



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
Maestría en Ciencia y Tecnología de
Alimentos

“Desarrollo y caracterización de nanofibras electroestiradas de proteína de amaranto y pululano cargadas con dos bacteriocinas: nisina A y pediocina PA-1”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos

PRESENTA

Q. en A. KAREN MAGALY SOTO MARTÍNEZ

DIRIGIDA POR

Dra. Sandra O. Mendoza Díaz

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2014



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Desarrollo y caracterización de nanofibras electroestiradas de proteína de amaranto y pululano cargadas con dos bacteriocinas: nisina A y pediocina PA-1”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

Q. en A. Karen Magaly Soto Martínez

Dirigido por:

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz
Presidente

Firma

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Secretario

Firma

Dr. Gabriel Luna Bárcenas
Vocal

Firma

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Suplente

Firma

Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa
Suplente

Firma

M.S.P. Sergio Pacheco Hernández Director de
la Facultad

Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario

Querétaro, Qro.
Septiembre 2014

México

RESUMEN

En la actualidad, el desarrollo de nanofibras ha tenido gran auge, debido a los diferentes campos en que pueden ser empleadas, desde la industria textil, hasta la industria biomédica. Sin embargo, en el área de alimentos, son pocos los estudios que se han realizado en esta área y se encaminan a la utilización de compuestos de origen natural y comestible, como la proteína de amaranto. En la industria alimentaria, las nanofibras pueden ser de gran utilidad para la encapsulación de activos que sean sensibles al pH o que interaccionen con componentes del alimento y disminuyan su actividad biológica. En este proyecto, se incorporaron en nanofibras de amaranto y pululano, dos bacteriocinas (pediocina y nisina), que son péptidos de amplio espectro antimicrobiano usados en la inactivación de microorganismos patógenos y deterioradores en diversos alimentos. Se obtuvieron nanofibras a partir de la mezcla 50:50 Aislado proteico de amaranto (APA)-Pululano (PUL) y diferentes concentraciones de bacteriocinas. Las micrografías de las fibras obtenidas con y sin activo, revelan que se obtuvieron fibras lisas y continuas, sin defectos en todas las mezclas, presentando diámetros entre 300 y 200 nm, el tamaño de las fibras fue proporcional a la disminución de la conductividad eléctrica y la viscosidad de las mezclas utilizadas para el proceso de electroestirado. Los resultados de FTIR indican la miscibilidad del aislado proteico de amaranto y el pululano para la formación de nanofibras, interaccionando a través de enlaces de hidrógeno. El proceso de electroestirado mejoró las propiedades térmicas de las mezclas, desplazando los picos de T_m a temperaturas mayores (180 °C). La actividad antimicrobiana de los compuestos no se afectó por el proceso de electroestirado, la cual depende únicamente de la concentración de activos y la eficiencia de encapsulación.

Palabras clave: nanofibras, electroestirado, amaranto, bacteriocinas, nisina A, pediocina PA-1.

ABSTRACT

In recent years, the development of nanofibers has been of great interest since they can be employed in textile and biomedical industries. However in the food área, few studies have been conducted and directed to the use of compounds of natural origin and edible, like amaranth protein. In the food industry the nanofibers can be used for encapsulation of active compounds, which are sensitive to pH or interact with food components reducing its biological activity. The aim of this work was to incorporate bacteriocins (nisin and pediocin) in to electrospun nanofibers of amaranth and pullulan 50:50 loaded with different concentrations of bacteriocins. For all the tested samples, the micrographs exhibit smooth and continuous fibers whit any defects with diameters between 200 and 300 nm. The diameter increases as the electrical conductivity and viscosity values of solution decrease. FTIR analysis shows miscibility for amaranth protein isolate and pullulan to form nanofibers interacting by hydrogen bonding. Electrospinning process improved thermal properties of the mixture displacing T_m peak at higher temperatures (180°C). The antimicrobial activity of the compounds is not affected by electrospinning process and its dependent of the concentration of active compounds as well as the encapsulation efficiency.

Key words: electrospinning, nanofibers, amaranth, bacteriocins, nisin A, pediocin PA-1.

*Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa
(Mahatma Gandhi).*

Dedicado a todos las personas especiales en mi vida, quienes han estado en cada paso, en cada caída y en cada triunfo, gracias por permanecer.

Agradecimientos

A Dios

Gracias por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de tu infinita bondad, amor y esperanza para no dejarme caer.

A mis padres

No me alcanzaría la vida para agradecerles lo mucho que me han enseñado y me han brindado, gracias por apoyarme en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor y comprensión, mi cariño es infinito para ustedes.

A mis hermanos

A mis hermanas Lupe y Leslie que siempre han estado a mi lado para apoyarme y brindarme su amistad y cariño, a Paty un angelito en el cielo que me cuida y me alienta en momentos de dificultad, a mi hermano Carlos por su cariño y apoyo, todos están en mi pensamiento y oraciones. Gracias a Bombi que aunque no podrás leerlo eres quien siempre me escucha y mi mas grande confidente.

A mis sobrinos

Dani y Aixa por ser tan buenos conmigo y apoyarme ser mas que familia también amigos, a Karla y Pepe que aunque son pequeños se que serán grandes personas, los quiero mucho y siempre podrán contar conmigo en cualquier momento, en mi no solo encontraran a una tía, si no también a una amiga y confidente.

A el amor

Gracias Jairi por ser incondicional en las buenas y en las malas, por ser parte de mi vida y compartir alegrías y tristezas, en verdad no tengo como agradecerle lo bueno y lindo que has sido conmigo, esto es solo una parte de lo mucho que compartiremos, tan solo gracias por existir.

A mis amigos

En la vida siempre se encontraran personas que llegan para quedarse y formar la familia que elegimos, esos son ustedes, amiguitas Diana, Kari, Adri, Sara, Brendita, años de amistad y seguiremos juntas, Angie y Bren gracias por ser mis amigas aunque tomemos caminos diferentes siempre estaremos unidas, a todos mis compañeros de maestría, gracias por hacer tan divertida esta etapa de mi vida. Gracias también a Adriana, eres una gran persona y un gran apoyo y a mis compañeras de laboratorio con las que compartí momentos de desesperación y también de relajación. A Juani que aunque te me adelantaste se que serás siempre un angelito mas en el cielo que me cuide y me proteja. Los quiero mucho.

Dra. Sandra

En especial deseo agradecer a la persona que hizo posible la realización de este proyecto, a usted doctora por ser mi guía durante la maestría, por apoyarme y ser tan comprensiva, gracias por compartirme sus conocimientos y ahora aceptarme en el doctorado, prometo no fallarle.

Sinodales

Gracias por tomarse el tiempo de revisar mi tesis, compartir sus conocimientos y por formar parte de este proceso de crecimiento en mi

vida, gracias también por sus consejos, a ustedes Dra. Loarca, Dra. Monserrat, Dr. Luna y Dr. Aldapa que ha estado conmigo desde la licenciatura en verdad gracias.

Finalmente agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado durante mis estudios de maestría.

