

Portada en pasta dura



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CAMPUS TUXTEPEC

Actividad antimicrobiana de bacteriocinas inmovilizadas en
biopelículas de caseína

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Ingeniera en Biotecnología

PRESENTA

ANAHÍ LEYVA HERNÁNDEZ

DIRECTORA

DRA. CYNTHIA MAGALY ANTONIO CISNEROS

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA

2022



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
CAMPUS TUXTEPEC

Actividad antimicrobiana de bacteriocinas inmovilizadas en
biopelículas de caseína

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Ingeniera en Biotecnología

PRESENTA

ANAHÍ LEYVA HERNÁNDEZ

DIRECTORA

DRA. CYNTHIA MAGALY ANTONIO CISNEROS

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA

2022



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 08 de noviembre de 2022 a las 16:15 h. los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "**Actividad antimicrobiana de bacteriocinas Inmovilizadas en biopelículas de caseína**" presentada por la alumna **Anahí Leyva Hernández**, con número de matrícula 16090089, aspirante al título de **Licenciatura**.


Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que la aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

Tuxtepec, Oaxaca, a 08 de noviembre de 2022.


ATENTAMENTE
LA COMISIÓN REVISORA




Dra. Cynthia Magaly Antonio Cisneros
Profesor Investigador Titular "A"
Universidad del Papaloapan
Director de Tesis



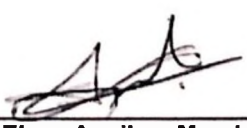
Dr. Oscar Núñez Gaona
Profesor Investigador Titular "A",
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



Dra. Alma Xóchil Avila Alejandro
Profesor Investigador Titular "A"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



Dr. Lucio Abel Vázquez León
Cátedra CONACyT-UNPA
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



Dra. Martha Elena Aguilera Morales
Profesor Investigador Asociado "B"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Tuxtepec, Oaxaca, a 17 de noviembre de 2022
Oficio No. JCIB/003/11/2022

Lic. Yesenia Barrientos Arenal
Jefe de Servicios Escolares
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis de la alumna **Anahí Leyva Hernández** titulado "Actividad antimicrobiana de bacteriocinas inmovilizadas en biopelículas de caseína" para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

Dr. Óscar Núñez Gaona (Presidente, Universidad del Papaloapan)
Dr. Lucio Abel Vázquez León (Secretario, Universidad del Papaloapan)
Dra. Martha Elena Aguilera Morales (Vocal, Universidad del Papaloapan)
Dra. Alma Xochil Ávila Alejandre (Primer Suplente, Universidad del Papaloapan)
Dr. Cirilo Nolasco Hipólito (Segundo Suplente, Universidad del Papaloapan)

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente

*Terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú*



Dra. Jacqueline Capataz Tafur
Jefa de Carrera de Ingeniería en Biotecnología
Universidad del Papaloapan

SECRETARÍA DE INGENIERÍA
EN BIOTECNOLOGÍA
CAMPUS TUXTEPEC

Vo.Bo. M.C. Héctor López Arjona
Vice Rector Académico
Universidad del Papaloapan



c c p Dra. Cynthia Magaly Antonio Cisneros Director de tesis, Para su conocimiento
c c p Anahí Leyva Hernández Alumna. Para su conocimiento
c c p Archivo

Campus Loma Bonita
Av. Ferrocarril S/N, Col. Ciudad Universitaria, Loma Bonita, Oaxaca C.P. 68400
Tel/Fax: 01 281 872 92 30

www.unpa.edu.mx

Campus Tuxtepec
Circuito Central N° 200, Col. Parque Industrial, Tuxtepec, Oaxaca. C.P. 68301
Tel/Fax: 01 287 875 9240

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi **familia**, que siempre ha estado para mí en las buenas y en las peores. A mi madre, que es mi mayor referencia de perseverancia y esfuerzo para lograr una meta, por estar siempre ahí y hacerme ver lo positivo dentro de cada dificultad. A mis tías y primos por acompañarme a lo largo de mi vida estudiantil y ser un apoyo moral.

A mis **amigos** (no mencionaré nombres, ellos saben quiénes son), por hacer de los cinco años de carrera los mejores, las prácticas de laboratorio, las reuniones de estudio para salvar el semestre, viajes escolares, convivios. Por enseñarme a reír de mis infortunios y darle vuelta a la página.

A mi asesora, la Dra. Cynthia Magaly Antonio Cisneros, por su disposición y paciencia en todo el proceso. Si se presentaron algunas dificultades, siempre me motivó para hacer las cosas bien y seguir adelante.

Al Dr. Aurelio Ramírez Hernández por su apoyo en el manejo del equipo IR-TF.

Al comité revisor integrado por los profesores-investigadores: Dra. Alma Xochil Ávila Alejandre, Dr. Oscar Núñez Gaona, Dra. Martha Elena Aguilera Morales, Dr. Lucio Abel Vázquez León, Dr. Cirilo Nolasco Hipólito.

DEDICATORIA

El presente trabajo se lo dedico a mis **padres** por brindarme su comprensión y apoyo incondicional durante la carrera y en la conclusión de este ciclo.

A mi **tía Ysa (+)**, por impulsarme a ser mejor y a no desistir por difícil que parezca todo. Por siempre haber estado para escucharme y brindarme consejos cuando lo necesitaba. Por su confianza desmedida en mí para cumplir mis metas, a veces más de la que yo me tenía.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
I. INTRODUCCIÓN	13
1.1. MARCO TEÓRICO	14
1.1.1. Biopelículas comestibles	14
1.1.1.1. Material para formación de biopelícula	15
1.1.1.2. Plastificante	16
1.1.1.3. Aditivos	17
1.1.2. Caseína	18
1.1.3. Bacteriocinas	20
1.1.3.1. Clasificación	21
1.1.3.2. Nisina	21
1.1.3.3. Natamicina	23
1.1.3.4. Mecanismo de acción	25
1.1.4. <i>Listeria monocytogenes</i>	27
1.2. ANTECEDENTES	29
II. JUSTIFICACIÓN	37
III. HIPÓTESIS	38
3.1. OBJETIVOS	38
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	39
4.1. Preparación de las biopelículas	39
4.2. Caracterización fisicoquímica	40
4.3. Actividad antimicrobiana	41
4.4. Diseño experimental y análisis estadístico	42
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
5.1. Preparación de las biopelículas	43
5.2. Caracterización fisicoquímica	45
5.2.1. Contenido de humedad y capacidad de retención de aceite	45
5.2.2. Análisis estructural IR-TF	48
5.3. Actividad antimicrobiana	51
VI. CONCLUSIONES	54
VII. PERSPECTIVAS	56
VIII. REFERENCIAS	58
IX. ANEXOS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura de la nisina A.	22
Figura 2. Estructura de la natamicina.	23
Figura 3. Mecanismo dual de la nisina.	25
Figura 4. Mecanismo de acción de la natamicina.	26
Figura 5. Estrategia metodológica en general.	39
Figura 6. Preparación de biopelículas. Preparación de la solución formadora de biopelícula (SFP), formulación (F) y el vaciado en placas de vidrio.	40
Figura 7. Proceso de la técnica de difusión en Agar Mueller Hinton.	42
Figura 8. Biopelículas obtenidas, A) Control; B) con Natamicina; C) con Nisina.	43
Figura 9. Espectros FTIR: A) Biopelículas con Natamicina, B) Biopelículas con Nisina y C) Caseína, gnetina y glicerol.	50
Figura 10. Halos de inhibición de biopelículas, A) Control negativo; B) Control positivo, C) NA5025, D) NI2525, E) NA2525, F) NI5025.	51

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Aplicaciones de caseína con actividad antimicrobiana.	29
Tabla 2. Diámetro y grosor de biopelículas de caseína/bacteriocinas.	44
Tabla 3. Contenido de humedad y CRA de biopelículas de caseína/bacteriocinas.	46
Tabla 4. Coeficientes de correlación entre CRA, humedad, espesor y diámetro de las biopelículas.	48
Tabla 5. Diámetro de halos de inhibición de los diferentes tratamientos de natamicina y nisina.	52

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP	Péptidos antimicrobianos
ARN	Ácido ribonucleico
Asn	Asparagina
BAL	Bacterias del ácido láctico
CRA	Capacidad de retención de aceite
F	Formulación
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Generally Recognized As Safe
His	Histidina
kDa	Kilodalton
ppm	partes por millón
p/v	peso/volumen
SFP	Solución formadora de biopelícula

RESUMEN

El impacto negativo en el ambiente de los envases plásticos usados en los alimentos, los problemas de salud que generan los conservadores químicos en el consumidor y la presencia de microorganismos patógenos que provocan el deterioro de alimentos y enfermedades, han llevado al surgimiento de empaques biodegradables con compuestos bioactivos. Las biopelículas y revestimientos comestibles se definen como materiales delgados utilizados para envolver alimentos. Pueden contener sustancias activas como las bacteriocinas que son aditivos y antimicrobianos permitidos y utilizados en la conservación de alimentos de origen animal. El uso de caseína como material base para la elaboración de biopelículas comestibles es una opción viable, de fácil adquisición (subproducto de la acidificación de la leche), bajo costo, biodegradable y funcional. La hipótesis es que las biopelículas preparadas con diferentes proporciones de polímero (caseína), plastificante (glicerol) y distinta bacteriocina (nisina y natamicina), presentarán propiedades fisicoquímicas y actividad antimicrobiana diferentes entre sí. El objetivo de la investigación es evaluar la actividad antimicrobiana de biopelículas de caseína y bacteriocina sobre *Listeria monocytogenes*. Se prepararon biopelículas de caseína y bacteriocinas (nisina y natamicina) por el método de vaciado en placa; empleando dos concentraciones de caseína (2.5 y 5.0 g/mL) y plastificante (2.5 y 5.0 mL/mL). Se determinaron las características fisicoquímicas (contenido de humedad, capacidad de retención de aceite y grupos funcionales) y se comprobó la actividad antimicrobiana de todas las biopelículas obtenidas sobre *Listeria monocytogenes*. Los resultados mostraron que la metodología propuesta en este trabajo permite obtener biopelículas con características fisicoquímicas semejantes entre sí ($p \leq 0.5$). La capacidad de retención de aceite (CRA) y la humedad en las biopelículas obtenidas fue similar en ambos tratamientos, pero la mayor aportación de estos resultados es la correlación que existe de estas variables con el espesor y el diámetro de la biopelícula. La determinación de los grupos funcionales permite visualizar la aportación de cada componente. Esto es apreciable en las zonas características de las bandas de absorción que están ausentes principalmente en las bacteriocinas. Finalmente, La actividad antimicrobiana expresada por el halo de inhibición de la bacteria patógena *L. monocytogenes*, mostró sensibilidad hacia la natamicina. No obstante, la posible sensibilidad hacia la nisina permite establecer la importancia de probar otras concentraciones de bacteriocinas en la preparación de biopelículas con mejor respuesta en la inhibición de este y otros patógenos alimentarios.

ABSTRACT

The negative impact on the environment of plastic packaging used in food, the health problems generated in the consumer by chemical preservatives, and the presence of pathogenic microorganisms that cause food deterioration and diseases, have led to the emergence of biodegradable packaging with bioactive compounds. Edible biofilms and coatings are defined as thin materials used to wrap foods. They may contain active substances such as bacteriocins, which are permitted additives and antimicrobials and used in the preservation of food of animal origin. The use of casein as a base material for the production of edible films is a viable option, easy to acquire (by-product of milk acidification), low cost, biodegradable and functional. The hypothesis is that biofilms prepared with different proportions of polymer (casein), plasticizer (glycerol) and different bacteriocin (nisin and natamycin), will have physicochemical properties and antimicrobial activity different from each other. The objective of the research is to evaluate the antimicrobial activity of casein and bacteriocin biofilms on *Listeria monocytogenes*. Biofilms of casein and bacteriocins (nisin and natamycin) were prepared by casting method; using two concentrations of casein (2.5 and 5.0 g/mL) and plasticizer (2.5 and 5.0 mL/mL). The physicochemical characteristics (moisture content, oil retention capacity and functional groups) were determined and the antimicrobial activity of all the biofilms obtained on *Listeria monocytogenes* was evaluated. The results showed that the methodology proposed in this work allows obtaining biofilms with similar physicochemical characteristics ($p \leq 0.5$) compared to control. The oil retention capacity (CRA) and the humidity in the biofilms obtained were similar in both treatments, but the greatest contribution of these results is the correlation exists between these variables with the thickness and diameter. The determination functional groups allows visualizing the contribution of each component. This is important in the characteristic zones of absorption bands that are absent in bacteriocins. Finally, the antimicrobial activity expressed by the inhibition halo of the pathogenic bacteria *L. monocytogenes*, showed sensitivity with natamycin. However, the sensitivity with nisin allows establishing the importance of testing other concentrations of bacteriocins in the preparation of biofilms with a better response in the inhibition of this and other food pathogens.

I. INTRODUCCIÓN

El crecimiento y la proliferación de microorganismos de deterioro de alimentos provocan cambios físicos, químicos y sensoriales, así como enfermedades de transmisión alimentaria y pérdidas económicas ([Umaraw et al., 2020](#); [Bimpizas-Pinis et al., 2022](#)). Por ello, mantener la calidad y garantizar la inocuidad de los productos alimenticios ha sido cada vez más importante en la industria alimentaria ([Bimpizas-Pinis et al., 2022](#)).

Uno de los principales microorganismos patógenos de transmisión alimentaria es *Listeria monocytogenes*. Causa listeriosis, infección provocada por consumir alimentos contaminados (cárnicos, lácteos, pescado, mariscos, vegetales y frutas), puede llegar a ser mortal para mujeres embarazadas y sus fetos, neonatos, adultos mayores y personas inmunodeprimidas ([Jordan & McAuliffe, 2018](#); [Lopes-Luz et al., 2021](#)). Su propagación a través de los alimentos se ve facilitada por su resistencia y adaptabilidad a condiciones ambientales adversas ([Lopes-Luz et al., 2021](#)).

La preocupación por el medio ambiente, la creciente carga de eliminación de residuos plásticos, la utilización de residuos industriales alimentarios y la demanda de alimentos naturales, nutritivos y saludables; ha motorizado en los últimos años el desarrollo de envases renovables, biodegradables y compostables ([Umaraw et al., 2020](#); [Mo et al., 2021](#); [Ollé Resa et al., 2014](#)).

Las biopelículas comestibles antimicrobianas de biopolímeros se han estudiado cada vez más por el interés de reducir el uso de empaques plásticos desechables y obtener productos más seguros y sin conservantes químicos (han suscitado una creciente preocupación por la seguridad de su consumo), que permitan prolongar la vida útil de los alimentos ([Mo et al., 2021](#); [Bimpizas-Pinis et al., 2022](#); [Ollé Resa et al., 2014](#)). La adición de agentes antimicrobianos puede reducir o incluso impedir el crecimiento de microorganismos patógenos y de deterioro en los alimentos sin alterar sus propiedades sensoriales ([Ollé Resa et al., 2014](#)). Las bacteriocinas son la principal alternativa como agentes antimicrobianos naturales en la industria alimentaria; la nisina y natamicina son las bacteriocinas más estudiadas y prometedoras para dicho fin, además de considerarse GRAS. Sin embargo, la mayor problemática de su uso es que pierden sus propiedades durante las etapas de procesamiento del alimento o al reaccionar con los componentes de la matriz alimentaria ([Bernela et al., 2014](#)). Las biopelículas comestibles formadas de biopolímeros producidos a partir de materias primas renovables como la caseína, incorporadas con bacteriocinas (nisina/natamicina), permitirán preservar la propiedad antimicrobiana de éstas.

1.1. MARCO TEÓRICO

1.1.1. Biopelículas comestibles

Las biopelículas y revestimientos comestibles pueden definirse como materiales delgados (0.050-0.250 mm de grosor) y cohesivos formados a partir de una matriz de polímeros bioactivos utilizados para envolver o recubrir los alimentos ([Hammam, 2019](#)). El término biopelícula comestible tiene dos consideraciones principales: la palabra comestible significa que las películas pueden ser consumidas junto con alimentos en contacto, por lo que debe ser considerada como GRAS, según la Food and Drug Administration (FDA), ([Erkmen & Barazi, 2018](#)). La palabra biopelícula significa que el material de cobertura debe tener propiedades de embalaje para proteger la parte exterior del alimento del ambiente y limitar el transporte de gas y vapor de agua. El material utilizado no debe alterar la apariencia, el olor y el sabor del producto. El material de la biopelícula debe ser lo más delgado posible adquiriendo las propiedades mecánicas adecuadas para proteger el alimento. Las biopelículas comestibles pueden utilizarse con características funcionales como encapsulación de aromas volátiles, vitaminas, colorantes, agentes aromatizantes, antimicrobianos y antioxidantes ([Erkmen & Barazi, 2018](#); [Han, 2014](#)). La calidad de los productos alimenticios puede mejorarse cuando se protegen de cambios físicos, químicos y microbiológicos como pérdida de humedad, reacciones enzimáticas de oscurecimiento, deterioro microbiano y oxidación de lípidos ([Erkmen & Barazi, 2018](#)).

Una biopelícula comestible típica tiene tres componentes principales: material de formación de la biopelícula, plastificante y aditivos. Además, las biopelículas comestibles necesitan un solvente adecuado para preparar una solución formadora de película (SFP). Por su solubilidad natural, el agua y etanol se utilizan como solventes ([Erkmen & Barazi, 2018](#)). Las propiedades más importantes que deben evaluarse en las biopelículas y revestimientos comestibles son las propiedades de barrera a la humedad y gases, estabilidad microbiológica, capacidad de absorción de humedad, la adhesión, cohesión, solubilidad, transparencia, propiedades mecánicas y propiedades sensoriales ([Falguera et al., 2011](#)). Las mayores ventajas que proporcionan las biopelículas comestibles son su comestibilidad y biodegradabilidad inherente. Para mantener su comestibilidad, todos los componentes de la biopelícula (biopolímeros, plastificantes y aditivos) deben ser ingredientes de grado alimentario ([Han, 2014](#)).

