



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

"ELABORACIÓN DE UN EMPAQUE BIODEGRADABLE

ACTIVO CONTRA *Listeria monocytogenes*"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

ANAYANCI GARCIA REYES

DIRIGIDA POR

Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2004.

BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

No. Adq. 04706427

No. Título _____

Clas TS

684.09

926e



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**"ELABORACIÓN DE UN EMPAQUE BIODEGRADABLE
ACTIVO CONTRA *Listeria monocytogenes*"**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO EN ALIMENTOS**

PRESENTA

ANAYANCI GARCIA REYES

DIRIGIDA POR

Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2004.

INDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
Resumen	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Industria del plástico en México	3
II.2 Historia de películas de empaque y recubrimientos biodegradables	5
II.2.1 Definición	5
II.2.2 Tecnología de empaques activos	6
II.3 Suero de leche	6
II.3.1 Proteínas del suero	6
II.3.2 Concentrado de proteína de suero (WPC)	7
II.3.3 Propiedades funcionales del WPC	7
II.3.4 Uso del WPC	9
II.4 Conservación de alimentos	9
II.5 Bacterias ácido lácticas (BAL)	10
II.5.1 Sustancias antimicrobianas producidas por las BAL	11
II.5.2 Bacteriocinas	11
II.5.2.1 Clasificación	12
II.5.2.2 Importancia	15
II.6 <i>Listeria monocytogenes</i>	15
II.6.1 Listeriosis	16
III. OBJETIVOS	18
General	18
Específicos	18

IV. METODOLOGÍA	19
IV.1 MATERIALES	19
IV.2 METODOS	19
IV.2.1 Elaboración de las películas de WPC	19
IV.2.2 Evaluación de las propiedades mecánicas	20
IV.2.2.1 Prueba de punción	20
IV.2.2.2 Prueba de tensión	21
IV.2.3 Evaluación de las propiedades fisicoquímicas	23
IV.2.3.1 Permeabilidad al vapor de agua	23
IV.2.3.2 Isotermas de adsorción	24
IV.2.4 Prueba de solubilidad	27
IV.2.5 Selección de las películas	27
IV.2.6 Elaboración de las películas adicionadas de agentes antimicrobianos	27
IV.2.7 Actividad contra <i>Listeria monocytogenes</i>	28
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
V.1 Elaboración de películas de WPC	29
V.2 Evaluación de las propiedades mecánicas	31
V.3 Evaluación de las propiedades fisicoquímicas	35
V.3.1 Permeabilidad al vapor de agua	35
V.3.2 Isotermas de adsorción	37
V.4 Prueba de solubilidad	41
V.5 Selección de las películas	42
V.6 Actividad contra <i>Listeria monocytogenes</i>	42
VI. CONCLUSIONES	45
VII. BIBLIOGRAFÍA	46

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	Página.
1. Composición del WPC.	8
2. Clasificación de las bacteriocinas.	14
3. Incidencia de listeriosis con vehículo identificado en diferentes países.	17
4. Diferentes microclimas utilizados para las isotermas de adsorción.	26
5. Porcentajes empleados de los compuestos para la elaboración de las películas.	30
6. Composición del WPC empleado.	30
7. Análisis de varianza para la prueba de punción.	33
8. Comparación de medias de Tuckey-Kramer $p \leq 0.05$ para la prueba de punción.	33
9. Análisis de varianza para la prueba de tensión.	33
10. Comparación de medias de Tuckey-Kramer $p \leq 0.05$ para la prueba de tensión.	34
11. Análisis de varianza para la prueba de permeabilidad al vapor de agua.	36
12. Comparación de medias de Tuckey-Kramer $p \leq 0.05$ para la prueba de permeabilidad al vapor de agua.	37
13. Parámetros BET y GAB para isotermas de adsorción de películas comestibles de WPC.	40
14. Porcentaje de solubilización de las diferentes formulaciones de cera de candelilla	41

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA.	Página.
1. Consumo de los principales plásticos en México en el año 2000.	4
2. Composición del mercado de resina PET a nivel nacional en el 2000.	4
3. Aparato empleado para realizar la prueba de punción.	21
4. Cortador de acrílico empleado para la prueba de tensión.	22
5. Aparato empleado para realizar la prueba de tensión.	22
6. Desecador empleado para la prueba de permeabilidad el cual contiene las celdas con las películas.	24
7. Efecto del porcentaje de cera de candelilla en la fuerza de punción de películas a base de WPC.	32
8. Efecto del porcentaje de cera de candelilla en la fuerza de tensión de películas a base de WPC.	32
9. Efecto del porcentaje de cera de canelilla en la permeabilidad Al vapor de agua de películas de WPC.	36
10. Isotermas de adsorción de películas a base de WPC usando el modelo BET.	39
11. Isotermas de adsorción de películas a base de WPC usando el modelo GAB.	39
12. Zona de inhibición de crecimiento del <i>M. luteus</i> , por la película de WPC con el agente antimicrobiano incorporado.	43
13. Zona de inhibición de crecimiento del <i>L. monocytogenes</i> , por la película de WPC con el agente antimicrobiano incorporado.	43

RESUMEN

El uso de materiales de empaques sintéticos ha creado un aumento significativo en la contaminación ambiental. Una alternativa para disminuir dicha contaminación, es la elaboración y uso de películas comestibles biodegradables hechas a base de proteínas. El objetivo de este estudio fue la elaboración y caracterización de películas biodegradables adicionadas de una bacteriocina activa contra *Listeria monocytogenes*, ya que éste es un patógeno que es resistente a diferentes valores de pH y temperatura, por lo que se puede encontrar en alimentos ya procesados o en refrigeración. Para la realización de este proyecto se empleó como base concentrado de proteína de suero (WPC) con 73 % de proteína en concentraciones del 10% w/v, 5% w/v de glicerol como plastificante, cera de candelilla en concentraciones de 0.2-0.4% w/v. A las películas se le realizaron pruebas mecánicas (tensión, punción), permeabilidad al vapor de agua e isotermas de adsorción. Se observó que la adición de cera de candelilla a las películas afectó las propiedades mecánicas haciendo que estas disminuyeran por la cristalización de los lípidos en la matriz de las películas. La permeabilidad disminuyó debido a las características hidrofóbicas de los lípidos que al ser homogeneizados en partículas entre 1 y 5 μm de diámetro fueron finamente distribuidos en la película, formando pequeños cristales al secarse evitando así el paso del agua. Se comprobó la eficiencia de los agentes antimicrobianos producidos por *L. lactis* UQ2 en la película al lograr ésta inhibir a la *Listeria monocytogenes* teniendo en la película una concentración de 204,800 UA/ml de solución de película.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha observado un mayor aumento en la contaminación ambiental. Los materiales de empaques utilizados en los alimentos generan aproximadamente el 30% en peso de la basura sólida, lo que ha sido un factor para la búsqueda de nuevos tipos de empaques de alimentos que además de proteger y mantener las características óptimas de los alimentos, sean biodegradables. Un ejemplo son las películas biodegradables hechas a partir de proteínas como la caseína, colágeno, proteínas de soya, proteínas de suero de leche.

Las funciones de este tipo de empaques son las de proteger a los alimentos, de factores físicos, químicos y biológicos, tal como: humedad, luz, gases, aromas, microorganismos, con el fin de mantener su calidad y prolongando su vida de anaquel.

Algunas de las ventajas de utilizar este tipo de películas es que además de ser biodegradables, también pueden ser comestibles, ayudan a disminuir problemas de contaminación ambiental, le dan un valor nutricional adicional a los alimentos, también pueden ser adicionadas de sustancias como son: antioxidantes, colorantes, nutrientes, agentes antimicrobianos, etc., que mejoran las características de las películas.

La adición de agentes antimicrobianos ayuda a la disminución de la carga bacteriana, así como también a inhibir patógenos como *Salmonella*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, entre otros, que pueden causar un riesgo a la salud.

En este estudio se elaboraron películas biodegradables hechas con proteínas de suero de leche, las cuales se adicionaron de un agente antimicrobiano (bacteriocinas), producido por el *Lactococcus lactis* UQ2, con el fin de encontrar la dosis inhibitoria para la *Listeria monocytogenes*. Este es un patógeno que puede desarrollarse en diferentes condiciones de pH y temperaturas de refrigeración, por

lo que se puede encontrar en alimentos procesados o refrigerados. Dicha capacidad de crecer en estos ambientes es la característica principal de que sea considerada una bacteria de interés en la salud pública.

II. ANTECEDENTES

II.1 INDUSTRIA DEL PLÁSTICO EN MÉXICO.

En 1996, según datos del programa de las Naciones Unidas para el medio ambiente (PNUMA), el 4% de la producción de petróleo bruto se destinaba a la fabricación de plástico. También se realizó una estimación en donde se identificó que se requiere de 18.7 toneladas de petróleo para fabricar 3.74 toneladas de plástico. La industria de los termoplásticos en México tiene una participación importante en la industria del envase y el embalaje, en la Figura 1 se muestran los datos del año 2000 de los principales plásticos en México (PAOT , 2003).

El tereftalato de polietileno (PET) es uno de los materiales más utilizados para el empaque y embalaje de diversos productos. Por las características de este plástico, los envases son ligeros, transparentes, brillantes, con alta resistencia a impactos, tienen cierre hermético, no alteran las propiedades del contenido y no son tóxicos. Es por ello que el PET ha desplazado a otros materiales y tiene una demanda creciente en todo el mundo (PAOT , 2003).

En México, actualmente existen cinco plantas productivas que elaboran polímero en gránulo (chip) de PET. Durante el 2000 se produjeron en las plantas mexicanas 502,100 toneladas de PET, de las cuales se exportaron 75,000 toneladas, además se importaron 40,000 toneladas de este material. Se estima que para el año 2000 el consumo de PET a escala nacional fue de 467,100 toneladas. El crecimiento anual de la demanda de este material es de 13.1%. En la Figura 2 se puede observar la utilización del PET en empaques de diferentes productos en el 2000 a nivel nacional (PAOT, 2003).

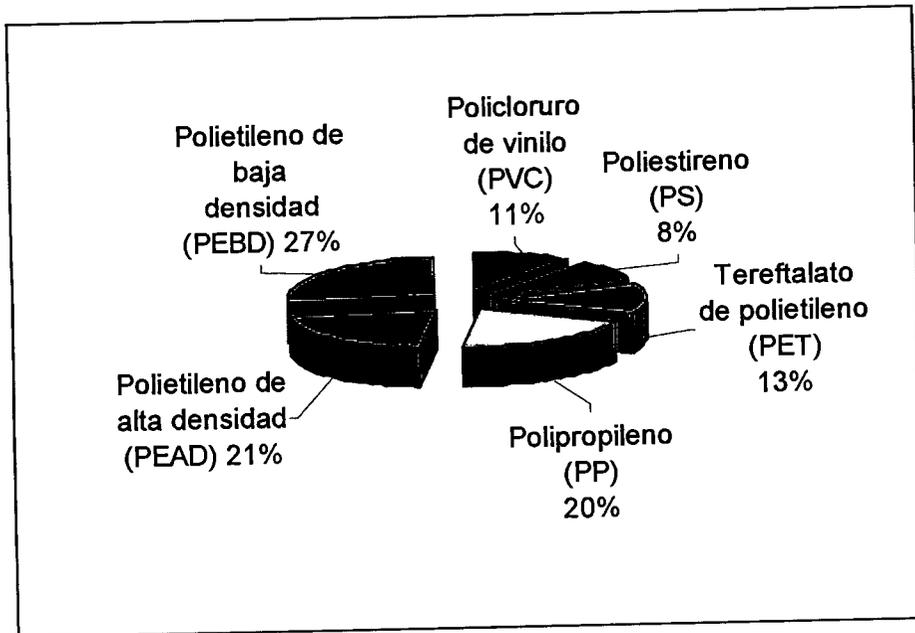


Fig. 1 Consumo de los principales plásticos en México en el año 2000. (PAOT, 2003).