Con mucho cariño
Magaly

Índice

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
Agradecimientos.....	iv
Índice	2
Índice de figuras	4
Índice de cuadros	6
1 INTRODUCCIÓN	7
2 MARCO TEÓRICO	9
2.1 Electroestirado	9
2.2 Proceso de electroestirado	9
2.2.1 Descripción general del proceso	9
2.2.2 Equipo.....	10
2.2.3 Variables del proceso	12
2.3 Aplicaciones de nanofibras	13
2.4 Amaranto	14
2.4.1 Propiedades del amaranto.....	15
2.4.2 Proteína de amaranto	15
2.4.3 Proteínas de reserva	16
2.5 Pululano	18
2.6 Bacteriocinas	18
2.6.1 Clasificación de bacteriocinas	19
2.6.2 Uso de bacteriocinas en alimentos.....	21
2.6.3 Nisina.....	22
2.6.4 Pediocina PA-1	23

3	Hipótesis	26
4	Justificación.....	27
5	Objetivos	28
5.1	Objetivo general	28
5.2	Objetivos específicos.....	28
6	Metodología	29
6.1	Materiales	29
6.2	Cepas.....	29
6.3	Métodos.....	29
6.3.1	Preparación del aislado proteico	29
6.3.2	Preparación de las soluciones poliméricas con la adición de activos. .	30
6.3.3	Caracterización física de las soluciones.....	30
6.3.4	Proceso de electroestirado.....	30
6.3.5	Caracterización fisicoquímica de nanofibras	31
6.3.5.1.	Espectroscopia infrarroja con Reflectancia Difusa	31
6.3.5.2.	Microscopia electrónica de barrido	31
6.3.5.3.	Calorimetría diferencial de barrido.....	31
6.3.5.4.	Marcaje fluorescente de los péptidos antimicrobianos y proteína de amaranto	32
6.4	Eficiencia de encapsulación.....	32
6.5	Pruebas microbiológicas.....	33
6.5.1	Prueba de antagonismo.....	33
6.5.1.1.	Lavado de cepas.....	33
6.5.1.2.	Difusión en placa	33
6.6	Análisis estadístico	34
7	Resultados	35
7.1	Caracterización física de soluciones APA:PUL.....	35
7.2	Marcaje fluorescente de péptidos antimicrobianos.....	38
7.3	Espectroscopia de Infrarrojo con Reflectancia Dispersa (FTIR-DRIFTS).....	39

7.1	Calorimetría diferencial de barrido	44
7.2	Eficiencia de encapsulación.....	46
7.3	Análisis microbiológico	47
8	Conclusiones	51
9	Bibliografía	52

Índice de figuras

Figura		Pág.
1	Conos de Taylor formados por una solución de agua recubierta por una funda delgada de aceite de oliva (A) y por una envoltura gruesa de aceite de oliva (B).	10
2	Ensamble del sistema de electrospinning.	11
3	Estructura química del pululano.	18
4	Mecanismo de acción de las bacteriocinas de tipo II. A) disipación de la fuerza motriz de protones compuesta por potencial de membrana ($\Delta\varphi$) y el gradiente de pH (ΔpH) b) modelo propuesto de la muerte celular por la formación de poros mediante bacteriocinas.	24
5	Imágenes de microscopía electrónica de barrido de fibras 50:50 amaranto-pululano, cargadas con a) Mezcla A (50:50), b) mezcla B (50:50:1), c) mezcla C (50:50:3), d) mezcla D (50:50:10), e) mezcla E (50:50:20) y f) diámetros de nanofibras por mezcla (prueba de Dunnet P 0.5%).	37
6	Imágenes de microscopía de fluorescencia de fibras electroestiradas de la mezcla 50:50 amaranto-pululano cargadas con el complejo, a) FTIC-Nisina, b) RIBTC-pediocina y microscopia óptica con aumento 63X, c) FTIC-Nisina, d) RIBTC-pediocina.	39
7	Vibraciones fundamentales del grupo peptídico. Bandas Amida I y II.	40

- 8** Espectro FTIR de Reflectancia difusa del Aislado Proteico de 40
Amaranto, donde se representan las bandas características de
un espectro proteico.
- 9** Espectro FTIR las fibras obtenidas, a) aislado proteico de 42
amaranto, b) Pululano, y c) Mezcla 50:50 APA-PUL.
- 10** Espectro FTIR de los productos electroestirados, a) 50:50 APA- 43
PUL pediocina 1 μ g/mL, b) 50:50 APA-PUL pediocina 6 μ g/mL, c)
Mezcla 50:50 APA-PUL, d) 50:50 APA-PUL nisina 10 mg/mL, y e)
50:50 APA-PUL nisina 10 mg/mL
- 11** Termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido 45
de, a) APA, b) Pululano, y c) Mezcla A.
- 12** Actividad antimicrobiana de las diferentes fibras obtenidas en el 50
proceso de electroestirado, contra *Leuconostoc mesenteroides*,
a) pediocina 1 mg/mL, b) nisina 5 mg/mL; y *Lactobacillus sakei*, c)
pediocina 1 mg/mL, y d) nisina 10 mg/mL

Índice de cuadros

Cuadro		Pág.
1	Contenido de aminoácidos del grano de amaranto (fracción molar).	17
2	Clases y bacteriocinas representativas de cada grupo.	20
3	Aplicación de bacteriocinas en alimentos.	22
4	Contenido de bacteriocinas de las mezclas 50:50 APA-PUL.	30
5	Caracterización física de las soluciones y diámetro medio de las fibras obtenidas por el método de electroestirado.	36
6	Propiedades térmicas de los polímeros y de las fibras electroestiradas.	45
7	Eficiencias de encapsulación de las diferentes mezclas electroestiradas.	46
8	Diámetros de los halos de inhibición de las fibras cargadas con bacteriocinas y los compuestos puros.	49
9	Abreviaturas	63

1 INTRODUCCIÓN

Una de las principales funciones de las empresas de alimentos es ofrecer alimentos procesados bajo la primicia de brindar una mayor calidad a los consumidores. Para elaborar productos inocuos, se han desarrollado técnicas de conservación que eviten la propagación de los microorganismos patógenos relacionados con las enfermedades transmitidas por alimentos. La utilización de aditivos antagonistas como conservadores con propiedades antimicrobianas ha sido la manera más aceptada para prolongar la inocuidad y calidad de alimentos, bebidas y productos procesados.

Existen diferentes conservadores comerciales que han sido aprobados para su uso en alimentos, entre ellos se encuentran las bacteriocinas: nisina y pediocina. Las bacteriocinas son polipéptidos capaces de inhibir el desarrollo de bacterias taxonómicamente similares a aquéllas que las producen. En particular, las bacteriocinas producidas por Bacterias Ácido Lácticas (BAL) son de mayor interés en la conservación de alimentos debido a que presentan propiedades antimicrobianas, tienen alta especificidad inhibitoria contra cepas de la misma especie y son rápidamente digeridas por las proteasas en el tracto digestivo humano, por lo que se inactivan sin llegar a formar compuestos secundarios (Chen and Hoover, 2003).

Los compuestos activos difícilmente son incorporados en su forma pura, debido a que sufren diversas modificaciones que inducen la pérdida de la actividad biológica, sin embargo, pueden estar encapsulados en matrices que aseguren su estabilidad y sean sistemas de liberación controlada. Se ha demostrado que las nanofibras obtenidas por la técnica de electroestirado, son un buen sistema de liberación para péptidos y antioxidantes.

El electroestirado es un proceso simple y directo, que implica la aplicación de un campo eléctrico, para expulsar continuamente la solución de un polímero de la aguja de una jeringa hacia un colector a tierra. Como resultado se forman fibras

ultrafinas, en la escala de micrómetros o nanómetros, que se recogen como una malla no tejida o membrana en la placa del colector. La fibra obtenida tiene propiedades tales, como gran área superficial y alta porosidad, que son deseables para un portador, para la entrega de fármacos u otros agentes terapéuticos (Neo *et al.*, 2013). Se han realizado diferentes estudios sobre la fabricación de fibras de diferentes polímeros, como el óxido de polietileno, celulosa, quitosano, etc. En los últimos años, se han desarrollado estudios para evaluar el potencial para formar fibras de polímeros de fuentes naturales, como la zeína y las proteínas de amaranto (Neo *et al.*, 2013; Homayoni *et al.*, 2009; Jia *et al.*, 2011).

El amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*), es una planta tradicional mexicana, que posee granos y hojas de alto valor nutricional. Sin embargo, es considerado como un cultivo subutilizado. El amaranto se ha convertido recientemente, en un foco de interés por su alto valor nutritivo y gran potencial como alimento funcional, principalmente los aislados de proteína. En 2011, Aceituno *et al.*, demostraron que un concentrado proteico de amaranto puede ser utilizado para la formación de fibras, cuando es mezclado con otros polímeros como el pululano.

En este proyecto se formularon nanofibras cargadas con compuestos que presentan propiedades antimicrobianas, tal es el caso de la nisina y pediocina, teniendo como objetivo evitar o disminuir su degradación al encontrarse en diferentes matrices alimentarias. Las nanofibras se obtuvieron por la técnica de electroestirado, a partir de proteína de amaranto, mezclada con un polisacárido (pululano) y se realizó la caracterización fisicoquímica, así como la evaluación de la actividad antimicrobiana.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Electroestirado

El electroestirado, es uno de los procesos más sencillos y versátiles para la producción de nanofibras de polímeros sintéticos o naturales, con diámetros en la escala nanométrica y/o micrométrica (Okutan *et al.*, 2014). Esta técnica utiliza la acción de un campo eléctrico externo aplicado a la solución del polímero. La morfología y el diámetro de las nanofibras, dependen de una serie de parámetros, entre los que se encuentran: las propiedades y composición de la solución, el tipo de polímero utilizado, la viscosidad, conductividad y polaridad de la solución, así como la tensión superficial del disolvente (Ignatova *et al.*, 2007).

2.2 Proceso de electroestirado

2.2.1 Descripción general del proceso

El proceso de electroestirado consta de diferentes etapas, entre las que se puede mencionar el bombeo de la solución polimérica al electrodo (aguja), hasta la etapa final de recolección de fibras. El principio básico de electroestirado, consiste en aplicar una diferencia de potencial a una solución polimérica, para superar la tensión superficial del polímero y alcanzar un potencial crítico, capaz de perturbar el equilibrio de la gota en la punta del capilar y que ésta adquiera una forma cónica denominada cono de Taylor (Figura 1) (Subbiah *et al.*, 2005; Moreno, 2010; Rogina, 2014).

Cuando el potencial aplicado alcanza el valor crítico, requerido para superar la tensión superficial del líquido, éste sufre un movimiento caótico o inestabilidad de flexión, un chorro de líquido es expulsado y el campo se dirige hacia el colector cargado de forma negativa, que recoge las fibras. Como el chorro viaja a través de la atmósfera, el solvente se evapora, dejando detrás una fibra seca en el

dispositivo de recolección. En las soluciones de baja viscosidad y poco entrelazamiento de las cadenas del polímero, el chorro se rompe en gotitas, mientras que para soluciones de alta viscosidad, se desplaza hacia el colector en forma de fibras con diámetros entre 50 nm y 10 μm (Gamboa *et al.*, 2007; Subbiah *et al.*, 2005; Kong and Ziegler, 2014).

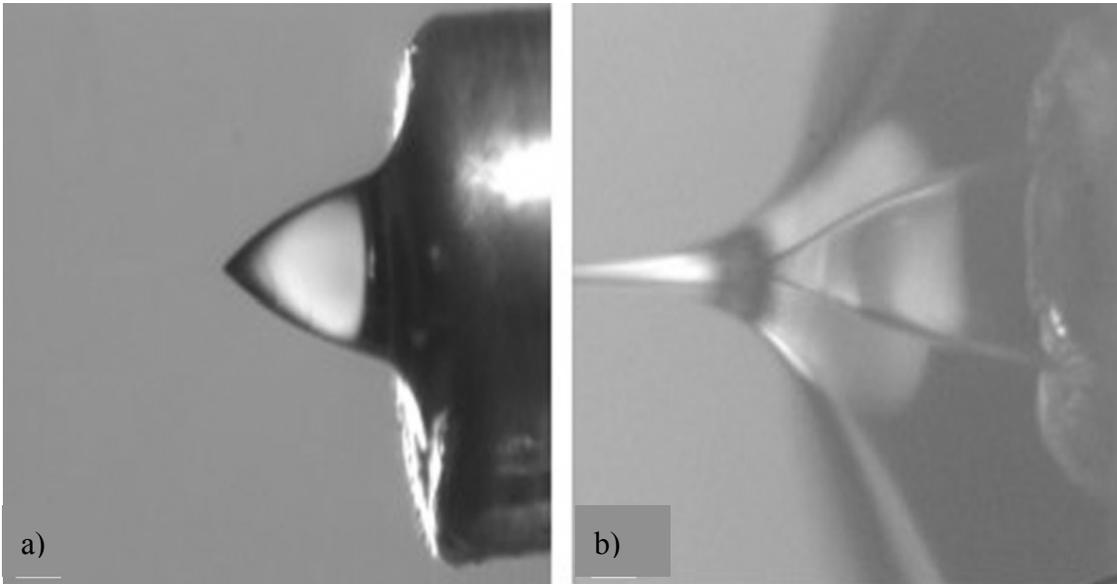


Figura 1. Conos de Taylor formados por una solución de agua recubierta por una funda delgada de aceite de oliva (A) y por una envoltura gruesa de aceite de oliva (B) (Thompson *et al.*, 2007).

2.2.2 Equipo

El equipo básico de electroestirado se compone de cuatro componentes (Figura 2): 1) Un reservorio de solución o material fundido que se conecta a un tubo capilar (aguja de diámetro interno del orden de los 400 μm a 800 μm), 2) una bomba de infusión conectada a una jeringa, que permite suministrar un flujo constante y determinado, 3) una fuente de alto voltaje y 4) una placa metálica

conectada a tierra para coleccionar el material electrohilado (Caracciolo *et al.*, 2008; Rogina, 2014).

La técnica puede ser desarrollada de forma horizontal o vertical de acuerdo a los requerimientos deseados. El principal inconveniente al trabajar en posición vertical, es la posible salida de gotas de la solución desde el capilar hacia el plato colector, las cuales pueden caer sobre las fibras depositadas, haciendo defectuosa la superficie de las mismas e interrumpiendo el proceso. Para impulsar la solución a través del capilar, puede utilizarse una bomba de infusión; si se trabaja de forma horizontal, se utiliza un cono tipo capilar, la salida de la solución puede estar determinada por la fuerza de gravedad y está ligada a la viscosidad de la solución (Duque, 2013).