1.1.1.1. Material para formación de biopelícula

Las proteínas, polisacáridos, lípidos y la combinación o mezcla de éstos son los principales materiales formadores de biopelícula ([Han, 2014](#)). Las proteínas son macromoléculas con secuencias de aminoácidos (más de 20 aminoácidos como mínimo) y estructuras moleculares específicas. Las características más distintivas de las proteínas en comparación con otros materiales filmógenos son su desnaturalización conformacional, sus cargas electrostáticas y su naturaleza anfifílica ([Han, 2014](#)). Las propiedades de formación de biopelículas de las proteínas se modulan controlando los enlaces electrostáticos, hidrofóbicos, disulfuro y de hidrógeno entre las cadenas de proteínas. Al tener regiones tanto hidrofílicas como hidrofóbicas, pueden utilizarse para atrapar una variedad de componentes bioactivos ([Chen et al., 2021](#)). Las proteínas son malas barreras de vapor de agua, pero muestran una resistencia mecánica mayor que los polisacáridos ([Jeevahan & Chandrasekaran, 2019](#)).

Los polisacáridos son polímeros formados por un monómero de unidades repetitivas, contienen un gran número de grupos hidroxilos y otros grupos polares, por lo que el enlace de hidrógeno juega un papel importante en la formación de la biopelícula y las propiedades finales de la misma ([Jeevahan & Chandrasekaran, 2019](#); [Chen et al., 2021](#)). Los polisacáridos actúan como barrera contra los gases, pero poseen una pobre barrera contra el vapor de agua, ambas propiedades atribuidas a su red de polímeros hidrofílicos fuertemente empaquetados ([Jeevahan & Chandrasekaran, 2019](#)). Los lípidos son biomateriales comestibles, biodegradables y cohesivos. La mayoría de los lípidos y resinas comestibles son sólidos blandos a temperatura ambiente y poseen temperaturas de transición de fase características ([Han, 2014](#)). Por su fuerte hidrofobicidad, los lípidos tienen una buena resistencia a la humedad, lo que es importante para evitar el deterioro de los alimentos; sin embargo, las biopelículas a base de lípidos suelen ser relativamente frágiles, tienen malas propiedades mecánicas y una débil adhesión a los alimentos que tienen superficies hidrofílicas ([Chen et al., 2021](#)). La elección del material de formación de biopelícula depende del tipo de alimento al que se aplica, así como a las propiedades mecánicas, sensoriales y barreras deseadas en el producto final. Debido a la limitada propiedad de barrera que poseen de manera individual, se ha optado por el uso en sinergia de proteínas, polisacáridos y lípidos, a fin de mejorar y complementar sus propiedades, para ello es importante cuidar la biocompatibilidad entre estos ([Falguera et al., 2011](#)).

1.1.1.2. Plastificante

La International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) define plastificante como "una sustancia incorporada a un material (normalmente un plástico o elastómero) para aumentar su flexibilidad, trabajabilidad o distensibilidad" ([Chen et al., 2019](#)). Los plastificantes son generalmente compuestos no volátiles, de alto punto de ebullición y bajo peso molecular, que se añaden a un polímero, modificando las propiedades mecánicas y haciendo que las biopelículas sean más dúctiles, disminuyendo la viscosidad y la temperatura de transición vítrea del producto sin alterar el carácter químico fundamental del material plastificado. Pueden aumentar el volumen libre entre las cadenas del polímero, lo que permite que los segmentos de la cadena se muevan y giren más libremente, disminuyendo la temperatura de transición vítrea del polímero y la viscosidad ([Lim & Hoag, 2013](#)).

La adición de plastificantes afecta la resistencia a la permeabilidad de vapores y gases. La mayoría de los plastificantes son muy hidrofílicos e higroscópicos, por lo que pueden atraer moléculas de agua y formar un gran complejo hidrodinámico plastificante-agua ([Han, 2014](#)). El agua se considera el plastificante más potente para las biopelículas a base de hidrocoloides. Además del agua, los polioles, monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos son los plastificantes más utilizados. Los polioles han resultado ser especialmente eficaces para los polímeros hidrofílicos plastificados ([Chen et al., 2019](#)). El glicerol, es uno de los más utilizados debido a su buena eficacia, gran disponibilidad y alta higroscopicidad ([Chen et al., 2019](#); [Fundo et al., 2015](#)).

Las biopelículas plastificadas con glicerol y sorbitol son blandas, lisas, transparentes, uniformes y con buena resistencia mecánica, las plastificadas con glicol son duras, opacas, ásperas y tienen poca resistencia mecánica, mientras que las plastificadas con azúcares poseen mayor cristalinidad, resistencia mecánica y elongación ([Chen et al., 2021](#)). En el caso de las biopelículas comestibles de proteínas y polisacáridos, los plastificantes interrumpen los enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares, aumentan la distancia entre las moléculas del polímero y reducen la proporción entre la región cristalina y la amorfa. Es importante identificar las características químicas de los plastificantes para verificar su compatibilidad química con los biopolímeros y determinar los cambios en la estructura de la biopelícula causados por la adición de plastificantes ([Han, 2014](#)).

1.1.1.3. Aditivos

De acuerdo al Codex Alimentarius ([Codex STAN-192](#), desde 1995) “se entiende por aditivo alimentario cualquier sustancia que en cuanto tal no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición intencionada al alimento con fines tecnológicos (incluidos los sensoriales) en sus fases de fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte o pueda preverse razonablemente que resulte (directa o indirectamente) por sí o sus subproductos, en un componente del alimento o un elemento que afecte a sus características. Esta definición no incluye contaminantes o sustancias añadidas al alimento para mantener o mejorar las cualidades nutricionales.”

Las biopelículas y los recubrimientos comestibles pueden llevar varios agentes activos, como emulsionantes, antioxidantes, antimicrobianos, aceites esenciales, nutracéuticos, sabores y colorantes, para mejorar las propiedades físicas y mecánicas de las biopelículas. Los emulsionantes son agentes tensioactivos de naturaleza anfipática capaces de reducir la tensión superficial de la interfaz agua-lípido o de la superficie agua-aire. Modifican la energía superficial para controlar la adhesión y la humectabilidad de la superficie de la biopelícula. En el caso de las biopelículas proteicas, algunas proteínas formadoras de biopelículas tienen suficiente capacidad emulsionante debido a su estructura anfipática. También se pueden incorporar antioxidantes y agentes antimicrobianos a las soluciones formadoras de biopelículas para conseguir funciones activas adicionales al sistema de biopelículas y recubrimientos comestibles para proteger los productos alimentarios de la oxidación y el deterioro microbiano, lo que resulta en una mejora de la calidad y una mayor seguridad. Si se añaden aditivos bioactivos, deben identificarse los efectos de las condiciones del proceso de formación de la biopelícula, como la temperatura y la presión del proceso, sobre la bioactividad de los aditivos para preservar la actividad residual de los mismos ([Han, 2014](#)).

Los aditivos alimentarios constituyen un ingrediente integral de las operaciones modernas de producción y procesamiento de alimentos, ya que sus propiedades funcionales son primordiales no sólo para mejorar las cualidades sensoriales (olor, color, textura, sensación en la boca, aroma y/o sabor), sino también para prevenir el deterioro, prolongando así la vida útil de los productos alimentarios ([Bimpizas-Pinis et al., 2022](#)).

1.1.2. Caseína

Los biopolímeros, con sus ventajas de biodegradabilidad, procesabilidad, posibilidades de combinación y nula contaminación de los alimentos, se han convertido en los principales materiales de envasado de alimentos. Polisacáridos, proteínas y lípidos pueden extraerse directamente de la biomasa, sintetizarse a partir de monómeros bioderivados y producirse directamente por microorganismos, todos ellos abundantes y renovables. Además, las materias primas utilizadas para producirlos son de bajo costo, y algunas incluso proceden de residuos agroindustriales. Los biopolímeros utilizados como materiales de envasado de alimentos, que incluyen biopelículas y revestimientos, deben garantizar la seguridad sanitaria, las propiedades mecánicas, térmicas, de barrera y durabilidad. Algunas ventajas del uso de proteínas, como la abundancia relativa, la buena capacidad de formación de biopelículas, el alto valor nutricional, hace que estas se utilicen ampliamente para preparar biopelículas biodegradables ([Chen et al., 2019](#)).

La caseína se define como la proteína precipitada de la leche a un pH cercano a 4.6, constituye el 80% de las proteínas totales de la leche y contiene cuatro subunidades principales: la caseína kappa, la beta-caseína, la alfa s1-caseína y la alfa s2-caseína (κ -, β -, α s1- y α s2-caseína), que constituyen el 13%, 36%, 38% y 10% de la composición de la caseína, respectivamente. Las propiedades únicas de las cuatro fracciones proteicas afectan a la capacidad de formación de biopelículas de la caseína ([Alichanidis et al., 2016](#); [Bonnaillie et al., 2014](#); [Chen et al., 2019](#)).

De acuerdo al método de coagulación, se pueden obtener diferentes tipos de caseína con características específicas, siendo la caseína ácida y de cuajo los principales tipos disponibles. La caseína ácida es la caseína precipitada obtenida mediante la acidificación del pH de la leche a 4.6 (punto isoeléctrico de la caseína) con ácidos minerales o ácido láctico. Los fosfatos de calcio coloidales de la caseína ácida se solubilizan y se pierden durante el proceso de coagulación. Es insoluble en agua y su pH es de alrededor de 4.6. En el caso de la caseína de cuajo, la coagulación se obtiene por la acción de las enzimas, la quimosina (cuajo), que escinde una sustancia química ligada a la κ -caseína (denominada glicomacropéptido) e induce una desestabilización de las micelas de caseína. Es insoluble en agua, conserva sus fosfatos de calcio coloidales y su pH es de alrededor de 7.5. Las caseínas ácidas y de cuajo están menos estudiadas que el caseinato ([Chevalier et al., 2018](#)).

La caseína, es un hidrocoloide deseable para la formación de biopelículas comestibles debido a su alto valor nutricional, solubilidad en agua y capacidad de emulsión ([Picchio et al., 2018](#)). Puede formar biopelículas de forma natural, a partir de soluciones acuosas sin necesidad de procesamiento adicional debido a la fuerte cohesión entre cadenas causada por su naturaleza de bobina aleatoria y un gran número de enlaces intermoleculares de hidrógeno, hidrofóbicos y electrostáticos formados. Las propiedades de la caseína, como la biodegradabilidad, alta estabilidad térmica, no toxicidad, capacidad de unir pequeñas moléculas e iones y la capacidad de formación de micelas, hacen que la proteína sea un buen candidato para biopelículas biodegradables y comestibles ([Chen et al., 2019](#)).

Al aportar muchos grupos funcionales polares, como los grupos hidroxilo y amino, a la matriz de la biopelícula, las biopelículas de caseína muestran una buena barrera al oxígeno y a otras moléculas no polares, lo que las hace útiles para la protección de productos propensos a la oxidación ([Picchio et al., 2018](#); [Bonnaillie et al., 2014](#)). Sin embargo, las biopelículas de caseína pura tienden a encogerse durante el secado y a volverse quebradizas, por lo que se usan los plastificantes comestibles, como el glicerol, para aumentar el volumen libre de la red de polímeros y para hacer que las biopelículas de caseína sean más flexibles, reduciendo su temperatura de transición vítrea ([Bonnaillie et al., 2014](#)).

Las biopelículas comestibles de caseína tienen buenas propiedades de barrera al oxígeno, por lo que son adecuadas para productos propensos a la oxidación. Poseen una buena resistencia a la tracción y una elasticidad moderada en condiciones normales cuando se les añade glicerol ([Saikia & Badwaik, 2018](#)). La caseína se ha descrito como una buena materia prima para la formación de biopelículas, que permite la producción de biopelículas flexibles y transparentes con buenas propiedades de barrera al aroma y el aceite a baja humedad relativa ([Chevalier et al., 2018](#)). Una desventaja es que son muy sensibles a la humedad, lo que afecta en gran medida a las propiedades mecánicas de las biopelículas y limita su rango de utilización ([Saikia & Badwaik, 2018](#)). Una solución a esto es el empleo de la β -caseína, la proteína más hidrofóbica de la leche, se estudió por su potencial para proporcionar biopelículas con una menor permeabilidad al vapor de agua. También se han usado hidrocoloides, como la gelatina, para mejorar la resistencia mecánica, así como las propiedades de barrera al vapor de agua ([Bonnaillie et al., 2014](#)).

1.1.3. Bacteriocinas

La bioconservación es un método de conservación natural que implica el uso de microorganismos o de sus productos naturales (metabolitos). Las bacterias del ácido láctico (BAL) tienen gran potencial en la bioconservación, ya que producen sustancias antimicrobianas activas como las bacteriocinas ([Kumariya et al., 2019](#)). Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos (AMP), de una longitud de 20 a 60 aminoácidos, catiónicos e hidrofóbicos, producidos por las bacterias, que son secretados al medio extracelular y tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de otras bacterias ([Kumariya et al., 2019](#); [Martínez et al., 2016](#); [Beshkova & Frengova, 2012](#)). En la naturaleza existe una gran diversidad bacteriana y se estima que un 99 % de las bacterias producen cuando menos una bacteriocina ([Heredia-Castro et al., 2017](#)).

La estructura secundaria de los L-aminoácidos crea la estructura catiónica o anfipática de los AMP, lo que conduce a su amplia acción contra una variedad de bacterias, virus, protozoos y hongos ([Biswaro et al., 2018](#)). Los AMP matan a las bacterias por diferentes vías, como el mecanismo externo, incluyendo la degradación de la membrana bacteriana, y mecanismos internos, como impedir la síntesis de los principales componentes celulares, incluidos el ADN, ARN, pared celular, proteínas y/o regulación de las enzimas ([Bahrami et al., 2019](#)).

Además de su actividad antimicrobiana, otra característica de las bacteriocinas es que su peso molecular oscila entre 2 kDa y 300 kDa. Las lantibióticas y no lantibióticas se caracterizan por tener un pH elevado, son altamente catiónicas a pH 7, tienen residuos hidrofóbicos/hidrófilos y tienen actividad en el rango de pH 3-7 debido a su óptima estabilidad, aunque se ha observado inactivación irreversible a pH neutro de algunas ([Ahmad et al., 2017](#)). Entre las ventajas que se han considerado para la aplicación y uso de los AMP en la industria alimentaria están su inocuidad para células eucariotas y su capacidad para no formar compuestos secundarios al biodegradarse en el tracto gastrointestinal del huésped ([Heredia-Castro et al., 2017](#)).

Los AMP se incorporan en los productos alimenticios de diversas maneras: adición del compuesto purificado como aditivo alimentario, adición de un fermentado bacteriano como sustancia GRAS, adición de la bacteria productora al producto o como parte del cultivo iniciador, incorporación a un recubrimiento alimentario comestible o unido al envase alimentario. El material de recubrimiento protege a la bacteriocina de la inactivación debida a la interacción con los componentes de los alimentos y a la inactivación enzimática. Además, la aplicación de moléculas

de bacteriocina en la superficie del alimento requiere cantidades mínimas de bacteriocina, lo que disminuye los costos de procesamiento ([O'Bryan et al., 2018](#)).

1.1.3.1. Clasificación

Las bacteriocinas han sido agrupadas de acuerdo a su peso molecular en cinco clases: la **clase I** o lantibióticos son péptidos de bajo peso molecular (<5 kDa), resistentes a variaciones de temperatura. Los aminoácidos presentes en la estructura son: lantionina, metilantionina, dehidroxilamina y dehidrobutirina. Los lantibióticos pueden encontrarse en forma lineal (tipo A), como en el caso de la nisina o de forma globular (tipo B), como el caso de la mersacidina. La **clase II** incluye péptidos pequeños termoestables (<10 kDa) sin aminoácidos modificados en su estructura. La clase II ha sido dividida en cinco subclases (IIa, IIb, IIc, IId y IIe). La subclase IIa, son bacteriocinas que actúan fuertemente contra *Listeria monocytogenes*, siendo la pediocina PA-1 la más representativa; la subclase IIb son bacteriocinas formadas por dos péptidos, como la plantaricina EF; en la subclase IIc se encuentran las bacteriocinas que no comparten homología con ninguna otra bacteriocina, por ejemplo lactococcina A; en la clase IId, se encuentran péptidos lineales como la lacticina Q; y en la clase IIe se encuentran las bacteriocinas que se formaron por la degradación específica de proteínas más grandes. La **clase III** son péptidos termolábiles de alto peso molecular (>30 kDa), siendo la helveticina la bacteriocina representativa. La **clase IV** incluye péptidos grandes y de estructura compleja, ya que se encuentran asociados a carbohidratos (glicoproteínas) o lípidos (lipoproteínas), siendo la lactocina S una de las bacteriocinas de esta clase. Por último, en la **clase V** se encuentran los péptidos con una estructura circular que no posee modificaciones postraduccionales, siendo la enterocina AS-48 un ejemplo de esta clase ([Heredia-Castro et al., 2017](#)).

1.1.3.2. Nisina

La nisina es un pequeño péptido de 34 aminoácidos con una masa molecular de 3.5 kDa producida por bacterias Gram-positivas, incluyendo *Lactococcus* y *Streptococcus* ([Ng et al., 2020](#); [Khan & Oh, 2016](#)). La nisina es un lantibiótico derivado de los antibióticos de lantionina y consiste en aminoácidos inusuales y distintivos modificados después de la traducción: lantionina y 3-metilantionina ligada al tioéter y 2,3-didehidroalanina y 2,3-didehidrobutirina insaturada ([Khan & Oh, 2016](#)). Hasta la fecha, se han descubierto y caracterizado ocho tipos de variantes de nisina: las nisinas A, Z, F y Q producidas por *Lactococcus lactis* y las nisinas U, U2, P y H producidas por

calentamiento durante varias horas a 100 °C sólo provoca una ligera disminución de su actividad ([Lule et al., 2016](#)).

