo en México se muestran en la Tabla 7 (Ramírez-López & Vélez-Ruiz, 2012).

Tabla 7. Quesos mexicanos más populares (Rodríguez-Lara, 2009)

Variedad de queso	Textura de la pasta
Panela	Blanda elástica
Ranchero	Blanda molida
Requesón	Blanda
Sierra	Compacta molida
Oaxaca	Semiblanda hilada
Asadero	Semiblanda hilada
Chihuahua (madurado)	Semiblanda compacta
Manchego (madurado)	Semiblanda compacta

De esta lista de quesos típicos mexicanos, el queso ranchero, el panela y el requesón son considerados quesos frescos por su alto porcentaje de humedad.

3 JUSTIFICACIÓN

Los quesos frescos son productos lácteos tradicionales mexicanos, debido a su alto contenido de humedad, son muy perecederos y tienen una vida útil estimada de aproximadamente una semana cuando se mantienen a una temperatura de 2 °C. Aunque reciben un tratamiento térmico durante su elaboración, puede ocurrir una contaminación post-procesamiento por microorganismos, causando el deterioro del queso y un riesgo para la salud de los consumidores. Microorganismos indeseables pueden causar defectos en el sabor, textura y apariencia del queso y resultar en pérdidas económicas. Con el aumento en la producción de quesos frescos, hay una gran necesidad de mejorar la seguridad microbiana del queso mediante el control o la eliminación de contaminantes microbianos de post-procesado.

Este proyecto nace de la necesidad de extender la vida de anaquel de dicho producto lácteo y al problema ecológico que representa el desecho final de los materiales plásticos derivados del petróleo, así como a la utilización de recursos que sean económicos, seguros, de fuentes renovables, y sobre todo que sean biodegradables. Para lograr este cometido, se ha recurrido a la implementación de películas comestibles elaboradas a partir de macromoléculas de origen natural, como sustitutos de polímeros sintéticos. Éstas han sido utilizadas desde hace algún tiempo, su finalidad primordial consiste en proteger de ataques microbiológicos y prevenir la pérdida de agua durante el almacenamiento de los productos alimenticios, así como convertirse en una barrera a la transferencia de masa, proteger a los ingredientes y mejorar la integridad mecánica de los productos envasados.

Las películas comestibles pueden servir como vehículos para una amplia gama de aditivos, incluyendo compuestos antimicrobianos para inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos o deterioradores. Un ejemplo de antimicrobiano que puede incorporarse en estas películas, son las bacteriocinas, las cuales presentan un amplio espectro inhibitorio, otras de sus ventajas sobre otros conservadores de alimentos son: no toxicidad, inmediata digestibilidad, estabilidad al calor a bajo pH así como ausencia de color y sabor. La incorporación de agentes antimicrobianos como bacteriocinas en películas comestibles, permite su liberación gradual y controlada, prolongando así su acción bio-protectora.

4 HIPÓTESIS

El péptido antimicrobiano tipo bacteriocina producido por *Streptococcus infantarius*, bacteria aislada del pozol, podrá ser incorporado en películas bioactivas a base de gelana-pectina y EDTA; estas películas mostrarán actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, y la inclusión de estos agentes antimicrobianos (péptido antimicrobiano y EDTA) no afectará significativamente las propiedades de barrera ni las propiedades mecánicas de las películas, las cuales representarán una alternativa para el establecimiento de una plataforma tecnológica viable para la bioconservación de quesos.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Elaborar y caracterizar películas a base de pectina-gelana, bacteriocinas y EDTA, con potencial bioconservador de queso fresco, para contribuir al desarrollo de tecnologías de barrera en la conservación de alimentos.

5.2 Objetivos específicos

- Definir la Concentración Mínima Inhibitoria de los compuestos antimicrobianos producidos por *Streptococcus infantarius*, bacteria aislada del pozol y EDTA sobre *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* a 35 °C.
- Establecer la formulación de películas pectina-gelana con la inclusión de bacteriocinas y EDTA, con potencial bioconservador en un sistema modelo a base de queso fresco.
- Determinar la actividad antimicrobiana de películas a base de pectina, gelana, bacteriocinas y EDTA contra tres microorganismos indicadores: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* durante la vida de anaquel de un sistema modelo a base de queso fresco.
- Determinar las propiedades mecánicas y de transferencia de masa de las películas pectina, gelana, bacteriocinas y EDTA a través de pruebas de tensión uniaxial y de permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

6.1.1 Biopolímeros

Pectina cítrica (GENU[®] Pectin, DE=36%, CP-Kelco, Estados Unidos de América), gelana de bajo acilo (Kelcogel, CP-Kelco, Estados Unidos de América), glicerol (Química Meyer, México), CaCl₂ (JT Baker, México).

6.1.2 Agente antimicrobiano (CAM)

El agente antimicrobiano empleado en esta investigación fue un extracto concentrado de caldos de fermentación de la bacteria ácido láctica (BAL), *Streptococcus infantarius*, combinado con EDTA.

6.1.3 Microorganismos

6.1.3.1 *Streptococcus infantarius*

Bacteria ácido láctica aislada del “pozol”, bebida refrescante, ácida no alcohólica, obtenida de la fermentación espontánea de masa de maíz nixtamalizado y cacao; originaria del sureste de México. El microorganismo fue donado por el grupo de investigación de las Dras. Carmen Wachter Rodarte y Gloria Díaz Ruiz, Depto. Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. La bacteria se conservó a -80°C en viales de 1.5 mL, los cuales contenían 0.3 mL de glicerol y 1.3 de la cepa crecida en caldo De Man-Rogosa-Sharpe (MRS).

6.1.3.2 *Listeria monocytogenes* (CFQ-B-104), *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*

Estos microorganismos indicadores fueron donados por la Dra. Gloria Díaz Ruiz del Cepario de la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Se conservaron 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 Infusión Cerebro Corazón (BHI).

6.1.4 Medios de cultivo

Para la preparación de viales de conservación y activación de microorganismos se usó caldo De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (BD® DIFCO) para la bacteria ácido-láctica, y caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) (Bioxon®) para *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. aureus*. Para las pruebas de actividad antimicrobiana, "difusión en agar por gota", se utilizó BHI-agar suave formulado con una mezcla de caldo BHI y bacto-agar (BD® DIFCO). Para determinar la concentración mínima inhibitoria para los microorganismos indicadores se usó caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI). En las pruebas de crecimiento selectivo y diferencial de *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. aureus*, así como en la prueba de actividad antimicrobiana de las películas, se utilizó medio Oxford (BD® DIFCO), Agar MacConkey (Sigma Aldrich) y Baird Parker (BD® DIFCO), respectivamente.

6.2 Métodos

6.2.1 Producción de péptidos antimicrobianos por *Streptococcus infantarius*

6.2.1.1 Fermentación nivel matraz

Se realizaron fermentaciones a nivel matraz, para ello se activaron en 5 mL de caldo MRS estéril, 50 µL 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 inoculó (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 MaxQ 5000). De acuerdo con López-Ortega (2014) la máxima capacidad antilisterial del compuesto antimicrobiano se obtiene a las 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 2 N; enseguida se concentró en un rotavapor con controlador de vacío (BUCHI R-215; 60 °C a 35 rpm; 72 mbar). 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 (CAM) se colocó en tubos Corning® estériles y se almacenó a -80 °C (Figura 9).



Figura 9. Técnica de producción de concentrado con actividad antimicrobiana por *Streptococcus infantarius*.

6.2.1.2 Fermentación por lote nivel biorreactor

Después del periodo de incubación (24 h a 30 °C), 24 mL de caldo de la bacteria ácido-láctica en MRS fueron inoculados (1% v/v) por inyección en un biorreactor MTB autoclavable de 3 L (Applikon Biotechnology) (Figura 10) y el proceso de fermentación fue realizado con las siguientes condiciones de operación: volumen de operación 2.4 L de Medio MRS (pH inicial de 6.7 ± 0.2), 30 °C (control mediante baño recirculador PolyScience), agitación a 200 rpm (2 turbinas Rushton de 45 mm de diámetro) y aireación de 1 L/min.

El biorreactor fue armado incluyendo electrodos de pH y oxígeno disuelto insertos en la tapa superior, los cuales fueron calibrados antes de la esterilización del medio *in situ*. El flujo de aire, pH, oxígeno disuelto y temperatura fueron monitoreados y controlados con una bioconsola (Bio Controller ADI-1030) acoplada a una PC usando el software BioXpert (Versión 1.1x).



Figura 10. Biorreactor MTB autoclavable de 3 L (Applikon Biotechnology).

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

Se determinó la actividad antimicrobiana del concentrado de *S. infantarius* adaptando el método de difusión en agar por gota, el microorganismo indicador fue *Listeria monocytogenes* (Lm). Se realizó la activación del microorganismo indicador inoculando 50 μL del abasto de conservación en 5 mL de BHI, llevando a incubación a 35 °C por un periodo de 24 h; posteriormente, se tomaron 50 μL de este caldo para inocular 5 mL de caldo BHI estéril e incubar por 6 h a 35°C (esto resultó en un cultivo de Lm en fase log, con una concentración de 1×10^9 UFC/mL). En la campana de flujo laminar se adicionó 58 μL del cultivo activo del microorganismo indicador en 10 mL de agar fundido BHI ($37 \pm 2^\circ\text{C}$), se mezcló suavemente y se vertió en caja Petri estéril, hasta gelificar.

El método de “Difusión en agar por gota” consiste en evaluar halos de inhibición del crecimiento de un microorganismo indicador (*L. monocytogenes* en esta investigación) 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, probándose hasta 2^8 . Posteriormente, en sentido contrario a las manecillas del reloj se colocó una gota de 10 μL de cada dilución sobre el agar suave BHI solidificado (10 mL), en la periferia, el cual

previamente fue inoculado con 58 μL de cultivo de Lm (10^9 UFC/Caja). Una gota del antimicrobiano sin diluir se coloca en el centro de cada una de las cajas inoculadas con *L. monocytogenes*. Las cajas se incuban a 35 °C durante 24 h (Figura 11). Al término de la incubación se midieron los halos de inhibición con un vernier (Fowler, México) con 0.01 mm de exactitud (Mendoza Mendoza, 2012).

La actividad antimicrobiana se reportó en Unidades Arbitrarias de Actividad (UA) por mL de caldo de fermentación. Se consideró una actividad unitaria como aquella correspondiente a la máxima dilución ensayada en la cual se obtuvo un halo claro de inhibición de Lm.

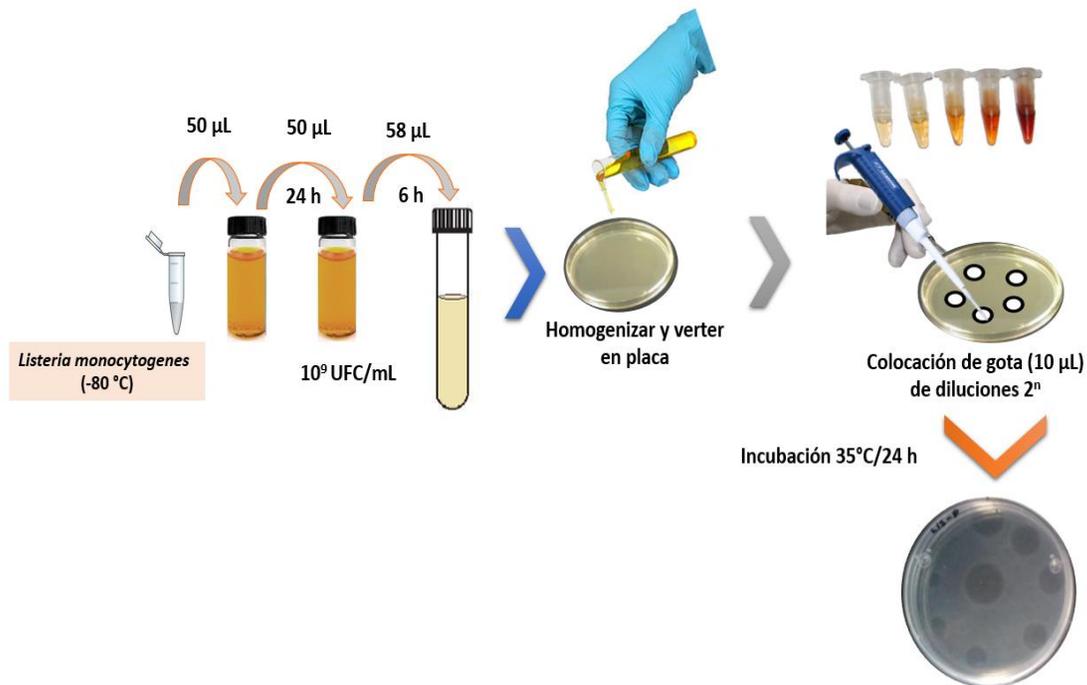


Figura 11. Técnica de la difusión en agar por gota frente a *L. monocytogenes*.

6.2.3 Determinación de la concentración inhibitoria mínima

Las técnicas de dilución en caldo, se utilizan para medir la actividad "in vitro" de un antimicrobiano frente a un cultivo bacteriano. Estos métodos se basan en la preparación de una serie placas con caldo, a los cuales se les agrega el antimicrobiano en distintas

concentraciones. Luego se inoculan cada una de las placas con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Las pruebas se examinan después de incubar y se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado. El resultado final depende significativamente de la metodología empleada. Por ello, para obtener valores reproducibles, cada detalle técnico debe ser cuidadosamente controlado.

Medio de cultivo. Se utilizó el medio BHI (Brain Heart Infusion: Infusión de cerebro de ternera, infusión corazón vacuno, peptona, cloruro de sodio, glucosa y fosfato disódico; pH 7.4 ± 0.2).

Inóculo. Fueron estudiadas por separado las cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* con 24 horas de incubación. De cada uno de los microorganismos, se preparó una suspensión y se ajustó para obtener una concentración de 4.57×10^4 , 7.21×10^4 , 4.25×10^4 UFC/pozo respectivamente.

Técnica empleada. Se emplearon placas estériles de poliestireno para microtitulación de 96 pocillos con fondo redondo (distribuidas en filas designadas con letras de la A a la H y 12 columnas numeradas), siguiendo el esquema de controles y tratamientos indicados en las Figuras 12 y 13. Las placas fueron incubadas a 35°C durante 24 h para su correspondiente lectura. La CIM se definió como la menor concentración de antimicrobiano frente a la cual las cepas ensayadas no exhibieron crecimiento visible. El criterio de crecimiento fue una turbidez definida o presencia de sedimento (i.e., botón).

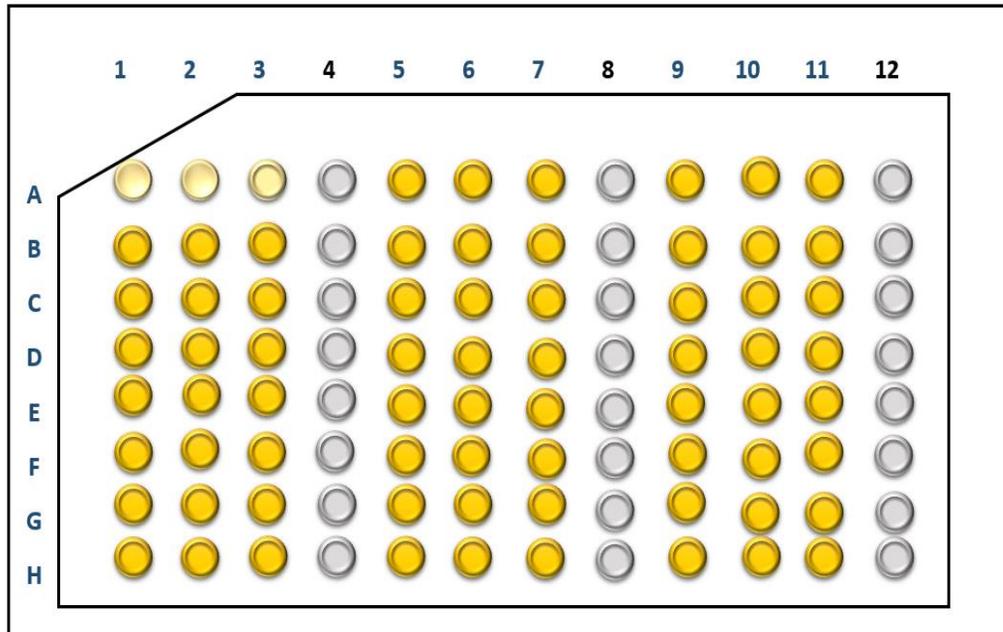


Figura 12. Esquema de inoculación para la determinación de la concentración mínima inhibitoria en placas de microtitulación de 96 pocillos.

Pozo A1-A3 (-): Control negativo (220 μ l medio de crecimiento BHI).

Pozo B1-B3 (+): Control positivo (170 μ l de medio BHI + 50 μ l de la cepa de estudio).

Pozo C1-C3: 75 UA de CAM + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.

Pozo D1-D3: 90 UA de CAM + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.

Pozo E1-E3: 200 UA de CAM + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.

Pozo F1-F3: 400 UA de CAM + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.

Pozo G1-G3: 1×10^{-3} M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.

Pozo H1-H3: 2×10^{-3} M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.

Pozo A5-A7: 4×10^{-3} M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.

Pozo B5-B7: 8×10^{-3} M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.

Pozo C5-C7: 0.02 M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.

Pozo D5-E7: 0.05 M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.

Pozo E1-E3: 75 UA de CAM + 1×10^{-3} M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.

Pozo F1-F3: 75 UA de CAM + 2×10^{-3} M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.

Pozo G1-G3: 75 UA de CAM + 4×10^{-3} M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.

Pozo H1-H3: 75 UA de CAM + 8×10^{-3} M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.

Pozo A9-A11: 75 UA de CAM + 0.02 M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.

Pozo B9-B11: 75 UA de CAM + 0.05 M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.

Pozo C9-C11: 90 UA de CAM + 1×10^{-3} M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.

Pozo D9-D11: 90 UA de CAM + 2×10^{-3} M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.
 Pozo E9-E11: 90 UA de CAM + 4×10^{-3} M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.
 Pozo F9-F11: 90 UA de CAM + 8×10^{-3} M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.
 Pozo G9-G11: 90 UA de CAM + 0.02 M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.
 Pozo H9-H11: 90 UA de CAM + 0.05 M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.

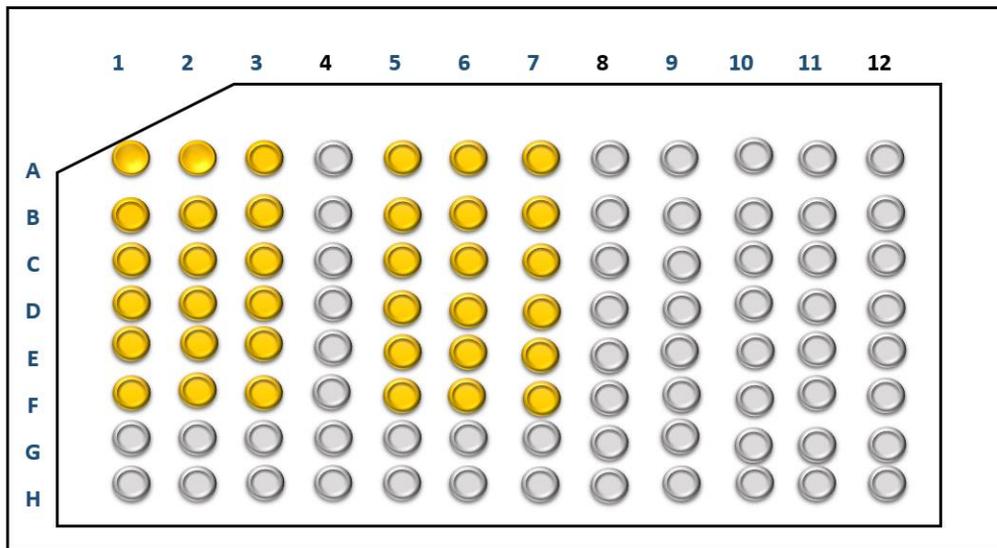


Figura 13. Esquema de inoculación para la determinación de la concentración mínima inhibitoria en placas de microtitulación de 96 pocillos.

Pozo A1-A3: 200 UA de CAM + 1×10^{-3} M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.
 Pozo B1-B3: 200 UA de CAM + 2×10^{-3} M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.
 Pozo C1-C3: 200 UA de CAM + 4×10^{-3} M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.
 Pozo D1-D3: 200 UA de CAM + 8×10^{-3} M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.
 Pozo E1-E3: 200 UA de CAM + 0.02 M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.
 Pozo F1-F3: 200 UA de CAM + 0.05 M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.
 Pozo A5-A7: 400 UA de CAM + 1×10^{-3} M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.
 Pozo B5-B7: 400 UA de CAM + 2×10^{-3} M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.
 Pozo C5-C7: 400 UA de CAM + 4×10^{-3} M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.
 Pozo D5-D7: 400 UA de CAM + 8×10^{-3} M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.
 Pozo E5-E7: 400 UA de CAM + 0.02 M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.
 Pozo F5-F7: 400 UA de CAM + 0.05 M EDTA + 120 μ l de medio BHI + 50 μ l de cepa bacteriana.

6.2.4 Elaboración de las películas con agentes antimicrobianos

Se elaboraron películas con pectina (1 % p/v), gelana (0.2 % p/v) y glicerol (0.5 % p/v) como agente plastificante, una concentración 0.05M de EDTA y tres concentraciones de CAM (i.e., 75, 90 y 120 UA/20 mL_{SF}) y agua destilada como disolvente (Tabla 8). Se usó

CaCl₂ para favorecer la gelificación de gelana y pectina. También se elaboró una película control, formulada con todos los componentes con excepción de CAM y EDTA.