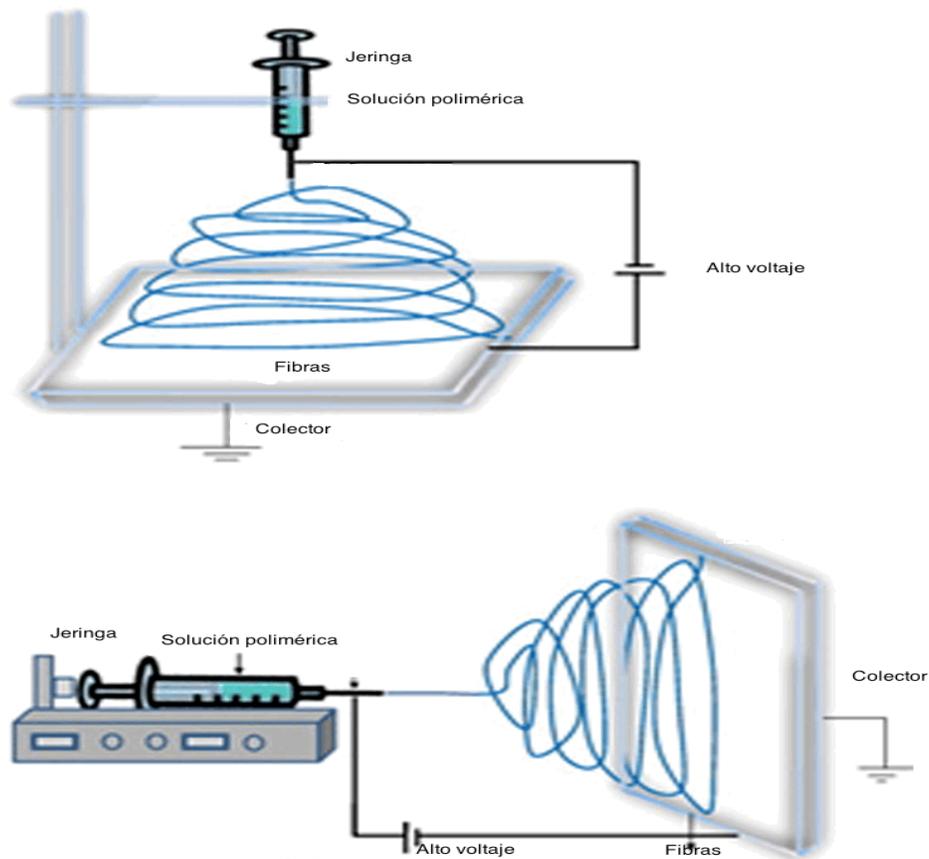


Figura 2. Ensamble del sistema de electroestirado (Rogina, 2014).

2.2.3 Variables del proceso

Las nanofibras electroestiradas exhiben características interesantes, tales como alta porosidad, gran área superficial por unidad de masa, alta permeabilidad a gases y tamaño de poro pequeño (Saeed y Park, 2010). Estas características pueden verse afectadas por diferentes factores, tanto de la solución (concentración, viscosidad, conductividad eléctrica, tensión superficial y propiedades dieléctricas), como del proceso (campo eléctrico, velocidad de flujo, distancia a la placa colectora) y de parámetros ambientales como la humedad y la temperatura (Thompson *et al.*, 2007; Okutan *et al.*, 2014).

La concentración de polímero en una solución determina si puede formar nanofibras y tiene un efecto importante en la morfología de las mismas. Se requiere una concentración óptima para evitar que el jet colapse y forme gotas antes de que el solvente se evapore, teniendo como consecuencia la formación de defectos denominados perlas (Frenot and Loannis, 2003; Bhardwaj and Kundu, 2010). Generalmente, un aumento de la concentración de la solución, aumenta el diámetro de la fibra y su uniformidad (Deitzel *et al.*, 2001).

Ziani *et al.*, 2011, evaluaron el efecto de un tensoactivo no catiónico (Tween 20) y la acidez en la formación de nanofibras de quitosano y óxido de polietileno. Demostraron que la presencia del tensoactivo ayuda a formar fibras lisas, ya que disminuye la tensión superficial de la solución, también observaron que a medida que la acidez disminuía, se comenzaban a formar perlas, en el estudio encontraron que la mejor concentración de ácido acético fue de 90 % v/v.

Homayoni *et al.*, en 2009, demostraron que la viscosidad y concentración del disolvente (ácido acético) en soluciones de quitosano, afectaba la creación de nanofibras de este material. Los mejores resultados los obtuvieron al poner concentraciones de 70-90 % del disolvente. En 2007, Thompson *et al.*, evaluaron cinco parámetros (densidad de carga volumétrica, la distancia desde la boquilla al colector, radio del orificio de la aguja, el tiempo de relajación y la viscosidad) sobre

el radio de las nanofibras. Se encontró que estos parámetros tienen un efecto importante en el radio de las nanofibras. Otros parámetros como la concentración del polímero, densidad de la solución, potencial eléctrico, la frecuencia de la perturbación y la presión de vapor del disolvente, tienen efectos moderados sobre el radio de las fibras, mientras que los parámetros de humedad relativa, tensión superficial y difusividad de vapor, tienen efectos menores sobre el radio.

2.3 Aplicaciones de nanofibras

En el área de medicina se han realizado diversos estudios sobre la producción de nanofibras con diversos antibióticos, como el publicado por Sohrabi *et al.*, en 2013, quienes evaluaron el mecanismo de liberación de ampicilina de fibras elaboradas con poli-metil-acrilato y nylon, evaluando su capacidad antimicrobiana, para usarlos como sistemas de liberación controlada, cuando se encuentran en contacto directo con la zona afectada.

Nanofibras de diversos materiales han sido utilizadas en muchos campos, desde la industria textil, hasta el área médica. Sin embargo, en el área de alimentos han sido pocos los usos que se les ha dado, debido principalmente que hasta el momento solo se han empleado componentes de origen sintético para su obtención y no de grado alimenticio, por lo que en los últimos años se ha buscado la utilización de polímeros que sean naturales y puedan utilizarse en esta área, entre ellos se encuentra el uso de proteínas, como las de amaranto y de maíz (Nieuwland *et al.*, 2014; Aceituno *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2014).

En la industria alimentaria se está incursionando en probar polímeros naturales como zeína, usada para encapsular ácido gálico en nanofibras, con el fin de incorporarlo como ingrediente funcional en alimentos y así aumentar su valor comercial (Neo *et al.*, 2013). Otros usos que se les pueden dar a las nanofibras son la elaboración de películas para el recubrimiento de alimentos, que los protejan y además encapsulen sustancias bioactivas como antioxidantes o

antimicrobianos, tal es el caso de las bactericinas que se están utilizando para dar un valor agregado a alimentos de la industria cárnica y láctea. Recientemente, el grupo de trabajo en colaboración con el grupo de investigación de nuevos materiales y nanotecnología del IATA-CSIC, España, desarrolló nanofibras basadas en aislados de proteína de amaranto con la técnica de electroestirado (Patente P201131705; Aceituno *et al.*, 2013).

2.4 Amaranto

El grano de amaranto es considerado un pseudocereal, ya que comparte algunas características con los cereales. Posee cantidades importantes de almidón, aunque éste se encuentra almacenado en el perisperma. Sin embargo, como pertenece a las dicotiledóneas no es considerado un cereal, es un cultivo anual de grano pequeño (1 mm de diámetro), típico de las regiones de Sud América y América central. Pertenece a la familia Amaranthaceae, que comprende más de 60 géneros, con aproximadamente 800 especies de plantas herbáceas anuales o perennes, de las cuales, tres son las principales productoras de grano: *A. hypochondriacus* y *A. Cruentus*, cultivados en México y Guatemala, y *A. caudatus*, que se cultiva en Perú (Colla *et al.*, 2006; Ventureira, 2012).

El cultivo tiene la ventaja de ser resistente a las sequías y suelos salinos, aumentando su potencial de cultivo, en suelos que no son aptos para otras especies, tiene un metabolismo C4, lo que le permite fijar más eficientemente el dióxido de carbono, cabe destacar que se aprovechan tanto sus semillas como sus hojas para la alimentación y el grano posee un alto contenido proteico (Ventureira, 2012).

El Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) es una planta tradicional Mexicana, la cual posee tanto granos como hojas de un alto valor nutritivo, sin embargo, sigue siendo un cultivo subutilizado. En el 2013 la producción fue de 4,617.73 toneladas y una superficie cosechada de 3,729.00 ha de acuerdo con el servicio de

información agroalimentaria y pesquera (SIAP) de Sagarpa (Gorinstein *et al.*, 2001).