La natamicina, muestra una actividad de inhibición de mohos de amplio espectro, siendo a la vez segura y eficaz a concentraciones muy bajas (normalmente usada en concentraciones 1 a 10 ppm dependiendo del alimento). También es activo contra los protozoos que tienen ergosterol en sus membranas ([Aparicio et al., 2016](#)). La membrana de las células eucariotas tiene lípidos, fosfolípidos, proteínas y esteroides, donde los esteroides (ergosterol) desempeñan un papel importante en la acción selectiva de los antimicóticos de polieno, por tanto, la natamicina es activa contra los hongos pero no contra las bacterias ([Lule et al., 2016](#); [González-Forte et al., 2019](#)). Es extremadamente renuente a la resistencia microbiana, ya que la única forma que tendrían los hongos de evadir su acción sería cambiar los esteroides de sus membranas. Por estas razones, así como su baja toxicidad para las células de los mamíferos, esta molécula se ha convertido en uno de los principales inhibidores de moho utilizados en la industria alimentaria. Otra ventaja, es que su aplicación en la superficie de los alimentos no afecta a sus propiedades sensoriales: sabor, textura y color ([Aparicio et al., 2016](#)).

Su uso se aprobó en 1967 como conservante del queso, desde entonces, se ha extendido a una gran variedad de alimentos y bebidas. Al igual que la nisina, la natamicina está incluida en la lista de aditivos del Codex Alimentarius ([Codex STAN-192](#), desde 1995). Además, ha sido autorizada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA por sus siglas en inglés) (aditivo E235) y la FDA para proteger los alimentos de la contaminación por levaduras, mohos y de los posibles riesgos inherentes a la intoxicación por micotoxinas. En particular, es el único agente antifúngico que se considera GRAS ([Aparicio et al., 2016](#)). El [Codex STAN-192](#) permite su uso en quesos no madurados, madurados, procesados, análogos y de proteína de suero en un nivel máximo de 40 ppm y en productos cárnicos, avícolas y de caza procesados, curados y secos no tratados térmicamente, en piezas enteras o en cortes, en un nivel máximo de 20 ppm ([Mani-López et al., 2016](#)). La mayoría de las levaduras y mohos son inhibidos a concentraciones de 1-15 ppm de natamicina en varios alimentos y bebidas lácteas, demostrando ser un método factible y atractivo para la bioconservación de alimentos ([Lule et al., 2016](#)).

1.1.3.4. Mecanismo de acción

Como se ha mencionado, la nisina tiene un modo de acción dual. Este mecanismo puede dividirse en tres etapas (Figura 3): la bacteriocina se une a la pared celular mediante atracciones electrostáticas entre la molécula de nisina catiónica y los fosfolípidos aniónicos de la superficie celular bacteriana (etapa 1). Después, la nisina se une al lípido II, principal transportador de las subunidades de peptidoglucano, impidiendo la síntesis de la pared celular, y utiliza esta molécula para anclarse a la membrana celular (región N-terminal) (etapa 2). Luego, la bacteriocina cambia su orientación en relación con la membrana y se inserta en ésta (región C-terminal). Finalmente, la unión de diversos péptidos en el sitio de inserción provoca la formación de un poro transmembranal que da lugar a la disipación de la fuerza motriz de protones, agotamiento del ATP intracelular, fuga de sustratos intracelulares importantes (aminoácidos y cationes esenciales como el K^+), lo que provoca la muerte celular (etapa 3) ([Preciado et al., 2013](#); [O'Bryan et al., 2018](#); [Kumariya et al., 2019](#)).

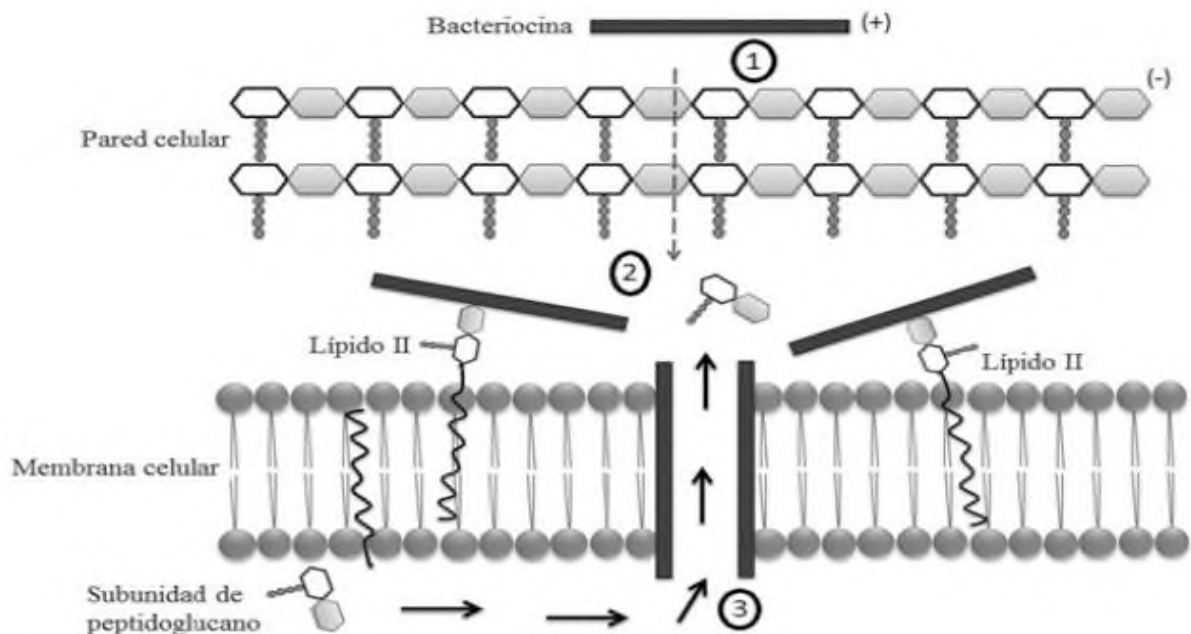


Figura 3. Mecanismo dual de la nisina. Tomado de [Preciado et al. \(2013\)](#).

El ergosterol es el principal esteroide en las células fúngicas, además de tener un papel estructural para la membrana fúngica, regula diversas actividades fisiológicas, como la endocitosis, la exocitosis, la fusión de vacuolas, la polaridad y la morfogénesis ([Rivera-Toledo et al., 2020](#); [Aparicio et al., 2016](#)). A diferencia de otros antifúngicos poliénicos que forman poros en la

membrana, la natamicina no forma complejos de disrupción de la membrana y su acción está correlacionada con la alteración del funcionamiento normal del ergosterol en la membrana fúngica ([Te Welscher et al., 2012](#); [Aparicio et al., 2016](#)). La natamicina tiene una gran afinidad por el ergosterol, se une de forma irreversible a este en la membrana celular del hongo (esta interacción es mediada de manera esencial por la micosamina), de esta manera, por el simple hecho de unirse la molécula poliénica al ergosterol, interfiere con funciones vitales para las células fúngicas, como el crecimiento celular, la germinación de las esporas y la actividad de las enzimas asociadas a la membrana (Figura 4) ([Lule et al., 2016](#); [Rivera-Toledo et al., 2020](#); [Delves-Broughton & Weber, 2011](#)). La natamicina perjudica la fusión de las vacuolas a través de la perturbación de las reacciones de cebado dependientes del ergosterol que preceden a la fusión de la membrana e inhibe el crecimiento de las levaduras y los hongos mediante la inhibición inmediata del transporte de aminoácidos y glucosa a través de la membrana plasmática. Esto es atribuible a una inhibición de las proteínas transportadoras dependiente del ergosterol ([Aparicio et al., 2016](#); [Lule et al., 2016](#)).

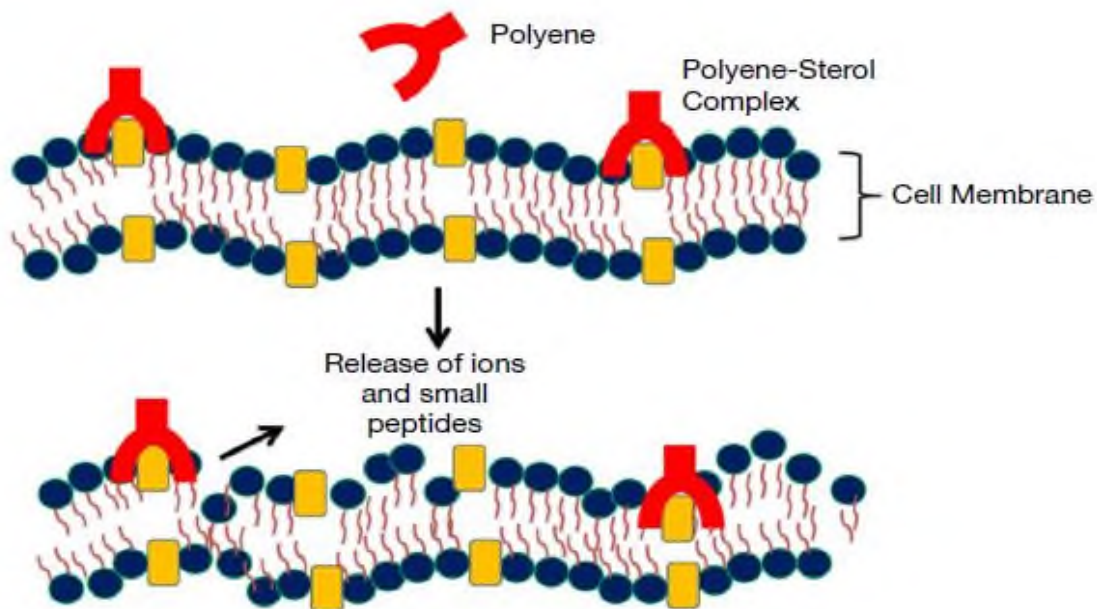


Figura 4. Mecanismo de acción de la natamicina. Tomado de [Lule et al., 2016](#).

1.1.4. *Listeria monocytogenes*

Es un pequeño bacilo Gram-positivo no formador de esporas de 0.5-4 µm de diámetro y 0.5-2 µm de longitud. Es catalasa positivo y negativo a la oxidasa, urea e indol ([Jamshidi & Zeinali, 2019](#); [Matle et al., 2020](#)). La temperatura óptima de crecimiento de *L. monocytogenes* es de 30-37 °C, pero puede sobrevivir entre 0 y 50 °C. Soporta la congelación, pero se inactiva calentándola a 60 °C durante 30 minutos. Tiene una motilidad rotatoria a 20-25 °C debido a los flagelos peritricos. Es un anaerobio facultativo que puede crecer en un rango de pH de 4 a 9.5 y tiene la capacidad de crecer en cloruro de sodio al 10% (p/v). El acetato es el acidulante más eficaz para inhibir su crecimiento. La actividad de agua mínima para su crecimiento oscila entre 0.90 y 0.97. ([Jamshidi & Zeinali, 2019](#); [Batt, 2014](#)). Estas condiciones de crecimiento contribuyen a su versatilidad para crecer y sobrevivir en condiciones ambientales extremas planteadas en las instalaciones de procesamiento de alimentos y se convierten en un grave problema para la industria alimentaria ([Matle et al., 2020](#)). En la industria alimentaria, es capaz de formar un biofilm que puede actuar como una fuente potencial de contaminación. Es un organismo ampliamente distribuido en la naturaleza, cuyos principales reservorios son el suelo y el forraje ([Jamshidi & Zeinali, 2019](#)).

El género *Listeria* cuenta con 20 especies y se subdivide en dos grandes grupos: (i) *Listeria sensu stricto* que comprende las especies *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* y *L. marthii* y (ii) *Listeria sensu lato* que incluye *L. grayi*, *L. fleischmannii*, *L. weihenstephanensis*, *L. rocourtiae*, *L. floridensis*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. aquatica*, *L. grandensis*, *L. newyorkensis*, *L. goaensis*, *L. booriae*, *L. costaricensis* y *L. thailandensis* ([Lopes-Luz et al., 2021](#)). Sólo *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* pueden causar enfermedades en animales, y sólo *L. monocytogenes* parece causar enfermedades en humanos, aunque hay informes esporádicos de *L. innocua* y *L. seeligeri* que causan enfermedades en humanos. Se ha encontrado en 37 especies de mamíferos y 17 especies de aves, así como en peces y mariscos. Aproximadamente el 10% de la población humana puede ser portadora ([Batt, 2014](#)). Basándose en los antígenos somáticos (O) y flagelares (H), se identificaron 13 serotipos en *L. monocytogenes*. Los alimentos o el entorno de producción de alimentos suelen estar contaminados con los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b ([Jamshidi & Zeinali, 2019](#)).

Listeria monocytogenes es un patógeno bacteriano, invasivo, transmitido por los alimentos, que causa la listeriosis, una enfermedad sistémica resultante de la ingestión de alimentos

contaminados ([Lopes-Luz et al., 2021](#)). Los brotes de listeriosis se han relacionado con leches y quesos crudos sin pasteurizar, helados, verduras crudas o procesadas, frutas crudas o procesadas, aves crudas o poco cocidas, salchichas, hot dogs, embutidos, pescado crudo o ahumado y otros mariscos. *L. monocytogenes* también se ha encontrado en alimentos crudos para mascotas. Generalmente se transmite cuando los alimentos se cosechan, procesan, preparan, empaquetan, transportan o almacenan en ambientes contaminados con *L. monocytogenes*. Los ambientes pueden estar contaminados por materias primas, agua, suelo y aire entrante ([Listeria \(listeriosis\). FDA](#)). La propagación sistémica del patógeno desde el tracto gastrointestinal depende de su capacidad para atravesar las barreras intestinal, hematoencefálica y placentaria. La infección localizada en el tracto gastrointestinal puede conducir a la aparición de una forma rara de gastroenteritis caracterizada por diarrea, calambres abdominales y síntomas parecidos a los de la gripe en adultos sanos, mientras que la enfermedad sistémica invasiva se manifiesta por fiebre, dolor de cabeza, meningitis, encefalitis, absceso hepático, aborto, parto prematuro, mortinato e infección neonatal con sepsis y neumonía en huéspedes inmunocomprometidos. La tasa de mortalidad en huéspedes inmunocomprometidos, incluidos los ancianos, mujeres embarazadas y sus fetos, neonatos, pacientes con cáncer y receptores de quimioterapia, es del 20-30% ([Lopes-Luz et al., 2021](#)). En 2016, hubo 2536 casos humanos confirmados de listeriosis en la Unión Europea (UE), una tasa de notificación de 0.47 casos por cada 100,000 habitantes. La incidencia de la listeriosis en Estados Unidos es de aproximadamente 0.24/100,000 habitantes de acuerdo al Centers for Disease Control ([Jordan & McAuliffe, 2018](#)).

En los alimentos, los métodos para la detección de *L. monocytogenes* han sido establecidos tanto por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA por sus siglas en inglés) como por la FDA ([Batt, 2014](#)). Se utilizan diferentes metodologías para el análisis de *L. monocytogenes*, por ejemplo, la ISO, la BAM o métodos alternativos ([Jordan & McAuliffe, 2018](#)). Muchos países han respondido a la amenaza que suponen los patógenos transmitidos por alimentos mediante la aplicación de estrictas normas o criterios microbiológicos en relación con la contaminación de los productos alimentarios. Las normas microbiológicas varían entre los diferentes países; sin embargo, se guían por normas internacionales como la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos (ICMSF por sus siglas en inglés) y la Comisión del Codex Alimentarius ([Matle et al., 2020](#)).

1.2. ANTECEDENTES

Las aplicaciones de polímeros son diversas, desde elaboración de fibras de sutura médica, cubiertas de aparatos electrónicos hasta empaques compatibles con productos agrícolas. La Tabla 1 concentra las aportaciones científicas sobre biopelículas de caseína y los detalles se describen a continuación.

Tabla 1. Aplicaciones de caseína con actividad antimicrobiana.

