



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Agropecuarias

Área Académica de Ingeniería Agroindustrial e Ingeniería en Alimentos

**"Diseño y caracterización de películas de gelana-pectina
adicionadas con bacteriocinas y EDTA, con actividad antimicrobiana
contra *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus
aureus* en medios a base de Barbacoa estilo Tulancingo"**

TESIS

Que, para obtener el grado de:

Maestra en Ciencia de los Alimentos

PRESENTA:

Q. A. Lorena Trejo González

Dirección de Tesis:

Dr. Norberto Chavarría Hernández

Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández

Tulancingo de Bravo, Hidalgo, Octubre 2016

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vii
1 RESUMEN	ix
2 ABSTRACT	xi
3 INTRODUCCIÓN	1
4 MARCO TEÓRICO	3
4.1 Bioconservación.....	3
4.2 Nuevas tecnologías en empaques para alimentos	4
4.3 Antecedentes de los recubrimientos alimentarios.....	5
4.4 Empaques comestibles: películas y recubrimientos.....	6
4.4.1 Recubrimiento comestible	7
4.4.2 Película comestible	7
4.5 Materiales formadores de películas y recubrimientos comestibles.....	8
4.5.1 Hidrocoloides: Polisacáridos y proteínas	10
4.5.2 Lípidos y ceras.....	16
4.5.3 Multicomponentes	17
4.5.4 Plastificantes.....	18
4.6 Empaques para alimentos	20
4.6.1 Empaques inteligentes	22
4.6.2 Empaques activos	22
4.7 Bacteriocinas de las bacterias lácticas	34
4.7.1 Características generales.....	35
4.7.2 Clasificación	36

4.7.3	Modo de acción	37
4.8	Barbacoa estilo Tulancingo	39
5	JUSTIFICACIÓN.....	54
6	OBJETIVOS.....	56
6.1	Objetivo General.....	56
6.2	Objetivos Específicos	56
7	Hipótesis.....	56
8	MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
8.1	Materiales.....	57
8.1.1	Medios de cultivo	57
8.1.2	Biopolímeros	57
8.1.3	Agentes antimicrobianos	58
8.1.4	Microorganismos.....	58
8.2	Métodos	59
8.2.1	Producción del Concentrado con Actividad Antimicrobiana (CAM) por <i>Streptococcus infantarius</i>	59
8.2.2	Determinación de la actividad antimicrobiana del Concentrado con Actividad Antimicrobiana producido por <i>Streptococcus infantarius</i> , prueba de difusión en agar por gota (método de la dilución crítica).....	61
8.2.3	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	63
8.2.4	Elaboración de las películas con agentes antimicrobianos.....	67
8.2.5	Acondicionamiento de las películas	68
8.2.6	Evaluación del efecto antimicrobiano de las películas contra tres microorganismos patógenos: <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	68

8.2.7	Evaluación del efecto antimicrobiano de la película bioactiva en medios a base de Barbacoa estilo Tulancingo	70
8.2.8	Propiedades mecánicas de la película con agentes antimicrobianos	73
8.2.9	Propiedades de barrera.....	76
8.2.10	Determinación de la solubilidad.....	78
8.2.11	Análisis Estadístico	78
9	RESULTADOS Y DISCUSIONES	79
9.1	Determinación de la actividad antimicrobiana del CAM producido por <i>Streptococcus infantarius</i>	79
9.2	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	81
9.3	Evaluación del efecto antimicrobiano de las películas contra tres microorganismos patógenos: <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	88
9.4	Evaluación del efecto antimicrobiano de la película bioactiva en medios a base de Barbacoa estilo Tulancingo	94
9.5	Propiedades mecánicas de la película con agentes antimicrobianos	105
9.6	Propiedades de barrera.....	108
9.6.1	Permeabilidad al oxígeno (PO ₂) de la película con agentes antimicrobianos.....	108
9.6.2	Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de la película con agentes antimicrobianos	110
9.7	Determinación de la solubilidad	113
10	CONCLUSIONES.....	116
11	BIBLIOGRAFÍA	118

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Función de barrera de los recubrimiento y películas comestibles. Tomada de (Arredondo Ochoa, 2012).....	6
Figura 2. Principales materiales utilizados en películas comestibles. Tomado de (Arredondo Ochoa, 2012).	10
Figura 3. Estructura de la pectina y la imagen de una película a base de este polímero. Tomado de (Embuscado & Huber, 2009).....	15
Figura 4. Estructura de la goma gelana y la imagen de una película a base de este polímero. Tomado de (Embuscado & Huber, 2009).....	16
Figura 5. Estructura molecular del glicerol.	19
Figura 6. Mecanismo de acción de las bacteriocinas ácido lácticas que consiste en la formación de poros en la membrana celular. Tomada de (Cotter et al., 2005).	38
Figura 7. Barbacoa de hoyo estilo Tulancingo.....	40
Figura 8. Algunas de las etapas para la producción del CAM por <i>Streptococcus infantarius</i> . A) Fermentación a nivel matraz. B) Incubación con agitación orbital. C) Separación de biomasa mediante centrifugación. D) Concentración en rotavapor con controlador de vacío.	60
Figura 9. Fotografía de biorreactor tanque enchaquetado de 3L (Applikon Biotechnology).	61
Figura 10. Procedimiento para la realización de la prueba de difusión en agar por gota (método de la dilución crítica). Tomado de (Mendoza Mendoza, 2012).	62
Figura 11. Placas de Elisa utilizadas para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria.	64
Figura 12. Esterilización de las películas por luz UV en la campana de flujo laminar.....	69
Figura 13. Barbacoa estilo Tulancingo.....	70
Figura 14. Diagrama de controles y tratamientos evaluados, cada uno se realizó por triplicado. Mismo diagrama para cada microorganismo de estudio.	72
Figura 15. Homogeneización en Seward Stomacher® 400 Circulator a 300 rpm por 5 min.	73

Figura 16. Máquina universal (TA plus, Lloyd) donde se realizarón las pruebas mecánicas.	74
Figura 17. Equipo para medición de permeabilidad al oxígeno VAC-V2 Permeability tester.	76
Figura 18. A) Equipo (desecador de gabinete) y condiciones utilizados en la PVA. Tomada de (Calderón Aguirre, 2014). B) Fotografía de las muestras de estudio.	77
Figura 19. Efecto del CAM producido por <i>Streptococcus infantarius</i> , EDTA y sus mezclas sobre el crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> durante la prueba de concentración mínima inhibitor.	82
Figura 20. Efecto del CAM producido por <i>Streptococcus infantarius</i> , EDTA y sus mezclas sobre el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> durante la prueba de concentración mínima inhibitoria.	84
Figura 21. Efecto del CAM producido por <i>Streptococcus infantarius</i> , EDTA y sus mezclas sobre el crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> durante la prueba de concentración mínima inhibitoria.	86
Figura 22. Efecto de películas con y sin compuestos antimicrobianos en el crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en medios elaborados a base de Barbacoa estilo Tulancingo, en los distintos tratamientos bajo condiciones de incubación a 35 °C. Se muestran los resultados de tres réplicas. (PB = Película Bioactiva; CSPSI = Control sin película, sin inóculo; PC = Película Control; CSPCI = Control sin película, con inóculo) *mb= medio Barbacoa.	98
Figura 23. Efecto de películas con y sin compuestos antimicrobianos en el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> en medios elaborados a base de Barbacoa estilo Tulancingo, 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) *mb= medio Barbacoa.	101
Figura 24. Efecto de películas con y sin compuestos antimicrobianos en el crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> en medios elaborados a base de Barbacoa estilo Tulancingo, 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) *mb= medio Barbacoa. .	104

Figura 25. Reogramas representativos de la película control (biopolimérica) y bioactiva (90 UA/mL del CAM producido por *Streptococcus infantarius* más EDTA 0.05 M.) 108

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Funciones de las películas y recubrimientos comestibles en los alimentos, así como el tipo de película adecuado para tal fin (Neetoo & Mahomoodally, 2014).	9
Tabla 2. Plásticos derivados del petróleo utilizados en el envasado de alimentos (Realini & Marcos, 2014).	21
Tabla 3. Algunas funciones de los empaques activos (Murillo Martínez, 2008).	23
Tabla 4. Algunas investigaciones representativas sobre elaboración de películas incluyendo diferentes compuestos antimicrobianos en su formulación.	25
Tabla 5. Clasificación de las bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas (BAL) según (Cotter et al., 2005).	36
Tabla 6. Películas con antimicrobianos elaborados a partir de polímeros y su aplicación en la conservación de alimentos cárnicos.	43
Tabla 7. Distribución en placa de 96 pocillos de las diferentes concentraciones del CAM, EDTA y sus respectivas mezclas.	65
Tabla 8. Formulaciones de las películas bioactivas.	67
Tabla 9. Prueba de inhibición del crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en placas de agar suave BHI.	80
Tabla 10. Concentración Mínima Inhibitoria del CAM producido por <i>Streptococcus infantarius</i> , EDTA o sus mezclas para los tres microorganismos patógenos de estudio.	87
Tabla 11. Imágenes de cajas Petri inoculadas con <i>Listeria monocytogenes</i> en medio Oxford, <i>Escherichia coli</i> en agar MacConkey y <i>Staphylococcus aureus</i> en medio Baird Parker. Se muestra el efecto de los distintos tratamientos (película control y biopelículas) bajo condiciones de incubación a 25 °C.	91
Tabla 12. Imágenes de cajas Petri inoculadas con <i>Listeria monocytogenes</i> en medio Oxford, <i>Escherichia coli</i> en agar MacConkey y <i>Staphylococcus aureus</i> en medio Baird Parker. Se comprueba la esterilidad de los medios a base de Barbacoa estilo Tulancingo y que el recuento de células viables corresponde a los microbios de estudio.	95
Tabla 13. Propiedades mecánicas de las películas evaluadas, con y sin sustancias antimicrobianas.	106

Tabla 14. Permeabilidad al oxígeno (PO₂) de películas con y sin sustancias antimicrobianas.
 109

Tabla 15. Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de películas con y sin sustancias antimicrobianas..... 111

Tabla 16. Valores promedio de la solubilidad en agua de la película control y película bioactiva. 113

1 RESUMEN

Las películas comestibles con compuestos antimicrobianos son empaques bioactivos, biodegradables y novedosos que pueden extender la vida útil de los alimentos a través de la inhibición de microorganismos patógenos que pudieran estar presentes en la superficie de los mismos. En este trabajo se formuló una biopelícula antimicrobiana a base de gelatina-pectina (P = 1 % p/p, G = 0.2 % p/p, CaCl₂ 5mM), con glicerol (5 % p/v) como plastificante y con la inclusión de dos agentes antimicrobianos: concentrado con actividad antimicrobiana producido por *Streptococcus infantarius* (CAM), bacteria ácido-láctica aislada del pozol y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en una concentración de 90 UA/mL_{SF} y 0.05 M respectivamente. Se evaluó la actividad antimicrobiana de la película formulada en medios a base de Barbacoa estilo Tulancingo a 35 °C durante 7 días, usando como microorganismos indicadores *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. La finalidad fue establecer la formulación de una película biopolimérica bioactiva que pudiera inhibir el desarrollo de bacterias patógenas que ponen en riesgo la calidad e inocuidad de los alimentos así como la salud de los consumidores. Con estos estudios se espera proponer una técnica innovadora de bioconservación de Barbacoa estilo Tulancingo, misma que puede utilizarse como plataforma para otros alimentos de origen cárnico. Además de los análisis de actividad antimicrobiana, se evaluaron las propiedades mecánicas (ASTM D882), de permeabilidad al oxígeno (PO₂) (ASTM D1434) y permabilidad al vapor de agua (PVA) (ASTM E96-00), así como la solubilidad de la película bioactiva para determinar el posible efecto de los agentes antimicrobianos en esas propiedades. La película bioactiva (90 UA/mL_{SF} del CAM más EDTA 0.05 M) inhibió completamente el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* hasta 7 días a 35 °C, ya que la población bacteriana inicial de 100 UFC pasó directamente a 0 UFC, no se cuantificó crecimiento de los microorganismos de estudio. La película con la inclusión de los agentes antimicrobianos presentó una deformación de Hencky en el punto de fractura de 0.80±0.16 %, esfuerzo verdadero de 5.65±0.67 MPa y mostró valores de 706.55±47.75 para Módulo de Young y 1.86±0.39 % de elongación. La película bioactiva formulada mostró valores de 1.94±1.16×10⁻¹² (g m Pa⁻¹ s⁻¹ m⁻²), 2.88±0.80×10⁻¹¹ (g m Pa⁻¹ s⁻¹ m⁻²) y 91.99±3.53 % para

permeabilidad al oxígeno, permeabilidad al vapor de agua respectivamente y solubilidad respectivamente.

2 ABSTRACT

3 INTRODUCCIÓN

El desarrollo de nuevas metodologías de preservación de alimentos, a fin de obtener alimentos inocuos y mejorados en sus características nutricionales y organolépticas, es un área de investigación de constante interés y permanente avance (Campos, Gerschenson, & Flores, 2010). La demanda creciente de 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*” (Ntzimani, Giatrakou, & Savvaidis, 2010).

Los empaques en la industria alimentaria están destinados a la conservación y protección de todo tipo de alimentos y sus materias primas, en particular del deterioro físico, químico y microbiano, así como para ampliar su vida útil durante el almacenamiento (Patricia Castellano, Belfiore, & Vignolo, 2011). No obstante, el uso indiscriminado de empaques sintéticos ha generado serios problemas ecológicos, contribuyendo a la contaminación ambiental provocada por desechos sólidos de baja degradabilidad.

El uso de empaques tales como las películas y/o recubrimientos, ha despertado un gran interés por su funcionalidad selectiva para regular la transferencia de humedad y la permeabilidad a los gases, aroma y compuestos de sabor en un sistema alimentario, lo que permite mejorar la calidad, seguridad y extender la vida útil de estos productos (Sayanjali, Ghanbarzadeh, & Ghiassifar, 2011). Los esfuerzos en la investigación se han centrado en el diseño de empaques ecológicos a base de polímeros biodegradables, que además de disminuir los residuos de los empaques sintéticos, permitan que subproductos provenientes de la industria de los alimentos puedan ser utilizados en la elaboración de películas comestibles.

La incorporación de agentes antimicrobianos a empaques tiene ventajas relevantes en la industria alimentaria, ya que pueden aumentar la vida de anaquel de los alimentos y evitar la adición directa de aditivos químicos a los alimentos. En los últimos años, la incorporación directa de conservadores químicos al alimento ha sido cuestionada cada vez más por el consumidor, ya que estamos en la era de los productos “*mínimamente procesados*” (Kraśniewska & Gniewosz, 2012).

La tendencia de consumir alimentos frescos y con un bajo nivel de procesamiento ha motivado diversas investigaciones relacionadas con el diseño de nuevos empaques para la conservación de los alimentos entre los que se encuentran las películas comestibles adicionadas con agentes antimicrobianos naturales tales como: ácidos orgánicos, enzimas (lisozima, lactoferrina), extractos de especias, el sistema lactoperoxidasa, bacteriocinas (nisina, pediocina, lacticina), entre otros (Deshmukh & Thorat, 2013; Nithya, Murthy, & Halami, 2013). Sin embargo son muy pocos los estudios realizados en relación con los factores que podrían afectar la actividad antimicrobiana, las propiedades mecánicas y de barrera, así como, la difusión de agentes antimicrobianos adicionados (Xiao et al., 2011).

En el presente trabajo se elaboraron películas bioactivas a partir de la mezcla de biopolímeros gelana-pectina, en las que se incorporaron los péptidos bioactivos producidos por la bacteria ácido láctica, *Streptococcus infantarius* aislada del pozol (bebida ácida y refrescante de origen Maya obtenida del maíz a través de fermentaciones no alcohólicas y consumida en el suroeste de México) en sinergia con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, agente quelante que puede crear complejos con cationes divalentes principalmente) con la finalidad de evaluar su actividad antimicrobiana contra tres microorganismos patógenos (*Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*) en medios a base de Barbacoa estilo Tulancingo. Se examinó la bioactividad de las películas a lo largo del tiempo en condiciones de incubación a 35 °C durante 7 días. Con estos estudios se desea contribuir en la generación de empaques bioactivos diseñados para proteger productos alimentarios de la acción de microorganismos patógenos. Además de los análisis de actividad antimicrobiana de las películas elaboradas, en este trabajo de investigación se evaluaron las propiedades mecánicas y de barrera (permeabilidad al oxígeno y vapor de agua), así como la solubilidad de las películas para tener un mayor conocimiento sobre la caracterización y comportamiento de las películas.

4 MARCO TEÓRICO

4.1 Bioconservación

La producción de alimentos menos procesados, “más naturales”, pero al mismo tiempo con altas expectativas en cuanto a su conservación, calidad e inocuidad, es una de las tendencias actuales de las empresas productoras de alimentos y motivo de muchas investigaciones alrededor del mundo (Concha-Meyer, Schöbitz, Brito, & Fuentes, 2011; Oliveira et al., 2010; Suput, Lazic, Popovic, & Hromis, 2015). El poder satisfacer tal demanda representa un reto importante para los investigadores y para las empresas del ramo alimenticio, principalmente cuando lo que se quiere es la eliminación o disminución de conservadores químicos en los alimentos. Es por ello que, para la industria alimentaria, la bioconservación ha logrado convertirse en el sustituto principal de la conservación química, tecnología aún vigente en muchos sectores de productos alimenticios.

La bioconservación se puede definir como la extensión de la vida útil e incremento de la seguridad de un alimento, utilizando su microbiota natural o controlada y sus metabolitos (Kraśniewska & Gniewosz, 2012). El término microbiota hace referencia a la utilización de microorganismos capaces de producir sustancias inhibidoras que impidan el desarrollo de microorganismos que puedan afectar la calidad de los alimentos.

Las bacterias más empleadas en este método de conservación son las bacterias ácido lácticas (BAL), que pueden estar habitualmente presentes o no en la microflora natural del alimento al cual se aplican (Fernández-Pan, Carrión-Granda, & Maté, 2014; A. Gennadios, Hanna, & Kurth, 1997). Dentro de este grupo de bacterias se incluye un amplio número de microorganismos Gram positivos, que presentan la característica común de producir como metabolito mayoritario el ácido láctico, a partir de la fermentación de los carbohidratos (Barbosa-Pereira, Angulo, Lagarón, Paseiro-Losada, & Cruz, 2014; Zacharof & Lovitt, 2012). Las bacterias ácido lácticas pertenecen a los géneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenoccus*, *Sporolactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* y *Bifidobacterium* (Mills, Stanton, Hill, & Ross, 2011).

La bioconservación, si bien constituye una de las formas de conservación más antiguas, cobra relevancia al proporcionar alternativas válidas y de hecho preferibles respecto al uso de aditivos artificiales (Soysal et al., 2015).

La bioconservación se ha aplicado en diferentes alimentos, sobre todo en productos lácteos, vegetales y cárnicos, y en menor proporción en productos marinos (Galvez, Abriouel, Lopez, & Ben Omar, 2007), con el objeto de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos o microorganismos del deterioro de los alimentos y favorecer el crecimiento de otros microorganismo, de naturaleza generalmente ácido láctica, que alteren mínimamente el alimento. En ocasiones el consumo de estas bacterias lácticas supone un beneficio para el consumidor una vez ingeridos.

La bioconservación en los últimos años, ha atraído la atención de la industria alimentaria como un importante reemplazo de los conservadores utilizados en la actualidad, ya que permite alargar la vida útil e inocuidad de los alimentos a partir de sustancias naturales con propiedades antibacterianas así como utilizando microorganismos capaces de producir las sustancias funcionales (D.G., 2003; Deegan, Cotter, Hill, & Ross, 2006; Jeevaratnam K., 2005).

4.2 Nuevas tecnologías en empaques para alimentos

El desarrollo de nuevas metodologías de preservación de alimentos, a fin de obtener alimentos inocuos y mejorados en sus características nutricionales y organolépticas, es un área de investigación de constante interés y permanente avance (Coma, 2008).

La creciente demanda de los consumidores por alimentos seguros y de calidad, aunado a la conciencia ecológica de los recursos naturales limitados y el impacto ambiental de los residuos de envases, han impulsado el desarrollo y caracterización de nuevas alternativas de empaqueo como son la elaboración de películas y recubrimientos comestibles, los cuales constituyen un campo innovador en el área de la conservación por su selectiva funcionalidad, debido a que ofrecen propiedades únicas de empaqueo (Balasubramanian, Rosenberg, Yam, & Chikindas, 2009).

Esta tecnología responde a (Falguera, Quintero, Jiménez, Muñoz, & Ibarz, 2011):

- El interés de los consumidores en alimentos saludables, de alta calidad, convenientes y seguros.
- La toma de conciencia colectiva en cuanto al cuidado del medio ambiente, y la necesidad de contar con materiales biodegradables y/o reciclables que reduzcan las consecuencias ambientales de los envases sintéticos.
- La capacidad de estas películas para contribuir a la solución de problemas relacionados con la apariencia, conservación y almacenamiento de ciertos alimentos.
- La gran disponibilidad, carácter de recurso renovable y costo relativamente bajo de las materias primas utilizadas en su elaboración.

4.3 Antecedentes de los recubrimientos alimentarios

A partir de los años 70, los polímeros petroquímicos, han sido el material más usado para embalar debido a su alto rendimiento y su bajo precio. Sin embargo, los serios problemas ambientales asociados al uso de materiales no biodegradables han impulsado a los científicos a buscar nuevos materiales alternativos biodegradables (Embuscado & Huber, 2009).

Los recubrimientos comestibles fueron usados por cientos de años. Por ejemplo, la cera ha sido aplicada a los cítricos para retrasar su deshidratación desde el siglo XII en China (P. J. P. Espitia, Du, Avena-Bustillos, Soares, & McHugh, 2014). La yuba, también conocida como piel de soya o nata de soya, elaborada a partir de soya, esencialmente un film de proteína, era usada para conservar algunos productos alimenticios en Asia en el siglo XV. En el siglo XVI las grasas fueron usadas para cubrir cortes de carne con el fin de prevenir el encogimiento. La grasa de cerdo o cera fue usada para cubrir la fruta y otros productos alimenticios en Inglaterra. Más tarde, en el siglo XIX, las películas de gelatina fueron usadas para cubrir carnes y la sacarosa fue escogida como un recubrimiento comestible protector, sobre almendras y avellanas, para prevenir la oxidación y la rancidez (Falguera et al., 2011; Vartiainen, Vähä-Nissi, & Harlin, 2014).

Recubrimientos de cera sobre frutas y verduras, recubrimientos de zeína sobre caramelos y de azúcar sobre almendras son los ejemplos comerciales más comunes de

recubrimiento comestibles. Éteres de celulosa (carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y metilcelulosa) han sido usados como ingredientes en recubrimientos para frutas, verduras, carnes, almendras, productos de confitería, panadería, granos y otros productos agrícolas (Realini & Marcos, 2014).

4.4 Empaques comestibles: películas y recubrimientos

Las películas y recubrimientos comestibles son capas delgadas de materiales comestibles aplicadas en los productos alimenticios, que juegan un papel importante en su conservación, distribución y comercialización. Algunas de sus funciones son proteger el producto de daños mecánicos, físicos, químicos y actividades microbiológicas (Figura 1). Su uso en aplicaciones alimentarias y sobre todo en los productos altamente perecederos, se basa en algunas particularidades tales como el costo, la disponibilidad, los atributos funcionales, propiedades mecánicas (flexibilidad, tensión), propiedades ópticas (brillo y opacidad), efecto como barrera contra gases, resistencia estructural al agua y a microorganismos y aceptabilidad sensorial (Falguera et al., 2011).

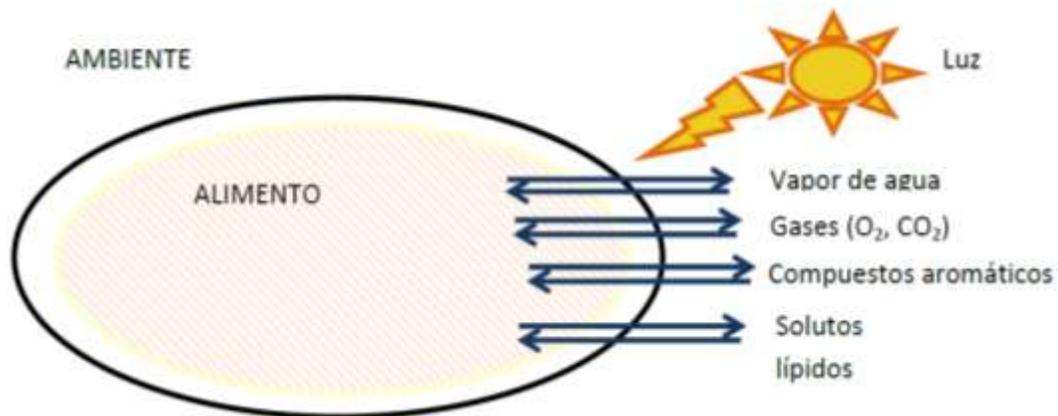


Figura 1. Función de barrera de los recubrimiento y películas comestibles. Tomada de (Arredondo Ochoa, 2012).

La principal diferencia entre estos sistemas es que el recubrimiento comestible se aplica en forma líquida sobre los alimentos, por lo general mediante la inmersión del producto en una solución capaz de producir una matriz estructural (hidratos de carbono, proteínas, lípidos o de la mezcla de varios componentes) y las películas comestibles se moldean primero

como láminas sólidas que se aplican después como una envoltura en el producto alimenticio (Suput et al., 2015; Ustunol, 2009).

Los recubrimientos o películas comestibles pueden también ayudar a controlar la migración de la humedad, gases y lípidos (Vartiainen et al., 2014), contribuyendo así a prolongar la vida útil y a exaltar la calidad global de los alimentos (Cagri, Ustunol, & Ryser, 2004; Vartiainen et al., 2014).

4.4.1 Recubrimiento comestible

Un recubrimiento comestible es una capa delgada de material comestible formado como un revestimiento sobre un producto alimenticio, es decir, que se pueden aplicar directamente a las superficies de productos alimenticios mediante inmersión o pulverización y se pueden consumir con o como parte del producto alimenticio (Falguera et al., 2011; Suput et al., 2015).

4.4.2 Película comestible

Una película comestible es un preformado, es una capa delgada hecha de material comestible, que una vez formada se puede colocar sobre o entre los componentes del alimento (Falguera et al., 2011; Suput et al., 2015).

Una película comestible ideal debe tener las siguientes características (Embuscado & Huber, 2009):

- No contienen componentes tóxicos, que causen alergia y no digeribles
- Proporcionar estabilidad estructural y evitar daños mecánicos durante el transporte, manipulación y comercialización
- Tener buena adhesión a la superficie de los alimentos a proteger y proporcionar una cobertura uniforme
- Control de la migración de agua dentro y fuera de los alimentos protegidos para mantener el contenido de humedad deseado

- Proporcionar semi-permeabilidad para mantener el equilibrio interno de los gases implicados en el alimento, de este modo retardar la senescencia
- Evitar la pérdida o absorción de componentes que estabilizan el aroma, el sabor, la nutrición y las características organolépticas necesarias para la aceptación de los consumidores sin que ello afecte negativamente al sabor o apariencia
- Proporcionar estabilidad bioquímica y microbiana a la superficie del alimento, protección contra la contaminación, la infestación de plagas, la proliferación de microbios, y otros tipos de decaimiento
- Mantener o mejorar la estética y los atributos sensoriales (apariencia, sabor, etc.) del producto
- Servir como vehículo de aditivos deseables tales como probióticos, nutrientes y vitaminas. La incorporación de antioxidantes y agentes antimicrobianos puede limitarse a la superficie mediante el uso de películas comestibles, minimizando así el costo y el sabor intrusivo.
- Por último, pero no menos importante que su elaboración sea fácil y económicamente viable.

Las películas comestibles, pueden usarse para soportar aditivos, tales como antimicrobianos, usándose así para impartir un efecto funcional altamente localizado (M. Rocha, Ferreira, Souza, & Prentice, 2013; Vartiainen et al., 2014) o producir la liberación gradual del antimicrobiano al alimento (Cagri et al., 2004). Es de destacar que las condiciones de formación de las películas y la composición de las mismas, definen la migración de estos aditivos antimicrobianos, delimitando su efectividad (Tawakkal, Cran, Miltz, & Bigger, 2014).

4.5 Materiales formadores de películas y recubrimientos comestibles

Los recubrimientos y películas comestibles suelen ser clasificados atendiendo a su material estructural. De esta manera, las películas y los recubrimientos se basan en

polisacáridos, proteínas, lípidos o multicomponentes (Tabla 1). Por ejemplo, una película puede consistir en lípidos e hidrocoloides combinados para formar una bicapa o un grupo.

En cuanto a la organización supramolecular de las películas, se puede inferir que su cohesividad está ligada a la química y estructura del polímero, naturaleza del solvente usado, composición de la película y condiciones de proceso de formación. En general, se requieren polímeros de cadena larga para dar matrices con adecuada fuerza cohesiva por depósito a partir de un solvente adecuado (Campos et al., 2010; Falguera et al., 2011).

Tabla 1. Funciones de las películas y recubrimientos comestibles en los alimentos, así como el tipo de película adecuado para tal fin (Neetoo & Mahomoodally, 2014).

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

En algunos estudios recientes la producción de películas comestibles biodegradables se puede obtener mediante la combinación de diversos polisacáridos, proteínas y lípidos con el objetivo de aprovechar las propiedades de cada compuesto y la sinergia entre ellos (Figura 2). Las propiedades mecánicas y de barrera de estas películas no sólo dependen de los compuestos usados en la matriz polimérica, sino también de su compatibilidad (Falguera et al., 2011).

En general, se hace indispensable el uso de plastificantes como glicerol o sorbitol, a fin de proporcionar la flexibilidad y extensibilidad deseada a dichas películas (Suput et al., 2015)

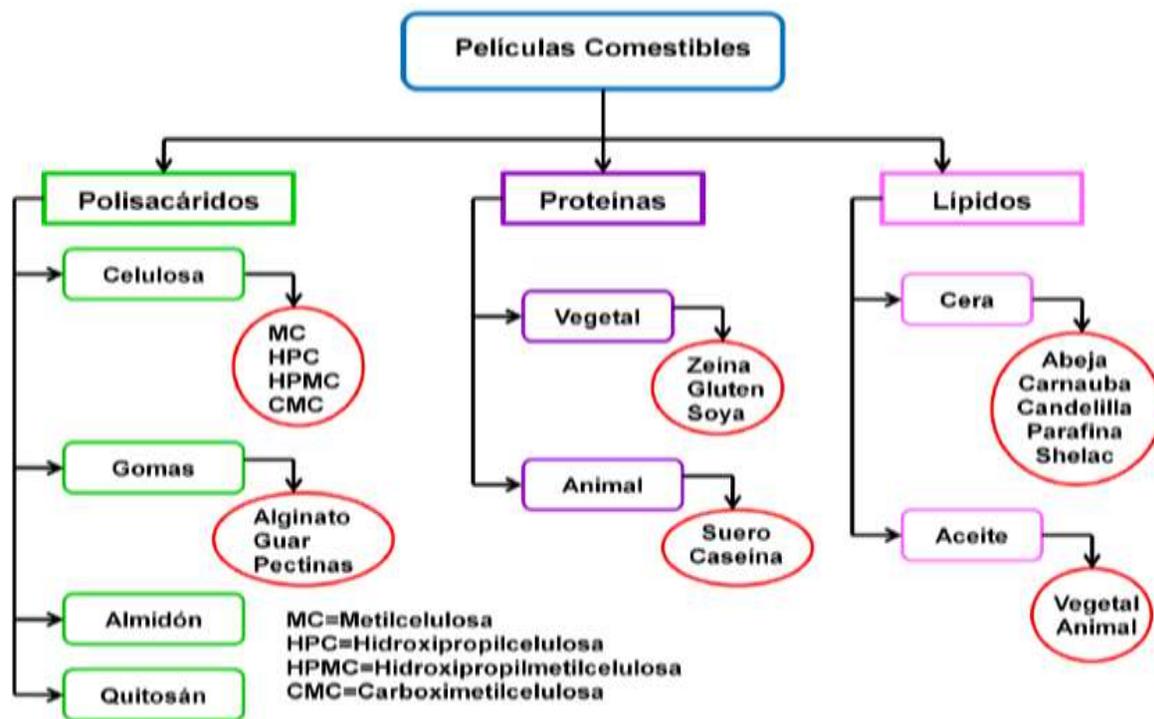


Figura 2. Principales materiales utilizados en películas comestibles. Tomado de (Arredondo Ochoa, 2012).

4.5.1 Hidrocoloides: Polisacáridos y proteínas

Hidrocoloides (polisacáridos y proteínas) son los biopolímeros más investigados en el campo de los recubrimientos y películas comestibles. Los polisacáridos y proteínas muestran excelentes propiedades mecánicas y estructurales, pero tienen una deficiente barrera contra la transferencia de humedad (Campos et al., 2010). En cambio, los lípidos muestran una mayor barrera a la humedad debido a sus propiedades hidrófobas, especialmente aquellos con altos puntos de fusión tales como la cera de abeja (Falguera et al., 2011).

Los hidrocoloides tienen buena aptitud para formar una matriz continua y coherente con propiedades mecánicas adecuadas. Tal capacidad está relacionada con la estructura química de estos compuestos, lo que permite la asociación a través de enlaces de hidrógeno de sus cadenas poliméricas (Campos et al., 2010).

En líneas muy generales, la formación de una red macromolecular de un biopolímero tipo hidrocoloide requiere de algunas etapas: en primer lugar la solubilización (parcial o total)

que permita una ruptura de enlaces intermoleculares de baja energía que estabilicen a los polímeros en su estado nativo; de esta manera se facilita un reordenamiento y orientación de las cadenas poliméricas y una interacción con el resto de componentes que forman la película (esta estructura se estabiliza durante el secado) (Falguera et al., 2011; Vartiainen et al., 2014).

➤ *Polisacáridos*

Los polisacáridos, son polímeros de cadena larga formados a partir de unidades repetidas de monosacáridos o disacáridos unidos mediante enlaces glucosídicos. Como resultado de la gran cantidad de grupos hidróxilo y otros restos hidrofílicos presentes en su estructura, los enlaces de hidrógeno tienen un papel importante en la formación de las películas comestibles que a su vez le confieren características especiales (Calderón Aguirre, 2014).

En general, las películas comestibles elaboradas a partir de estos biopolímeros se forman por interacciones interrumpidas entre los segmentos de cadena larga del polímero durante el proceso de coacervación y la formación de nuevos enlaces de hidrógeno intermoleculares a través de la evaporación del solvente para crear la matriz estructural de la película comestible (Suput et al., 2015; Vartiainen et al., 2014).

A nivel molecular, los polisacáridos varían en función de su peso molecular, grado de ramificación, conformación, carga eléctrica e hidrofobicidad. Las diferencias en estas características moleculares conducen a variaciones en su capacidad de formación como película comestible, así como de sus propiedades fisicoquímicas y rendimiento (Falguera et al., 2011).