2.4.1 Propiedades del amaranto

El amaranto ha recobrado interés por su alto valor nutritivo y gran potencial como un alimento funcional. Por ejemplo, Mendonca *et al.*, en 2009, reportaron una reducción de niveles de colesterol en ratas a las que se les administraba un aislado proteico de amaranto junto con caseína. Sanz-Penella *et al.*, en 2013, evaluaron la adición de harina de amaranto en panes integrales, aumentando significativamente los contenidos de proteína, lípidos y minerales, dando un mayor valor nutricional a los productos adicionados con esta harina.

2.4.2 Proteína de amaranto

Una de las características más destacadas de las semillas de amaranto, es su contenido de proteínas de aproximadamente 14-18%, el cual es superior al de la mayoría de los cereales (10% en base seca). Diversos informes han concluido que la proteína de amaranto es especialmente rica en lisina y contiene niveles aceptables de cisteína y metionina, esto hace de las semillas de amaranto una fuente muy atractiva de nutrientes y proteínas para el consumo humano (Cordero, 2005).

Las proteínas de amaranto están constituidas principalmente por albúminas, que conforman entre el 49 y 65% del total, seguidas en abundancia por glutelinas, 22.4 al 42.3%, globulinas, 13.7 al 18,% y finalmente prolaminas que conforman del 1 al 3.2% del total de proteínas. Según la Organización Mundial de la Salud, las proteínas del grano de amaranto presentan un buen balance de aminoácidos (Cuadro 1), con un contenido importante de lisina, triptófano y de aminoácidos azufrados (principalmente metionina), esenciales en la alimentación humana y que comúnmente son limitados en otros granos (Ventureirna, 2012; Condés, 2012).

Cabe destacar que el amaranto contiene un bajo o nulo nivel de prolaminas, además de un nulo contenido de proteínas tóxicas como gliadina, secalina, hordenina y avenina, por lo que lo hacen un ingrediente apto para celíacos (Gorinstein *et al.*, 2001).

2.4.3 Proteínas de reserva

Las globulinas y glutelinas constituyen las principales proteínas de reserva del grano, las cuales se encuentran localizadas en el embrión y en el endospermo. Respecto a la fracción de globulinas, es sabido que participan de la misma manera que las globulinas de reserva clásicas de muchos granos. Esta fracción se compone de tres proteínas, las tipo 7S (son minoritarias desde el punto de vista cuantitativo), las 11S (como la del arroz y la avena) y las globulinas-P, características del amaranto.

Las globulinas-P poseen una composición polipeptídica semejante a las globulinas 11S, destacando la presencia de un polipéptido particular de 56 kDa, que aparentemente es responsable de su alta capacidad de polimerización. En cuanto a las glutelinas, poseen como característica sobresaliente su baja solubilidad (en disolventes salinos neutros), aún en medios alcalinos. De manera adicional demuestran elevado grado de agregación, y un punto isoeléctrico similar al de la gluteína del arroz. Por otra parte la globulina-P, tiene propiedades de solubilidad entre globulinas y gluteinas, siendo esta característica un punto de comparación para el amaranto, con otras especies (Gorinstein *et al.*, 2001; Abugoch *et al.*, 2003).

Cuadro 1. Contenido de aminoácidos del grano de amaranto (fracción molar).

Aminoácido	Harina total	Albumina	Globulina	Glutelina 2	Glutelina 3
Lisina	5.5	6.7	5.7	2.9	5.9
Histidina	2.7	2.1	3.8	3.4	2.7
Arginina	7.5	0.7	8.2	10.1	6.5
Triptófano	0.9	0.6	0.6	0.1	0.3
Ác. aspártico	8.5	8.0	7.5	9.1	10.3
Treonina	4.5	5.2	4.7	3.7	5.5
Serina	7.1	12.1	5.6	7.1	6.9
Ác. glutámico	14.5	16.4	13.7	16.6	11.7
Prolina	4.6	2.9	4.6	6.8	5.0
Glicina	12.8	14.2	8.9	10.3	9.4
Alanina	6.3	8.1	5.8	5.4	7.5
Cisteína	1.6	2.2	4.4	1.6	1.3
Valina	4.9	4.4	6.0	4.1	5.5
Metionina	2.2	2.3	2.8	1.2	1.4
Isoleucina	3.5	2.9	4.3	4.1	4.1
Leucina	6.0	5.4	6.1	6.2	8.3
Tirosina	3.7	2.7	2.9	3.1	3.4
Fenilalanina	3.3	2.5	4.5	4.1	4.4

(Gorinstein *et al.*, 2001)

2.5 Pululano

El pululano es un polisacárido soluble en agua, producido por *Aureobasidium pullulans*. El polímero lineal (Figura 3) se compone principalmente de unidades de maltotriosa interconectadas entre sí por un enlace glicosídico (1, 6). Este patrón de enlaces único dota al pululano de propiedades físicas para la formación de películas fuertes, transparentes, solubles en agua y con baja permeabilidad al oxígeno. Sin embargo, su aplicación en forma pura para la producción de películas ha sido limitada por sus pobres propiedades mecánicas (frágil, fácil de romper) y su elevado costo (Wu *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2014).

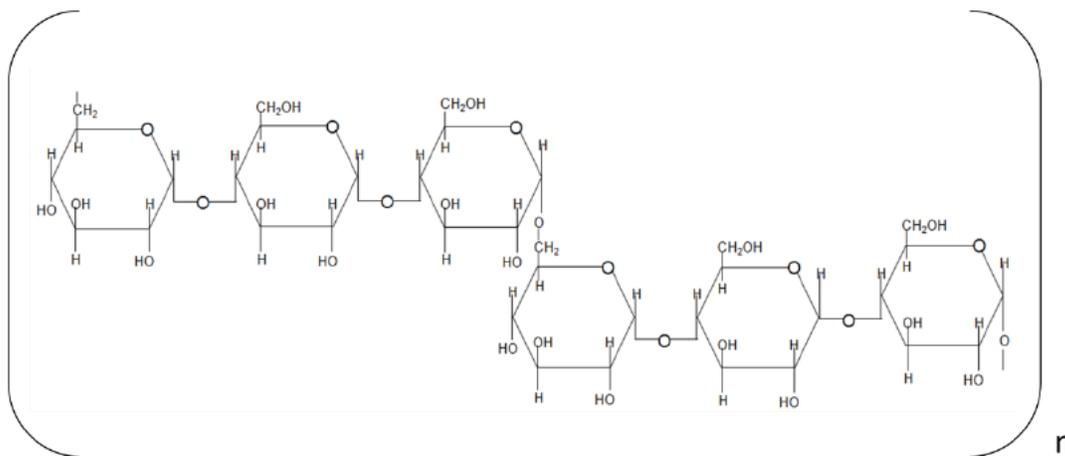


Figura 3. Estructura química del pululano (Aceituno, 2011)

2.6 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son pequeños péptidos antimicrobianos que se sintetizan a nivel ribosómico, pueden sufrir modificaciones postraduccionales y son segregadas al exterior por una bacteria (principalmente ácido lácticas) (Arqués *et al.*, 2011). La bacteria es inmune a la bacteriocina que produce. En condiciones normales, las bacteriocinas son activas exclusivamente frente a bacterias Gram-positivas. La amplitud en el número de especies y cepas inhibidas depende de cada

bacteriocina, pues puede ser estrecho y confinado a la inhibición de especies que se encuentren relacionadas con su crecimiento, o puede ser relativamente amplio e incluir muchas especies bacterianas diferentes (Joerger, 2003; Hill *et al.*, 2011;).