Aplicación / Evaluación	Método	Referencia
Propiedades fisicoquímicas y morfológicas	Biopelícula comestible probiótica preparada con pectina, alginato de sodio, glicerol y caseína.	Namratha et al. (2020)
Propiedades fisicoquímicas y antimicrobianas	Biopelículas comestibles de caseína y quitosano.	Apriliyani et al. (2020)
Caracterización y propiedad antimicrobiana	Biopelículas compuestas activas preparadas con caseína, gelatina y pectina.	Saikia & Badwaik (2018)
Propiedades morfológicas, barrera, tensión y antimicrobianas	Biopelículas comestibles preparadas de las mezclas de caseína y cera como portadoras de sorbato de potasio producidas por extrusión de doble tornillo.	Chevalier et al. (2018)
Propiedades fisicoquímicas	Biopelículas de caseína reticuladas con ácido tánico.	Picchio et al. (2018)
Crecimiento microbiano, propiedades químicas y sensoriales	Biopelículas comestibles de caseína y natamicina para controlar el crecimiento de moho durante la maduración del queso Kashar.	Yangilar & Oğuzhan Yıldız (2016)
Propiedades antimicrobianas, mecánicas, térmicas y morfológicas	Biopelículas antimicrobianas comestibles de gelatina y caseína que contienen nisina encapsulada en liposomas y nanoarcilla de halloysita	Boelter & Brandelli (2016)
Propiedades fisicoquímicas y mecánicas, biodegradabilidad y toxicidad.	Biopelículas bicapa comestible de pectina-alginato de sodio y caseína, incorporadas con nanopartículas de caseína y un nanocompuesto conjugado de caseína y plata.	Bora & Mishra (2016)
Propiedades mecánicas y de estructura	Biopelículas de caseína adicionadas con pectina cítrica.	Bonnaillie et al. (2014)
Caracterización fisicoquímica	Biopelículas de caseína y concentrado de proteína de suero (WPC), plastificadas con glicerol y sorbitol por la técnica de colada y su aplicación para el envasado de queso Cheddar.	Wagh et al. (2014)

Fabricación y evaluación de las propiedades fisicoquímicas de una biopelícula comestible probiótica basada en un compuesto de pectina-alginato-caseína. El objetivo del estudio de [Namratha et al. \(2020\)](#) fue la incorporación del probiótico *E. faecium* Rp1 aislado de las gachas de Ragi (alimento similar a una papilla) en la matriz de biopelícula comestible preparada con caseína, pectina, alginato de sodio (SA) y glicerol. La biopelícula comestible probiótica se preparó mediante la técnica de vaciado en la que se añadieron SA de calidad alimentaria (0.5-3%); pectina (1-3%); caseína (2-2.5%) y glicerol (1.5-3%) en diferentes concentraciones y se mezclaron en agua destilada caliente (50 °C) con agitación continua. A partir de las biopelículas comestibles compuestas preparadas, descubrieron que la mejor composición para preparar la biopelícula comestible probiótica fue aquella preparada con pectina al 3% p/v, caseína al 2% p/v, SA al 3% p/v y glicerol al 2% v/v. La adición de probiótico no alteró el espesor de la biopelícula comestible; el espesor de la biopelícula con y sin probiótico fue de 0.23 ± 0.03 mm y 0.28 ± 0.02 mm, respectivamente. La biopelícula mostró buenas propiedades antimicrobianas y antioxidantes con propiedades fisicoquímicas aceptables. El espectro IR-TF expuso las bandas de caseína a 3455 cm^{-1} , 1661 cm^{-1} y 1510 cm^{-1} . El estudio morfológico demostró la uniformidad de la biopelícula y reveló la presencia de *E. faecium* Rp1. En general, la matriz de biopelícula comestible desarrollada resultó ser prometedora para el atrapamiento de probióticos y, por lo tanto, sugiere su uso como recubrimiento de productos de confitería para mejorar su seguridad y sus potenciales beneficios para la salud.

Propiedades fisicoquímicas y antimicrobianas de las biopelículas comestibles de caseína-quitosano con calidad y seguridad alimentaria. El objetivo del estudio de [Apriliyani et al. \(2020\)](#) fue determinar la mejor proporción entre la caseína y el quitosano en la fabricación de biopelículas comestibles. Esperando que la proporción produzca un efecto en términos de calidad fisicoquímica (permeabilidad al vapor de agua, actividad del agua y solubilidad de la biopelícula) y actividad antimicrobiana (*Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Escherichia coli* y *Salmonella sp.*) en la biopelícula comestible formada. Realizaron observaciones a las formulaciones de la relación de solución de caseína y quitosano 1:1; 1:2; 1:3 y 1:4 (mL:mL) para determinar la que produce la mejor solución. La mejor solución en relación caseína:quitosano fue= 1:4 (mL:mL). La mayor permeabilidad al vapor de agua con $0.1140\text{ g mm m}^{-2}\text{ h}^{-1}\text{ kPa}^{-1}$, la solubilidad de la biopelícula con 32.809% y la actividad del agua con 0.709. Las biopelículas

comestibles de caseína-quitosano tuvieron una fuerte actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *L. bulgaricus*, *E. coli* y *Salmonella sp.*, sobre todo el tratamiento CS4 con un halo de inhibición de 18.06, 19.80, 26.92 y 20.62 mm, respectivamente.

Caracterización y propiedad antimicrobiana de biopelículas compuestas activas a base de caseína, gelatina y pectina. El estudio de [Saikia & Badwaik \(2018\)](#) fue el desarrollo de biopelículas comestibles compuestas mediante la combinación de pectina, caseína y gelatina incorporadas con aceite esencial de clavo para conseguir la mejor biopelícula comestible con propiedades activas y mejoradas. Prepararon nueve biopelículas con proporciones variables (0-100%) de pectina, caseína y gelatina en las proporciones de 100:0:0 (F1), 0:100:0 (F2), 0:0:100 (F3), 50:0:50 (F4), 50:50:0 (F5), 0:50:50 (F6), 50:25:25 (F7), 25:25:50 (F8), 25:50:25 (F9). Analizaron las biopelículas en cuanto a espesor, permeabilidad al vapor de agua, absorción de humedad, solubilidad en agua, propiedades de tensión, color, etc. La biopelícula F7 (50:25:25) mostró las mejores propiedades. La solubilidad en agua, la absorción de humedad y la permeabilidad al vapor de agua de la biopelícula F7 fueron de 40.59%, 17.75% y 1.07×10^{-12} g/Pa h m, respectivamente, y superaron a las demás biopelículas. El color y las propiedades de tensión de la biopelícula F7 fueron satisfactorios y mostraron una alta resistencia a la tensión de 8.63×10^5 Pa. La morfología de la superficie de la biopelícula F7 se encontró lisa, uniforme y sin grietas a través del análisis SEM. La descomposición térmica de todas las biopelículas compuestas comenzó por encima de los 200 °C. Incorporaron el aceite esencial de clavo a la solución formadora de biopelícula F7 seleccionada al 0.5, 1 y 1.5% (v/v). La biopelícula incorporada con 1.5% de aceite esencial de clavo mostró la mayor propiedad antimicrobiana contra *Escherichia coli*. Estas biopelículas compuestas eran biodegradables y poseían propiedades mecánicas moderadas y una tasa baja de transmisión de vapor de agua.

Extrusión de mezcla de caseína y cera para la producción de biopelículas comestibles como portadoras de sorbato de potasio. El objetivo del trabajo de [Chevalier et al. \(2018\)](#) consistió en evaluar el potencial del proceso de extrusión para producir biopelículas de caseína de cuajo y ceras (cera de abeja, candelilla y carnauba) portadoras de sorbato de potasio (KS), y analizar la liberación y potencial antimicrobiano del KS a 15 °C contra *Escherichia coli* ATCC 10536. Las ceras no se añadieron en una proporción superior al 5% (p/p) para evitar que se produjera una ruptura en el interior del material. Con el análisis SEM confirmaron la dispersión homogénea de las ceras

en las biopelículas al someterse al proceso de extrusión. Las propiedades morfológicas de la biopelícula se afectaron al añadir cera al 1% y la adición de cera de abeja y carnauba al 5% también tuvo un efecto significativo en la morfología de la película. Observaron que a mayor humedad relativa (80%), el módulo de Young (YM) y la resistencia a la tensión (TS) disminuyeron entre 5 y 10 veces, y el alargamiento a la rotura (%E) aumentó entre 2 y 9 veces. La presencia de KS inhibió significativamente a *E. coli*, incluso a baja concentración y hasta después de 20 días a 15 °C, lo que les sugirió el efecto de la matriz de caseína como portadora de conservantes. Además, demostraron una acción plastificante del KS al 10% de adición sobre las propiedades mecánicas (disminución de la TS y aumento del %E) y sobre las propiedades de barrera al agua. En lo que respecta a la permeabilidad al vapor de agua (WVP), sólo la cera de abeja, entre las ceras introducidas en las biopelículas, fue eficaz para reducir la WVP en 20%.

Biopelículas de caseína reticuladas con ácido tánico para aplicaciones de envasado de alimentos. La investigación de [Picchio et al. \(2018\)](#) tuvo como objetivo el uso de ácido tánico (TA) para producir biopelículas plastificadas de caseína reticulada con propiedades fisicoquímicas mejoradas y baja toxicidad. La preparación de la biopelícula consistió en caseína (10% p/p), glicerol (50% p/p), y TA (4, 8, 10, 15 y 20% p/p). Los resultados obtenidos mostraron que las biopelículas reticuladas presentaban una estructura de red, que fue modificada por la concentración de TA utilizada en la reacción de reticulación. El aumento de la concentración del agente reticulante mejoró la resistencia a la tensión (TS), pero comprometió el alargamiento a la rotura (EB). La solución de caseína se comportó como un sólido viscoelástico, indicando la existencia de enlaces físicos cruzados. Observaron que el efecto producido por la incorporación de TA fue un desplazamiento de las bandas de la amida I (estiramiento de C=O) y la amida II (flexión de N-H); y un aumento relativo de la señal de la primera, lo que atribuyeron a un fuerte enlace químico entre el compuesto tánico y la proteína. El uso de TA optimizó la resistencia al agua de las biopelículas. Además, investigaron la influencia del tiempo de almacenamiento sobre la resistencia al agua de las biopelículas. El grado de hinchamiento en el equilibrio resultante disminuía notablemente. La estabilidad térmica de las biopelículas mejoró mediante la reticulación con TA. Todas las biopelículas pudieron considerarse no tóxicas para las células hasta una concentración de extracto del 1%, pero a una concentración superior al 10%, sólo los extractos de TA₄ y TA₈ fueron tolerados. Aunque el TA sin reaccionar puede ser una fuente de

toxicidad a altas concentraciones. Los ensayos de biodegradación les mostraron que las biopelículas podían descomponerse fácilmente después de 7 días en condiciones de compostaje y su tasa de degradación podía ser controlada por la concentración de TA, debido a su actividad antibacteriana.

Eficacia de las biopelículas comestibles de caseína/natamicina para controlar el crecimiento de moho y las propiedades microbiológicas, químicas y sensoriales durante la maduración del queso Kashar. El objetivo del estudio de [Yangilar & Oğuzhan Yıldız \(2016\)](#) fue determinar la eficacia de las biopelículas de recubrimiento a base de caseína (Cas), caseína/natamicina (Cas/N) y natamicina (N) en la prevención del crecimiento de moho e investigar sus efectos sobre las propiedades microbiológicas y químicas (pH, materia seca, grasa, acidez, sal, proteína, nitrógeno soluble en agua, índice de maduración, nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 12% y pH 4.6 de nitrógeno soluble), los niveles de proteólisis y la evaluación sensorial del queso Kashar tradicional durante su maduración (3, 30, 60 y 90 días). La diferencia en los cambios microbiológicos y químicos entre las muestras resultó ser significativa ($P < 0.05$) durante el periodo de maduración. Los recuentos de moho más altos y más bajos los determinaron en las muestras control ($2.87 \log \text{ UFC g}^{-1}$) y Cas/N ($< 1 \log \text{ UFC g}^{-1}$), respectivamente, a los 90 días de maduración. En comparación con los otros quesos, los quesos control y los recubiertos con Cas/N tenían niveles más altos de nitrógeno soluble en agua y de índice de maduración al final del almacenamiento. En cuanto a la evaluación sensorial, la N recibió la mayor puntuación de textura (8.20), mientras que el queso de control (C) obtuvo la puntuación más baja (7.06). La muestra Cas obtuvo las puntuaciones más bajas de olor (7.40) y sabor (6.93). Las muestras N y Cas/N fueron las preferidas por los panelistas. Este estudio es relevante ya que indica con éxito a través de las muestras recubiertas con caseína, caseína/natamicina y soluciones de natamicina que los materiales mencionados podrían ser utilizados como materiales de recubrimiento eficaces en la fabricación del queso tradicional Kashar.

Biopelículas innovadoras bionanocompuestas de proteínas comestibles que contienen nisina encapsulada en liposomas y nanoarcilla de halloysita. El objetivo del estudio de [Boelter & Brandelli \(2016\)](#) fue desarrollar biopelículas antimicrobianas comestibles de gelatina y caseína incorporando nanoarcillas como refuerzo y liposomas de fosfatidilcolina que contienen nisina. Prepararon liposomas con 0.5, 1.0 y 1.5 mg/mL de nisina a partir de dos fuentes de fosfatidilcolina

(Phospholipon® y lecitina de soya). Los liposomas preparados con lecitina de soya o con Phospholipon® mostraron una alta eficiencia de atrapamiento (94-100%) y un tamaño de partícula que oscilaba entre 124 y 173 nm, excepto los preparados con lecitina de soya y 1.0 mg/mL de nisina. El grosor de las biopelículas osciló entre 0.057 y 0.111 mm; las biopelículas de gelatina eran significativamente más gruesas que las de caseína a excepción de la biopelícula de caseína con liposomas y halloysita. Las biopelículas presentaron actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* y *Bacillus cereus*: los halos inhibitorios fueron de 43 ± 2 mm y 41 ± 2 mm para las biopelículas de gelatina que contenían liposomas y las que contenían liposomas + halloysita, respectivamente. Las biopelículas de caseína que contenían liposomas mostraron halos inhibitorios de 38 ± 3 mm, mientras que las biopelículas de caseína con liposomas + halloysita mostraron halos de 37 ± 2 mm. Las principales bandas de absorción fueron similares en las biopelículas de caseína y gelatina: $1033-1040\text{ cm}^{-1}$ (C-N), $1631-1636\text{ cm}^{-1}$ (H-N) y $3282-3292\text{ cm}^{-1}$ (O-H). Estas bandas son típicas de la matriz proteica. La ausencia de cambios significativos indica que no se produjeron interacciones químicas entre los liposomas y la halloysita con la matriz proteica de las biopelículas. La microscopía electrónica de barrido reveló que las biopelículas tenían una superficie lisa, pero mostraban una mayor rugosidad con la adición de liposomas y halloysita. Las biopelículas de caseína eran más finas y ligeramente amarillentas, menos rígidas y muy elásticas en comparación con las de gelatina.

Caracterización de nanopartículas conjugadas de caseína y caseína-plata que contienen una biopelícula bicapa multifuncional (pectina-alginato de sodio/caseína). En la investigación de [Bora & Mishra \(2016\)](#) han intentado desarrollar una biopelícula bicapa comestible (pectina-alginato de sodio/caseína) con buenas propiedades de barrera y antimicrobianas, así como con propiedades funcionales mejoradas, incorporando nanopartículas de caseína en la capa interna de caseína y nanocompuesto conjugado de caseína-plata en la capa externa de pectina-alginato de sodio. Observaron que el grosor de las biopelículas se encontró en el rango de 0.13-0.20 mm. El grosor de las biopelículas que contenía el nanocompuesto S4 o S5 era mayor que el de las otras biopelículas que contenían nanocompuestos. La solubilidad en agua del nanocompuesto que contenía la bicapa era significativamente menor que la de la biopelícula de control. La permeabilidad al vapor de agua osciló en 0.011-0.020 g H₂O mm/cm². Los valores de la tasa de transmisión de vapores (WVTR) fluctuaron entre 2.78×10^{-5} y 3.94×10^{-5} g H₂O mm/h cm² para las

biopelículas que contienen nanopartículas. La adición de plata-caseína conjugada en la capa de pectina-alginato sódico y de caseína en la capa de caseína mejoró la resistencia a la tensión de la biopelícula en comparación con el control. La adición de nanopartículas de caseína (sintetizadas a pH 11) mejoró la estructura de la biopelícula y las propiedades mecánicas de la misma. Todas las biopelículas que contenían nanopartículas mostraron una zona clara de inhibición que oscilaba entre 5.5 y 8.5 mm. La biopelícula 13 mostró una zona de inhibición clara de 8.5 mm. Al aumentar la proporción de plata durante la preparación de los nanocompuestos conjugados de caseína y plata, las propiedades antibacterianas de las biopelículas también aumentaron. Los resultados indicaron que todas las biopelículas que contenían nanocompuestos tenían una superficie lisa, una estructura compacta y una integridad estructural sin grietas ni cavidades, similar a la de las otras biopelículas compuestas. El nivel de nanopartículas de caseína y las nanopartículas conjugadas de caseína y plata utilizadas en la biopelícula fueron seguras y biocompatibles, sin efectos hemotóxicos detectables.

Biopelículas de caseína: Los efectos de la formulación, las condiciones ambientales y la adición de pectina cítrica sobre la estructura y las propiedades mecánicas. [Bonnaillie et al. \(2014\)](#) caracterizaron las propiedades mecánicas de las biopelículas de caseinato de calcio (CaCas)/glicerol (Gly) fundidas con disolvente (15% de sólidos) (proporción CaCas:Gly de 3:1) en función de las condiciones ambientales y procesamiento, incluyendo el grosor de la biopelícula, formulación de la solución y humedad ambiental (de 22% a 70% de humedad relativa (HR) a ~20 °C). Observaron que con una HR constante, el alargamiento a la rotura (EAB) tenía una fuerte dependencia positiva del grosor de la biopelícula. Al aumentar la HR, la resistencia a la tensión (TS) y el módulo de tensión (E) disminuyeron de forma aproximadamente lineal, mientras que la EAB aumentó. Al incorporar del 0.05% al 1% (p/p) de pectina cítrica (CP) a las biopelículas de CaCas/Gly siguiendo siete formulaciones diferentes, para alterar la red proteica y evaluar los efectos de la CP en las propiedades de tracción de las biopelículas de CaCas/Gly/CP. Con un grosor de biopelícula constante y ~60% de HR, la adición de 0.1% o 1.0% de CP a las biopelículas aumentó o disminuyó considerablemente la EAB, TS y E en diferentes direcciones y en diferentes grados, dependiendo de la formulación, mientras que las micrografías ópticas también mostraron configuraciones de red muy diferentes, lo que sugiere complejas interacciones caseína-pectina dependientes de la formulación y la estequiometría dentro de las biopelículas secas.

Preparación y caracterización de biopelículas de proteínas lácteas y su aplicación para el envasado de queso Cheddar. El estudio realizado por [Wagh et al. \(2014\)](#) tuvo como objetivos (a) el desarrollo y caracterización de biopelículas comestibles basadas en proteínas de caseína y suero y (b) la aplicación y evaluación de estas biopelículas para el envasado de queso Cheddar.