Una gran variedad de polisacáridos y sus derivados han sido probados para su uso potencial en la elaboración de películas comestibles debido a su abundancia, bajo costo y fácil manejo, entre los que se encuentran el almidón y sus derivados, derivados de celulosa: metilcelulosa (MC), carboximetilcelulosa (CMC), hidroxipropilcelulosa (HPC) e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), alginatos, carragenina, quitosano, pectina y diversas gomas (Campos et al., 2010; Embuscado & Huber, 2009; Falguera et al., 2011).

Las películas comestibles a base de polisacáridos, poseen la capacidad de modificar el ambiente interno de un alimento creando una barrera contra gases como el O₂ y el CO₂, sin

embargo, poseen propiedades mecánicas pobres debido a su naturaleza hidrofílica, ofrecen poca resistencia a la migración de agua y por tanto sus valores de permeabilidad al vapor de agua (PVA) son muy altos si se comparan con los empaques formados con polímeros sintéticos, por lo que una alternativa viable son los procesos de modificación empleando diferentes métodos, con el objetivo de mejorar las propiedades del polisacárido para su uso en la elaboración de películas comestibles (Tharanathan, 2003; Villada, Acosta, & Velasco, 2007).

En general, los polisacáridos son los materiales más utilizados para la formación de recubrimientos y películas comestibles, hacen películas homogéneas, transparentes, con moderadas propiedades mecánicas y estructurales. Sin embargo, la aplicación de estas películas está limitada por su solubilidad en agua y la deficiente permeabilidad al vapor de agua (Suput et al., 2015).

➤ *Proteínas*

Las proteínas, son biomoléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos unidas mediante enlaces peptídicos que dependiendo de su estructura se clasifican en fibrosas y globulares. Molecularmente, las proteínas proporcionan una variedad casi ilimitada de materiales que provienen de diversas fuentes y que pueden utilizarse en la elaboración de películas comestibles (Calderón Aguirre, 2014; Vartiainen et al., 2014).

Las proteínas presentan una variedad amplia de características moleculares en base a su origen biológico y función, que involucran su peso molecular, conformación espacial, cargas eléctricas, flexibilidad y estabilidad térmica, que determinarán en última instancia la capacidad de una proteína para formar una película comestible y conferirle características especiales (Falguera et al., 2011).

Asimismo, la forma de la proteína es de gran importancia para la formación de estas redes que conforman la matriz. Las proteínas de alto peso molecular y fibrilares como el colágeno, la gelatina y las proteínas miofibrilares pueden formar redes más amplias con buenas propiedades mecánicas (Embucado & Huber, 2009). En cambio, las proteínas globulares, frecuentemente de bajo peso molecular (como las proteínas aisladas de soya y proteínas

sarcoplásmicas), hacen redes más compactas y menos elásticas, con menor resistencia (Suput et al., 2015).

Las proteínas que se han utilizado en la elaboración de películas comestibles incluyen el aislado de proteína de suero de leche (WPI, por sus siglas en inglés) y la caseína, ambas de origen animal, o las obtenidas a partir de vegetales como la zeína, el gluten de trigo, la proteína de soya e incluso la proteína de semilla de algodón (Calderón Aguirre, 2014; Vartiainen et al., 2014).

Al igual que las películas comestibles a base de polisacáridos, las películas a base de proteínas exhiben buenas propiedades de barrera al O₂, CO₂ y compuestos lipídicos, sobre todo en condiciones de baja humedad relativa, pero son en general pobres barreras contra el agua, además de ser frágiles y susceptibles a la rotura debido a la fuerte densidad de energía cohesiva de los polímeros.

El entrecruzamiento de las proteínas mediante tratamiento físico (calentamiento, irradiación), químico (formación de glutaraldehído, gliceraldehído, glioxal), enzimático (transglutaminasa) fue reportado como un método para mejorar la barrera al vapor de agua, así como las propiedades mecánicas y la resistencia a la proteólisis de películas (Suput et al., 2015).

Todas estas variables y la gran diversidad de características de las distintas proteínas permiten obtener un amplio abanico de posibilidades y propiedades de las películas constituidas a partir de estos biopolímeros. En general, si bien las películas a base de proteínas presentan buenas propiedades de barrera frente al oxígeno y dióxido de carbono, son susceptibles a la humedad (Suput et al., 2015; Vartiainen et al., 2014).

En comparación con las películas sintéticas, las películas basadas en proteínas presentan una pobre resistencia al agua y una menor resistencia mecánica. Sin embargo, las proteínas son generalmente superior a los polisacáridos en cuanto a su capacidad para formar películas con mejores propiedades mecánicas y de barrera (Suput et al., 2015).

4.5.1.1 *Pectina*

La pectina es un heteropolisacárido estructural (Figura 3) que se encuentra en las paredes celulares de las plantas terrestres, tales como la remolacha azucarera (Vartiainen et al., 2014). La pectina es uno de los principales componentes de la pared celular vegetal, químicamente constituida por poli-ácidos galacturónico (α 1-4). En la industria alimentaria, la pectina es generalmente reconocida como segura (GRAS, por sus siglas en inglés) por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) y se utiliza como gelificante, estabilizante o agente espesante en productos alimenticios tales como mermeladas, bebidas de yogur, bebidas de leche con sabor a fruta y helados.

La pectina es uno de los principales componentes de la pared celular de la planta, que contribuye a la integridad del tejido y la rigidez, se considera una de las macromoléculas más complejas en la naturaleza. Las principales fuentes industriales para la extracción de pectina son el orujo de manzana y los cítricos (P. J. P. Espitia et al., 2014).

De acuerdo con el grado de esterificación (DE, por sus siglas en inglés) con metanol, que es la relación de los grupos esterificados de ácido galacturónico con los grupos totales de ácido galacturónico, la pectina puede ser clasificada como pectina de alto metoxilo (HMP, por sus siglas en inglés) o pectina de bajo metoxilo (LMP, por sus siglas en inglés).

La HMP tiene más del 50 % de sus grupos carboxilo esterificados ($DE > 50$), mientras que la LMP tiene un $DE < 50$ %. El DE afecta a las propiedades de gelificación de las pectinas. De esta manera, LMP forma gel en presencia de iones multivalentes, que actúan como un relleno entre pares de grupos carboxilo de diferentes cadenas de pectina. Por otro lado, HMP forma un gel en un medio ácido con la adición de diferentes azúcares, tales como sacarosa o glucosa (Campos et al., 2010).

Debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad, comestibilidad, química versátil y propiedades físicas (tales como gelificación, permeabilidad selectiva a los gases, etc.), la pectina es una matriz polimérica adecuada para la elaboración de películas comestibles destinadas al empaque de alimentos. Sin embargo, la literatura relacionada con películas comestibles a base de pectina y su caracterización es muy escasa (P. J. P. Espitia et al., 2014).

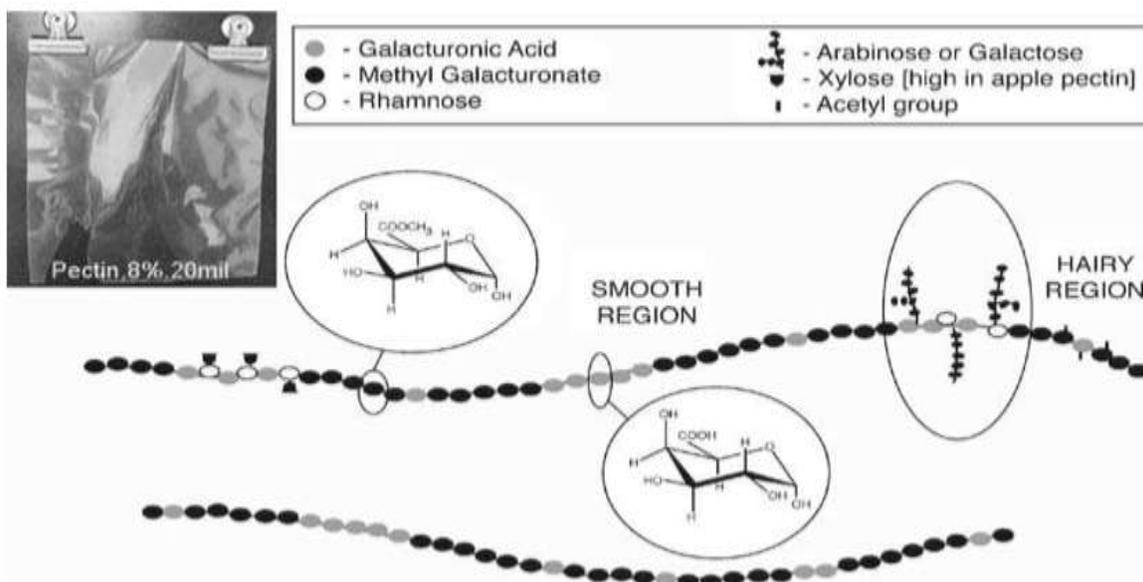


Figura 3. Estructura de la pectina y la imagen de una película a base de este polímero. Tomado de (Embuscado & Huber, 2009).

4.5.1.2 Gelana

La goma gelana es un exopolisacárido bacteriano que se produce a partir de la fermentación aeróbica de la bacteria *Sphingomonas elodea*; es un polímero lineal, aniónico de aproximadamente 50,000 DP, que consiste en una repetición del tetrasacárido (1,3-BD-glucosa, ácido glucurónico 1,4-BD, 1,4-BD-glucosa, 1,4-al-ramnosa) que contiene un grupo carboxílico en la parte lateral (Figura 4). La gelana se utiliza comúnmente en la industria alimentaria y farmacéutica (Embuscado & Huber, 2009), puede disolverse en agua, y cuando se calienta y se mezcla con cationes mono o divalentes, forma un gel transparente en la reducción de la temperatura en condiciones suaves resistente al calor y al estrés ácido.

Existen dos formas de la goma gelana, acetilada y desacetilada, siendo esta última la forma más común y disponible en el mercado. Ambas forman geles termorreversibles que varían en sus propiedades mecánicas; es suave, elástica, transparente, forma geles flexibles para la forma acetilada, mientras que la totalmente desacetilada forma geles duros, no elásticos y quebradizos (Embuscado & Huber, 2009; Oliveira et al., 2010).

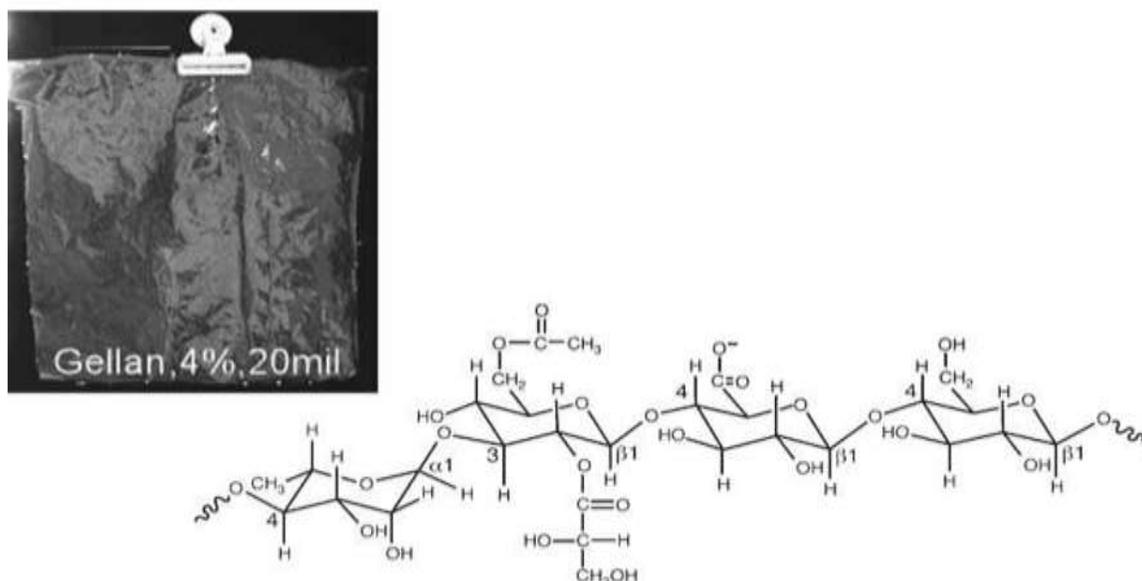


Figura 4. Estructura de la goma gelana y la imagen de una película a base de este polímero.

Tomado de (Embuscado & Huber, 2009).

4.5.2 Lípidos y ceras

A diferencia de otras macromoléculas, los lípidos y resinas no son considerados como biopolímeros debido a que no poseen un gran número de unidades repetidas unidas por enlaces covalentes para formar una estructura autosuficiente, por lo que su uso siempre está asociado como un agente de incorporación a un polímero que proporcione resistencia mecánica a la película comestible (Falguera et al., 2011).

Lípidos neutros, ácidos grasos, ceras (candelilla, carnauba y abeja) y resinas, son comúnmente utilizados en la elaboración de películas comestibles y pueden ser adicionados como una capa lipídica dispersa en una red de hidrocoloide o como una capa secundaria, esto es, una capa lipídica sobre una capa de hidrocoloide (Campos et al., 2010). Los lípidos son por lo general combinados con otros materiales formadores de películas, tales como proteínas o polisacáridos, como partículas de la emulsión o recubrimientos de capas múltiples con el fin de aumentar la resistencia a la penetración de agua.

La función primaria de la incorporación de lípidos en la formulación de películas comestibles, además de conferirle brillo al alimento, es la barrera contra la humedad, ya que

el agua posee poca movilidad dentro de una matriz lipídica debido a su poca afinidad, baja polaridad y densidad. Las propiedades finales de las películas comestibles adicionadas con lípidos dependerán de las características de estos componentes tales como su estado físico, grado de saturación y longitud de la cadena (Embuscado & Huber, 2009).

La eficiencia de materiales lipídicos en películas y recubrimientos comestibles depende de la naturaleza del lípido utilizado, y en particular de su estructura, disposición química, hidrofobicidad, estado físico (sólido o líquido) y las interacciones del lípido con otros componentes de la película.

Barreras comestibles a base de sustancias hidrofóbicas tales como lípidos fueron desarrollados específicamente para limitar la migración de humedad dentro de los alimentos. En la industria alimentaria, éstos se utilizan para mejorar la apariencia de la superficie (color y brillo) y reducir la pegajosidad superficial (Falguera et al., 2011).

Pocos estudios han investigado los efectos de la aplicación de lacas y barnices de origen natural en los alimentos. Sin embargo, proveedores de aditivos alimentarios han propuesto su uso como agentes de recubrimiento. Emulsionantes y agentes tensoactivos se utilizan a veces como barreras para gases y/o la humedad sobre el pescado y productos cárnicos. También se pueden añadir a una formulación de revestimiento para mejorar la adherencia superficial entre el recubrimiento y alimento a recubrir (Suput et al., 2015).

4.5.3 *Multicomponentes*

Los recubrimientos y películas comestibles pueden consistir en una mezcla de polisacáridos, proteínas y/o lípidos. Este enfoque permite hacer uso de las características funcionales distintivas de cada compuesto. De acuerdo con la literatura, el objetivo principal de la producción de películas a partir de mezclas de biopolímeros es mejorar las características de permeabilidad o propiedades mecánicas según lo dictado por la necesidad de una aplicación específica.

La asociación entre los polímeros puede lograrse a través de mezcla, extrusión, laminado o recubrimiento con otros polímeros con propiedades deseables. La mezcla es una

forma más fácil y eficaz para preparar materiales poliméricos asociados (Campos et al., 2010).

Las películas compuestas pueden ser formuladas para combinar las ventajas de cada componente. Los biopolímeros, tales como proteínas y polisacáridos, proporcionan la matriz de soporte para la mayoría de las películas de material compuesto, y por lo general ofrecen buenas propiedades de barrera a los gases, con componentes de hidrocoloides que proporcionen una barrera selectiva para el oxígeno y dióxido de carbono. Los lípidos proporcionan una buena barrera al vapor de agua, mientras que los plastificantes son necesarios para mejorar la flexibilidad y mejorar las propiedades mecánicas de la película.

La composición, microestructura y propiedades físicas de las películas de biopolímeros determinan sus posibles aplicaciones. El control de la formulación de la película permite la adaptación de las propiedades mecánicas y de barrera de estos materiales, mejorando la eficiencia de la preservación de los alimentos envasados. El estudio de la microestructura de la película y las interacciones entre los componentes de la película da una idea de los aspectos fundamentales sobre ciencia de los materiales y tecnologías prácticas para posibles aplicaciones (Embuscado & Huber, 2009).

4.5.4 Plastificantes

Las películas a base de polisacáridos o proteínas suelen ser quebradizas y poco flexibles por lo que requieren de la adición de plastificantes ya que reducen los enlaces hidrógeno internos entre las cadenas de polímeros (Embuscado & Huber, 2009).

Los plastificantes afectan la capacidad de atracción de agua del sistema y generalmente suelen aumentar la permeabilidad al oxígeno de los recubrimientos comestibles. Son compuestos de pequeño peso molecular, de baja volatilidad y con una naturaleza química similar a la del polímero formador de recubrimiento; se añaden a las coberturas para mejorar su flexibilidad y propiedades mecánicas (Campos et al., 2010).

La adición de plastificantes modifica la organización polimérica de la red proteica tridimensional, disminuyendo las fuerzas de atracción intermoleculares, incrementando el volumen libre y favoreciendo la movilidad de las cadenas (Suput et al., 2015). Numerosos

autores han estudiado el efecto que produce el tipo y concentración de los plastificantes hidrofílicos en las propiedades de las películas de proteínas (Soysal et al., 2015). El efecto plastificante se evidencia más cuando la molécula empleada es más pequeña y más hidrofílica. Un exceso de plastificante puede tener efectos negativos sobre las propiedades de barrera de las películas (Eca, Machado, Hubinger, & Menegalli, 2015).

Entre los plastificantes más frecuentes se encuentran los polioles (sorbitol, glicerol, polietilenglicoles y los derivados del glicerol), azúcares y ácidos grasos. Los polioles son particularmente efectivos como plastificantes, siendo el glicerol el más comúnmente empleado en las formulaciones de películas de proteínas (Bhatia & Bharti, 2015).

El glicerol es un compuesto químico, también llamado glicerina. Es un líquido viscoso, sin olor ni color y ampliamente usado en la industria farmacéutica. El glicerol posee tres grupos hidroxilos que son responsables de su solubilidad en agua y su naturaleza higroscópica (Figura 5). Es el componente central de algunos lípidos.

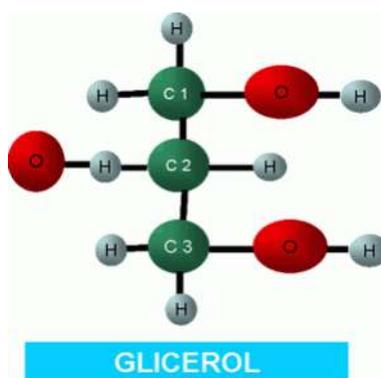


Figura 5. Estructura molecular del glicerol.

El glicerol es ligeramente dulce y de baja toxicidad. Gracias a la presencia de grupos $-OH$ en su estructura, el glicerol es capaz de vincularse a través de puentes de hidrógeno con las cadenas del polímero, impidiendo el completo ordenamiento de las mismas debido a que se interpone entre éstas. El efecto global del reemplazo de interacciones polímero-polímero por interacciones plastificante-polímero es la reducción de la rigidez de las películas.

El tamaño molecular, la configuración y el número total de grupos hidroxilo funcionales del plastificante, como así también su compatibilidad con el polímero, afectan el

tipo y cantidad de interacciones entre el plastificante y las cadenas poliméricas (Suput et al., 2015). Este hecho, unido a que el glicerol produce además mayor absorción de humedad que el sorbitol (Vartiainen et al., 2014), hace que normalmente se utilice una combinación a partes iguales entre ambos polioles para conseguir de este modo efectos intermedios.

4.6 Empaques para alimentos

Los envases juegan un papel fundamental en la industria alimentaria ya que realizan importantes funciones como la de “contener, proteger, manipular, distribuir y presentar mercancías, desde materias primas hasta artículos acabados, y desde el fabricante hasta el usuario o el consumidor” (Han, 2005). Entre estas funciones destaca la acción protectora de los envases, ya que contribuyen al retraso del deterioro, aumentan la vida útil y mantienen la calidad y seguridad de los alimentos envasados.

Los envases protegen a los alimentos y bebidas de una serie de agentes externos procedentes del ambiente como son el calor, la luz, humedad, oxígeno, presión, enzimas, olores indeseables, microorganismos, insectos, suciedad y partículas de polvo o emisiones de gases, entre otros que suponen un detrimento de su calidad o seguridad. Por otra parte, desde un punto de vista comercial los envases se emplean para identificar un producto determinado, y también para proporcionar información importante como, por ejemplo, el peso, ingredientes o valor nutricional (M. d. Rocha, Loiko, Tondo, & Prentice, 2014).

Los materiales más utilizados para el envasado de alimentos y bebidas son los plásticos sintéticos, que se clasifican en siete categorías (Tabla 2). Estos polímeros sintéticos se emplean por las múltiples ventajas que presentan, como ser químicamente inertes, ligeros, resistentes, cómodos e higiénicos, y por su versatilidad de forma, tamaño, etc. (Neetoo & Mahomoodally, 2014). Sin embargo, al ser compuestos sintéticos, no biodegradables y derivados del petróleo, su utilización supone serios problemas ecológicos debidos principalmente a la contaminación medioambiental que causan, tanto por su fabricación e incineración como por su aporte en la generación y acumulación de residuos.

Tabla 2. Plásticos derivados del petróleo utilizados en el envasado de alimentos (Realini & Marcos, 2014).

Tipo	Material	Abreviatura	Aplicaciones
1	Polietileno tereftalato	PET	Botellas
2	Polietileno de alta densidad	PEAD (HDPE)	Botellas, bandejas
3	Policloruro de vinilo	PVC	Películas flexibles
4	Polietileno de baja densidad	PEBD (LDPE)	Películas, bolsas
5	Polipropileno	PP	Películas flexibles
6	Poliestireno	PS	Bandejas, tarrinas
7	Otros	Policarbonatos, resinas, epoxi, etc.	

* Entre paréntesis por sus siglas en inglés.

Por otro lado, estos polímeros sintéticos pueden vehicular sustancias tóxicas o no deseables como monómeros, plastificantes, antioxidantes sintéticos, aditivos, etc. presentes en su propia composición y que pueden migrar al alimento que envuelven (Muppalla, Kanatt, Chawla, & Sharma, 2014). Además de lo anteriormente expuesto, no hay que olvidar otros problemas que conllevan el uso del petróleo como materia prima, como son la disminución de las reservas petrolíferas y su precio elevado.

Por lo tanto, existe un interés tanto político como social por encontrar nuevos materiales procedentes de fuentes renovables, menos contaminantes o de fácil reciclado para envasar los alimentos. Con ese objetivo en los últimos años se han realizado numerosas investigaciones encaminadas a desarrollar nuevos materiales biodegradables, como son algunos biopolímeros, ya que éstos tienen un menor o nulo impacto medioambiental.

La demanda de alimentos mínimamente procesados ha traído como consecuencia la generación de un gran número de investigaciones e innovaciones de nuevos empaques con propiedades antimicrobianas. Dichos empaques pueden actuar como vehículo de compuestos activos como ácidos orgánicos, agentes antioxidantes, antimicóticos, extractos de especias, lisozima, antibióticos, el sistema lactoperoxidasa, bacteriocinas, y lactoferrina entre otros (Neetoo & Mahomoodally, 2014; Pérez-Pérez, Regalado-González, Barbosa-Rodríguez, Rodríguez-Rodríguez, & F., 2006; Sanchez-Ortega et al., 2014).

4.6.1 *Empaques inteligentes*

Los empaques inteligentes son aquellos que poseen la habilidad para el monitoreo de las condiciones del alimento empacado, es decir proveen de información acerca de los diferentes factores que pudiesen dañar al alimento durante su transporte y almacenamiento.

Para tal fin utilizan sensores o indicadores los cuales son colocados dentro o fuera del empaque. Algunos ejemplos de dichos sensores son sensores de tiempo, de temperatura, de niveles de oxígeno, de dióxido de carbono y de crecimiento microbiano (Kamel, 2014).

4.6.2 *Empaques activos*

Los empaques convencionales o tradicionales durante muchos años han sido utilizados para actuar como una barrera inerte entre el producto y su entorno. Las nuevas necesidades de los consumidores por adquirir alimentos con el menor procesamiento posible, frescos y con una apariencia agradable han traído como consecuencia el desarrollo de nuevos empaques.

Entre las innovaciones más interesantes se encuentran los “envases activos”, donde el empaque además de tener las funciones de un envase convencional cambia activamente la condición del envase del alimento para extender la vida útil o para mejorar la seguridad y propiedades sensoriales, mientras mantiene la calidad del producto envasado.

El empaque activo puede ser diseñado como un dispositivo para llevar a cabo funciones específicas (Guo, Jin, Wang, Scullen, & Sommers, 2014). El tipo de dispositivo puede ser elaborado de distintos tipos de materiales que le brinden la propiedad de ser o no biodegradable. Recientemente se han realizado investigaciones sobre diversos tipos de compuestos activos incorporados dentro de éstos dispositivos con la finalidad de que desempeñen funciones determinadas como lo son: capturar gases, O₂, CO₂, regular la humedad, eliminar olores y sabores.

Entre los distintos tipos de empaques activos se encuentran las películas comestibles que pueden utilizarse tanto para el control de la deshidratación de los alimentos frescos y

congelados como para evitar la absorción de humedad en los alimentos deshidratados (M. Blanco Massani et al., 2014; M. Rocha et al., 2013).

Las últimas investigaciones han enfocado su atención en el desarrollo de empaques activos y biodegradables, incluyendo películas elaboradas a partir de proteínas como caseína, gelatina, proteínas de soya, proteínas aisladas del suero de leche y zeína. Los empaques activos han mostrado tener propiedades físicas adecuadas y son excelente barrera de protección para los alimentos. No obstante, en general son una barrera pobre frente a la humedad. Por ello que se ha propuesto la adición de lípidos, como el ácido esteárico, para disminuir la permeabilidad al vapor de agua (Nithya et al., 2013).

Los empaques activos elaborados a partir de polímeros naturales son sugeridos para la aplicación en alimentos por tener las propiedades señaladas en la Tabla 3.

Tabla 3. Algunas funciones de los empaques activos (Murillo Martínez, 2008).

Funciones
Control de la migración/pérdida de humedad
Control de intercambio de gases (O ₂ , CO ₂ , C ₂ H ₄ , entre otros)
Control de la migración de solutos
Control de migración, pérdida o intercambiador de sabor
Control de migración, pérdida o intercambio de sabor color, antimicrobianos y otros aditivos de alimentos
Prevención control de fotodegradación-oxidación
Mejorar las propiedades mecánicas de envasado de los alimentos

La función que tienen estas películas y/o recubrimientos adicionados con sustancias activas como agentes antimicrobianos es inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos o causantes de deterioro de los alimentos. Dentro de las películas comestibles con actividad antimicrobiana se han incorporado las bacteriocinas (nisina y pediocina) y algunas enzimas con actividad antimicrobiana como lactoferrina y lizosima (Fernandez-Pan, Mendoza, & Mate, 2013; Kim, Cho, & Han, 2013).

Recientemente, se ha reportado la incorporación de dos o más antimicrobianos naturales como lactoferrina, extractos de plantas y bacteriocinas (Tabla 4) con el objetivo de ampliar el espectro inhibitorio y controlar el crecimiento de microorganismos deteriorantes y/o patógenos presentes en alimentos (Kraśniewska & Gniewosz, 2012). Estas

investigaciones son muy importantes debido a que tienen como finalidad aumentar la vida de anaquel del producto envasado y/o reducir la aparición de cepas resistentes que son de alto riesgo para la salud.

Por otra parte, los empaques adicionados con agentes quelantes como citratos, lactatos, pirofosfatos y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), son empaques que evitan el deterioro de los alimentos causados por iones metálicos divalentes como Fe^{2+} , Ca^{2+} , y Cu^{2+} , estos iones metálicos en algunos de los casos resultan necesarios para el crecimiento de microorganismos, por lo que los agentes quelantes pueden actuar también como agentes antimicrobianos (Khare, Biswas, & Sahoo, 2014; Ntchimani et al., 2010).

Las últimas investigaciones hechas sobre empaques con actividad quelante se han enfocado en el uso de EDTA. Los empaques adicionados con EDTA combinados con otros agentes antimicrobianos tienen la capacidad de ampliar el espectro inhibitorio contra bacterias Gram-negativas como *Echerichia coli* y *Salmonella tiphymurium* (Patricia Castellano et al., 2011; Gadang, Hettiarachchy, Johnson, & Owens, 2008; Prudêncio, Ferreira, Mantovani, & Vanetti, 2015).

Tabla 4. Algunas investigaciones representativas sobre elaboración de películas incluyendo diferentes compuestos antimicrobianos en su formulación.

No.	Polímero	Agente antimicrobiano	Microorganismo al que inhibe	Resultados relevantes	Referencia
1	Proteína de suero de leche y caseinato de calcio	Sobrenadante de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> NRRL B-442	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A • <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29413 • <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 • <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 14028 	Las cepas microbianas se inocularon en caldo de soya tripticasa, se realizaron diluciones para obtener una densidad de aprox. 10^7 células/mL. La zona de inhibición de las películas (3 discos de 0.6 cm de diámetro) se determinó mediante el ensayo de difusión (de 0.1 mL de las células bacterianas) en la superficie del agar, las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h y se midieron los halos de inhibición. Se observó actividad antimicrobiana notable (aprox. 3 mm) contra las bacterias cuando se añadieron 18 mg/mL del sobrenadante libre de células.	(Beristain-Bauza, Mani-López, Palou, & López-Malo, 2016)
2	Gelatina de bovino	Bacteriocinas de <i>Enterococcus faecium</i> SM21 y flavonoide éster activo	<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. monocytogenes</i> 01/155 • <i>S. aureus</i> ATCC29213 • <i>Bacillus cereus</i> 1 	La película elaborada tenía una concentración final de bacteriocina de 63 UA/cm ² (que provenía de una solución de enterocina con 800 UA/mL). La actividad de los compuestos antimicrobianos se determinó usando el método de difusión en agar. Fragmentos de 1 cm ² de cada película se cortó, se esterilizó con luz UV y se colocó sobre agar BHI solidificado. El agar se inoculó previamente con cada patógeno con el fin de obtener 10^7 - 10^8 UFC/mL de la cepa, después de 24 h de incubación a 37 °C se evaluaron los halos de inhibición. Solo <i>L. monocytogenes</i> fue claramente inhibida por la bacteriocina, para los otros 2 patógenos no mostró actividad antimicrobiana.	(Ibarguren et al., 2015)

3	Almidón	Nisina, lisozima y EDTA	<ul style="list-style-type: none"> • Contaminación ambiental 	Se evaluaron una variedad de tratamientos; concentración de nisina (que van de 0-7500 UI/mL), 3 variables de la concentración de lisozima (0 a 5000 UI/mL) y de EDTA (0 a 20 mM). La zona de inhibición de las películas antimicrobianas se observó mediante el método de difusión en agar. Cada muestra de película (12 mm) se colocó sobre el agar previamente inoculado con una densidad de cultivo de 10 ⁶ UFC/mL. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h y se midieron los diámetros de los halos de inhibición, 12 diferentes combinaciones mostraron actividad antimicrobiana.	(Bhatia & Bharti, 2015)
4	Proteínas de anchoíta (<i>Engraulis anchoita</i>)	Ácido sórbico o benzoico	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i> O157: H7 • <i>L. monocytogenes</i> • <i>Salmonella enteritidis</i> SE86 • <i>S. aureus</i> ATCC 25953 	Las muestras de películas se cortaron asépticamente en discos de 15 mm de diámetro, se colocaron en placas con agar Mueller-Hinton (MH), previamente inoculado con una suspensión bacteriana de 1-2×10 ⁸ UFC/mL, las placas se incubaron invertidas a 37 °C durante 24 h y se midieron los halos de inhibición. Películas con 1.50% de ácido sórbico o benzoico tuvieron la mayor inhibición contra <i>E. coli</i> O157: H7, <i>S. enteritidis</i> y <i>L. monocytogenes</i> , sin embargo no lograron inhibir a <i>S. aureus</i> .	(M. d. Rocha et al., 2014)
5	Polietileno de baja densidad y celulosa	Péptido antibacterial de <i>Bacillus licheniformis</i> Me1	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341 • <i>L. monocytogenes</i> Scott A • <i>S. aureus</i> FRI 722 • <i>Salmonella typhimurium</i> MTCC 1251 • <i>B. cereus</i> F 4433 	Se evaluaron 2 concentraciones del péptido antibacterial (800 y 6400 UA/mL). Las películas tratadas (2×2 cm) se colocaron sobre la superficie de placas con agar suave BHI (0.8 %) sembradas con 10 ⁴ UFC/mL, se incubaron a 37 °C durante 18±2 h y se evaluó la actividad antagonista mediante la observación de una zona clara de inhibición. Después de 3 meses de incorporación, las películas activas se mantuvieron a 4 °C y a temperatura ambiente mostrando una actividad antilisterial clara y estable.	(Nithya et al., 2013)

6	Metilcelulosa	Aceite de tomillo, romero, cilantro, albahaca y pimienta	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 	<p>Se evaluó la actividad antimicrobiana de diversas proporciones de aceite esencial de tomillo, romero, cilantro, albahaca y pimienta aceite de bayas (1, 2, 3 y 4 % g/cc) utilizando el método de difusión en agar. Discos de 1 cm de diámetro de película se colocaron en la superficie de agar nutritivo que se había inoculado con un cultivo que contenía 10⁶ UFC/cc. Se incubaron a 30 °C durante 24 h y se midió el diámetro de la zona de inhibición. El más potente efecto antimicrobiano alcanzado fue incluyendo aceite de cilantro. El efecto antimicrobiano más débil incluía el aceite de romero.</p>	(Kalkan, Erginkaya, & Ünal, 2013)
7	Metilcelulosa	Pediocina y ZnO	<ul style="list-style-type: none"> • <i>S. aureus</i> ATCC 6538 • <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313 	<p>Concentración de los agentes antimicrobianos: ZnO (17 % p/p) y pediocina (20 % p/p). El inóculo bacteriano fue de 1×10⁸ UFC/mL, <i>S. aureus</i> se subcultivó en Agar Baird Parker, mientras que <i>L. monocytogenes</i> se subcultivó en agar Oxford para el ensayo de actividad antimicrobiana. Discos de 1 cm de diámetro fueron colocados sobre la superficie de los medios, las placas se incubaron a 12 °C durante 24 h para permitir la difusión de compuestos antimicrobianos, después se incubaron a 35 °C durante 24 h para determinar la actividad antimicrobiana mediante la medición de la zona de inhibición alrededor de los discos. La zona de inhibición de <i>L. monocytogenes</i> fue 2±0.1 cm, mientras que para <i>S. aureus</i> fue 1.6±0.2 cm.</p>	(P. J. Espitia et al., 2013)