2.6.1 Clasificación de bacteriocinas

Muchas de las bacteriocinas de las bacterias ácido lácticas, son moléculas catiónicas, hidrofóbicas o anfifílicas, compuestas de 20 a 60 aminoácidos. Estas bacteriocinas son clasificadas comúnmente en 3 clases, como se muestra en el Cuadro 2 (Chen and Hoover, 2003).

- Clase I

Incluye a péptidos pequeños (< 5 kDa), activos a nivel de membrana, que contienen aminoácidos inusuales o poco comunes como lantionina (Lan), α -metil lantionina (MeLan), deshidroalanina y deshidrobutirina, formados en modificaciones post-traduccionales (Alquicira, 2006).

La formación de aminoácidos no comunes se explica por la deshidratación de los aminoácidos serina y treonina, con la posterior adición de azufre de la cisteína y formación de dobles enlaces de los deshidroaminoácidos (Alquicira, 2006).

Estas bacteriocinas son llamadas lantibióticos y se dividen en dos subgrupos atendiendo a su estructura y modo de acción. Los lantibióticos de tipo A se caracterizan por ser péptidos flexibles y cargados positivamente, que actúan a nivel de membrana. A este tipo pertenece la nisina, la más estudiada de todas las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas. Los lantibióticos de tipo B tienen una estructura secundaria más rígida. Son péptidos globulares que actúan inhibiendo algunas de las reacciones enzimáticas de la célula Diana (Reviriego, 2009).

Cuadro 2. Clases y bacteriocinas representativas de cada grupo.

Clase	Bacteriocina	Microorganismo productor	Breve descripción
Clase I Tipo A Lantibióticos	Nisina A y Z	<i>Lactococcus lactis subs. lactis</i>	Contienen algunos aminoácidos poco comunes como la lantionina, α -metil lantionina y deshidroalanina
	Lactocina S	<i>Lactobacillus sakei L45, I48</i>	
	Epidermina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
	Gallidermina	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	
Clase I Tipo B Lantibióticos	Lacticina 481	<i>Lactococcus lactis</i>	
	Mersacidina	<i>Bacillus subtilis</i>	
	Cinamycina	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	
	Ancovenina	<i>Streptomyces ssp.</i>	
Clase II a	Duramycina	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	
	Pediocina PA-1	<i>Listeria monocytogenes</i>	
	Pediocina JD	<i>Pediococcus acidilacti JD1-23</i>	
	Leucocina	<i>Leuconostoc gelidum</i>	
Clase II b	Mesentericina	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	< 10 kDa, estables al calor, no contienen lantionina
	Enterocina A	<i>Enterococcus faecium</i>	
	Lactococcina A	<i>Lactococcus cremoris</i>	
	Lactococcina B	<i>Lactococcus cremoris 9B4</i>	
Clase II c	Plantaricina A	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Requieren dos diferentes péptidos para su actividad
	Plantaricina S	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
	Plantaricina EF	<i>Lactobacillus plantarum C11</i>	
	Plantaricina JK	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
Clase II c	Acidocina B	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Péptidos estables, termoestables y se transportan por péptidos líder.
	Carnobacteriocina	<i>Carnobacterium piscicola</i>	
	Divergicina A	<i>Enterococcus faecium</i>	
Clase III	Enterocina B	<i>Enterococcus faecium</i>	Péptidos > 30 kDa, lábiles al calor.
	Helveticina J	<i>Lactobacillus helveticus</i>	
	Helveticina V1829	<i>Lactobacillus helveticus</i>	

(Alquicira, 2006)

- Clase II

La clase II de las bacteriocinas, también llamadas no lantibióticos, son péptidos con un peso molecular menor a 10 kDa, son estables al calor y contienen

aminoácidos regulares que no sufren modificaciones postraduccionales. En este grupo se pueden identificar tres subclases (Cuadro 2).

La clase IIa, también denominada como “familia de la pediocina” porque la pediocina PA-1 fue el primer miembro que se descubrió, constituye el grupo más numeroso de las bacteriocinas de la clase II (Alquicira, 2003). Las bacteriocinas de la Clase IIb, son formadoras de poros en la membrana celular, consisten de dos péptidos diferentes, siendo los dos necesarios para la actividad antimicrobiana. La clase IIc contiene el resto de los péptidos de la clase, son bacteriocinas termoestables, no modificadas y se transportan mediante péptidos líder (Reviriego, 2009).

- Clase III

Denominadas bacteriolincinas, incluye péptidos cuyo peso molecular es mayor a 30 kDa y son termolábiles, por lo que tienen menos interés para tecnologías alimentarias. Su mecanismo de acción es distinto en comparación con el resto de las bacteriocinas, y se basa en la catálisis e hidrólisis de la pared celular de las células sensibles (Alquicira, 2003).

2.6.2 Uso de bacteriocinas en alimentos

En los últimos años, una gran cantidad de trabajos se han dirigido a la detección, purificación y caracterización de bacteriocinas. Se ha considerado su uso en las estrategias de conservación de alimentos (Settanni and Corsetti, 2008), por ejemplo, la adición a los alimentos de bacterias que produzcan bacteriocinas o la incorporación de las bacteriocinas en forma de concentrados, parcial ó totalmente purificados. Para ser usadas requieren una aprobación específica como conservantes de acuerdo a la legislación vigente. Hasta el momento, la nisina y la pediocina PA-1, son las únicas bacteriocinas con licencia para usarse como conservantes de alimentos (Balciunas *et al.*, 2013). En el Cuadro 3 se muestran, algunas bacteriocinas con aplicación en alimentos.

Cuadro 3. Aplicación de bacteriocinas en alimentos.

Bacteriocina	Productor	Actividad	Alimento	Reducción (log UFC/g)
Nisina	<i>L. lactis</i>	<i>B. thermosphacta</i>	Carne	3.5
Nisina	<i>L. lactis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Leche	6
Pediocina	<i>L. plantarum</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Queso	1-2
Enterocina	<i>E. faecalis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Leche	2
Enterocina	<i>E. faecium</i>	<i>S. aureus</i>	Salchichas	5.3
Nisina Z	<i>L. lactis</i>	<i>S. aureus</i>	Queso	2

(Balciunas *et al.*, 2013)

2.6.3 Nisina

La nisina es un péptido lantibiótico cargado positivamente, capaz de unirse a membranas citoplasmáticas. La nisina contiene 34 residuos de aminoácidos y tiene un peso molecular de 3,4 kD. Es un antibacteriano ampliamente utilizado como conservador de alimentos, debido a su potente actividad bactericida contra una gran variedad de bacterias que deterioran los alimentos, principalmente Gram-positivas como *L. monocytogenes*, *Clostridium botulinum* y *Bacillus cereus*. Se produce por algunas cepas de *Lactococcus lactis*. Se han estudiado dos grupos de nisina, A y Z, diferenciadas por el aminoácido del residuo 27, el grupo A contiene Histidina, mientras que el B tiene Asparagina, sin embargo no presentan diferencias en su poder antimicrobiano (Sun *et al.*, 2009; Bi *et al.*, 2011; Iburguren *et al.*, 2014).

El modo de acción de la nisina, es la formación de poros en la membrana de células sensibles, dando lugar a la emanación de los componentes celulares y el colapso de la fuerza protón-motriz, además impide la síntesis de la pared celular por la unión específica a lípidos II, un intermediario esencial de la síntesis del peptidoglicano. Además la nisina puede inhibir el desarrollo de algunas esporas

bacterianas (Sun *et al.*, 2009; Magalhães and Nitschke 2013; Ibarguren *et al.*, 2014).