La resistencia a la tensión (TS), la deformación por tensión (TE) y el módulo elástico (EM) de las biopelículas oscilaron entre 0.71 y 4.58 MPa, 19.22 y 66.63 % y 2.05 y 6.93 MPa, respectivamente. Las propiedades de las biopelículas fueron influenciadas por el tipo de biopolímero (caseína y concentrado de proteína de suero), el plastificante y su concentración. Al aumentar la concentración de plastificante, aumentaron el espesor de la biopelícula, el TE y la permeabilidad de vapor de agua (WVP), pero disminuyeron el TS y el EM. Al aumentar la concentración de plastificante hasta el nivel más alto, el grosor de la biopelícula aumentó de 0.168 a 0.305 mm para las biopelículas plastificadas con glicerol y de 0.251 a 0.326 mm para las biopelículas plastificadas con sorbitol. Las biopelículas de caseína mostraron unas propiedades de tracción superiores a las de las biopelículas de WPC. El WVP de las biopelículas de caseína y WPC se situó entre 3.87 y 13.97 g mm m⁻² h⁻¹ kPa⁻¹. La permeabilidad al oxígeno de las biopelículas de caseína era relativamente menor que la de las biopelículas de WPC, independientemente del plastificante utilizado. Los datos sensoriales revelaron que la calidad sensorial del queso Cheddar no se vio afectada por el envasado con biopelículas de leche-proteína.

II. JUSTIFICACIÓN

El interés de la población por alimentos frescos e inocuos con envases biodegradables que permitan su consumo, conducen a la producción de biopelículas comestibles preparadas con sistemas innovadores y que no utilicen alimentos como materia prima.

Estos envases biodegradables con actividad antimicrobiana permitirán sustituir los conservantes químicos por conservantes naturales, que no suponen un riesgo a la salud pública y poseen una alta efectividad de inhibición contra diversos microorganismos patógenos como: *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. Además de que estos envases biodegradables no provienen de recursos no renovables ni contaminan como los plásticos a base de combustibles fósiles.

La caseína como material base de biopelículas comestibles es una opción viable por su fácil adquisición (se obtiene a partir de la leche desnatada), bajo costo, biodegradabilidad, alto valor nutricional, solubilidad en agua, alta estabilidad térmica, no toxicidad, y las propiedades que aporta a la biopelícula, como buena barrera al oxígeno, resistencia a la tensión, elasticidad y transparencia. Estas propiedades se pueden potenciar al emplearse en conjunto con plastificantes, como el glicerol u otros materiales formadores de biopelículas como la gelatina.

La nisina y natamicina, son las bacteriocinas más utilizadas y estudiadas como conservantes de alimentos por su espectro de acción contra bacterias patógenas y mohos respectivamente, se consideran como aditivos permitidos por el Codex Alimentarius y son GRAS. Sin embargo, aún está poco estudiada su actividad antimicrobiana cuando se incorpora en biopelículas a base de caseína.

Por esta razón, esta investigación buscará probar la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas (nisina/natamicina) incorporadas a las biopelículas con diferente proporción de caseína y glicerol, evaluando el efecto de estas concentraciones en las propiedades fisicoquímicas y tener una idea sobre su aplicabilidad como biopelículas comestibles en la industria alimentaria.

III. HIPÓTESIS

Las biopelículas preparadas con diferentes proporciones de polímero (caseína), plastificante (glicerol) y distinta bacteriocina (nisina y/o natamicina), presentarán propiedades fisicoquímicas y actividad antimicrobiana diferentes entre sí.

3.1 OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana de biopelículas de caseína y bacteriocina sobre *Listeria monocytogenes*.

Objetivos específicos

- Formular las biopelículas a partir de caseína, glicerol y bacteriocina por el método de vaciado en placa.
- Evaluar las características fisicoquímicas de las biopelículas: contenido de humedad, capacidad de retención de aceite y grupos funcionales.
- Comprobar la actividad antimicrobiana de las biopelículas sobre el patógeno seleccionado: *Listeria monocytogenes*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Métodos

La metodología general estuvo dividida en 3 etapas: la primera fue la preparación de las biopelículas, la segunda la caracterización fisicoquímica y la tercera la evaluación antimicrobiana (Figura 5). A continuación, se describe cada etapa.



Figura 5. Estrategia metodológica general.

4.1. Preparación de las biopelículas

Se utilizó la metodología descrita por [Akhter et al. \(2019\)](#) con algunas modificaciones. El método de vaciado en placa se utilizó para preparar las biopelículas en proporciones diferentes (Anexo A). Todos los aditivos fueron grado alimenticio a menos que se indique lo contrario. Se preparó la solución formadora de biopelícula (SFP) mezclando 3 g de grenetina y 97 mL de agua destilada en una placa calefactora con agitación (Arsa®, AR-311) a una temperatura de 40-50 °C hasta homogeneizar. De forma simultánea, se preparó la formulación (F) en otra placa calefactora con agitación (WiseStir®, MSH-20A) a temperatura ambiente (25 °C); la F (Anexo A) consistió en la mezcla de 2.5 % p/v de bacteriocina (Weiri (Shandong) Biotech Co., Ltd, China), 25 y/o 50 % p/v de caseína (Glanbia® Ingredients Plc., Ballyragget, Co. Kilkenny, Irlanda), 25 y/o 50 % v/v de glicerol y agua destilada (csp) si la F lo requería para lograr el 10% p/v. Tanto la SFP y F se llevaron a una agitación media durante 30 min (Figura 6). Después de la dispersión completa, se incorporó la F a la SFP y se mezclaron durante 10 min a temperatura ambiente. El resultado de la mezcla se vertió en la misma cantidad sobre placas de vidrio para secar en un horno de convección forzada (BINDER®, FD-53) a 35 °C durante 24 h. Las biopelículas secas se despegaron cuidadosamente de las placas de vidrio y se almacenaron en un desecador a temperatura ambiente. Tanto la preparación como el despegado de las biopelículas se realizaron en una campana de extracción de gases (EMILAB®).

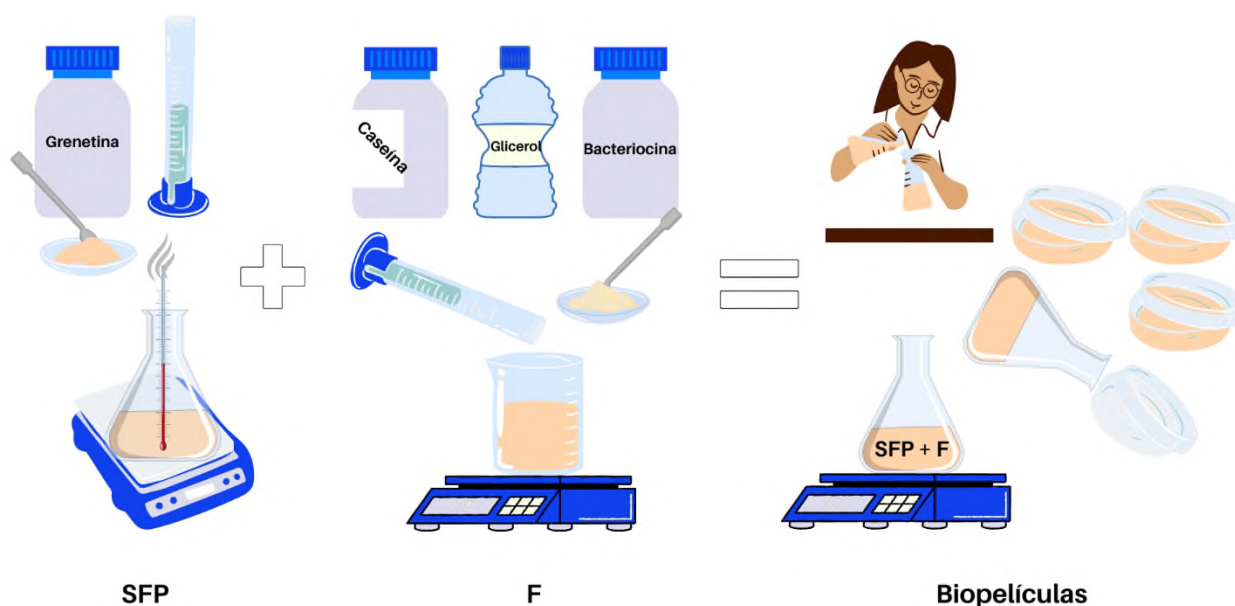


Figura 6. Preparación de biopelículas. Preparación de la solución formadora de biopelícula (SFP), formulación (F) y el vaciado en placas de vidrio.

4.2. Caracterización fisicoquímica

La caracterización se realizó de acuerdo con lo propuesto por [Pérez-Vergara et al. \(2020\)](#) y [Pedrosa-Silva et al. \(2019\)](#). El grosor y diámetro de las biopelículas se determinó usando un vernier digital en cinco posiciones aleatorias. Los reactivos empleados en las técnicas de caracterización fueron grado analítico.

Contenido de humedad. El contenido de humedad fue determinado por el método gravimétrico, empleando un horno de convección forzada (BINDER®, FD-53) a 120 °C hasta alcanzar el peso constante, para este procedimiento se utilizó una balanza analítica (ADAM®, PW 124). Las mediciones se realizaron por quintuplicado y el contenido de humedad se determinó con la Ec. 1:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso inicial de la muestra (g)} - \text{Pérdida de peso en la muestra (g)}}{\text{Peso inicial de la muestra (g)}} \times 100 \quad [\text{Ec. 1}]$$

donde el peso inicial de la muestra es el peso de la muestra antes del secado y la pérdida de peso en la muestra es la diferencia entre el peso de la muestra con la charola después del secado y el peso de la charola antes del secado.

Capacidad de retención de aceite. Las muestras de biopelículas se sumergieron en 5 mL (pH 7) de aceite comestible comercial de canola-soya (Patrona®, México) y se agitaron a 50 rpm durante 30 min de manera constante a 25 °C en un baño María (Lab. Companion®, BS-06). Después, las

muestras se filtraron con una bomba de vacío (WELCH®, 2522B-01) hasta que no existió goteo de aceite. Las biopelículas impregnadas de aceite se pesaron en vasos de precipitados a peso constante y la capacidad de retención de aceite (CRA) se determinó empleando la Ec. 2:

$$\text{CRA (g/g)} = \frac{\text{peso de la muestra impregnada en aceite} - \text{peso de la muestra sin aceite}}{\text{peso de la muestra sin aceite}} \quad [\text{Ec. 2}]$$

Análisis estructural IR-TF. Las interacciones estructurales de la SFP, F, plastificante y bacteriocinas se analizaron en un espectrómetro infrarrojo de Transformada de Fourier (IR-TF) (PerkinElmer®, Spectrum 100). Los espectros obtenidos se registraron entre 4000 cm⁻¹ y 400 cm⁻¹.

4.3. Actividad antimicrobiana

Se evaluó empleando la metodología propuesta por [Mittal et al. \(2020\)](#) con algunas modificaciones. Se aplicó el método de difusión de agar. Los reactivos y los medios de cultivo empleados fueron grado analítico. Todo el equipo empleado en el análisis se esterilizó en autoclave (AESA®, CV300) y desinfectó con etanol al 70 %. Se utilizó una lámpara de luz ultravioleta dentro de una campana de flujo laminar (PRENDO®, CFL-102 NW) durante 30 min para desinfectar el área de trabajo previamente. Primero se tomó una proporción del stock de glicerol con *Listeria monocytogenes* CDBB-B-1426 (Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares (CDBB) del CINVESTAV), usando el asa bacteriológica y un tubo con búfer de fosfatos pH 7 esterilizado previamente y se procedió a realizar las diluciones seriadas en los tubos restantes (Figura 7A). Después se colocó 1 mL de cada dilución en placas de Agar Mueller Hinton (DIBICO®, México) con el propósito de verificar el crecimiento microbiano a 37 °C durante 24 h (Figura 7B). La dilución elegida fue 1x10⁻⁵ UFC mL⁻¹ (Figura 7C), por lo que en las etapas sucesivas se realizó la siembra de la bacteria sobre Agar Mueller Hinton (DIBICO®, México) usando movimientos oscilatorios para garantizar la homogeneización de la bacteria y se colocaron tres discos de biopelículas en cada placa (Figura 7D). Las placas se dejaron reposar durante 15 min a temperatura ambiente que permitió la propagación de compuestos bioactivos de las biopelículas. Se usó una incubadora (Felisa®, FE-132AD) a 37 °C durante 24 h (Figura 7E) y se midió el diámetro de la zona transparente alrededor de las biopelículas, incluyendo el diámetro del disco en mm (Figura 7F). Se utilizaron dos controles: uno negativo, que correspondía a medio de cultivo Mueller Hinton (DIBICO®, México), sin *Listeria monocytogenes* y sin biopelícula y otro positivo,

que consistió en medio de cultivo sin *Listeria monocytogenes* y con biopelículas control. Las determinaciones se realizaron por quintuplicado.

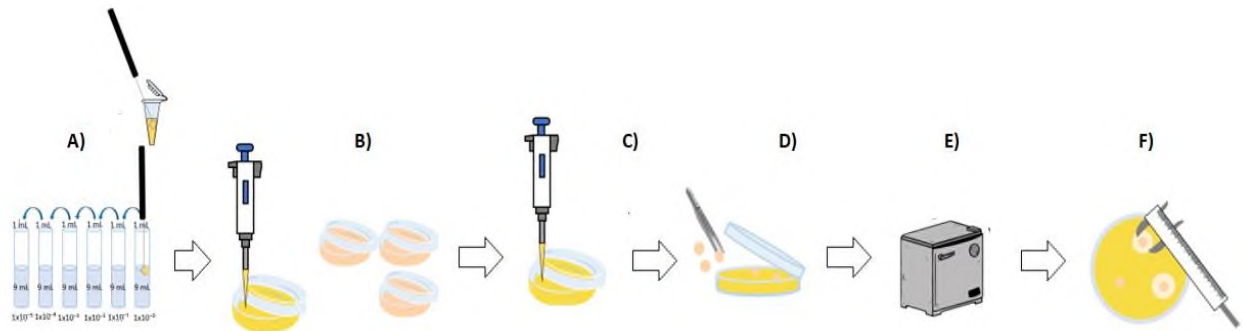


Figura 7. Proceso de la técnica de difusión en Agar Mueller Hinton.

4.4. Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial 2^3 , los factores fueron: tipo de bacteriocina (nisina y natamicina), porcentaje peso en volumen de caseína (25 y 50 %) y porcentaje volumen en volumen del plastificante (25 y 50 %), con cinco repeticiones por interacción (Anexo A). El análisis estadístico de los datos obtenidos en la caracterización fisicoquímica se realizó un ANOVA, seguido de una prueba de pares por Tukey a 5% de nivel de significancia. El software utilizado fue el SAS (Statistic Analysis System, versión 2004).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Preparación de las biopelículas

El método de vaciado en placa se mostró como una buena opción para la preparación de biopelículas con caseína y antimicrobianos (nisina y natamicina). En la Figura 8, se observa que la biopelícula control caseína-glicerol (Figura 8A) resultó diferente en apariencia a las biopelículas preparadas con natamicina que fue opaca (Figura 8B) y nisina que fue ligeramente transparente (Figura 8C). La adherencia sobresalió en la biopelícula con nisina que fue reflejada en los límites de la circunferencia, limitando la facilidad para manipular la biopelícula a diferencia de la obtenida con natamicina.

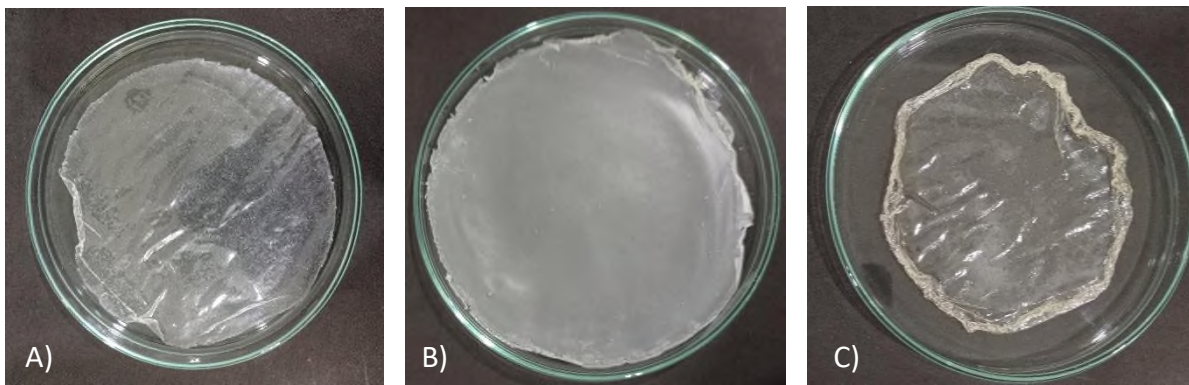


Figura 8. Biopelículas obtenidas, A) Control; B) con Natamicina; C) con Nisina.

En la Tabla 2, se muestran los resultados obtenidos de la medición del diámetro y espesor de las biopelículas. En general, las biopelículas de natamicina presentaron un diámetro mayor a las de nisina, esto puede deberse a la adherencia de las biopelículas de nisina, que provocaba un enrollamiento de las orillas al momento de despegar de la placa de vidrio, disminuyendo su diámetro. La biopelícula NA2525 presentó el mayor diámetro (94.04 mm), mientras que la biopelícula NI5025 presentó el menor (66.90 mm). Existió diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en el diámetro de la biopelícula NI5025 con respecto a todas las biopelículas preparadas incluyendo la biopelícula control. Las biopelículas preparadas con natamicina NA2525, NA5050, NA2550 y NA5025 no muestran diferencia estadística ($P \leq 0.05$) en el diámetro. La apariencia general de estas biopelículas puede observarse en el Anexo B.

Tabla 2. Diámetro y grosor de biopelículas de caseína/bacteriocinas.