8	Quitosano	Nisina, péptido P34 y natamicina	<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 • <i>B. cereus</i> ATCC 14579 • <i>S. aureus</i> ATCC 25923 • <i>E. coli</i> ATCC 25922 • <i>S. enteritidis</i> ATCC 13076 • <i>Clostridium perfringens</i> ATCC 3624 	Los antimicrobianos nisina, péptido P34 y natamicina se incorporaron en una concentración final de 2.5 µg/mL, 16 UA/mL y 2 µg/mL respectivamente. La actividad antimicrobiana se determinó por el método de difusión. Películas cortadas de 6 mm se colocaron en agar de soya tríptica (TSA) con un inóculo de 10 ⁶ UFC/mL, las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 h y se midieron los diámetros de inhibición. Los péptidos antimicrobianos nisina y P34 no causaron inhibición cuando se utilizaron individualmente. Cuando se ensayaron las películas que incorporaron nisina y péptido P34, mostró un aumento de la actividad inhibidora, lo más notable fue para P34 contra <i>C. perfringens</i> y <i>E. coli</i> .	(Cé, Noreña, & Brandelli, 2012)
9	Proteína aislada de suero de leche	Aceite esencial de orégano, clavo, árbol de té, cilantro, tomillo, laurel de la masilla, romero y salvia.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. innocua</i> • <i>S. aureus</i> • <i>S. enteritidis</i> • <i>Pseudomona fragi</i> 	Se probaron las siguientes concentraciones de aceites esenciales: 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 %. Un inóculo de 100 µL de suspensión bacteriana que contenía 10 ⁷ UFC/mL se extendió sobre agar Mueller-Hinton o BHI, discos de la película formulada (17 mm de diámetro) se colocaron sobre el inóculo. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h y se midieron los halos de inhibición. Películas en las que se incorporó aceite de orégano y clavo de olor fueron las únicas activas contra los 4 microorganismos estudiados. Los otros aceites evaluados incluso a altas concentraciones (7% a 9%) no causan ningún efecto antimicrobiano frente a los patógenos.	(Fernandez-Pan, Royo, & Ignacio Mate, 2012)
10	Carboximetilcelulosa	Lisozima y lactoferrina	<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. innocua</i> DSMZ 20649 • <i>E. coli</i> DSMZ 50902 	Muestras de película activa (15 cm ²) se colocaron en 30 mL de TSB en tubos estériles inoculados (1% v/v) con una suspensión microbiana de las bacterias para tener OD ₆₀₀ =0.200. y se incubaron a 30 °C. Lisozima demostró una reducción final de 0,5 log. La presencia de ambas proteínas provocó que a las 24 h la población	(Barbiroli et al., 2012)

				final fuera casi 1 ciclo log menor que en el control para <i>L. innocua</i> . Respecto a <i>E. coli</i> lisozima produjo un efecto inhibitor modesto, tuvo una reducción decimal de sólo el 0.25 log UFC/mL con respecto al control, lactoferrina dio una disminución final de 1.7 log respecto al control y los mejores resultados fueron el empleo de las proteínas combinadas, con una reducción decimal de 2.04 log UFC/mL.	
11	Almidón de plátano	Aceite esencial de canela y sorbato de potasio	<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. innocua</i> • <i>S. aureus</i> 	Las películas se elaboraron con sorbato de potasio (0.4 y 0.6 % p/v) y aceite de canela (1 y 1.5 % p/v). Se usó la prueba de difusión en agar para determinar el efecto antimicrobiano de las películas. Círculos de películas (3 mm de diámetro) se colocaron en agar soya tripticasa, se mantuvieron a 7 °C por 48 h para que el antimicrobiano difundiera al medio y después se incubaron a 37 °C por 48 h y se observaron los halos de inhibición. Las películas que contenían sorbato de potasio en su formulación, mostraron una menor actividad antimicrobiana que las películas con el aceite esencial de canela.	(Romero-Bastida, 2011)
12	Gelatina de salmón	Quitosano	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i> 	Propiedades antimicrobianas contra <i>E. coli</i> (10 ⁵ UFC/mL) se obtuvieron por difusión en placa de agar y mediciones cinéticas a 37 °C. Películas (1 cm ²) con diferentes concentraciones de quitosano se colocaron en placas con agar Muller Hinton previamente inoculadas con <i>E. coli</i> , se incubaron a temperatura ambiente durante 5, 10, 15 y 20 min y a 4 °C durante 24 h, después las piezas de las películas se retiraron y las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. El 100% del crecimiento de <i>E. coli</i> se inhibió por todas las concentraciones de quitosano estudiadas dentro de las 24 h de incubación.	(Celis, Azocar, Enrione, Paez, & Matiacevic h, 2011)

13	Caseinato de sodio	Nisina	<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. innocua</i> 	<p>La película activa tenía una concentración de nisina de 1000 UI/cm². Las películas se cortaron en discos de 4 mm de diámetro y se colocaron en superficies de agar de recuento en placa (PCA) que contenía una concentración de 10¹⁰ UFC/mL de la bacteria, las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h y se evaluaron las zonas de inhibición. Se obtuvo un diámetro de inhibición de 13 mm, que corresponde a un diámetro total de 17 mm (diámetro de película 4).</p>	(Cao-Hoang, Grégoire, Chaine, & Waché, 2010)
14	Proteína de soya	Extracto de semilla de uva, nisina y EDTA	<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. monocytogenes</i> • <i>E. coli</i> O157:H7 • <i>S. typhimurium</i> 	<p>Películas que contenían extracto de semilla de uva (1% p/p), nisina (10.000 UI/g), EDTA (0.16% p/p), y sus combinaciones fueron evaluadas. Para determinar el efecto inhibitorio de la película, 15 µL de cultivo bacteriano (1.5×10⁶ bacterias) se inocularon en discos de películas (1 cm de diámetro), los recuentos de bacterias totales se contaron después de 1 h de incubación a 25 °C. Se sembraron en medios selectivos para cada microorganismo (para <i>L. monocytogenes</i> placas con medio Oxford LSA con suplemento antibiótico, para <i>S. typhimurium</i>, agar XLT4 con suplemento XLT4, y para <i>E. coli</i> O157: H7 agar MacConkey sorbitol). Estas placas se incubaron a 37 °C durante 48 h y las colonias se contaron. La película bioactiva demostró mayor actividad inhibitoria frente a <i>L. monocytogenes</i>. La película activa fue capaz de reducir <i>L. monocytogenes</i> 2.9 log UFC/mL, mientras que la población de <i>E. coli</i> O157: H7 y <i>S. typhimurium</i> se redujeron en 1.8 y 0.6 log UFC/mL, respectivamente.</p>	(Sivarooban, Hettiarachchi, & Johnson, 2008)
15	Polietileno de baja densidad	Enterocina 416K1	<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. monocytogenes</i> NCTC 10888 	<p>La concentración usada de enterocina fue de 2569 UA/mL. Muestras de películas (20×20 mm²) se colocaron en agar de soya tripticasa (TSA), placas sembradas con 10⁶ UFC de cultivos de <i>L. monocytogenes</i>, las placas se incubaron a 37 °C durante</p>	(Iseppi et al., 2008)

				24 h y se cuantificó la zona clara de inhibición. Durante la evaluación los recuentos viables de <i>L. monocytogenes</i> se redujeron 1.5 unidades log en comparación con el control después de 72 h.	
16	Quitosano	EDTA, aceite esencial de tomillo y clavo	<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. monocytogenes</i> PTCC 1298 • <i>S. aureus</i> PTCC 1431 • <i>S. enteritidis</i> PTCC 1247 	Las concentraciones estudiadas de los aceites fue de (0.5, 1 y 1.5 % v/v) en combinación con EDTA 5 mmol. Se cortaron discos de 10 mm de diámetro de las películas y se colocaron en la superficie de agar BHI previamente inoculado con una concentración de 10 ⁵ -10 ⁶ UFC/mL de las bacterias. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h y se midieron los diámetros de la zona de inhibición. El EDTA aumentó los efectos contra bacterias gram-positivas y gram-negativas.	(Mohamm ad Hasehm Hosseini, 2008)
17	Polietileno lineal de baja densidad	Nisina y bacteriocinas Bac162W de <i>Lactobacillus curvatus</i> y BacAM09 de <i>Lactobacillus plantarum</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. monocytogenes</i> 	Soluciones de Bac162W, BacAM09, y nisina con una concentración final de 6400 AU/mL se adicionaron a los plásticos. Películas (2×4 cm) se colocaron en el fondo de cajas Petri vacías (90 mm de diámetro), después se agregaron 20 mL de caldo soya triptona, 0.75 % de agar y se sembró con 2 % de un cultivo de una noche de edad de la cepa indicadora. Se incubaron a 30 °C durante 24 h y se observaron los halos de inhibición. Las películas tratadas con nisina mostraron la actividad antimicrobiana más eficaz.	(La Storia, Ercolini, Marinello, & Mauriello, 2008)
18	Caseinato de sodio	Lactato de sodio, sorbato de potasio y nisina	<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. monocytogenes</i> 	Se inocularon placas de agar con una concentración de 10 ² UFC/cm ² . Se usó agar soya triptosa con NaCl como modelo de sistema de alimento sólido; porciones de 20 g de medio se virtieron en cajas Petri, alícuotas de 0.1 mL se inocularon en la superficie y se colocaron películas del mismo diámetro de la caja Petri. Películas que contenían nisina fueron las más efectivas en la reducción de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> .	(Kristo, Koutsoumanis, & Biliaderis, 2008)

19	Ácido poliláctico biodegradable	Nisina	<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. monocytogenes</i> • <i>E. coli</i> O157:H7 • <i>S. Enteritidis</i> 	<p>En la prueba de difusión en agar, películas (1.4×1.4 cm) se colocaron en la superficie de una placa de agar BHI suave, previamente inoculadas con una densidad bacteriana de aprox. 10⁶ UFC/mL. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 H y se midieron los halos de inhibición. La película activa logró reducir 1.2 y 0.5 log UFC/mL a las 4 h respecto al control la población de <i>L. monocytogenes</i> y <i>E. coli</i> respectivamente.</p>	(T. Jin & Zhang, 2008)
20	Zeína	Lisozima, proteína albúmina y EDTA disódico	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i> • <i>B. subtilis</i> 	<p>La concentración evaluada de EDTA fue de 277 y 310 µg/cm² en película seca. Se cortaron discos de 0.9 cm de diámetro y se colocaron en la superficie de cajas Petri con agar nutritivo con 0.1 mL del inóculo de la bacteria. Las cajas se incubaron a 37 °C durante 24 y 48 h y se midieron los halos de inhibición. La concentración más baja de EDTA evaluada logró inhibir el crecimiento microbiano desde las 24 h.</p>	(Güçbilmez, Yeminicioğlu, & Arslanoğlu, 2007)
21	Polietileno	Bacteriocina 32Y de <i>Lactobacillus curvatus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. monocytogenes</i> 	<p>La concentración evaluada de la bacteriocina fue de 6400 UA/mL. La película activa fue atrapada en un portaobjetos de microscopía con solución salina de fosfato y TSB que contenía aprox. 10⁷ UFC/mL de <i>L. monocytogenes</i>. Se aplicó directamente una solución de tinción viable y las células vivas y muertas fueron contadas inmediatamente y después de 2, 5 y 7 h de incubación a temperatura ambiente y 4 °C mediante microscopía de epifluorescencia. Independientemente de la temperatura de incubación, el número de células vivas por campo disminuyó a cero dentro de 2 h.</p>	(Ercolini, La Stora, Villani, & Mauriello, 2006)

22	Quitosano	Aceite de ajo, sorbato de potasio y nisina	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i> • <i>S. aureus</i> • <i>S. typhimurium</i> • <i>L. monocytogenes</i> • <i>B. cereus</i> 	<p>Se cortaron películas en forma de disco de 17 mm de diámetro, se colocaron en placas con agar Mueller Hinton, previamente inoculadas con 0.1 mL de inóculo que contiene microorganismos en el rango de 10^5 a 10^6 UFC/mL, las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h y se midieron los halos de inhibición. <i>L. monocytogenes</i> fue la bacteria más sensible y susceptible a la nisina, ya que mostraba una zona clara de inhibición de 28.67 mm de diámetro. Se encontró que 100 µL/g de aceite de ajo, 100 mg/g de sorbato de potasio y nisina 51,000 UI/g tienen actividad antimicrobiana contra <i>S. aureus</i>, <i>L. monocytogenes</i> y <i>B. cereus</i>.</p>	(Pranoto, Rakshit, & Salokhe, 2005)
23	Zeína de maíz	Nisina, ácido láurico y EDTA	<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. monocytogenes</i> • <i>S. Enteritidis</i> 	<p>EDTA (27.9 mg/mL), ácido láurico (200 mg/mL) y nisina (0.188 mg/mL) se incorporaron en películas de zeína de maíz expuestas a caldos de cultivo (10^8 UFC/mL) de las bacterias por 48 h. El número de células de <i>L. monocytogenes</i> disminuyó más de 4 logs después de 48 h de exposición.</p>	(Hoffman, Han, & Dawson, 2001)

4.7 Bacteriocinas de las bacterias lácticas

Las bacterias ácido lácticas pueden inhibir o impedir el crecimiento de bacterias patógenas o deterioradoras mediante la producción ácido láctico u otros ácidos orgánicos que provocan la acidificación del medio y, por tanto, una disminución del pH en los alimentos que perjudica a las bacterias ácido-sensibles. También pueden ejercer su acción por competición con los patógenos por el sustrato (vitaminas, minerales, elementos traza y péptidos), modificación redox o producción de otras moléculas inhibitorias, como peróxido de hidrógeno, diacetilo, acetaldehído, compuestos no proteicos de bajo peso molecular y bacteriocinas (Deshmukh & Thorat, 2013).

Las bacteriocinas son polipéptidos activos bactericidas de bajo peso molecular sintetizados en el ribosoma de las BAL. Son, en general, termoresistentes, aparentemente hipoalergénicas, inactivas frente a células eucariotas y fácilmente degradables por enzimas proteolíticas del intestino humano (Mariana Blanco Massani, Vignolo, Eisenberg, & Morando, 2013).

Algunos autores consideran que el espectro de inhibición de estas proteínas o péptidos es reducido, se caracterizan por presentar un efecto antagónico contra especies de microorganismos taxonómicamente relacionadas, ya sea patógenos y/o causantes de deterioro (Balciunas et al., 2013). Sin embargo estudios recientes han demostrado que la actividad antagónica de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas también se ha observado contra algunos microorganismos Gram-negativos (Ibarguren et al., 2015; Zacharof & Lovitt, 2012). Dentro de los géneros de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas se encuentran *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Enterococcus* (M. Blanco Massani et al., 2014).

El término “colicina” se asignó en 1925 a proteínas antibacterianas de alto peso molecular producidas por varias bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (Mills et al., 2011). Más tarde el término bacteriocina fue empleado para designar a los péptidos antimicrobianos producidos por bacterias lácticas. En 1953 la empresa inglesa Aplin & Barret en Dorset, Inglaterra lanzó al mercado un concentrado de nisina conocido como Nisaplin®. En 1969, la nisina fue valorada como segura para su uso en alimentos por la *Food and*

Agriculture Organization/World Health Organization. En 1983 fue incorporada en la lista de aditivos para alimentos de la Unión Europea (Zacharof & Lovitt, 2012) y en 1988 fue aprobada por la FDA para ser usada en quesos fundidos pasteurizados (M. Rocha et al., 2013). En el 2001, su empleo ya había sido aprobado en 40 países, incluyendo México (P. J. Espitia et al., 2013).

4.7.1 Características generales

Las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas son péptidos pequeños que contienen entre 20 y 60 aminoácidos. Son moléculas catiónicas, hidrofóbicas o anfifílicas (Ibarguren et al., 2015). 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 (Khare et al., 2014). Presentan puntos isoelectrónicos en un intervalo de pH 8.6 a 10.4.

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 períodos 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 (Deshmukh & Thorat, 2013).

Debido a su naturaleza proteica, se inactivan por proteasas incluyendo aquellas 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 (Mills et al., 2011). Con respecto al espectro de inhibición, su actividad está dirigida hacia especies Gram-positivas bajas en guanina y citosina. No obstante, pueden presentar actividad contra microorganismos Gram-negativos siempre y cuando haya sido dañada la integridad de su membrana (M. Blanco Massani et al., 2014).

4.7.2 Clasificación

Anteriormente, 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 (Ibarguren et al., 2015).

Sin embargo, recientemente Cotter, Hill, and Ross (2005), han propuesto una nueva clasificación (Tabla 5) que divide a las bacteriocinas en dos distintas 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 clasificadas dentro de la clase III y que se caracterizan por poseer un peso molecular >30 kDa 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 5. Clasificación de las bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas (BAL) según (Cotter et al., 2005).

Clasificación*	Subclase características	Observaciones	Ejemplos
Clase I Que contienen lantionina Bacteriocinas/lantibióticos	11 clases han sido propuestas	Incluye uno o dos péptidos lantibióticos	Un solo péptido: nisina, mersacidina, lacticina 481 Dos péptidos: lacticina 3147, citolisina.
Clase II	IIa: tipo pediocina IIb: dos péptidos IIc: cíclicas, formalmente clase V IId: péptidos lineales no tipo pediocina	Clase heterógena de péptidos pequeños	Clase IIa: pediocina PA, Leucocina A Clase IIb: Lactacina F Clase IIc: enterocina AS38, reuterina 6 Clase IId: lactococina A, divergicina A, Enterolisina A, Lisostafina
Bacteriolisinas Proteínas no bacteriolíticas**		Proteínas grandes y termolábiles, muchas veces hidrolasas	

*Clase IV de bacteriocinas sin fracción proteica no son incluidas porque no han sido demostradas.

**Sugiere que éstas no son generalmente consideradas como bacteriocinas.

4.7.3 *Modo 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 0.01µg/mL (M. Blanco Massani et al., 2014). Estas concentraciones pueden variar con la composición de lípidos en la membrana de la célula sensible y con el pH del medio (Mills et al., 2011). Su actividad antibacteriana se atribuye a la desestabilización de las funciones de la membrana citoplásmica (Deshmukh & Thorat, 2013).

Las bacteriocinas inhiben a otros microorganismos mediante el bloqueo de la síntesis de la pared celular o bien mediante la formación de poros en la membrana citoplasmática de células bacterianas sensibles. La formación de estos poros provoca una pérdida de iones K^+ , ATP y, en algunos casos aminoácidos y moléculas pequeñas, que a su vez originan la pérdida del potencial de membrana, consumo de las reservas energéticas celulares, disminución en la síntesis de ADN, ARN y proteínas, provocando finalmente la muerte celular (Deshmukh & Thorat, 2013; Zacharof & Lovitt, 2012).

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 transmembrana y/o el gradiente de pH. Esto afecta la permeabilidad ocasionando que moléculas pequeñas salgan del citoplasma y que el ATP no puede ser sintetizado (Figura 6) (Mills et al., 2011).

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 (Ibarguren et al., 2015). Por su parte, los péptidos 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 (Balciunas et al., 2013; Mills et al., 2011).

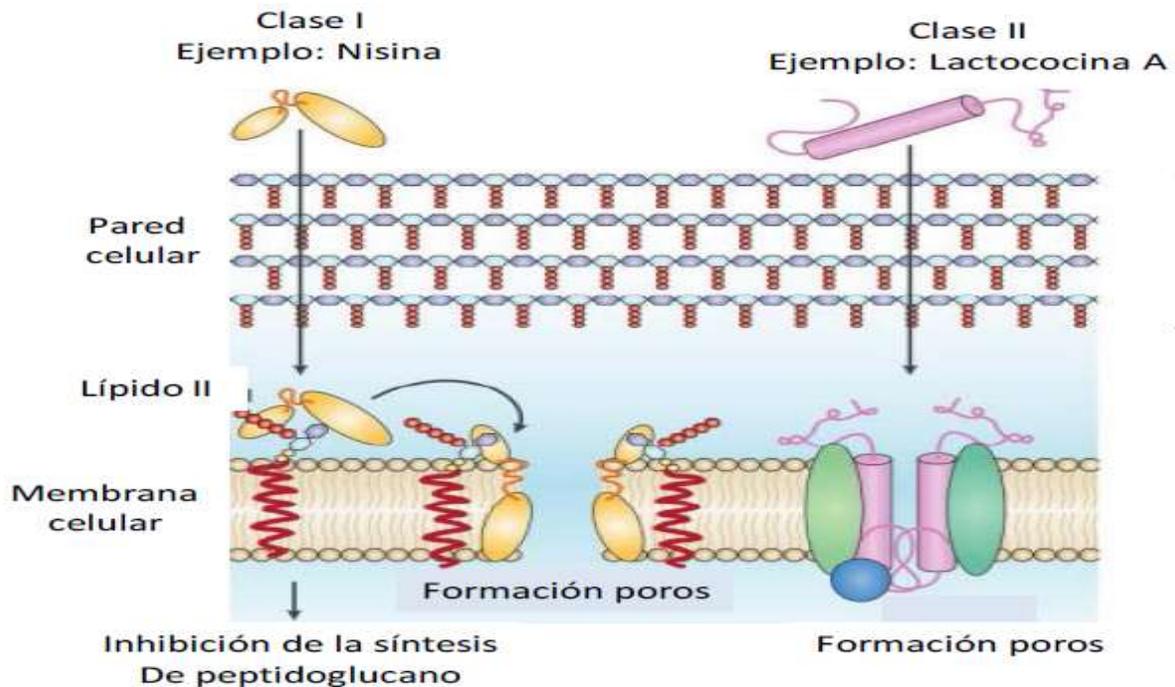


Figura 6. Mecanismo de acción de las bacteriocinas ácido láctico que consiste en la formación de poros en la membrana celular. Tomada de (Cotter et al., 2005).

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 (P. Castellano, Belfiore, Fadda, & Vignolo, 2008; La Stora et al., 2008). Asimismo, se cree que es probable que la porción hidrofóbica insertada dentro de la membrana forme poros (Nieto-Lozano, Reguera-Useros, Pelaez-Martinez Mdel, & Hardisson de la Torre, 2006).

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 (Irkin & Esmer, 2015).

4.8 Barbacoa estilo Tulancingo

El censo ovino nacional se mantuvo con pocos cambios entre las décadas de los 70 a los 90, sin embargo, en los últimos 10 años ha tenido un crecimiento sostenido, llegando en 2010 a 8.1 millones según cifras aportadas por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). La distribución geográfica del ganado ovino abarca la mayoría de los estados de la república mexicana, siendo los que en el 2010 tuvieron mayores inventarios: Estado de México (1,289,321), Hidalgo (1,055,678), Veracruz (630,348), Oaxaca (570,598), San Luis Potosí (450,657) y Puebla (441,249) (García-García, 2001; Rubio, Torres, Gutierrez, & Mendez, 2004).

El consumo de la carne de ovino en México casi en su totalidad (95%), es a través de la barbacoa (alimento típico), considerado como un platillo de lujo resultado de la cocción de la canal ovina, cubierta con pencas de maguey, en horno subterráneo o en bote de metal. La barbacoa se consume en altas cantidades durante los fines de semana en los estados del centro de México (Ciudad de México, Estado de México, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala), siendo también uno de los componentes del menú ofrecido en diversos eventos sociales.

La barbacoa de borrego, uno de los platillos más populares en México, es oriunda del estado de Hidalgo (Soto Simental, González Tenorio, Fernández Diez, Alfaro Rodríguez, & Mateo Oyagüe, 2009); su nombre está registrado desde 1518 en la Colección de Documentos Inéditos del Archivo de Indias. Existen dos principales teorías sobre el origen de la palabra barbacoa: la primera que proviene del maya Baalbak'Kaab (carne tapada con tierra) y la segunda que se origina del taíno caribeño Barabicu (carne cocinada sobre andamios de madera). Independientemente del origen de este vocablo, no hay duda que la barbacoa es un sistema de cocción por calor indirecto inventado por las culturas prehispánicas (Mexiquense, 2015).

La forma clásica de prepararla es excavar un hoyo de un metro de profundidad y con un diámetro de 60 cm, forrado hasta su tercera parte por piedras y ladrillos (Figura 7). El día anterior se prende un fuego dentro de el hasta que las piedras estén al rojo vivo, se recubren el fondo y las paredes del horno con pencas de maguey previamente asadas, se coloca en el horno una olla de un diámetro de 40 cm parcialmente llena de pulque, agua o cerveza,

garbanzos, chícharos y zanahorias picadas y una buena dosis de chile verde. Sobre este bote se coloca una rejilla que sostiene las piezas de un cordero envueltas en pencas de maguey. El estómago del cordero se rellena con las vísceras limpias, picadas y sazonadas con chiles anchos, hierbas y sal: es el “obispo” que se coloca en la parte superior. Todo se tapa con más pencas de maguey, costales mojados y una capa de tierra. Durante toda la noche, se mantiene encima un fuego de brasas. Al día siguiente, se abre el horno y se come el obispo y la carne espolvoreándole sal gruesa y acompañándola con salsa borracha. En la olla, en el fondo del horno, se ha formado un consomé delicioso y agradable al paladar de los consumidores (García-García, 2001; Natividad-Bonifacio et al., 2010; Rubio et al., 2004; Sanchez-Ortega et al., 2014).



Figura 7. Barbacoa de hoyo estilo Tulancingo.

Cabe destacar que a través de la historia de la gastronomía mexicana, la barbacoa ha formado parte fundamental de la herencia culinaria prehispánica. Es por ello que es una de las especialidades más representativas de la comida mexicana.

Esta tradición ha perdurado gracias al esfuerzo de personas que siguen preparando y promocionando éste manjar culinario que actualmente se acostumbra los fines de semana en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México. Ejemplo de ello es El Mexiquense, un restaurante comprometido con ésta tradición culinaria ancestral, al preservar la receta auténtica de tiempos prehispánicos, elaboran barbacoa de horno de manera tradicional, en un horno artesanal como los primeros pobladores mesoamericanos.

El valor social, cultural y económico de la barbacoa es tal, que en el año 2014 el gobernador del Estado de México, Eruviel Ávila dio a conocer que se construirá el Centro

de Investigación e Innovación de Alimentos y Productos Cárnicos o “La Universidad de la Barbacoa”, como él mismo la bautizó, con un inversión de más de 47 millones de pesos en el municipio de Capulhuac, en el Estado de México. También el gobernador señaló que se introducen más de 15 mil cabezas de ganado por semana en ese municipio y que se comercializan más de 45 mil toneladas de barbacoa. Con este proyecto se busca impulsar aspiraciones productivas relacionadas principalmente con la venta y distribución de barbacoa (Ramos, 2014).

Del mismo modo, brindar un buen plato de barbacoa hecha en un horno tradicional, envuelta en pencas de maguey, acompañada de un delicioso consomé, y que además sea saludable e inocua; no es fácil y menos los 365 días del año; es por eso que algunas empresas han dedicado sus esfuerzos a la comercialización de barbacoa empacada, algunas de ellas son Alimentos Naturales Rancho Viejo, S.A. de C.V en el estado de Hidalgo, Elaboración de Alimentos Nacionales, S.A. de C.V. y ALIMENTOS AD HOC, S.A. DE C.V. en Monterrey, SIERRA GRANDE ALIMENTOS, S.A. DE C.V. en Sonora por mencionar algunas.

La empresa Alimentos Naturales Rancho Viejo, ha reportado que de un borrego de 40 kilos permite envasar únicamente nueve, es decir, que se aprovecha menos del 25% y el 75% restante se desecha, razón por la que el costo de la barbacoa es alto ("EU pronto comerá barbacoa y cochinita mexicanas," 2016). Es de ahí que la barbacoa sea considerada como un alimento de lujo en la cocina mexicana, además de su peculiar y delicioso sabor.

Estas empresas no solo se han enfocada en la comercialización y distribución de la barbacoa dentro del país, sino que también se han interesado en dar a conocer el producto en otras partes del mundo. Actualmente la barbacoa empacada es exportada a países como Costa Rica y Panamá, pero se está trabajando para que pueda llegar a otros lugares del mundo, uno de los objetivos principales es el mercado estadounidense, esto aunado a la importante población hispana que se encuentra en ese país.

Para poder comercializar y exportar la barbacoa es importante innovar en tecnologías de conservación y empaquetado, con el fin de proporcionar un producto de buena calidad, seguro e inocuo que pueda traspasar fronteras sin problemas, cumpliendo con las más altas normas y expectativas de calidad. Es por eso que en este trabajo de investigación se propone la formulación de una película bioactiva a base de gelatina-pectina con la inclusión de un

concentrado con actividad antimicrobiana producido por la fermentación de la bacteria ácido láctica *Streptococcus infantarius* y EDTA con el propósito de exponer una opción innovadora y amigable con el ambiente para la bioconservación de la barbacoa estilo Tulancingo.

En la Tabla 6 se muestran algunos de los estudios más recientes donde se han elaborado películas activas a base de polímeros sintéticos o biopoliméricos con la inclusión de diferentes agentes antimicrobianos con el fin de inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos y/o causantes de deterioro que afectan la calidad y seguridad de alimentos cárnicos ya sean frescos o procesados.

La inocuidad de la barbacoa se ha visto afectada por microorganismos patógenos como lo es *Clostridium perfringens* según lo reportado por Natividad-Bonifacio et al. (2010), ya que ellos realizaron un estudio donde evaluaron la relevancia de *Clostridium perfringens* como agente etiológico de las enfermedades transmitidas por los alimentos. De las 650 muestras analizadas, 106 (16.3 %) fueron positivas para *Clostridium perfringens*; 6.4 % (16/250) aislamientos eran de barbacoa, 19 % (38/200) tacos de cabeza y el 13 % (45/200) de tacos de pansa. Estos resultados demuestran la importancia de enfermedades transmitidas por alimentos populares y el gran riesgo sanitario implicado en su consumo.

Es por eso que se buscan empaques con actividad antimicrobiana que puedan asegurar la seguridad y calidad de un alimento por más tiempo. En este trabajo de investigación la película bioactiva formulada fue evaluada contra tres microorganismos patógenos que afectan a los alimentos cárnicos frescos y procesados, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* bacterias que pueden poner en riesgo la salud del consumidor provocando enfermedades gastrointestinales severas e incluso la muerte.

Es importante mencionar que no se ha reportado ningún estudio donde hayan formulado películas activas aplicadas en la barbacoa estilo Tulancingo con el fin de proporcionar un alimento inocuo al consumidor. Es de ahí que surge la relevancia de este trabajo, ya que según la literatura revisada, no existe un empaque activo que pueda prolongar la vida de anaquel de la barbacoa estilo Tulancingo dándole un valor agregado a este platillo que tiene una alta demanda en el mercado nacional y que se puede dar a conocer en otras partes del mundo.

Tabla 6. Películas con antimicrobianos elaborados a partir de polímeros y su aplicación en la conservación de alimentos cárnicos.