Tabla 8. Formulaciones de las películas bioactivas

Componentes/ Película	Control	Bioactiva 1	Bioactiva 2	Bioactiva 3
Biopolímero	Pectina 1% p/v Gelana 0.2% p/v	Pectina 1% p/v Gelana 0.2% p/v	Pectina 1% p/v Gelana 0.2% p/v	Pectina 1% p/v Gelana 0.2% p/v
Glicerol	0.5 % p/v	0.5 % p/v	0.5 % p/v	0.5 % p/v
CaCl ₂	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM
EDTA	0.05 M	0.05 M	0.05 M	0.05 M
Péptido antimicrobiano	0	75 UA/mL	90 UA/mL	120 UA/mL

p/v: relación peso volumen

Los biopolímeros fueron disueltos en agua desionizada con agitación constante y se calentaron hasta 60-65 °C durante 40 minutos. Una vez mezclados los polímeros, se adicionó el agente plastificante y CaCl₂ en solución incrementando la temperatura hasta 75 °C. Las soluciones filmogénicas se mantuvieron en agitación por 30 min, posteriormente se adicionó la cantidad correspondiente del compuesto antimicrobiano, continuando con la agitación. Una vez preparada la solución filmogénica, ésta fue vertida en moldes de teflón, colocando 645 g en cada molde. Los moldes se secaron en horno de convección a 35 °C por aproximadamente 17 h, pasado el tiempo de secado se desmoldaron las películas cuidadosamente (Figura 14).

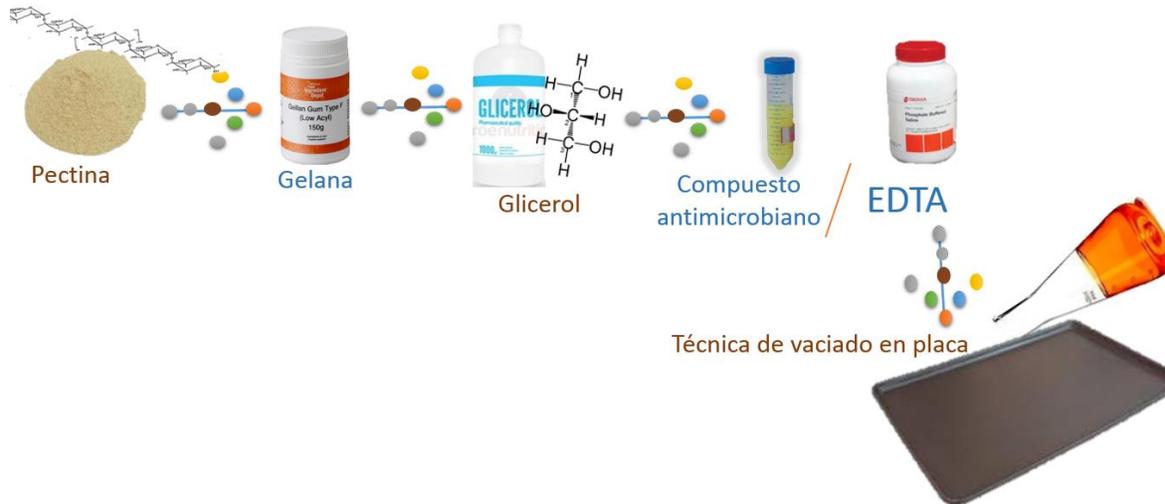


Figura 14. Representación gráfica de la elaboración de películas comestibles de pectina-gelana, CAM y EDTA.

6.2.5 Acondicionamiento de las películas

Previo a someter las películas a pruebas mecánicas y de barrera, 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.

Concluido el tiempo de acondicionamiento, en cinco diferentes puntos de la película (orillas y centro), se midió el grosor, utilizando un micrómetro digital. El promedio del grosor de cada película se usó en los cálculos de propiedades mecánicas y de barrera.

6.2.6 Evaluación del efecto antimicrobiano de las películas contra tres microorganismos indicadores: *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli*.

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de la películas en primera instancia se activaron los microorganismos indicadores: *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E.coli*. De este

cultivo se realizaron diluciones decimales y de la dilución adecuada se tomó el volumen necesario el cual se llevó a un volumen total de 200 μ L aforando con solución salina isotónica, los cuales se sembraron por extensión en superficie empleando medios diferenciales/selectivos para cada microorganismo indicador (Tabla 9), para obtener 25 UFC/caja. Una vez fraguado el inóculo en los medios bajo la campana de flujo laminar y en condiciones asépticas, se colocó una película (control y activas) con el mismo diámetro que la caja a manera de cubrir toda la superficie del medio. Posteriormente las cajas se incubaron a 25 °C. Previo a su utilización las películas fueron esterilizadas con luz UV en una campana de flujo laminar por 24 h (12 h por lado). Se inocularon tres cajas por tratamiento, mismas que fueron monitoreadas cada día hasta cumplir un total de 30 días (Figura 15). Una vez que transcurrió el período de monitoreo, de las tres películas activas se eligió la de mayor actividad antimicrobiana para su posterior evaluación en el sistema modelo de queso fresco.

Tabla 9. Medios Selectivos/Diferenciales y Caldos de crecimiento para cada microorganismo indicador

Microrganismo indicador	Medio Selectivo /Diferencial	Caldo de crecimiento
<i>Listeria monocytogenes</i>	Agar Oxford	Infusión Cerebro Corazón (BHI)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Agar Baird Parker	Infusión Cerebro Corazón (BHI)
<i>Escherichia coli</i>	Agar MacConkey	Infusión Cerebro Corazón (BHI)

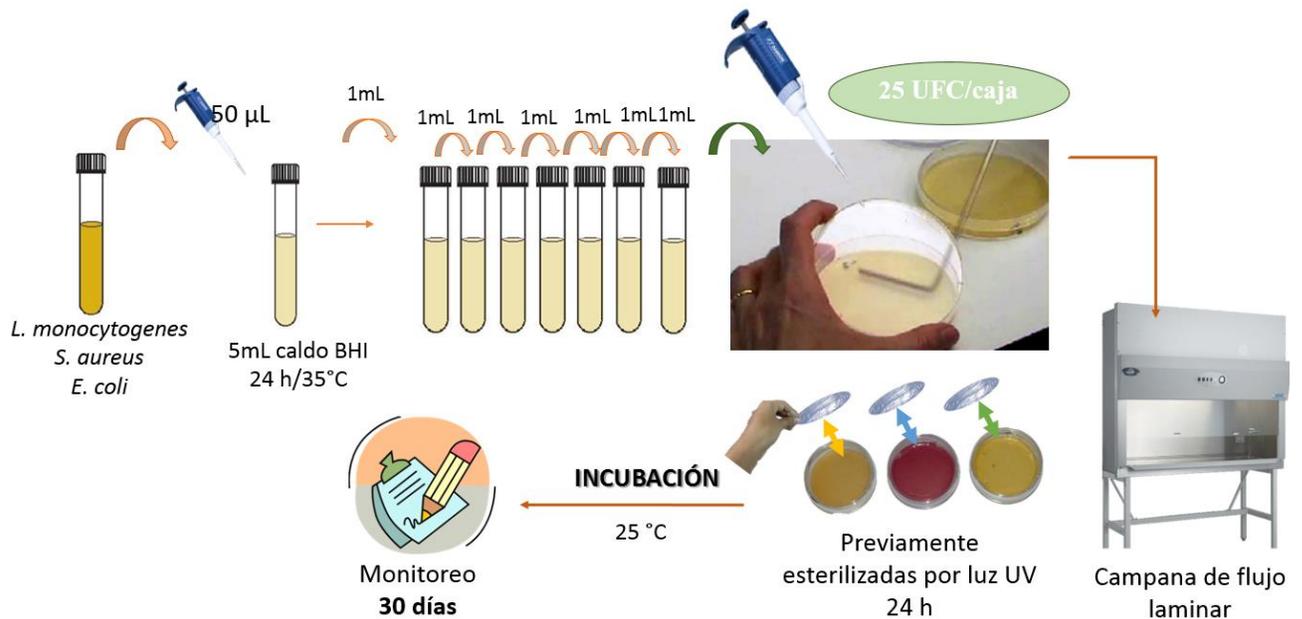


Figura 15. Técnica para la evaluación del efecto antimicrobiano de las películas biopoliméricas contra tres microorganismos indicadores: *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli* en su respectivo medio selectivo/diferencial.

6.2.7 Evaluación del efecto antimicrobiano de la película bioactiva en sistema modelo de queso fresco

1. Preparación del medio a base de queso Panela

Se preparó el medio a base de queso Panela con una cantidad total de 20 g de sólidos, tomando en cuenta la humedad del alimento se pesaron 44.44 g de queso fresco, mismos que se molieron en un procesador para alimentos (Oster®). El alimento procesado se mezcló con 1 L de agua destilada, a los cuales se le agregó 15 g de bacto-agar (BD™ DIFCO), la mezcla se mantuvo en agitación constante y calentamiento hasta que llegó al punto de ebullición. El medio se llevó a esterilización durante 1 h y se vertieron 5 mL del medio en cajas de Petri, se dejó fraguar el medio elaborado a base de queso Panela por 24 h antes de ser utilizado.

2. Inóculo del microorganismo indicador y colocación de películas

Se inició la prueba con la activación de los microorganismos patógenos de estudio (*E. coli*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*), inoculando 50 µL del abasto de conservación en 5 mL de BHI, llevando a incubación a 35 °C por un periodo de 24 h.

Una vez concluido el tiempo de activación del microorganismo, se realizaron las diluciones decimales, se usaron tubos estériles, a los cuales se les agregó 9 mL de solución salina isotónica estéril; al primer tubo se le colocó 1 mL de inóculo que procedía del vial de activación del microorganismo patógeno (dilución 10^{-1}) homogenizando posteriormente, después fue tomado 1 mL de la dilución 10^{-1} y se colocó en el segundo tubo (que contenía 9 mL de solución salina isotónica estéril), obteniendo así una dilución 10^{-2} del microorganismo de estudio; posteriormente se realizaron diluciones seriadas, siguiendo el paso anterior diluyendo el inóculo del patógeno hasta obtener una concentración de 100 UFC/mL para llevar a cabo la inoculación de los medios a base de queso fresco 'Panela'.

El inóculo que contenía las 100 UFC/mL del patógeno se aforó con solución salina isotónica estéril a un volumen de 200 μ L, esto con la finalidad de tener el volumen suficiente que cubriera en su totalidad la superficie de la caja Petri con medio queso Panela. Se colocaron sobre la superficie de los medios, una vez inoculados, círculos de película control y película bioactiva que contenía en su formulación las 90 UA/mL de CAM más una concentración 0.05 M de EDTA, que fue la elegida como la mejor del experimento anterior, previamente esterilizadas por luz UV en una campana de flujo laminar por 24 h, 12 h de un lado y 12 h del otro.

Se montó el experimento (ver Figura 16) contando con el control 1 que consistía en el agar queso Panela sin inóculo y sin película, un control 2 sólo con el inóculo de los microorganismos indicadores y dos tratamientos de estudio, la película control (sólo con los biopolímeros) y la película activa (90 UA/mL de la bacteriocina más 0.05 M de EDTA); cada tratamiento se realizó por triplicado y por cada uno de los días de muestreo, en total se tenían 50 cajas Petri para cada microorganismo patógeno.

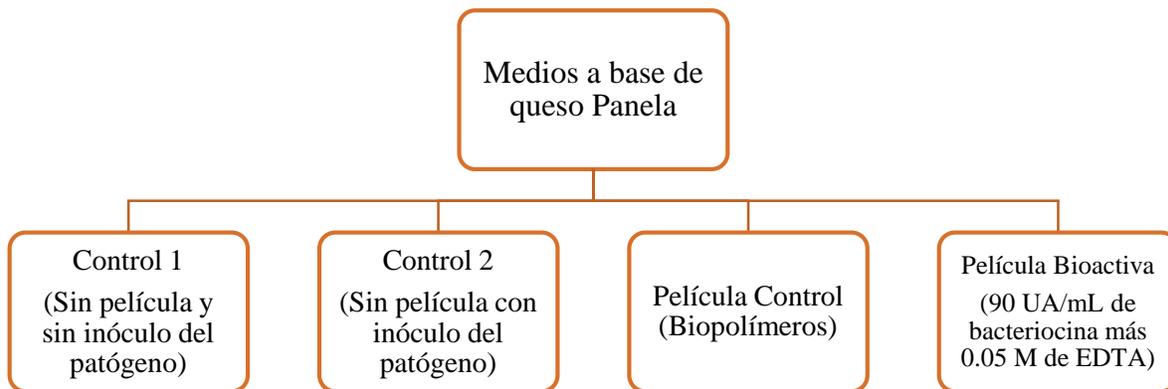


Figura 16. Diagrama de los tratamientos de estudio y sus controles, cada uno se realizó por triplicado.

El experimento tuvo una duración de 7 días, haciendo un muestreo al día 0, 1, 3, 5 y 7. Las cajas Petri fueron incubadas a 35 °C hasta el día de su procesamiento. Los pasos antes mencionados se realizaron para cada microorganismo de estudio.

3. Homogenización y recuento de células viables

Cada tratamiento fue monitoreado a $T_0= 1$ h después de la contaminación artificial, $T_1= 24$ h después, $T_2=$ día 3, $T_3=$ día 5 y $T_4=$ día 7, mediante la utilización de un homogeneizador Stomacher para procesar agar queso Panela tratado y 45 mL de agua peptonada estéril, a 300 rpm durante 5 min. Se realizaron las diluciones decimales necesarias siguiendo la metodología descrita en el apartado de “Inóculo del microorganismo indicador y colocación de películas”, con la única variante de que el inóculo procedía de la bolsa que se sometió a homogenización en el Stomacher, esto se realizó con la finalidad de tener un recuento de células viables en cada tratamiento. Una vez obtenida la dilución adecuada para poder contar las UFC del microorganismo patógeno se tomó 1 mL y se colocó en un tubo que contenía 10 mL de agar suave BHI, homogeneizando posteriormente. Se llevó a cabo el vertido en cajas de Petri las cuales se dejaron incubando a 35 °C durante 24 h, por triplicado para cada tratamiento y controles, una vez transcurrido ese tiempo realizó el recuento de células viables.

6.2.8 Propiedades mecánicas de las películas con agentes antimicrobianos

Las propiedades mecánicas de las películas se midieron con el método estándar ASTM D882 (ASTM, 2010) en una máquina universal (TA plus, Lloyd) (Figura 17). Una vez que transcurrieron 48 h del acondicionamiento de las películas (50-55% HR, 25 °C), éstas fueron cortadas con un molde en forma de “hueso de perro” de acuerdo a las dimensiones indicadas en la normativa ASTM D638M (ASTM, 1993). Las películas se sujetaron entre las pinzas de tensión con un espacio de 5 cm. La velocidad de extensión que se empleó fue de 1.0 mm/s. Con ello se obtuvieron datos de fuerza y distancia, con los cuales se determinó el perfil de esfuerzo verdadero vs deformación de Hencky (ϵ_H). Se tensaron 30 tiras para cada tratamiento, eliminando aquellos datos en donde las muestras no se fracturaron en el centro.



Figura 17. Máquina universal (TA plus, Lloyd), CICATA, Querétaro.

Para calcular la deformación de Hencky o deformación verdadera se usó la Ecuación 1:

$$\epsilon_H = \ln \left[\frac{L_t}{L_0} \right] = \ln L_t - \ln L_0 = \ln \frac{L_t}{L_0} \quad (1)$$

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 sometió la muestra en cada instante de tensión, se usó el concepto de esfuerzo verdadero, σ_T (Ecuación 2), 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 3.

$$\sigma_T = \frac{F}{A_t} \quad (2)$$

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

$$A_{(t)} = \frac{A_0 L_0}{L} \quad (3)$$

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 como se muestra a continuación:

$$\%e = \frac{\Delta L}{L_0} * 100$$

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 frecuentemente determinadas en películas. El esfuerzo a la fractura es 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.

6.2.9 Propiedades de barrera

6.2.9.1 Permeabilidad al oxígeno (PO_2) de las películas con sustancias antimicrobianas

En el equipo VAC-V2 Permeability tester (Labthink®, China) (Figura 18) se determinó la permeabilidad al oxígeno con base en el 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, tomando la medida de 5 puntos aleatorios de su espesor. Las películas se colocaron en las cámaras del equipo VAC-V2. La presión de entrada del gas permeante fue de 1.01 kgf/cm².

La temperatura de las determinaciones se controló a 25 °C, con un baño de recirculación. Se obtuvieron gráficos de la presión del gas permeante (Pa) en función del tiempo (s). A partir de esos gráficos se determinó el flux de oxígeno que difunde a través de la película y la permeabilidad de oxígeno de la película (Calderón-Aguirre et al., 2015).

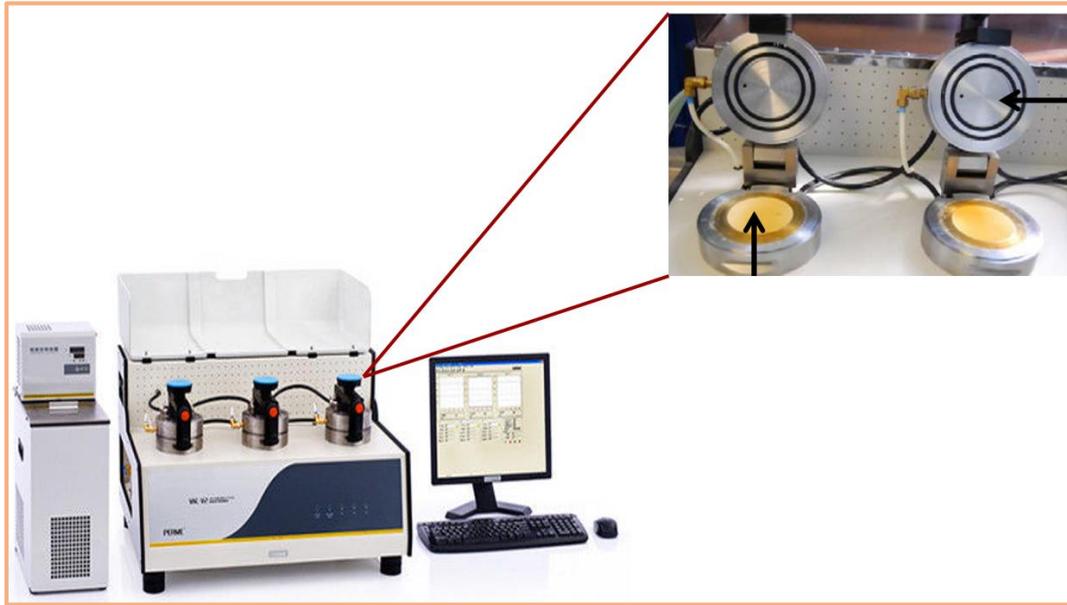


Figura 18. Equipo VAC-V2 Permeability tester empleado en determinación de permeabilidad al oxígeno (PO_2) de las biopelículas.

6.2.9.2 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. En las celdas se colocaron 70 g de sílica gel como agente absorbente que fue previamente secada en la estufa a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. También las películas fueron acondicionadas con anterioridad y medidas en su grosor.

La PVA de las películas se determinó usando un gradiente de humedad de 80% y una temperatura de $23 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las celdas se pesaron en una balanza analítica (sensibilidad 0.00001 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. Se realizaron 3 réplicas por tratamiento (Calderón-Aguirre et al., 2015).

6.3 Determinación de la solubilidad

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, Pinotti, Martino, & Zaritzky, 2004), con algunas modificaciones: se cortaron piezas de 2 cm × 2 cm de cada tratamiento mismas que se almacenaron por 7 días en un desecador 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 matraces Erlenmeyer de 250 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 ($\approx 25^{\circ}\text{C}$) y se agitaron durante 1 h. Transcurrido el tiempo de agitación, el contenido total del matraz fue filtrado a través de papel filtro Whatman No. 1, llevado previamente a peso constante en un horno de convección ($24\text{ h}/95\pm 5^{\circ}\text{C}$). 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; posteriormente se registró el peso y el porcentaje de materia soluble de la película se calculó con la siguiente ecuación.

$$\% \text{Solubilidad} = \left(\frac{\text{Peso seco inicial de la película} - \text{Peso seco final de la película}}{\text{Peso seco inicial de la película}} \right) \times 100$$

6.4 Análisis Estadístico

Los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), empleando la prueba Tukey para la comparación de medias con un nivel de significancia $p < 0.05$ mediante el software estadístico IBM SPSS Statistics 20. Los datos se graficaron en el programa SigmaPlot.

7 RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 Efecto del tiempo de fermentación en la actividad antimicrobiana de los péptidos producidos por *Streptococcus infantarius*

Se evaluó el efecto del tiempo de fermentación en la actividad antimicrobiana de los concentrados de la fermentación de la bacteria ácido láctica *Streptococcus infantarius* (aislada del pozol). La Figura 19 presenta los halos de inhibición que se obtuvieron por el método de difusión en agar por gota, sobre el microorganismo patógeno *Listeria monocytogenes*, de los concentrados de la fermentación a nivel matraz, obtenidos a las 6, 12 y 24 horas. Se consiguieron halos de inhibición de 11.58 ± 2.23 mm de diámetro en la dilución 2^5 para el concentrado obtenido a las 24 horas. El concentrado obtenido a las 12 horas de fermentación exhibió halos de inhibición en la dilución 2^5 de 11.03 ± 2.69 mm de diámetro. En contraste, el concentrado de la fermentación de 6 horas presentó halos de hasta 13.78 ± 3.53 mm de diámetro en la dilución 2^7 .

Como se aprecia en la Figura 19, el extracto con mayor efecto antimicrobiano fue el de las 6 horas de fermentación, ya que hasta la dilución 2^7 logró inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Los concentrados obtenidos a las 12 y 24 horas de fermentación no mostraron diferencia entre sí, dado que los dos se comportaron del mismo modo, inhibiendo el crecimiento del microorganismo patógeno hasta la dilución 2^5 .

De acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 19, el concentrado de fermentación obtenido a las 6 horas presentó mayor actividad inhibitoria frente a *Listeria monocytogenes* en placas de agar suave BHI, por lo cual fue seleccionado para trabajar en la presente investigación. Este tiempo de fermentación fue el usado en la fermentación a nivel biorreactor por lote, mediante la cual se obtuvo el lote de concentrado antimicrobiano que se usó en todo el trabajo.