Tratamiento	Diámetro, (mm)	Espesor (mm)
Control	92.11 ^{de}	0.250 ^c
NA2525	94.04 ^{de}	0.165 ^a
NA2550	87.36 ^{cd}	0.225 ^{bc}
NA5025	86.44 ^{cd}	0.201 ^{ab}
NA5050	89.30 ^{de}	0.192 ^{ab}
NI2525	73.39 ^b	0.256 ^c
NI2550	82.99 ^c	0.255 ^c
NI5025	66.90 ^a	0.265 ^c
NI5050	83.05 ^c	0.312 ^d
EEM	2.315	0.018

En la misma columna, los valores que no comparten letras indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$). EEM: error estándar de la media.

Por otro lado, el análisis estadístico demuestra que el espesor es similar en las biopelículas preparadas con caseína y natamicina NA2525, NA5025, NA5050 y NA2550. La biopelícula de menor espesor fue NA2525 (0.165 mm) y la de mayor espesor fue NI5050 (0.312 mm). No obstante, el espesor de las biopelículas preparadas con caseína y nisina son estadísticamente análogas entre sí (NI2550, NI2525, NI5025), además, el espesor de estas biopelículas es similar a la biopelícula control. De acuerdo con la hoja técnica proporcionada por el proveedor, la nisina es más soluble en agua que la natamicina, esta propiedad puede afectar el espesor después del secado de las biopelículas. El análisis estadístico demostró que el espesor de las biopelículas es diferente ($P \leq 0.05$) cuando se utiliza nisina o natamicina en F. Aunque el método de preparación empleado en este trabajo de investigación usando SFP y F favorece la solubilidad de la nisina permitiendo obtener biopelículas de diámetro y espesor similar, los resultados mostraron que existen diferencias cuando se usa nisina o natamicina en la preparación de las biopelículas.

Una de las características deseables en las biopelículas es que sean materiales delgados. Las biopelículas de caseína y natamicina (NA2525, NA2550, NA5025 y NA5050) tienen un espesor que va de 0.165 a 0.225 mm, entra en el intervalo de 0.050-0.250 mm que [Hammam, 2019](#) propone como espesor ideal para las biopelículas comestibles. También coincide con el resultado obtenido por [Bora & Mishra \(2016\)](#) en biopelículas de caseína con espesor de 0.13-0.20 mm. [Wagh et al.](#)

(2014) reportaron un espesor de 0.17 a 0.31 mm en biopelículas de caseína plastificadas con glicerol, siendo el intervalo en el que coinciden tanto las biopelículas de caseína-natamicina como las de caseína-nisina, además de la película control. [Namratha et al. \(2020\)](#) reportaron un espesor en sus biopelículas de pectina-alginato-caseína de 0.23 mm. En el trabajo de [Wagh et al. \(2014\)](#) la concentración del plastificante influyó en el espesor (a mayor concentración mayor espesor), a diferencia de este trabajo en el que la concentración del plastificante no tuvo un efecto significativo ($P \leq 0.05$) en el espesor. Además de que solo se utilizó entre 5 y 2.5 mL (50 y 25 % v/v) de plastificante en la formulación de las biopelículas. La biopelícula con mejor diámetro y grosor fue la NA2525.

5.2. Caracterización fisicoquímica

5.2.1. Contenido de humedad y capacidad de retención de aceite

La presencia de humedad en la formulación de los alimentos influye en la seguridad y estabilidad de éstos, así como en las características físicas, químicas, microbiológicas y nutricionales. Algunos ejemplos evidentes son el peso seco, la densidad, viscosidad del producto, conductividad eléctrica y pH. Los resultados de la Tabla 3 muestran el porcentaje de humedad de las biopelículas preparadas con caseína y bacteriocinas. Las biopelículas con menor contenido de humedad fueron NI5025 (34.01 %), NI2525 (35.20 %), NA5025 (36.70 %) y NA2525 (39.57 %); todas por abajo del 50 % y sin diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$) entre ellas. Mientras que las biopelículas restantes presentaron un contenido de humedad mayor al 50 % incluyendo la biopelícula control. Este resultado indica que la SFP y la concentración del plastificante empleado en la formulación retienen humedad a la biopelícula. Esto se puede verificar cuando se comparan las biopelículas NA2525 (39.57 %) y NA2550 (57.81 %) con un contenido de humedad diferente ($P \leq 0.05$), se observa la misma bacteriocina, la misma concentración de caseína, pero diferente concentración de plastificante.

La capacidad de retención de aceite (CRA) es una propiedad funcional que corresponde a la cantidad de aceite que una muestra o alimento puede absorber por unidad de peso. En general se puede asumir que un ingrediente o alimento con CRA alta se puede utilizar para mejorar la textura de otros alimentos, también se puede utilizar para mejorar algunas propiedades sensoriales como la jugosidad de alimentos de origen animal como quesos y productos cárnicos. Los resultados mostrados en la Tabla 3 indican que las biopelículas preparadas con caseína y

bacteriocina son similares y que no existe diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$) en la CRA entre tratamientos. No obstante, se observa que las biopelículas NI5025 y NA5025 con la misma concentración de caseína y glicerol como plastificante presentan la mayor CRA, 0.238 y 0.231 g/g respectivamente, pero sin diferencia estadística entre ellas. Solo estas dos biopelículas muestran diferencia en CRA respecto al control. La CRA de las biopelículas NA2525, NA2550, NA5050, NI2525, NI2550 y NI5050 es similar entre ellas con valores entre 0.144-0.195 g/g.

La CRA no ha sido muy estudiada en biopelículas de caseína, por lo que no se tiene un precedente para comparar los resultados. En general, la CRA de las biopelículas de nisina y natamicina fue similar entre sí, en el caso de la CRA de NI5025 y NA5025, puede deberse a que la concentración menor del glicerol, facilita la interacción entre los componentes de la biopelícula y el aceite comestible.

Tabla 3. Contenido de humedad y CRA de biopelículas de caseína/bacteriocinas

Tratamiento	Humedad, %	CRA, g/g
Control	54.89 ^{bc}	0.118 ^a
NA2525	39.57 ^a	0.195 ^{ab}
NA2550	57.81 ^c	0.144 ^{ab}
NA5025	36.70 ^a	0.231 ^b
NA5050	54.86 ^{bc}	0.150 ^{ab}
NI2525	35.20 ^a	0.196 ^{ab}
NI2550	52.97 ^b	0.163 ^{ab}
NI5025	34.01 ^a	0.238 ^b
NI5050	51.14 ^b	0.174 ^{ab}
EEM	2.217	0.037

En la misma columna, los valores que no comparten letras indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$). EEM: error estándar de la media.

Los datos de humedad (%) obtenidos en este trabajo fueron de 34.01 hasta 57.81 %. [Picchio et al. \(2018\)](#) obtuvieron un contenido de humedad (HC, por sus siglas en ingles) de 24.4 % para biopelículas de caseína sin tratar (control), y para las demás biopelículas de caseína con diferente concentración de ácido tánico (TA_{4,8,10,15,20}) se mantuvo de 11-16 %. [Saikia & Badwaik \(2018\)](#), reportaron un % de humedad de un 36.30 % para biopelículas de caseína, 30.75 % para biopelículas de gelatina y 32.17 % para biopelículas de caseína-gelatina. [Bora & Mishra \(2016\)](#),

realizaron biopelículas de pectina-alginato de sodio/caseína con nanopartículas conjugadas de caseína y caseína-plata, el control tuvo un 44.03% de HC, mientras que los demás tratamientos tuvieron un % de humedad de 38.16 a 42.80 %. Se pueden observar las diferencias entre los resultados obtenidos, esto se puede deber principalmente a que además de la caseína, algunos autores como [Picchio et al. \(2018\)](#) y [Bora & Mishra \(2016\)](#) usaron otros polímeros y aditivos que cambian las propiedades de las biopelículas resultantes, el trabajo de [Saikia & Badwaik \(2018\)](#) fue el más similar con los resultados de esta investigación.

También se evaluó la correlación entre las variables CRA, humedad, espesor y diámetro; los resultados demostraron que existe una correlación inversa entre la humedad (%) y CRA (g/g), es decir cuando la humedad aumenta en las biopelículas preparadas con bacteriocinas, entonces la CRA disminuye (Tabla 4) y la probabilidad de que esto suceda es 34 %. Este resultado es importante porque permite tomar decisiones sobre la aplicación final de las biopelículas, es decir si lo que se desea es que las biopelículas presenten CRA alta entonces se requiere disminuir el contenido de humedad en ellas y esto se puede lograr empleando menos proporción de disolvente en la SFP y menos plastificante en la F. De forma similar, cuando se compara el diámetro (mm) y CRA (g/g), existe una correlación inversa que indica que cuando el diámetro disminuye, la CRA aumentará con una probabilidad del 16 %. Esta correlación es poco intuitiva ya que al requerir mayor CRA en la biopelícula esto se puede lograr disminuyendo el diámetro. Finalmente, existe dos correlaciones directas que se aprecian entre el espesor (mm) y CRA (g/g) con una probabilidad del 27 % y entre la humedad (%) y el diámetro (mm) con un 34 % de probabilidad que al aumentar la humedad en las biopelículas también aumente el diámetro de las mismas.

Tabla 4. Coeficientes de correlación entre CRA, humedad, espesor y diámetro de las biopelículas.

Variables	Coeficientes de correlación Pearson			
	CRA, g/g	Humedad, %	Espesor, (mm)	Diámetro, (mm)
CRA, g/g	sc	-0.34	0.27	-0.16
	sc	0.02	0.07	0.31
	sc	45	45	45
Humedad, %	sc	sc	0.06	0.34
	sc	sc	0.69	0.02
	sc	sc	45	45
Espesor, (mm)	sc	sc	sc	-0.08
	sc	sc	sc	0.44
	sc	sc	sc	90

sc: sin correlación

5.2.2. Análisis estructural IR-TF

La IR-TF es una técnica que permite conocer la estructura química (grupos funcionales y sus interacciones) de muestras sólidas, líquidas y gaseosas, es idónea por ser simple, rápida, no invasiva con la muestra y permite leer todas las longitudes de onda a la vez. Algunas interacciones a nivel estructural entre la SFP y la formulación, es posible analizarlas con esta técnica. En la Figura 9, se pueden apreciar los espectros de los diferentes tratamientos, control, natamicina (Figura 9A, azul) nisina (Figura 9B, rojo), así como de la caseína, grenetina y glicerol (Figura 9C).

De forma complementaria se concentran los grupos funcionales y el tipo de vibración, así como la zona de absorción en el Anexo C, con el fin de guiar la interpretación que a continuación se describe. Los espectros de las biopelículas preparadas con bacteriocinas fueron similares entre sí, las diferencias son apreciables cuando estos espectros se comparan con los espectros de las bacteriocinas. Para fines prácticos se resumen en lo siguiente: A) Diferencias espectrales de las bacteriocinas: la natamicina (espectro azul) presenta bandas a 1714 cm^{-1} , 1570 cm^{-1} , 1267 cm^{-1} y 1002 cm^{-1} . La nisina (espectro rojo) presenta bandas a 3283 cm^{-1} (tensión O-H del grupo COOH), 2966 cm^{-1} (tensión C-H), 1646 cm^{-1} , 1538 cm^{-1} , 1233 cm^{-1} . La diferencia más evidente está en la

zona de 1640 y 1520 cm^{-1} donde pueden estar presente varias vibraciones, por ejemplo, las bandas de estiramiento de C=O y C=C de los ácidos carboxílicos, ésteres y amidas de ácidos carboxílicos y proteínas. Estas bandas solo están presentes en la nisina y ausentes en la natamicina. B) las diferencias espectrales en los componentes de la SFP y F; se observan bandas a 3282 cm^{-1} , 2962 y 2974 cm^{-1} , 1636 cm^{-1} y 1635 cm^{-1} , 1520 y 1531 cm^{-1} , 1233 y 1240 cm^{-1} para la caseína y grenetina respectivamente. La banda en 1030 cm^{-1} (tensión C-O en el alcohol primario) y las bandas en 3289 y 921 cm^{-1} (tensión y flexión del grupo O-H) corresponden al glicerol. Mientras que la caseína (espectro verde) y la grenetina (espectro naranja) son similares entre sí, presentan bandas características en la zona entre 1630 y 1520 cm^{-1} . Estas bandas están completamente ausentes en el glicerol (espectro rosa). El glicerol posee una banda característica en la zona de tensión y flexión del grupo O-H. Finalmente, C) diferencias espectrales presente en los tratamientos con natamicina (NA2525, NA2550, NA5025 y NA5050) que no muestran diferencia entre sí, pero si una ligera diferencia con respecto al control; los picos a 2935-2933 cm^{-1} , 1637-1633 cm^{-1} , 1553-1549 cm^{-1} y 1240 cm^{-1} corresponden a los grupos amida de las proteínas (caseína y grenetina); las bandas 3289-3282 cm^{-1} , 1037-1032 cm^{-1} , 922-919 cm^{-1} indican la presencia del glicerol. La interacción de la natamicina con los demás componentes es débil. Los tratamientos con nisina (NI2525, NI2550, NA5025 y NA5050) son muy similares entre sí y con una diferencia más marcada con respecto al control (a diferencia de los tratamientos con natamicina); los tratamientos presentaron bandas a 3289-3282 cm^{-1} , 2940-2933 cm^{-1} , 1644-1634 cm^{-1} , 1551-1548 cm^{-1} , 1239-1233 cm^{-1} , 1036-1034 cm^{-1} , 922-921 cm^{-1} . Se pueden observar picos en los grupos funcionales de las proteínas (grenetina y caseína), el glicerol y la nisina. Esta última comparte los grupos amida de la caseína y grenetina, por lo que no se puede apreciar la interacción de los enlaces entre los compuestos.

Las bandas de la caseína obtenidas del análisis estructural IR-TF de las biopelículas de natamicina y nisina coinciden con los picos a 1645-1666 cm^{-1} (amida I), 1540-1550 cm^{-1} (amida II) y 1232-1242 cm^{-1} (amida III) reportados por [Picchio et al. \(2018\)](#). También tiene bandas a 3200-3300 cm^{-1} y a 2960 cm^{-1} (vibraciones de tensión de los grupos $-\text{CH}_2$). [Namratha et al. \(2020\)](#), informan que las bandas de la caseína se encuentran a 3455 cm^{-1} , 1661 cm^{-1} y 1510 cm^{-1} . [Boelter & Brandelli \(2016\)](#), concluyeron que las principales bandas de absorción eran similares en las biopelículas de caseína y gelatina: 1033-1040 cm^{-1} , 1631-1636 cm^{-1} y 3282-3292 cm^{-1} . El espectro de la nisina

reportado por [Bernela et al. \(2014\)](#), da una banda ancha a 3288 cm^{-1} (estiramiento OH del grupo COOH), un pico a 2960 cm^{-1} , 1232 cm^{-1} , 1645 cm^{-1} (grupo amida) y 1527 cm^{-1} (flexión de la amina I), similar al espectro de nisina que se obtuvo en el trabajo. [Mo et al. \(2021\)](#) notificaron picos a 1002 y 1267 cm^{-1} para las vibraciones C-O-C en el éter, 1713 cm^{-1} para el éster conjugado, y 1572 cm^{-1} para la amina primaria que representan la natamicina. En general, se puede apreciar la presencia del grupo amida representativo de las proteínas (caseína y grenetina), del grupo amino, éster, éter (natamicina). La nisina al ser un péptido comparte grupos funcionales con el polímero, por lo que tienen casi las mismas características y no se aprecia diferencia entre los picos (al estar uno encima del otro). A diferencia de la natamicina, que las interacciones son débiles.

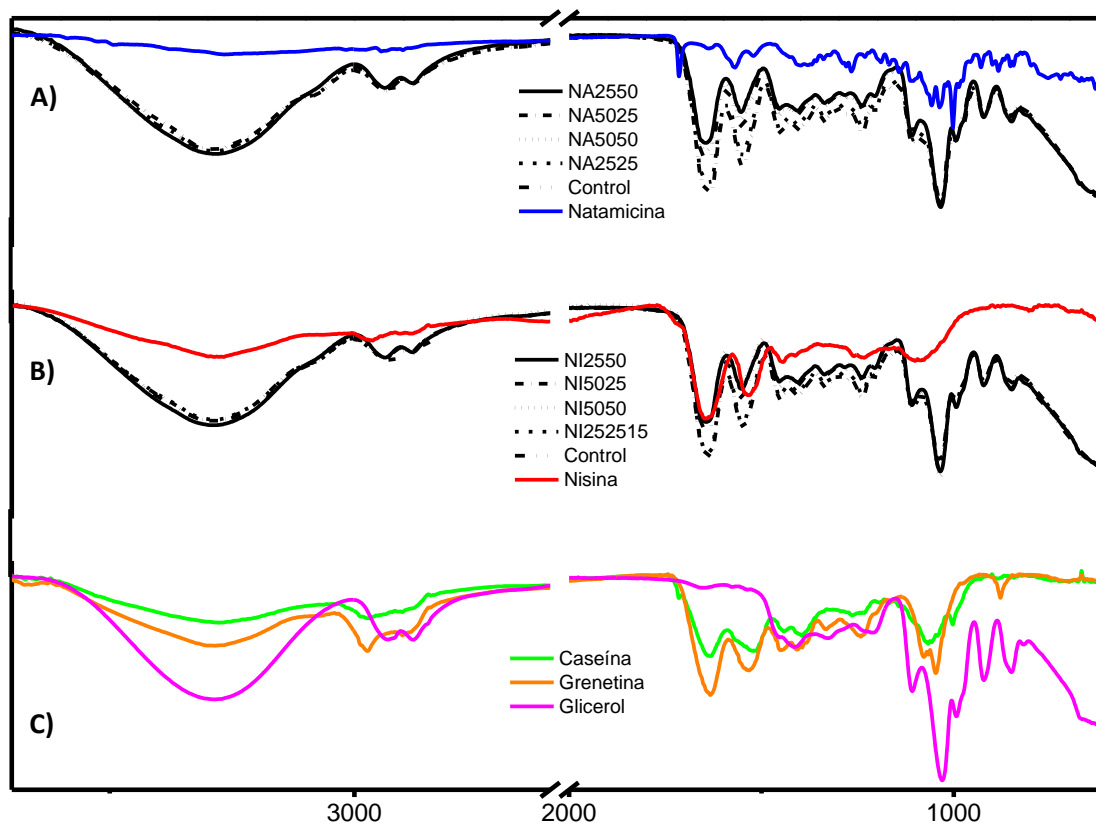


Figura 9. Espectros FTIR: A) Biopelículas con Natamicina, B) Biopelículas con Nisina y C) Caseína, grenetina y glicerol.