No.	Biopolímero	Agente antimicrobiano	Microorganismo al que inhibe	Alimento	Resultados relevantes	Referencia
1	Poliétileno de baja densidad	Nisina, quitosano, sorbato de potasio y plata-zeolita	<ul style="list-style-type: none"> • Bacterias aerobias mesófilas • Coliformes totales • Mohos y levaduras 	Muslos de pollo	Bolsas de múltiples capas activas (LDPE/poliamida/LDPE que contenían 2 % del agente antimicrobiano) fueron utilizadas para empacar muslos de pollo a bajo vacío. Los tratamientos se almacenaron a 5 °C durante 6 días. Recuentos de bacterias aerobias mesófilas muestras envasadas en bolsas que contienen quitosano, nisina, AgZeo y sorbato de potasio fueron 1.03, 0.98, 0.51, y 0.17 log respectivamente, inferiores a los de las muestras envasadas en bolsas control.	(Soysal et al., 2015)
2	Pululano	Arginato láurico y nisina Z	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Salmonella Typhimurium</i> • <i>Salmonella Enteritidis</i> • <i>Listeria monocytogenes</i> • <i>Staphylococcus aureus</i> • <i>Escherichia coli</i> O157:H7, O111, y O26 	Pechuga cruda de pavo, jamón deli, rodajas de carne de res fresca	Las muestras fueron inoculadas con 5 log ₁₀ UFC/cm ² y se envolvieron con la película de pululano que contenía arginato láurico al 2 % (p/v de la solución de la película) y/o nisina Z (320 UA/mL de la solución de película), se transfirieron envueltos en una bolsa estándar para vacío y se sellaron. Las muestras selladas al vacío se mantuvieron a 4 °C por 28 días. Película que contenía una combinación de arginato láurico con nisina Z redujo el inóculo de <i>L.monocytogenes</i> y <i>S. aureus</i> sobre superficies de jamón en aprox. 5.53 y	(Pattanayaiying, A, & Cutter, 2015)

					5.62 log ₁₀ UFC/cm ² respectivamente, durante el almacenamiento refrigerado. <i>E. coli</i> O157: H7, O111 y O26 también se redujeron mediante >4 log ₁₀ UFC/cm ² en rodajas de carne fresca después del tratamiento con la película de combinación y el almacenamiento refrigerado.	
3	Poliétileno de baja densidad	Aceite de ajo	<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. monocytogenes</i> • <i>E. coli</i> • <i>Brochothrix thermosphacta</i> 	Pan de carne de vaca listo para consumir	A la película se añadió aceite de ajo (2, 4, 6 u 8 % p/p). El inóculo bacteriano fue de aprox. 10 ⁵ UFC/g. Las muestras se almacenaron a 4 °C durante 15 días. Independientemente de la cantidad de aceite de ajo, el plástico antimicrobiano fue capaz de reducir el número de <i>L. monocytogenes</i> en panes de carnes después de 3, 6, 9 y 15 días de almacenamiento a 4 °C. Película con 8 % p/p de aceite de ajo tuvo un recuento de 1.98 log UFC/g inferior a la película control (aprox. 9 log UFC/g) a los 6 días de almacenamiento.	(Sung et al., 2014)
4	Poli (ácido láctico) y nanocristales de celulosa	Nisina	<ul style="list-style-type: none"> • <i>L.monocytogenes</i> 	Rebanadas de jamón cocido	Análisis microbiológico de jamón cocido en rodajas inoculado con <i>L. monocytogenes</i> (10 ⁴ UFC/g), cada rebanada se colocó entre dos películas, a continuación se sellaron al vacío. Las muestras se almacenaron 14 días a 4 °C. La película bioactiva mostró una reducción significativa en el jamón desde el día 1 y una inhibición total desde el día 3.	(Salmieri et al., 2014)

5	Celulosa	Nisina lactato de sodio, diacetato de sodio, sorbato de potasio y benzoato sodio	<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. monocytogenes</i> 	Salmón ahumado en frío	Las muestras fueron inoculadas con una dilución 10^8 UFC/mL del cóctel de cinco cepas de <i>L. monocytogenes</i> para lograr una concentración final de 10^5 UFC/cm ² de superficie de salmón. Los tratamientos que incorporan nisina (25000 UI/mL) en combinación con sorbato de potasio (0.3 %) y benzoato de sodio (0.1 %) tenían la más alta efectividad inhibitoria, la reducción de la población de <i>L. monocytogenes</i> fue un máximo de 3.3 log UFC/cm ² con respecto a las muestras control a los 10 días de almacenamiento a 21 °C.	(Neetoo & Mahomoodally, 2014)
6	Carboximetilcelulosa y polivinil alcohol	Aceite de clavo	<ul style="list-style-type: none"> • <i>S.aureus</i> • <i>Bacillus cereus</i> 	Carne molida de pollo	El aceite de clavo se añadió en una concentración de 1, 2 y 3 %. Las muestras se almacenaron a 4 °C durante 16 días. Los recuentos iniciales de <i>S. aureus</i> en la muestra control eran de 3.37 log UFC/g y luego aumentó hasta 6.07 log UFC/g durante el almacenamiento refrigerado. La película activa con 3 % de aceite de clavo logró reducir hasta 1 ciclo log. En el día 7 se observó la eliminación completa del cultivo de <i>S. aureus</i> .	(Muppalla et al., 2014)
7	Quitosano	Éster de arginato láurico y nisina	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Listeria innocua</i> 	Carne de pavo listas para comer	La densidad celular inoculada en la superficie de la muestra era de aprox. 6-7 log UFC/cm ² . Las muestras se empacaron al vacío y se colocaron a 10 °C durante 24 h antes del análisis microbiológico. Películas con 1.94	(Guo et al., 2014)

					mg/cm ² de quitosano y 0.388 mg/cm ² de éster de arginato láurico redujeron 4.5 log UFC/cm ² . Películas con nisina (486 UI/cm ²) mostraron una menor eficacia antimicrobiana en comparación con el éster de arginato láurico.	
8	Gluten de trigo	Bacteriocinas lactocina 705 y lactocina AL705 que produce <i>Lactobacillus curvatus</i> CRL 705	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Lactobacillus plantarum</i> CRL691 • <i>L. innocua</i> 7 	Salchichas de Frankfurt (carne de res y cerdo)	Bacteriocinas CRL705 (1 mg/cm ³ , 267 UA/cm ³ y 2133 UA/cm ³ para lactocina 705 y lactocina AL705, respectivamente). Las salchichas se inocularon con una concentración de 10 ⁴ UFC/g y se almacenaron a 5 °C durante 45 días. EL tratamiento control alcanzó 10 ⁶ -10 ⁷ UFC/g al final del período de almacenamiento, el tratamiento activo inhibió con eficacia (reducción de 2.5 ciclos log en el día 45) para <i>L. innocua</i> .	(M. Blanco Massani et al., 2014)
9	Polietileno de polivinil glicol	Extracto de mostaza	<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. monocytogenes</i> 	Salchicha de bolonia	Se empaquetó bolonia en rodajas inoculada por inmersión con 4 log UFC/g de <i>L. monocytogenes</i> , se colocó el empaque elaborado, se envasaron al vacío y se almacenaron a 4 °C. El patógeno se hizo indetectable en bolonia empacada con el extracto de mostaza oriental de los 52 a 70 días de almacenamiento.	(Lara-Lledo, Olaimat, & Holley, 2012)
10	Acetato de celulosa	Aceite esencial de romero basa (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	<ul style="list-style-type: none"> • Coliformes totales • Psicrótrofos • Coliformes termotolerantes • <i>Salmonella</i> 	Pechuga de pollo	Se incorporaron dos concentraciones de aceite de romero, 20 y 50 % v/p a la película, misma que se puso en contacto con los cortes de pechuga de pollo durante 6 días almacenadas a 2 ± 2°C. El inóculo inicial fue de entre	(Adriane Alexandre Machado de Melo, 2012)

			<ul style="list-style-type: none"> • Coagulasa positiva <i>Staphylococcus</i> 		<p>10⁴-10⁵ UFC/g. Las películas que contenían 20 % de aceite esencial no demostraron efectos significativos en comparación con el control. Las películas incorporadas con el 50 % de aceite esencial demostraron una eficacia hacia el control de coliformes durante el almacenamiento de las muestras.</p>	
11	Almidón y alginato	Dos cepas de bacterias ácido lácticas y nisina	<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. monocytogenes</i> 	Salmón ahumado	<p>Película de alginato que contenía dos cepas de BAL y nisina (100 UI/mL). Pedazos de salmón (4.0×4.0 cm²) inoculados con <i>L. monocytogenes</i> a una concentración final de 10⁴ UFC/cm² se cubrieron con la película y se almacenaron a 4 °C. La película bioactiva tuvo un efecto bacteriostático sobre el patógeno durante un período de 28 días.</p>	(Concha-Meyer et al., 2011)
12	Bolsas de polietileno de baja densidad y poliamida	EDTA, lisozima, aceite de romero y orégano	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pseudomonas</i> spp. • <i>Brochothrix thermosphacta</i> 	Pollo cocido	<p>Filetes de pollo cocido envasados al vacío se almacenaron a 4 °C durante un período de 18 días. Los tratamientos con solución de EDTA (1.5 % p/p), lisozima (1.5 % p/p) y aceite de orégano o romero (0.20 % v/p) fueron los más efectivos contra el crecimiento bacteriano. Lograron extender la vida de anaquel de 7-8 días en comparación con la muestra control.</p>	(Ntzimani et al., 2010)

13	Gelatina-quitosano	Aceite de clavo de olor	<ul style="list-style-type: none"> • <i>P. fluorescens</i> • <i>L. innocua</i> • <i>E. coli</i> • <i>L. acidophilus</i> 	Extracto a base de pescado	<p>El aceite de clavo se incorporó en una proporción de 0.75 ml/g biopolímero (gelatina sola o gelatina con quitosano). Se cortaron filetes de bacalao y se cubrieron con la película que contenía gelatina, quitosano y aceite esencial de clavo de olor, en bolsas se envasaron al vacío. Los lotes se almacenaron a 2±1 °C durante 11 días. Inicialmente el recuento de bacterias viables fue de 6.1 log UFC/g. La película bioactiva logró reducir o inhibir el crecimiento de los microorganismos estudiados.</p>	(Gomez-Estaca, Lopez de Lacey, Lopez-Caballero, Gomez-Guillen, & Montero, 2010)
14	Caseinato de sodio	Células de <i>Lactobacillus sakei</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. monocytogenes</i> Scott A 	Carne fresca de vacuno	<p>Incorporación de células de <i>L. sakei</i> en la película preformada, en unadensidad de población de 10⁶ UFC/cm². Se inocularon cortes de carne fresca (4×5×1 cm) con 10² UFC/cm², películas del mismo tamaño se colocaron en la superficie del producto y se almacenaron a 5 y 15 °C. En las muestras sin película el nivel inicial fue de 3.1 logs UFC/cm² y aumentó a un nivel máximo de 5.8-6.0 logs UFC/cm² después de 6-9 días de almacenamiento. En la carne de vacuno en contacto con la película el conteo inicial fue de 6 logs UFC/cm² debido a la presencia de <i>L. sakei</i> y aumentó a 7 logs UFC/cm² durante el almacenamiento. La última diferencia dieron como resultado una inhibición significativa del crecimiento de <i>L.</i></p>	(Gialamas, Zinoviadou, Biliaderis, & Koutsoumanis, 2010)

					<p><i>monocytogenes</i> de 2 ciclos log en comparación con el control al final del período de almacenamiento. Las fluctuaciones de temperatura de 4 a 14 °C dio lugar a un crecimiento significativo del patógeno en muestras control de 4.0 a 6.4 logs UFC/cm², mientras que para las muestras con las películas del total el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> fue de 1.5-2.0 ciclos log más baja al final del período de almacenamiento.</p>	
15	Bolsa de plástico	Nisina, una solución de HCl y EDTA	<ul style="list-style-type: none"> • Carnobacteria • Bacterias ácido lácticas • <i>B. thermosphacta</i> 	Carne de bovino (chuletas)	<p>Nisina muestra una actividad de 12800 unidades arbitrarias UA/mL frente a <i>B. thermosphacta</i>. Muestras almacenadas a 1 °C. Desarrollo de <i>B. thermosphacta</i> fue inhibido durante al menos 11 días de almacenamiento. Una reducción de 1-3 ciclos log para enterobacterias también fue registrada entre los 22 y 32 días de almacenamiento.</p>	(Ercolini et al., 2010)
16	Proteína de soya	Aceites esenciales de tomillo y orégano	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli O157: H7</i> • <i>S. aureus</i> • <i>P. aeruginosa</i> • <i>L. plantarum</i> 	Carne molida de res fresca	<p>Concentraciones evaluada de los aceites esenciales 5 %. Muestras almacenadas a 4 °C durante 12 días. <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> se inhibió significativamente por la película antimicrobiana. <i>L. plantarum</i> y <i>P. aeruginosa</i> fueron las bacterias más resistentes.</p>	(Emiroglu, Yemis, Coskun, & Candogan, 2010)

17	Bolsas de polietileno de baja densidad y poliamida	Nisina y EDTA	<ul style="list-style-type: none"> • Bacterias mesófilas • <i>Pseudomonas</i> sp. • <i>B. thermosphacta</i> • Bacterias ácido lácticas • <i>Enterobacteriaceae</i> 	Carne de pollo fresca	Concentraciones evaluadas de nisina (500 y 1500 UI/g) y EDTA (10 y 50 mM). Muestras almacenadas a 4 °C durante 24 días. El pollo se conserva mejor a tratamientos (Nisina 500 UI/g – EDTA 50 mM) y (Nisina 1500 UI/g – EDTA 50 mM), mantuvieron los atributos de olor aceptables incluso hasta 20 y 24 días de almacenamiento.	(Economou, Pournis, Ntzimani, & Savvaidis, 2009)
18	Celulosa	Pediocina (ALTA® 2351)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. innocua</i> • <i>Salmonella</i> sp. 	Jamón rebanado	Las películas antimicrobianas se incorporaron con pediocina (25 y 50 %) en un aemulsión a base de celulosa. Rodajas de jamón se sumergieron en una solución que contiene 10 ⁶ UFC/mL de las bacterias. Ñas muestras se empacaron al vacío y se almacenaron a 12 °C. Pediocina al 50 % presenta una reducción de 2 ciclos log en comparación con el tratamiento control después de 15 días de almacenamiento par <i>L. innocua</i> . Los 25 y 50 % tuvieron un rendimiento similar en <i>Salmonella</i> sp. Presentando una reducción de 0.5 ciclos log en relación al control después de 12 días de almacenamiento.	(Santiago-Silva et al., 2009)
19	Celulosa	Nisina	<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. monocytgenes</i> • Bacterias aeróbicas totales 	Salchichas	Las salchichas de Frankfurt se sumergieron en solución salina que contenía 10 ⁶ UFC/mL, las muestras se sellaron al vacío y se almacenaron a 4 °C durante 14 días. Las películas producidas usando concentración de nisina (2500 UI/mL) dio como	(Nguyen, Gidley, & Dykes, 2008)

					<p>resultado una disminución de la cuenta de <i>L. monocytogenes</i> en salchichas de 2 log UFC/g después de 14 días de almacenamiento en comparación con el control. Los niveles de bacterias aeróbicas totales de redujeron 3.3 log UFC/g después de 14 días de almacenamiento en comparación con muestras control.</p>	
20	Alginato	<p>Enterocina A y B de <i>Enterococcus faecium</i> CTC492</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. monocytogenes</i> 	Jamón cocido	<p>La concentración usada de enterocinas fue de 2000 UA/mL. Jamón cocido se inoculó con 10⁴ UFC/g de <i>L. monocytogenes</i>. Las muestras se almacenaron a 1 y 6 °C durante 2 meses. El comportamiento de la bacteria a 6 °C se estudió adicionalmente hasta el día 90. Envase antimicrobiano y procesamiento de alta presión fue necesario para conseguir una reducción de los niveles inoculados durante 60 días de almacenamiento además de que resulta en niveles por debajo del límite de detección para el día 90. El embalaje antimicrobiano y el almacenamiento a 1 °C ejerce un efecto bacteriostático durante 60 días. Todos los lotes almacenados llevaron a recuentos <100 UFC/g en el día 60.</p>	(Marcos, Aymerich, Monfort, & Garriga, 2008)
21	Aislado de proteína de suero de leche	<p>Nisina, extracto de semilla de uva, ácido málico y EDTA</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. monocytogenes</i> • <i>E. coli</i> O157:H7 • <i>S. typhimurium</i> 	Salchichas de pavo	<p>Las salchichas se inocularon en la superficie con aprox. 10⁶ UFC/g de los patógenos. Las muestras se almacenaron a 4 °C durante 28 días. La población de <i>L. monocytogenes</i></p>	(Gadang et al., 2008)

					(5.5 log/g) se redujo a 2.3 log/g después de 28 días a 4 °C en las muestras que contenían nisina (6000 UI/g) en combinación con extracto de semilla de uva (0.5 %) y ácido málico (1.0 %). La población de <i>S. typhimurium</i> (6.0 log/g) se redujo aprox. 1 ciclo log después de 28 días a 4 °C en las muestras que contenían los 4 agentes antimicrobianos. La población de <i>E. coli</i> (6.15 log/g) se redujo en 4.6 ciclos log después de 28 días de almacenamiento con la película que contenía ácido málico, nisina y EDTA (1.6 mg/mL).	
22	Quitosano	Ácido acético o ácido láctico	<ul style="list-style-type: none"> <i>L. monocytogenes</i> 	Carne asada de res lista para consumir	<p><i>L. monocytogenes</i> se diluyó decimalmente para dar una inoculación inicial de >6.50 log UFC/g que se inocularon sobre la superficie de carne de res asada. Las concentraciones probadas de ácido acético o láctico fueron de 0.5 o 1 % p/v. Las muestras se refrigeraron a 4 °C. Una concentración inicial de 6.50 log UFC/g de <i>L. monocytogenes</i> aumento >10 log UFC/g para el día 28. En el día 14 los recuentos fueron significativamente diferentes para todas las muestras recubiertas con la película de quitosano en comparación con el control 2-3 log UFC/g y así permaneció hasta el día 28. Los resultados demostraron que la película de quitosano con ácido acético fue la</p>	(Beverly, Janes, Prinyawiwatkul, & No, 2008)

					más efectiva en la reducción de los recuentos de <i>L. monocytogenes</i> .	
23	Alginato	Nisina	• <i>S. aureus</i>	Rodajas de carne de ternera	Rodajas de carne se inocularon con <i>S. aureus</i> a un nivel de 10^4 UFC/g. A continuación se revistieron con la película a base que alginato que contenía nisina (0, 500 o 1000 UI/mL). Las muestras se se almacenaron a 4 °C. Los resultados demostraron que después de 7 días, hubo una reducción de 0.91 y 1.86 log UFC/cm ² para la carne cubierta con la película que contenía 500 o 1000 UI/mL de nisina, respectivamente.	(Millette, Le Tien, Smoragiewicz, & Lacroix, 2007)

5 JUSTIFICACIÓN

El crecimiento de microorganismos es una de las principales causas

de deterioro en los alimentos lo cual afecta económicamente a la industria de los alimentos y a la salud de los consumidores. El desarrollo microbiano se inicia generalmente en la superficie de los productos, afectando sus propiedades sensoriales y nutricionales, además de poner en riesgo la salud humana. La contaminación de alimentos por microorganismos como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus*, se ha convertido en una preocupación dentro de la industria alimentaria debido a que pueden estar presentes tanto en carne fresca, como en productos cárnicos, vegetales y en productos alimenticios mínimamente procesados, y además están asociados con enfermedades gastrointestinales severas (Ibarguren et al., 2015; M.P. Castro, 2015).

El interés en el desarrollo y uso de películas comestibles a base de biopolímeros naturales para prolongar la vida de anaquel y mejorar la calidad de los productos cárnicos, ha venido creciendo debido a la necesidad de reducir y sustituir el empleo de plásticos y envases sintéticos de baja degradabilidad, por materiales amigables con el medio ambiente, aunado a la demanda de alimentos mínimamente procesados de calidad, inocuos y con mayor vida de anaquel (M. Rocha et al., 2013).

Por tal razón, las películas comestibles pueden resultar en una forma innovadora y efectiva de proteger los alimentos, esto aunado a la creciente demanda de los consumidores por productos libres de conservadores sintéticos, pero a la vez con altas expectativas en cuanto a su conservación, calidad e inocuidad, la industria continúa la búsqueda de agentes antimicrobianos naturales, entre los que destacan: aceites esenciales (mentol, eugenol, fenoles, mentona, borneol, tirpineno, pineno, etc.), enzimas (peroxidasa y lisozima) y bacteriocinas (nisina, pediocina, enterocina, latococina, etc.) (Doulgeraki, Ercolini, Villani, & Nychas, 2012; Fernández-Pan et al., 2014; Realini & Marcos, 2014).

Son pocos los estudios en cuanto a películas comestibles bioactivas elaboradas a partir de la mezcla de biopolímeros gelana-pectina, de aquí la necesidad de contribuir con más información sobre el comportamiento y las características de dichos empaques.

No hay reportes en donde se analice de manera conjunta el efecto en las propiedades mecánicas y en la permeabilidad al oxígeno y vapor de agua; así como el efecto antimicrobiano al incorporar un concentrado con actividad antimicrobiana producido por *Streptococcus infantarius* y EDTA contra tres microorganismos patógenos: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus*.

Del mismo modo, esta actividad antimicrobiana no ha sido evaluada en medios controlados representando ser un alimento sólido (medios a base de Barbacoa estilo Tulancingo), que pueda servir como plataforma para evaluar otros alimentos cárnicos. De ahí que el estudio de dichos factores sea fundamental para establecer aplicaciones futuras en alimentos.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Diseñar y caracterizar películas elaboradas a base de gelana-pectina adicionadas con bacteriocinas y EDTA, con actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en medios a base de Barbacoa estilo Tulancingo.

6.2 Objetivos Específicos

- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria del concentrado con actividad antimicrobiana producido por *Streptococcus infantarius* bacteria aislada del pozol y EDTA contra tres microorganismos patógenos *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.
- Determinar la actividad antimicrobiana del empaque funcional elaborado, contra tres microorganismos patógenos *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.
- Determinar las propiedades mecánicas y de transferencia de masa del empaque funcional elaborado, a través de pruebas de tensión uniaxial y de permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno.

7 Hipótesis

Es posible obtener una película bioactiva a base de gelana-pectina, con actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* debida a la inclusión de un concentrado con actividad antimicrobiana producido por la bacteria ácido-láctica *Streptococcus infantarius* y EDTA. La inclusión de estos agentes antimicrobianos no afectará significativamente las propiedades de barrera ni las propiedades mecánicas de la película formada, la cual pueda ser una alternativa de conservación para la Barbacoa estilo Tulancingo (platillo típico y tradicional del estado de Hidalgo).

8 MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Materiales

8.1.1 Medios de cultivo

Para la preparación de viales de conservación y activación de microorganismos se usó caldo De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (BD Dibico México®) para la bacteria ácido-láctica, y caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) (Bioxon México®) para *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Para las pruebas de actividad antimicrobiana, "difusión en agar por gota", se utilizó BHI-agar suave formulado con una mezcla de 1.5% p/v caldo BHI y 1% p/v bacto-agar (BD™ DIFCO, Francia). Para determinar la concentración mínima inhibitoria para los microorganismos patógenos se usó caldo BHI (Bioxon México®). En las pruebas de crecimiento selectivo y diferencial de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, así como en la prueba de actividad antimicrobiana de las películas se utilizó medio Oxford (BD Dibico México®), Agar MacConkey (Sigma-Aldrich), Baird Parker (BD Dibico México®). Para preparar el medio a base de Barbacoa estitlo Tulancingo, se molieron 44.84 g de Barbacoa adquirida en el mercado municipal de Tulancingo de Bravo, Hidalgo; el alimento procesado se mezcló con 1 L de agua destilada, a los cuales se le agregó 15 g de bacto-agar (BD™ DIFCO, Francia), la mezcla se mantuvo en agitación constante y calentamiento hasta que llegó al punto de ebullición y se sometió a esterilización durante 2 h.

8.1.2 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).

8.1.3 *Agentes antimicrobianos*

El agente antimicrobiano empleado en esta investigación fue un Concentrado con Actividad Antimicrobiana (CAM) obtenido de fermentaciones de la bacteria ácido láctica (BAL) *Streptococcus infantarius*, aislada del pozol y donada por el grupo de investigación de la Dra. María del Carmen Wachter Rodarte de la facultad de Química de la UNAM. Y el agente quelante ácido etilendiaminotetraacético, sal disódica dihidrato $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$ (Sigma-Aldrich, Lote # SLBM9213V; EDTA).

8.1.4 *Microorganismos*

- *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 la Dra. María del Carmen Wachter Rodarte, Depto. Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. La bacteria se conservó a $-80^{\circ}C$ en viales de 1.5 mL, los cuales contenían 0.3 mL de glicerol y 1.3 de la cepa crecida en caldo MRS.

- *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

Estos microorganismos patógenos fueron donados por la Dra. Gloria Díaz Ruiz del Cepario, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Se conservaron a $-80^{\circ}C$, en viales de 1.5 mL, los cuales contenían 0.3 mL de glicerol y 1.3 mL de la cepa crecida en caldo BHI.

8.2 Métodos

8.2.1 Producción del Concentrado con Actividad Antimicrobiana (CAM) por *Streptococcus infantarius*

8.2.1.1 Fermentación nivel matraz

Se realizaron tres fermentaciones a nivel matraz, para ello se activaron en 5 mL de caldo MRS estéril, 50 μ L de un vial de conservación de *Streptococcus infantarius*. El cultivo se incubó (Sheldon, GI6) a 30 °C durante 24 h, posteriormente 250 mL de caldo MRS estéril se inocularon (1% v/v) con el cultivo activado de *Streptococcus infantarius*, el cual se incubó a 30 °C, 130 rpm, durante 6, 12 y 24 h en una incubadora con agitación orbital (Lab. Companion, SI-600R). El tiempo de incubación se seleccionó con base a los estudios de producción del compuesto antimicrobiano realizados previamente por López-Ortega (2014).

Concluidas las fermentaciones, se separó la biomasa del caldo de cultivo a través de centrifugación (Hermle, Z323K; 6000 rpm, 30 min a 4 °C). El sobrenadante se recuperó y su pH se ajustó a 6.5 con una solución de NaOH 5 N; en seguida se concentró en un rotavapor con controlador de vacío (BUCHI, R-215; 60 °C a 35 rpm; 72 mbar), el factor de concentración fue 2.58, es decir, por cada 80 mL de sobrenadante se eliminaron por evaporación 49 mL de agua. Para inactivar la acción de proteasas, el concentrado se sometió a un tratamiento térmico, 110 °C durante 10 min. Una vez frío, el concentrado antimicrobiano se colocó en tubos Corning® estériles y se almacenó en un refrigerador (Torrey) a 4 °C (Figura 8).

Una vez obtenidos los tres concentrados a las diferentes horas de fermentación (6, 12 y 24 h) se evaluó su actividad anti-listerial mediante la prueba de difusión en agar por gota donde se determinó cual era el concentrado con mayor actividad, el cual se llevaría a una fermentación por lote a nivel biorreactor para ser utilizado durante todo el proceso de experimentación de este trabajo de investigación.



Figura 8. Algunas de las etapas para la producción del CAM por *Streptococcus infantarius*. A) Fermentación a nivel matraz. B) Incubación con agitación orbital. C) Separación de biomasa mediante centrifugación. D) Concentración en rotavapor con controlador de vacío.

8.2.1.2 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) en un biorreactor tanque enchaquetado de 3 L (Applikon Biotechnology) (Figura 9) y el proceso de fermentación fue realizado con las siguientes condiciones de operación (López Ortega, 2014): volumen de operación 2.4 L de Medio MRS, 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 9. Fotografía de biorreactor tanque encaquetado de 3L (Applikon Biotechnology).

8.2.2 *Determinación de la actividad antimicrobiana del Concentrado con Actividad Antimicrobiana producido por Streptococcus infantarius, prueba de difusión en agar por gota (método de la dilución crítica)*

La actividad antimicrobiana se determinó mediante de técnica de difusión en agar (Nuñez, 1996). Se inició la prueba con la activación de *Listeria monocytogenes*, inoculando 50 μ L 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 μ L de este caldo para inocular 5 mL de caldo BHI estéril e incubar por 6 h a 35°C (ésto resulta en un cultivo de *Listeria monocytogenes* en fase log, con una concentración de 8.5×10^8 UFC/mL).

Luego, 58 μ L de este último caldo de fermentación fueron inoculados en 10 mL de agar fundido BHI ($37 \pm 2^\circ\text{C}$) el cual posteriormente fue vertido en caja Petri estéril (Interlux, poliestireno estériles de 90×15 mm); una vez solidificado el agar inoculado con *Listeria monocytogenes* se realizó la prueba de difusión en agar por gota, como se indica en el siguiente párrafo (Figura 10). Posteriormente las cajas fueron incubadas a 35°C durante 24 h; transcurrido el tiempo de incubación se midieron los halos de inhibición usando un vernier Fowler. Ésto se realizó por duplicado para cada muestra tomada durante las fermentaciones.

Se realizaron diluciones base 2, usando nueve microtubos estériles Eppendorf® de 2 mL, de los cuales a ocho se les agregaron 500 μL de agua estéril; al primer tubo se le colocó 1000 μL de caldo concentrado (dilución 2^0), después fueron tomados 500 μL de concentrado y se colocaron en el segundo tubo (que contenía agua estéril), homogenizando posteriormente y obteniendo así una dilución 2^1 de concentrado. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas, siguiendo el paso anterior diluyendo el concentrado hasta 2^8 .

Luego, se depositaron 10 μL de cada dilución sobre el agar suave BHI solidificado, en la periferia, en sentido contrario a las manecillas del reloj y depositando el concentrado (2^0) en el centro. Las gotas se dejaron en reposo en una campana de flujo laminar durante 40 min para posteriormente incubar la caja a 35°C durante 24 h. La actividad antimicrobiana se reportó en Unidades Arbitrarias (UA) por mL. Se consideró una actividad unitaria, en UA, en la máxima dilución en la cual se obtiene un halo claro de inhibición de *Listeria monocytogenes* (Mendoza Mendoza, 2012; Nuñez, 1996).

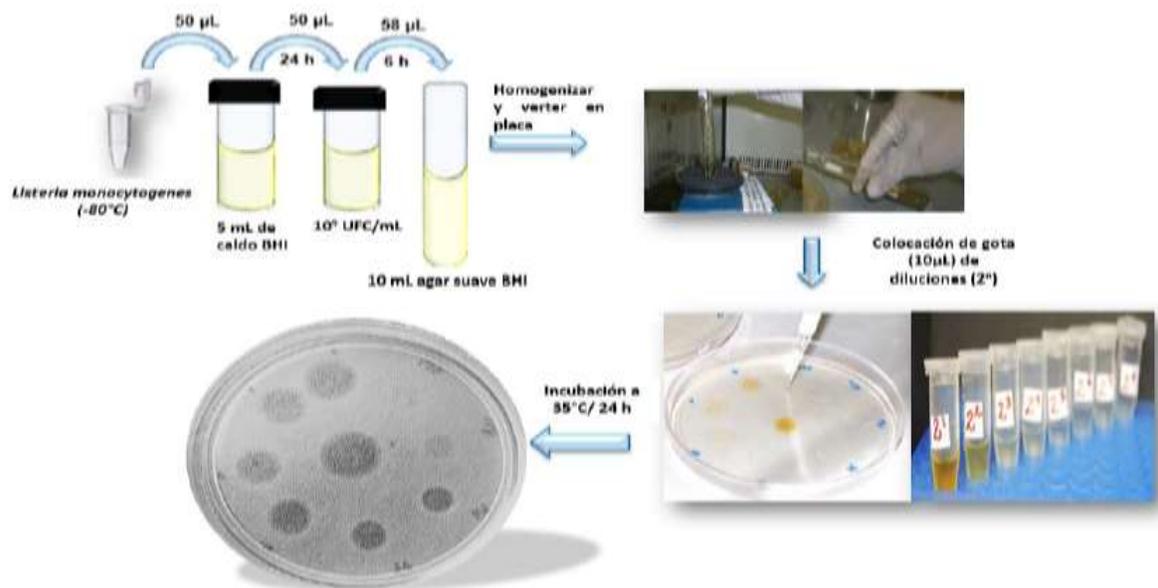


Figura 10. Procedimiento para la realización de la prueba de difusión en agar por gota (método de la dilución crítica). Tomado de (Mendoza Mendoza, 2012).

Para determinar las UA del agente antimicrobiano (CAM) se consideró el recíproco a la máxima dilución a la cual se obtiene una zona clara de inhibición del microorganismo indicador (Nuñez, 1996).

8.2.3 *Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)*

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 de 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 (CMI) 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 (Wiegand, Hilpert, & Hancock, 2008).

- Medio de cultivo

Se utilizó el medio BHI para el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

- Inóculo

Fueron estudiadas por separado las cepas de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* con 24 h de incubación. De cada uno de los microorganismos, se preparó una suspensión y se ajustó para obtener una concentración de 4.3×10^4 , 4.6×10^4 y 7.2×10^4 UFC/pozo (volumen de trabajo por pozo=220 μ L), respectivamente.

- Técnica empleada y lectura

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) (Corning® Costar®, placas de cultivo celular de 96 pocillos de fondo plano; Figura 11). Se elaboró un esquema de inoculación, para cada una de las cepas de estudio (Tabla 7).

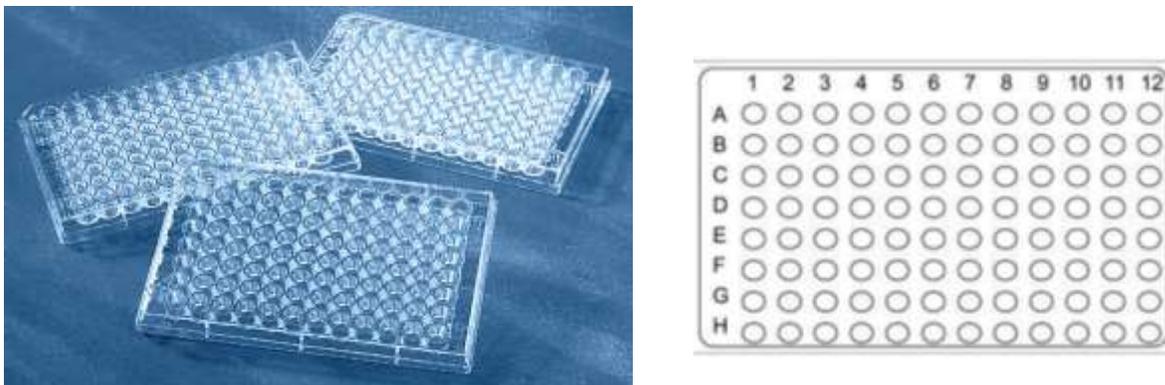


Figura 11. Placas de Elisa utilizadas para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria.

Del pozo A1 al A3 se colocaron 220 μL del medio de cultivo estéril y quedó como control negativo de esterilidad del caldo BHI. Del pozo B1 al B3 se colocaron 170 μL de BHI estéril más 50 μL de suspensión microbiana ajustada (control positivo de crecimiento bacteriano).

Fueron repartidos 120 μL del medio de crecimiento BHI estéril en los pozos C1 al C3, subsecuente hasta los pozos H1 al H3, del mismo modo se trabajó en los pozos A5 al A7 completando las columnas hasta llegar a los pozos H5 al H7 y en los pozos A9 al A11 hasta llenar todas las columnas y culminar en los pozos H9 al H11. Con las columnas 4, 8 y 12 no se trabajó, solo sirvieron de separación entre tratamientos.

Se tomaron 50 μL de la solución del CAM que tenía una concentración de 75 UA/mL y se colocaron en los pozos C1 al C3. De la misma forma se adicionó el CAM en los pozos D1 al D3, E1 al E3 y F1 al F3 con las concentraciones de 90, 200 y 400 UA/mL respectivamente.

En los pozos G1 al G3 se añadió 50 μL de una solución de EDTA 1×10^{-3} M. Para los pozos de la fila H1 a la H3 se colocó una solución de EDTA 2×10^{-3} M. De la misma forma se realizó para las filas A, B, C, D de la columna 5, 6 y 7 pero con las concentraciones de EDTA 4×10^{-3} M, 8×10^{-3} M, 0.02 M y 0.05 M respectivamente. Y a partir de los pozos E5 al E7 en adelante, hasta terminar la placa y otra más para completar todos los tratamientos de evaluación se realizaron una serie de mezclas adicionando 25 μL de la concentración del CAM y 25 μL de la del EDTA.

Finalmente se añadieron 50 μL de la suspensión de las bacterias de estudio a todos los pozos con excepción del control negativo (pozos A1 al A3). Con el fin de mezclar lo contenido en cada pozo se pipeteó (sube-baja) 3 veces consecutivas con una punta diferente estéril para cada pozo. Las placas fueron incubadas a 35 °C durante 24 h para su lectura. Es importante mencionar que toda la prueba se realizó en la campana de flujo laminar (Labconco, 3746701).

Tabla 7. Distribución en placa de 96 pocillos de las diferentes concentraciones del CAM, EDTA y sus respectivas mezclas.

Placa 1:

	1	2	3	5	6	7	9	10	11
A	C+	C+	C+	4×10^{-3}	4×10^{-3}	4×10^{-3}	75 + 0.02	75 + 0.02	75 + 0.02
B	C-	C-	C-	8×10^{-3}	8×10^{-3}	8×10^{-3}	75 + 0.05	75 + 0.05	75 + 0.05
C	75	75	75	0.02	0.02	0.02	90 + 1×10^{-3}	90 + 1×10^{-3}	90 + 1×10^{-3}
D	90	90	90	0.05	0.05	0.05	90 + 2×10^{-3}	90 + 2×10^{-3}	90 + 2×10^{-3}
E	200	200	200	75 + 1×10^{-3}	75 + 1×10^{-3}	75 + 1×10^{-3}	90 + 4×10^{-3}	90 + 4×10^{-3}	90 + 4×10^{-3}
F	400	400	400	75 + 2×10^{-3}	75 + 2×10^{-3}	75 + 2×10^{-3}	90 + 8×10^{-3}	90 + 8×10^{-3}	90 + 8×10^{-3}
G	1×10^{-3}	1×10^{-3}	1×10^{-3}	75 + 4×10^{-3}	75 + 4×10^{-3}	75 + 4×10^{-3}	90 + 0.02	90 + 0.02	90 + 0.02

H	2×10^{-3}	2×10^{-3}	2×10^{-3}	75 +	75 +	75 +	90 +	90 +	90 +
				8×10^{-3}	8×10^{-3}	8×10^{-3}	0.05	0.05	0.05

(C-): Control negativo: 270 μ L de caldo BHI estéril. (C+): Control positivo: 170 μ L de BHI más 50 μ L de suspensión bacteriana. Concentración de actividad antimicrobiana: 75, 90, 200 y 400 UA/mL. Concentraciones de EDTA: 1×10^{-3} , 2×10^{-3} , 4×10^{-3} , 8×10^{-3} , 0.02 y 0.05 M. Cantidades por pozo: 120 μ L de BHI, 50 μ L de CAM o EDTA, 50 μ L de inóculo. Para las mezclas: 120 μ L de BHI, 25 μ L de CAM, 25 μ L EDTA, 50 μ L de inóculo.