Los datos obtenidos de la medición de halos de inhibición del compuesto antimicrobiano de 6 horas de fermentación y la concentración de la máxima dilución en donde se observaron halos definidos fueron usados para determinar las unidades arbitrarias de actividad (UA), la cual fue de 6400 UA/mL.

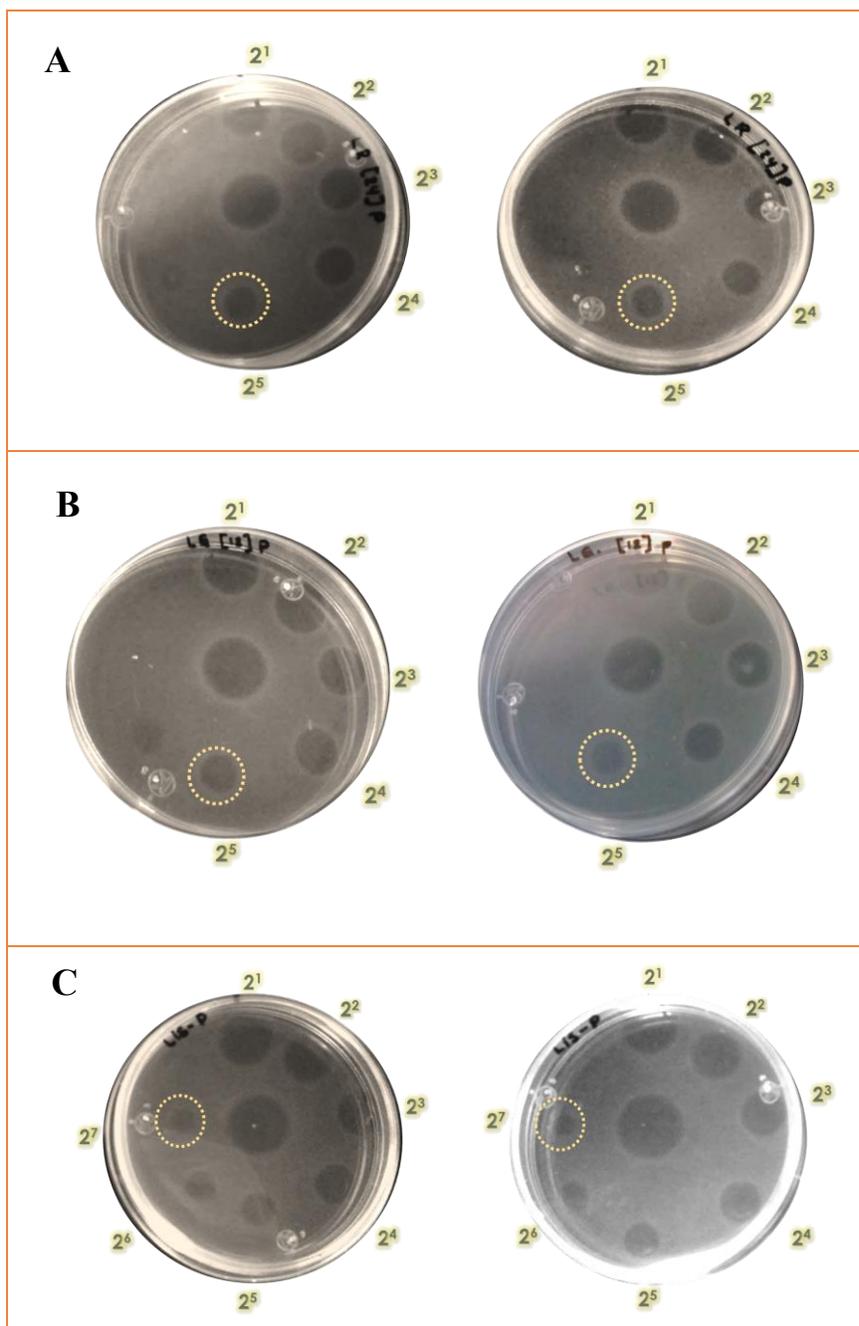


Figura 19. Halos de inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* en placas de agar suave BHI. A) Efecto antimicrobiano del concentrado obtenido de *Streptococcus infantarius* a las 24 h de fermentación en la dilución 2^5 y su réplica. B) Inhibición del concentrado obtenido de *Streptococcus infantarius* a las 12 h de fermentación en la dilución 2^5 , así como su réplica. C) Efecto antimicrobiano del concentrado obtenido de la bacteria láctica *Streptococcus infantarius* a las 6 h de fermentación en la dilución 2^7 y su réplica.

7.2 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima

Se determinó de la concentración inhibitoria mínima (CIM), es decir, la concentración más baja (UA/mL) en la cual el concentrado antimicrobiano (CAM) producido por *Streptococcus infantarius* es capaz de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. El método usado fue el de dilución en placa.

Las concentraciones de CAM que se evaluaron fueron 75, 90, 200 y 400 UA/mL. De igual forma se determinó el efecto inhibitorio de seis concentraciones de EDTA: $1 \times 10^{-3} \text{M}$, $2 \times 10^{-3} \text{M}$, $4 \times 10^{-3} \text{M}$, $8 \times 10^{-3} \text{M}$, 0.02 M, 0.05 M, y las combinaciones CAM-EDTA, para determinar efectos sinérgicos. Se hizo uso de dos controles: el primero fue el control negativo (caldo BHI sin suspensión bacteriana) y el segundo fue el control positivo (BHI y suspensión bacteriana). Los criterios de interpretación fueron la existencia/ausencia de turbidez o de sedimentación de biomasa (botón) en el fondo del pozo.

La bacteria *E. coli* figura entre los patógenos de transmisión alimentaria más comunes que afectan a millones de personas cada año, a veces con consecuencias graves o mortales. En virtud de ello, fue imprescindible determinar la formulación CAM-EDTA con acción antimicrobiana sobre dicho microorganismo, debido a que la mayoría de las bacteriocinas producidas por BAL no tienen acción contra bacterias Gram negativas.

En la Figura 20 se observan los resultados que se obtuvieron para *E. coli*, resaltando que el tratamiento con 90 UA/mL de CAM en combinación con 0.05 M de EDTA consiguió inhibir totalmente el crecimiento del microorganismo de ensayo; dado que los pozos correspondientes a este tratamiento se presentaron completamente transparentes; sin presencia visible de posible desarrollo del microorganismo patógeno. Las bacteriocinas no actúan contra microorganismos Gram negativos, sin embargo en algunos estudios se ha propuesto que al combinarlas con EDTA pueden penetrar hasta la membrana y dañar la célula (López, Escudero, & Mendoza, 2009). Para este microorganismo patógeno no hubo una inhibición de su crecimiento al tratarla con CAM por sí solo. Sin embargo, al mezclarlo con EDTA sí se observó un efecto inhibitorio.

Las bacterias Gram-negativas se caracterizan por la presencia de una membrana externa que contiene lipopolisacáridos (LPS) estabilizados por Mg^{2+} y Ca^{2+} (Sivarooban, Hettiarachchy, & Johnson, 2008). No obstante, el Ácido Etilen-diaminotetraacético (EDTA) es un agente quelante de tales cationes divalentes, debilitando de este modo la capa de lipopolisacáridos de la membrana externa; esta acción permite que los péptidos hidrófobos antimicrobianos, tales como las bacteriocinas, penetren en la membrana citoplasmática más fácilmente y de esta forma lleven a cabo su mecanismo de acción principal (Castellano, Belfiore, & Vignolo, 2011; Hansen, Austin, & Gill, 2001). Algunos factores que influyen en la resistencia bacteriana incluyen la permeabilidad de la membrana, enzimas proteolíticas, compuestos que compiten por los mismos sitios de unión o la presencia de compuestos capaces de eliminar la bacteriocina disponible a través de la unión no específica (Gálvez, López, Pulido, & Burgos, 2014).

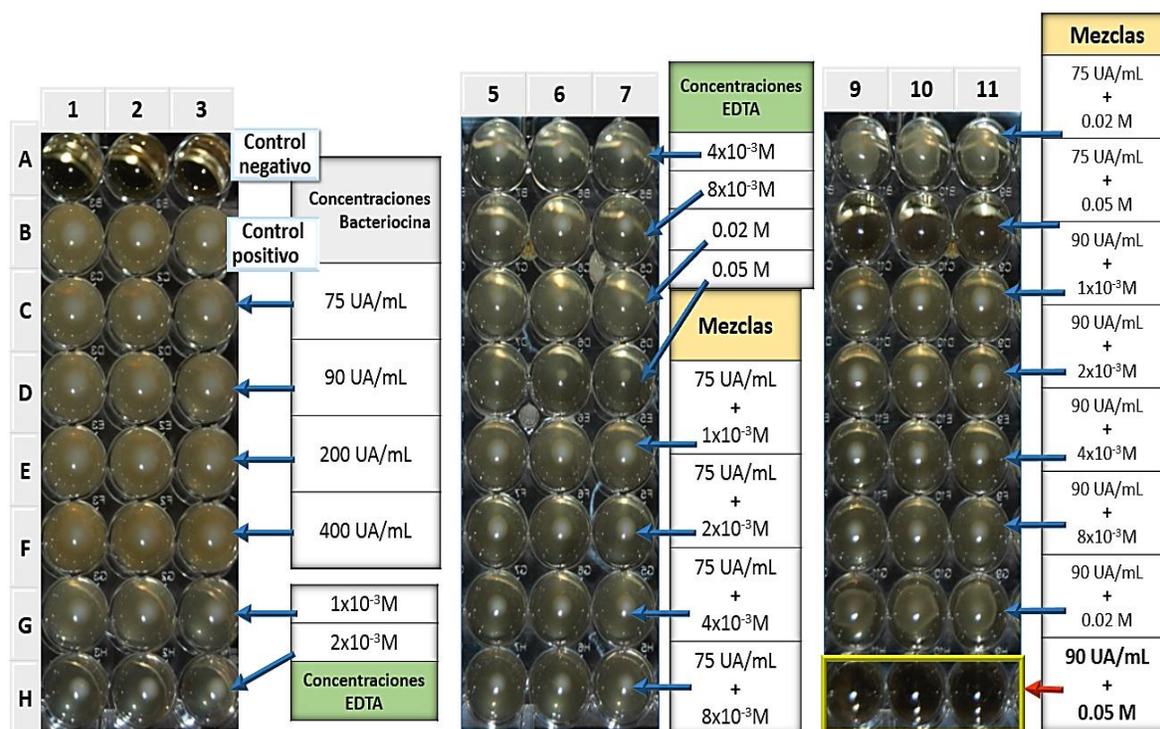


Figura 20. Efecto del concentrado antimicrobiano (CAM) producido por *Streptococcus infantarius*, EDTA y sus mezclas sobre el crecimiento de *E. coli* durante la prueba de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).

se realizó el mismo ensayo que en los microorganismos anteriores, se determinó que la CIM del CAM sobre *L. monocytogenes* fue de 90 UA/mL, resultados presentados en la Figura 22. A partir de 90 UA/mL de CAM, los pozos se mostraron sin la presencia de turbidez ni del “botón” en el fondo del pozo indicativo de la presencia de biomasa, motivo por el cual se seleccionó dicha concentración como la mínima inhibitoria.

Los resultados obtenidos son similares a los reportados por otros autores (Izquierdo et al., 2008; Martin-Platero et al., 2006; Tessema, Moretro, Kohler, Axelsson, & Naterstad, 2009), quienes reportaron la alta actividad anti-listerial de algunas bacteriocinas como nisina, enterocinas A y B, enterocina 416K1, siendo eficaces para frenar el desarrollo de *Listeria monocytogenes* en productos alimenticios y representando una alternativa potencial a la conservación química. Tominaga & Hatakeyama (2006) han reportado que la actividad antimicrobiana de esta clase de bacteriocinas frente a cepas del género *Listeria*, se debe principalmente a la alta cantidad de cisteínas próximas al extremo amino del péptido antimicrobiano, lo que representa una mayor cantidad de puentes disulfuro que facilitan el mecanismo de acción de estas bacteriocinas, el cual se atribuye a la desestabilización (debido a la formación de poros) de la membrana citoplasmática, lo cual trae como consecuencia la pérdida de iones K^+ , ATP y, en algunos casos aminoácidos y moléculas pequeñas. La pérdida de estas sustancias origina a su vez el descenso de la síntesis de ADN, ARN y proteínas, originando la muerte celular (Cé, Noreña, & Brandelli, 2012).

Los métodos de dilución en caldo se consideran de referencia para la determinación cuantitativa y cualitativa de la actividad de los antimicrobianos. La gran cantidad de variables (dependientes del microorganismo, del medio de cultivo, del inóculo) que influyen en estos métodos son responsables de oscilaciones en el resultado final (Acuña et al., 2015). En la Tabla 10 se muestra el resumen de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) del CAM, EDTA y las mezclas para los tres microorganismos patógenos de estudio. De acuerdo a los resultados obtenidos, el CAM producido por *Streptococcus infantarius* no mostró efecto inhibitorio contra *E. coli*, pues se trata de una bacteria Gram negativa por lo que fue necesaria la presencia de EDTA para así lograr una acción antagónica efectiva. Con respecto a *S. aureus*, las concentraciones estudiadas del CAM por sí solas no consiguieron inhibir el crecimiento de este

patógeno, no obstante, desde la concentración menor de EDTA (1×10^{-3} M) se impidió el desarrollo de dicha bacteria Gram positiva. En contraste, las bacteriocinas presentes en el CAM mostraron efecto mayor contra *L. monocytogenes*, únicamente 90 UA/mL de CAM fueron suficientes para inhibir el desarrollo de ese patógeno.

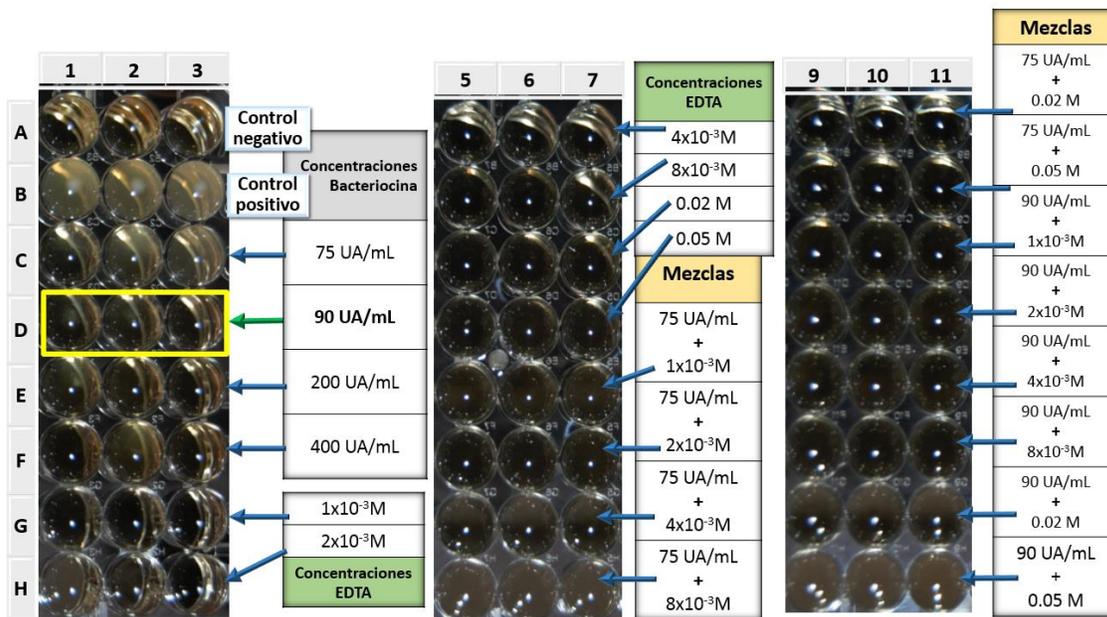


Figura 22. Efecto del CAM producido por *Streptococcus infantarius*, EDTA y sus mezclas sobre el crecimiento de cepa de *L. monocytogenes* durante la prueba de la concentración inhibitoria mínima.

Tabla 10. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de CAM producido por *Streptococcus infantarius*, EDTA o sus mezclas para los tres microorganismos de ensayo.

Microorganismo patógeno	CIM
<i>Escherichia coli</i>	90 UA/mL CAM + 0.05 M EDTA
<i>Staphylococcus aureus</i>	1×10^{-3} M EDTA
<i>Listeria monocytogenes</i>	90 UA/mL CAM

En la Tabla 11 se exhiben algunos trabajos representativos de evaluación de CIM de distintos antimicrobianos de origen natural, sin embargo, es evidente que existen diferencias

experimentales debido a que se emplean distintos métodos de determinación, temperatura de experimentación, la naturaleza del antimicrobiano y las unidades en las que se reporta. Por lo anterior, resulta difícil realizar comparaciones directas entre los resultados citados.

Tabla 11. Concentraciones inhibitorias mínimas de antimicrobianos naturales “in vitro” contra microorganismos patógenos.

Antimicrobiano	Microorganismo patógeno	Técnica empleada	CIM	Referencia
Pediocina producida por <i>Pediococcus pentosaceus</i> 34	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 53135	Dilución en agar	540 UA/mL	Kaur, Singh, and Malik (2013)
Enterocina producida por <i>Enterococcus faecium</i> FH99	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 53135	Dilución en agar	120 UA/mL	Kaur et al. (2013)
Aceite esencial de orégano	<i>Escherichia coli</i>	Dilución en agar	10-20 UI/mL	Rodríguez - Saucedo (2011)
Aceite esencial de romero	<i>Staphylococcus aureus</i>	Dilución en agar	0.4-10 UI/mL	Rodríguez - Saucedo (2011)
Pediocina PA-1	<i>Listeria monocytogenes</i>	Dilución en caldo	307 AU/mL	Hartmann, Wilke, & Erdmann (2011)
Bacteriocinas producidas por <i>Enterococcus</i> spp.	<i>Listeria innocua</i>	Método de placa de microtitulación	320 UB/mL	Hassan, Javadzadeh, Lotfipour, & Badomchi (2011)
Extracto de hojas secas de <i>Silybum marianum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Dilución en caldo	21 mg/mL	Cruz-Carrillo, Rodríguez, & Rodríguez (2010)
Bacteriocina producida por <i>Enterococcus faecium</i> MXVK29	<i>Escherichia coli</i>	Difusión en agar	12500 UA/mL	Aguado-Bautista, Álvarez -Cisneros, & Ponce-Alquicira, (2010)
Nisina (Nisaplin®)	<i>Listeria monocytogenes</i>	Difusión en agar	1.000 UI/m	Schmidt-Mc Lachlan (2007)

En estudios realizados por Kaur, Singh & Malik (2013) se evaluó la concentración más baja a la cual la Pediocina producida por *Pediococcus pentosaceus* 34 inhibió el crecimiento de *Listeria monocytogenes* ATCC 53135. Este trabajo reportó que la pediocina mostró una CIM de 540 UA/mL; en contraste en el presente estudio, con el mismo microorganismo patógeno la CIM fue de 90 UA/mL del CAM producido por *Streptococcus infantarius*, indudablemente fue mucho menor la concentración obtenida para lograr un efecto antagónico contra dicho patógeno.

7.3 Descripción visual de las películas

El concentrado extraído de la fermentación de la bacteria ácido láctica *Streptococcus infantarius* (90 UA/mL), pectina, gelana y EDTA (0.05 M) dieron origen a películas opacas y de color amarillo, a las cuales se les denominará en este trabajo “películas bioactivas”; mientras que las películas control, es decir aquellas elaboradas con los biopolímeros (pectina y gelana) fueron transparentes (Figura 23). Las películas bioactivas fueron más rígidas que las películas control; sin embargo, en ambos casos, la adición de glicerol produjo películas ligeramente más opacas y más flexibles.

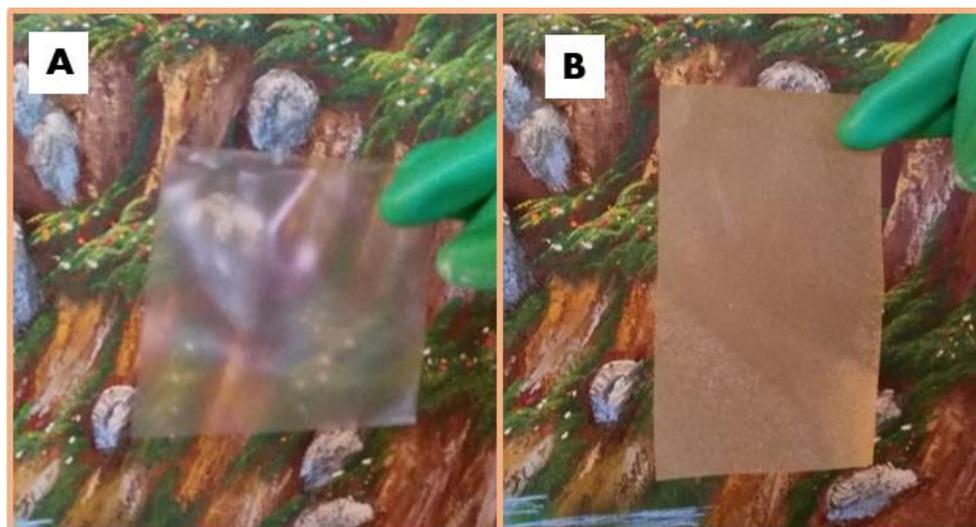


Figura 23. Películas elaboradas a partir del concentrado de la fermentación de *Streptococcus infantarius* (CAM), EDTA y biopolímeros (pectina, gelana). A) Película control (sólo biopolímeros). B) Película bioactiva (CAM, EDTA y biopolímeros).