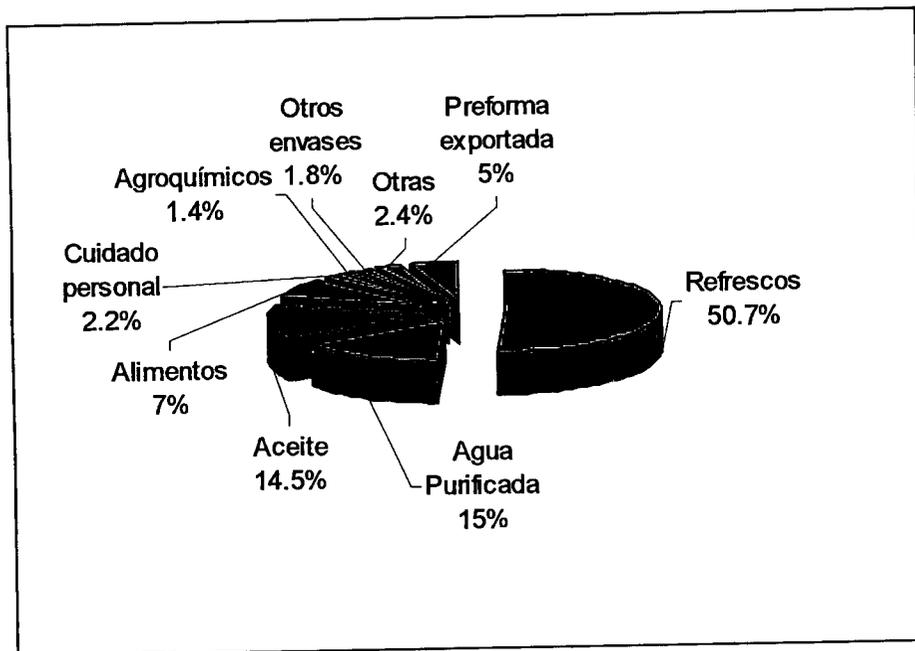


Fig. 2 Composición del mercado de resina PET a nivel nacional en el 2000. (PAOT, 2003)

II.2 HISTORIA DE PELÍCULAS Y RECUBRIMIENTOS BIODEGRADABLES.

La aplicación de películas y recubrimientos, biodegradables y comestibles que alargan la vida de anaquel de alimentos no es nueva. El recubrimiento de naranjas y limones frescos con cera para retrasar la desecación fue practicado desde los siglos XII y XIII, en China. El revestimiento de alimentos con grasa, una práctica llamada "mechado", fue usado en Inglaterra en el siglo XVI, el objetivo era la disminución de la pérdida de humedad del producto. En los años 30's la fundición de ceras de parafina era comercialmente disponible para recubrir frutas cítricas y así retrasar la pérdida de humedad, y en los 50's la cera de carnauba y emulsiones de aceite en agua fueron desarrolladas para recubrir frutas frescas y vegetales (Kester y Fennema, 1986).

En los últimos treinta años, se han publicado estudios a cerca del uso de películas comestibles y recubrimientos que extienden la vida de anaquel y mantienen la calidad de los alimentos frescos, congelados y procesados (Kester y Fennema, 1986).

II.2.1 DEFINICIÓN

Generalmente una película comestible es definida como una capa delgada de polímeros biodegradables comestibles, que se encuentran en los alimentos en forma de recubrimiento, o como una película pre-formada sobre, o entre los componentes de los alimentos. El propósito de estas películas es inhibir la migración de humedad, oxígeno, dióxido de carbono, aromas y lípidos, etc. (Krochta y DeMulder-Johnston, 1997).

Es bueno establecer que una variedad de polímeros incluyendo proteínas, carbohidratos y lípidos pueden ser usados para formar películas delgadas, flexibles, que tienen propiedades similares a películas formadas de polímeros sintéticos (Han, 2001).

II.2.2 TECNOLOGÍA DE EMPAQUES ACTIVOS.

La tecnología de empaques activos comprende interacciones entre el alimento, el empaque y la atmósfera interna gaseosa, para aumentar la vida de anaquel del alimento manteniendo su calidad y seguridad. En general, los empaques activos pueden proveer varias funciones que los sistemas de empaques tradicionales no pueden hacer. Estas películas pueden adicionarse de ingredientes como: antioxidantes, antimicrobianos, saborizantes, etc.; que brindan a las películas funciones activas que mantienen y/o mejoran la calidad de los alimentos, además de ser comestibles y biodegradables (Han, 2001).

La investigación de los empaques se ha dirigido con mayor énfasis hacia películas comestibles y biodegradables, tales como películas de proteína. Por ejemplo proteínas para películas que incluyen caseína, colágeno, zeína de maíz, proteína de soya, gluten de trigo y proteínas de suero de leche. Algunas ventajas de la utilización de proteínas para la formación de películas incluyen: descenso de la contaminación ambiental (películas que son biodegradables), mejoramiento de las propiedades de los alimentos empacados (sabores, colores), reducción de la pérdida de humedad y valor nutricional (Kim y Ustunol, 2001a).

II.3 SUERO DE LECHE.

II.3.1 PROTEÍNAS DEL SUERO.

El suero es una fuente confiable de varias proteínas, carbohidratos y minerales de alta calidad y algunos de sus componentes presentan actividad biológica como efecto antimicrobiano, entre otras. Las características nutrimentales y funcionales del suero se relacionan con las funciones estructurales y biológicas de estas proteínas. La β -lactoglobulina constituye aproximadamente 50% del contenido total

de proteínas del suero de leche, y la α -lactoglobulina representa aproximadamente 25% (Harper, 2000).

Las proteínas de suero tienen una o más de las siguientes funciones biológicas en alimentos:

- Actúan como una fuente de aminoácidos esenciales.
- Son una fuente de proteínas para defenderse contra infecciones microbianas (lactoferrina, lisozima y lactoperoxidasa).
- Pueden representar una fuente de factores de crecimiento.

(Harper, 2000).

II.3.2 CONCENTRADO DE PROTEÍNA DE SUERO (WPC).

El concentrado de proteína de suero es un producto obtenido por la exclusión de constituyentes no proteicos del suero pasteurizado. El WPC es preparado por técnicas de ultrafiltración y diafiltración y el contenido de proteína varía de 34 a 80% en base seca. El WPC contiene todos los componentes proteínicos del suero. En el Cuadro 1 se muestra el rango de composición del concentrado de proteína de suero (USDA, 2003).

II.3.3 PROPIEDADES FUNCIONALES DEL WPC.

El WPC tiene distintas propiedades funcionales que son de utilidad para su aplicación en alimentos tales como: el sabor, que es normalmente suave, pero el sabor exacto va a depender de la fuente del suero lácteo y las condiciones de procesamiento, el color depende principalmente de la fuente del suero lácteo, puede ser un polvo blanco cremoso, si esta hecho del suero de queso blanco o un color dorado cuando se prepara a partir de suero de queso que ha sido coloreado de rojo (Palazolo y col., 2000, Moro y col., 2001).

Cuadro 1. Composición del WPC.

(USDA, 2003.)

Bs = base seca

Rango de Composición de WPC	
Proteína (Bs)	30 - 80%
Grasa (Bs)	3 - 8%
Lactosa (Bs)	5 - 55%
Ceniza(Bs)	4 - 12 %
Humedad	2 - 6%

El WPC se solubiliza perfectamente en rangos de pH de 2-10; aunque su solubilidad es reducida si la proteína se encuentra desnaturalizada. En su estado nativo (presencia de proteína no desnaturalizada) el WPC pueden emulsificar aceites presentes en varios alimentos; ya que enlaza y retiene la grasa. Cuando el WPC es desnaturalizado, puede formar una masa insoluble la cual tiene una gran capacidad de retención de agua, aunque esta característica depende de muchas condiciones como es el pH, la temperatura, la concentración iónica y la composición ácida. Las soluciones que contienen más del 8% de proteína de WPC son capaces de formar geles durante el enfriamiento, este gel es capaz de inmovilizar o atrapar agua u otros componentes (ingredientes alimenticios, sabores), una vez que han sido calentados. Esta habilidad le permite al WPC formar alimentos espesos ó bien gelificados (Palazolo y col., 2000, Moro y col., 2001).

II.3.4 USOS DEL WPC.

El concentrado de proteína de suero es usado en alimentos como:

- Componente en la fortificación de alimentos.
- Extensor.
- Sustituto funcional.

Algunos ejemplos de su uso son en panadería, quesería, helados, confitería, productos cárnicos, bebidas, entre otros. Otro uso del WPC es en la elaboración de películas comestibles y biodegradables. Las películas tienen potencial para ser utilizadas como coberturas para alimentos, ya que pueden utilizarse como un empaque biodegradable con buenas propiedades mecánicas y de barrera (Lin y Krochta, 2003).

II.4 CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS

Desde siempre, el hombre ha tenido la necesidad de buscar métodos para conservar los alimentos frescos para su uso posterior; tradicionalmente los alimentos han sido conservados mediante calor, empleo de bajas temperaturas, secado y fermentación (Branen, 1993). Actualmente la conservación de alimentos es mucho más compleja, a través de una adecuada selección del sistema a utilizar y a menudo utilizando más de un método de conservación. Los diferentes métodos de conservación, físicos, químicos y biológicos, son aplicados con la intención de obtener alimentos más seguros y extender su vida de anaquel, mediante la destrucción, retardo o prevención del crecimiento de microorganismos patógenos y deterioradores (Doley y col., 2001).

Los métodos físicos son aquellos que utilizan tratamientos físicos que inhiben los microorganismos indeseables. El crecimiento microbiano puede ser inhibido por procesos de deshidratación, los cuales incluyen el secado con aire caliente, la liofilización y otros métodos físicos de conservación de alimentos son la

concentración por congelación y el almacenamiento a bajas temperaturas (refrigeración y congelación); todos ellos reducen la actividad acuosa (a_w) (Farkas, 1997).

Un conservador químico ha sido definido por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) como "cualquier sustancia química que al ser adicionada a los alimentos, previene o retarda su deterioro". Los conservadores previenen tanto el deterioro químico como biológico; los conservadores utilizados para prevenir el deterioro químico incluyen los antioxidantes, mientras que para prevenir el deterioro biológico se tienen los agentes antimicrobianos (Branen, 1993); los cuales son compuestos químicos adicionados a los alimentos para inhibir o retardar el crecimiento microbiano (Doley, 2001).

Los métodos biológicos o la bioconservación, tienen la finalidad de alargar la vida de anaquel e inocuidad de los alimentos, mediante el uso de bacterias ácido lácticas (BAL), entre otros. Las BAL pueden funcionar como microorganismos antagonistas, utilizar sus productos metabólicos o ambos para inhibir o destruir microorganismos patógenos y/o deterioradores de los alimentos (Doley, 2001).

II.5 BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS (BAL).

Las BAL son Gram positivas, cocos no esporulados, bacilos o cocobacilos, generalmente son catalasa negativos. En base a la fermentación de carbohidratos pueden ser: homofermentativas, cuando las hexosas son convertidas principalmente a ácido láctico, mediante la ruta de la glicólisis ó bien heterofermentativas cuando usan la ruta del 6-fosfogluconato/fosfoacetolasa, produciéndose ácido láctico, dióxido de carbono, etanol y/o ácido acético (Gasson, 1993).

Las BAL comprenden los géneros *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Denococcus*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*,

Lactococcus, *Lactosphaera*, *Leuconoctoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Jay, 2000).