Placa 2:

	1	2	3	5	6	7
A	200 + 1×10^{-3}	200 + 1×10^{-3}	200 + 1×10^{-3}	400 + 1×10^{-3}	400 + 1×10^{-3}	400 + 1×10^{-3}
B	200 + 2×10^{-3}	200 + 2×10^{-3}	200 + 2×10^{-3}	400 + 2×10^{-3}	400 + 2×10^{-3}	400 + 2×10^{-3}
C	200 + 4×10^{-3}	200 + 4×10^{-3}	200 + 4×10^{-3}	400 + 4×10^{-3}	400 + 4×10^{-3}	400 + 4×10^{-3}
D	200 + 8×10^{-3}	200 + 8×10^{-3}	200 + 8×10^{-3}	400 + 8×10^{-3}	400 + 8×10^{-3}	400 + 8×10^{-3}
E	200 + 0.02	200 + 0.02	200 + 0.02	400 + 0.02	400 + 0.02	400 + 0.02
F	200 + 0.05	200 + 0.05	200 + 0.05	400 + 0.05	400 + 0.05	400 + 0.05

(C-): Control negativo: 270 μ L de caldo BHI estéril. (C+): Control positivo: 170 μ L de BHI más 50 μ L de suspensión bacteriana. Concentración de actividad antimicrobiana: 75, 90, 200 y 400 UA/mL. Concentraciones de EDTA: 1×10^{-3} , 2×10^{-3} , 4×10^{-3} , 8×10^{-3} , 0.02 y 0.05 M. Cantidades por pozo: 120 μ L de BHI, 50 μ L de CAM o EDTA, 50 μ L de inóculo. Para las mezclas: 120 μ L de BHI, 25 μ L de CAM, 25 μ L EDTA, 50 μ L de inóculo.

- Lectura de la Concentración Mínima Inhibitoria

La CMI se definió como la menor concentración de antimicrobiano frente a la cual las cepas bacterianas evaluadas no mostraron crecimiento visible. El criterio de crecimiento fue una turbidez definida y/o la formación de un “botón” sedimentado indicador de presencia de biomasa producida por la bacteria.

8.2.4 *Elaboración de las películas con agentes antimicrobianos*

Para la elaboración de películas bioactivas se siguió la técnica de vaciado en placa descrita por Calderón-Aguirre et al. (2015). Se elaboraron películas con pectina (1% p/v), gelana (0.2% p/v), glicerol (0.5% p/v) como agente plastificante, EDTA 0.05 M y tres concentraciones del CAM (75, 90 y 120 UA/mL_{SF}). Se usó agua destilada como disolvente y CaCl₂ 5 mM para favorecer la gelificación de gelana y pectina. También se elaboró una película control, formulada con todos los componentes a excepción del CAM y EDTA (Tabla 8).

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
CaCl₂	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM
EDTA	0	0.05 M	0.05 M	0.05 M
CAM	0	75 UA/mL _{SF}	90 UA/mL _{SF}	120 UA/mL _{SF}

p/v: relación peso volumen.

Los biopolímeros fueron disueltos en agua destilada con agitación constante (Thermo Scientific, SP131015; potenciómetro de agitación número 8) y se calentaron hasta 60-65 °C durante 40 min. 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 de los agentes antimicrobiano y se mezclaron mediante agitación. Posteriormente la solución filmogénica fue vertida en moldes de teflón (EKCO® de 39.5×27×2 cm), colocando 645 g de la solución en cada molde. Los moldes se secaron en horno de convección (Shel-Lab, 1380FX) a 35°C durante 17 h a una humedad relativa de <20 %, los moldes se colocaron en el nivel medio del horno y se colocaron recipientes con agua para mantener constante la humedad requerida; después de transcurrido el tiempo se desmoldaron las películas.

8.2.5 Acondicionamiento de las películas

Previo a someter las películas a pruebas mecánicas, de barrera y solubilidad, 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 nitrato de magnesio, Mg(NO₃)₂ (Meyer®, Lote M0510258) que generó un ambiente de 50-55% HR.

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

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

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de la películas en primera instancia se activaron los microorganismos patógenos: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. 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 µL aforando con solución salina isotónica con la finalidad de tener el volumen necesario que fuera capaz de cubrir en su totalidad la superficie de las cajas Petri (Interlux, poliestireno estéril de 60×15 mm).

Este inóculo se sembró por extensión en superficie empleando medios diferenciales/selectivos para cada microorganismo; agar Oxford para *Listeria monocytogenes*, agar MacConkey para *Escherichia coli* y agar Baird Parker para *Staphylococcus aureus* con el fin de obtener 25 UFC/caja.

Una vez fraguado el inóculo en los medios bajo la campana de flujo laminar (Labconco, 3746701) y en condiciones asépticas, se colocaron con ayuda de hisopos estériles y pinzas de disección esterilizadas a la flama del mechero círculos de película control (biopolimérica) y bioactivas (75, 90 y 120 UA/mL del CAM más EDTA 0.05 M) de 60 mm de diámetro, mismo diámetro de la caja Petri a manera de que cubriera en su totalidad la superficie del medio previamente inoculada. Posteriormente las cajas fueron incubadas a una temperatura de 25 °C durante 30 días.

Es importante mencionar que, previo a su utilización para esta prueba, las películas fueron sometidas a esterilización por luz UV en una campana de flujo laminar por 24 h, 12 h de un lado y 12 h del otro (Figura 12). Las películas se colocaron a una distancia de 25 cm de la lámpara UV, se esterilizaron de manera conjunta 36 películas (9 películas control y 9 películas bioactivas para cada tratamiento evaluado 75, 90 y 120 UA/mL del CAM más EDTA 0.05 M).

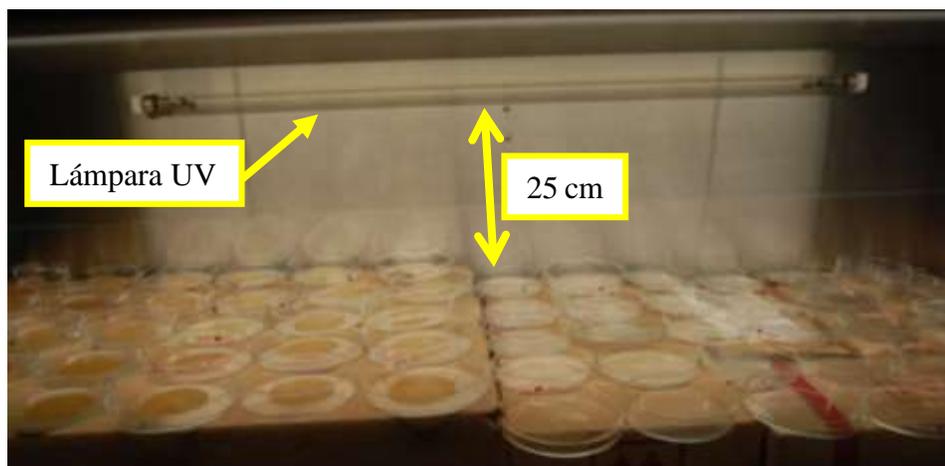


Figura 12. Esterilización de las películas por luz UV en la campana de flujo laminar.

El experimento se realizó por triplicado para cada tratamiento de estudio. Las muestras fueron monitoreadas y fotografiadas cada 24 h hasta cumplir un total de 30 días.

Una vez transcurrido el período de monitoreo, de las tres películas bioactivas se eligió la de mayor actividad antimicrobiana para su posterior evaluación en medios a base de Barbacoa estilo Tulancingo.

8.2.7 *Evaluación del efecto antimicrobiano de la película bioactiva en medios a base de Barbacoa estilo Tulancingo*

- Preparación del medio a base de barbacoa estilo Tulancingo

Se preparó el medio a base de barbacoa estilo Tulancingo (Figura 13) con una cantidad total de 20 g de sólidos, tomando en cuenta la humedad del alimento (55%) se pesaron 44.84 g de barbacoa estilo Tulancingo, mismos que se molieron en un procesador para alimentos (Oster®, 3213, 3212-13).



Figura 13. Barbacoa estilo Tulancingo.

El alimento procesado se mezcló con 1 L de agua destilada, a los cuales se le agregó 15 g de bacto-agar (BD™ DIFCO, Francia), la mezcla se mantuvo en agitación constante y calentamiento hasta que llegó al punto de ebullición. El medio se llevó a esterilización (Tutthauer, 3870ELV-D; ciclo Bioreactor; 121 °C; 2 h) y se vertieron 5 mL del medio en cajas de Petri (Interlux, poliestireno estéril de 60×15 mm), se dejó fraguar el medio elaborado a base de barbacoa estilo Tulancingo por 24 h antes de ser utilizado.

- Inóculo del microorganismo de estudio y colocación de películas

Se inició la prueba con la activación de los microorganismos patógenos de estudio (*Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus 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 contaminación artificial y controlada de los medios a base de barbacoa estilo Tulancingo. La concentración del inóculo (100 UFC/mL) para cada microorganismo indicador se eligió en base a lo reportado y establecido por las Normas Oficiales Mexicanas, sobre la cantidad de bacterias permitidas para alimentos cárnicos.

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 (Interlux, poliestireno estéril de 60×15 mm) que contenía el medio a base de barbacoa estilo Tulancingo.

Se colocaron sobre la superficie de los medios previamente inoculados con la ayuda de hisopos estériles y pinzas de disección esterilizadas a la flama del mechero círculos con un diámetro de 60 mm de película control y película bioactiva que contenía en su formulación las 90 UA/mL del CAM más una concentración de EDTA 0.05 M, que fue la elegida como la mejor del experimento descrito en el apartado 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 controlado con cuatro tratamientos de estudio: control 1 que consistía en el agar de barbacoa estilo Tulancingo sin inóculo, sin película; control 2 el inóculo de los microorganismos patógenos, sin película; la película control (solo con los biopolímeros) y la película bioactiva (90 UA/mL del CAM más EDTA 0.05 M) (Figura 14); cada tratamiento se realizó por triplicado y para cada uno de los días de muestreo, en total se tenían 50 cajas Petri para cada microorganismo indicador.

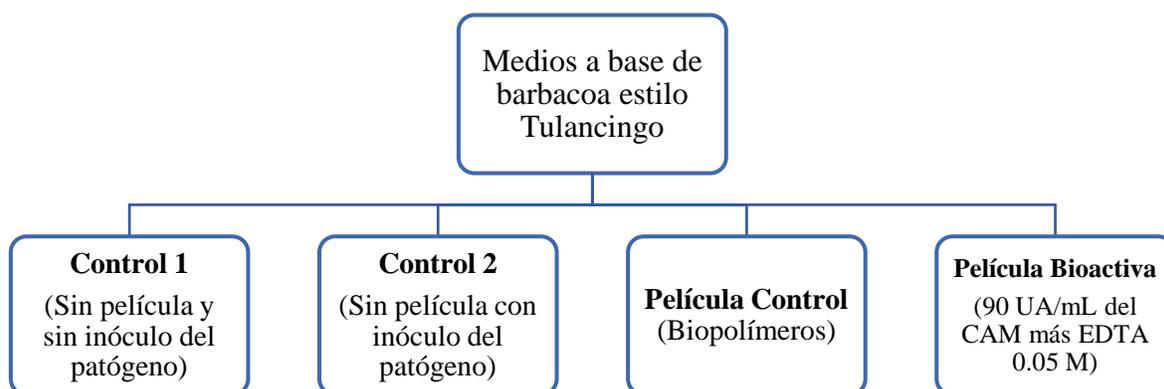


Figura 14. Diagrama de controles y tratamientos evaluados, cada uno se realizó por triplicado. Mismo diagrama para cada microorganismo de estudio.

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

Para cada día de muestreo, se sembró mediante la técnica de estría en superficie cajas Petri (Interlux, poliestireno estéril de 90×15 mm) con medios diferenciales/selectivos Oxford, Mac Conkey y Baird Parker previamente fraguados el correspondiente a cada tratamiento evaluado para cada microorganismo indicador *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* respectivamente, las cajas se incubaron a 35 °C durante 24 h; se corroboró el crecimiento del patógeno por medio de la proliferación de colonias con la morfología, color y características típicas de cada bacteria estudiada.

- Homogenización y recuento de células viables

Una vez teniendo todos los tratamientos controlados, se procedió a su procesamiento, recuento y monitoreo durante 4 tiempos de observación ($T_0= 1$ 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 Seward Stomacher® 400 Circulator (Figura 15) donde se llevó a 300 rpm durante 5 min la bolsa que contenía el medio a base de barbacoa estilo Tulancingo con su respectivo tratamiento y 45 mL de agua peptonada estéril.

Se realizaron las diluciones decimales necesarias siguiendo la metodología descrita en el apartado de “Inóculo del microorganismo de estudio y colocación de películas”, con la única variante de que el inóculo procedía de la bolsa que se sometió a homogeneización en el Stomacher, ésto se realizó con la finalidad de tener un recuento de células viables totalmente cuantitativo.

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 (Interlux, poliestireno estériles de 90×15 mm) 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.



Figura 15. Homogeneización en Seward Stomacher® 400 Circulator a 300 rpm por 5 min.

8.2.8 Propiedades mecánicas de la película con agentes antimicrobianos

La ejecución de estas pruebas se realizó bajo el método estándar ASTM D882 (ASTM, 2010) en una máquina universal (TA plus, Lloyd) (Figura 16). Después de 48 h del acondicionamiento de las películas (50-55% HR, 25 °C), éstas fueron cortadas con la asistencia de un molde en forma de “hueso de perro”, con la objetivo de promover la fractura de las películas en el centro; las cuales se sujetaron entre las pinzas de tensión dejando un espacio de 5 cm entre las pinzas. La velocidad de extensión fue de 1 mm/s. Se obtuvieron datos de fuerza y distancia, a partir de los cuales se determinó el perfil de esfuerzo verdadero

Vs deformación de Hencky (ϵ_H). El análisis de propiedades mecánicas utilizando estos parámetros eliminó diferencias en los resultados de un mismo tratamiento debidas a variaciones en el área transversal y la longitud inicial de las muestras.

Se tensaron al menos 30 tiras de cada tratamiento y se eligieron las determinaciones reproducibles para realizar los cálculos necesarios, descartando las pruebas en donde las muestras no se fracturaron en el centro.



Figura 16. Máquina universal (TA plus, Lloyd) donde se realizaron las pruebas mecánicas.

Para calcular la deformación de Hencky o deformación verdadera se usó la siguiente ecuación:

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

Donde:

ϵ_H = deformación de Hencky (-)

L_0 = altura o longitus inicial (m)

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

Para calcular los esfuerzos a los que se somete la muestra en cada instante de tensión, se usó el concepto de esfuerzo verdadero, σ_T (Ecuación 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 4.

$$\sigma_T = \frac{F}{A_{(t)}} \quad \text{[Ecuación 2]}$$

$$A_0 = (\Delta x) * (\alpha) \quad \text{[Ecuación 3]}$$

$$A_{(t)} = \frac{A_0 L_0}{L} \quad \text{[Ecuación 4]}$$

Donde:

F= fuerza (N)

Δx = Espesor de la tira de película (m)

α = Ancho de la tira de película (m)

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

A_0 = Área inicial (m^2)

El porcentaje de elongación (%e) se calculó de la siguiente manera:

$$\%e = \frac{\Delta L}{L_0} \times 100 \quad \text{[Ecuación 5]}$$

Donde:

%e= Porcentaje de elongación

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

El esfuerzo a la fractura (σ_f), porcentaje de elongación (%e) y Módulo de Young (ME), son las propiedades mecánicas más comúnmente determinadas en películas. El esfuerzo a la fractura es un parámetro importante en el diseño de envases, mide el esfuerzo máximo que un material puede resistir antes de su ruptura, este parámetro se obtiene a través

de las curvas esfuerzo-deformación, como el valor del esfuerzo máximo soportado por las películas en el instante previo a su ruptura; mientras que el porcentaje de elongación revela el incremento total de la longitud de la película sometida a tensión, hasta el punto de ruptura.

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

8.2.9 Propiedades de barrera

8.2.9.1 Permeabilidad al oxígeno (PO_2) de la película con agentes antimicrobianos

La permeabilidad al oxígeno se determinó en el equipo VAC-V2 Permeability tester (Labthink®, China) que funciona de acuerdo al principio manométrico descrito en los estándares de la ASTM D1434-82 (ASTM, 1998) (Figura 17). Se trabajaron 5 réplicas por tratamiento, las películas previamente acondicionadas (50-55% HR, 25 °C), se cortaron en círculos con un diámetro que se obtuvo previo al análisis, con un promedio de su espesor, tomando mediciones en 5 puntos aleatoriamente seleccionados. Las películas se colocaron en las cámaras del equipo VAC-V2. La presión de entrada del gas permeante fue de 1.01 kgf/cm².



Figura 17. Equipo para medición de permeabilidad al oxígeno VAC-V2 Permeability tester.

La temperatura de las determinaciones se controló a 25 °C, (mediante baño recirculador PolyScience). Se obtuvieron gráficos de la presión del gas permeante (Pa) en función del tiempo (s).

8.2.9.2 Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de la película con agentes antimicrobianos

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 (Figura 18) . 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 previamente secada en una estufa a 100 °C / 24 h y las películas fueron acondicionadas y medidas en su grosor.

Las celdas se pesaron en una balanza analítica (Sartorius, MSA324S100DU; sensibilidad 0.0001 g) cada hora durante 8 h, para obtener el flux de masa de agua transferido a través de la película. Con el dato de flux de vapor de agua y las condiciones experimentales de la prueba (HR, temperatura, difusividad del vapor de agua en el aire, etc.) se calcularon valores de difusividad y permeabilidad al vapor de agua de las películas con y sin sustancias antimicrobianas. Se trabajaron 3 réplicas por tratamiento.

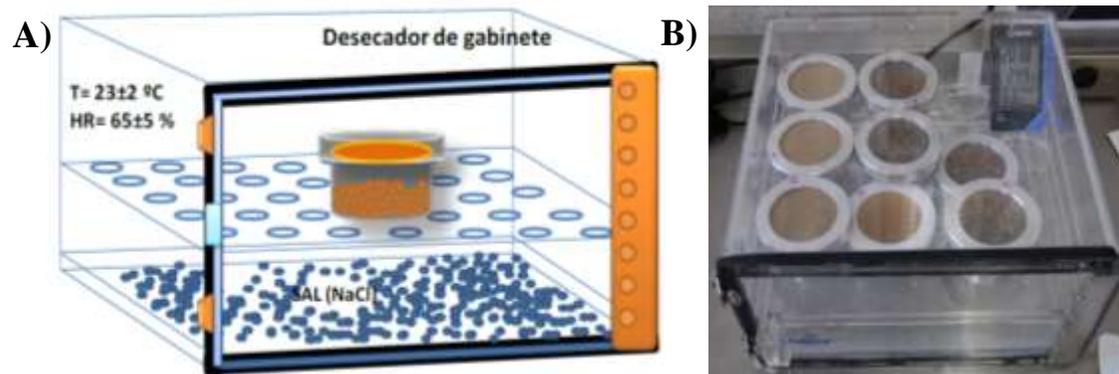


Figura 18. A) Equipo (desecador de gabinete) y condiciones utilizados en la PVA. Tomada de (Calderón Aguirre, 2014). B) Fotografía de las muestras de estudio.

8.2.10 *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 (Garcia, Pinotti, Martino, & Zaritzky, 2004), con algunas modificaciones: se cortaron piezas de 2 x 2 cm² de cada tratamiento mismas que se almacenaron por 7 días en un desecador con pentóxido de difósforo anhidro, O₅P₂ (Sigma-Aldrich, Lote # BCBH7663V) 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 x 250 mL) a temperatura ambiente (≈25 °C) y se agitaron durante 1 h.

Transcurrido el tiempo de agitación, el contenido total del vaso fue filtrado a través de papel filtro (Whatman No. 1), llevado previamente a peso constante en un horno de convección (24 h/95±5 °C). El papel filtro con los restos no disueltos de la película se secó en un horno de convección Shel Lab (modelo 11308FX) a 60 °C durante 2 h, posteriormente se registró el peso y el porcentaje de materia soluble de la película se calculó por diferencia con la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Solubilidad} = \left(\frac{\text{Peso seco inicial de la película} - \text{Peso seco final de la película}}{\text{Peso seco inicial de la película}} \right) \times 100 \quad [\text{Ecuación 6}]$$

8.2.11 *Análisis Estadístico*

Los resultados de todas las pruebas se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA). La comparación de medias fue llevada a cabo por la prueba de Tukey a un nivel de P<0.05. Los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico IBM SPSS Statistics 20.

9 RESULTADOS Y DISCUSIONES

9.1 Determinación de la actividad antimicrobiana del CAM producido por *Streptococcus infantarius*

La Tabla 9 muestra los halos de inhibición contra *Listeria monocytogenes* que se obtuvieron para los tres concentrados obtenidos a diferentes tiempos de fermentación a nivel matraz a las 6, 12 y 24 h de la bacteria ácido láctica *Streptococcus infantarius* aislada del pozol.

Se obtuvieron halos de inhibición claros hasta de 11.58 mm (DE?) de diámetro en la dilución 2^5 para el concentrado obtenido a las 24 h, para el caso del concentrado obtenido a las 12 h de fermentación presentó halos de inhibición de 11.03 mm (DE?) de diámetro en la misma dilución 2^5 y halos de hasta 13.78 mm (DE?) de diámetro en la fermentación de 6 h en la dilución 2^7 .

Como se puede observar en la Tabla 9 el extracto con mayor efecto antimicrobiano fue el que se obtuvo a las 6 h de fermentación, dado que alcanzó una inhibición en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en una dilución mayor, que fue la dilución 2^7 . Los concentrados obtenidos a las 12 y 24 h de fermentación no mostraron diferencia, ya que los dos se comportaron de la misma manera inhibiendo el crecimiento del microorganismo patógeno hasta la dilución 2^5 .

El concentrado de fermentación obtenido a las 6 h presentó mayor actividad inhibitoria contra *Listeria monocytogenes* en placas de agar suave BHI, por lo cual fue seleccionado para trabajar en el resto del proceso experimental de esta investigación, realizando una fermentación a nivel bioreactor por lote. Los datos obtenidos de la medición de halos de inhibición del concentrado antimicrobiano de 6 h de fermentación y la concentración de la máxima dilución en donde se observaron halos definidos fueron usados para determinar las unidades de actividad (UA); de esta forma el concentrado con actividad antimicrobiana que produce *Streptococcus infantarius* a las 6 h de fermentación presentó 6400 UA/mL.

Tabla 9. Prueba de inhibición del crecimiento de *Listeria monocytogenes* en placas de agar suave BHI.

Edad del caldo al concentrarlo	Halos de inhibición (Dos réplicas)	Mayor dilución con efecto antimicrobiano
6 horas de fermentación		Dilución 2 ⁷
12 horas de fermentación		Dilución 2 ⁵
24 horas de fermentación		Dilución 2 ⁵

Los resultados obtenidos se pueden comparar con los reportados por López Ortega (2014) quien realizó estudios sobre la producción del compuesto antimicrobiano producido por la bacteria ácido láctica *Streptococcus infatarius* aislada del pozol (misma que se utilizó en este trabajo de investigación), el máximo valor de actividad antimicrobiana lo encontró donde la BAL fue crecida en un Medio APT (Evans y Niven, 1951) (Peptona de caseína (1% p/v), Extracto de levadura (0.5% p/v), K₂HPO₄ (0.5% p/v), Citrato de sodio (1.2% p/v), NaCl (1.2% p/v), Dextrosa Anhidra (1% p/v), MgSO₄ (0.08% p/v), MnCl₂·4H₂O (0.1% p/v), FeSO₄ (0.004% p/v), Tween 80 (0.3% p/v) y Lactosuero en polvo (1% p/v), en

fermentaciones en tanque agitado mecánicamente (200 rpm) a una condición de aireación de 0.5 vvm (Volumen de aire por volumen de medio de cultivo por minuto), éste fue 3498 (UA/mL) (DE=1262) y se presentó a las 6 h de fermentación. Como se puede observar el valor es menor al encontrado en este trabajo de investigación (6400 UA/mL), en el mismo tiempo de fermentación pero donde la bacteria ácido-láctica fue crecida en medio MRS.

9.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se realizó la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) con el fin de conocer la concentración más baja (UA/mL) a la que el CAM producido por *Streptococcus infantarius* fuera capaz de inhibir el crecimiento visible de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Las concentraciones del CAM evaluadas fueron 75, 90, 200 y 400 UA/mL. De la misma forma se valoró el efecto antimicrobiano de seis concentraciones de EDTA: 1×10^{-3} , 2×10^{-3} , 4×10^{-3} , 8×10^{-3} , 0.02, 0.05 M; así como las mezclas del CAM en sinergia con las diferentes concentraciones de EDTA. Se emplearon dos controles: el primero fue el control negativo (caldo BHI estéril) y el segundo fue el control positivo (suspensión microbiana ajustada); utilizando como indicadores de crecimiento bacteriano la presencia de turbidez y/o de un botón de biomasa sedimentado en el fondo del pozo.

La bacteria *Listeria monocytogenes* ha tomado gran importancia y se encuentra prescrita en la mayoría de las normativas de calidad por ser el agente etiológico de la listeriosis, una enfermedad infecciosa transmitida por los alimentos. En virtud de los antecedentes, fue también de interés conocer la acción del CAM de estudio sobre este patógeno. Una vez realizado el ensayo, se determinó que la concentración del CAM producido por *Streptococcus infantarius* que inhibe el crecimiento de *Listeria monocytogenes* es de 90 UA/mL, observándose en la Figura 19 que los pozos correspondientes a este tratamiento se muestran totalmente cristalinos, sin los indicadores visibles del posible crecimiento del microorganismo patógeno en estudio.

Los resultados obtenidos son similares a los reportados por otros autores (Acuña et al., 2015; Chopra, Singh, Kumar Jena, & Sahoo, 2015; Iseppi et al., 2008; Neetoo &

Mahomoodally, 2014), quienes señalan la alta actividad anti-listeria que presentan las bacteriocinas como nisina, enterocinas A y B, enterocina 416K1, Sakacin, Pediocina AcH, demostrando que son capaces de controlar la proliferación de *Listeria monocytogenes* en productos alimenticios contaminados artificialmente y las identifican como un ejemplo importante de compuestos antimicrobianos que tienen un potencial considerable en el campo de la bioconservación de alimentos.

La actividad antimicrobiana frente a cepas del género *Listeria* de esta clase de bacteriocinas (nisina o pediocina) se debe principalmente a la alta cantidad de cisteínas próximas al extremo amino, lo que representa mayor cantidad de puentes disulfuro que facilitan el mecanismo de acción de las bacteriocinas que se basa en la interrupción de las funciones de la membrana diana, promoviendo la formación de poros y la consiguiente disipación de la fuerza motriz de protones. En el intento de mantener o restaurar la fuerza motriz de protones, existe aceleración en el consumo de ATP y en consecuencia la muerte celular (Balciunas et al., 2013; Cé et al., 2012; Nguyen et al., 2008).

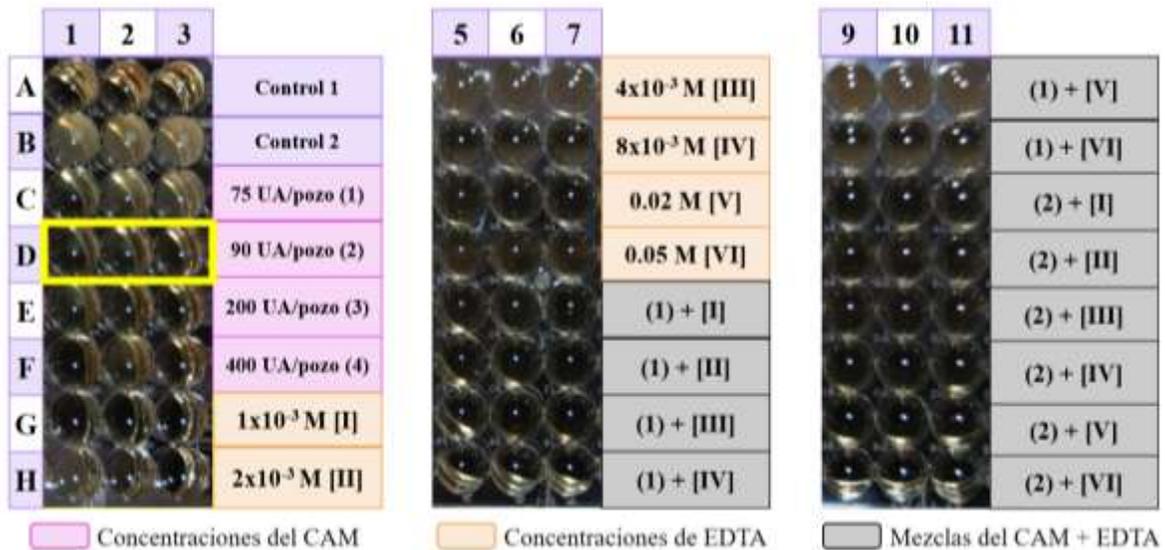


Figura 19. Efecto del CAM producido por *Streptococcus infantarius*, EDTA y sus mezclas sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* durante la prueba de concentración mínima inhibitor.

La información obtenido sobre la CMI es nueva para el grupo de investigación, no se había realizado el estudio para conocer la concentración más baja del CAM producido por

Streptococcus infantarius que fuera capaz de inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos, en particular el crecimiento de *Listeria monocytogenes*; en estudios anteriores realizados por el grupo de investigación se manejaron concentraciones altas del CAM lo que posiblemente saturaba el efecto antimicrobiano y podía alterar las propiedades mecánicas y de barrera de las películas elaboradas.

La CMI del CAM producido mediante fermentación de la bacteria ácido láctica *Streptococcus infantarius* para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* fue de 90 UA/mL, este valor encontrado se puede comparar con lo obtenido por Sonsa-Ard, Rodtong, Chikindas, and Yongsawatdigul (2015), quienes determinaron la Concentración Mínima Inhibitoria de la bacteriocina parcialmente purificada CN-25 producida por *Enterococcus faecium* CN-25 bacteria aislada de cultivos fermentados de huevos de pescado tailandés contra *Listeria monocytogenes* Scott A.

Listeria monocytogenes Scott A se cultivó en caldo de soya trípico suplementado con 0.6 % extracto de levadura (TGY) y se incubó a 30 °C durante 24 h. La concentración de 10^8 UFC/mL se diluyó 100 veces con el objetivo de tener una concentración final de 10^6 UFC/mL. Una solución madre de bacteriocina CN-25 parcialmente purificada se preparó con agua estéril para obtener concentraciones finales de 2.38, 2.04, 1.70, 1.36, 1.02, 0.68 y 0.34 mg/mL. La nisina fue utilizada como control positivo (la solución preparada se añadió a pocillos que contenían el cultivo diluido de *Listeria monocytogenes* Scott A). Caldo TGY sin inocular fue utilizado como control negativo. Otro control positivo fueron los pozos que contenían *Listeria monocytogenes* Scott A sin bacteriocina. Las placas se incubaron durante 24 h a 30 °C y se observaron utilizando un lector de microplacas Molecular Devices THERMOmax a una densidad óptica de 595 nm para cada pocillo a intervalos de 30 min con 5 s de agitación antes de cada lectura.

Se encontró que la bacteriocina parcialmente purificada CN-25 inhibe completamente el crecimiento de *Listeria monocytogenes* Scott A en la concentración mínima de 2.38 mg/mL; este valor encontrado se puede comparar con la CMI de 90 UA/mL del CAM que inhibe el desarrollo de la misma bacteria patógena de estudio.

Los resultados obtenidos para *Escherichia coli* pueden apreciarse en la Figura 20, destacando el tratamiento con 90 UA/mL del CAM en combinación con EDTA 0.05 M que logró inhibir por completo el crecimiento del microorganismo de ensayo, ya que los pozos se observan cristalinos, sin la presencia del botón de biomasa en el fondo del pozo, motivo por el cual se seleccionó dicho tratamiento como la Concentración Mínima Inhibitoria para *Escherichia coli*.

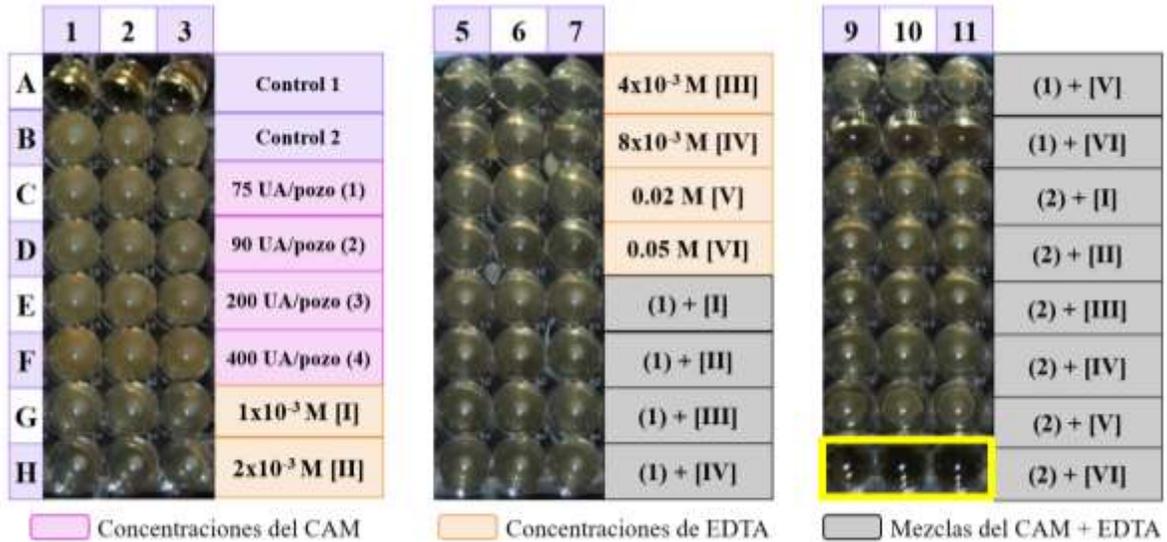


Figura 20. Efecto del CAM producido por *Streptococcus infantarius*, EDTA y sus mezclas sobre el crecimiento de *Escherichia coli* durante la prueba de concentración mínima inhibitoria.

Para este microorganismo patógeno no hubo una inhibición de su crecimiento al tratarla con el CAM por sí solo, pero sí una vez que se combinó con EDTA, pues este agente quelante permite la entrada de compuestos hidrofóbicos a la membrana de bacterias Gram-negativas. Se ha reportado que 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 (Acuña et al., 2015). Las bacterias Gram-negativas se caracterizan por la presencia de una membrana externa que contiene lipopolisacáridos (LPS) estabilizados por Mg²⁺ y Ca²⁺ (Gill & Holley, 2003).

Las bacteriocinas también se puede aplicar para la inactivación de estos patógenos Gram-negativos en los alimentos, en combinación con otros obstáculos o tratamientos para inducir daño celular y parcial desorganización de la capa protectora de la membrana externa.

Tratamientos con EDTA, agente quelante de cationes divalentes tales como Mg^{2+} y Ca^{2+} debilitan la capa de lipopolisacáridos de la membrana externa; esta acción la hace sensible a péptidos hidrófobos antimicrobianos como las bacteriocinas, dejando que penetren en la membrana citoplasmática más fácilmente (Sivarrooban et al., 2008).