7.4 Evaluación del efecto antimicrobiano de las películas contra tres microorganismos indicadores: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

La Figura 24 muestra el comportamiento de los indicadores *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. aureus* en medios selectivos (25 UFC/caja a t=0) en presencia de películas control y bioactivas (CAM y EDTA) durante 30 días de monitoreo (tiempo total del experimento). La caja testigo, en la cual no se colocó ningún tipo de película, presentó crecimiento evidente de los microorganismos patógenos a partir de las 48 h para *L. monocytogenes* y *E. coli* alcanzando 105 y 78 UFC/caja respectivamente, sin embargo en el caso de *S. aureus* se desarrolló hasta las 72 h alcanzando 77 UFC/caja. Esta cuenta permaneció constante hasta el término de las observaciones. Por otra parte, es evidente que aún sin agente antimicrobiano, la película control, logró inhibir por completo el crecimiento de los tres microorganismos indicadores. Este efecto de inhibición puede ser atribuido a la actividad antimicrobiana que presenta por sí sola la pectina y a la barrera al oxígeno que presenta la película control por sí misma.

Además de eso, se ha encontrado en la literatura un estudio realizado por Gopi, Kanimozhi, Bhuvaneshwari, Indira, & Kavitha (2014), en el que llevaron a cabo la evaluación de nanopartículas de hidroxipatita [HAP , $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] en combinación de pectina extraída de la cáscara de plátano. La actividad antimicrobiana de las nanopartículas de HAP fue evaluada en cuatro volúmenes diferentes (25, 50, 75 y 100 μL) frente a dos cepas patógenas, *S. aureus* y *E. coli*, encontrando que, con la concentración óptima (0.15 %) de pectina en presencia de las nanopartículas de HAP exhibían una mejor actividad antimicrobiana que las nanopartículas sintetizadas en ausencia de la pectina. Con lo que sostienen, que la pectina de la cáscara del plátano tiene un efecto antimicrobiano por algunos componentes orgánicos (ácidos urónicos, polifenoles y algunos minerales como el K^+ , Na^+ y Mg^+).

En otra investigación realizada por Daoud, Sura, and Abdel-Massih (2013), en el que también se ha confirmado la actividad antimicrobiana de pectinas; al determinar un efecto antagónico de pectina cítrica frente a cepas de *Helicobacter pylori* ATCC 43504 (bacteria Gram-negativa), encontraron que, a una concentración de 0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a pH 7 la pectina produce efectos antibacteriales. Explican, esto es debido a la complejidad de las cadenas laterales de la pectina.

Otro estudio realizado por Li et al. (2013), demostraron una fuerte actividad antimicrobiana de oligosacáridos pécticos Haw (fruta haw, que pertenece a la familia de las rosáceas) contra *E. coli*. Afirmaron que la inhibición dependía de la concentración de oligosacáridos pécticos y el pH.

En estudios menos recientes, Takenaka, Muto, Yusunami & Echigo (1994) demostraron que la pectina de limón hidrolizada por pectinasa (0.1 a 1% de hidrolizados a pH 5.5) mostró una actividad inhibitoria frente a *E. coli*. También afirmaron que el efecto de los hidrolizados enzimáticos parecía ser debido a grupos libres carboxilo no disociados, los azúcares neutros, grupos metoxilo y el grado de polimerización del ácido oligogalacturónico. La actividad antimicrobiana incrementó con la abundancia de estos dos últimos.

El comportamiento de las tres películas bioactivas evaluadas (75, 90, 120 UA/mL más 0.05 M EDTA) fue el mismo ya que lograron inhibir en su totalidad el crecimiento de los microorganismos patógenos de estudio (*L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus*), lo cual muestra un efecto sinérgico entre los componentes de la película y los agentes antimicrobianos adicionados.

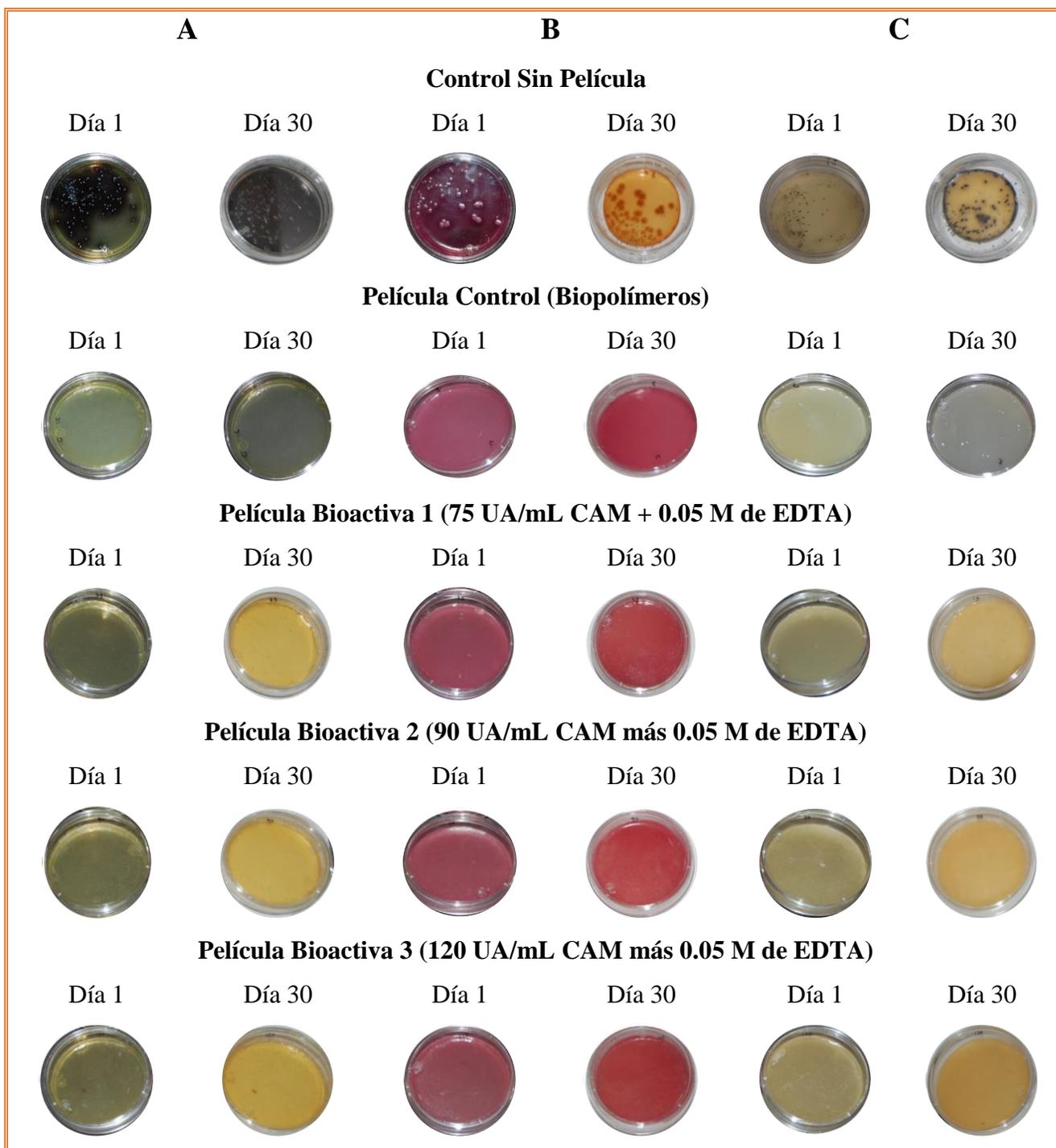


Figura 24 Imágenes de cajas Petri inoculadas con *L. monocytogenes* en medio Oxford (A), *E. coli* en MacConkey (B) y *S. aureus* en Baird Parker (C). Se muestra el efecto de los distintos tratamientos (película control y películas Bioactivas) bajo condiciones de incubación a 25 °C.

Los resultados obtenidos se pueden comparar con los de Espitia et al., (2013) quienes investigaron películas nanocompuestas de metil celulosa (MC) y óxido de zinc (ZnO) incorporadas con pediocina. El ensayo de la actividad antimicrobiana se determinó colocando películas con los agentes antimicrobianos (pediocina y nanopartículas de ZnO) sobre la superficie de cajas Petri con agar previamente inoculado con *Streptococcus aureus* (ATCC 6538) y *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) incubados a 35 ± 1 °C durante 24 h. Observando que las películas bioactivas tuvieron una reducción del crecimiento de *S. aureus* de 5 log y para *L. monocytogenes* 5.3 log, esto indica que las películas desarrolladas tienen un uso potencial en el control de estos patógenos alimentarios.

Otro estudio similar es el de Woraprayote et al. (2013), quienes desarrollaron una película biocompuesta de ácido poliláctico (PLA) y partículas de aserrín (SP) con la incorporación de pediocina PA-1 / AcH (Ped), utilizando *L. monocytogenes* ATCC19115 como cepa indicadora. La eficacia antimicrobiana se evaluó colocando en contacto directo las películas activas sobre la superficie de agar TSB, que contenía aproximadamente 10^6 UFC/mL del microorganismo de estudio. Las placas se incubaron a 4 ± 2 °C y se realizaron los conteos viables después de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 14 días de almacenamiento. Estos autores reportaron que las películas activas mostraron actividad anti-listerial importante, puesto que redujeron la población en 1.5-2 ciclos log de 1 a 14 días.

Películas comestibles que se prepararon a partir de soluciones de gelatina de bovino y que contenían aceite esencial de *Zataria multiflora* (ZMO), fueron estudiadas por Kavooosi et al. (2014). Se analizó la actividad antimicrobiana individualmente de dos bacterias Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1074 y *Escherichia coli* PTCC 1330 y de dos bacterias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* PTCC 1112, *Bacillus subtilis* PTCC 1023. En este estudio se colocaron en contacto directo discos de las películas sobre placas de agar nutritivo previamente inoculado con las cepas. Todas las cajas se incubaron a 37 °C durante 24 h y se midieron los diámetros de las zonas de inhibición. Estas películas de gelatina incorporadas con ZMO exhibieron resultados prometedores puesto que observaron fuertes efectos antibacterianos tanto para las bacterias estudiadas Gram-positivas, como para las Gram-negativas.

El uso de películas antimicrobianas puede ofrecer ventajas comparadas con la adición directa de conservadores a los productos alimenticios, ya que estos agentes se adicionan a la matriz formadora de la película. Además de que la migración de los antimicrobianos es lenta desde el material de embalaje hasta la superficie del alimento. Permitiendo así, no sólo la inhibición inicial de microorganismos indeseables, sino también una actividad residual a lo largo del tiempo de transporte, almacenamiento y distribución del producto.

Otros autores (Neetoo & Mahomoodally, 2014) compararon y optimizaron la eficacia antimicrobiana de películas a base de Metilcelulosa (MC) e Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), con la incorporación de nisina (Nis), lactato de sodio (SL), diacetato de sodio (SD), sorbato de potasio (PS), y/o benzoato de sodio (SB) en combinaciones binarias o ternarias. Resultando que los tratamientos que contenían Nis (25000 IU/mL) en combinación con PS (0.3%) y SB (0.1%) tuvieron la mayor actividad inhibidora, la reducción de la población de *L. monocytogenes* fue por un máximo de 3.3 log UFC/cm² con respecto a muestras control después de 10 días de almacenamiento a 21 ° C.

Ibarguren et al. (2015), reportaron que películas compuestas de gelatina de bovino con la incorporación de un éster de flavonoides, laurato de prunina, y las enterocinas A, B y P sintetizadas por *Enterococcus faecium* SM21 en una concentración final de 63 UA/cm², lograron tener actividad antimicrobiana tanto en la técnica de difusión en agar, como en contacto directo de microplaca, contra *Listeria monocytogenes* 01/155, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Bacillus cereus*. Debido a que existió una disminución de 3 ciclos log sobre la viabilidad de *L. monocytogenes* y 2 ciclos log para *S. aureus* durante las primeras 24 h de contacto directo. Sin embargo, para *B. cereus* se observó un patrón de inhibición similar durante las primeras 2 h de contacto pero varió las siguientes 22 h.

Así mismo, un trabajo realizado por Güçbilmez, Yemenicioğlu, & Arslanoğlu (2007), en el que incorporaron lisozima parcialmente purificada en películas de zeína en combinación con extracto de albúmina de garbanzo, albúmina de suero bovino y ácido etilendiaminotetraacético disódico dihidratado (EDTA-2Na • 2H₂O), generó como resultado películas activas efectivas sobre el control de la población de *E. coli* (ATCC 53868) y *B. subtilis* (ATCC 6633).

En las últimas décadas los productos alimenticios se conservan aplicando tecnología de barreras múltiples, que consiste en manipular varios de los factores (intrínsecos y/o extrínsecos) que influyen en el crecimiento microbiano y en su supervivencia en los alimentos. Típicamente, ninguna variable individual se altera en manera suficiente para prevenir el desarrollo de los microorganismos indeseables, por lo que al recurrir a un gran número de combinaciones de variables puede ser realmente eficaz, ya que trabajan de forma sinérgica, sin uso excesivo de tratamientos que puedan alterar las propiedades sensoriales o nutricionales. Dentro de las barreras usadas eficazmente están el empaçado aséptico y los conservadores naturales. Recientemente, el uso de películas con actividad antimicrobiana ha ganado más interés en virtud de su capacidad de no sólo proporcionar una barrera contra los gases y la humedad, sino también actuar como portadores de agentes antimicrobianos, muchos de ellos clasificados como GRAS como algunas bacteriocinas.

En este sentido, es relevante resaltar que las películas bioactivas de la presente investigación, mostraron una inhibición total contra *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. aureus*; incluso en condiciones de crecimiento convenientes para los patógenos (25 °C) y por los 30 días que duró el experimento, ya que de las 25 UFC/caja que se inocularon en su respectivo medio selectivo/diferencial, no se desarrolló ningún microorganismo indicador. Por lo tanto, las películas con actividad antimicrobiana elaboradas a base de gelana-pectina con la inclusión del péptido activo producido por *Streptococcus infantarius* y EDTA, pueden usarse para controlar la contaminación de *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. aureus* de productos alimentarios empacados.

7.5 Evaluación del efecto antimicrobiano de la película bioactiva en medios de cultivo elaborados a base de queso fresco

En la Figura 25 se muestra el crecimiento de *E. coli* inoculada en medios de crecimiento elaborados a base de Queso fresco durante 7 días de monitoreo a 35 °C en contacto con la película bioactiva (PB), la película control (PC) y de dos controles de estudio, el control de esterilidad (CSPSI), el cuál no contenía ni el inóculo del microorganismo ni la película, y el control de crecimiento microbiano, el cual contenía el inóculo pero sin película (CSPCI).

El control CSPSI no mostró desarrollo de la bacteria, confirmando de esta manera la esterilidad del medio durante todos los días de la prueba. El control en el que no se colocó ningún tipo de película pero que fue inoculado con la bacteria (CSPCI), evidentemente mostró un fuerte crecimiento de *E. coli*. En el inicio del experimento la concentración del microorganismo de estudio fue de 10^2 UFC_{*E.coli*}/g medio Queso y alcanzó una concentración de 10^8 UFC_{*E.coli*}/g medio Queso en el muestreo que se realizó en el día 5. Dicha concentración se mantuvo hasta el día 7; tiempo que duro el experimento, debido a que no existió diferencia significativa de la concentración final del microorganismo entre los últimos dos días de monitoreo.

En los medios de cultivo a base de queso fresco, inoculados con *E. coli* y con película control (pectina-gelana sin antimicrobianos) en la superficie, presentaron hasta el quinto día del experimento un recuento de células viables no mayor a 70 UFC_{*E.coli*}/g medio Queso retardando el desarrollo de población microbiana, sin embargo, su desarrollo aumentó considerablemente hasta alcanzar cerca de 200 UFC_{*E.coli*}/g medio Queso al término de la evaluación.

El efecto inhibitorio parcial sobre el crecimiento de *E. coli* que presentó la película control en los primeros días de estudio puede ser atribuido a la pectina y gelana, ambos polisacáridos son aniónicos y dan lugar a soluciones filmogénicas ácidas (pH 3 a 4) y a la barrera física al oxígeno que limita el crecimiento microbiano. Por otra parte, se ha reportado el efecto antimicrobiano de pectinas de diversas fuentes sobre microorganismos como *Salmonella enteritidis*, *Salmonella entérica*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli* (Du et al., 2008; Mild et al., 2011; Ravishankar, Zhu, Olsen, McHugh, & Friedman, 2009).

Los resultados obtenidos para la película bioactiva (90 UA/mL de bacteriocina con 0.05 M de EDTA) exhibió una fuerte actividad antimicrobiana sobre *E. coli*, inhibiendo totalmente el desarrollo del microorganismo de estudio desde el tiempo cero hasta el día 7 a una temperatura de incubación de 35 °C. Este resultado es debido a que existe un efecto sinérgico contundente entre los componentes antimicrobianos de la película bioactiva, es decir bacteriocinas producidas por *S. infantarius* y el EDTA. Debido a que el EDTA es un agente quelante, principalmente de cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} , los cuales se encuentran formando parte de la membrana celular de los microorganismos. Por lo tanto, el EDTA secuestra dichos iones permitiendo la inestabilización de la membrana externa y permitiendo el paso de otros agentes

antimicrobianos, como las bacteriocinas. Estas últimas tienen un efecto antagónico contra bacterias taxonómicamente relacionadas, es decir, bacterias Gram-positivas, por lo que su acción en bacterias Gram-negativas, como *E. coli*, requiere la acción combinada de otros antimicrobianos que logren desestabilizar la membrana. La película bioactiva elaborada a base de pectina-gelana con la adición de 90 UA/mL de CAM producido por *Streptococcus infantarius* y una solución 0.05 M EDTA logró reducir la concentración del patógeno *E. coli* 9 ciclos logarítmicos en comparación con el control CSPCI al día 7 de monitoreo.

Un reporte similar es el de Arteaga-Márquez et al. (2015), en el que se estudió el efecto de una película antimicrobiana, sobre la vida útil del queso Costeño. Las películas fueron elaboradas a base de carboximetilcelulosa y como principio activo fue nisina (16 mg/100 mL de solución). Se realizaron análisis microbiológicos (*E. coli* y *S. aureus*). El tratamiento control presentó crecimiento visible de los patógenos, mientras la película antimicrobiana ejerció un efecto inhibitorio sobre *S. aureus* en los quesos. Sin embargo, el espectro antimicrobiano de la nisina fue estrecho, al no lograr inhibir la flora Gram negativa.

Otro estudio es el de Shin et al. (2012), en el que evaluaron películas a base de algas rojas, incorporadas con extracto de semillas de pomelo, también conocida como toronja (1 % p/p) para el embalaje de queso. Fue probada esta película para inhibir el crecimiento de *E. coli* O157: H7 y *L. monocytogenes*, las muestras fueron almacenadas a 4°C durante 15 días.

La película redujo la población de *E. coli* O157: H7 por 1.21 log UFC/g después de 15 días de almacenamiento a temperatura de refrigeración (4°C) en comparación con el control y 0.85 log UFC/g para el caso de *L. monocytogenes*. Esto sugirió que las biopelículas son un material útil para extender la vida de anaquel del queso.

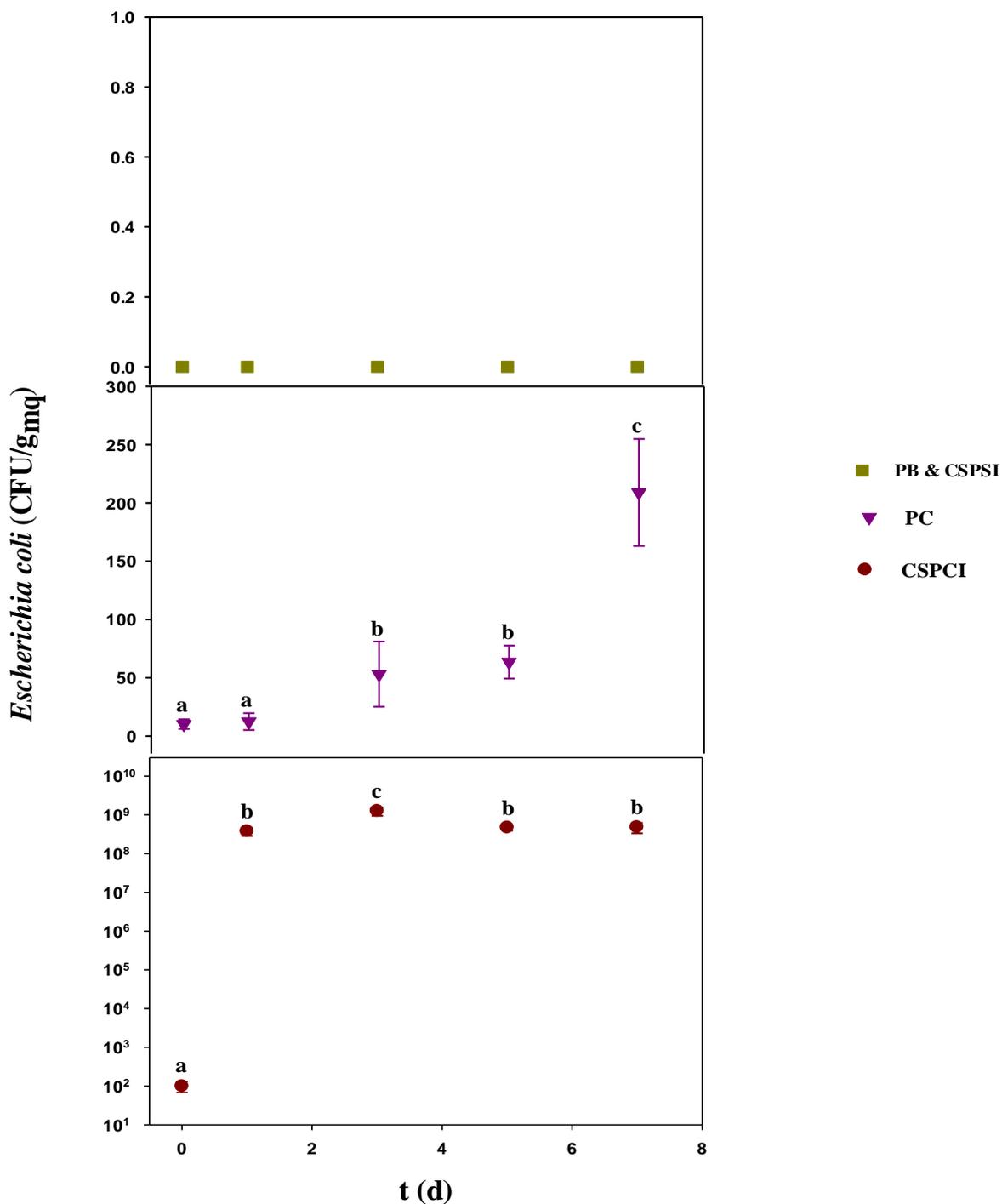


Figura 25. Efecto de películas con y sin compuestos antimicrobianos en el crecimiento de *E. coli* en medios elaborados a base de Queso, en los distintos tratamientos bajo condiciones de incubación a 35 °C. Se muestran los resultados con sus tres réplicas. (PB = Película Bioactiva; CSPSI = Control sin película, sin inóculo; PC = Película Control; CSPCI = Control sin película, con inóculo).