Las BAL presentan un gran potencial para ser utilizadas como bioconservadores debido a que durante miles de años han sido las responsables de la conservación de alimentos fermentados. Las BAL son generalmente reconocidas como seguras (GRAS, Generally Recognized as Safe) en la legislación actual de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (Kailasapathy y Chin; 2000, Feord, 2002).

II.5.1 SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS PRODUCIDAS POR LAS BAL.

Las sustancias producidas por el metabolismo de las BAL actúan inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas y deterioradoras, dando lugar a productos estables y relativamente inocuos. Actualmente se sabe que además de los ácidos orgánicos (principalmente láctico y acético), las BAL producen otras sustancias antimicrobianas como son metabolitos del oxígeno (peróxido de hidrógeno) y también algunos productos finales del catabolismo celular (diacetilo, alcoholes, dióxido de carbono u reuterina). Por otro lado, se ha descrito que algunas especies de BAL son capaces de sintetizar y secretar al medio sustancias antimicrobianas conocidas como bacteriocinas (Cleveland y col., 2001).

II.5.2 BACTERIOCINAS

Las bacteriocinas son péptidos o complejos de péptidos bioactivos sintetizados ribosomalmente, liberados extracelularmente las cuales tienen un efecto bactericida o bacteriostático sobre otras especies relacionadas taxonómicamente. El término "bacteriocina" fue originalmente introducido en 1953 específicamente para definir antibióticos proteicos del tipo colicina, pero ahora se acepta incluir péptidos inhibitorios producidos por cualquier género bacteriano (Giraffa y col., 1995).

II.5.2.1 CLASIFICACIÓN

Las bacteriocinas difieren en su espectro de actividad, características bioquímicas, peso molecular, mecanismo de acción, sistemas de producción y secreción, determinantes genéticos y organización de los operones que codifican para estos compuestos (Cintas y col., 2001).

Las bacteriocinas se han clasificado en base a su estructura primaria como se muestra en el Cuadro 2.

◆ CLASE I: LANTIBIÓTICOS

Estas bacteriocinas son péptidos policíclicos pequeños (<5 kDa) de entre 19 a 50 aminoácidos, estables al calor, cuya principal característica es que contienen aminoácidos con modificaciones postraduccionales. (Twomey y col., 2002). Los lantibióticos se subclasifican en dos tipos:

TIPO Ia: Moléculas flexibles

Péptidos catiónicos e hidrofóbicos que forman poros en las membranas celulares de los microorganismos blanco. Dentro de esta clasificación se encuentran las siguientes: nisina, subtilisina, epidermina, lacticina 481, lactocina S (Ennahar y col., 2000).

TIPO Ib: Moléculas globulares.

Péptidos globulares sin carga neta. Dentro de esta clasificación se encuentran las siguientes: mersacidina, cinnamicina, duramicina (Cleveland y col., 2001).

◆ CLASE II: NO LANTABIÓTICOS

Son péptidos pequeños (<10 kDa) de entre 20 a 60 aminoácidos, catiónicos, hidrofóbicos, estables al calor (Hechard y Shall, 2002).

CLASE IIa: Tienen una actividad antimicrobiana especialmente fuerte contra *Listeria monocytogenes*. Tienen un elevado contenido de restos aminoácidos no polares así como aminoácidos pequeños como la glicina, lo que le confiere a la molécula, un alto grado de libertad conformacional. Algunos representantes son: leucocina A, mesentericina Y105, bavaricina A, sakacina P, enterocinas A y P (Ennahar y col., 2000; Cintas y col., 2001).

CLASE IIb: Bacteriocinas compuestas de 2 péptidos diferentes para tener acción óptima. Si bien se requieren de ambos péptidos para lograr mayor actividad, los péptidos individuales eventualmente presentan actividad antimicrobiana moderada. Ejemplos: lactocina 705, lactococcina G, lactacina F y plantaricina S (Nes y Holo, 2000; Cuozzo y col., 2003).

CLASE IIc: Bacteriocinas que contienen una extensión N-terminal denominada tipo sec-dependiente o péptido señal a diferencia de las demás bacteriocinas Clase II a y b que contienen una secuencia líder tipo doble glicina para su secreción. Estas bacteriocinas se adhieren proteolíticamente y se exportan por medio de la vía general de secreción (GSP). Ejemplos de éstas son: acidocina B, divergicina A, bacteriocina 331 y lactococcina 972 (Cintas y col., 2001).

CLASE IId: Bacteriocinas que no caen en las clasificaciones anteriores, principalmente son péptidos que no presentan secuencias similares, no requieren secuencia líder, ni péptido señal para ser secretadas. Ejemplos son: enterocina L50 y Q (Nes y Holo, 2000; Cintas y col., 2001).

◆ CLASE III. PROTEÍNAS (>30KDa)

Bacteriocinas grandes (>30 kDa). A diferencia de las bacteriocinas Clase I y II; éstas se inactivan con tratamientos térmicos entre 60° y 100°C por 10-15 min. Ejemplos de estos son: helveticina J, lactacina A y B, caseicina 80 (Cintas y col., 2001; Cleveland y col., 2001).

Cuadro 2. Clasificación de las Bacteriocinas. (Cleveland y col., 2001;
Mc Auliffe y col., 2001).

CLASE I. LANTIBIOTICOS

Tipo Ia: Moléculas flexibles.

Tipo Ib: Moléculas globulares.

CLASE II. NO LANTABIÓTICOS.

Clase IIa: Familia de la pediocina.

Clase IIb: Bacteriocinas con dos péptidos.

Clase IIc: Bacteriocinas sec - dependientes.

Clase IId: Otras bacteriocinas.

CLASE III. PROTEINAS (>30KDa).

II.5.2.2 IMPORTANCIA.

El interés en las bacteriocinas producidas por BAL ha crecido dramáticamente en las últimas décadas, ya que el uso potencial de éstas ó de los organismos productores en la elaboración de los alimentos y medicamentos puede ser muy amplio. Una de las razones de este interés es que las bacteriocinas inhiben bacterias patógenas de los alimentos tales como *Listeria monocytogenes*, por lo cual pueden utilizarse como una alternativa a los métodos de conservación de alimentos (O'Sullivan y col., 2002).

La efectividad de las bacteriocinas en los alimentos puede reducirse porque la concentración mínima inhibitoria difiere ampliamente entre bacteriocinas y cepas sensibles. Además, el espectro de actividad de las bacteriocinas producidas por las bacterias Gram positivas es usualmente limitado y no incluye a las bacterias Gram negativas (Goulhem y col., 1999).

II.6 *Listeria monocytogenes*.

Es un bacilo corto, gram positivo, no esporulado, dotado de movilidad capaz de crecer a 4°C. Los requerimientos nutrimentales de *Listeria* son típicos de otras bacterias gram positivas. Los límites de temperatura para el crecimiento son inusualmente amplios (1°–45°C) con temperatura óptima entre 30° y 37°C. El pH óptimo es de 7.0 con límites de 4.5–8.0. La habilidad del microorganismo de crecer en un amplio rango de temperatura en ambientes ácidos, así como en la ausencia o muy bajas concentraciones de O₂, la hace capaz de multiplicarse en ambientes muy variados. Por lo tanto, el microorganismo está distribuido ampliamente y puede ser encontrado en diversos sitios, tales como el agua, suelos, leche de vaca y heces humanas y de animales (Ryser y Marth, 1991).

II.6.1 LISTERIOSIS

La listeriosis se manifiesta de diferentes maneras en el hombre. La infección puede ser asintomática o asociarse con malestar general, náusea, diarrea y fiebre ligera. En el Cuadro 3 se muestran incidencias de listeriosis en diferentes vehículos (Jay, 2000).

La incidencia de listeriosis reportada varía de 0.2 a 8.3 casos por millón de personas, con la mayoría de los casos reportados en países industrializados. Sin embargo, en algunos países se ha reportado una mayor incidencia, aunque se considera que aproximadamente del 80 al 90 % de los casos de listeriosis humana están relacionados a la ingestión de alimentos (www.ehpnetl.niehs.nih.gov, 2003).

L. monocytogenes ha sido un patógeno de particular interés en la salud pública, ya que la listeriosis puede causar varios trastornos que van desde los síntomas leves parecidos a los de resfriado, hasta una infección a nivel del sistema nervioso, e incluso, en las mujeres embarazadas puede atravesar la placenta y ocasionar daños severos al feto (Ryser y Marth, 1991).

Cuadro 3. Incidencia de listeriosis con vehículo identificado en diferentes países.
(Jay, 2000)

País	Año	Casos/muertes	Vehículo
Nueva Zelanda	1980	22/6	Mariscos
Canada	1981	41/18	Col
Boston	1983	49/14	Leche pasteurizada
EUA	1986-1987	36/16	Vegetales
Italia	1989	1	Salchichas de pavo
EUA	1989	9/1	Camárones
Vermont	1990	1	Leche cruda
Italia	1990	1	Salchichas
Australia	1990	11/6	Paté
Australia	1991	3	Mejillones ahumados
Nueva Zelanda	1992	4/2	Mejillones ahumados
Canada	1992	1	Carne de cabra
Francia	1992	279/85	Lengua de cerdo
Australia	1993	5	Almejas ahumadas
EUA	1994	52	Leche con chocolate
EUA	1999	50	Salchichas

III. OBJETIVOS

GENERAL

Obtener una película biodegradable comestible a base de concentrado de proteínas de suero (WPC) adicionada de agentes antimicrobianos para la inhibición de *Listeria monocytogenes*.

ESPECÍFICOS

- Elaborar y caracterizar películas biodegradables y comestibles a base de WPC.
- Medir las propiedades mecánicas (tensión, punción) y fisicoquímicas (permeabilidad al vapor de agua, isotermas de adsorción), para en su momento seleccionar la mejor formulación de película biodegradable, para una cierta aplicación.
- Determinar la dosis de agentes antimicrobianos producidos por *Lactococcus lactis* UQ2 e incorporarlo en la película biodegradable, con capacidad de inhibir *Listeria monocytogenes*, como resultado de su difusión.

IV. METODOLOGÍA

IV.1 MATERIALES

Para este trabajo se empleó concentrado de proteína de suero (WPC) con 73% de proteína (New Zealand Milk Products, Wellington, New Zealand), glicerol (Baker Cat. No. 2136-63, Xalostoc, México), cera de candelilla (Strahl and Pitschinc, México D.F.), Nitrato de magnesio ($Mg(NO_3)_2$) (Mallinckrodt Cat. No. 6002), cloruro de litio (LiCl) (Mallinckrodt Cat. No. 5852), cloruro de magnesio ($MgCl_2$) (Baker Cat. No. 2444), carbonato de potasio (K_2CO_3) (Baker Cat. No. 3010-01), bromuro de sodio (NaBr) (Mallinckrodt Cat. No. 0535), yoduro de potasio (KI) (Baker Cat. No. 3165-01), Tween 80 (Sigma Cat. No. P-8074, St. Louis MO, USA). Medios de cultivo: Infusión cerebro corazón (BHI) (Bioxon Cat. No. 214700, Cuautitlan, México), Agar Bacteriológico (Bioxon Cat. No. 150-1).

Los aparatos empleados son un Ultra-Turrax T25 Janke and Kunkei (Ika-Labortechnik) para homogenizar, con un dispositivo de dispersión S25N – 25S; con el cual se logra un tamaño de partícula de acuerdo al productor en un rango de 1-5 μm , un Elcometer 345, (Electrometer Instruments, Inglaterra) para la medición de espesor; un texturometro TA-HD (Texture Technologies Co., Scarsdale, N. Y.), para las propiedades mecánicas.

IV.2 MÉTODOS

IV.2.1 Elaboración de las películas de WPC.

El procedimiento se fundamenta en los reportes de Pérez-Gago y Krochta en 2001 y Cagri y col. en 2003, para poder obtener las diferentes formulaciones con algunas modificaciones en las cantidades empleadas por ellos, también se probaron diferentes superficies de vaciado (como: acrílico, vidrio, teflón, loseta).