Los resultados obtenidos se pueden comparar con lo reportado por Acuña et al. (2015), quienes determinaron la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del híbrido de bacteriocina Ent35-MccV en caldo BHI contra *Escherichia coli* ATCC 13706 y *Listeria monocytogenes* CECT 4032, que se utilizaron como indicadores de cepas Gram-negativas y Gram-positivas, respectivamente. La CMI la realizaron por duplicado en una placa de microtitulación de 96 pocillos, los intervalos ensayados de bacteriocina fueron de 2-500 UA/mL. El medio se inoculó con $\sim 10^4$ células de las cepas sensibles. Controles de crecimiento positivos fueron incluidos en pozos que carecen del compuesto antimicrobiano probado. La CMI se definió como la dilución más baja de bacteriocina que inhibe el crecimiento de la cepa indicadora después de 24 h de incubación a 37 °C.

La concentración de bacteriocina requerida para inhibir el crecimiento o matar a *Escherichia coli* a 37 °C en medio BHI fue de 170 UA/mL. Por otro lado, se encontró que la CMI contra *Listeria monocytogenes* fue de 16 UA/mL en BHI. Como se puede observar se requiere una concentración mayor (170 UA/mL) de esta bacteriocina (Ent35-MccV) para inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* en comparación con las 90 UA/mL que arrojó la evaluación de la técnica de CMI para el CAM que produce *Streptococcus infantarius* aunque en nuestro trabajo de investigación esta concentración del CAM actuó en sinergia con una concentración de EDTA 0.05 M potencializando el efecto antimicrobiano del CAM.

Los ensayos de dilución en placa se realizaron empleando como microorganismo sensible a *Staphylococcus aureus* bajo las mismas condiciones descritas anteriormente que emplean un intervalo determinado de concentraciones de la bacteriocina (75 a 400 UA/mL) y de EDTA (1×10^{-3} a 0.05 M) como se puede observar en la Figura 21. Cada una de las concentraciones de la CAM estudiadas no presentaron efecto atagónico contra dicho patógeno, debido a que existió evidencia de turbidez y del botón de biomasa en el fondo del pocillo generado por el crecimiento del microorganismo. Por el contrario desde la

concentración más baja de EDTA tuvo efecto sobre del crecimiento de dicha cepa, resultando que la concentración de 1×10^{-3} fue la mínima inhibitoria para *Staphylococcus aureus*.

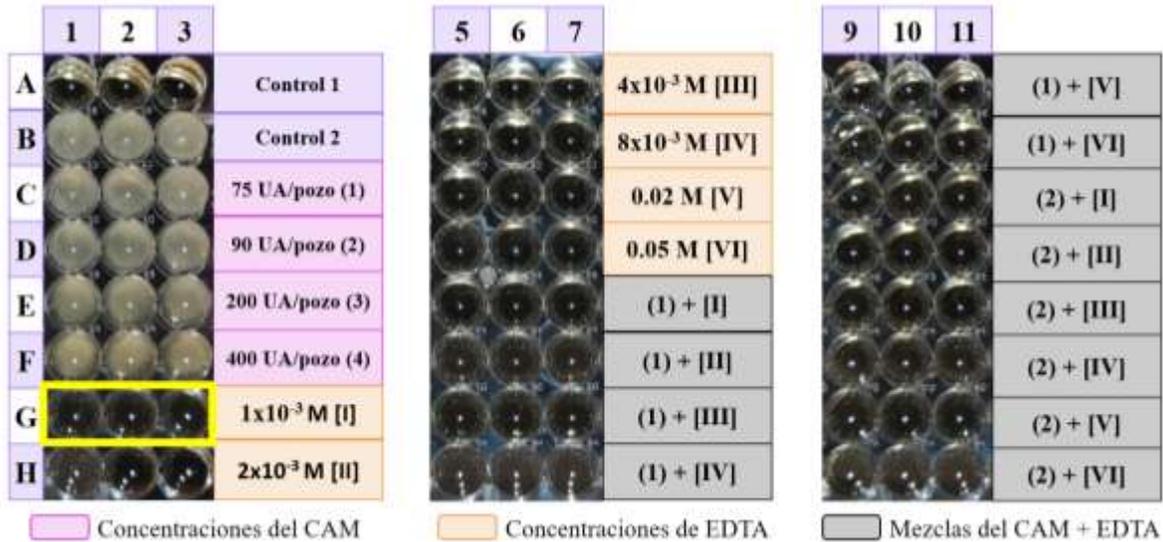


Figura 21. Efecto del CAM producido por *Streptococcus infantarius*, EDTA y sus mezclas sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* durante la prueba de concentración mínima inhibitoria.

La CMI encontrada para *Staphylococcus aureus* se puede comparar con lo conseguido por Ashokkumar, Sree Krishna, Pavithra, Hemalatha, and Ingale (2011), quienes determinaron la CMI de la bacteriocina producida por *Lactobacillus paracasei* bacteria que se aisló a partir de leche de burra. La bacteriocina se sometió a actividad antimicrobiana frente a agentes patógenos clínicos (*Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Sataphylococcus aureus*).

La CMI se determinó por el método de micro-dilución en caldo. Se evaluaron concentraciones de bacteriocina que iba de 8 a 1024 μ L, que se añadieron en tubos que contenían caldo Mueller-Hinton previamente inoculados con 124 UFC/mL de la bacteria patogénica de prueba, sulfóxido de dimetilo estéril sirvió como control negativo; los tubos se incubaron a 37 °C durante 24 h. La CMI la definieron como la concentración más baja de bacteriocina que inhibe completamente el crecimiento del cultivo de 24 h. Los resultados indicaron que la CMI fue de 128 μ L contra *Salmonella typhi*, 256 μ L contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, 512 μ L contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Por otra parte Chopra et al. (2015), evaluaron la CMI de la bacteriocina denominada Sonorensin contra *Staphylococcus aureus*. Cada pocillo de la microplaca contenía 4×10^6 UFC/mL de *Staphylococcus aureus* y variables concentraciones de Sonorensin que iba de 20 a 200 μg en caldo BHI-sacarosa. Las microplacas se incubaron a 37 °C durante 24 h. La concentración que alcanzó alrededor del 90 % de inhibición fue la de 200 μg .

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 (Wiegand et al., 2008).

En resumen las CMI's del CAM, EDTA y sus mezclas en estudio se muestran en la Tabla 10, las cuales se determinaron con base a la ausencia de turbidez y/o del botón indicador de la producción de biomasa. Con base en los resultados anteriores el CAM producido por *Streptococcus infantarius* tiene mayor efecto contra *Listeria monocytogenes* al tener que adicionar únicamente 90 UA/mL al medio de cultivo, por lo que el CAM fue eficiente por sí solo. En contraste, para *Escherichia coli*, bacteria Gram-negativa, es necesaria la presencia del EDTA para lograr una acción antagónica. Y para *Staphylococcus aureus* las concentraciones estudiadas del CAM por sí solo no lograron inhibir el crecimiento de este patógeno, en cambio, desde la concentración más pequeña de EDTA (1×10^{-3} M) logró inhibir el desarrollo de esta bacteria Gram-positiva que pone en riesgo la inocuidad de alimentos.

Tabla 10. Concentración Mínima Inhibitoria del CAM producido por *Streptococcus infantarius*, EDTA o sus mezclas para los tres microorganismos patógenos de estudio.

Microorganismo Patógeno	Concentración Mínima Inhibitoria
<i>Listeria monocytogenes</i>	90 UA/mL del CAM
<i>Escherichia coli</i>	90 UA/mL del CAM + 0.05 M de EDTA
<i>Staphylococcus aureus</i>	1×10^{-3} M de EDTA

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

La Tabla 11 muestra el comportamiento de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en presencia de películas con y sin compuestos antimicrobianos durante los 30 días de monitoreo que duró el experimento. La caja testigo, en la cual no se colocó película alguna, presentó crecimiento evidente de los microorganismos patógenos a partir de las 48 h para *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* alcanzando 105 y 78 UFC/caja respectivamente, *Staphylococcus aureus* se desarrolló hasta alcanzar 77 UFC/caja en 72 h ésta cuenta permaneció constante hasta el término de las observaciones. Es importante recordar que la concentración bacteriana esperada era de 25 UFC/caja, se observó una mayor proliferación de bacterias a lo que se calculó.

Fue evidente que aún sin agente antimicrobiano, la película control, logró inhibir por completo el crecimiento de los tres microorganismos patógenos. 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.

La actividad antimicrobiana atribuida a la pectina según lo revisado en la literatura se respalda por el estudio realizado por Sánchez Aldana, Andrade-Ochoa, Aguilar, Contreras-Esquivel, and Nevárez-Moorillón (2015), en esta investigación prepararon películas comestibles con dos materias primas de origen péctico, bagazo y orujo de lima a una concentración de 0.70, 0.85 y 1.00 % con aceite esencial de limón mexicano a tres diferentes concentraciones 0, 500 y 1000 mg/L, evaluaron la actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas transmitidas por los alimentos (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*); las películas comestibles preparadas con extractos pécticos (bagazo y orujo de lima mexicana) presentaron mayor inhibición frente a bacterias Gram-negativas, pero las preparadas con extracto de bagazo péctico fueron las más eficaces contra las cinco bacterias estudiadas. De igual manera Gopi, Kanimozhi, Bhuvaneshwari, Indira, and Kavitha (2014), valoraron la síntesis de nanopartículas de hidroxapatita (HAP, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH}_2)$) en presencia de pectina de cáscara de banana. Evaluaron 4 volúmenes de HAP (25, 50, 70 y 100 μL), la actividad

antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* fue mayor cuando las nanopartículas de HAP fueron sintetizadas en presencia de una concentración de pectina (0.15 %) en comparación con las nanopartículas sintetizadas en ausencia de pectina; concluyendo que la pectina extraída de la banana posee actividad antimicrobiana, la cual se debe a la presencia de algunos componentes orgánicos como ácidos urónicos, polifenoles e incluso minerales tales como K^+ , Na^+ y Mg^+ . En otros estudios también se ha reportado la actividad antimicrobiana de pectinas; Bayarri, Oulahal, Degraeve, and Gharsallaoui (2014), demostraron que la actividad antimicrobiana de lisozima se reduce al disminuir la concentración de pectina de bajo metoxilo. La actividad antimicrobiana de pectina se muestra también en los estudios de Jindal, Kumar, Rana, and Tiwary (2013), quienes caracterizaron la pectina extraída de *Aegle marmelos*, comúnmente llamado “Bael”, dentro de la prueba de actividad antimicrobiana encontraron que conforme aumenta la concentración de pectina, incrementa también el efecto antimicrobiano de la misma. Usaron como microorganismos indicadores *Bacillus cereus* y *Escherichia coli*. Por otra parte, Tony Jin, Liu, Zhang, and Hicks (2009), observaron una actividad antilisterial baja en películas de pectina y ácido poliláctico. De forma similar, Olano-Martin, Williams, Gibson, and Rastall (2003), señalaron que los oligosacáridos pécticos (obtenidos a través de hidrólisis enzimática de pectinas) en concentraciones de 10 mg/mL, son suficientes para neutralizar la toxina shiga de *Escherichia coli*.

El comportamiento de las tres películas bioactivas fue el mismo ya que lograron inhibir en su totalidad el crecimiento de los microorganismos patógenos de estudio (*Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*), lo cual mostró un efecto sinérgico entre los componentes de la película y los agentes antimicrobianos adicionados.

Los resultados obtenidos sobre la actividad antimicrobiana de las películas bioactivas en medios selectivos/diferenciales para cada bacteria de estudio, confirmó lo alcanzado previamente en la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria.

Las películas bioactivas evaluadas (75, 90, 120 UA/mL más EDTA 0.05 M) se propusieron en base a la CAM para *Escherichia coli* (bacteria más resistente a los agentes antimicrobianos), ya que se buscaba una película que fuera capaz de inhibir el crecimiento de los tres microorganismos de estudio.

Se decidió evaluar 3 concentraciones del CAM, 90 UA/mL según lo obtenido en la CMI y una concentración arriba y abajo, 90 y 120 UA/mL respectivamente, para evaluar su efecto antimicrobiano una vez que el CAM y el EDTA se encontraran suspendidos en una matriz biopolimérica a base de gelana-pectina.

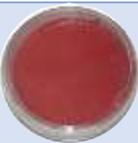
Ya evaluada la actividad antimicrobiana de las películas bioactivas se podía tener un efecto de inhibición conocido como tecnología de barreras múltiples. El efecto antimicrobiano que se le atribuye a la pectina por sí sola, la inclusión de los agentes antimicrobianos (CAM y EDTA) y la barrera al oxígeno que representa por sí sola la película evaluada.

Ya que las 3 películas bioactivas se comportaron de la misma manera inhibiendo en su totalidad en crecimiento de las bacterias de estudio, se decidió trabajar con la película de 90 UA/mL del CAM más EDTA 0.05 M en los medios a base de Barbacoa estilo Tulancingo, tomando la película con la concentración intermedia para tratar de asegurar su efectividad en medios y condiciones diferentes.

Los resultados obtenidos se pueden comparar con los de Ibarguren et al. (2015), quienes estudiaron películas elaboradas a base de gelatina de bovino con la inclusión de un flavonoide laurato prunina éster y las enterocinas A, B y P sintetizadas por *Enterococcus faecium* SM21 (63 UA/cm²), la actividad antibacteriana de la película fue determinada por las técnicas de difusión en agar y por la de contacto directo en microplaca contra *Listeria monocytogenes* 01/155, *Staphylococcus aureus* ATCC29213 y *Bacillus cereus* 1, el agar se inoculó previamente con una concentración inicial de 10⁷-10⁸ UFC/mL de cada cepa patógena de estudio. La película evaluada logró reducir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* tres ciclos logarítmicos durante las primeras 24 h y a *Staphylococcus aureus* dos ciclos logarítmicos durante el mismo tiempo de contacto.

Las tres películas bioactivas que se estudiaron a base gelana-pectina con la inclusión del CAM producido por *Streptococcus infantarius* y EDTA lograron inhibir por completo el desarrollo de los tres microorganismos patógenos, ya que de las 25 UFC/caja que se inocularon en el medio selectivo/diferencial correspondiente para cada microorganismo indicador, las películas evaluadas impidieron totalmente el crecimiento de los patógenos.

Tabla 11. Imágenes de cajas Petri inoculadas con *Listeria monocytogenes* en medio Oxford, *Escherichia coli* en agar MacConkey y *Staphylococcus aureus* en medio Baird Parker. Se muestra el efecto de los distintos tratamientos (película control y biopelículas) bajo condiciones de incubación a 25 °C.

<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
Control Sin Película					
Día 1	Día 30	Día 1	Día 30	Día 1	Día 30
					
Película Control (Biopolímeros)					
Día 1	Día 30	Día 1	Día 30	Día 1	Día 30
					
Película Bioactiva 1 (75 UA/mL del CAM más EDTA 0.05 M)					
Día 1	Día 30	Día 1	Día 30	Día 1	Día 30
					
Película Bioactiva 2 (90 UA/mL del CAM más EDTA 0.05 M)					
Día 1	Día 30	Día 1	Día 30	Día 1	Día 30
					
Película Bioactiva 3 (120 UA/mL del CAM más EDTA 0.05 M)					
Día 1	Día 30	Día 1	Día 30	Día 1	Día 30
					

Del mismo modo, Nithya et al. (2013), evaluaron la actividad antimicrobiana de películas a base de polietileno de baja densidad (LDPE) y celulosa, con el péptido antibacteriano de *Bacillus licheniformis* Me1 (800 y 6400 UA/mL) contra patógenos transmitidos por alimentos, tales como *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Listeria monocytogenes* Scott A, *Staphylococcus aureus* FRI 722, *Salmonella typhimurium* MTCC 1251 y *Bacillus cereus* F 4433 con una concentración de 10^4 UFC/mL. Reportaron que las películas activas mostraron actividad antibacteriana contra todos los microorganismos indicadores, encontraron que después de 3 meses de incorporación, las películas activas (tanto de LDPE y de celulosa) que se mantuvieron a una temperatura de 4°C seguían mostrando una actividad clara y estable contra *Listeria monocytogenes*.

Es importante mencionar que las películas bioactivas estudiadas, lograron inhibir por completo el desarrollo de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* durante 30 días que duró el experimento, siendo que las cajas monitoreadas se incubaron a 25 °C, dándole en cierta medida condiciones más favorables para el desarrollo a los microorganismos de estudio.

Los resultados obtenidos se pueden comparar con otro estudio realizado por P. J. Espitia et al. (2013), quienes evaluaron películas bioactivas a base metilcelulosa con la inclusión de ZnO (17 % p/p) y pediocina (20 % p/p) como agentes antimicrobianos. La película se probó contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 con un inóculo bacteriano de 1×10^8 UFC/mL, el cual se sembró en agar Baird Parker y Oxford para cada patógeno respectivamente. Discos de 1 cm de diámetro fueron colocados en la superficie de los medios previamente inoculados, las placas se incubaron a 12 °C durante 24 h para permitir la difusión de los compuestos antimicrobianos, después se incubaron a 35 °C durante 24 h para determinar la actividad antimicrobiana mediante la medición de la zona de inhibición alrededor de los discos. La zona de inhibición de *Listeria monocytogenes* fue 2 ± 0.1 cm, mientras que para *Staphylococcus aureus* fue 1.6 ± 0.2 cm.

Como se puede observar, los medios que utilizaron estos investigadores para determinar la actividad antimicrobiana de su película formulada fueron medios selectivos/diferenciales, mismos medios que fueron empleados para la evaluación de la película bioactiva de gelana-pectina con la inclusión del CAM y EDTA.

Por otra parte, el efecto antimicrobiano de películas comestibles de quitosano formuladas con nisina, péptido P34 y natamicina en una concentración final de 2.5 µg/mL, 16 UA/mL y 2 µg/mL respectivamente, fue investigado por Cé et al. (2012), a prueba contra *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Clostridium perfringens*, *Lactobacillus acidophilus*, *Aspergillus phoenicis* y *Penicillium stoloniferum* en una concentración de 10⁶ UFC/mL, ellos observaron diámetros de 10 a 12 mm en la zona de inhibición, diámetros similares para todas las bacterias probadas.

Las películas de quitosano en las que incorporaron nisina mostró un efecto inhibitorio contra *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*, aunque esas películas no mostraron actividad antimicrobiana sobre las bacterias Gram-negativas. El efecto sinérgico de quitosano con la nisina y el péptido P34 logró ampliar el espectro antimicrobiano a la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli*.

En este sentido, las bacteriocinas se han propuesto como obstáculos adicionales para combatir los microorganismos, y su combinación con algunas sustancias químicas, como ácidos orgánicos y agentes quelantes como el EDTA empleado en este trabajo de investigación, han sido descrito con éxito. Asimismo "La tecnología de barreras múltiples" se refiere a la manipulación de múltiples factores (intrínsecos y extrínsecos) diseñados para prevenir la contaminación microbiana o controlar el crecimiento de microorganismos y la supervivencia en los alimentos. Una combinación de métodos de conservación puede trabajar sinérgicamente o al menos asegura una mejor protección que un único método por sí solo, lo que mejora la seguridad y calidad alimentaria. También, el sinergismo entre diferentes efectos antimicrobianos permite el uso de dosis más bajas de cada aplicación individual (Ibarguren et al., 2015).

Otro estudio realizado por Sivarooban et al. (2008), donde fueron evaluadas las propiedades antimicrobianas de películas de aislado de proteína de soya que contenían extracto de semilla de uva (1% p/p), nisina (10.000 UI/g), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA 0.16% p/p), y sus combinaciones; encontraron que la película bioactiva fue capaz de reducir la población de *Listeria monocytogenes* en 2.9 log UFC/mL, mientras que la población de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella typhimurium* se redujo en 1.8 y 0.6 log

UFC/mL respectivamente. El extracto de semilla de uva, la nisina y el EDTA han demostrado de forma individual que pueden ser inhibidores eficaces contra los patógenos transmitidos por los alimentos. Sin embargo, cuando se aplican en conjunto estos compuestos pueden proporcionar protección contra un espectro más amplio de los patógenos que ponen en riesgo la inocuidad y seguridad de los alimentos.

De igual manera, la combinación de los agentes antimicrobianos empleados en el presente trabajo de investigación (CAM producido por *Streptococcus infantarius* y EDTA) presentan un efecto antimicrobiano potencializado contra los microorganismos patógenos de estudio cuando se mezclan, ampliando el espectro de inhibición no solo contra bacterias Gram-positivas como lo son *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, sino también contra bacterias Gram-negativas como lo es *Escherichia coli*.

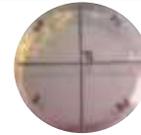
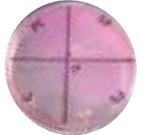
9.4 Evaluación del efecto antimicrobiano de la película bioactiva en medios a base de Barbacoa estilo Tulancingo

La Figura 22 muestra el comportamiento de *Listeria monocytogenes* en presencia de la película control y la película bioactiva (90 UA/mL del CAM más EDTA 0.05 M), así como de los dos controles estudiados sobre medios de crecimiento elaborados a base de Barbacoa estilo Tulancingo. El control se esterilidad (CSPSI), el cuál no tenía película ni el inóculo de la bacteria, no presentó crecimiento del microorganismo, por lo que se confirmó la esterilidad del medio durante los 7 días que duró el experimento. En la Tabla 12 se presentan las fotografías de los medios selectivos/diferenciales sembrados mediante la técnica de estriado de cada microorganismo indicador evaluado para cada día de muestreo, del mismo modo es una manera de asegurar que las colonias bacterianas cuantificadas pertenecen a los microorganismos de estudio.

El control (CSPCI) en el cual no se colocó película alguna, pero si el inóculo de la bacteria, presentó crecimiento evidente de *Listeria monocytogenes* a partir del tiempo cero, es decir, que desde que inicio el experimento la concentración del microorganismo patógeno presentó un orden de magnitud de 10^2 UFC_{*L. monocytogenes*}/g de medio Barbacoa, hasta alcanzar 10^7 UFC_{*L. monocytogenes*}/g de medio Barbacoa en el muestreo que se realizó el día 5, siendo la concentración más alta que alcanzó el patógeno durante los 7 días que duró el experimento.

Esta cuenta se redujo un poco en el día 7, ya que estadísticamente existió diferencia significativa respecto al día 5.

Tabla 12. Imágenes de cajas Petri inoculadas con *Listeria monocytogenes* en medio Oxford, *Escherichia coli* en agar MacConkey y *Staphylococcus aureus* en medio Baird Parker. Se comprueba la esterilidad de los medios a base de Barbacoa estilo Tulancingo y que el recuento de células viables corresponde a los microbios de estudio.

Bacteria/Muestreo	Día 0	Día 1	Día 3	Día 5	Día 7
<i>Listeria monocytogenes</i>					
<i>Escherichia coli</i>					
<i>Staphylococcus aureus</i>					

Las cajas en las que se colocó la película control (solo los biopolímeros en su formulación) mostró en los primeros 5 días de experimentación un recuento de células viables menor a 400 UFC_{*L. monocytogenes*}/g de medio Barbacoa, logrando contener un poco el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en los primeros días de muestreo, sin embargo, después del día 5 de evaluación, el crecimiento del patógeno incrementó hasta alcanzar una concentración ligeramente mayor a las 1600 UFC_{*L. monocytogenes*}/g de medio Barbacoa en el día que finalizó el experimento.

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 gelana-pectina logró inhibir el crecimiento del *Listeria monocytogenes*. Este efecto de inhibición parcial puede ser atribuido a la barrera al oxígeno que presenta la película de gelana-pectina por sí misma. Por lo tanto, es posible su crecimiento aun con una barrera al oxígeno, considerando además que los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura óptima para el crecimiento del microorganismo de estudio (35 °C). Es importante mencionar que para *Listeria*

monocytogenes se ha reportado una temperatura óptima de crecimiento de 30 a 37 °C y según los requerimientos de oxígeno se le clasifica como un microorganismo facultativo, es decir, puede crecer bajo condiciones aerobias o con oxígeno reducido (Mastromatteo, Lucera, Sinigaglia, & Corbo, 2010; Nguyen et al., 2008). Por otra parte, la película bioactiva (90 UA/mL de CAM más EDTA 0.05 M) mostró una evidente y total actividad antimicrobiana sobre *Listeria monocytogenes* ya que logró inhibir por completo el crecimiento del microorganismo de estudio hasta el término del experimento a una temperatura de incubación de 35 °C.

Los resultados obtenidos en este experimento se pueden comparar con lo realizado por Salmieri et al. (2014), quienes evaluaron películas bioactivas con una matriz compuesta por poli (ácido láctico) y nanocristales de celulosa, utilizando nisina como agente antimicrobiano contra *Listeria monocytogenes* (10^4 UFC/g) probada en rebanadas de jamón cocido. Ellos lograron reducir la concentración bacteriana 3.0 a 3.5 log UFC/g del microorganismo indicador desde el día 3 hasta el día 14 de almacenamiento a 4 °C.

Aunque estos autores lograron controlar el crecimiento de *Listeria monocytogenes* por el doble de tiempo, en comparación con los 7 días que se logró inhibir el crecimiento del mismo microorganismo indicador en este estudio, es importante mencionar que nuestro experimento se llevó a cabo a una temperatura de 35 °C; es probable, que aún a esta temperatura de incubación, si se le hubiera dado continuidad al experimento por más días, la película bioactiva formulada hubiera seguido controlando el desarrollo de *Listeria monocytogenes*. Por otro lado, si el experimento se hubiera realizado a una temperatura de refrigeración el tiempo de inhibición de la película probablemente hubiera sido mucho mayor.

Del mismo modo, el comportamiento de la película bioactiva a base de gelana-pectina con la inclusión del CAM producido por *Streptococcus infantarius* y EDTA como agentes antimicrobianos se puede comparar con la película bioactiva formulada por Concha-Meyer et al. (2011), ya que ellos evaluaron el efecto antimicrobiano de películas elaboradas a base de alginato, nisina (con una concentración de 100 UI/mL) y dos cepas de BAL (3200 AU/mL BAL-A y 1600 AU/mL BAL-B), su único microorganismo de estudio fue *Listeria monocytogenes* (10^4 UFC/mL), el alimento en el que aplicaron la película fue en salmón

ahumado, llevando a cabo su experimento en condiciones de refrigeración a 4 °C durante 28 días.

Es de destacar la diferencia que existe entre las concentraciones utilizadas por Concha-Meyer et al. (2011) y en este trabajo de estudio; estos investigadores reportan la concentración de su agente antimicrobiano (nisina) en UI/mL y en este trabajo de investigación la concentración del CAM se midió en UA/mL, la diferencia resalta en que las Unidades Internacionales (UI) difiere de una sustancia a otra y es establecida por acuerdo internacional basada en su actividad biológica medida (o sus efectos); entonces 1 UI de nisina equivale a 0.025 µg, en cambio las Unidades Arbitrarias (UA) es la última dilución capaz de producir un alud de inhibición visible alrededor del pocillo o gota de algún agente antimicrobiano y es considerada según el criterio de cada investigador (Nuñez, 1996).

Igualmente, es importante comparar las concentraciones empleadas de los agentes antimicrobianos. La película formulada por Concha-Meyer et al. (2011), tenía 100 UI/mL de nisina, 3200 AU/mL de la BAL-A y 1600 AU/mL de la BAL-B, estas concentraciones son notablemente mayores a la concentración de 90 UA/mL del CAM producido por la bacteria ácido láctica *Streptococcus infantarius* adicionada a la película bioactiva.

Los resultados que alcanzaron fueron parecidos a los obtenidos en este trabajo de investigación, ya que ellos lograron reducir alrededor de 1.5 ciclos logarítmicos la concentración de su microorganismo de estudio (*Listeria monocytogenes*) a los 28 días de experimentación, siendo que su concentración inicial fue 10⁴ UFC/mL. La película bioactiva que se evaluó a base de gelana-pectina con la inclusión del CAM y EDTA en este trabajo de investigación, logró reducir 2 ciclos logarítmicos la concentración inicial (100 UFC/mL) del microorganismo patógeno (*Listeria monocytogenes*) a los 7 días de experimentación, la reducción en este caso implicó que ya no había más listeria (paso de 100 UFC a 0 UFC); destacando que nuestro experimento se realizó a una temperatura de 35 °C, temperatura óptima para el desarrollo del microorganismo patógeno de estudio. La película bioactiva a base de gelana-pectina logró obtener un éxito rotundo contra *Listeria monocytogenes*, ya que a pesar de manejar una concentración menor del CAM, según lo reportado con otros autores; y llevando a cabo el experimento a una temperatura de 35 °C pudo contener por completo el crecimiento del microorganismo indicador en estudio (Calderón-Aguirre et al., 2015).

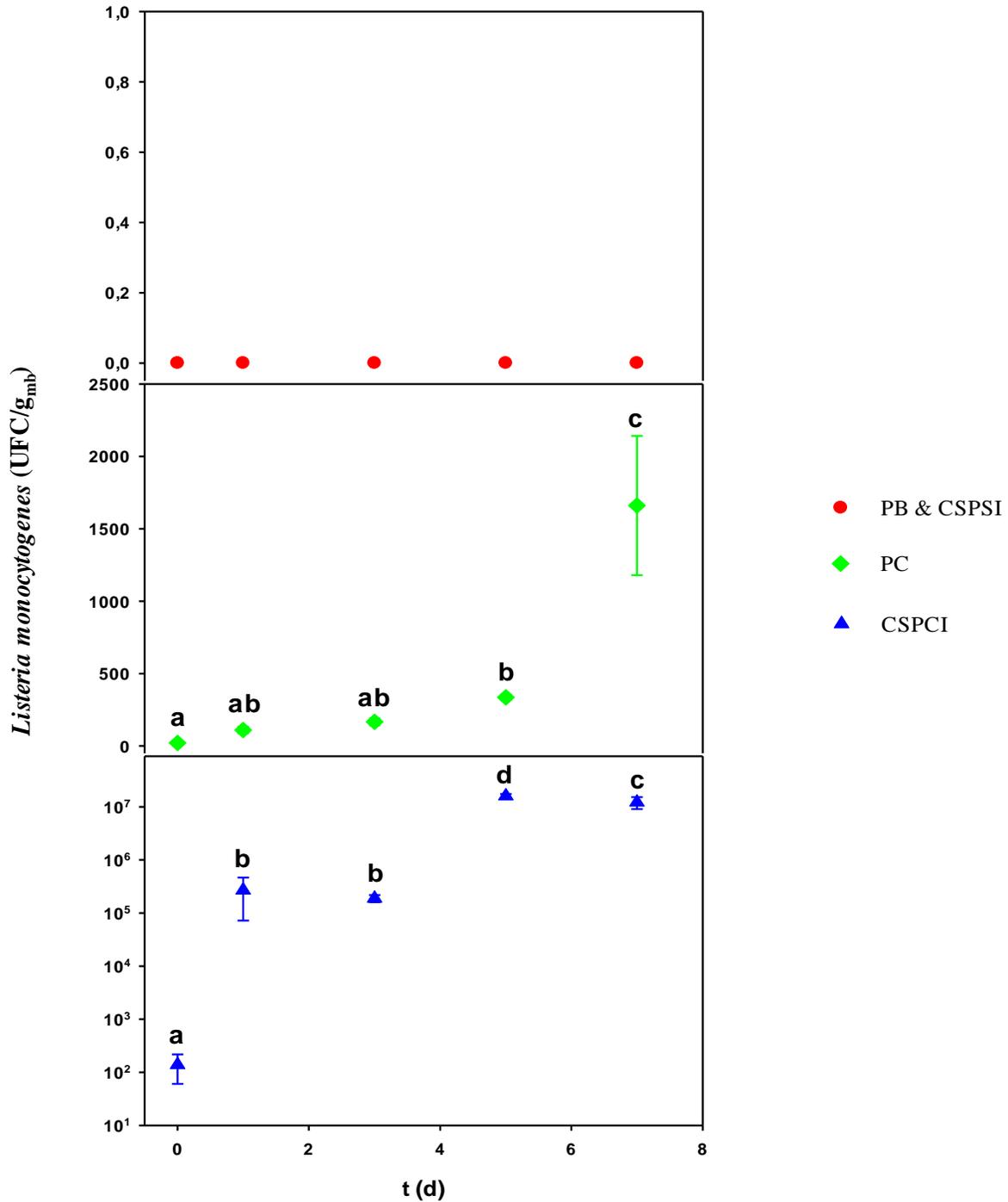


Figura 22. Efecto de películas con y sin compuestos antimicrobianos en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en medios elaborados a base de Barbacoa estilo Tulancingo, en los distintos tratamientos bajo condiciones de incubación a 35 °C. Se muestran los resultados de tres réplicas. (PB = Película Bioactiva; CSPSI = Control sin película, sin inóculo; PC = Película Control; CSPCI = Control sin película, con inóculo) *mb= medio Barbacoa.

La Figura 23 muestra el comportamiento de *Escherichia coli* en presencia de películas con y sin compuestos antimicrobianos, así como los controles empleados sobre los medios elaborados a base de Barbacoa estilo Tulancingo. El control (CSPSI), nuevamente corroboró la esterilidad de los medios a base de Barbacoa ya que no registró colonias bacterianas durante los 7 días que duró el experimento.

El control (CSPCI), en el cual no se colocó película alguna, pero sí el inóculo de la bacteria, presentó crecimiento evidente de *Escherichia coli* a partir del tiempo cero, es decir, desde que inició el experimento la concentración del microorganismo patógeno presentó una concentración de 10^3 UFC_{*E.coli*}/g de medio Barbacoa, hasta alcanzar 10^8 UFC_{*E.coli*}/g de medio Barbacoa en 24 h. Esta cuenta permaneció casi constante, manteniéndose en el mismo orden de magnitud hasta el término de las observaciones (día 7), según el análisis estadístico todos los muestreos revelaron diferencias significativas, a excepción del muestreo realizado en el día 1 y 7 que estadísticamente no exhiben diferencias significativas ($P < 0.05$).

Las cajas en las que se colocó la película control (solo los biopolímeros en su formulación) mostró en los primeros 3 días de experimentación una concentración menor a 50 UFC_{*E.coli*}/g de medio Barbacoa, sin diferencias significativas ($P < 0.05$) según el análisis estadístico. Logrando contener un poco el crecimiento de *Escherichia coli* en los primeros días de muestreo, después del día 3 de evaluación, el crecimiento del patógeno fue incrementando hasta alcanzar más de 300 UFC_{*E.coli*}/g de medio Barbacoa al día 7 de observación día en el que finalizó el experimento.

Comparando este resultado con la caja testigo, fue evidente que en los primeros tres días de evaluación la película biopolimérica logró inhibir el crecimiento del *Escherichia coli*. Este efecto de inhibición parcial puede atribuirse a algún tipo de sinergismo existente entre los componentes de la película (gelana-pectina), ya que se ha reportado y confirmado la actividad antimicrobiana de pectinas sobre microorganismos como *Bacillus cereus* y *Escherichia coli* (Calderón Aguirre, 2014; P. J. P. Espitia et al., 2014).