La Figura 26 muestra el comportamiento del crecimiento de *S. aureus* en medios elaborados a base de queso fresco, en contacto directo con la película control y la película bioactiva (90 UA/mL de bacteriocina + 0.05 M de EDTA). De igual forma se observan los controles de estudio en los medios de crecimiento elaborados a base de Queso, inoculados previamente con la bacteria. El control de esterilidad (CSPSI), sin el microorganismo antes mencionado, no mostró desarrollo; confirmando de esta manera la esterilidad del medio durante los 7 días de la prueba.

El control sin película alguna y con inóculo de la bacteria (CSPCI), exhibió un fuerte crecimiento de *S. aureus*; inicialmente la concentración del microorganismo patógeno fue de 10^2 UFC_{*S. aureus*/g medio Queso}, para luego alcanzar 10^9 UFC_{*S. aureus*/g medio Queso} en el día 7 del muestreo, siendo ésta la concentración máxima de la población de *S. aureus*. De acuerdo con el análisis estadístico existió diferencia significativa en todos los días de monitoreo.

Las placas en las que se colocó la película control (únicamente pectina y gelana) evidenciaron un crecimiento de *S. aureus* menor a 30 UFC_{*S. aureus*/g medio Queso} durante los días: 0, 1 y 3 de prueba, sin diferencias significativas entre estos días de recuento microbiológico. Para el día 5 de muestreo se realizó un conteo promedio de 80 UFC_{*S. aureus*/g medio Queso}, concentración que se fue incrementando gradualmente hasta lograr alcanzar cerca de 230 UFC_{*S. aureus*/g medio Queso} para el día final del experimento. Fue evidente que la película biopolimérica, sólo pectina-gelana en su formulación, logró inhibir el desarrollo desmedido de *S. aureus* durante los tres primeros días. Esto contrastando con la caja testigo del inóculo sin película.

La película bioactiva incorporada con 90 UA/mL de CAM más 0.05 M de EDTA exhibió una fuerte actividad inhibitoria sobre *S. aureus*. Esto debido a que impidió el desarrollo total del microorganismo de estudio hasta el término del experimento con una temperatura de incubación de 35 °C. Estos resultados se pueden comparar con los reportados por Haniyah et al. (2016), ya que investigaron el control microbiano de una película comestible de proteína de suero de leche que contenía lisozima modificada y EDTA en queso Gouda. Muestras de queso gouda joven fueron sumergidos en la solución filmogénica; previamente, los quesos fueron contaminados artificialmente sobre la superficie, exhibió *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* por separado mediante una suspensión microbiana de 10^6 UFC/mL. Se dejó

en maduración el queso durante 8 semanas a 10 °C y 85 % HR. El recuento microbiano se realizó a 1 día, 2 semanas, 4 semanas y 8 semanas. La adición de lisozima modificada y EDTA en el recubrimiento generó una disminución de 2 log UFC/g para *E. coli* y *S. typhi* desde la semana 2 hasta la semana 8 del experimento. El recuento de *S. aureus* permaneció estable en 4 log UFC/g desde el principio hasta 4 semanas después. Esto demuestra que el recubrimiento comestible antimicrobiano es eficaz en la prevención del crecimiento de microorganismos patógenos tanto en la superficie como interior del queso gouda durante la maduración. Estos autores observaron un efecto bacteriostático en *S. aureus* durante el tiempo que duró su experimentación. En contraste, la película bioactiva de gelana-pectina usada en el presente trabajo de investigación logró reducir 2 ciclos logarítmicos la concentración del mismo microorganismo patógeno a los 7 días de monitoreo. Es importante resaltar que el presente trabajo de investigación se llevó a cabo a una temperatura de 35 °C, es decir, proporcionando las condiciones óptimas de desarrollo para *S. aureus*.

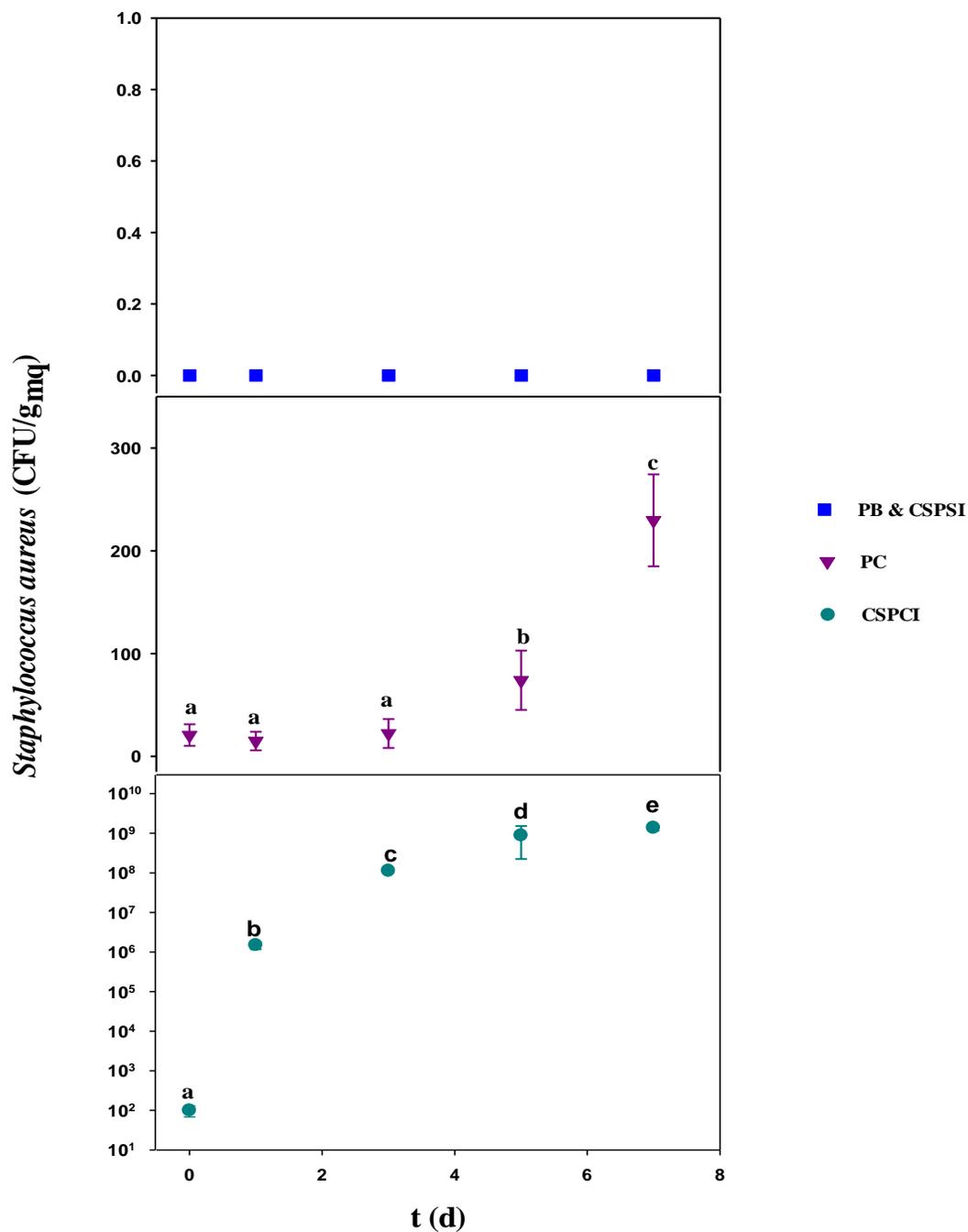


Figura 26. Efecto de películas con y sin compuestos antimicrobianos en el crecimiento de *S. aureus* en medios elaborados a base de Queso, en los distintos tratamientos bajo condiciones de incubación a 35 °C. Se muestran los resultados con sus tres réplicas. (PB = Película Bioactiva; CSPSI = Control sin película, sin inóculo; PC = Película Control; CSPCI = Control sin película, con inóculo).

La Figura 27 muestra el comportamiento de *L. monocytogenes* en presencia de películas con y sin compuestos antimicrobianos, así como los controles empleados sobre los medios elaborados a base de Queso. El control CSPSI, una vez más corroboró la esterilidad de los medios preparados, puesto que no presentó colonias del patógeno durante los 7 días que duró el experimento. El control sin película pero con inóculo de la bacteria (CSPCI), evidenció crecimiento indudable de *L. monocytogenes* a partir del tiempo cero; la concentración inicial del microorganismo fue de 10^2 UFC_{*L.monocytogenes*}/g medio Queso, hasta alcanzar 10^5 UFC_{*L.monocytogenes*} /g medio Queso en las siguientes 24 h. Esta cuenta cambió a 10^7 UFC_{*L.monocytogenes*}/g medio Queso para los días 3, 5 y 7, manteniéndose sin cambios importantes.

Las cajas en las que se colocó la película control (sólo biopolímeros en su formulación) en la superficie, presentaron en los primeros 3 días del experimento una concentración de alrededor de 30 UFC_{*L.monocytogenes*}/g medio Queso, sin diferencias significativas según el análisis estadístico. Logrando mantener bajo el desarrollo de *L. monocytogenes* en los primeros días de muestreo, pero después del día 3 de evaluación, el crecimiento del patógeno se incrementó hasta alcanzar un poco más de 500 UFC_{*L.monocytogenes*}/g medio Queso al día 7 de observación. Comparando este resultado con la caja testigo del inóculo, fue evidente que en los primeros tres días de evaluación la película biopolimérica a base de pectina y gelana controló el desarrollo de *L. monocytogenes*. Este efecto inhibitorio parcial de la película se puede atribuir a que fue una barrera al paso del oxígeno, además a que ambos polímeros poseen azúcares ácidos en su estructura, ácido galacturónico en la pectina y ácido glucurónico en la gelana retardando posiblemente el desarrollo del patógeno. Además que los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura de 35 °C, siendo ésta la óptima para el crecimiento del microorganismo de estudio.

Por otra parte, la película bioactiva (90 UA/mL de CAM más 0.05 M de EDTA) mostró una importante actividad antimicrobiana sobre *L. monocytogenes* ya que logró inhibir por completo el crecimiento del microorganismo de estudio hasta el término del muestreo a una temperatura de incubación de 35 °C.

Este trabajo de investigación puede ser comparado con lo reportado por Martins et al. (2010) quienes evaluaron películas bioactivas con una matriz compuesta por galactomananos de *Gleditsia triacanthos*, empleando nisina (50 UI/ g) como agente antimicrobiano contra *L.*

monocytogenes (10^6 UFC/mL) probado en muestras de queso Ricotta. Ellos lograron reducir la concentración bacteriana a $2.2 \log \text{ UFC g}^{-1}$ hasta el día 14 de almacenamiento a 4°C . Si bien, estos autores informaron el control de *L. monocytogenes* por el doble de tiempo, en comparación con los 7 días que se inhibió el crecimiento del mismo microorganismo indicador en el presente estudio, es relevante mencionar que el de ellos se llevó a cabo a una temperatura de 4°C y el de esta investigación a 35°C . Adicionalmente, la membrana citoplasmática de *L. monocytogenes* puede ser dañada por bajas temperaturas, por lo tanto, la capacidad de la nisina para formar poros en la membrana es mayor y con ello la mortalidad del microorganismo a temperaturas de refrigeración se incrementa.

Del mismo modo, el comportamiento de la película bioactiva de pectina y gelana incorporada con los péptidos antimicrobianos producidos por *Streptococcus infantarius* y EDTA se puede comparar con la película formulada por Cao-Hoang et al. (2010). Estos autores evaluaron una película de caseinato de sodio que contenía nisina (1000 UI/ cm^2) y se empleó para controlar *Listeria innocua* en un queso contaminado artificialmente, Queso Mini Babybel® rojo, el cual fue elegido como un queso modelo semi-suave. El microorganismo *L. innocua* fue inoculado en la superficie del alimento en una concentración final de 10^5 UFC/cm^2 . La presencia de la película activa resultó en una reducción de $1.1 \log \text{ UFC/g}$ en los recuentos de *L. innocua* en muestras de queso después de una semana de almacenamiento a 4°C en comparación con las muestras control.

Otro reporte similar es de Duan et al. (2007), ellos investigaron las actividades antimicrobianas de películas compuestas de quitosano-lisozima (60% de lisozima por peso seco de quitosano) contra *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, o *Pseudomonas fluorescens* (10^4 UFC/g), inoculados sobre la superficie de queso Mozzarella, durante 14 días de almacenamiento a 10°C . Ellos observaron una reducción de la cuenta microbiana en el queso de 0.43 a 1.25, 0.40 a 1.40 y 0.32 a 1.35 log en *E. coli*, *P. fluorescens* y *L. monocytogenes*, respectivamente.

Comparando los resultados del presente trabajo con los expuestos anteriormente, la película bioactiva de pectina y gelana exhibió una excelente inhibición de *L. monocytogenes*. A pesar de haber usado una concentración más baja de unidades de actividad de bacteriocina, según lo reportado en otras investigaciones, se logró impedir totalmente el desarrollo del microorganismo

indicador en cuestión, pese a que el experimento se llevó a cabo a la temperatura óptima de crecimiento para el patógeno (35°C).

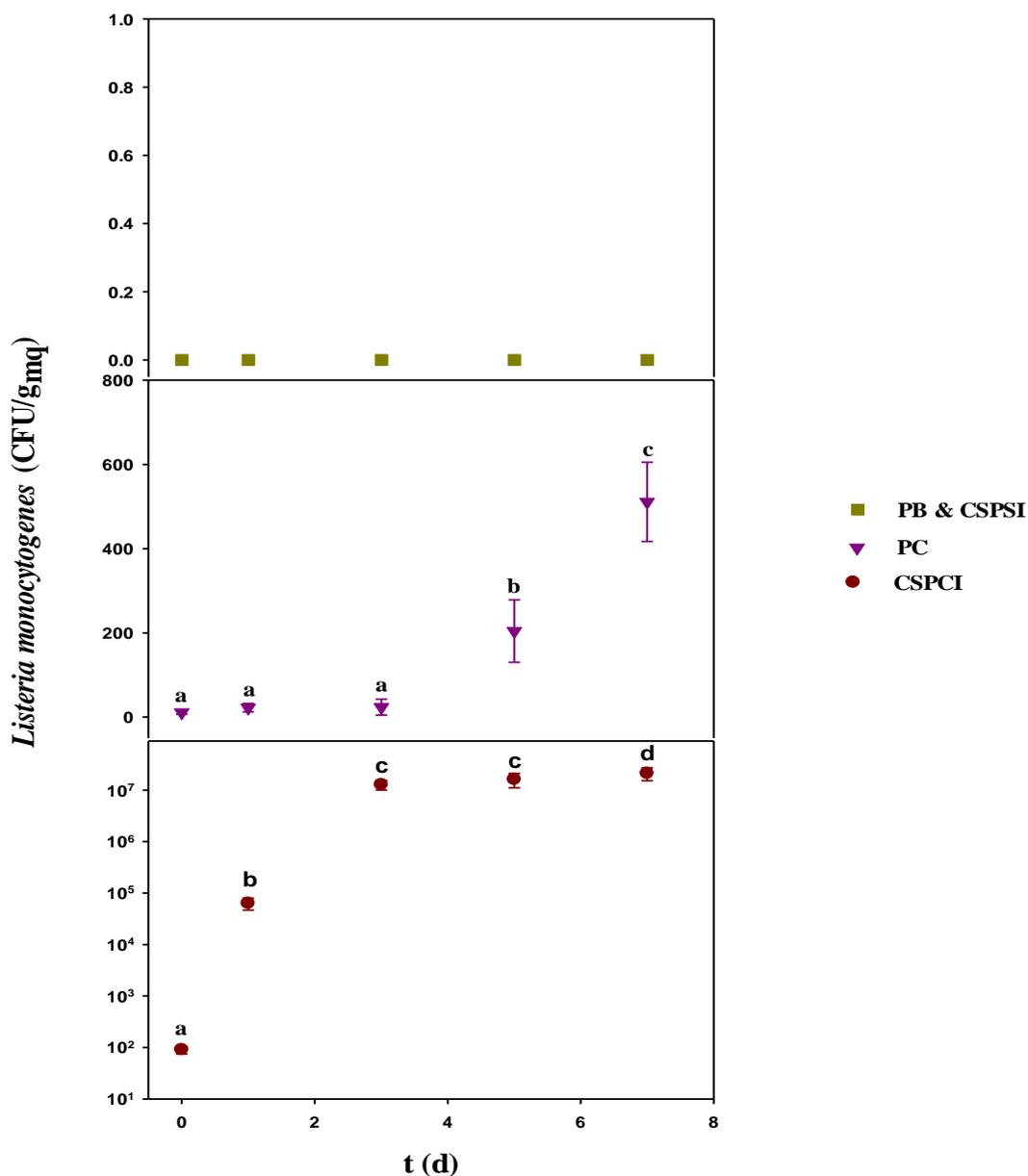


Figura 27. Efecto de películas con y sin compuestos antimicrobianos en el crecimiento de *L. monocytogenes* en medios elaborados a base de Queso, en los distintos tratamientos bajo condiciones de incubación a 35 °C. Se muestran los resultados con sus tres réplicas. (PB = Película Bioactiva; CSPSI = Control sin película, sin inóculo; PC = Película Control; CSPCI = Control sin película, con inóculo).

Recapitulando, se destaca que la película antimicrobiana formulada de pectina-gelana con la adición de 90 UA/mL de CAM producida por *Streptococcus infantarius* más 0.05 de EDTA, presentó una fuerte actividad inhibitoria contra los tres microorganismos de estudio (*E. coli*, *S. aureus* y *L. monocytogenes*) ya que logró impedir por completo su crecimiento en los medios preparados a base de Queso.

Por todas estas características, la película estudiada tiene un potencial uso en la conservación de los alimentos, por su amplio espectro de inhibición tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas. Esta investigación, establece una plataforma tecnológica que permite sugerir a la película bioactiva no sólo en quesos, sino en una amplia gama de alimentos con propiedades similares y que se vean amenazados por el ataque de los microorganismos patógenos examinados en este estudio.

7.6 Propiedades mecánicas de las películas con agentes antimicrobianos

Las películas elaboradas a base de complejos biopoliméricos son materiales viscoelásticos que poseen características tanto de sólidos como de líquidos. Una matriz, constituida por la interacción entre los biopolímeros que forman el complejo, es probablemente la estructura de soporte que determina las propiedades mecánicas de las películas (Chen, Kuo, & Lai 2009). Las interacciones entre los biopolímeros, el disolvente, el plastificante y otros aditivos (antioxidantes, antimicrobianos, entre otros) dispersos en los espacios de la matriz, también contribuyen notablemente en las propiedades mecánicas de las películas. Es decir, dependen en gran medida del tipo de material empleado es su elaboración, especialmente de su grado de cohesión (habilidad del polímero para formar muchos puentes moleculares entre las cadenas poliméricas y que éstos sean estables) (Lavorgna, Piscitelli, Mangiacapra, & Buonocore, 2010).

Las propiedades mecánicas son importantes para las películas comestibles, ya que una resistencia mecánica adecuada asegura la integridad de las películas y la ausencia de defectos menores, tales como perforaciones o poros (Hari & Nair, 2016). Es muy importante que una película comestible tenga buenas propiedades mecánicas para que conserve íntegro al alimento durante el manejo, el embalaje y el transporte. Normalmente, las películas hechas de

polisacáridos o proteínas muestran buenas propiedades mecánicas, siempre que se incorpore un plastificante. Debido a que éste promueve la formación de puentes de hidrógeno, relaja la estructura y proporciona mayor flexibilidad a las películas (Liu et al., 2016).

La información cuantitativa de los parámetros mecánicos de las películas comestibles es esencial para su diseño. Se lleva a cabo mediante la reología, ciencia que establece relaciones entre tres variables: deformación, esfuerzo y tiempo. Con ello, es posible conseguir las propiedades materiales verdaderas independientes del tamaño de la muestra y geometría. Se considera que las propiedades mecánicas de las películas son buenas cuando se obtiene un equilibrio en la estructura química, para lo cual, entre los factores importantes son la resistencia a la tensión ($\sigma_{\text{máx}}$), el cual es un parámetro importante en el diseño de envases, mide la máxima tensión que un material puede resistir antes de romperse. El porcentaje de elongación (% e), es la variación porcentual de la longitud inicial de la muestra, usualmente se determina en el punto de rompimiento de la muestra. El módulo de Young (ME) representa la rigidez del material mostrada cuando se le aplica una fuerza, entre más grande sea la rigidez mayor será la fuerza o esfuerzo necesario para causar una deformación (Mendoza Mendoza, 2012).

La Figura 28 muestra el aspecto de las películas a base de pectina-gelana con y sin la inclusión de agentes antimicrobianos durante las pruebas de tensión, Se eligió las determinaciones reproducibles, descartando las pruebas donde las películas no se fracturaron en el centro.