5.3. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana en biopelículas que revisten alimentos es una propiedad deseada, puesto que ayuda a preservar por más tiempo el alimento sin alterar sus características sensoriales, además de la prevención del riesgo de contraer una enfermedad de transmisión alimentaria. Tanto las biopelículas preparadas con natamicina (NA2525, NA5025, NA2550 y NA5050) como las biopelículas con nisina (NI2525, NI5025) presentaron actividad bactericida (Anexo D). Los controles no presentaron crecimiento microbiano durante el tiempo que se realizó el experimento (Figura 10A y B). A pesar de que se esperaba más actividad antimicrobiana en las biopelículas con nisina, solo NI2525 y NI5025 presentaron halos de inhibición (Figura 10D y 10F). Las biopelículas con natamicina presentaron halos de inhibición en todos los tratamientos, en la Figura 10C y 10E se muestran algunas representaciones de estos halos de inhibición.

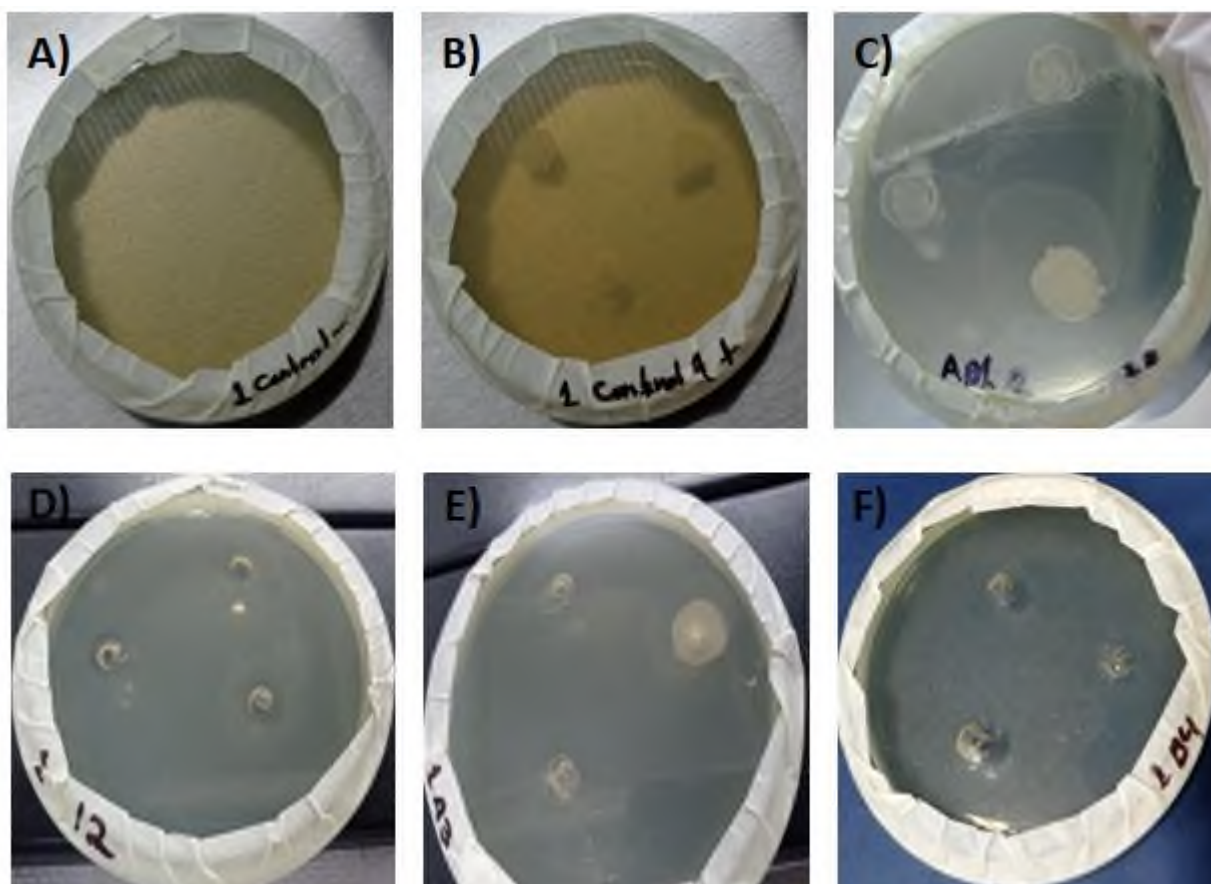


Figura 10. Halos de inhibición de biopelículas, A) Control negativo; B) Control positivo, C) NA5025, D) NI2525, E) NA2525, F) NI5025.

El halo de inhibición se produce debido a la presencia de las bacteriocinas soportadas en las biopelículas que al ser depositadas en la caja Petri previamente inoculada con el patógeno, entra en contacto con la superficie del Agar y entonces se difunde radialmente a través del disco de biopelícula que contiene las bacteriocinas. La biopelícula y el Agar inoculado forman un gradiente de concentración hasta llegar al equilibrio y después de 20 o 24 h de incubación es posible visualizar en la interfase una circunferencia más o menos regular que indica la sensibilidad existente entre la bacteriocina y la bacteria patógena (*L. monocytogenes*).

El halo de inhibición presente en las placas de Agar previamente inoculadas con *L. monocytogenes* fue determinado en todas aquellas que lo presentaron y los resultados están concentrados en la Tabla 5. En general, se reportan dos mediciones, horizontal (2-4) y vertical (1-3); el tratamiento NA2550 fue el que presentó el halo de inhibición de mayor tamaño (35.57 mm), seguido de NA5025 (33.01 mm) mientras que el tratamiento NI5025 presentó el halo de inhibición más pequeño (10.89 mm).

Tabla 5. Diámetro de halos de inhibición de los diferentes tratamientos de natamicina y nisina.

Tratamiento	Halo de inhibición (mm)		Promedio (mm)
	1-3	2-4	
NA2525	21.95	21.20	21.57
NA2550	32.45	38.68	35.57
NA5025	33.75	32.27	33.01
NA5050	29.14	27.52	28.33
NI2525	34.65	29.26	31.95
NI5025	10.35	11.43	10.89
NI2550	SH	SH	SH
NI5050	SH	SH	SH

SH: Sin halo de inhibición; SC: Sin crecimiento bacteriano

Se esperaba que todas las biopelículas con nisina presentaran actividad bactericida, aunque fueron las biopelículas de diferentes concentraciones de natamicina las que presentando mayor actividad antimicrobiana. Los halos de inhibición presentaron un tamaño que iba de 10.35 x 11.43 mm a 32.45 x 38.68 mm. [Apriliyani et al. \(2020\)](#) reportaron un diámetro de la zona de inhibición de 12.10 a 26.92 mm en biopelículas de caseína-quitosano contra *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella sp.*

y *L. bulgaricus*. [Namratha et al. \(2020\)](#) observaron diámetros de la zona de inhibición de 31.20, 14.38 y 12.77 mm para *E. coli*, *S. aureus* y *S. flexneri* respectivamente, en biopelículas de pectina-alginato-caseína incorporadas con probióticos. [Chevalier et al. \(2018\)](#) notificaron diámetros de inhibición de entre 20 y 60 mm para todas las formulaciones para la cepa *E. coli*. Las áreas de inhibición experimentales para la difusión inducida por las biopelículas que contienen aceite esencial (0.5%, 1%, 1.5%) contra *E. coli* van de 18.21, 34.85 y 84.47 mm², respectivamente, de acuerdo a lo que notifican [Saikia & Badwaik \(2018\)](#) en su trabajo. [Boelter & Brandelli \(2016\)](#) informaron que tanto las biopelículas de gelatina como las de caseína mostraron actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes*, *C. perfringens* y *B. cereus*, los halos inhibitorios fueron de 43 mm y 41 mm para las biopelículas de gelatina que contenían liposomas y las que contenían liposomas + halloysita, respectivamente. Las biopelículas de caseína que contenían liposomas mostraron halos inhibitorios de 38 mm, mientras que las biopelículas de caseína con liposomas + halloysita mostraron halos de 37 mm. En el trabajo de [Bora & Mishra \(2016\)](#), obtuvieron halos de inhibición de 6-8.5 mm para biopelículas bicapa comestibles incorporadas con nanopartículas y nanocompuestos contra *E. coli*. Como se puede observar, los datos reportados en la literatura no varían de los obtenidos en este trabajo, a pesar de que son biopelículas con diferente compuesto activo, en este caso bacteriocinas.

VI. CONCLUSIONES

- El método de vaciado en placa en la preparación de biopelículas con bacteriocinas soportadas permitió observar diferencias cualitativas en transparencia y adherencia; aunque no fueron variables medibles y obtenidas en este trabajo de investigación, permitieron identificar las diferencias fisicoquímicas entre las biopelículas.
- La concentración de plastificante empleada y probada en formulación fue consistente con la apariencia de las biopelículas, ya que se obtuvieron biopelículas con diferencias evidentes entre sí. La SFP fue consistente con la F ya que esto permitió apreciar las diferencias en las características fisicoquímicas y en la actividad antimicrobiana.
- Se demostró que el espesor y diámetro de las biopelículas es diferente cuando se utiliza nisina o natamicina en formulación (F). El plastificante no tuvo un efecto significativo ($P \leq 0.05$) en el espesor.
- Las biopelículas NI/NA5025 y NI/NA2525 no tuvieron diferencia significativa entre sí ($P \leq 0.05$), pero si hubo diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con respecto a las biopelículas NI/NA5050 y NI/NA2550. Este resultado indica que la SFP y la concentración del plastificante empleado en la formulación retienen humedad a la biopelícula.
- Estadísticamente ($P \leq 0.05$) las biopelículas preparadas con caseína/bacteriocina tienen CRA similar, aunque NI5025 y NA5025 fueron las de mayor CRA. Se demostró que existe una correlación inversa entre la humedad (%) y CRA (g/g), lo cual es de gran importancia para la toma de decisiones del uso y preparación de la biopelícula.
- La CRA y la humedad en las biopelículas obtenidas demuestra que la hipótesis se cumple en ambos tratamientos, no obstante, la mayor aportación de estos resultados es la correlación que existe de estas variables con el espesor y el diámetro. El conocimiento de esta información permitirá optimizar la posible aplicación de las biopelículas, ya sea como empaque para alimentos de origen vegetal o como recubrimiento temporal de quesos y productos cárnicos.
- La determinación de los grupos funcionales de las biopelículas, así como los componentes de la SFP (grentina) y la F (caseína, glicerol y bacteriocina) permite visualizar la aportación de cada componente. Esto es apreciable en las zonas características de las bandas de absorción que están ausentes principalmente en las bacteriocinas.

- La actividad antimicrobiana expresada por el halo de inhibición de la bacteria patógena *L. monocytogenes*, mostró aparente sensibilidad hacia el antimicrobiano natamicina. No obstante, la posible sensibilidad hacia el antimicrobiano nisina permite establecer la importancia de probar otras concentraciones de bacteriocinas en la preparación de biopelículas con mejor respuesta en la inhibición de este y otros patógenos alimentarios.

VII. PERSPECTIVAS

- El uso de ingredientes de bajo costo, inocuos y con actividad antimicrobiana en la industria alimentaria obedece a la necesidad de conservar alimentos frescos y mínimamente procesados. Si estos antimicrobianos están presente en empaques comestibles y/o biodegradables, no solo coadyuvan en la conservación, también mejoran propiedades sensoriales, nutricionales y degustables.
- Este trabajo de investigación debe complementarse con el análisis de propiedades coligativas, reológicas, mecánicas, sensoriales y nutricionales. Es un error considerar este trabajo concluyente o definitivo. Sin embargo, es posible orientar estos resultados a posibles aplicaciones en la industria alimentaria.
- El uso de aditivos alimentarios en la industria tiene fuerte regulaciones internacionales, sin embargo, en México no existe legislación vigente que regule la concentración máxima permitida en los alimentos de consumo básico como la leche y la carne fresca, así como en los subproductos artesanales como los quesos y embutidos. Las dosis empleadas en este trabajo de investigación están por debajo de lo permitido por la norma internacional. Si con esta concentración es posible demostrar actividad o sensibilidad antimicrobiana sobre bacterias patógenas como *L. monocytogenes*, entonces los resultados pueden aproximarse al aumento de la concentración de bacteriocina sin comprometer el límite permitido.
- Es preciso realizar un análisis bioquímico sobre los antimicrobianos para comprender su mecanismo de acción y complementar la investigación.
- Es necesario complementar el análisis estadístico con un análisis multivariado (MANOVA), para determinar el factor (contenido del plastificante, tipo de antimicrobiano o contenido de caseína) que afecta en la caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana.
- Es necesario probar concentraciones diferentes de antimicrobianos soportados en las biopelículas, así como su sensibilidad y respuesta hacia otras bacterias y hongos patógenos capaces de transmitir enfermedades.
- Es necesario probar otros métodos de sensibilidad o inhibición bacteriana, el método de formación de halo de inhibición o antibiograma es un método semi-cuantitativo no concluyente.

- Esta investigación se complementa horizontalmente con otro trabajo de investigación (resultados en proceso de publicación) donde se exploró la morfología, la interacción entre grupos ácidos y básicos de las biopelículas y la capacidad antioxidante.

VIII. REFERENCIAS

1. Ahmad, V., Khan, M. S., Jamal, Q. M. S., Alzohairy, M. A., Al Karaawi, M. A., & Siddiqui, M. U. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(1), 1-11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.08.016>
2. Akhter, R., Masoodi, F. A., Wani, T. A., & Rather, S. A. (2019). Functional characterization of biopolymer based composite film: Incorporation of natural essential oils and antimicrobial agents. *International journal of biological macromolecules*, 137, 1245-1255. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.214>
3. Alichanidis, E., Moatsou, G., & Polychroniadou, A. (2016). Composition and properties of non-cow milk and products. In *Non-bovine milk and milk products* (pp. 81-116). Academic Press. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803361-6.00005-3>
4. Aparicio, J. F., Barreales, E. G., Payero, T. D., Vicente, C. M., de Pedro, A., & Santos-Aberturas, J. (2016). Biotechnological production and application of the antibiotic pimarcin: biosynthesis and its regulation. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(1), 61-78. DOI: [10.1007/s00253-015-7077-0](https://doi.org/10.1007/s00253-015-7077-0)
5. Apriliyani, M. W., Manab, A., Ahmad, B. M., & Uula, L. M. (2020). Physico-chemical and antimicrobial properties of casein-chitosan edible films as food quality and food safety. *IOP Conference Series. Earth and Environmental Science*, 443(1), 012018. DOI: [10.1088/1755-1315/443/1/012018](https://doi.org/10.1088/1755-1315/443/1/012018)
6. Bahrami, A., Delshadi, R., Jafari, S. M., & Williams, L. (2019). Nanoencapsulated nisin: An engineered natural antimicrobial system for the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 94, 20-31. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.10.002>
7. Batt, C. A. (2014). LISTERIA | *Listeria monocytogenes*. En *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 490–493). Elsevier. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00191-9>

8. Bernela, M., Kaur, P., Chopra, M., & Thakur, R. (2014). Synthesis, characterization of nisin loaded alginate–chitosan–pluronic composite nanoparticles and evaluation against microbes. *LWT-Food Science and Technology*, 59(2), 1093-1099. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.061>
9. Beshkova, D., & Frengova, G. (2012). Bacteriocins from lactic acid bacteria: microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 419-432. DOI: <https://doi.org/10.1002/elsc.201100127>
10. Bhatia, S., & Bharti, A. (2015). Evaluating the antimicrobial activity of Nisin, Lysozyme and Ethylenediaminetetraacetate incorporated in starch based active food packaging film. *Journal of food science and technology*, 52(6), 3504-3512. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1414-7>
11. Bimpizas-Pinis, M., Santagata, R., Kaiser, S., Liu, Y., & Lyu, Y. (2022). Additives in the food supply chain: Environmental assessment and circular economy implications. *Environmental and Sustainability Indicators*, 14, 100172. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indic.2022.100172>
12. Biswara, L. S., da Costa Sousa, M. G., Rezende, T., Dias, S. C., & Franco, O. L. (2018). Antimicrobial peptides and nanotechnology, recent advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 9, 855. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00855>
13. Boelter, J. F., & Brandelli, A. (2016). Innovative bionanocomposite films of edible proteins containing liposome-encapsulated nisin and halloysite nanoclay. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 145, 740-747. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.080>
14. Bonnaillie, L. M., Zhang, H., Akkurt, S., Yam, K. L., & Tomasula, P. M. (2014). Casein films: The effects of formulation, environmental conditions and the addition of citric pectin on the structure and mechanical properties. *Polymers*, 6(7), 2018-2036. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym6072018>