Para la elaboración de las películas se empleó una solución de WPC-73% al 10% w/v, disolviendo con agitación; se adicionó como plastificante glicerol al 5% w/v, en agua destilada. El pH de la mezcla, se ajustó a 8.0 con NaOH 5N; después la solución se calentó a 80°C en un baño de agua durante 30 min. Durante los últimos 5 min de calentamiento, se adicionó cera de candelilla en concentraciones de 0.2 y 0.4% w/v. Al término del calentamiento la solución fue homogenizada a 9000 rpm durante 4 min usando un ultra-turrax T25; la solución se filtro con gasa. El filtrado será desgasificado por 30 min. La solución obtenida se vació en placas de acrílico de 9 mm de espesor, utilizando un aplicador de cromatografía de capa fina con un espesor fijo de 2 mm. Las películas fueron secadas a condiciones ambiente durante 24 horas. Una vez secas, las películas fueron despegadas y guardadas para pruebas posteriores.

IV.2.2 Evaluación de las propiedades mecánicas

Para la evaluación de las propiedades mecánicas, se empleó el método del ASTM D882-83 (1983), utilizando un texturometro TA-HD. Todas las películas fueron acondicionadas a 53% de humedad relativa (HR) hasta peso constante utilizando como sal $Mg(NO_3)_2$ saturado; se tomaron muestras por triplicado y se determinó el espesor de cada una en 5 puntos al azar mediante una sonda de espesor (Elcometer 345).

IV.2.2.1 Prueba de punción

Las películas se recortaron en forma de discos de 4 cm de diámetro. Se colocaron en una celda de vidrio con empaques de teflón, enseguida se efectuó la medición, como se observa en la Figura 3.

De las curvas registradas en el texturómetro en función del tiempo proporcionaron la fuerza máxima de ruptura (N), el área bajo la curva (N*s), la ordenada al origen y

el gradiente de fuerza. Las condiciones de prueba empleadas fueron, una velocidad de cabezal de 1 mm/s y una sonda de 3 mm de diámetro.

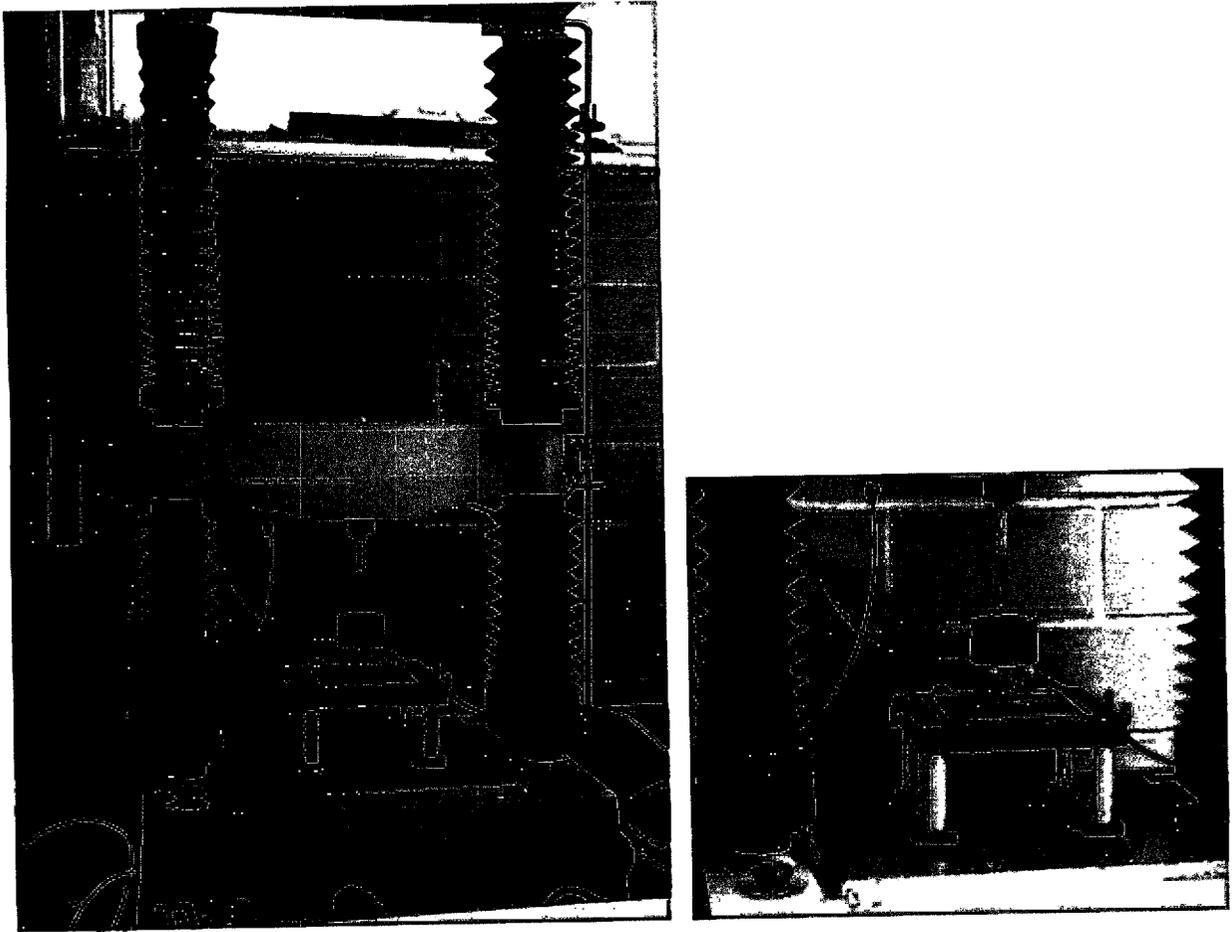


Figura 3. Aparato empleado para realizar la prueba de punción.

IV.2.2.2 Prueba de tensión.

Las películas se recortaron con un cortador de acrílico (Figura 4). Las películas serán colocadas en pinzas neumáticas adaptadas al equipo como se observa en la Figura 5, con una separación inicial de 15 cm y operando a una velocidad de desplazamiento de 1 mm/s.

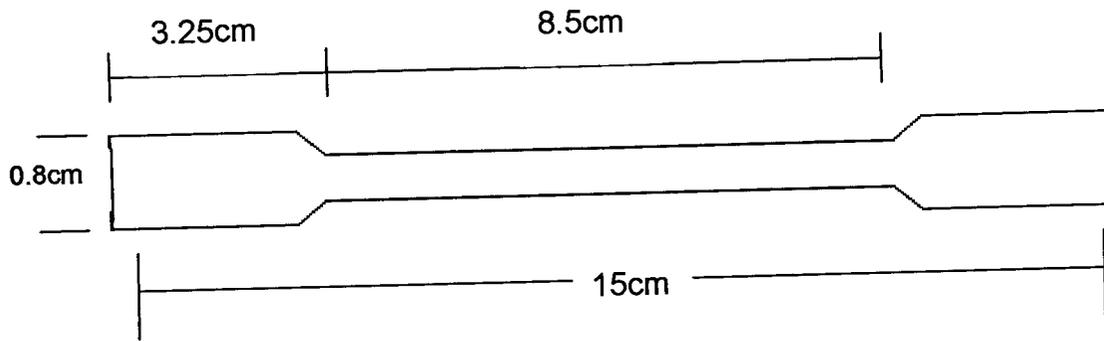


Figura 4. Cortador de acrílico empleado para la prueba de tensión.

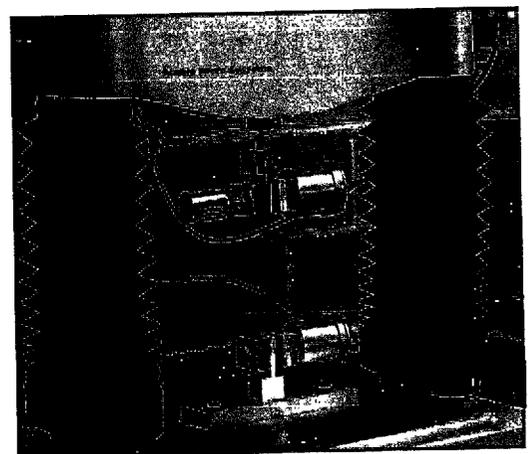
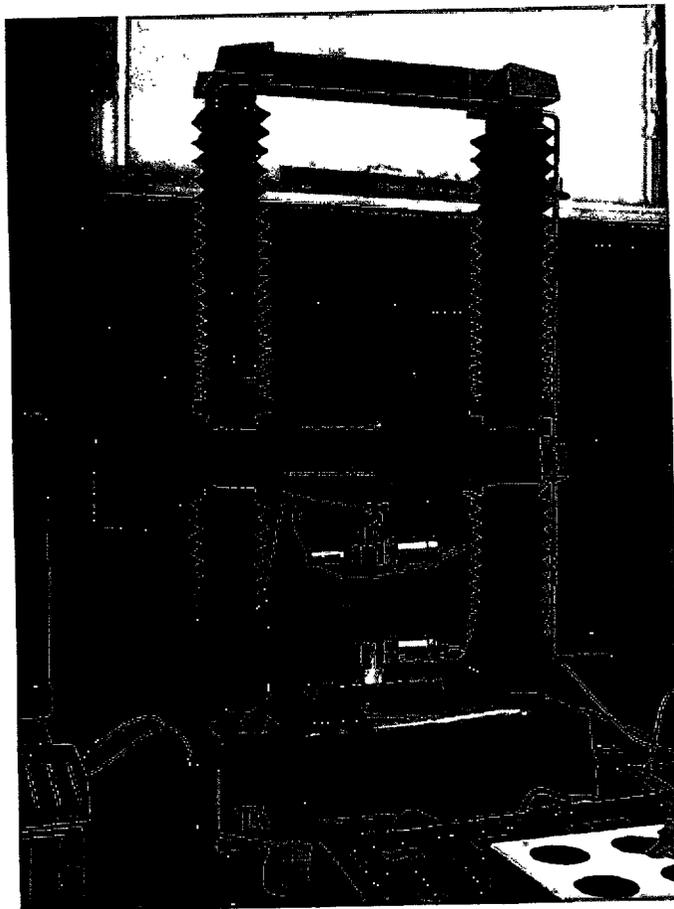


Figura 5. Aparato empleado para realizar la prueba de tensión.

De los resultados que se registraron en la gráfica de fuerza contra distancia obtenida por el equipo, se evaluó la fuerza máxima de tensión por unidad de área de sección transversal (Mpa).

IV.2.3 Evaluación de las propiedades fisicoquímicas

IV.2.3.1 Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) se determinó gravimetricamente usando una modificación del método del ASTM E96-95 (1995).

Las películas fueron recortadas en círculos de 4 cm de diámetro. Para determinar la permeabilidad al vapor de agua, las películas se colocaron en celdas de permeabilidad, las cuales contenían agua destilada hasta un nivel de 2 cm por debajo de la tapa (100% HR, 2.58×10^{-3} MPa presión vapor del agua). Las celdas se colocaron dentro de un desecador que contenía sílica gel, al cual se le aplicó vacío para mantener una humedad relativa en el ambiente de 76% (1.96×10^{-3} MPa presión de vapor del agua) como se representa en la Figura 6. La difusión del vapor de agua a través de la película fue absorbida por la sílica gel y la cantidad de vapor de agua difundido se determinó por pérdida de peso de cada celda. Las celdas fueron pesadas en intervalos de tiempo durante 50 h.