En la Tabla 12 se muestran los valores promedio de las propiedades mecánicas de las películas comestibles obtenidas en esta investigación. El módulo de Young, como se mencionó, describe la rigidez de la película. La película control (únicamente pectina-gelana en su formulación) mostró un valor menor para ME siendo casi dos veces menos que el correspondiente valor de la película bioactiva (pectina-gelana, 90 UA/mL de CAM producida por *Streptococcus infantarius* más 0.05 M EDTA). Lo cual indica, que la incorporación del agente antimicrobiano y EDTA, provocó que la película bioactiva fuera más rígida. Aun cuando se trata de la misma matriz polimérica, la adición de EDTA y de los compuestos antimicrobianos pueden resultar diferencias microestructurales que se reflejan directamente en las características

mecánicas. Esta diferencia se atribuye a la organización microestructural que adoptan los biopolímeros durante la gelificación y/o proceso de secado de la solución filmogénica.

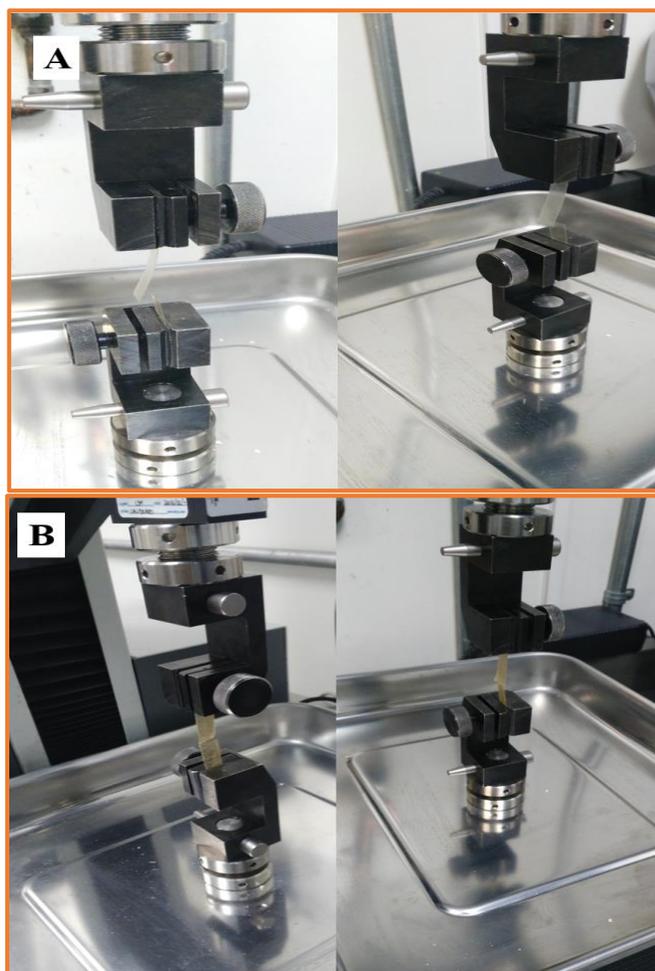


Figura 28. Ensayo de tensión en películas a) pectina-gelana, b) pectina-gelana, bacteriocinas y EDTA, en el que se observa la evolución de la tensión y la elongación hasta el momento de fractura. Determinaciones realizadas en CICATA-Querétaro.

De acuerdo a estudios reportados por Calderón-Aguirre et al. (2015), quien elaboró biopelículas con la misma matriz polimérica (pectina-gelana) y con el mismo compuesto antimicrobiano producido por *Streptococcus infantarius*, indican que se obtuvieron valores más pequeños de ME en películas con la inclusión de la bacteriocina con respecto al blanco (pectina-

gelana), en ese trabajo se explica que las sustancias antimicrobianas actúan como plastificantes adicionales 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.

Tabla 12. Propiedades mecánicas de películas elaboradas con pectina-gelana, 90 UA/mL CAM producido por *Streptococcus infantarius*, más 0.05 M EDTA

	Módulo de Young (MPa)	Esfuerzo en el punto de fractura (σ_f , MPa)	Elongación (% e)	Deformación de Hencky en el punto de fractura (ϵ_f , %)
Película control	706.55±47.75	12.58 ± 1.28	9.26 ± 1.97	3.84 ± 0.79
Película bioactiva	1393.72±144.24	5.65 ± 0.67	1.86 ± 0.39	0.80 ± 0.16

Valores promedio de 30 determinaciones ± desviación estándar.

Sin embargo, este efecto no se vio reflejado en el presente estudio, posiblemente radique en la única diferencia, que fue la adición de EDTA. Es sabido, que las pectinas de bajo metoxilo (empleada en este trabajo) requieren del calcio. Éste, induce la gelificación iónica de las pectinas mediante el acoplamiento de cadenas, interaccionado con cationes bivalentes, principalmente el calcio y los grupos carboxílicos de las cadenas de pectina. Es por ello, que el calcio es de suma importancia en sus propiedades funcionales (Rascón Chu, Martínez López, Carvajal Millán, Martínez Robinson, & Campa Mada, 2016). Por otra parte, el ácido etilenediaminotetraacético (EDTA) es un agente quelante, debido a que tiene la capacidad de formar complejos con iones divalentes como el Ca^{2+} y Mg^{2+} . Dado esto, al combinarse en una misma matriz lo que sucede es que actúa como un secuestrador de iones, es decir, captura los iones Ca^{2+} del medio (Anbinder, Peruzzo, & Amalvy, 2016), como resultado de lo cual se pueden disminuir las interacciones entre Homogalacturonanos (HG-HG) de las pectinas o entre cadenas de gelana (Vincken et al., 2003). Es decir, el calcio puede estar interactuando más con el quelante que con la pectina y gelana, impidiendo la asociación entre cadena-cadena de biopolímero y la formación

de los hidrogeles de pectina-gelana. Esto podría conducir a una mayor densidad de entrecruzamiento entre el EDTA y el calcio (Singh, Suri, Tiwary, & Rana, 2012; Syuhada et al., 2014), produciendo así películas más rígidas en comparación con las películas producidas por la interacción entre la pectina y la gelana únicamente.

El esfuerzo a la fractura (σ_f) fue distinto entre los dos tipos de películas, en donde, la película con pectina y gelana requirió mayor esfuerzo para fracturarse (12.58 ± 1.28 MPa) que la película con actividad antimicrobiana (5.65 ± 0.67 MPa). Esto es, no obstante que la película bioactiva fue más rígida, requiere menos fuerza o esfuerzo para que llegue al punto de fractura (i.e. menos manejable).

Silva, Bierhalz, & Kieckbusch (2009) observaron en películas de pectina, que conforme aumentaba la concentración de calcio en el medio, promovía un aumento en los valores de la resistencia a la tensión. Resultados similares fueron encontrados por Rhim (2004), quien observó un aumento en σ_f , por el tratamiento con calcio en películas de alginato.

Por otro lado, las películas menos rígidas (valores menores de ME) y con valores mayores de σ_f fueron las más extensibles (i.e. película control) con valores cercanos al 10%, mientras que las más rígidas (película bioactiva) apenas se deformaron hasta un cerca del 2% con respecto a su longitud inicial.

La Figura 29 muestra los reogramas representativos de las películas. Es evidente una zona plástica más pronunciada para las películas que contienen en su formulación únicamente pectina-gelana. En contraste las películas con los péptidos activos producidos por *Streptococcus infantarius* y EDTA fueron menos plásticas (deformaciones pequeñas antes de la fractura) y más rígidas. Por lo tanto, posiblemente EDTA actuó como un agente secuestrante de iones calcio del medio, promoviendo mayores interacciones iónicas EDTA-Calcio, lo cual disminuyó la cohesividad de la red gelana-pectina. Esto, provocó el posible cambio en las propiedades mecánicas, decreciendo la flexibilidad en la matriz polimérica de la película bioactiva (Silva et al., 2009; Singh et al., 2012).

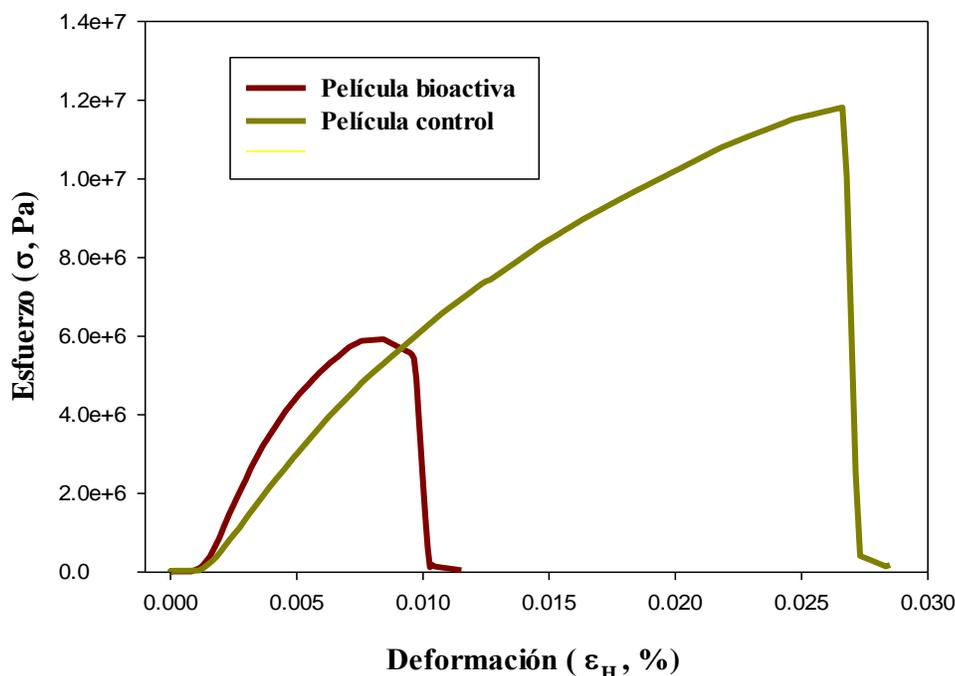


Figura 29. Comportamiento mecánico de las películas de pectina-gelana en sus diferentes tratamientos después de ser sometidas a la prueba de tensión uniaxial.

En la Tabla 13 se muestran algunos resultados de trabajos enfocados al estudio de las propiedades mecánicas de películas comestibles adicionadas con agentes antimicrobianos, sin embargo, resulta complicado la comparación de los resultados, debido a que éstos son dependientes del equipo utilizado, de las condiciones de prueba (temperatura, humedad, velocidad de deformación, etc.), el método de elaboración de la película (método de secado, tipo de plastificante, entre otros). Los resultados de ME reportados para películas que son de pectina y con la inclusión de una bacteriocina (nisina) varían considerablemente. Jin et al. (2009) reportaron valores de ME por encima de los 2000 MPa, lo cual indica que esas películas fueron aún más rígidas que las evaluadas en la presente investigación, pero la elongación de esas películas fue comparable a la obtenida en este trabajo. En general, comparando las propiedades mecánicas de las películas evaluadas en este estudio con varias biopoliméricas reportadas, es evidente que se obtuvieron películas rígidas poco elongables.

Tabla 13. Propiedades mecánicas de algunas películas biopoliméricas reportadas en la literatura

Película	Condiciones de prueba	Módulo de Young, ME (MPa)	Esfuerzo a la fractura, σ_f (MPa)	Elongación, e (%)	Referencia
Carragenina Glicerol (plastificante) Nanofibrillas de quitina (CNF)	Instron Universal Testing Machine (Model 5565) Tiras de: 2,54 cm×15 cm V= 50 mm/min	30.2 ×10 ³ ± 1.8 40.7×10 ³ ± 3.5 44.7 ×10 ³ ± 3.6 29.8 ×10 ³ ± 3.5	30.2 ± 1.8 40.7 ± 3.5 44.7 ± 3.6 29.8 ± 3.5	21.8 ± 1.8 14.4 ± 2.6 11.2 ± 1.3 3.9 ± 1.6	Shankar, Reddy, Rhim, & Kim (2015)
Carboximetilcelulosa (CMC) Glicerol (plastificante) Tween 80 (emulsionante) Aceite esencial: <i>Zataria multiflora</i> Boiss (Control, 1, 2, y 3% (v/ v))	Testometric tensile tester (modelo M350-10CT) Tiras de: 1.5cm ×10 cm V= 10 mm/min	—	17.75 ± 1.8 58.84 ± 1.36 23.71 ± 1.42 16.96 ± 0.95	26.86 ± 0.98 30.40 ± 0.75 26.72 ± 1.37 20.77 ± 0.51	Dashipour et al. (2015)
Gelatina de bovino Glicerol (plastificante) Aceite esencial <i>Zataria multiflora</i> (ZMO) (0, 2, 4, 6 y 8% w/w)	Analizador de textura (TA.XT Sistema Micro Estable). Tiras de: 60 mm×10 mm×0.1 mm V= 10 mm/s	8.8 ± 0.4 7.5 ± 0.25 6.7 ± 0.26 6.2 ± 0.31 5.7 ± 0.24	4.4±0.26 3.7 ± 0.21 3.4 ± 0.23 2.9 ± 0.17 2.7 ± 0.18	125 ± 7 140 ± 5 144 ± 6 167 ± 7 172 ± 8	Kavoosi et al. (2014)
Carragenina Glicerol (plastificante) Extracto de semilla de pomelo (GSE) (control, 0.6, 3.3, 6.6, 10 y 13.3 mg/ml de GSE)	Instron Universal Testing Machine (Model 5565) Tiras de: 2.54 cm×15 cm V= 50 mm/min	1112.08 ± 69.4 969.71 ± 99.88 614.25 ± 56.83 530.48 ± 67.76 472.29 ± 82.94 347.29 ± 14.85	44.63 ± 4.69 43.38 ± 9.86 24.91 ± 3.23 24.49 ± 1.54 11.18 ± 1.18 3.21 ± 0.87	24.22 ± 2.31 26.41 ± 5.71 27.14 ± 3.49 27.27 ± 3.45 18.14 ± 2.58 14.93 ± 1.46	Kanmani & Rhim (2014)
Caseinato de sodio (CS), Metilcelulosa (MC) Dos bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas (BAL):	Texturómetro Analyser TA-XT-plus Tiras de:24.5 × 100 mm V= 50 mm/min	CS = 345±79 CS + L. a = 318±34	11.2 ± 1.2 10.0 ± 0.8 6.9 ± 0.5 31.6 ± 0.8	6.0 ± 0.3 5.8 ± 0.2 6.3 ± 0.2 29 ± 7.0	Sánchez-González et al. (2014)

<i>Lactobacillus acidophilus</i> (L. a) y <i>Lactobacillus reuteri</i> (L. r)		CS + L. r= 252±23 MC= 532±25 MC + L. a= 332±35 MC + L. r =328±21	30.7 ± 0.8 24.0 ± 24.0	32.9 ± 1.3 33.0 ± 2.0	
Almidón de sagú 4% (w/w) Sorbitol/glicerol (plastificante) Extracto de hoja de betel (0%, 5%, 10%, 20%, y 30%, w/w)	Analizador de textura TA.XT2 Tiras de: 100 mm × 20 mm V= 1 mm/s	—	Formulación 20% = 5.5 30% = 3	Formulación 20% = 115 30% = 90	Nouri & Mohammad (2014)
Pectina Ácido poliláctico (PLA) Nisina (1000 UI/ mL)	Instron Universal Testing (model 1122) Tiras de: 16.42 cm × 1.91cm V=50 mm/min	PLA= 2482 ± 99 Pectina/PLA = 2598 ± 100	53.4 ± 3.5 40.2± 1.1	3.0 ± 0.21 1.98± 0.07	Jin et al. (2009)
Proteína de soya GSE: extracto de semilla de pomelo (1%), Nis: nisina (10,000 IU/g), EDTA (0.16%), GSE+Nis: extracto de semilla de pomelo (1%) + nisina(10,000 IU/g), GSE+EDTA: extracto de semilla de pomelo (1%) + EDTA (0.16 %), Nis + EDTA: Nisina (10,000 IU/g) + EDTA (0.16%), GSE + N + E: extracto de semilla de pomelo (1%) + nisina (10,000 IU/g) + EDTA (0.16%)	Texturómetro analyzer (TA- XT2I Tiras de: 40mm ×15 mm V= 2 mm/s	—	8.80 ± 0.26 10.74 ± 0.88 5.11± 0.30 9.29 ± 0.29 9.78 ± 0.12 8.34 ± 0.44 4.72 ± 0.40 7.78 ± 0.33	—	Sivarooban et al. (2008)

7.7 Permeabilidad al oxígeno (PO₂) de las películas con agentes antimicrobianos.

Es necesario que películas y recubrimientos comestibles exhiban óptimas propiedades de barrera, debido a que la transferencia del oxígeno del medio ambiente hacia el alimento determina su calidad y su vida útil. El deterioro en diversos productos alimenticios empacados se debe principalmente a la permeabilidad al oxígeno de su empaque, lo cual causa la oxidación de lípidos, vitaminas, compuestos de sabor y pigmentos (Ayranci & Tunc, 2003). El deterioro promovido por la respiración y la oxidación de productos alimenticios puede ser controlado con el uso de películas comestibles, esto se relaciona directamente con la permeabilidad al oxígeno y al gas carbónico de la película, ya que se tratan de dos gases que están involucrados en la conservación de frutas frescas y vegetales, así como de alimentos que contienen lípidos. Las películas comestibles con permeabilidades bajas al oxígeno se utilizan para recubrir alimentos que son susceptibles a la oxidación o enranciamiento. En contraste, una permeabilidad alta de gas carbónico es eficaz para productos hortofrutícolas.

La Tabla 14 muestra los valores de permeabilidad al oxígeno (PO₂) determinados en las películas de los tratamientos estudiados en este trabajo. Los resultados de PO₂ de la película control y bioactiva fueron comparables con los reportados para películas biopoliméricas como las de caseinato de calcio (1.25×10^{-12} g m⁻¹ s⁻¹ Pa⁻¹), carboximetilcelulosa 0.25 % (5.54×10^{-12} g m⁻¹ s⁻¹ Pa⁻¹), gelatina bovina, porcina y de salmón (2.94 a 3.98×10^{-12} g m⁻¹ s⁻¹ Pa⁻¹) (Aguirre-Loredo, 2011) ya que se encuentran en el mismo orden de magnitud.

Tabla 14. Permeabilidad al oxígeno (PO₂) de películas con y sin sustancias antimicrobianas.

Tratamiento	PO ₂ × 10 ⁻¹² (g m Pa ⁻¹ s ⁻¹ m ⁻²)
Película Control (Biopolímeros)	1.23 ± 0.24
Película Bioactiva (90 UA/mL de CAM + 0.05 M de EDTA)	1.94 ± 1.16

Se muestra el promedio de 5 determinaciones ± desviación estándar.

Las películas elaboradas a partir de pectina-gelana, adicionadas con CAM de *S. infantarius* y EDTA presentan un permeabilidad menor a otro tipo de películas biopoliméricas de uso común, como las elaboradas a partir de quitosano al 1, 1.5 y 2 % (3.29, 2.41 y $2.47 \times 10^{-9} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, respectivamente) (Aguirre-Loredo, 2011), por lo que la película bioactiva estudiada impide en mayor medida el paso de las moléculas de O_2 .

Los resultados obtenidos de PO_2 de la película control y bioactiva se pueden comparar con los valores reportados para películas sintéticas, que son los empaques más utilizados en la industria de los alimentos, polipropileno ($2.46 \times 10^{-14} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$), polietileno de baja densidad ($3.08 \times 10^{-14} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$) y polietileno de alta densidad ($0.4 \times 10^{-14} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$) (Calderón-Aguirre, 2014) que son dos órdenes de magnitud más pequeños en comparación con las películas de estudio, esto significa que son más impermeables al oxígeno.

Las diferencias entre los distintos tipos de películas evaluadas en este trabajo, se pueden atribuir a las características propias de cada matriz estructural de la película y a posibles interacciones que existen entre los biopolímeros estructurales y los compuestos antimicrobianos, ya que al tener diferentes matrices biopoliméricas pueden tener distintas proporciones de zonas amorfas/cristalinas que están directamente relacionadas con las propiedades de barrera que pueda tener una película.

7.8 Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas con antimicrobianos

La determinación de la permeabilidad al vapor de agua se obtuvo mediante la transferencia de vapor de agua a través de la película mediante técnica gravimétrica.

Para el cálculo de la permeabilidad al vapor de agua (PVA) de películas hidrofílicas, se conceptualizan 3 etapas:

- a) La primera etapa es el flujo del vapor de agua del medio hacia la superficie de la película,
- b) Difusión de las moléculas de vapor de agua a través de la película
- c) Finalmente la salida de las moléculas gaseosas de agua de la película.

El segundo paso del proceso de difusión depende del tamaño, forma y polaridad del penetrante, de la cristalinidad, de los enlaces y el movimiento de las cadenas poliméricas. En la tercera fase se da el fenómeno de desorción.

Para cada película en particular se tienen diferentes características dependiendo de sus componentes, en la Tabla 15 se muestran los resultados obtenidos para PVA de las películas de pectina y gelana incorporadas con sustancias antimicrobianas.

Tabla 15. Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de películas de películas con agentes antimicrobianos

Tratamiento	PVA ($\times 10^{-11}$ g m/ s Pa m ²)
Película control	19.8 \pm 0.42
Película Bioactiva	2.88 \pm 0.80

Valores promedio (n=3) \pm desviación estándar.

De acuerdo a los resultados de PVA, si se observó diferencia entre la película elaborada únicamente con pectina y gelana (19.4×10^{-11} g m/ s Pa m²) y la película bioactiva (2.88×10^{-11} g m/s Pa m²). Por lo que la inclusión de los agentes antimicrobianos (CAM y EDTA) generó cambios en la permeabilidad al vapor de agua de las películas, la película bioactiva fue 7 veces menos permeable al vapor de agua que la película control, posiblemente esto se deba a la inclusión de cristales de EDTA en su formulación, ya que estos resultados no coinciden con lo reportado por Calderón-Aguirre (2014), quien trabajó con las mismas películas pero sin EDTA en su formulación. Calderón-Aguirre no observó diferencia significativa entre película control y la bioactiva que también incluía compuestos antimicrobianos producidos por *Streptococcus infantarius* pero en mayor cantidad (3.84 mL/película).