Esta bacteriocina ha sido utilizada para la preservación de diversos alimentos, principalmente productos lácteos, como lo reportado por Castro *et al.* (2009), donde utilizaron nisina en la fabricación de queso blanco. Se logró reducir aproximadamente 3 log de la concentración inicial, a los 10 días de refrigeración del queso. Arqués en 2008, evaluó la actividad antimicrobiana de nisina en un producto lácteo semisólido elaborado en España, lográndose una mejor preservación al combinarla con ruterina y el sistema enzimático de lactoperoxidasa, disminuyendo 2 log de la concentración inicial de *L. monocytogenes*.

Existen diferentes estudios en los que se intenta evitar la disminución de la actividad antimicrobiana de la nisina, debido a problemas de estabilidad como la degradación proteolítica o la interacción con diversos alimentos (formación de complejos con cationes divalentes, enzimas, grasas y otros componentes). Se han desarrollado sistemas de encapsulación de esta bacteriocina que ayuden a mantener su actividad biológica, como los nanoliposomas elaborados con lecitina de soya, estos se utilizaron para la elaboración de películas comestibles (Imran *et al.*, 2012). Otro método de encapsulación es el utilizado por Xiao y Zhong en 2011, en el que se estudió el efecto de Tween 20 y glicerol, en formulaciones de partículas a base de zeína, elaboradas mediante el método de secado por aspersión. Se demostró que la mejor combinación para obtener un mayor rendimiento durante la encapsulación, fue la adición de 0.05% de Tween 20 o glicerol a un pH de 6.0.

2.6.4 Pediocina PA-1

Es una bacteriocina que pertenece a la clase IIa, constituida de 44 residuos de aminoácidos, no se modifica postraduccionalmente. Tiene carga neta positiva a pH

6. Es producida por cepas de las especies *P. acidilactici* de origen cárnico, *P. parvulus* de origen vegetal y una cepa de *L. plantarum* (Renyte *et al.*, 2011; Díez, 2011).

El modo de acción bactericida de la pediocina PA-1, se debe a la permeabilización de la membrana como consecuencia de la formación de poros (Figura 4), por los que se pierden algunos componentes intracelulares: iones, aminoácidos y otros compuestos de bajo peso molecular. Como consecuencia se disipa la fuerza protón-motriz, reduciéndose o perdiéndose totalmente el potencial eléctrico transmembranal y el gradiente de protones (Díez, 2011).

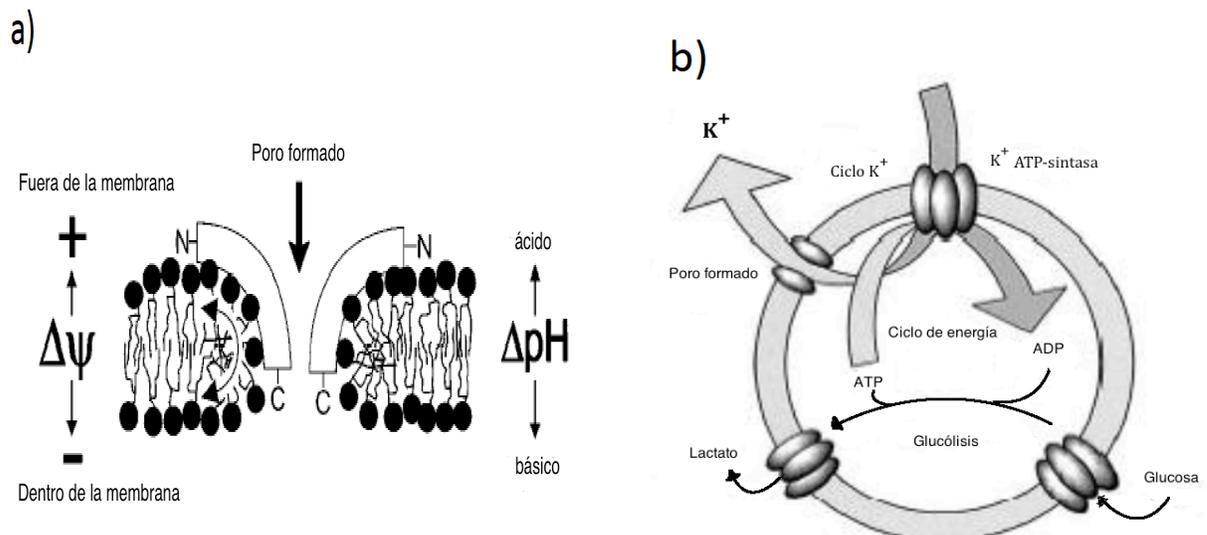


Figura 4. Mecanismo de acción de las bacteriocinas de tipo II. A) disipación de la fuerza motriz de protones compuesta por potencial de membrana ($\Delta\psi$) y el gradiente de pH (ΔpH), b) modelo propuesto de la muerte celular por la formación de poros mediante bacteriocinas (Díez, 2011).

La pediocina ha sido utilizada en diferentes alimentos, principalmente productos cárnicos y lácteos. Las bacterias productoras de la pediocina no fermentan la lactosa, lo cual, es un inconveniente para su producción en alimentos lácteos. Se han realizado estudios para la caracterización de los genes que dan origen a esta

bacteriocina, logrando introducirlos en otros microorganismos para su producción mediante la transformación genética de *Streptococcus thermophilus*, y así tener la expresión constitutiva de estos genes (operón PAPA-D) (Renyé *et al.*, 2011). Este no es el caso de la industria cárnica, se ha evaluado su actividad contra *L. monocytogenes* en salchichas cocidas, en donde se disminuyeron 2 log de UFC/mL de la concentración inicial, al sexto día de almacenamiento (Mattilaa *et al.*, 2003).

3 Hipótesis

Las nanofibras electroestiradas elaboradas con mezclas de proteína de amaranto-puluano son un medio efectivo para la incorporación de bacteriocinas como Nisina y Pediocina A-1, sin afectar su actividad antimicrobiana.

4 Justificación

Las bacteriocinas al estar en una matriz alimenticia pueden sufrir problemas de estabilidad, como la degradación proteolítica y cambios en el potencial eléctrico, lo que conlleva a la disminución de la actividad antibacteriana. La nisina y la pediocina A-1 pueden sufrir cambios en su actividad biológica, debido a su interacción con cationes divalentes, enzimas, grasas y otros componentes, por lo que se requiere que se incorporen en matrices que no permitan su degradación y que mantengan una liberación eficiente.

Las nanofibras preparadas por la técnica de electroestirado, compuestas de diferentes polímeros, se pueden utilizar como matriz de soporte para las bacteriocinas y otros péptidos antimicrobianos. Estas nanofibras se han utilizado para la liberación de antibióticos, proteínas, factores de crecimiento, nanopartículas de plata, ADN plasmídico, así como células viables. Sin embargo, la mayoría de las fibras que se han desarrollado no son grado alimenticio, por lo cual, es necesario el uso de polímeros naturales, como es el caso de la proteína de amaranto.

5 Objetivos

5.1 Objetivo general

Desarrollar y caracterizar nanofibras electroestiradas elaboradas a base de proteína de amaranto y pululano cargadas con dos bacteriocinas, nisina y pediocina PA-1 y evaluar su actividad antimicrobiana.

5.2 Objetivos específicos

1. Desarrollar nanofibras elaboradas con proteína de amaranto y pululano cargadas con nisina y pediocina.
2. Caracterizar fisicoquímicamente las nanofibras cargadas con nisina A y pediocina PA-1.
3. Evaluar la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas encapsuladas en las nanofibras contra diferentes cepas de acuerdo a su espectro antibacteriano.