La PVA fue calculada de acuerdo a la ecuación:

$$PVA = \frac{w \times}{A t (p_2 - p_1)} \quad (1)$$

Donde w es la pérdida de peso (g), s el tiempo total (h), x el espesor de la película (m), A el área de la película expuesta (m^2) y $(p_2 - p_1)$ es la diferencia en presión de vapor de agua (kPa).

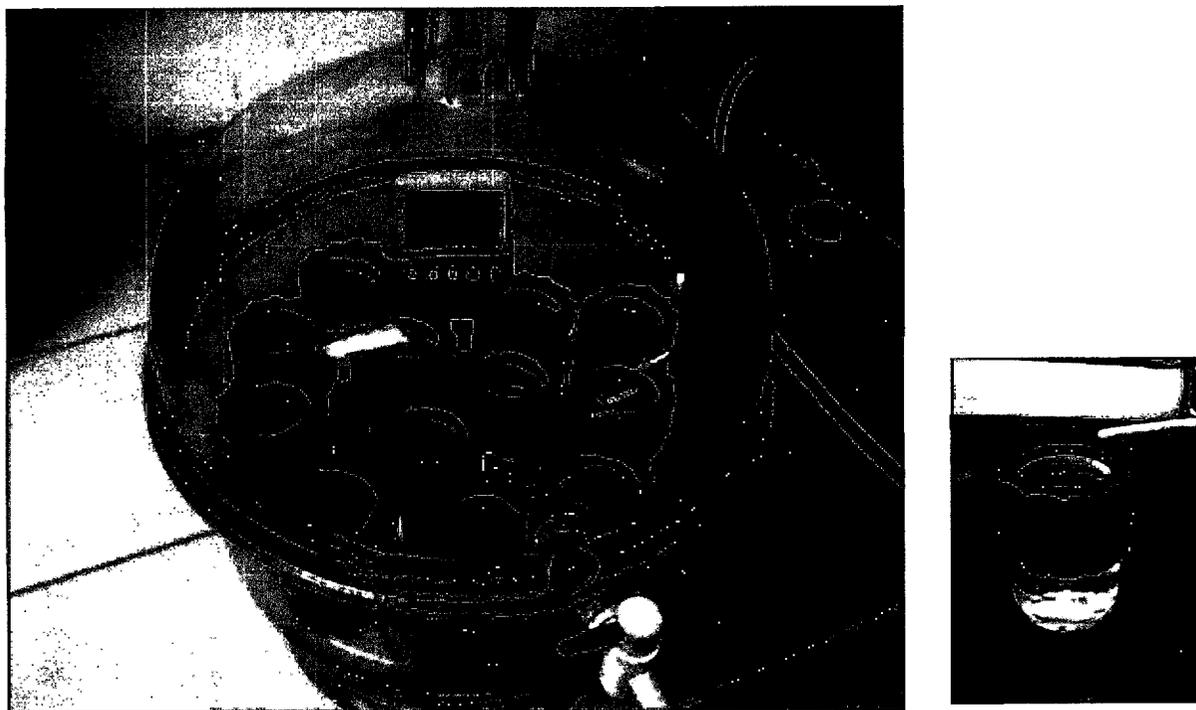


Figura 6. Desecador empleado para la prueba de permeabilidad conteniendo las celdas con las películas.

IV.2.3.2 Isotermas de adsorción

Se empleó el método de microclimas, usando diferentes HR logradas con soluciones saturadas de diferentes sales como se muestra en el Cuadro 4. Las películas fueron secadas a 80°C por 4 horas en una estufa al vacío, y luego se pulverizaron.

Se emplearon muestras de 1g (w_1) por triplicado de cada formulación, las cuales se colocaron en los diferentes microclimas en una cámara de temperatura controlada de $10 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta alcanzar las condiciones de equilibrio (aproximadamente 14 días). Las muestras se pesaron (w_2) y la diferencia de peso ($w_2 - w_1$) representó la cantidad de humedad adsorbida. Los resultados obtenidos se ajustaron a los modelos de Brunauer, Emmett y Teller (BET) (Brunauer y col., 1938) y Guggenheim, Anderson, De Boer (GAB) (Anderson, 1948).

La ecuación de BET es:

$$M = \frac{M_0 c a_w}{(1 - a_w) (1 - a_w + c a_w)} \quad (2)$$

Donde M es el contenido de humedad al equilibrio, M_0 es el contenido de humedad en la monocapa, c es la constante relacionada al calor de sorción y a_w es la actividad de agua.

La ecuación de GAB es:

$$M = \frac{M_0 C k a_w}{(1 - k a_w) (1 - k a_w + C k a_w)} \quad (3)$$

Donde M es el contenido de humedad al equilibrio, M_0 es el contenido de humedad en la monocapa, C es la constante de Guggenheim, la cual está relacionada con el calor de sorción de la primera capa y k es un parámetro relacionado al calor total de sorción.

Cuadro 4. Diferentes microclimas utilizados para las isotermas de adsorción.
(Manual de instrucciones AQUALAB)

Soluciones salinas saturadas	Aw (10°C)	Aw (20°C)
LiCl	0.133	0.111
MgCl ₂	0.335	0.333
K ₂ CO ₃	0.431	0.432
Mg(NO ₃) ₂	0.575	0.545
NaBr	0.621	0.591
KI	0.721	0.699
NaCl	0.757	0.754

IV.2.4 Prueba de solubilidad.

Se pesan tres gramos de la película y se deja secar a 80°C durante 24h. Una vez seca la película se peso (W_1) y se adicionaron 50ml de agua destilada con 0.05% de azida de sodio. Se dejo en agitación a 20°C durante 24h. Se decanto la solución y se dejo secando por 24h a 80°C y se volvió a pesar (W_2).

$$\% \text{ de Solubilidad} = \frac{(W_1 - W_2) \times 100}{W_1} \quad (4)$$

IV.2.5 Selección de las películas.

Una vez obtenidos los resultados de las pruebas anteriores se eligió la mejor formulación para la adición de los agentes antimicrobianos presentes en el extracto libre de células de la cepa bacteriocinogenica *L. lactis* UQ2.

IV.2.6 Elaboración de las películas adicionadas de agentes antimicrobianos

Las películas se elaboraron como en la primera parte, pero antes de ser degasificadas se incorporó la cantidad de agentes antimicrobianos a probar, obtenidos de la fermentación de suero lácteo dulce con *Lactococcus Lactis* UQ2. Después se vació en cajas petri estériles en condiciones asépticas y se dejaron secar por 24 horas.

Las películas adicionadas de agentes antimicrobianos se elaboraron solo con la formulación que se eligió, basándose en las pruebas mecánicas y fisicoquímicas que se realizaron.

IV.2.7 Actividad contra *Listeria monocytogenes*

La actividad de los agentes antimicrobianos incorporadas en las películas se pudieron probar, utilizando *Micrococcus luteus*, para observar la difusión de la actividad bactericida en la película.

Una vez observada esta difusión, se probaron diferentes concentraciones de agentes antimicrobianos en las películas, hasta obtener la dosis inhibitoria contra *Listeria monocytogenes*, para la prueba se emplearon cuadros de 1cm². Se utilizó el método de difusión en agar, el cual consiste en colocar una capa de agar BHI (1% w/v agar), en una caja petri estéril. Una vez sólida esta capa se colocó el cuadro de la película activa y se cubrió con otra capa de agar BHI (0.8% w/v agar), adicionado de 200 µl de Tween 80 al 20% (v/v) e inoculado con 50 µl de 10⁶ ufc/ml de solución del *L. monocytogenes*. Las cajas fueron incubadas por 24h a 37°C. La presencia de zonas de inhibición indicó actividad antimicrobiana en la película.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

V.1 Elaboración de las películas de WPC.

Para la elaboración de las películas se emplearon 32 formulaciones en las que se varió tanto el porcentaje de WPC, glicerol y cera de candelilla (Cuadro 5).

También se probó el vaciado de las películas en diferentes superficies, tales como: acrílico, teflón, vidrio y loseta. En cuanto a la superficie se observó que se despegaba satisfactoriamente tanto del acrílico como del teflón. Para la elección del material se tomó en cuenta el costo y las características de las películas, y se eligió al acrílico, ya que tiene un menor costo que el teflón y permite obtener películas completamente lisas, lo que no ocurría con el teflón, que dejaba una superficie rugosa por las características del material comercial.

En cuanto a las formulaciones se eligieron las que contenían 10% w/v de WPC, 5% w/v de glicerol y dos diferentes porcentajes de cera de candelilla (0.2 y 0.4 %), porque se despegaban mejor de la superficie, también se trabajó con un control (0% cera de candelilla), para observar el efecto de la cera de candelilla en las pruebas a realizar.

La formación de las películas proteicas es el resultado de la polimerización de proteínas desnaturalizadas con el calor, donde los enlaces disulfuro e hidrofóbicos mantienen la red de la película (Janes y col., 2001)

En el Cuadro 6 se observa la composición del WPC que se empleó para la elaboración de las películas.

Cuadro 5. Porcentajes empleados de los compuestos para la elaboración de las películas.

% WPC	% Glicerol	% Cera
5	2.7	0
10	3.13	0.4
	5	0.8
	10	1.5

Cuadro 6. Composición del WPC empleado.

Composición del WPC.	
Proteína	73 %
Grasa	16.7 %
Lactosa	6.1 %
Ceniza	2.6 %
Humedad	1.6%

V.2 Evaluación de las propiedades mecánicas.

El efecto de la adición de cera de candelilla en la fuerza de punción y tensión de las películas preparadas con WPC se observa en las Figuras 7 y 8.

La figura 7 representa la fuerza de punción de las películas de WPC, en la cual los resultados muestran que la fuerza de punción disminuyó significativamente ($p \leq 0.05$), con la adición de cera de candelilla (Cuadro 7), ya que se observó que las películas que no contenían cera de candelilla presentaron una mayor resistencia a la fuerza de punción, aunque no se observó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los dos porcentajes de cera de candelilla que se utilizaron (0.2 y 0.4%) (Cuadro 8).

Un comportamiento similar ocurre con la fuerza de tensión, representada en la Figura 8 donde se observa que la cera de candelilla incorporada en la formación de la película ocasionó una disminución significativa ($p \leq 0.05$) de la fuerza de tensión (Cuadro 9 y 10). Esto coincide con el trabajo realizado por Pérez-Gago y Krochta (2001) donde reportan que las propiedades mecánicas se ven afectadas por la adición de lípidos, disminuyendo su resistencia a la tensión y punción. Ellos explican que cuando los lípidos son incorporados en la solución para formar la película, las partículas de lípido dispersas en la matriz proteica cristalizan, haciendo que las películas sean quebradizas y menos flexibles. Además debe considerarse que en este trabajo se uso WPC- 73, el cual contenía 6.1% de lactosa, la cual al formarse la película, también cristaliza, aumentando de esta el efecto que se indica cuando se tiene la presencia de lípidos.