Las películas elaboradas en el presente trabajo fueron menos permeables al vapor de agua que películas elaboradas con proteína de soya, de acuerdo a lo reportado por González

& Alvarez Igarzabal (2015), quienes reportaron valores de $PVA=4.3 \times 10^{-10}$ g m/ s Pa m². También son menos permeables al vapor de agua que películas de quitosano con la inclusión de aceites esenciales, $PVA= 1.2 \times 10^{-10}$ g m/ s Pa m² (Sun et al., 2014) y películas a base de carboximetilcelulosa, $PVA=5.79 \times 10^{-10}$ g m/ s Pa m² (Dashipour et al., 2015). Como se puede observar las películas de pectina, gelana, CAM y EDTA son mejor barrera al vapor de agua que varias películas biopoliméricas, sin embargo, aún no pueden ser comparables con los plásticos sintéticos como el polietileno de alta densidad (5.5×10^{-12} g m/ s Pa m²), ya que siguen siendo la mejor opción para impedir el paso del vapor de agua (Hernandez-Izquierdo & Krochta, 2008; Khwaldia et al., 2004).

Uno de los factores más importantes que afecta la permeabilidad de vapor de agua, es el uso de plastificantes (Pastor-Navarro, 2010), ya que cuanto mayor contenido de plastificante, mayor será la PVA (Bangyekan, Aht-Ong, & Srikulkit, 2006), esto debido a que su presencia disminuye las fuerzas intermoleculares en las cadenas del polímero, dando una mayor movilidad molecular, aumentando su permeabilidad al agua. Igualmente los plastificantes incrementan el volumen libre, en consecuencia existe más espacio para que las moléculas de agua migren, además los plastificantes hidrofílicos como el glicerol son compatibles con el material polimérico que forma la película y aumentan la capacidad de sorción de moléculas polares tales como el agua, por tal razón aumenta la permeabilidad de los mismos (Uriarte-Montoya et al., 2010). Otro factor que influye en las características de permeabilidad es la humedad relativa ambiental, ya que si ésta incrementa, más moléculas de agua interactúan con el material, repercutiendo en un efecto plastificante en la película, con ello la movilidad y la transferencia de masa se favorecen y por tanto aumentan los valores de permeabilidad al vapor de agua.

7.9 Determinación de la solubilidad

La solubilidad en agua de las películas es un factor importante que se debe 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 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 la Tabla 16, se observó diferencias entre la película control y bioactiva.

Tabla 16. Valores promedio de la solubilidad en agua de la película control y película bioactiva

Tratamiento	Solubilidad (%)
Película Control (Biopolímeros)	77.17±1.85
Película Bioactiva (90 UA/mL de CAM más 0.05 M de EDTA)	91.99±3.53

Se muestra el promedio de 4 determinaciones ± desviación estándar.

La película bioactiva adicionada con CAM de *S. infantarius* y EDTA presentó los valores más altos de solubilidad (92%). Esto puede atribuirse a las posibles interacciones moleculares entre los agentes antimicrobianos (péptido bioactivo de *S. infantarius* y EDTA) y los biopolímeros, generando una matriz con mayor afinidad hacia compuestos polares como el agua. Es importante resaltar que los métodos usados para determinar solubilidad no están bien estandarizados, en esta determinación influye de manera prominente el área de contacto de la película, la velocidad de agitación en el disolvente (agua), temperatura, relación película/disolvente, etc., por lo que no es conveniente comparar estos datos de solubilidad con los reportados por otros autores.

8 CONCLUSIONES

- Los compuestos antimicrobianos producidos por la bacteria ácido láctica *Streptococcus infantarius*, aislada del pozol, poseen actividad antilisterial.
- Se determinó que la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) contra *Listeria monocytogenes*, fue de 90 UA/mL de péptidos antimicrobianos producido por *Streptococcus infantarius*. Para inhibir el desarrollo de *Staphylococcus aureus* fue suficiente 1×10^{-3} M de EDTA. Mientras que para inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* fue necesaria la mezcla de concentrado antimicrobiano (90 UA/mL) y EDTA (0.05 M).
- Se logró definir la formulación de películas comestibles, elaboradas a base de pectina-gelana incorporadas con bacteriocinas producidas por *Streptococcus infantarius* y EDTA, que potencializaron la bioconservación de un queso fresco.
- En las películas de pectina-gelana en sinergia con los péptidos antimicrobianos (75, 90 y 120 UA/mL) y EDTA (0.05 M), se comprobó que presentan actividad antimicrobiana total sobre el desarrollo de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en sus respectivos medios selectivos/diferenciales durante 30 días a 25°C.
- Se detectó, en el sistema modelo a base de queso fresco que la película bioactiva (90 UA/mL de concentrado antimicrobiano más 0.05 M EDTA) inhibió completamente la población de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (de forma individual), hasta el término de la evaluación (7 días), con una temperatura óptima de incubación (35 °C).
- La inclusión de compuestos antimicrobianos (péptidos bioactivos de *S. infantarius* y EDTA) afectaron las propiedades mecánicas de las películas. El módulo de Young (ME) aumentó, el porcentaje de elongación (% e) y el esfuerzo a la fractura (σ_f)

disminuyeron con la adición de los antimicrobianos con respecto a la película control. Es decir, existió una reducción en las propiedades mecánicas de las películas activas en comparación con el control, sin embargo, se obtuvieron películas con excelente actividad antimicrobiana.

- La película bioactiva presentó una permeabilidad al vapor de agua de 2.88×10^{-11} ($g\ m$) / ($Pa\ s\ m^2$) y una permeabilidad al oxígeno de 3.79×10^{-12} ($g\ m$) / ($Pa\ s\ m^2$). La barrera al vapor de agua fue mayor en la película bioactiva. La transferencia de oxígeno de las películas evaluadas es similar a películas plásticas sintéticas, lo cual las hace competitivas para ser usadas en productos que deben ser protegidos del oxígeno.
- Las películas bioactivas fueron altamente solubles (92 %) en agua, a las condiciones de prueba ($\approx 25^\circ C$, con agitación durante 1 h). Con un valor mayor de solubilidad en comparación a la película control, potencializando su biodegradabilidad.

9 BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, L., Corbalan, N. S., Fernandez-No, I. C., Morero, R. D., Barros-Velazquez, J., & Bellomio, A. (2015). Inhibitory Effect of the Hybrid Bacteriocin Ent35-MccV on the Growth of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in Model and Food Systems. *Food and Bioprocess Technology*, 8(5), 1063-1075. doi: 10.1007/s11947-015-1469-0
- Aday, M. S., & Yener, U. (2015). Assessing consumers' adoption of active and intelligent packaging. *British Food Journal*, 117(1), 157-177. doi: 10.1108/bfj-07-2013-0191
- Aguado-Bautista, L. A., Álvarez -Cisneros, Y. M., & Ponce-Alquicira, E. (2010). Evaluación del efecto antimicrobiano in vitro del extracto crudo de bacteriocina en combinación con conservadores químicos utilizados en la industria cárnica. *Nacameh*, 4, 69-84.
- 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.
- Ahvenainen, R. (2003). Active and intelligent packaging (pp. 5-21). Finland.
- Anbinder, P. S., Peruzzo, P. J., & Amalvy, J. I. (2016). Effect of food additives on the microstructure, mechanical and water transport properties of polyurethane films. *Progress in Organic Coatings*, 101, 207-215. doi: 10.1016/j.porgcoat.2016.08.012
- Araújo, V. S., Pagliares, V. A., Queiroz, M. L. P., & Freitas-Almeida, A. C. (2002). Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J Appl Microbiol*, 22, 1172–1177.
- Arrieta, M. P. (2011). Envases alimentarios (pp. 43-56).
- Arteaga-Márquez, M. R., Espitia-Petro, R., Ramírez-Coronado, E. P., Hernández-Bedoya, C. C., Chams-Chams, L., Espitia-Petro, D. L., & Martínez-B., W. J. (2015). Estudio del efecto de una película antimicrobiana en la vida útil del queso Costeño. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 6, 036-056.
- ASTM. (1993). *Standard test Method for Tensile Properties of Plastics (Metric). D638M*. Philadelphia, EE.UU.: Annual Book of ASTM Standards.
- ASTM. (1998). *Standard test method for determining gas permeability characteristics of plastic film and sheeting. D1434* Philadelphia, EE.UU.: Annual Book of ASTM Standards.
- ASTM. (2000). *Standard methods for water vapour transmission of material. E96-00*. Philadelphia, EE.UU.: Annual Book of ASTM Standards.
- ASTM. (2010). *Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting, D882-10 American Society for Testing and Materials* Philadelphia: Annual Book of ASTM Standards
- 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 Chem*, 80, 423–431.
- Balciunas, E. M., Castillo Martinez, 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
- Bangyekan, C., Aht-Ong, D., & Srikulkit, K. (2006). Preparation and properties evaluation of chitosan-coated cassava starch films. *Carbohydrate Polymers*, 63(1), 61-71. doi: 10.1016/j.carbpol.2005.07.032
- Beshkova, D., & Frengova, G. (2012). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 419-432. doi: 10.1002/elsc.201100127
- Biji, K. B., Ravishankar, C. N., Mohan, C. O., & Srinivasa Gopal, T. K. (2015). Smart packaging systems for food applications: a review. *J Food Sci Technol*, 52(10), 6125-6135. doi: 10.1007/s13197-015-1766-7
- Boerema, J. A., Clemens, R., & Brightwell, G. (2006). Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol*, 107(2), 192-201. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.07.008
- Boonnattakorn, R., Chonhenchob, V., Siddiq, M., & Singh, S. P. (2015). Controlled Release of Mangiferin Using Ethylene Vinyl Acetate Matrix for Antioxidant Packaging. *Packaging Technology and Science*, 28(3), 241-252. doi: 10.1002/pts.2097
- Brunazzi, G., Parisi, S., & Pereno, A. (2014). Packaging and Food: A Complex Combination (pp. 7-56). doi: 10.1007/978-3-319-08452-7_2
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol*, 94(3), 223-253. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
- Calderón-Aguirre, Á.-G. (2014). *PROPIEDADES FÍSICAS Y BIOACTIVIDAD DE PELÍCULAS CON AGENTES ANTIMICROBIANOS PRODUCIDOS POR BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS*. (Tesis de maestría), Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo de Bravo, Hidalgo; México.
- Calderón-Aguirre, Á.-G., Chavarría-Hernández, N., Mendoza-Mendoza, B., Vargas-Torres, A., García-Hernández, E., & Rodríguez-Hernández, A.-I. (2015). Antilisterial activity and physical-mechanical properties of bioactive caseinate films. *CyTA - Journal of Food*, 1-8. doi: 10.1080/19476337.2014.1003200
- Camacho, A. K. C. (2011). *EVALUACIÓN DE RIESGOS DE Listeria monocytogenes EN QUESO FRESCO EN COLOMBIA*. Instituto Nacional de Salud, Bogotá.
- Campos, C. A., Gerschenson, L. N., & Flores, S. K. (2010). Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. *Food and Bioprocess Technology* (Vol. 4, pp. 849-875). doi: 10.1007/s11947-010-0434-1
- Cao-Hoang, L., Chaine, A., Gregoire, L., & Wache, Y. (2010). Potential of nisin-incorporated sodium caseinate films to control *Listeria* in artificially contaminated cheese. *Food Microbiol*, 27(7), 940-944. doi: 10.1016/j.fm.2010.05.025
- Carpentier, B., & Cerf, O. (2011). Review--Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *Int J Food Microbiol*, 145(1), 1-8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.005
- Carrique-Mas, J. J., Hökeberg, I., Andersson, Y., Arneborn, M., Tham, W., Danielsson-Tham, M. L., . . . Giesecke, J. (2003). Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese – an outbreak of listeriosis? *Epidemiology and Infection*, 130(1), 79-86. doi: 10.1017/s0950268802008014

- Cartwright, E. J., Jackson, K. A., Johnson, S. D., Graves, L. M., Silk, B. J., & Mahon, B. E. (2013). Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008. *Emerg Infect Dis*, *19*(1), 1-9; quiz 184. doi: 10.3201/eid1901.120393
- Castellano, P., Belfiore, C., & Vignolo, G. (2011). Combination of bioprotective cultures with EDTA to reduce *Escherichia coli* O157:H7 in frozen ground-beef patties. *Food Control*, *22*(8), 1461-1465. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.02.018
- 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
- Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales de *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, *61*, 28-40.
- Claeys, W. L., Cardoen, S., Daube, G., De Block, J., Dewettinck, K., Dierick, K., . . . Herman, L. (2013). Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control*, *31*(1), 251-262. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.09.035
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., & Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol*, *71*, 1-20.
- Conedera, G., Dalvit, P., Martini, M., Galiero, G., Gramaglia, M., Goffredo, E., . . . Caprioli, A. (2004). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in minced beef and dairy products in Italy. *Int J Food Microbiol*, *96*(1), 67-73. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.010
- Cotter, P.-D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: Developing innate immunity for food. In N. P. Group (Ed.), *Food Microbiol* (Vol. 3).
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, *12*, 564-582.
- Cruz-Carrillo, A., Rodríguez, N., N., & Rodríguez, C. E. (2010). Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*. *Actualidad & Divulgación Científica*, *13*, 117-124.
- Chen, C.-H., Kuo, W.-S., & Lai, L.-S. (2009). Effect of surfactants on water barrier and physical properties of tapioca starch/decolorized hsian-tsoo leaf gum films. *Food Hydrocolloids*, *23*(3), 714-721. doi: 10.1016/j.foodhyd.2008.06.006
- Chen, H., & Hoover, D. G. (2003). Bacteriocins and their Food Applications. *COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY*, *2*, 82-100.
- Daoud, Z., Sura, M., & Abdel-Massih, R. M. (2013). Pectin shows antibacterial activity against *Helicobacter pylori*. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, *04*(02), 273-277. doi: 10.4236/abb.2013.42A037
- Dashipour, A., Razavilar, V., Hosseini, H., Shojaee-Aliabadi, S., German, J. B., Ghanati, K., . . . Khaksar, R. (2015). Antioxidant and antimicrobial carboxymethyl cellulose films containing *Zataria multiflora* essential oil. *Int J Biol Macromol*, *72*, 606-613. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.09.006
- de Oliveira, T. M., de Fátima Ferreira Soares, N., Pereira, R. M., & de Freitas Fraga, K. (2007). Development and evaluation of antimicrobial natamycin-incorporated film in gorgonzola cheese conservation. *Packaging Technology and Science*, *20*(2), 147-153. doi: 10.1002/pts.756

- de S. Medeiros, B. G., Souza, M. P., Pinheiro, A. C., Bourbon, A. I., Cerqueira, M. A., Vicente, A. A., & Carneiro-da-Cunha, M. G. (2013). Physical Characterisation of an Alginate/Lysozyme Nano-Laminate Coating and Its Evaluation on 'Coalho' Cheese Shelf Life. *Food and Bioprocess Technology*, 7(4), 1088-1098. doi: 10.1007/s11947-013-1097-5
- Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, P. (2006). Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16(9), 1058-1071. doi: 10.1016/j.idairyj.2005.10.026
- Devlieghere, F., Vermeiren, L., & Debevere, J. (2004). New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, 14(4), 273-285. doi: 10.1016/j.idairyj.2003.07.002
- Dobrucka, R., & Cierpiszewski, R. (2014). Active and Intelligent Packaging Food – Research and Development – A Review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 64(1), 7-15.
- Donnelly, C. W. (2001). *Listeria monocytogenes*. A continuing challenge. *Nutrition Science policy*, 59, 183-194.
- Drago, H., Marín, G. H., Sturla, F., Roque, G., Mártire, K., Díaz Aquino, V., . . . Mansilla, E. (2010). The Next Generation of Burns Treatment: Intelligent Films and Matrix, Controlled Enzymatic Debridement, and Adult Stem Cells. *Elsevier Inc.*, 42, 345–349. doi: 10.1016/j.transproceed.2009.11.031
- Drosinos, E. H., Mataragas, M., & Paramithiotis, S. (2008). Antimicrobial Activity of Bacteriocins and Their Applications. In S. Science (Ed.), *Meat Biotechnology*. Athens, Greece.
- Du, W. X., Olsen, C. W., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H., Levin, C. E., & Friedman, M. (2008). Antibacterial activity against *E. coli* O157:H7, physical properties, and storage stability of novel carvacrol-containing edible tomato films. *J Food Sci*, 73(7), M378-383. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00892.x
- Duan, J., Park, S. I., Daeschel, M. A., & Zhao, Y. (2007). Antimicrobial chitosan-lysozyme (CL) films and coatings for enhancing microbial safety of mozzarella cheese. *J Food Sci*, 72(9), M355-362. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00556.x
- Duhan, J. S., Nehra, K., Gahlawat, S. K., Saharan, P., & Surekha, D. (2013). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria (pp. 127-141). doi: 10.1007/978-81-322-1683-4_11
- Dury-Brun, C., Chalier, P., Desobry, S., & Voilley, A. (2007). Multiple Mass Transfers of Small Volatile Molecules Through Flexible Food Packaging. *Food Reviews International*, 23(3), 199-255. doi: 10.1080/87559120701418319
- ECDC. (2014). Annual epidemiological report 2014 – food- and waterborne diseases and zoonoses: European Centre for Disease Prevention and Control.
- Embuscado, M. E., & Hube, r. H. (2009). *Edible films and coatings for Food Applications* (Springer Ed.). New York.
- Espie, E., Vaillant, V., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Martin-Schaller, R., De Valk, H., & Vernozy-Rozand, C. (2006). *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. *Epidemiol Infect*, 134(1), 143-146. doi: 10.1017/S0950268805004887
- Espitia-Pérez, P. J., Du, W.-X., Jesús;Avena-Bustillos, R. d., Soares, N. d. F. F., & McHugh, T. H. (2014). Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties - A review. *Food Hydrocolloids*, 35, 287-296. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.06.005

- Espitia, P. J., Soares Nde, F., Teofilo, R. F., Coimbra, J. S., Vitor, D. M., Batista, R. A., . . . Medeiros, E. A. (2013). Physical-mechanical and antimicrobial properties of nanocomposite films with pediocin and ZnO nanoparticles. *Carbohydr Polym*, 94(1), 199-208. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.01.003
- Espitia, P. J. P., Avena-Bustillos, R. J., Du, W.-X., Teófilo, R. F., Soares, N. F. F., & McHugh, T. H. (2014). Optimal antimicrobial formulation and physical–mechanical properties of edible films based on açai and pectin for food preservation. *Food Packaging and Shelf Life*, 2(1), 38-49. doi: 10.1016/j.fpsl.2014.06.002
- Evenson, M., Ward, H., Bernstein, R. S., & Bergdoll, M. S. (1988). Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int J Food Microbiol*, 7, 311-316.
- Foschino, R., Invernizzi, A., Barucco, R., & Stradiotto, K. (2002). Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year. *Journal of Dairy Research*, 69(02). doi: 10.1017/s0022029902005459
- Gálvez, A., Burgos, M. J. G., López, R. L., & Pulido, R. P. (2014). *Food Biopreservation*. London: springer.
- Gálvez, A., López, R. L., Pulido, R. P., & Burgos, M. J. G. (2014). Application of Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins for Food Biopreservation Food Biopreservation (pp. 15-22). doi: 10.1007/978-1-4939-2029-7_3
- Garcia, M., Pinotti, A., Martino, M., & Zaritzky, N. (2004). Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydrate Polymers*, 56(3), 339-345. doi: 10.1016/j.carbpol.2004.03.003
- Garsa, A. K., Kumariya, R., Sood, S. K., Kumar, A., & Kapila, S. (2014). Bacteriocin production and different strategies for their recovery and purification. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 6(1), 47-58. doi: 10.1007/s12602-013-9153-z
- Gautam, N., & Sharma, N. (2009). Bacteriocin: safest approach to preserve food products Indian J Microbiol (Vol. 49, pp. 204-211). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23100770>. doi: 10.1007/s12088-009-0048-3
- Gonzalez-Cordova, A. F., Yescas, C., Ortiz-Estrada, A. M., De la Rosa-Alcaraz Mde, L., Hernandez-Mendoza, A., & Vallejo-Cordoba, B. (2016). Invited review: Artisanal Mexican cheeses. *J Dairy Sci*, 99(5), 3250-3262. doi: 10.3168/jds.2015-10103
- González, A., & Alvarez Igarzabal, C. I. (2015). Nanocrystal-reinforced soy protein films and their application as active packaging. *Food Hydrocolloids*, 43, 777-784. doi: 10.1016/j.foodhyd.2014.08.008
- 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. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 118, 589-597. doi: 10.1016/j.saa.2013.09.034
- Güçbilmez, Ç. M., Yemenicioğlu, A., & Arslanoğlu, A. (2007). Antimicrobial and antioxidant activity of edible zein films incorporated with lysozyme, albumin proteins and disodium EDTA. *Food Research International*, 40(1), 80-91. doi: 10.1016/j.foodres.2006.08.007
- 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
- Guilbert Stephane, G. C., Gontard Nathalie (2011). New Packaging Materials Based on Renewable Resources: Properties, Applications, and Prospects. In S. Science (Ed.), *Food Engineering Interfaces* (pp. 619-630). Montpellier, France.
- Han, J. H. (2000). Antimicrobial food packaging In A. R. (Ed.), *Novel Food packaging techniques* (pp. 50-70). Florida, E.U: Editorial CRC Press, Boca Raton.
- Haniyah, Y. S., Eka, P. L., Thohari, I., Setyowati, E., & Manab, A. (2016). Gouda Cheese Microbial Controlling During Ripening Using Composite Edible Film Containing Lysozyme. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(5), 748-756. doi: 10.20546/ijcmas.2016.505.076
- Hansen, L., Austin, J. W., & Gill, T. A. (2001). Antibacterial effect of protamine in combination with EDTA and refrigeration. *Int J Food Microbiol*, 66, 149-161.
- Hari, N., & Nair, A. J. (2016). Development and characterization of chitosan-based antimicrobial films incorporated with streptomycin loaded starch nanoparticles. *New Horizons in Translational Medicine*, 3(1), 22-29. doi: 10.1016/j.nhtm.2016.04.002
- Hartmann, H. A., Wilke, T., & Erdmann, R. (2011). Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. *Int J Food Microbiol*, 146(2), 192-199. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.031
- Hassan, M., Javadzadeh, Y., Lotfipour, F., & Badomchi, R. (2011). Determination of comparative minimum inhibitory concentration (MIC) of bacteriocins produced by enterococci for selected isolates of multi-antibiotic resistant *Enterococcus* spp. *Adv Pharm Bull*, 1(2), 75-79. doi: 10.5681/apb.2011.011
- Hernandez-Izquierdo, V. M., & Krochta, J. M. (2008). Thermoplastic processing of proteins for film formation--a review. *J Food Sci*, 73(2), R30-39. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00636.x
- Higueras, L., Lopez-Carballo, G., Hernandez-Munoz, P., Catala, R., & Gavara, R. (2014). Antimicrobial packaging of chicken fillets based on the release of carvacrol from chitosan/cyclodextrin films. *Int J Food Microbiol*, 188, 53-59. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.018
- Honish, L., Predy, G., Hislop, N., Chui, L., K., K.-G., & Trottier, L. (2005). An outbreak of *E. coli* O157:H7 hemorrhagic colitis associated with unpasteurized gouda cheese. *Canadian Journal of Public Health*, 96, 182-184.
- Huss, H., Jeppesen, V., Johansen, C., & Gram, L. (2014). Biopreservation of Fish Products—A Review of Recent Approaches and Results. *Aquatic Food Product Technology*, 4, 37-41. doi: 10.1300/J030v04n02_02
- Ibarguren, C., Céliz, G., Díaz, A. S., Bertuzzi, M. A., Daz, M., & Audisio, M. C. (2015). Gelatine based films added with bacteriocins and a flavonoid ester active against food-borne pathogens. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 28, 66-72. doi: 10.1016/j.ifset.2015.01.007
- Ibarguren, C., Vivas, L., Bertuzzi, M. A., Apella, M. C., & Audisio, M. C. (2010). Edible films with anti-*Listeria monocytogenes* activity. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 1443-1449. doi: 10.1111/j.1365-2621.2010.02286.x
- Irkin, R., & Esmer, O. K. (2015). Novel food packaging systems with natural antimicrobial agents. *J Food Sci Technol*, 52(10), 6095-6111. doi: 10.1007/s13197-015-1780-9