Por otra parte, la película bioactiva (90 UA/mL del CAM más EDTA 0.05 M) mostró una evidente y contundente actividad antimicrobiana sobre *Escherichia coli* ya que logró inhibir por completo el crecimiento del microorganismo de estudio hasta el término del

experimento, estando los tratamientos a una temperatura de incubación de 35 °C durante 7 días.

Es indudable el sinergismo que existe entre los agentes antimicrobianos adicionados a la película bioactiva, el concentrado con actividad antimicrobiana producido por *Streptococcus infantarius* y el EDTA. Este efecto antimicrobiano se puede atribuir a que el EDTA al ser un agente quelante, logra formar complejos con cationes divalentes principalmente Ca^{2+} y Mg^{2+} , presentes en la membrana celular de las bacterias logrando inestabilizar la pared celular, permitiendo que agentes antimicrobianos como las bacteriocinas logren entrar y puedan ejercer su acción bactericida o bacteriolítica de mejor manera, potencializando su efecto antagónico sobre bacterias taxonómicamente relacionadas ya sean patógenos o causantes de deterioro e incluso mostrando un efecto antimicrobiano mejorado sobre bacterias Gram (-) como lo es *Escherichia coli* (Economou et al., 2009; Sivarooban et al., 2008).

Los resultados obtenidos se pueden comparar con los reportados por Gadang et al. (2008), ya que ellos evaluaron películas a base de proteína de suero de leche, incorporando extracto de semilla de uva (0.5 %), nisina (6000 UI/g), ácido málico (1.0 %) y EDTA (1.6 mg/mL igual a 0.0054 M) en combinación para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7 y *Salmonella typhimurium* en un sistema de salchichas de pavo inoculado con una concentración inicial de aproximadamente 10^6 UFC/g, las muestras fueron almacenadas a 4 °C durante 28 días. La población inicial de *Escherichia coli* O157: H7 (6.15 log/g) se redujo 3.85 ciclos log al día 28 de experimentación a una temperatura de refrigeración (4 °C) con la película que contenía en su formulación nisina, ácido málico y EDTA; del mismo modo se redujo 4.6 ciclos en el día 28 de almacenamiento respecto a la concentración del tratamiento control que se tenía una concentración de 6.9 Log UFC/g.

La película bioactiva a base de gelana-pectina con la incorporación de 90 UA/mL del CAM producido por *Streptococcus infantarius* y una solución EDTA 0.05 M logró reducir la concentración inicial (100 UFC/mL) del patógeno 2 ciclos logarítmicos y 8 ciclos logarítmicos en comparación con el control CSPCI al día 7 de observación.

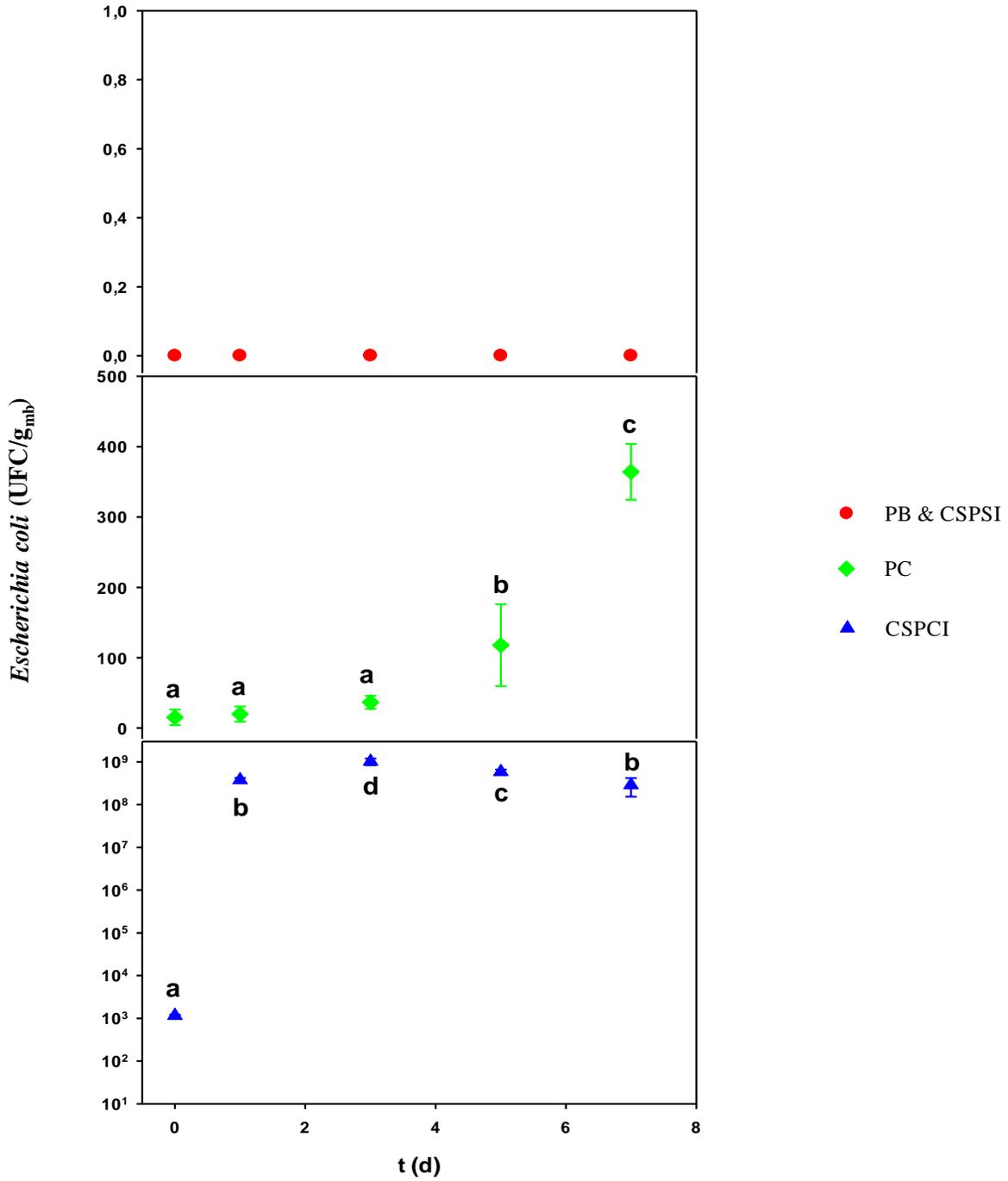


Figura 23. Efecto de películas con y sin compuestos antimicrobianos en el crecimiento de *Escherichia coli* en medios elaborados a base de Barbacoa estilo Tulancingo, en los distintos tratamientos bajo condiciones de incubación a 35 °C. Se muestran los resultados con sus tres réplicas. (PB = Película Bioactiva; CСПSI = Control sin película, sin inóculo; PC = Película Control; CСПCI = Control sin película, con inóculo) *mb= medio Barbacoa.

La Figura 24 muestra el comportamiento de *Staphylococcus aureus* en presencia de la película control y la película bioactiva (90 UA/mL del CAM más EDTA 0.05 M), así como de los controles de estudio sobre medios de crecimiento elaborados a base de Barbacoa estilo Tulancingo. El control se esterilidad (CSPSI), se comportó del mismo modo que para las otras dos bacterias (*Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*), no hubo crecimiento microbiano, confirmando la esterilidad de los medios a base de Barbacoa estilo Tulancingo.

El control (CSPCI) en el cual no se colocó película alguna, pero si el inóculo de la bacteria, presentó crecimiento evidente de *Staphylococcus aureus* a partir del tiempo cero, es decir, que desde que dio inicio el experimento la concentración del microorganismo patógeno presentó un orden de magnitud de 10^2 UFC_{*S. aureus*}/g de medio Barbacoa, hasta alcanzar 10^8 UFC_{*S. aureus*}/g de medio Barbacoa en el muestreo que se realizó a las 24 h, la cual se mantuvo constante hasta el día 7, ya que no mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) según el análisis estadístico para el día 1, 3 y 7. La concentración máxima de la población de *Staphylococcus aureus* se registró en el día 5 de monitoreo, ya que se observaron diferencias significativas respecto a los otros días de evaluación.

Las cajas en las que se colocó la película control (solo gelana-pectina en su formulación) mostró un control aparente en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* durante las primeras 24 h, ya que el recuento de UFC se mantuvo cercano a 0. Para el día 3 de muestreo se pudieron contar poco menos de 100 UFC_{*S. aureus*}/g de medio Barbacoa, concentración que fue aumentando gradualmente hasta alcanzar una población de alrededor de 270 UFC_{*S. aureus*}/g de medio Barbacoa para el día 7, día en el que culminó el experimento.

Comparando este resultado con la caja testigo del inóculo, fue evidente que la película biopolimérica a base de gelana-pectina logró inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* durante las primeras 24 h. En comparación con los otros dos microorganismos de estudio (*Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*) la película control logró impedir la proliferación de estos dos patógenos por más tiempo, alrededor de 3 días.

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

Los resultados obtenidos de la película bioactiva (90 UA/mL del CAM más EDTA 0.05 M) contra *Staphylococcus aureus* se puede comparar con lo reportado por Millette et al. (2007), donde inmovilizaron 0, 500 o 1000 UI/mL de nisina en películas elaboradas a base de alginato y evaluaron la actividad antimicrobiana de la película elaborada contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 con un inóculo inicial de 10^4 UFC/g sobre rodajas de carne de ternera durante el almacenamiento a 4 °C. Los resultados que obtuvieron demostraron una reducción de 0.91 y 1.86 log UFC/cm² después de 7 días de almacenamiento en la carne que era cubierta con la película que contenía 500 o 1000 UI/mL de nisina, respectivamente. En cambio, la película bioactiva formulada con la inclusión de los agentes antimicrobianos del CAM y EDTA manifestó una reducción de 2 ciclos logarítmicos del inóculo inicial (100 UFC/mL) de *Staphylococcus aureus* a los 7 días de evaluación, una reducción mayor en comparación con lo que obtuvieron Millette et al. (2007).

En resumen, podemos destacar que la película bioactiva formulada a base de gelanpectina con la inclusión de 90 UA/mL del CAM producido por *Streptococcus infantarius* más EDTA 0.05 presentó una contundente actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, ya que logró inhibir por completo el desarrollo de los tres microorganismos patógenos en medios a base de barbacoa estilo Tulancingo.

Medios que brindaban las condiciones óptimas para el desarrollo de las bacterias, como los nutrientes necesarios para la proliferación de los microorganismos indicadores, así como la humedad adecuada para su desarrollo; sin olvidar que el experimento se realizó a una temperatura de incubación de 35 °C, temperatura conveniente para el crecimiento de los microorganismos en estudio.

Es por eso, que la película bioactiva evaluada podría tener un uso potencial en el campo de la bioconservación de alimentos, utilizándose como un empaque activo con actividad antimicrobiana contra un espectro amplio de bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas que afectan la seguridad de los alimentos. Este experimento se realizó en medios a base de Barbacoa estilo Tulancingo, pero puede ser una plataforma que permita la utilización de esta película en otros alimentos con características similares y que se vean afectados por los mismos microorganismos patógenos.

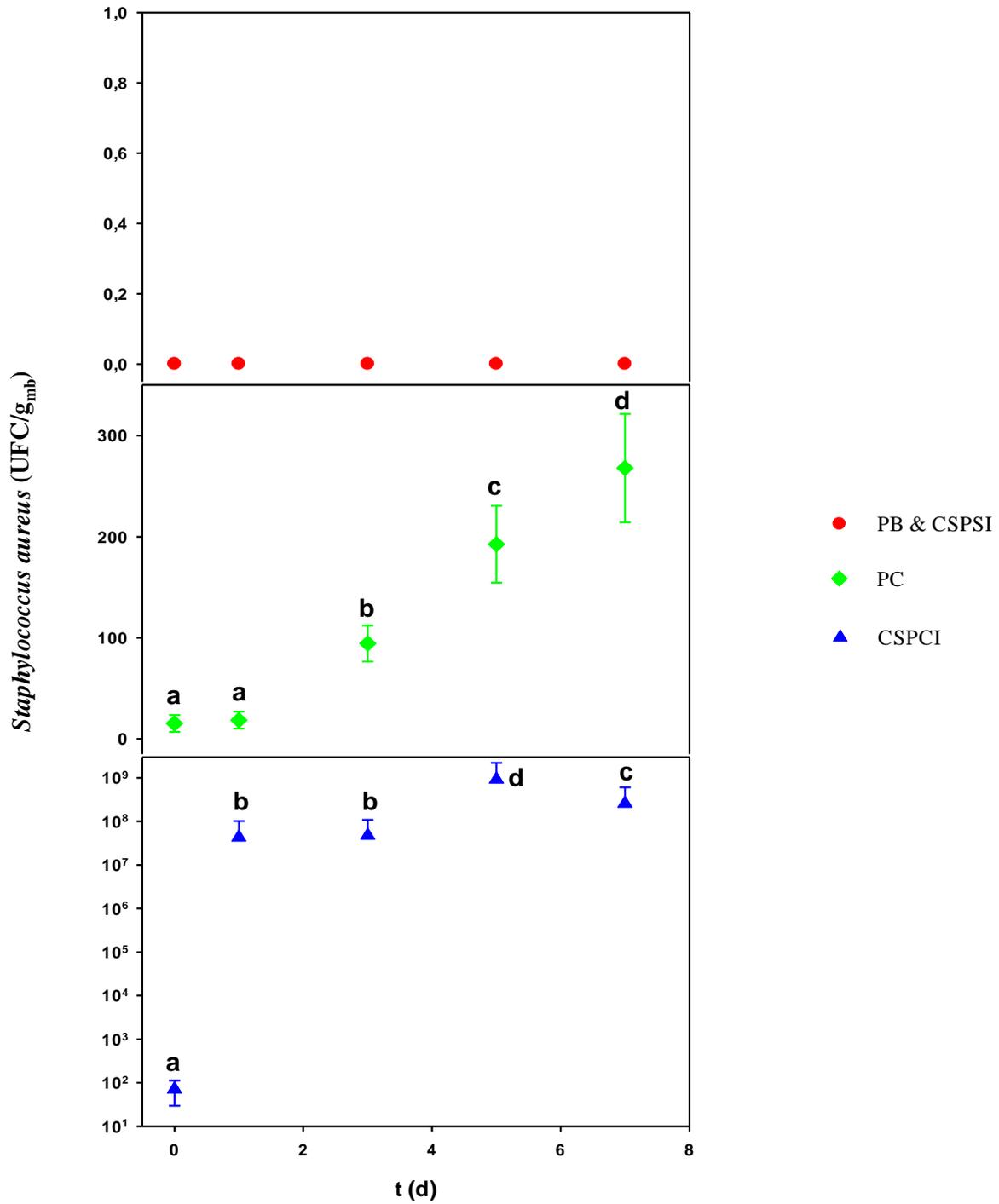


Figura 24. Efecto de películas con y sin compuestos antimicrobianos en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en medios elaborados a base de Barbacoa estilo Tulancingo, en los distintos tratamientos bajo condiciones de incubación a 35 °C. Se muestran los resultados con sus tres réplicas. (PB = Película Bioactiva; CSPSI = Control sin película, sin inóculo; PC = Película Control; CSPCI = Control sin película, con inóculo) *mb= medio Barbacoa.

9.5 Propiedades mecánicas de la película con agentes antimicrobianos

Las películas comestibles destinadas al empaqueo de alimentos deben de caracterizarse mecánicamente con el objetivo de conocer su comportamiento y así poder adaptarse a su posible deformación una vez que sean aplicadas al producto de interés. A las películas comestibles analizadas se les determinó:

- ❖ **Esfuerzo a la fractura (σ_f):** indica el esfuerzo verdadero al momento de la fractura de la película.
- ❖ **Porcentaje de elongación (%E):** revela el incremento de la longitud de la película antes de la fractura.
- ❖ **Módulo de Young (ME):** es la pendiente de la zona lineal de la gráfica esfuerzo-deformación.

Valores grandes de esfuerzo y elongación, combinados con valores bajos de módulo de Young, son asociados con películas difíciles de esterilizar y romper. Por el contrario, valores bajos de esfuerzo y módulo de Young, combinados con altos valores de elongación, son exhibidos por películas fáciles de estirar, pero difíciles de romper (Arredondo Ochoa, 2012).

En la Tabla 13 se presentan las propiedades mecánicas evaluadas en la película control (biopolimérica) y la película bioactiva con agentes antimicrobianos (i.e., CAM producido por *Streptococcus infantarius* y EDTA).

Los resultados implicaron diferencias significativas entre los dos tratamientos evaluados (película control y bioactiva), lo cual sugiere que la incorporación de los agentes antimicrobianos, provocó que la película fuera menos rígida.

Tabla 13. Propiedades mecánicas de las películas evaluadas, con y sin sustancias antimicrobianas.

Tratamiento	Deformación de Hencky en el punto de fractura (ϵ_f , %)	Esfuerzo verdadero (σ_f , MPa)	Módulo de Young (ME, MPa)	% de Elongación (%E)
Película Control (Biopolímeros)	3.84 ± 0.79	12.58 ± 1.28	706.55 ± 47.75	9.26 ± 1.97
Película Bioactiva (90 UA/mL del CAM más EDTA 0.05 M)	0.80 ± 0.16	5.65 ± 0.67	1393.72 ± 144.24	1.86 ± 0.39

Valores promedio ± desviación estándar.

La película control mostró un valor de 706.55 MPa para ME, siendo casi la mitad al correspondiente de la película bioactiva (1,393.72 MPa). Cuanto más altos son los valores del módulo de Young, también conocido como módulo elástico de las películas, mayor es el carácter sólido de las mismas (Mendoza Mendoza, 2012).

El valor más pequeño para ME lo presentó la película biopolimérica control (i.e., gelana-pectina y plastificante). Este resultado sugiere que el CAM, mezcla compleja de sustancias antimicrobianas producidas por *Streptococcus infantarius* y remanentes del medio de cultivo MRS, pudiera estar actuando como un plastificante adicionales. Estos componentes podrían disminuir la cohesión de la película al disminuir las fuerzas de interacción entre las cadenas de los polímeros que conforman la matriz estructural, provocando que las cadenas tengan menos restricciones para relajarse, dando lugar a películas más flexibles, menos rígidas (Calderón Aguirre, 2014).

La película bioactiva exhibió un valor de ME parecido a lo reportado por Shankar, Teng, Li, and Rhim (2015), ya que encontraron un ME de 1451.2 MPa en películas elaboradas con gelatina. Por otro lado, Calderón-Aguirre et al. (2015), adquirieron valores de ME para películas a base de caseinato y caseinato con nisina (761.70 y 752.53 MPa, respectivamente) similares a los hallados en el presente trabajo de investigación para la película control.

Con relación al %E, también se observaron diferencias significativas: la película bioactiva mostró un valor de 1.86 %, menor al alcanzado por la película control que fue de 9.26 % lo que representó una pobre capacidad de elongación de las películas. El porcentaje de elongación reportado en el presente trabajo para la película control es mayor que lo hallado por Shankar et al. (2015) en películas a base de gelatina (7.3 %). Del mismo modo, los valores encontrados de %E para la película control y bioactiva son mucho menores en comparación con el comportamiento que exhiben las películas derivadas del petróleo, películas de polietileno de baja densidad tienen valores de %E alrededor de 200 %, es decir, que el incremento de la longitud de la película antes de la fractura es del doble en comparación con su longitud inicial (Ali Dadfar, Alemzadeh, Reza Dadfar, & Vosoughi, 2011).

Por otra parte, los valores de elongación determinados fueron congruentes con los valores ME: las películas menos rígidas (valores menores de ME), fueron las más extensibles con valores cercanos al 10%, mientras que las más rígidas apenas se deformaron hasta un 2% (Tabla 13).

En lo referente al parámetro σ_f , el valor fue el obtenido con la película control, 12.58 MPa, siendo 2.22 veces el alcanzado por la película bioactiva, 5.65 MPa; al parecer la incorporación de los agentes antibacterianos provocó una reducción en el esfuerzo de tensión de las películas. Calderón-Aguirre et al. (2015) hallaron valores parecidos de σ_f , 4.01 y 7.35 MPa, para películas elaboradas a base de caseinato y caseinato con la inclusión de CAM producido por *Streptococcus infantarius* (i.e., el mismo aditivo usado en esta investigación), respectivamente. Por lo general, la presencia de plastificantes aumenta los valores de deformación y disminuye el esfuerzo y el módulo elástico. Ésto se debe a que los plastificantes pueden aumentar el volumen libre en la fase amorfa y reducen la interacción entre las cadenas de del polímero (Xiao et al., 2011; Yang, Paulson, & Nickerson, 2010).

Diversas investigaciones se han enfocado al estudio de las propiedades mecánicas de las películas comestibles adicionadas con sustancias antimicrobianas, sin embargo, la comparación de los resultados no es fácil, ya que éstos son muy variables y 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.).

La Figura 25 muestra el reograma representativo de las películas investigadas en el presente trabajo. Es evidente una zona plástica más pronunciada para la película control. En contraste las películas bioactivas fueron menos plásticas (deformaciones pequeñas antes de la fractura) y más rígidas (pendientes mayores en la zona lineal esfuerzo-deformación).

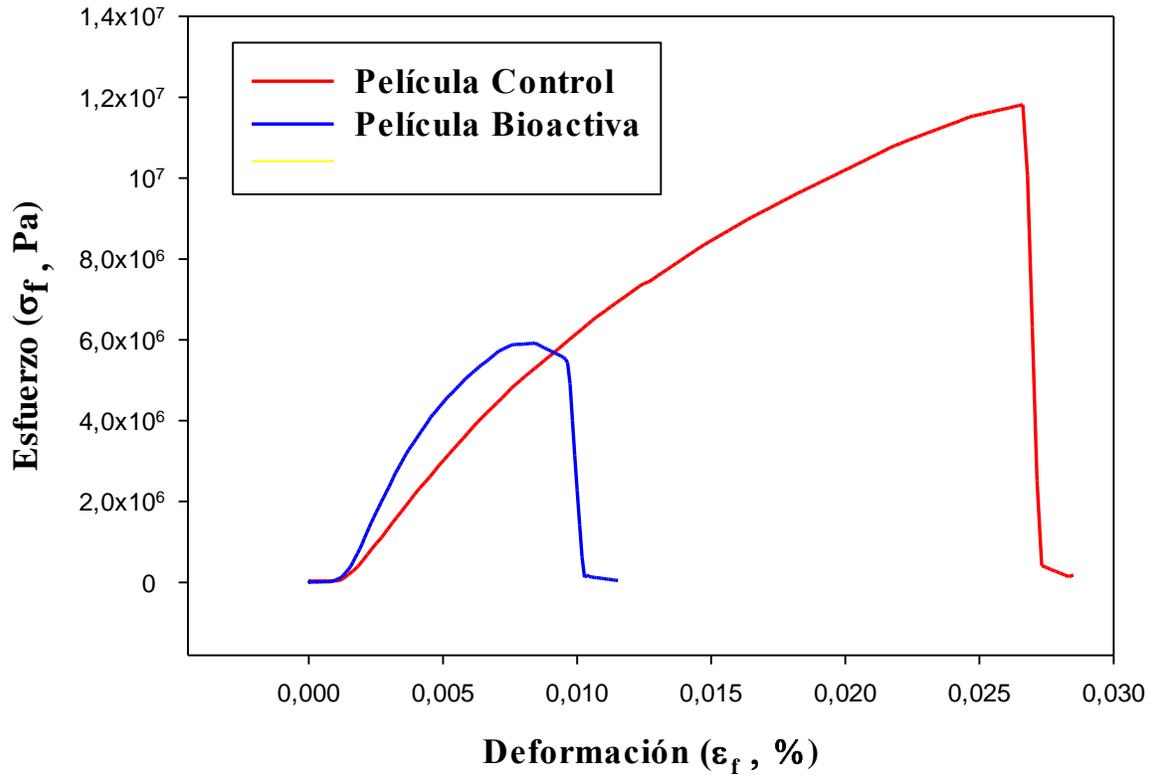


Figura 25. Reogramas representativos de la película control (biopolimérica) y bioactiva (90 UA/mL del CAM producido por *Streptococcus infantarius* más EDTA 0.05 M.)

9.6 Propiedades de barrera

9.6.1 Permeabilidad al oxígeno (PO₂) de la película con agentes antimicrobianos

Las propiedades de barrera a los gases de las películas comestibles son potencialmente de gran interés y deben ser específicas de acuerdo al alimento al que van a ser aplicados. Las películas comestibles con permeabilidades bajas al O₂ pueden ser utilizadas para proteger aquellos alimentos que son susceptibles a la oxidación (enranciamiento, pérdida de vitaminas oxidables, etc.). Por el contrario, una permeabilidad a los gases relativamente

alta es necesaria para productos hortofrutícolas frescos (especialmente la permeabilidad al CO₂). El desarrollo de una película comestible con una permeabilidad selectiva a los gases (O₂, CO₂, C₂H₄), permite el control en el intercambio respiratorio, desarrollo microbiano y generación de reacciones químicas y enzimáticas en un alimento (Arredondo Ochoa, 2012; Mendoza Mendoza, 2012).

La Tabla 14 muestra los valores de PO₂ determinados en las películas de los dos 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 ($1.25 \times 10^{-12} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$), CMC 0.25 % ($5.54 \times 10^{-12} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$), gelatina bovina, porcina y de salmón (3.96, 3.98, $2.94 \times 10^{-12} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$) (Rocío Yaneli 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 del CAM más EDTA 0.05 M)	1.94 ± 1.16

Valores promedio (n=5) ± desviación estándar.

Las películas elaboradas a partir de pectina-gelana, adicionadas con el CAM producido por *Streptococcus 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 % ($3.29, 2.41, 2.47 \times 10^{-9} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$) (Rocío Yaneli Aguirre-Loredo, 2011) ya que con los resultados obtenidos en este trabajo presentan una diferencia de tres órdenes de magnitud, por lo que la película bioactiva impide en mayor medida el paso de moléculas de O₂ a través de si misma.

Los resultados obtenidos de PO₂ 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) siendo son dos órdenes de magnitud más pequeños en comparación

con las películas de estudio, es decir, que las películas evaluadas (control y bioactiva) son más permeables al oxígeno.

Bonilla, Atarés, Vargas, and Chiralt (2012), reportan algunos valores de permeabilidad al oxígeno para películas de polisacáridos (metilcelulosa $12.8 \times 10^{-16} \text{ g m m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$), películas de proteínas (aislado de proteína de suero:sorbitol $39.9 \times 10^{-16} \text{ g m m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$) y algunos polímeros sintéticos (PET: $1.2 \times 10^{-16} \text{ g m m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$), pudiendo observarse que las películas a base de biopolímeros muestran excelente barrera al oxígeno, en comparación con los materiales sintéticos, incluso en algunos casos este valor es menor, lo que hace interesante para la aplicación en alimentos, ya que ayudarían a prolongar la vida útil de un producto por más tiempo.

Las características de permeabilidad dependen de diversos factores tales como la humedad relativa, si ésta incrementa, más moléculas de agua interactúan con el material y tienen un efecto plastificante sobre la película, en estas condiciones la movilidad y la transferencia de masa se ven favorecidas, aumentando los valores de permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno (R. Y. Aguirre-Loredo, Rodriguez-Hernandez, Morales-Sanchez, Gomez-Aldapa, & Velazquez, 2016; Bonilla et al., 2012).

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, 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.

9.6.2 Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de la película con agentes antimicrobianos

La norma ASTM E96-00 (ASTM, 2000) define a la permeabilidad como la tasa de transmisión de vapor de agua a través de una unidad de área de material plano con espesor inducido por una diferencia de presión de vapor entre dos superficies específicas, bajo condiciones de humedad y temperatura definidas (Aristippos Gennadios, Weller, & Gooding, 1994).

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) es una propiedad importante ya que indica la habilidad de la película para controlar el transporte de vapor de agua entre un sistema alimentario y sus alrededores (Aristippos Gennadios et al., 1994). La PVA es crucial debido a que la mayoría de los biopolímeros son muy propensos a plastificarse con agua, lo cual puede modificar las características de la matriz polimérica (Rocío Yaneli Aguirre-Loredo, 2011).

Para el cálculo de la PVA de películas hidrofílicas, se conceptuaron 3 etapas: el primer mecanismo para el flujo del vapor de agua por la película, difusión a través de la película y finalmente el paso al otro lado 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, considerando el área de la lámina en donde se presenta la menor HR interna (R. Y. Aguirre-Loredo et al., 2016; Calderón-Aguirre et al., 2015; Mendoza Mendoza, 2012).

La Tabla 15 muestra los resultados obtenidos para PVA de las películas de gelanpectina con y sin sustancias antimicrobianas (CAM producido por *Streptococcus infantarius* y EDTA).

Tabla 15. Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de películas con y sin sustancias antimicrobianas.

Tratamiento	PVA $\times 10^{-11}$ (g m Pa ⁻¹ s ⁻¹ m ⁻²),
Película Control (Biopolímeros)	19.8 ± 0.42
Película Bioactiva (90 UA/mL del CAM más EDTA 0.05 M)	2.88 ± 0.80

Valores promedio (n=3) ± desviación estándar.

En contraste las películas elaboradas en el presente trabajo fueron menos permeables con lo reportado por González and Alvarez Igarzabal (2015), donde obtuvieron valores de PVA=4.3 $\times 10^{-10}$ g / s · Pa · m para películas con proteína de soya. De igual modo en el caso de películas de quitosano PVA= 1.2 $\times 10^{-10}$ g / s · Pa · m con la inclusión de aceites esenciales según lo reportado por Sun et al. (2014). También en comparación con películas a base de metilcelulosa PVA=3.93 $\times 10^{-10}$ g / s · Pa · m conforme a lo obtenido por Takala et al. (2013). Y para películas de aislado de proteína de soya y gluten de trigo con glicerol (3.03 y 1.25 $\times 10^{-9}$ g / s · Pa · m respectivamente) y películas de alginato y gelana (0.30 y 0.31 $\times 10^{-9}$ g / s · Pa

· m) (Mendoza Mendoza, 2012), se puede observar que la película control y bioactiva son mejor barrera al vapor de agua.

Como se puede observar la película bioactiva de gelana-pectina con la inclusión del CAM y EDTA son mejor barrera al vapor de agua que la película control (bipolimérica), pudiendo ser comparados con los plásticos sintéticos como el polietileno de baja densidad (2.2×10^{-11} g / s · Pa · m), polietileno de alta densidad (5.5×10^{-12} g / s · Pa · m) y el celofán (8.4×10^{-11} g / s · Pa · m) (Hernandez-Izquierdo & Krochta, 2008; Khwaldia, Perez, Banon, Desobry, & Hardy, 2004) ya que se encuentran en el mismo orden de magnitud, proponiendo a las películas de estudio como una buena opción para detener la migración del vapor de agua.

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).

Asimismo, la PVA depende en gran medida de la estructura de la matriz polimérica (el acomodo de las cadenas del polímero), esta estructura puede verse alterada por diversos factores, tales como, el método de elaboración, método de secado, condiciones en las que se lleva a cabo la prueba, temperatura y humedad de antes de la prueba, así como la incorporación de sustancias como antioxidantes o antimicrobianos que de acuerdo con su naturaleza química pueden interactuar con las cadenas del polímero disminuyendo así la cohesividad de la película, provocando el incremento de la PVA (R. Y. Aguirre-Loredo et al., 2016; Calderón-Aguirre et al., 2015; Mendoza Mendoza, 2012).

9.7 Determinación de la solubilidad

La solubilidad es la medida o magnitud que indica la cantidad máxima de soluto que puede disolverse en una cantidad determinada de solvente, a una temperatura dada. Esta propiedad es de gran importancia para determinar la funcionalidad de la película comestible (Mendoza Mendoza, 2012).

La resistencia al agua de películas comestibles portadoras de antimicrobianos es deseable para mantener la integridad de la película si la misma debe utilizarse para la conservación de alimentos de humedad intermedia a alta (Rocío Yaneli Aguirre-Loredo, 2011). Una película antimicrobiana con pobre resistencia al agua se disuelve rápidamente en contacto con altos contenidos de humedad, determinando que la película libere el agente antimicrobiano (Arredondo Ochoa, 2012). Sin embargo, estas coberturas podrían utilizarse en alimento listos para consumir donde es deseable un alto porcentaje de solubilidad en la boca.

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 (Calderón Aguirre, 2014).

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 del CAM más EDTA 0.05 M)	91.99±3.53

Valores promedio (n=4) ± desviación estándar.

La película bioactiva adicionada con el CAM de *Streptococcus infantarius* y EDTA presentó los valores más altos de solubilidad (92 %). Esto puede atribuirse a las posibles interacciones moleculares entre los agentes antimicrobianos (CAM y EDTA) y los biopolímeros, generando una matriz con mayor afinidad hacia compuestos polares como el agua.

Los resultados obtenidos demuestran que la adición de las sustancias antimicrobianas si altera la solubilidad de las películas en agua, debido a que existen diferencias significativas entre los dos tratamientos. Se encontró que la película bioactiva es casi totalmente soluble en agua (mayor al 90%) lo que resulta benéfico para su degradabilidad al ser desechadas. Sin embargo, en las películas comestibles con antimicrobianos son deseables solubilidades en agua menores, para poder ser utilizadas en alimentos con alta contenido de humedad. Una película con capacidad antimicrobiana que tiene pobre resistencia al agua (alta solubilidad), se disuelve rápidamente, causando que la película pierda el agente antimicrobiano (Mendoza Mendoza, 2012).

Los datos obtenidos en este trabajo se pueden comparar con lo reportado por Beristain-Bauza et al. (2016) para películas elaboradas a base de proteína de suero (WPI) o caseinato de calcio (CC) con el sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-442, ya que observaron valores de solubilidad del 72 % para las películas de WPI y 83 % para películas de CC.

M. d. Rocha et al. (2014), determinaron la solubilidad de películas a base de proteína de sardina argentina o anchoíta con ácido ascórbico (SA) o ácido benzoico (BA) incorporados en diversas concentraciones, encontraron valores que iban del 28 al 65 % de solubilidad en agua.

Los dos estudios antes mencionados mostraron películas con menores valores de solubilidad, esto se puede atribuir a la formación de redes más compactas, menos plastificadas y por lo tanto con menor capacidad de hinchamiento por sorción de agua.

Calderón Aguirre (2014), obtuvo valores de solubilidad para pectinas elaboradas a base de pectina y gelana con la inclusión de nisina como agente antimicrobiano del 54 %, mientras que las películas con la misma matriz biopolimérica pero con la inclusión del concentrado

con actividad antimicrobiana producido por *Streptococcus infantarius* obtuvo un valor de solubilidad del 93 %. En este mismo estudio la película de caseinato con nisina mostró una solubilidad del 73 % y la película de caseinato con el péptido activo producido por *Streptococcus infantarius* tuvo una solubilidad del 97 %.

Mendoza Mendoza (2012), encontró que películas elaboradas con caseinato de sodio, glicerol y distintas concentraciones de sustancias antimicrobianas producidas por la BAL (*Streptococcus infantarius*) aislada del pozol, misma bacteria que se utilizó en el estudio antes mencionado tienen una solubilidad mayor al 90 %.