Los resultados obtenidos difieren con los reportados por Tien y col. (2000), donde sus resultados obtenidos para películas de WPC que no contenían cera de candelilla representaron un mayor valor en la fuerza de punción (más del doble del obtenido en este trabajo)

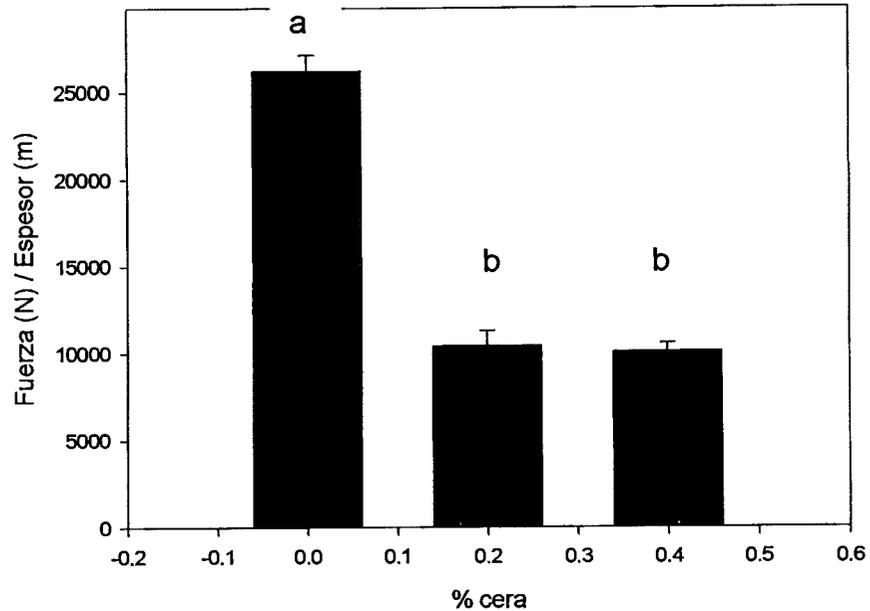


Figura 7. Efecto del porcentaje de cera de candelilla en la fuerza de punción de películas a base de WPC. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$), usando la prueba de comparación de medias de Tuckey.

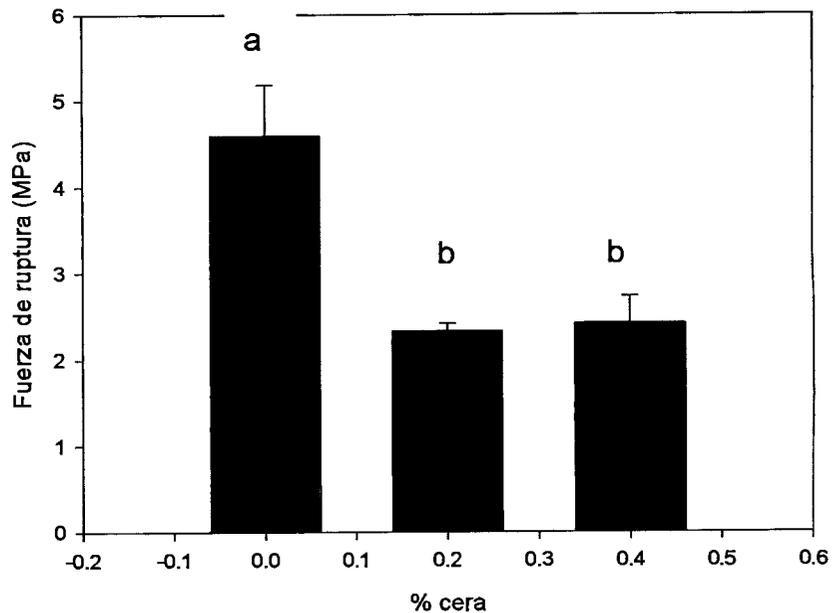


Figura 8. Efecto del porcentaje de cera de candelilla en la fuerza de tensión de películas a base de WPC. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$), usando la prueba de comparación de medias de Tuckey.

Cuadro 7. Análisis de varianza para la prueba de punción.

Fuente	DF (grados de libertad)	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. ratio	Prob. F
Cera	2	511824958	255912479	427.3391	<0.0001
Error	6	3592854	598809		
Total	8	515417812			

Cuadro 8. Comparación de medias de Tuckey-Kramer $p \leq 0.05$, para la prueba de punción.

% Cera	0	0.2	0.4
0	-1939	13881	14231
0.2	13881	-1939	-1589
0.4	14231	-1589	-1939

Valores positivos son significativamente diferentes

Cuadro 9. Análisis de varianza para la prueba de tensión.

Fuente	DF (grados de libertad)	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. ratio	Prob. F
Cera	2	16.333907	8.16695	53.5933	< 0.0001
Error	12	1.828650	0.15239		
Total	14	18.162557			

Cuadro 10. Comparación de medias de Tukey-Kramer $p \leq 0.05$, para la prueba de tensión.

% Cera	0	0.2	0.4
0	-0.6586	1.5090	1.5983
0.2	1.5090	-0.6586	-0.5694
0.4	1.5983	-0.5694	-0.6586

Valores positivos son significativamente diferentes

Sabato y col. (2001) reportan resultados de fuerza de punción para películas de aislado de proteína de suero (WPI) y aislado de proteína de soya (SPI), observando que existió una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre películas elaboradas con SPI (31.53 N/mm) y películas elaboradas con una mezcla de SPI y WPI (28.6 N/mm), siendo mayor la fuerza de punción para las películas elaboradas únicamente con SPI; comparando estos datos con nuestros resultados los valores de punción resultan ser ligeramente mayores que el valor para la película que no contenía cera; aunque mucho mayores (3 veces) para las películas que si contenían cera.

En cuanto a la fuerza de tensión solo se tienen reportes de películas elaboradas con WPI, Pérez-Gago y Krochta (2001) obtuvieron valores del doble a los obtenidos en este trabajo. Janes y col. en el 2001, trabajaron con películas de WPI y SPI, los resultados que obtuvieron para películas de WPI (1.95 MPa) fueron menores que los que se obtuvieron en este trabajo para las películas de WPC, mientras que los resultados de las películas de SPI (8.59 MPa) son mayores (casi el doble) comparando con las películas que no contenían cera.

V.3 Evaluación de las propiedades fisicoquímicas.

V.3.1 Permeabilidad al vapor de agua.

Los resultados de permeabilidad al vapor de agua (PVA) se indican en la Figura 9, donde se observa que existe una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la película que contiene 0.4% de cera de candelilla, con respecto a las películas que contenían 0.2 y 0 % de cera de candelilla (Cuadros 11 y 12). Esto se atribuyó a la naturaleza hidrofílica de la proteína, sin embargo, cuando se incorporan compuestos hidrofóbicos tales como lípidos a la matriz de la película, se puede reducir la permeabilidad al vapor de agua. De esta manera podría evitarse la pérdida de humedad de un alimento empacado usando estas películas.

La PVA de las películas, depende de muchos factores, incluyendo la integridad de la película, la proporción entre zonas amorfas y cristalinas, la proporción hidrofílica - hidrofóbica, etc.. En la emulsión de las películas lípido-proteína, las proteínas pueden actuar como una matriz cohesiva, mientras que los lípidos pueden distribuirse uniformemente como partículas cristalinas separadas, que pueden proveer resistencia a la humedad. La homogeneización utilizada en la formación de la emulsión redujo el tamaño de las gotas de lípido en el intervalo 1–5 μm de acuerdo con el tipo de dispositivo de dispersión usado, favoreciendo la reducción de la permeabilidad al vapor de agua (Mei y Zhao, 2003)

Los valores de permeabilidad al vapor de agua obtenidos en este trabajo son mucho menores a los reportados por Janes y col. (2001); aunque ellos emplearon WPI para la prueba efectuada, los valores reportados son $1.45 \pm 0.05 \text{ gmm/m}^2\text{hkPa}$, lo cual representa más del triple del valor de PVA obtenido en este trabajo para películas sin cera.

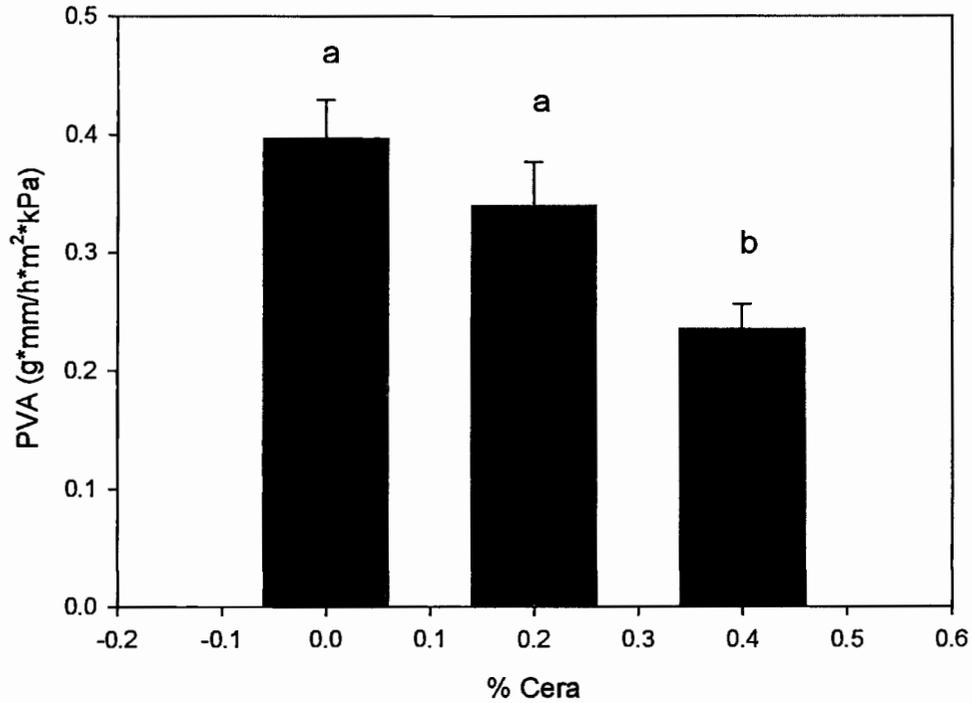


Figura 9. Efecto del porcentaje de cera de candelilla en la permeabilidad al vapor de agua de películas a base de WPC. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$), usando la prueba de comparación de medias de Tuckey.

Cuadro 11. Análisis de varianza para la prueba de permeabilidad al vapor de agua.

Fuente	DF (grados de libertad)	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. ratio	Prob. F
Cera	2	0.00071784	0.000359	20.8027	< 0.0020
Error	6	0.00010352	0.000017		
Total	8	0.00082136			

Cuadro 12. Comparación de medias de Tukey-Kramer $p \leq 0.05$, para la prueba de permeabilidad al vapor de agua.

% Cera	0	0.2	0.4
0	-0.01041	-0.00272	0.01117
0.2	-0.00272	-0.01041	0.00349
0.4	0.01117	0.00349	-0.01041

Valores positivos son significativamente diferentes

En el informe de Tanaka y col. (2001), donde trabajaron con películas comestibles preparadas con proteínas solubles de pescado adicionadas de diferentes porcentajes de lípidos como: ácido láurico, ácido palmítico, aceite de maíz, etc., observaron que al aumentar el porcentaje de cualquiera de estos compuestos hidrofóbicos existía una tendencia a disminuir la permeabilidad al vapor de agua.

En el trabajo realizado por Mei y Zhao en el 2003, utilizan películas de WPI y de caseinato de calcio (CC), ellos obtuvieron valores de permeabilidad mucho más grandes a los obtenidos en este trabajo; para las películas de WPI obtuvieron un valor de 15.013 gmm/m²hkPa y para las de CC 12.602 gmm/m²hkPa, aunque no existe una diferencia significativa entre estos dos ($p \leq 0.05$).

V.3.2 Isotermas de adsorción.

Los resultados del contenido de humedad de las películas en equilibrio con atmósferas a diferentes humedades relativas, ajustados a los modelos BET y GAB para isotermas de adsorción, están representados en las Figuras 10 y 11 respectivamente.

Se puede observar que los datos experimentales se ajustan a ambos modelos BET y GAB en intervalos de 0.112 – 0.536 y 0.112 – 0.840 de actividad de agua, respectivamente.

Los parámetros de las isothermas fueron estimados utilizando el algoritmo de Marquardt – Levenberg (Press y col., 1986; Sigma Plot, 2003) y se observan en el Cuadro 13. En este Cuadro se observa que los valores correspondientes al contenido de humedad en la monocapa (M_0) son menores en el modelo BET que en el GAB. También se observa que en el modelo de BET se tiene el mismo valor de la monocapa en la películas que contenían cera de candelilla.