- Izquierdo, E., Bednarczyk, A., Schaeffer, C., Cai, Y., Marchioni, E., Van Dorsselaer, A., & Ennahar, S. (2008). Production of enterocins L50A, L50B, and IT, a new enterocin, by *Enterococcus faecium* IT62, a strain isolated from Italian ryegrass in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*, *52*(6), 1917-1923. doi: 10.1128/AAC.01409-07
- Jiménez, A., Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2012). Edible and Biodegradable Starch Films: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, *5*(6), 2058-2076. doi: 10.1007/s11947-012-0835-4
- Jin, T., Liu, L., Zhang, H., & Hicks, K. (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
- Kampf, N., & Nussinovitch, A. (2000). Hydrocolloid coating of cheeses. *Food Hydrocolloids*, *14*, 531-537.
- Kanmani, P., & Rhim, J. W. (2014). Development and characterization of carrageenan/grapefruit seed extract composite films for active packaging. *Int J Biol Macromol*, *68*, 258-266. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.05.011
- Kaur, G., Singh, T. P., & Malik, R. K. (2013). Antibacterial efficacy of Nisin, Pediocin 34 and Enterocin FH99 against *Listeria monocytogenes* and cross resistance of its bacteriocin resistant variants to common food preservatives. *Brazilian Journal of Microbiology*, *44*, 63-71. doi: 10.1590/S1517-83822013005000025
- Kavoosi, G., Rahmatollahi, A., Dadfar, S., & Purfard, A. (2014). Effects of essential oil on the water binding capacity, physico-mechanical properties, antioxidant and antibacterial activity of gelatin films. *LWT - Food Science and Technology*, *57*(2), 556-561. doi: 10.1016/j.lwt.2014.02.008
- Khwaldia, K., Perez, C., Banon, S., Desobry, S., & Hardy, J. (2004). Milk proteins for edible films and coatings. *Crit Rev Food Sci Nutr*, *44*(4), 239-251. doi: 10.1080/10408690490464906
- Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P., & Drosinos, E. H. (2010). Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control*, *21*(6), 805-815. doi: 10.1016/j.foodcont.2009.11.015
- Kruijf, N. D., Beest, M. V., Rijk, R., Sipiläinen-Malm, T., Losada, P. P., & Meulenaer, B. D. (2010). Active and intelligent packaging: applications and regulatory aspects. *Food Additives & Contaminants*, *19*(sup1), 144-162. doi: 10.1080/02652030110072722
- Lavoine, N., Desloges, I., Manship, B., & Bras, J. (2015). Antibacterial paperboard packaging using microfibrillated cellulose. *J Food Sci Technol*, *52*(9), 5590-5600. doi: 10.1007/s13197-014-1675-1
- Lavorgna, M., Piscitelli, F., Mangiacapra, P., & Buonocore, G. G. (2010). Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films. *Carbohydrate Polymers*, *82*(2), 291-298. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.04.054
- Lei, J., Yang, L., Zhan, Y., Wang, Y., Ye, T., Li, Y., . . . Li, B. (2014). Plasma treated polyethylene terephthalate/polypropylene films assembled with chitosan and various preservatives for antimicrobial food packaging. *Colloids Surf B Biointerfaces*, *114*, 60-66. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.09.052
- Li, S., Li, T., Zhu, R., Wang, N., Song, Y., Wang, S., & Guo, M. (2013). Antibacterial Action of Haw Pectic Oligosaccharides. *International Journal of Food Properties*, *16*(3), 706-712. doi: 10.1080/10942912.2011.565904

- Linnan, M. J., Mascola, L., Lou, X. D., Goulet, V., & May, S. (1988). Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *The New England Journal of Medicine*, 319(13 1988), 823–828. doi: 10.1056%2FNEJM198809293191303
- Liu, X., Zhu, Y., Ren, J., Xuan, H., Zhang, J., & Ge, L. (2016). Multilayer Edible Fresh-keeping Films' Characterization and Their Preservation Effect. *ChemistrySelect*, 1(13), 3607-3611. doi: 10.1002/slct.201600694
- 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 Mestría), Universidad Autónoma del estado de Hidalgo, Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México.
- López, L. I., Escudero, B. I., & Mendoza, P. (2009). EFECTO DE LA COMBINACION DE BACTERIOCINAS, AC. LACTICO Y EDTA SOBRE PATOGENOS DE ALIMENTOS. *scielo*, 1, 23-45.
- Lundén, J., Tolvanen, R., & Korkeala, H. (2004). Human Listeriosis Outbreaks Linked to Dairy Products in Europe. *Journal Dairy Science*, 87, E6–E11.
- MacDonald, P. D., Whitwam, R. E., Boggs, J. D., MacCormack, J. N., Anderson, K. L., & Reardon, J. W. (2005). Outbreak of listeriosis among Mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced Mexican-style cheese. *Clinical Infectious Diseases*, 40, 677–682.
- Marin, L., Ailincăi, D., Mares, M., Paslaru, E., Cristea, M., Nica, V., & Simionescu, B. C. (2015). Imino-chitosan biopolymeric films. Obtaining, self-assembling, surface and antimicrobial properties. *Carbohydr Polymers*, 117, 762-770. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.10.050
- Martín-Belloso, O., Rojas-Graü, M. A., & Soliva-Fortuny, R. (2009). Delivery of Flavor and Active Ingredients Using Edible Films and Coatings. 295-313. doi: 10.1007/978-0-387-92824-1_10
- Martin-Platero, A. M., Valdivia, E., Ruiz-Rodriguez, M., Soler, J. J., Martin-Vivaldi, M., Maqueda, M., & Martinez-Bueno, M. (2006). Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*). *Appl Environ Microbiol*, 72(6), 4245-4249. doi: 10.1128/AEM.02940-05
- Martins, J. T., Cerqueira, M. A., Souza, B. W., Carmo Avides, M., & Vicente, A. A. (2010). Shelf life extension of ricotta cheese using coatings of galactomannans from nonconventional sources incorporating nisin against *Listeria monocytogenes*. *J Agric Food Chem*, 58(3), 1884-1891. doi: 10.1021/jf902774z
- McWilliams, M. (2012). pectin and gums *Carbohydrates* (Vol. 4). New York.
- Mendoza Mendoza, B. (2012). *Caracterización de películas a base de caseinato de sodio, con la inclusión de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas aisladas de pozol*. (Tesis de Mestría), Universidad autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México.
- Mild, R. M., Joens, L. A., Friedman, M., Olsen, C. W., McHugh, T. H., Law, B., & Ravishankar, S. (2011). Antimicrobial edible apple films inactivate antibiotic resistant and susceptible *Campylobacter jejuni* strains on chicken breast. *J Food Sci*, 76(3), M163-168. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02065.x
- Neetoo, H., & Mahomoodally, F. (2014). Use of antimicrobial films and edible coatings incorporating chemical and biological preservatives to control growth of *Listeria*

- monocytogenes on cold smoked salmon. *Biomed Res Int*, 2014, 534915. doi: 10.1155/2014/534915
- Nes, I. F. (2011). History, Current Knowledge, and Future Directions on Bacteriocin Research in Lactic Acid Bacteria. 3-12. doi: 10.1007/978-1-4419-7692-5_1
- Nickerson, S. C. (2002). Mastitis Pathogens. Contagious pathogens. In H. Roginski, J. W. Fuquay, & P. F. Fox (Eds.), *Encyclopedia of dairy sciences* (2nd ed., pp. 408-414). London.
- Nieto, M. B. (2009). Structure and Function of Polysaccharide Gum-Based Edible Films and Coatings (pp. 57-112). doi: 10.1007/978-0-387-92824-1_3
- Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiu, A., . . . Celano, G. V. (2005). Coagulase-positive Staphylococci and Staphylococcus aureus in food products marketed in Italy. *Int J Food Microbiol*, 98(1), 73-79. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.008
- Nouri, L., & Mohammadi Nafchi, A. (2014). Antibacterial, mechanical, and barrier properties of sago starch film incorporated with Betel leaves extract. *Int J Biol Macromol*, 66, 254-259. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.02.044
- Omar, N. B., Abriouel, H., Fliss, I., Fernandez-Fuentes, M. Á., Galvez, A., & Drider, D. (2013). Bacteriocins: Natural Weapons for Control of Food Pathogens (pp. 471-494). doi: 10.1007/978-94-007-5931-2_19
- Papagianni, M., & Anastasiadou, S. (2009). Pediocins: The bacteriocins of Pediococci. Sources, production, properties and applications *Microb Cell Fact* (Vol. 8, pp. 3). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19133115>. doi: 10.1186/1475-2859-8-3
- Pastor-Navarro, C. (2010). *RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES A BASE DE HIDROXIPROPIL METILCELULOSA: CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN*. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA, Valencia.
- Pavlath, A. E., & Orts, W. (2009). Edible Films and Coatings: Why, What, and How? , 1-23. doi: 10.1007/978-0-387-92824-1_1
- Pintado, C. M. B. S., Ferreira, M. A. S. S., & Sousa, I. (2009). Properties of Whey Protein-Based Films Containing Organic Acids and Nisin To Control *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 72, 1891-1896.
- Pintado, C. M. B. S., Ferreira, M. A. S. S., & Sousa, I. (2010). Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. *Food Control*, 21(3), 240-246. doi: 10.1016/j.foodcont.2009.05.017
- Prasad, P., & Kochhar, A. (2014). Active Packaging in Food Industry: A Review. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 8(5), 1-7.
- Ramírez-López, C., & Vélez-Ruiz, J. F. (2012). Quesos frescos: propiedades, métodos de detrmnación y factores que afectan su calidad. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6, 131-148.
- Rascón Chu, A., Martínez López, A. L., Carvajal Millán, E., Martínez Robinson, K. G., & Campa Mada, A. (2016). GELIFICACIÓN IÓNICA DE PECTINA DE BAJO GRADO DE ESTERIFICACIÓN EXTRAÍDA DE MANZANAS INMADURAS DE RALEO. *Rev. Fitotec. Mex.*, 39, 17-24.
- Ravishankar, S., Zhu, L., Olsen, C. W., McHugh, T. H., & Friedman, M. (2009). Edible apple film wraps containing plant antimicrobials inactivate foodborne pathogens on meat

- and poultry products. *J Food Sci*, 74(8), M440-445. doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01320.x
- Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., & Penna, A. L. B. (2012). Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications Food Engineering Reviews (Vol. 4, pp. 124-140). doi: 10.1007/s12393-012-9051-2
- Restuccia, D., Spizzirri, U. G., Parisi, O. I., Cirillo, G., Curcio, M., Iemma, F., . . . Picci, N. (2010). New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. *Food Control*, 21(11), 1425-1435. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.04.028
- Rhim, J.-W. (2004). Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. *LWT - Food Science and Technology*, 37(3), 323-330. doi: 10.1016/j.lwt.2003.09.008
- Rodríguez-Lara, J. (2009). *Efecto de la variación en acidez y temperatura sobre el rendimiento y la calidad de quesos tipo panela y chihuahua*. (Ingeniería), Universidad Autónoma Agraria "Antonio Navarro", Coahuila, México.
- Rodríguez -Sauceda, E. N. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 7, 153-170.
- Rudolf, M., & Scherer, S. (2001). High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *Int J Food Microbiol*, 63, 91-98.
- Sánchez-González, L., Cháfer, M., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2010). Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 277-283. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.04.047
- Sánchez-González, L., Quintero Saavedra, J. I., & Chiralt, A. (2014). Antilisterial and physical properties of biopolymer films containing lactic acid bacteria. *Food Control*, 35(1), 200-206. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.07.001
- Schmidt-Mc Lachlan, C. A. (2007). *Antagonismo en contra de Listeria monocytogenes de Nisina y de una Cepa Láctica, Encapsuladas en Alginato*. (Ingeniería en Alimentos), Universidad Austral del Chile, Valdivia - Chile.
- Shankar, S., Reddy, J. P., Rhim, J. W., & Kim, H. Y. (2015). Preparation, characterization, and antimicrobial activity of chitin nanofibrils reinforced carrageenan nanocomposite films. *Carbohydr Polym*, 117, 468-475. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.10.010
- Shen, Z., & Kamdem, D. P. (2015). Development and characterization of biodegradable chitosan films containing two essential oils. *Int J Biol Macromol*, 74, 289-296. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.11.046
- Shin, Y. J., Song, H. Y., Seo, Y. B., & Song, K. B. (2012). Preparation of red algae film containing grapefruit seed extract and application for the packaging of cheese and bacon. *Food Science and Biotechnology*, 21(1), 225-231. doi: 10.1007/s10068-012-0029-x
- Silva, M. A. d., Bierhalz, A. C. K., & Kieckbusch, T. G. (2009). Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca²⁺ ions: Effect of the plasticizer concentration. *Carbohydrate Polymers*, 77(4), 736-742. doi: 10.1016/j.carbpol.2009.02.014
- Singh, K., Suri, R., Tiwary, A. K., & Rana, V. (2012). Chitosan films: crosslinking with EDTA modifies physicochemical and mechanical properties. *J Mater Sci Mater Med*, 23(3), 687-695. doi: 10.1007/s10856-012-4554-1

- Sivarooban, 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
- Stephan, R., Schumacher, S., Corti, S., Krause, G., Danuser, J., & Beutin, L. (2008). Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Swiss raw milk cheeses collected at producer level. *J Dairy Sci*, 91(7), 2561-2565. doi: 10.3168/jds.2008-1055
- Sun, X., Sui, S., FERENCE, C., Zhang, Y., Sun, S., Zhou, N., . . . Zhou, K. (2014). Antimicrobial and mechanical properties of beta-cyclodextrin inclusion with essential oils in chitosan films. *J Agric Food Chem*, 62(35), 8914-8918. doi: 10.1021/jf5027873
- Sundh, I., & Melin, P. (2011). Safety and regulation of yeasts used for biocontrol or biopreservation in the food or feed chain. In A. v. Leeuwenhoek (Ed.), (Vol. 99, pp. 113–119): Springer Science.
- Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., & Bigger, S. W. (2003). Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *J Food Sci*, 68, 408-419.
- Suput, D., Lasic, V., Popovic, S., & Hromis, N. (2015). Edible films and coatings: Sources, properties and application. *Food and Feed Research*, 42(1), 11-22. doi: 10.5937/ffr1501011s
- Syuhada, N. I., Huang, N. M., Vijay-Kumar, S., Lim, H. N., Rahman, S. A., Thien, G. S. H., . . . Moradihamedani, P. (2014). Enhanced mechanical properties of chitosan/EDTA-GO nanocomposites thin films. *Sains Malaysiana*, 43, 851-859.
- Takala, P. N., Salmieri, S., Boumail, A., Khan, R. A., Vu, K. D., Chauve, G., . . . Lacroix, M. (2013). Antimicrobial effect and physicochemical properties of bioactive trilayer polycaprolactone/methylcellulose-based films on the growth of foodborne pathogens and total microbiota in fresh broccoli. *Journal of Food Engineering*, 116(3), 648-655. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.005
- Takenaka, T., Muto, O., Yasunami, K., & Echigo, T. (1994). Antibacterial activity of pectin hydrolyzates. *Japanese Society for Food Science and Technology*, 41, 785–792.
- Tessema, G. T., Moretto, T., Kohler, A., Axelsson, L., & Naterstad, K. (2009). Complex phenotypic and genotypic responses of *Listeria monocytogenes* strains exposed to the class IIa bacteriocin sakacin P. *Appl Environ Microbiol*, 75(22), 6973-6980. doi: 10.1128/AEM.00608-09
- Tominaga, T., & Hatakeyama, Y. (2006). Determination of essential and variable residues in pediocin PA-1 by NNK scanning. *Appl Environ Microbiol*, 72(2), 1141-1147. doi: 10.1128/AEM.72.2.1141-1147.2006
- Tompkin, R. B. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* in the Food-Processing Environment. *Journal of Food Protection*, 65, 709–725.
- Uriarte-Montoya, M. H., Arias-Moscoso, J. L., Plascencia-Jatomea, M., Santacruz-Ortega, H., Rouzaud-Sandez, O., Cardenas-Lopez, J. L., . . . Ezquerro-Brauer, J. M. (2010). Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle collagen: extraction, characterization, and potential application in the preparation of chitosan-collagen biofilms. *Bioresour Technol*, 101(11), 4212-4219. doi: 10.1016/j.biortech.2010.01.008
- Vásconez, M. B., Flores, S. K., Campos, C. A., Alvarado, J., & Gerschenson, L. N. (2009). Antimicrobial activity and physical properties of chitosan–tapioca starch based edible

- films and coatings. *Food Research International*, 42(7), 762-769. doi: 10.1016/j.foodres.2009.02.026
- Vincken, J. P., Schols, H. A., Oomen, R. J., Beldman, G., Visser, R. G., & Voragen, A. G. (2003). Pectin - The hairy thing. In Voragen, Fons, Schols, Henk, Visser, & R. G.F (Eds.), *Advances in Pectin and Pectinase Research* (pp. 47-59). The Netherlands Springer-Science.
- Wagh, Y. R., Pushpadass, H. A., Emerald, F. M., & Nath, B. S. (2014). Preparation and characterization of milk protein films and their application for packaging of Cheddar cheese. *J Food Sci Technol*, 51(12), 3767-3775. doi: 10.1007/s13197-012-0916-4
- Wang, Q., Tian, F., Feng, Z., Fan, X., Pan, Z., & Zhou, J. (2015). Antioxidant activity and physicochemical properties of chitosan films incorporated with *Lycium barbarum* fruit extract for active food packaging. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(2), 458-464. doi: 10.1111/ijfs.12623
- Willats, W. G. T., Knox, J. P., & Mikkelsen, J. D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, 17(3), 97-104. doi: 10.1016/j.tifs.2005.10.008
- Woraprayote, W., Kingcha, Y., Amonphanpokin, P., Krueate, J., Zendo, 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 sliced pork. *Int J Food Microbiol*, 167(2), 229-235. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.009
- Xiao, G., Zhu, Y., Wang, L., You, Q., Huo, P., & You, Y. (2011). Production and Storage of Edible Film Using Gellan Gum. *Procedia Environmental Sciences*, 8, 756-763. doi: 10.1016/j.proenv.2011.10.115
- Yam, K. L., Takhistov, P. T., & Miltz, J. (2005). Intelligent Packaging- Concepts and Applications. *Journal of Food Science*, 70(1).
- Zhu, G., Sheng, L., Li, J., & Tong, Q. (2013). Preparation and characterisation of gellan/pullulan composite blend films. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(12), 2683-2687. doi: 10.1111/ijfs.12235
- 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



COLEGIO MEXICANO DE INGENIEROS BIOQUÍMICOS, A.C.

CERTIFICATE OF PARTICIPATION

It is certified, that:

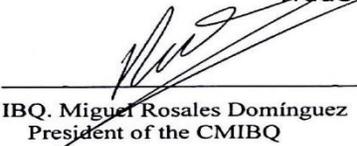
Lorena Trejo González; Perla Yesenia Jiménez Villeda; Adriana Inés Rodríguez Hernández; Ma. Del Rocío López Cuellar; Víctor Manuel Martínez Juárez; Apolonio Vargas Torres; Norberto Chavarría Hernández

Authors of the work:

ELABORACIÓN Y EVALUACIÓN DE PELÍCULAS BIOPOLIMÉRICAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR BACTERIOCINAS Y EDTA

Keyword: **CIA133NOR20151226**

Participated in the **poster** session of the IX International Congress, XX National Congress on Biochemical Engineering and the XIV Biomedicine and Molecular Biotechnology Scientific Meetings, held at World Trade Center, Boca del Río, Veracruz, Mexico, March 16-18 2016.


IBQ. Miguel Rosales Domínguez
President of the CMIBQ


Dra. Deifilia Ahuatzi Chacón
Chair Scientific Committee