15. Bora, A., & Mishra, P. (2016). Characterization of casein and casein-silver conjugated nanoparticle containing multifunctional (pectin–sodium alginate/casein) bilayer film. *Journal of food science and technology*, 53(10), 3704-3714. DOI: [10.1007/s13197-016-2343-4](https://doi.org/10.1007/s13197-016-2343-4)
16. Chen, H., Wang, J., Cheng, Y., Wang, C., Liu, H., Bian, H., ... & Han, W. (2019). Application of protein-based films and coatings for food packaging: A review. *Polymers*, 11(12), 2039. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym11122039>
17. Chen, W., Ma, S., Wang, Q., McClements, D. J., Liu, X., Ngai, T., & Liu, F. (2021). Fortification of edible films with bioactive agents: A review of their formation, properties, and application in food preservation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-27. DOI: [10.1080/10408398.2021.1881435](https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1881435)
18. Chevalier, E., Assezat, G., Prochazka, F., & Oulahal, N. (2018). Development and characterization of a novel edible extruded sheet based on different casein sources and influence of the glycerol concentration. *Food Hydrocolloids*, 75, 182-191. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.028>
19. Chevalier, E., Chaabani, A., Assezat, G., Prochazka, F., & Oulahal, N. (2018). Casein/wax blend extrusion for production of edible films as carriers of potassium sorbate—A comparative study of waxes and potassium sorbate effect. *Food packaging and shelf life*, 16, 41-50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.01.005>
20. Codex STAN 192. (2019). Norma General para los Aditivos Alimentarios: Codex STAN 192-1995. *Normas Internacionales de los Alimentos*. Recuperado de: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/es/>
21. Delves-Broughton, J., & Weber, G. (2011). Nisin, natamycin and other commercial fermentates used in food biopreservation. In *Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation* (pp. 63-99). Elsevier. DOI: <https://doi.org/10.1533/9780857090522.1.63>

22. Erkmen, O., & Barazi, A. O. (2018). General Characteristics of Edible Films. Vol. 2 No. 1: 3
Received: January 22, 2018. Recuperado: <https://www.imedpub.com/articles/general-characteristics-of-edible-films.php?aid=22339#1>
23. Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A., & Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6), 292-303. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.02.004>
24. Fundo, J. F., Galvis-Sanchez, A. C., Delgadillo, I., Silva, C. L., & Quintas, M. A. (2015). The effect of polymer/plasticiser ratio in film forming solutions on the properties of chitosan films. *Food Biophysics*, 10(3), 324-333. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11483-015-9394-3>
25. González-Forte, L. D. S., Amalvy, J. I., & Bertola, N. (2019). Effect of natamycin on the physicochemical properties of corn starch based films and their effect on *Penicillium* spp. activity. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 24(1), 63-74. DOI: <https://doi.org/10.1080/1023666X.2018.1517200>
26. Hammam, A. R. (2019). Technological, applications, and characteristics of edible films and coatings: A review. *SN Applied Sciences*, 1(6), 1-11. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42452-019-0660-8>
27. Han, J. H. (2014). Edible films and coatings: a review. *Innovations in food packaging*, 213-255. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00009-6>
28. Heredia-Castro, P. Y., Hernández-Mendoza, A., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Cordoba, B. (2017). Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: Mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*, 42(6), 340-346. Recuperado de: DOI: <https://www.redalyc.org/journal/339/33951621002/html/>
29. Jamshidi, A., & Zeinali, T. (2019). Significance and Characteristics of *Listeria monocytogenes* in Poultry Products. *International Journal of Food Science*, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/7835253>

30. Jeevahan, J., & Chandrasekaran, M. (2019). Nanoedible films for food packaging: A review. *Journal of Materials Science*, 54(19), 12290-12318. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10853-019-03742-y>
31. Jordan, K., & McAuliffe, O. (2018). *Listeria monocytogenes* in foods. *Advances in food and nutrition research*, 86, 181-213. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.02.006>
32. Khan, I., & Oh, D. H. (2016). Integration of nisin into nanoparticles for application in foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 34, 376-384. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.12.013>
33. Khazaei Monfared, Y., Mahmoudian, M., Hoti, G., Caldera, F., López Nicolás, J. M., Zakeri-Milani, P., Matencio, A., & Trotta, F. (2022). Cyclodextrin-Based Nanosponges as Perse Antimicrobial Agents Increase the Activity of Natural Antimicrobial Peptide Nisin. *Pharmaceutics*, 14(3), 685. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030685>
34. Kumariya, R., Garsa, A. K., Rajput, Y. S., Sood, S. K., Akhtar, N., & Patel, S. (2019). Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial pathogenesis*, 128, 171-177. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.002>
35. Lim, H., & Hoag, S. W. (2013). Plasticizer effects on physical–mechanical properties of solvent cast Soluplus® films. *Aaps Pharmscitech*, 14(3), 903-910. DOI: <https://doi.org/10.1208/s12249-013-9971-z>
36. *Listeria (listeriosis)*. (s/f). Food and Drug Administration; FDA. Recuperado de <https://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens/listeria-listeriosis>
37. Lopes-Luz, L., Mendonça, M., Bernardes Fogaça, M., Kipnis, A., Bhunia, A. K., & Bühner-Sékula, S. (2021). *Listeria monocytogenes*: Review of pathogenesis and virulence determinants-targeted immunological assays. *Critical Reviews in Microbiology*, 47(5), 647-666. DOI: <https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1911930>

38. Lule, V. K., Garg, S., Gosewade, S. C., & Khedkar, C. D. (2016). Natamycin. En *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 56–62). Elsevier. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00482-7>
39. Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2016). Preservatives: Classifications and Analysis. En *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 497–504). Elsevier. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00567-5>
40. Martínez, B., Rodríguez, A., & Suárez, E. (2016). Antimicrobial peptides produced by bacteria: the Bacteriocins. In *New weapons to control bacterial growth* (pp. 15-38). Springer, Cham. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-28368-5_2
41. Matle, I., Mbatha, K. R., & Madoroba, E. (2020). A review of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products: Epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 87(1), 1-20. DOI: <https://doi.org/10.4102/ojvr.v87i1.1869>
42. Mittal, A., Singh, A., Benjakul, S., Prodpran, T., Nilswan, K., Huda, N., & de la Caba, K. (2020). Composite films based on chitosan and epigallocatechin gallate grafted chitosan: Characterization, antioxidant and antimicrobial activities. *Food Hydrocolloids*, 111, 106384. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106384>
43. Mo, X., Peng, X., Liang, X., Fang, S., Xie, H., Chen, J., & Meng, Y. (2021). Development of antifungal gelatin-based nanocomposite films functionalized with natamycin-loaded zein/casein nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 113, 106506. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106506>
44. Namratha, S., Sreejit, V., & Preetha, R. (2020). Fabrication and evaluation of physicochemical properties of probiotic edible film based on pectin–alginate–casein composite. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(4), 1497-1505. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijfs.14550>

45. Ng, Z. J., Zarin, M. A., Lee, C. K., & Tan, J. S. (2020). Application of bacteriocins in food preservation and infectious disease treatment for humans and livestock: A review. *RSC advances*, 10(64), 38937-38964. DOI: <https://doi.org/10.1039/D0RA06161A>
46. O'Bryan, C. A., Koo, O. K., Sostrin, M. L., Ricke, S. C., Crandall, P. G., & Johnson, M. G. (2018). Characteristics of bacteriocins and use as food antimicrobials in the United States. *Food and feed safety systems and analysis*, 273-286. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811835-1.00015-4>
47. Ollé Resa, C. P., Jagus, R. J., & Gerschenson, L. N. (2014). Effect of natamycin, nisin and glycerol on the physicochemical properties, roughness and hydrophobicity of tapioca starch edible films. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 40, 281–287. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.04.005>
48. Pedrosa-Silva Clerici, Maria Teresa, Marques-Sampaio Ulliana, Schmiele Marcio. (2019). Identification and Analysis of Starch. Capitule 2. Starches for Food Application, chemical, technological and health properties. Academic Press. 23-69. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809440-2.00002-2>
49. Pérez-Vergara Luis D., Cifuentes Marco T., Franco Arlet P., Pérez-Cervera Carmen E., Andrade-Pizarro D. (2020). Development and characterization of edible films base on native cassava strach, beeswax and propolis. *NFS Journal* 21: 39-49. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2020.09.002>
50. Picchio, M. L., Linck, Y. G., Monti, G. A., Gugliotta, L. M., Minari, R. J., & Igarzabal, C. I. A. (2018). Casein films crosslinked by tannic acid for food packaging applications. *Food Hydrocolloids*, 84, 424-434. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.06.028>
51. Preciado, G. M., Escalante Minakata, P., Castro, J. A. O., Junquera, V. I., Chávez, J. A. M., González, C. N. A., & Herrera, R. R. (2013). Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia*, 21(59), 64-70. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/674/67430113008.pdf>

52. Rivera-Toledo, E., Jiménez-Delgadillo, A. U., & Manzano-Gayosso, P. (2020). Antifúngicos poliénicos. Mecanismo de acción y aplicaciones. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 63(2), 7-17. DOI: <https://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2020.63.2.02>
53. Saikia, M., & Badwaik, L. S. (2018). Characterization and antimicrobial property of casein, gelatin and pectin based active composite films. *Journal of Packaging Technology and Research*, 2(3), 233-242. DOI: <https://doi.org/10.1007/s41783-018-0044-3>
54. Silva, C. C., Silva, S. P., & Ribeiro, S. C. (2018). Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Frontiers in microbiology*, 9, 594. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00594>
55. Te Welscher, Y. M., van Leeuwen, M. R., de Kruijff, B., Dijksterhuis, J., & Breukink, E. (2012). Polyene antibiotic that inhibits membrane transport proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(28), 11156-11159. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1203375109>
56. Umaraw, P., Munekata, P. E. S., Verma, A. K., Barba, F. J., Singh, V. P., Kumar, P., & Lorenzo, J. M. (2020). Edible films/coating with tailored properties for active packaging of meat, fish and derived products. *Trends in Food Science & Technology*, 98, 10–24. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.032>
57. Villalobos-Delgado, L. H., Nevárez-Moorillon, G. V., Caro, I., Quinto, E. J., & Mateo, J. (2019). Natural antimicrobial agents to improve foods shelf life. In *Food quality and shelf life* (pp. 125-157). Academic Press. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817190-5.00004-5>
58. Wagh, Y. R., Pushpadass, H. A., Emerald, F., & Nath, B. S. (2014). Preparation and characterization of milk protein films and their application for packaging of Cheddar cheese. *Journal of food science and technology*, 51(12), 3767-3775. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0916-4>
59. Yangılar, F., & Oğuzhan Yıldız, P. (2016). Casein/natamycin edible films efficiency for controlling mould growth and on microbiological, chemical and sensory properties during the

ripening of Kashar cheese. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(7), 2328-2336.

DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.7348>

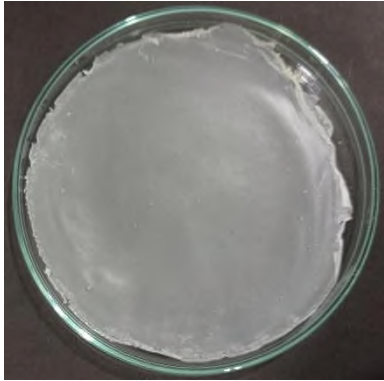
IX. ANEXOS

Anexo A. Diseño experimental con arreglo factorial 2³ de diferentes formulaciones para la preparación de biopelículas

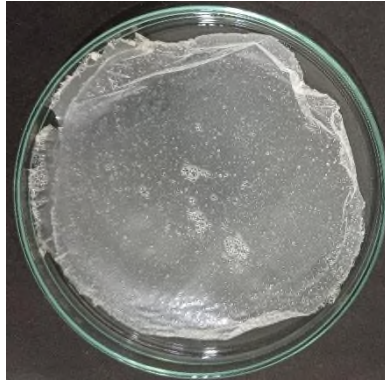
Factores			
Bacteriocina	Caseína	Glicerol	Código
			Control
Natamicina	25	25	NA2525*
Natamicina	25	50	NA2550*
Natamicina	50	25	NA5025*
Natamicina	50	50	NA5050
Nisina	25	25	NI2525*
Nisina	25	50	NI2550*
Nisina	50	25	NI5025*
Nisina	50	50	NI5050

*Tratamientos a los que se les añadió agua destilada (csp) para completar el 10 % p/v. El 25 y 50 % p/v o v/v corresponden a 2.5 y 5 g/mL o mL/mL, la bacteriocina es 2.5 % p/v (0.25 g/mL).

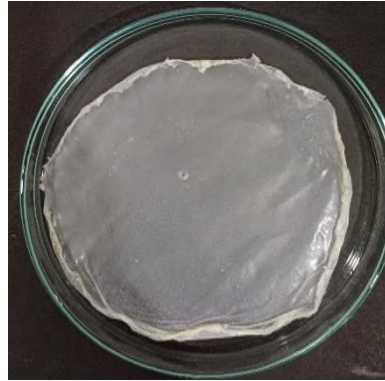
Anexo B. Biopelículas preparadas con natamicina y nisina



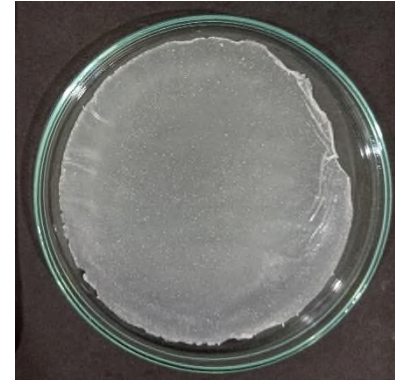
NA2525



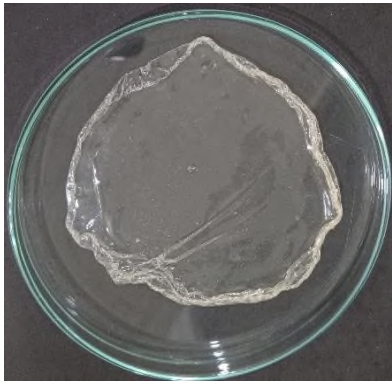
NA2550



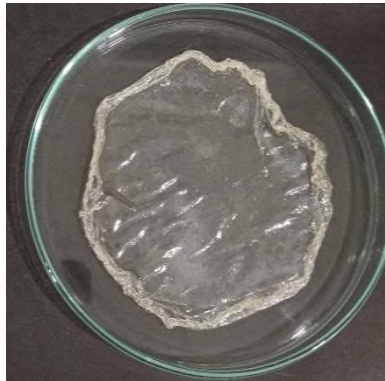
NA5025



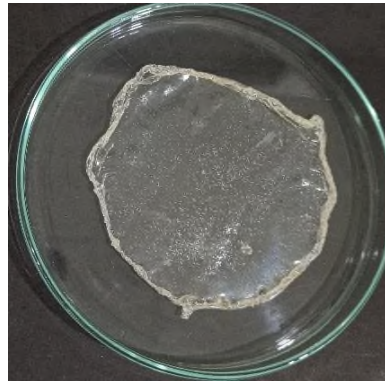
NA5050



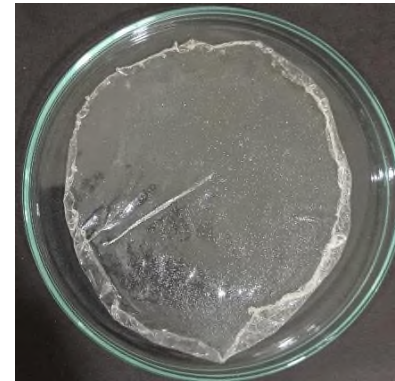
NI2525



NI2550



NI5025



NI5050

Anexo C. Longitud de onda y tipo de vibración de diferentes grupos funcionales

Longitud de onda (cm⁻¹)	Tipo de vibración
3300-3200	Tensión O-H Tensión N-H
2980-2920	Tensión simétrica y asimétrica C-H
1716-1713	Éster conjugado
1666-1630	Tensión C=O (Amida I)
1555-1520	Flexión N-H; Tensión C-N (Amida II)
1449-1441	Tensión simétrica COO ⁻
1414-1412	Flexión C-O-H
1242-1232	Tensión C-N y N-H (Amida III)
1267 y 1002	C-O-C en el éter
1087-1029	Tensión C-O
923-910	Flexión O-H

Anexo D. Diámetro de halos de inhibición de los diferentes tratamientos de natamicina y nisina.

Tratamiento	Halo de inhibición (mm)		Tratamiento	Halo de inhibición (mm)	
	1-3	2-4		1-3	2-4
NA2550 1	SH	SH	NA5050 3	SH	SH
NA5025 1	33.75	32.27	NI2525 4	51.01	40.63
NI2550 1	SH	SH	NI5025 4	10.35	11.43
NI5025 1	SH	SH	NI2550 3	SH	SH
NA5050 1	20.84	23.73	NA5025 5	SH	SH
NI5050 1	SH	SH	NI5025 5	SH	SH
NA2525 1	20.26	23.08	NI5050 3	SH	SH
NI2550 2	SH	SH	NA5050 4	SH	SH
NA2525 2	SH	SH	NA5050 5	37.44	31.31
NI5050 2	SH	SH	NI2550 4	SH	SH
NI2525 1	SH	SH	NI5050 4	SH	SH
NI2525 2	18.29	17.88	NI5050 5	SH	SH
NA2525 3	23.63	19.31	NA2550 2	35.36	48.17
NI5025 2	SH	SH	NA2550 3	SH	SH
NA5025 2	SH	SH	NI2525 5	SH	SH
NA5025 3	SH	SH	NI2550 5	SH	SH
NA5025 4	SH	SH	NA2550 4	SH	SH
NI2525 3	SH	SH	NA2525 5	SH	SH
NA2525 4	SH	SH	NA2550 5	29.54	29.19
NI5025 3	SH	SH	Control -	SC	SC
NA5050 2	SH	SH	Control +	SC	SC

SH: Sin halo de inhibición; SC: Sin crecimiento bacteriano