Esto es importante porque debe puntualizarse que la primer capa de moléculas de sorbato o monocapa es considerada la que tiene mayor fuerza de interacción con los sitios del sorbente que la segunda y las siguientes capas (Wang y Padua, 2004).

El calor de adsorción calculado es mayor para el modelo BET (c) que para el GAB (C y k), lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Wang y Padua (2004).

Wang y Padua (2004), mencionan que los modelos para las isothermas de adsorción se aplican diferentes rangos de actividad de agua (a_w), el modelo BET aplica solo para bajas a_w (0.05–0.45), lo cual representa una limitación en la aplicación de este modelo. El modelo GAB es el más aceptado para realizar las pruebas de isothermas de adsorción en alimentos ya que es un modelo más confiable y se aplica en un mayor rango de a_w (0.10–0.90). Al comparar los resultados de la humedad en la monocapa con los resultados obtenidos por Wang y Padua (2004) para las películas de zeína, se puede observar que son mucho mayores que los obtenidos para las películas de WPC.

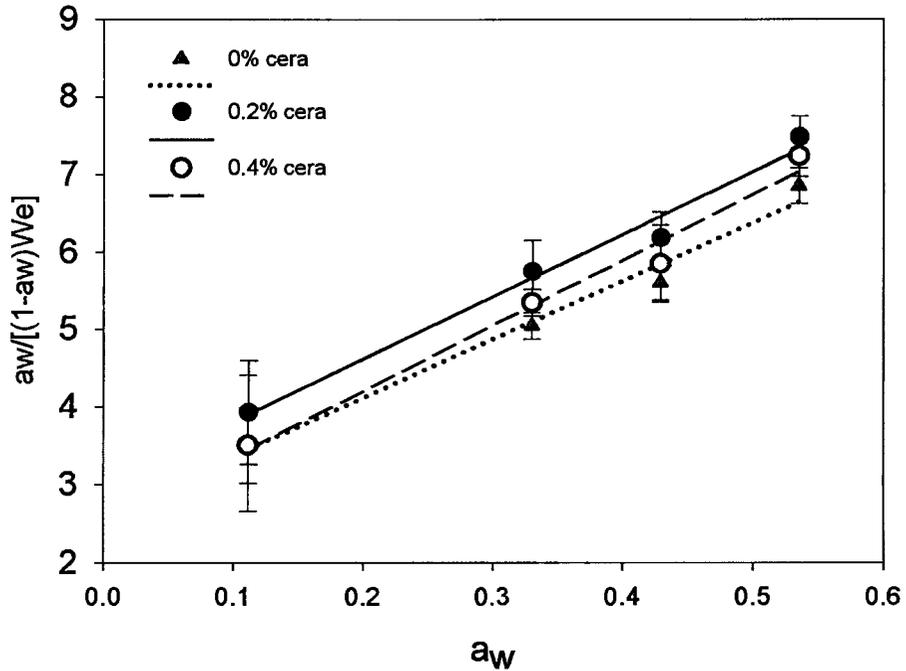


Figura 10. Isothermas de adsorción de películas a base de WPC usando el modelo BET. Las líneas representan el ajuste al modelo BET, y los símbolos representan los datos experimentales

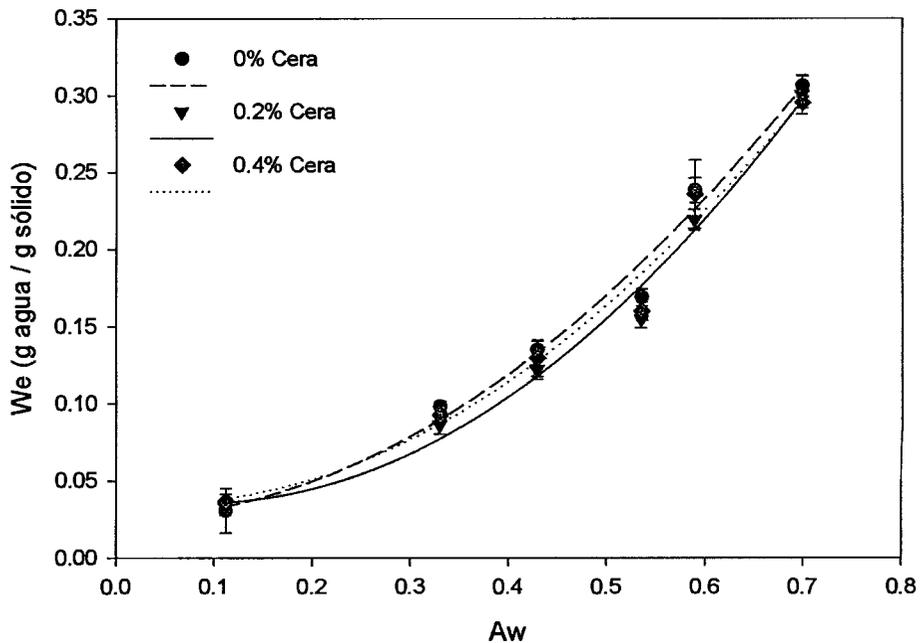


Figura 11. Isothermas de adsorción de películas a base de WPC usando el modelo GAB. Las líneas representan el ajuste al modelo GAB, y los símbolos representan los datos experimentales

Cuadro 13. Parámetros BET y GAB para isothermas de adsorción de películas comestibles de WPC. Valores \pm error estándar.

Modelo	Parámetros	0% Cera	0.2% Cera	0.4% Cera
BET (Rango de A_w : 0.112-0.536)	M_o	0.095 \pm 0.004	0.089 \pm 0.004	0.089 \pm 0.004
	C	4.61 \pm 0.84	4.04 \pm 0.75	4.82 \pm 1.1
	R^2	0.985	0.985	0.977
GAB (Rango de A_w : 0.112-0.840)	M_o	0.133 \pm 0.041	0.106 \pm 0.025	0.144 \pm 0.078
	C	2.38 \pm 1.12	2.46 \pm 1.08	1.99 \pm 1.42
	K	0.929 \pm 0.091	1.00 \pm 0.065	0.900 \pm 0.154
	R^2	0.981	0.984	0.966

M_o = contenido de humedad en la monocapa (g H_2O /g película); c = constante relacionada al calor de sorción; R^2 = coeficiente de determinación; C = constante de Guggenheim; k = parámetro relacionado al calor total de sorción.

La humedad crítica de la película se considera como un cambio drástico en la humedad en equilibrio para cambios pequeños de a_w . Desde este punto de vista la humedad crítica de nuestra película fue mayor a 0.83 de a_w .

De acuerdo con los resultados obtenidos y trabajos reportados en la literatura, la permeabilidad al vapor de agua de nuestra película de WPC adicionada de cera de candelilla resultó ser una de las más bajas, indicando con esto que su uso como material de empaque en alimentos con elevada actividad de agua sería altamente recomendable, ya que evitaría la pérdida de humedad.

Kim y Ustunol (2001b) mencionan que las isothermas de adsorción de humedad representan las propiedades higroscópicas de los componentes individuales, en donde cualquier modificación a la estructura del material puede influir en su isoterma de adsorción. Ellos utilizaron películas que contenían WPI, glicerol y cera de candelilla (1:0.54:0.16) en las cuales los valores obtenidos con el modelo GAB son mayores ($M_0 = 9.24$, $C = 28.39$, $k = 0.99$) a los obtenidos con las películas de WPC.

V.4 Prueba de solubilidad.

Los resultados obtenidos para esta prueba se muestran en el Cuadro 14 donde podemos observar que los valores obtenidos son muy pequeños (menores de 1%). El porcentaje de solubilidad es muy bajo pero esto no está relacionado con la biodegradabilidad de la película.

Esta insolubilidad permitiría conservar durante un mayor tiempo la integridad del alimento empacado, ya que evitaría la pérdida de humedad, conservando su característica de baja permeabilidad a gases y aromas.

Cuadro 14. Porcentaje de solubilización de las diferentes formulaciones con cera de candelilla.

% Cera de candelilla	% Solubilizado
0	1.019
0.2	0.961
0.4	0.994

V.5 Selección de las películas.

Con los resultados obtenidos se hizo la elección de la mejor formulación, para trabajar con la adición de los agentes antimicrobianos. Como no se observó una diferencia significativa en las propiedades mecánicas de las formulaciones que contenían cera de candelilla se tomó en cuenta principalmente la permeabilidad al vapor de agua ya que es una propiedad de barrera muy importante. La formulación elegida para el uso de los agentes antimicrobianos fue la que contenía 10% w/v de WPC, 5% w/v de glicerol y 0.4% w/v de cera de candelilla.

V.6 Actividad contra *Listeria monocytogenes*.

Primero se realizaron pruebas de actividad contra *M. luteus* que se utilizó como microorganismo indicador; la actividad fue de 12,800 UA/ml de solución de película de WPC. La zona de inhibición se observa en la Figura 12.

La inhibición de la *L. monocytogenes* se observa en la Figura 13, la actividad antimicrobiana que fue necesaria para la inhibición de la *L. monocytogenes* fue de 204,800 UA/ml de solución de película de WPC, ya que se probaron diferentes concentraciones como 51,200, 102,400 y 204,800 UA/ml de solución de película el resultado mencionado fue el que causó inhibición.

Las unidades arbitrarias (UA) son definidas como el recíproco de la máxima dilución que presenta inhibición, del microorganismo indicador (*M. Luteus*).

Se puede ver claramente una zona de inhibición alrededor de la película, indicando que esta no solo es efectiva al contacto, sino que existe también una difusión de los agentes antimicrobianos de la matriz de la película hacia el medio. La utilización de agentes antimicrobianos en la película ayudaría a alargar la vida de anaquel de los alimentos, así como también aseguraría la calidad y sanidad de los mismos.

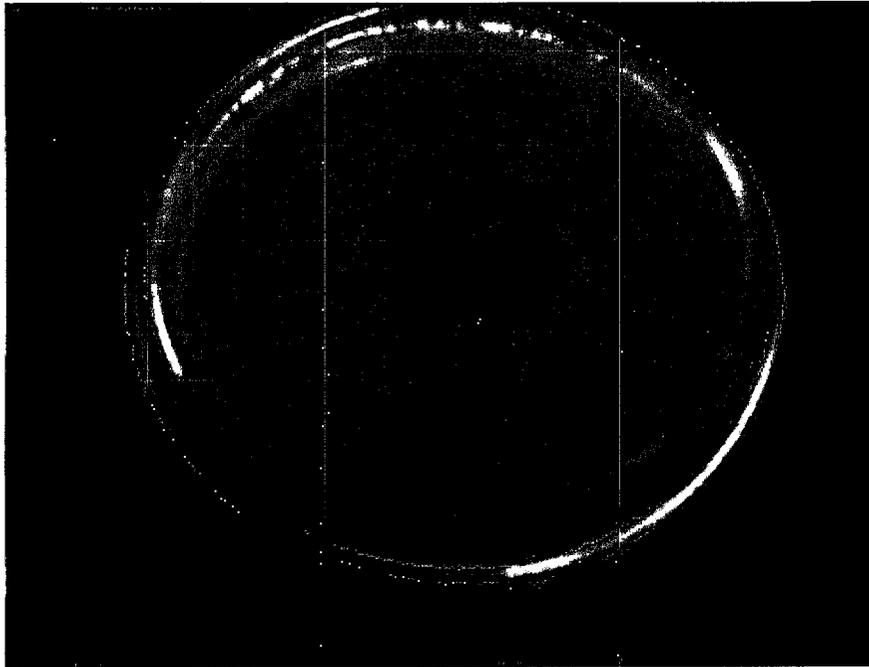


Figura 12. Zona de inhibición de crecimiento del *M. Luteus*, por la película de WPC con el agente antimicrobiano incorporado.