Los valores reportados en los dos estudios antes descritos son muy parecidos a la solubilidad de la película de gelana-pectina bioactiva, la resistencia al agua es una propiedad importante de las películas biodegradables para aplicaciones como protección de alimentos en donde la actividad del agua es alta, o cuando la película tiene que estar en contacto con agua durante el almacenamiento de alimentos recubiertos, como por ejemplo evitar la exudación de productos frescos o procesados.

Sin embargo, una alta solubilidad puede ser una desventaja para algunas aplicaciones, cuando las películas serán consumidas con un producto que será calentado antes de su consumo (Rocío Yaneli Aguirre-Loredo, Rodríguez-Hernández, & Chavarría-Hernández, 2014).

Las diferencias en la solubilidad de las películas es debida a diversos factores, tales como, naturaleza del polímero, algunos son más hidrofílicos que otros, también el tipo de plastificante utilizado, además de las condiciones de prueba ya que la solubilidad es dependiente de la temperatura.

10 CONCLUSIONES

Con base en los resultados generados en este trabajo se concluye que los compuestos antimicrobianos producidos por *Streptococcus infantarius*, bacteria aislada del pozol, tienen actividad antilisterial, siendo el más efectivo el concentrado obtenido a las 6 horas de fermentación.

Se encontró que una concentración de 90 UA/mL del CAM inhibe el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, la mezcla de 90 UA/mL del CAM con una solución de EDTA 0.05 M mostró un efecto sinérgico ya que presentó efecto antagónico contra *Escherichia coli* y la solución de EDTA 1×10^{-3} M fue capaz de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

En las películas gelana-pectina se comprobó que pectina presenta actividad antimicrobiana sobre los microorganismos patógenos; en las películas bioactivas se detectó un efecto sinérgico entre el CAM y el EDTA en las concentraciones usadas (75, 90, 120 UA/mL del CAM y EDTA 0.05 M) ya que inhibió completamente el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en sus medios selectivos/diferenciales durante 30 días a 25 °C.

En el medio elaborado a base de barbacoa estilo Tulancingo, la película bioactiva (90 UA/mL del CAM más EDTA 0.05 M) inhibió totalmente el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* durante 7 días; llevando a cabo el experimento en condiciones óptimas para el desarrollo del microorganismo indicador, una temperatura de incubación de 35 °C.

Las propiedades mecánicas de películas elaboradas con gelana-pectina, glicerol (5% p/v) y con la inclusión de sustancias antimicrobianas fueron evaluadas; el Módulo de Young aumentó, el porcentaje de elongación disminuyó al igual que el esfuerzo a la fractura al adicionar los agentes antimicrobianos, en comparación con la película biopolimérica.

Por otro lado, la película bioactiva presentó una permeabilidad al vapor de agua de 2.88×10^{-11} (g m) / (Pa s m²) y una permeabilidad al oxígeno de 3.79×10^{-12} (g m) / (Pa s m²), estos valores son menores a los reportados para películas elaboradas a base de caseinato de calcio y proteína de suero de leche.

Asimismo, la película bioactiva fue altamente soluble (92 %), mayor que la película control (77 %), esto indica que la película bioactiva de estudio es altamente biodegradable, lo que resulta benéfico ya que puede ser propuesto como un empaque amigable con el ambiente.

11 BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, Leonardo, Corbalan, Natalia S., Fernandez-No, Inmaculada C., Morero, Roberto D., Barros-Velazquez, Jorge, & Bellomio, Augusto. (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
- Adriane Alexandre Machado de Melo, Robson Maia Geraldine, Miriam Fontes Araujo Silveira, Maria Célia Lopes Torres, Cíntia Silva Minafra e Rezende, Thiago Henrique Fernandes, Antonio Nonato de Oliveira. (2012). Microbiological quality and other characteristics of refrigerated chicken meat in contact with cellulose acetate-based film incorporated with rosemary essential oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1419-1427.
- Aguirre-Loredo, R. Y., Rodriguez-Hernandez, A. I., Morales-Sanchez, E., Gomez-Aldapa, C. A., & Velazquez, G. (2016). Effect of equilibrium moisture content on barrier, mechanical and thermal properties of chitosan films. *Food Chem*, 196, 560-566. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.09.065
- Aguirre-Loredo, Rocío Yaneli. (2011). *Efecto del ácido oleico sobre las propiedades de transferencia de masa de películas biodegradables de quitosano*. (Tesis de Maestría), Universidad Autónoma de Tamaulipas, Reynosa, Tamaulipas, México.
- Aguirre-Loredo, Rocío Yaneli, Rodríguez-Hernández, Adriana Inés, & Chavarría-Hernández, Norberto. (2014). Physical properties of emulsified films based on chitosan and oleic acid. *CyTA - Journal of Food*, 12(4), 305-312. doi: 10.1080/19476337.2013.853207
- Ali Dadfar, S. M., Alemzadeh, I., Reza Dadfar, S. M., & Vosoughi, M. (2011). Studies on the oxygen barrier and mechanical properties of low density polyethylene/organoclay nanocomposite films in the presence of ethylene vinyl acetate copolymer as a new type of compatibilizer. *Materials & Design*, 32(4), 1806-1813. doi: 10.1016/j.matdes.2010.12.028
- Arredondo Ochoa, Teresita. (2012). *Diseño de empaques comestibles activos a base de almidón modificado para su posible aplicación en alimentos en fresco*. (Tesis de Maestría), Universidad Autónoma De Querétaro, Querétaro, México.
- Ashokkumar, S., Sree Krishna, R., Pavithra, V., Hemalatha, V., & Ingale, Priya. (2011). Production and antibacterial activity of bacteriocin by *Lactobacillus paracasei* isolated from donkey milk. *INT J CURR SCI I*, 109-115.
- ASTM (1998). Standard test method for determining gas permeability characteristics of plastic film and sheeting. D1434-82. Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia, PA: *American Society for Testing and Materials*.
- ASTM (2000). Standard methods for water vapor transmission of material. E96-00. Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia, PA: *American Society for Testing and Materials*.
- ASTM (2010). Standard Test Method for Tensile Properties of thin plastic sheeting, D882-10. Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia, PA: *American Society for Testing and Materials*.

- Balasubramanian, Aishwarya , Rosenberg, Linda E., Yam, Kit L., & Chikindas, Michael (2009). Antimicrobial Packaging: Potential vs. Reality—A Review. *Journal of Applied Packaging Research*, 3, 193-221.
- Balciunas, Eduardo Marcos, Castillo Martinez, Fabio Andres, Todorov, Svetoslav Dimitrov, Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo, Converti, Attilio, & Oliveira, Ricardo Pinheiro de Souza. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 32(1), 134-142. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.11.025
- Bangyekan, Cholwasa, Aht-Ong, Duangdao, & Srikulkit, Kawee. (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
- Barbiroli, Alberto, Bonomi, Francesco, Capretti, Giorgio, Iametti, Stefania, Manzoni, Matilde, Piergiovanni, Luciano, & Rollini, Manuela. (2012). Antimicrobial activity of lysozyme and lactoferrin incorporated in cellulose-based food packaging. *Food Control*, 26(2), 387-392. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.01.046
- Barbosa-Pereira, Letricia, Angulo, Inmaculada, Lagarón, José Maria, Paseiro-Losada, Perfecto, & Cruz, Jose M. (2014). Development of new active packaging films containing bioactive nanocomposites. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 26, 310-318. doi: 10.1016/j.ifset.2014.06.002
- Bayarri, Mélanie, Oulahal, Nadia, Degraeve, Pascal, & Gharsallaoui, Adem. (2014). Properties of lysozyme/low methoxyl (LM) pectin complexes for antimicrobial edible food packaging. *Journal of Food Engineering*, 131, 18-25. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2014.01.013
- Beristain-Bauza, S. C., Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2016). Antimicrobial activity and physical properties of protein films added with cell-free supernatant of *Lactobacillus rhamnosus*. *Food Control*, 62, 44-51. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.10.007
- Beverly, R. L., Janes, M. E., Prinyawiwatkul, W., & No, H. K. (2008). Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol*, 25(3), 534-537. doi: 10.1016/j.fm.2007.11.002
- Bhatia, S., & Bharti, A. (2015). Evaluating the antimicrobial activity of Nisin, Lysozyme and Ethylenediaminetetraacetate incorporated in starch based active food packaging film. *J Food Sci Technol*, 52(6), 3504-3512. doi: 10.1007/s13197-014-1414-7
- Blanco Massani, M., Molina, V., Sanchez, M., Renaud, V., Eisenberg, P., & Vignolo, G. (2014). Active polymers containing *Lactobacillus curvatus* CRL705 bacteriocins: effectiveness assessment in Wieners. *Int J Food Microbiol*, 178, 7-12. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.013
- Blanco Massani, Mariana , Vignolo, Graciela M. , Eisenberg, Patricia , & Morando, Pedro J. . (2013). Adsorption of the bacteriocins produced by *Lactobacillus curvatus* CRL705 on a multilayer-LLDPE film for food-packaging applications. *LWT - Food Science and Technology*, 53, 128-138.
- Bonilla, J., Atarés, L., Vargas, M., & Chiralt, A. (2012). Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality: Possibilities and limitations. *Journal of Food Engineering*, 110(2), 208-213. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2011.05.034
- Cagri, A., Ustunol, Z., & Ryser, E. T. (2004). Antimicrobial edible films and coatings. *J Food Prot*, 67(4), 833-848.
- Calderón-Aguirre, Ángel-Guadalupe, Chavarría-Hernández, Norberto, Mendoza-Mendoza, Bethsua, Vargas-Torres, Apolonio, García-Hernández, Edgar, & Rodríguez-

- Hernández, Adriana-Inés. (2015). Antilisterial activity and physical-mechanical properties of bioactive caseinate films. *CyTA - Journal of Food*, 1-8. doi: 10.1080/19476337.2014.1003200
- Calderón Aguirre, Ángel Guadalupe (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.
- Campos, Carmen A., Gerschenson, Lía N., & Flores, Silvia K. (2010). Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 849-875. doi: 10.1007/s11947-010-0434-1
- Cao-Hoang, Lan, Grégoire, Lydie, Chaine, Aline, & Waché, Yves. (2010). Importance and efficiency of in-depth antimicrobial activity for the control of listeria development with nisin-incorporated sodium caseinate films. *Food Control*, 21(9), 1227-1233. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.02.004
- Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., & Vignolo, G. (2008). A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Sci*, 79(3), 483-499. doi: 10.1016/j.meatsci.2007.10.009
- Castellano, Patricia, Belfiore, Carolina, & Vignolo, Graciela. (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, Nisia, Noreña, Caciano P. Z., & Brandelli, Adriano. (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
- Celis, Daniela, Azocar, Manuel Ignacio, Enrione, Javier, Paez, Maritza, & Matiacevich, Silvia. (2011). Characterization of salmon gelatin based film on antimicrobial properties of chitosan against *E. coli*. *Procedia Food Science*, 1, 399-403. doi: 10.1016/j.profoo.2011.09.061
- Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Sci*, 78(1-2), 90-103. doi: 10.1016/j.meatsci.2007.07.035
- Concha-Meyer, Aníbal, Schöbitz, Renate, Brito, Carmen, & Fuentes, Ricardo. (2011). Lactic acid bacteria in an alginate film inhibit *Listeria monocytogenes* growth on smoked salmon. *Food Control*, 22(3-4), 485-489. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.09.032
- Cotter, Paul D., Hill, Colin , & Ross, R. Paul (2005). Bacteriocins: Developing innate immunity for food *Nature Reviews Microbiology*, 3, 777-788. doi: 10.1038/nrmicro1240
- Chopra, L., Singh, G., Kumar Jena, K., & Sahoo, D. K. (2015). Sonorensin: A new bacteriocin with potential of an anti-biofilm agent and a food biopreservative. *Sci Rep*, 5, 13412. doi: 10.1038/srep13412
- D.G., Chen H. & Hoover. (2003). Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*, 2, 82-100.
- Deegan, Lucy H., Cotter, Paul D., Hill, Colin, & Ross, Paul. (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
- Deshmukh, P.V. , & Thorat, P.R. . (2013). Bacteriocins: A new trend in antimicrobial food packaging. *International Journal of Advanced Research in Engineering and Applied Sciences*, 2, 1-12.

- Doulgeraki, A. I., Ercolini, D., Villani, F., & Nychas, G. J. (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *Int J Food Microbiol*, *157*(2), 130-141. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.020
- Eca, K. S., Machado, M. T., Hubinger, M. D., & Menegalli, F. C. (2015). Development of Active Films From Pectin and Fruit Extracts: Light Protection, Antioxidant Capacity, and Compounds Stability. *J Food Sci*, *80*(11), C2389-2396. doi: 10.1111/1750-3841.13074
- Economou, T., Pournis, N., Ntzimani, A., & Savvaidis, I. N. (2009). Nisin-EDTA treatments and modified atmosphere packaging to increase fresh chicken meat shelf-life. *Food Chemistry*, *114*(4), 1470-1476. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.11.036
- Embuscado, Milda E. , & Huber, Kerry C. (2009). *Edible Films and Coatings for Food Applications*.
- Emiroglu, Z. K., Yemis, G. P., Coskun, B. K., & Candogan, K. (2010). Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Sci*, *86*(2), 283-288. doi: 10.1016/j.meatsci.2010.04.016
- Ercolini, D., Ferrocino, I., La Stora, A., Mauriello, G., Gigli, S., Masi, P., & Villani, F. (2010). Development of spoilage microbiota in beef stored in nisin activated packaging. *Food Microbiol*, *27*(1), 137-143. doi: 10.1016/j.fm.2009.09.006
- Ercolini, D., La Stora, A., Villani, F., & Mauriello, G. (2006). Effect of a bacteriocin-activated polythene film on *Listeria monocytogenes* as evaluated by viable staining and epifluorescence microscopy. *Journal of Applied Microbiology*, *100*(4), 765-772. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02825.x
- 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, Paula Judith Pérez, Du, Wen-Xian, Avena-Bustillos, Roberto de Jesús, Soares, Nilda de Fátima Ferreira, & McHugh, Tara 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
- EU pronto comerá barbacoa y cochinita mexicanas. (2016). *El Economista*.
- Falguera, Víctor, Quintero, Juan Pablo, Jiménez, Alberto, Muñoz, José Aldemar, & Ibarz, Albert. (2011). Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, *22*(6), 292-303. doi: 10.1016/j.tifs.2011.02.004
- Fernandez-Pan, I., Mendoza, M., & Mate, J. I. (2013). Whey protein isolate edible films with essential oils incorporated to improve the microbial quality of poultry. *J Sci Food Agric*, *93*(12), 2986-2994. doi: 10.1002/jsfa.6128
- Fernandez-Pan, I., Royo, M., & Ignacio Mate, J. (2012). Antimicrobial activity of whey protein isolate edible films with essential oils against food spoilers and foodborne pathogens. *J Food Sci*, *77*(7), M383-390. doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02752.x
- Fernández-Pan, Idoya, Carrión-Granda, Ximena, & Maté, Juan I. (2014). Antimicrobial efficiency of edible coatings on the preservation of chicken breast fillets. *Food Control*, *36*(1), 69-75. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.07.032
- Gadang, V. P., Hettiarachchy, N. S., Johnson, M. G., & Owens, C. (2008). Evaluation of antibacterial activity of whey protein isolate coating incorporated with nisin, grape

- seed extract, malic acid, and EDTA on a Turkey frankfurter system. *J Food Sci*, 73(8), M389-394. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00899.x
- Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R. L., & Ben Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol*, 120(1-2), 51-70. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001
- García-García, Adriana & Gutiérrez-Guerrero, Macaria. (2001). *Calidad microbiológica y sensorial de la barbacoa de borrego empacada al vacío*. (Tesis de Licenciatura), Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo, Hidalgo; México.
- 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
- Gennadios, A., Hanna, M. A., & Kurth, L. B. (1997). Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: A review. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 30(4), 337-350.
- Gennadios, Aristippos, Weller, Curtis L., & Gooding, Charles H. (1994). Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. *Journal of Food Engineering*, 21(4), 395-409. doi: 10.1016/0260-8774(94)90062-0
- Gialamas, Haralampos, Zinoviadou, Kyriaki G., Biliaderis, Costas G., & Koutsoumanis, Konstantinos P. (2010). Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-caseinate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. *Food Research International*, 43(10), 2402-2408. doi: 10.1016/j.foodres.2010.09.020
- Gill, Alexander O., & Holley, Richard A. (2003). Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 80(3), 251-259. doi: 10.1016/s0168-1605(02)00171-x
- Gomez-Estaca, J., Lopez de Lacey, A., Lopez-Caballero, M. E., Gomez-Guillen, M. C., & Montero, P. (2010). Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiol*, 27(7), 889-896. doi: 10.1016/j.fm.2010.05.012
- González, Agustín, & Alvarez Igarzabal, Cecilia 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, Çiğdem Mecitoğlu, Yemenicioğlu, Ahmet, & Arslanoğlu, Alper. (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
- Guo, Mingming, Jin, Tony Z., Wang, Luxin, Scullen, O. Joseph, & Sommers, Christopher H. (2014). Antimicrobial films and coatings for inactivation of *Listeria innocua* on ready-to-eat deli turkey meat. *Food Control*, 40, 64-70. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.11.018
- Han, Jung (2005). *Innovations in Food Packaging*.

- 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
- Hoffman, K. L., Han, I. Y., & Dawson, P. L. (2001). Antimicrobial effects of corn zein films impregnated with nisin, lauric acid, and EDTA. *J Food Prot*, 64(6), 885-889.
- Ibarguren, Carolina, Céliz, Gustavo, Díaz, Antonela S., Bertuzzi, M. Alejandra, Daz, Mirta, & Audisio, M. Carina. (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
- 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
- Iseppi, Ramona, Pilati, Francesco, Marini, Michele, Toselli, Maurizio, de Niederhäusern, Simona, Guerrieri, Elisa, . . . Bondi, Moreno (2008). Anti-listerial activity of a polymeric film coated with hybrid coatings doped with Enterocin 416K1 for use as bioactive food packaging. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 281-287. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.015
- Jeevaratnam K., Jamuna M. & Bawa A.S. (2005). Biological preservation of foods--Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Indian Journal of Biotechnology*, 4, 446-454.
- Jin, T., & Zhang, H. (2008). Biodegradable polylactic acid polymer with nisin for use in antimicrobial food packaging. *J Food Sci*, 73(3), M127-134. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00681.x
- Jin, Tony, Liu, LinShu, Zhang, Howard, & Hicks, Kevin. (2009). Antimicrobial activity of nisin incorporated in pectin and polylactic acid composite films against *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(2), 322-329. doi: 10.1111/j.1365-2621.2008.01719.x
- Jindal, M., Kumar, V., Rana, V., & Tiwary, A. K. (2013). Aegle marmelos fruit pectin for food and pharmaceuticals: Physico-chemical, rheological and functional performance. *Carbohydr Polym*, 93(2), 386-394. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.12.012
- Kalkan, Selin, Erginkaya, Zerrin, & Ünal, Emel. (2013). Determination of Antimicrobial Activity of Methyl Cellulose Films Enriched with Some Essential Oils on *Listeria innocua*. *Journal of Earth Science and Engineering*, 3, 834-839.
- Kamel, S. M. (2014). Utilization of Cactus Dear Peels Mucilage as an Edible Coating of Chicken Meat to Prolong its Shelf Life. *Food Science and Quality Management*, 28, 71-77.
- Khare, Anshul Kumar, Biswas, Ashim Kumar, & Sahoo, Jhari. (2014). Comparison study of chitosan, EDTA, eugenol and peppermint oil for antioxidant and antimicrobial potentials in chicken noodles and their effect on colour and oxidative stability at ambient temperature storage. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 286-293. doi: 10.1016/j.lwt.2013.08.024
- 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
- Kim, Sung-Jin, Cho, Ah Reum, & Han, Jaejoon. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of leafy green vegetable extracts and their applications to meat product preservation. *Food Control*, 29(1), 112-120. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.05.060

- Kraśniewska, Karolina, & Gniewosz, Małgorzata. (2012). Substances with Antibacterial Activity in Edible Films – A Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 62(4), 199-206. doi: 10.2478/v10222-12-0059-3
- Kristo, Eleana, Koutsoumanis, Konstantinos P., & Biliaderis, Costas G. (2008). Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids*, 22(3), 373-386. doi: 10.1016/j.foodhyd.2006.12.003
- La Stora, A., Ercolini, D., Marinello, F., & Mauriello, G. (2008). Characterization of bacteriocin-coated antimicrobial polyethylene films by atomic force microscopy. *J Food Sci*, 73(4), T48-54. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00713.x
- Lara-Lledo, M., Olaimat, A., & Holley, R. A. (2012). Inhibition of *Listeria monocytogenes* on bologna sausages by an antimicrobial film containing mustard extract or sinigrin. *Int J Food Microbiol*, 156(1), 25-31. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.018
- López-Ortega, Mayra Alejandra. (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*. (Maestra en Ciencia de los Alimentos), Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo de Bravo, Hidalgo.
- López Ortega, Mayra Alejandra (2014). *Producción de sustancias con actividad antimicrobiana de uso potencial en la industria de alimentos, mediante el cultivo de bacterias ácido lácticas usando medios de cultivo alternativos*. (Tesis de Maestría), Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo de Bravo, Hgo., México.
- M.P. Castro, M.E. Cayré, N.Z. Palavecino Prpich, F.P. Rivas. (2015). Control of pathogens in cooked meat products: the beneficial role of lactic acid bacteria. *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*.
- Marcos, Begonya , Aymerich, Teresa , Monfort, Josep M. , & Garriga, Margarita (2008). High-pressure processing and antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during storage of cooked ham. *Food Microbiology*, 25, 177-182.
- Mastromatteo, M., Lucera, A., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2010). Synergic antimicrobial activity of lysozyme, nisin, and EDTA against *Listeria monocytogenes* in ostrich meat patties. *J Food Sci*, 75(7), M422-429. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01732.x
- Mendoza Mendoza, Bethsua (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 Maestría), UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO, Tulancingo de Bravo, Hgo., México.
- Mexiquense, El. (2015). El origen de la barbacoa. <http://barbacoamx.com/el-origen-de-la-barbacoa/>. Retrieved 30 de Septiembre del 2016
- Millette, M., Le Tien, C., Smoragiewicz, W., & Lacroix, Monique. (2007). Inhibition of *Staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modified alginate films and beads. *Food Control*, 18(7), 878-884. doi: 10.1016/j.foodcont.2006.05.003
- Mills, S., Stanton, C., Hill, C., & Ross, R. P. (2011). New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2, 299-329. doi: 10.1146/annurev-food-022510-133721
- Mohammad Hasehm Hosseini, Seyed Hadi Razavi, Seyed Mohammad Ali Mousavi, Seyed Ahmad Shahidi Yasaghi, Azade Ghorbani Hasansaraei. (2008). Improving

- antibacterial activity of edible films based of chitosan by incorporating thyme and clove essential oils and EDTA. *Journal of Applied Sciences*, 8 (16), 2895-29000.
- Muppalla, Shobita R., Kanatt, Sweetie R., Chawla, S. P., & Sharma, Arun. (2014). Carboxymethyl cellulose–polyvinyl alcohol films with clove oil for active packaging of ground chicken meat. *Food Packaging and Shelf Life*, 2(2), 51-58. doi: 10.1016/j.fpsl.2014.07.002
- Murillo Martínez, María Magdalena. (2008). *Evaluación de propiedades fisicoquímicas y antimicrobianas de películas comestibles adicionadas con nisina y/o glucosa oxidasa*. (Tesis de MAestría), Universidad Autónoma Metropolitana, México, Distrito Federal.
- Natividad-Bonifacio, Iván , Vázquez-Quiñones, Carlos R. , Rodas-Suárez, Oscar R. , Fernández, Francisco J. , Rodríguez-Solis, Esteban , Quiñones-Ramírez, Elsa Irma , & Vázquez-Salinas, Carlos. (2010). Detection of *Clostridium perfringens* in yearling lamb meat (barbacoa), head, and gut tacos from public markets in Mexico City. *International Journal of Environmental Health Research*, 20, 213-217.
- 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 Research International*, 2014, 534915. doi: 10.1155/2014/534915
- Nguyen, V. T., Gidley, M. J., & Dykes, G. A. (2008). Potential of a nisin-containing bacterial cellulose film to inhibit *Listeria monocytogenes* on processed meats. *Food Microbiol*, 25(3), 471-478. doi: 10.1016/j.fm.2008.01.004
- Nieto-Lozano, J. C., Reguera-Useros, J. I., Pelaez-Martinez Mdel, C., & Hardisson de la Torre, A. (2006). Effect of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* on Spanish raw meat. *Meat Sci*, 72(1), 57-61. doi: 10.1016/j.meatsci.2005.06.004
- Nithya, V., Murthy, P. S., & Halami, P. M. (2013). Development and application of active films for food packaging using antibacterial peptide of *Bacillus licheniformis* Me1. *J Appl Microbiol*, 115(2), 475-483. doi: 10.1111/jam.12258
- Ntzimani, Athina G., Giatrakou, Vasiliki I., & Savvaidis, Ioannis N. (2010). Combined natural antimicrobial treatments (EDTA, lysozyme, rosemary and oregano oil) on semi cooked coated chicken meat stored in vacuum packages at 4°C: Microbiological and sensory evaluation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 187-196. doi: 10.1016/j.ifset.2009.09.004
- Núñez, M.; Tomillo, J.; Gaya, P.; Medina, M. (1996). Bacteriocin quantification by the critical dilution method: a comparison of arbitrary units with diameter and area of the zone of growth inhibition. *J. Food Sci.*, 55, 718-723.
- Olano-Martin, Estibaliz, Williams, Mark R., Gibson, Glenn R., & Rastall, Robert A. (2003). Pectins and pectic-oligosaccharides inhibit *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin as directed towards the human colonic cell line HT29. *FEMS Microbiology Letters*, 218(1), 101-105. doi: 10.1111/j.1574-6968.2003.tb11504.x
- Oliveira, J. T., Martins, L., Picciochi, R., Malafaya, P. B., Sousa, R. A., Neves, N. M., . . . Reis, R. L. (2010). Gellan gum: a new biomaterial for cartilage tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A*, 93(3), 852-863. doi: 10.1002/jbm.a.32574
- Pastor-Navarro, Clara;. (2010). *Recubrimientos comestibles a base de hidroxipropil metilcelulosa: caracterización y aplicación*. Universidad Politécnica De Valencia, Valencia.

- Pattanayaiying, R., A. H. Kittikun, & Cutter, C. N. (2015). Incorporation of nisin Z and lauric arginate into pullulan films to inhibit foodborne pathogens associated with fresh and ready-to-eat muscle foods. *International Journal of Food Microbiology*, 207, 77-82. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.045
- Pérez-Pérez, C., Regalado-González, C., Barbosa-Rodríguez, J. R., Rodríguez-Rodríguez, C. A., & F., Villaseñor-Ortega. (2006). Incorporation of antimicrobial agents in food packaging films and coatings. *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*, 193-216.
- Pranoto, Y., Rakshit, S. K., & Salokhe, V. M. (2005). Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT - Food Science and Technology*, 38(8), 859-865. doi: 10.1016/j.lwt.2004.09.014
- Prudêncio, Cláudia Vieira, Ferreira, Sukarno Olavo, Mantovani, Hilário Cuquetto, & Vanetti, Maria Cristina Dantas. (2015). Morphological changes in Salmonella Typhimurium caused by the lantibiotic bovicin HC5 in association with EDTA. *Annals of Microbiology*, 66(1), 373-379. doi: 10.1007/s13213-015-1117-y
- Ramos, Dulce. (2014). Eruviel anuncia la “Universidad de la Barbacoa”, *Diario de Toluca*. Retrieved from <http://www.animalpolitico.com/2014/02/eruviel-anuncia-universidad-de-la-barbacoa-con-un-costo-de-47-mdp/>
- Realini, C. E., & Marcos, B. (2014). Active and intelligent packaging systems for a modern society. *Meat Science*, 98(3), 404-419. doi: 10.1016/j.meatsci.2014.06.031
- Rocha, M., Ferreira, F. A., Souza, M. M., & Prentice, C. (2013). Antimicrobial films: a review. In A. Méndez-Vilas (Ed.), *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*.
- Rocha, Meritaine da, Loiko, Márcia Regina, Tondo, Eduardo César, & Prentice, Carlos. (2014). Physical, mechanical and antimicrobial properties of Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) protein films incorporated with organic acids. *Food Hydrocolloids*, 37, 213-220. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.10.017
- Romero-Bastida, C.A.; Zamudio-Flores, P.B.; Bello-Pérez, L.A. (2011). Antimicrobials in oxidized banana starch films: effect on antibacterial activity, microstructure, mechanical and barrier properties *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10, 445-453.
- Rubio, M. S., Torres, N., Gutierrez, J., & Mendez, R. D. (2004). Composition and sensory evaluation of lamb carcasses used for the traditional Mexican lamb dish, "barbacoa". *Meat Sci*, 67(2), 359-364. doi: 10.1016/j.meatsci.2003.10.022
- Salmieri, Stephane, Islam, Farhana, Ibrahim, Haytham M. M., Lacroix, Monique, Khan, Ruhul A., Miao, Chuanwei, . . . Hamad, Wadood Y. (2014). Antimicrobial nanocomposite films made of poly(lactic acid)-cellulose nanocrystals (PLA-CNC) in food applications: part A—effect of nisin release on the inactivation of *Listeria monocytogenes* in ham. *Cellulose* 21, 1837-1850.
- Sanchez-Ortega, I., Garcia-Almendarez, B. E., Santos-Lopez, E. M., Amaro-Reyes, A., Barboza-Corona, J. E., & Regalado, C. (2014). Antimicrobial edible films and coatings for meat and meat products preservation. *ScientificWorldJournal*, 2014, 248935. doi: 10.1155/2014/248935
- Sánchez Aldana, Daniela, Andrade-Ochoa, Sergio, Aguilar, Cristóbal N., Contreras-Esquível, Juan C., & Nevárez-Moorillón, Guadalupe V. (2015). Antibacterial activity of pectic-based edible films incorporated with Mexican lime essential oil. *Food Control*, 50, 907-912. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.10.044

- Santiago-Silva, Paula, Soares, Nilda F. F., Nóbrega, Juliana E., Júnior, Marcus A. W., Barbosa, Kiriaque B. F., Volp, Ana Carolina P., . . . Würlitzer, Nédio J. (2009). Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA® 2351) on preservation of sliced ham. *Food Control*, 20(1), 85-89. doi: 10.1016/j.foodcont.2008.02.006
- Sayanjali, Sara, Ghanbarzadeh, Babak, & Ghiassifar, Shiva. (2011). Evaluation of antimicrobial and physical properties of edible film based on carboxymethyl cellulose containing potassium sorbate on some mycotoxigenic *Aspergillus* species in fresh pistachios. *LWT - Food Science and Technology*, 44(4), 1133-1138. doi: 10.1016/j.lwt.2010.12.017
- Shankar, Shiv, Teng, Xinnan, Li, Gaobin, & Rhim, Jong-Whan. (2015). Preparation, characterization, and antimicrobial activity of gelatin/ZnO nanocomposite films. *Food Hydrocolloids*, 45, 264-271. doi: 10.1016/j.foodhyd.2014.12.001
- 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
- Sonsa-Ard, Noojaree, Rodtong, Sureelak, Chikindas, Michael L., & Yongsawatdigul, Jirawat. (2015). Characterization of bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* CN-25 isolated from traditionally Thai fermented fish roe. *Food Control*, 54, 308-316. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.02.010
- Soto Simental, Sergio, González Tenorio, Roberto , Fernández Diez, Ana , Alfaro Rodríguez, Rosa Hayde , & Mateo Oyagüe, Javier (2009). Determinación de compuestos volátiles en pencas de maguey destinadas a la elaboración de barbacoa. *Memorias del Coloquio Nacional en Ciencia y Tecnología de la Carne*, 09, 79-81.
- Soysal, Çiğdem, Bozkurt, Hüseyin, Dirican, Engin, Güçlü, Mehmet, Bozhüyük, Ebru Deniz, Uslu, Ali Erdal, & Kaya, Sevim. (2015). Effect of antimicrobial packaging on physicochemical and microbial quality of chicken drumsticks. *Food Control*, 54, 294-299. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.02.009
- 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
- Sung, Suet-Yen, Sin, Lee Tin, Tee, Tiam-Ting, Bee, Soo-Tueen, Rahmat, A. R., & Rahman, W. A. W. A. (2014). Control of bacteria growth on ready-to-eat beef loaves by antimicrobial plastic packaging incorporated with garlic oil. *Food Control*, 39, 214-221. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.11.020
- Suput, Danijela, Ladic, Vera, Popovic, Senka, & Hromis, Nevena. (2015). Edible films and coatings: Sources, properties and application. *Food and Feed Research*, 42(1), 11-22. doi: 10.5937/ffr1501011s
- Takala, Perlette N., Salmieri, Stephane, Boumail, Afia, Khan, Ruhul A., Vu, Khanh Dang, Chauve, Gregory, . . . Lacroix, Monique. (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

- Tawakkal, I. S., Cran, M. J., Miltz, J., & Bigger, S. W. (2014). A review of poly(lactic acid)-based materials for antimicrobial packaging. *J Food Sci*, 79(8), R1477-1490. doi: 10.1111/1750-3841.12534
- Tharanathan, R. N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*, 14(3), 71-78. doi: 10.1016/s0924-2244(02)00280-7
- Uriarte-Montoya, M. H., Arias-Moscoso, J. L., Plascencia-Jatomea, M., Santacruz-Ortega, H., Rouzaud-Sandez, O., Cardenas-Lopez, J. L., . . . Ezquerra-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
- Ustunol, Zey (2009). Edible Films and Coatings for Meat and Poultry. In M. E. E. K. C. Huber (Ed.), *Edible Films and Coatings for Food Applications* (pp. 245-268).
- Vartiainen, Jari, Vähä-Nissi, Mika, & Harlin, Ali. (2014). Biopolymer Films and Coatings in Packaging Applications—A Review of Recent Developments. *Materials Sciences and Applications*, 05(10), 708-718. doi: 10.4236/msa.2014.510072
- Villada, Héctor S. , Acosta, Harold A. , & Velasco, Reinado J. . (2007). Biopolímeros naturales usados en empaques biodegradables. *TEMAS AGRARIOS* 12, 5-13.
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*, 3(2), 163-175. doi: 10.1038/nprot.2007.521
- Xiao, Gongnian, Zhu, Yinbang, Wang, Liuxiong, You, Qi, Huo, Po, & You, Yuru. (2011). Production and Storage of Edible Film Using Gellan Gum. *Procedia Environmental Sciences*, 8, 756-763. doi: 10.1016/j.proenv.2011.10.115
- Yang, L., Paulson, A. T., & Nickerson, M. T. (2010). Mechanical and physical properties of calcium-treated gellan films. *Food Research International*, 43(5), 1439-1443. doi: 10.1016/j.foodres.2010.04.010
- Zacharof, M. P., & Lovitt, R. W. (2012). Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. *APCBEE Procedia*, 2, 50-56. doi: 10.1016/j.apcbee.2012.06.010