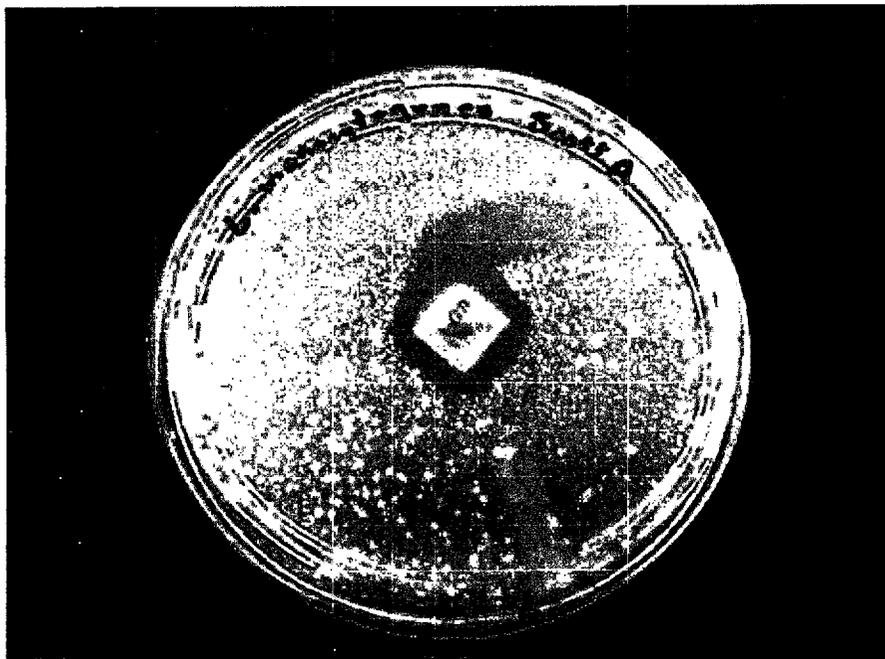


Figura 13. Zona de inhibición de crecimiento del *L. monocytogenes*, por la película de WPC con el agente antimicrobiano incorporado.

Los agentes antimicrobianos empleados fueron los metabolitos producidos durante el crecimiento de las bacterias ácido lácticas (BAL), tales como: peróxido de hidrógeno, acetaldehído, diacetilo, ácidos orgánicos y bacteriocinas, los cuales tienen estatus GRAS. Para este trabajo se empleó *Lactococcus Lactis UQ2*, la cual se inoculó en suero dulce suplementado, dejándose en el bioreactor por doce horas a una temperatura constante (30 °C). Una vez terminada la fermentación se obtuvo un extracto libre de células que se secó en un secador por aspersion (BÜCHI Mini Spray Drier B-191), para la obtención de estos agentes antimicrobianos en polvo.

VI. CONCLUSIONES.

Se logró establecer un procedimiento para elaborar material de empaque a base de concentrado de proteína de suero (WPC).

Con la adición de cera de candelilla las propiedades mecánicas y la permeabilidad al vapor de agua disminuyeron en las películas de empaque a base de WPC. La disminución en las propiedades mecánicas se atribuyó a la cristalización de los lípidos, mientras que la disminución en la permeabilidad al vapor de agua se debió a que los lípidos son compuestos hidrofóbicos que evitan la difusión del agua.

Los datos experimentales se ajustaron a los modelos para isothermas de BET y GAB en los intervalos de 0.112-0.536 y 0.112-0.840 de actividad de agua respectivamente. Las isothermas de adsorción pueden ser usadas para conocer el comportamiento de la película de WPC, dependiendo del tipo de alimento en el que puede ser aplicada.

Se logró incorporar los agentes antimicrobianos producidos por *L. lactis* UQ2 a la película, logrando que se conservara la actividad antimicrobiana. La dosis de 204,800 UA/ml de solución de película inhibió el patógeno de alimentos *L. monocytogenes* por difusión a través del medio. Esto permitiría garantizar alimentos más seguros y con una mayor vida de anaquel.

La utilización de los empaques activos no solo esta enfocada a mantener la calidad y seguridad de los alimentos, sino que también es una alternativa para disminuir la contaminación ambiental, ya que este tipo de empaques son biodegradables y comestibles.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

Anderson, R.B. 1946. Modifications of the Brunauer, Emmett and Teller equation. *J. Am. Chem. Soc. Vol: 68: 686-691.*

ASTM (Am Society for Testing and Materials).1983. D 882-83 Standard Methods for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. American Society for Testing and Materials, Philadelphia: 226-233.

ASTM (Am Society for Testing and Materials).1995. E 96-95 Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. In Annual Book of American Society for Testing Methods, Philadelphia.

Branen, A. L.. 1993. Introduction to use of antimicrobials. In: Antimicrobials in Foods. Davidson. P. M. and Branen, A. L. (eds), Marcel Dekker, New York: 1-9.

Brunauer, S., Emmett P.H., Teller, E. 1938. Adsorption of gases in multimolecular layers. *J. Am. Chem. Soc. Vol: 60: 309-319.*

Cagri, A., Ustunol, Z., Osburn, W., Ryser E. 2003. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on hot dogs using antimicrobial whey protein-based edible casing. *J. Food Sci.: Vol. 68: 291-299.*

Cintas, L., Casaus, M., Herranz, C., Nes, I. Hernández, P.. 2001. Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Tech. Int.: Vol. 7: 281-305.*

Cleveland, J., Montville, T., Nes, I., Chikindas, M.. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol : Vol. 71: 1-20.*

Cuozzo, S., Castellano, P., Sesma, F., Vignolo G., Raya, R.. 2003. Differential roles of the two-component peptides of lactocin 705 in antimicrobial activity. *Curr. Microbiol.:* Vol. 46: 180-183.

Doley, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J.. 2001. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. 2da. Ed. ASM Press. Washington, D.C.: 565-578.

Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A.. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.:* Vol. 24: 85-106.

Farkas, J.. 1997. Physical methods of food preservation. En: Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. Doyle, M.P., Beuchat, L.R. y Montville, T.J., (eds) ASM Press. USA: 497-519.

Feord J. 2002. Lactic acid bacteria in a changing legislative environment. *Antonie van Leeuwenhoek.:* Vol.82:353-360.

Gasson, M.J.. 1993. Plasmid complement of *Streptococcus lactis* NCDO712 and other lactic *Streptococc* after protoplast-induced curring. *J. Bacteriol.:* Vol. 154: 1-9.

Giraffa, G., Picchioni, N., Neviani, E., Carminati, D. 1995. Production and stability of an *Enterococcus faecium* bacteriocin during taleggio cheesemaking and ripening. *Food Microbiol. :* Vol. 12: 301-307.

Goulhem, F., Meghours, J., Lacroix, C.. 1999. Production of a nisin 2 / pediocin mixture by pH-controlled mixed-strain batch cultures in supplemented whey permeate. *J. Appl. Microbiol.:* Vol. 86: 399-406.

Han, J.H.. 2001. Edible and Biodegradable Films/Coatings Carrying Biactive Agents. Department of Food Science at the University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada.

Harper. 2000. Biological properties of whey components. A review. The American Dairy Products Institute. New York: 5.

Hechard, Y., Shall, H.. 2002. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochemie.*: Vol. 84: 545-557.

Janes,M.E., Ko, S., Hettiarachchy, N.S., Johnson, M.G.. 2001. Physical and chemical properties of edible films containing nisin and their action against *Listeria monocytogenes*. *J. Food. Sci.*: Vol. 66: 1006-1011.

Jay, J.M.. 2000. Modern Food Microbiology. 6ta. Ed., Aspen. Gaithersburg, Maryland:114-118, 501.

Kailasapathy, K., Chin, J.. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunol Cell Biol.* Vol. 78: 80-88.

Kester, J. J., Fennema, O. R. 1986. Edible Films And Coatings: A Review. *Food Technol.*: Vol. 6: 47-56.

Kim, S-J., Ustunol, Z. 2001a. Thermal properties, heat sealability and seal attributes of whey protein isolate / lipid emulsion edible films. *J. Food Sci.*: Vol. 66: 985-989.

Kim, S-J., Ustunol, Z. 2001b. Solubility and moisture sorption isotherms of whey protein-based edible films as influenced by lipid and plasticizer incorporation. *J. Agric. Food Chem.:* Vol. 49: 4388-4391.

Krochta, J. M., DeMulder-Johnston, C.. 1997. Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. *Food Technol.:* Vol. 2: 59-62.

Lin, S.Y., Krochta, J.M.. 2003. Plasticizer effect on grease barrier and color properties of whey-protein coatings on paperboard. *J. Food Sci.:* Vol. 68: 229.

McAuliffe, O., Ross, R.P., Hill, C.. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol Rev.:* Vol. 25: 285-308.

Mei, Y., Zhao, Y. 2003. Barrier and Mechanical Properties of Milk Protein-Based Edible Films Containing Nutraceuticals. *J. Agric. Food Chem.:* Vol. 51: 1914-1918.

Moro, A., Gatti, C., Delorenzi, N.. 2001. Hydrophobicity of whey protein concentrates measured by fluorescence quenching and its relation with surface functional properties. *J. Agric. Food Chem.:* Vol. 40: 4784-4789.

Nes, I., Holo, H.. 2000. Class II Antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers.:* Vol. 55: 50-61.

O'Sullivan, L., Ross, R.P., Hill, C.. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie.:* Vol. 84: 593-604.

Palazolo, G., Rodríguez, F., Farruggia, B., Picó, G., Delorenzi, N.. 2000. Heat treatment of β -Lactoglobulin: Structural changes studied by partitioning and fluorescence. *J. Agrc. Chem.:* Vol. 48: 3817-3822.

PAOT Procuraduría Ambiental y del Ordenamiento Territorial del D.F. 2003. www.paot.org.mx/centro/publi-ext/pet/06plasticos.html.

Pérez-Gago, M.B., Krochta, J.M..2001. Lipid particle size effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein beeswax emulsion films. *J. Agric. Food Chem.:* Vol. 49: 996-1002.

Press, W.H., Flannery, B.P., Teukolsky, S.A., Vetterling, W.T. 1986. Numerical Recipes. Cambridge University Press. Cambridge. 45-55.

Ryser, E.T., Marth, E.H.. 1991. Listeria, Listeriosis and Food Safety. Marcel Dekker, New York: 1-16, 45-65.

Sabato, S. F., Outtara, B., Yu, H., D'Aprano, G., Le Tien, C., Mateescu, M. A., Lacroix, M.. 2001. Mechanical and barrier properties of cross-linked soy whey protein based films. *J. Agric. Food Chem.:* Vol: 49: 1397-1403.

Sigma Plot Versión 8.0. 2003. Software para elaboración de graficas office XP. Jandel Scientific Co. San Francisco. QSA.

Tanaka, M., Ishizaki, S., Suzuki, T., Takai, R. 2001. Water vapor permeability of edible films prepared from fish water soluble proteins as affected by lipid type. *J. Tokyo University of Fisheries.:* Vol. 87: 31-37.

Tien, C.L., Letendre, M., Ispas-Szabo, P., Mateescu, M.A., Delmas-Patterson, G., Yu, H.L., Lacroix, M.. 2000. Development of biodegradable films from whey proteins by cross-linking and entrapment in cellulose. *J. Agric. Food Chem.:* Vol. 48: 5566-5575.

Twomey, D., Ross, R.P., Ryan, M., Meaney, B., Hill, C.. 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek.:* Vol. 82: 165-195.

USDA Specifications for Dry Whey Protein Concentrate. 2003.
http://www.ams.usda.gov/dairy/dry_whey_prot_conc.pdf

Wang, Y., Padua, G.W..2004. Water sorption of extruded zein films. *Agric. Food Chem.:* Vol. 52: 3100-3105.

www.ehpnetl.niehs.nih.gov, 2003.