6 Metodología

6.1 Materiales

Concentrado proteico de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L. variedad Revancha) suministrado por Nutrisol, San Miguel de Proyectos Agropecuarios S.P.R. de R.S. (SMPA). De Sigma-Aldrich se adquirieron: Pululano, ácido fórmico, nisina A, pediocina PA-1, N, N-dimetilformamida (DMF), isotiocianato de rodamina B (RBITC), isotiocianato de fluoresceína (FITC), Tween 80; de BD se adquirieron agar para métodos estándar (AME), medio MRS, peptona de soya; de Thermo Scientific se adquirió el Kit para cuantificación de proteína BCA; de J.T. Baker se obtuvo ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, dimetilsulfoxido (DMSO), ácido cítrico, fosfato de sodio, difosfato de sodio.

6.2 Cepas

Listeria monocytogenes Scott A (ATCC 49594), *Leuconostoc mesenteroides* (ATCC 8293), *Lactobacillus sakei* (ATCC 15521).

6.3 Métodos

6.3.1 Preparación del aislado proteico

El aislado proteico se preparó a partir de la técnica reportada por Martínez y Añon (1996). La harina de amaranto, previamente desgrasada con hexano durante 8 h (método Soxhlet), se dispersó en agua, manteniendo una relación 1:10 y se ajustó el pH a 9.0, mediante la adición de NaOH 2M. La dispersión se agitó durante una h y después se centrifugó a 9000 g, durante 20 min. Las proteínas se precipitaron mediante el ajuste del pH a 5.0, con HCl 2M y se separaron por centrifugación a 9000 g durante 20 min. Los pellets obtenidos se suspendieron en agua, se les ajustó el pH a 7 con NaOH 0.1M, se liofilizaron y se almacenaron en refrigeración.

6.3.2 Preparación de las soluciones poliméricas con la adición de activos.

Para la obtención de nanofibras, estas se elaboraron a partir del método descrito por Aceituno (2013), preparándose una mezcla de aislado proteico de amaranto (APA) y pululano en una proporción 50:50, usando como surfactante Tween 80 (20% respecto a la proteína) y como solvente ácido fórmico, la solución se agitó durante 2 h hasta su disolución. En el Cuadro 4 se muestran las mezclas elaboradas, con las diferentes concentraciones de bacteriocinas.

Cuadro 4. Contenido de bacteriocinas de las mezclas 50:50 APA-PUL.

Mezcla	Nisina (mg/mL)	Pediocina (µg/mL)
A	---	---
B	---	1
C	---	3
D	10	--
E	20	--

6.3.3 Caracterización física de las soluciones

La viscosidad de las soluciones se determinó con un reómetro de dos platos con un gab de 0.3 mm, marca Anton Para, modelo Physica MCR 101; la conductividad eléctrica se midió con un conductímetro ORION SoTAR A212 y el pH con un potenciómetro Thermo Scientific Orion 420A+. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente, empleando 5 mL de las soluciones obtenidas en el apartado 6.3.2.

6.3.4 Proceso de electroestirado

Para la elaboración de fibras se utilizó un equipo de electroestirado, el cual está equipado con una fuente de alto voltaje Acopian modelo P030HPI-230, capaz de

producir un voltaje variable de 0-30 kV. El ánodo se encuentra unido a una aguja de acero inoxidable con un diámetro inferior a 0.9 mm, que se conecta mediante un cable PTFE a las disoluciones de polímeros contenidos en un jeringa de plástico de 5 mL. La jeringa está conectada al electrodo de polaridad positiva, que a su vez se encuentra conectado a una fuente de alto voltaje. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Las condiciones de voltaje, distancia al colector y flujo de alimentación se fijaron a 22 kV, 10 cm y 0.4 mL/h, respectivamente (Aceituno, 2011).

6.3.5 Caracterización fisicoquímica de nanofibras

6.3.5.1. Espectroscopia infrarroja con Reflectancia Difusa

Los espectros de Reflectancia difusa se tomaron en un espectrofotómetro de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) Spectrum GX de Perkin Elmer con Microscopio acoplado AutoIMAGE. Para la obtención de los espectros se formaron pastillas con 12 mg de muestras y 202 mg de KBr.

6.3.5.2. Microscopia electrónica de barrido

La morfología de las nanofibras se examinó mediante microscopia electrónica de barrido (SEM). Las muestras se recubrieron con una capa de oro, al vacío. Todos los experimentos se llevaron a cabo a un voltaje de aceleración de 15 kV en un microscopio EVO-50 de Carl Zeiss. Los diámetros de las estructuras se obtuvieron por medio del Software Image J de Java, a partir de las micrografías obtenidas por SEM. Se midieron 100 estructuras de cada muestra para obtener el diámetro medio (Aceituno *et al.*, 2013).

6.3.5.3. Calorimetría diferencial de barrido

El análisis térmico se llevó a cabo en un calorímetro de barrido diferencial (DSC) modelo DSC 822e marca Mettler Toledo. El calorímetro se calibró previamente con Indio (0.16 mg), se utilizó un crisol de aluminio vacío como referencia. Se

pesaron muestras de fibras de 2-5 mg y se colocaron en crisoles de aluminio de 40 μ L. Las muestras se calentaron bajo atmosfera de nitrógeno (con velocidad de flujo de 20 mL/min), en un solo ciclo desde 25°C a 250°C, para las muestras de fibras y de 25°C a 200°C, para los compuestos puros. Las muestras se corrieron por triplicado.

6.3.5.4. Marcaje fluorescente de los péptidos antimicrobianos y proteína de amaranto

Para el marcaje de las bacteriocinas, se utilizó la técnica descrita por Heunis *et al.* en 2011, en la que nisina A en polvo (20 mg), se suspendió en 1 mL de N, N-dimetilformamida (DMF), se hizo reaccionar con 4 mg de isotiocianato de fluoresceína (FITC), previamente disueltos en el mismo volumen. Para pediocina PA-1 se mezclaron 4.2 mg de Rodamina B (RIBTC) con 30 μ L de Pediocina en 2 mL de DMF. Ambas soluciones se dejaron incubando en la obscuridad a 4°C durante 48 h en viales ámbar cerrados. El marcador fluorescente que no se unió, se eliminó mediante diálisis en una solución amortiguadora de fosfatos 7.5 mM a pH 7, reemplazando la solución hasta no observar coloración. Las soluciones se almacenaron, hasta su posterior uso. Para el proceso de electroestirado se prepararon 2 mL de la mezcla 50:50 APA-PUL y se agregaron 40 μ L de los complejos FITC-nisina y RIBTC-pediocina, por separado, posteriormente las mezclas se sometieron al proceso de electroestirado, colectándolas en un portaobjetos de vidrio, para su observación en un microscopio confocal Zeiss Axiovert 200 LSM 510 Meta–Multifótonico, a una longitud de onda de excitación de 472 nm y 572 nm para FITC y RIBTC, respectivamente.

6.4 Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación se obtuvo por la cuantificación de bacteriocina (nisina y pediocina) en las fibras electroestiradas, mediante un kit BCA. Las fibras obtenidas a partir de 1 mL de solución se disolvieron por completo en DMSO,

agitándose durante 12 h, la solución obtenida se llevo a pH 9, donde el APA se encuentra en solución, se centrifugó a 9000 g, se retiró el pellet y del sobrenadante se cuantificó la proteína mediante el kit BCA.

6.5 Pruebas microbiológicas

6.5.1 Prueba de antagonismo

6.5.1.1. Lavado de cepas

Las cepas de los diferentes microorganismos se incubaron en caldo soya tripticaseina (bacterias patógenas) y caldo MRS (bacterias deterioradoras), por 24 h a 37 °C, posteriormente se centrifugaron a 6000 rpm durante 5 min, el pellet se resuspendió en 3 mL de solución salina estéril al 10% y se centrifugó durante 5 min a 6000 rpm, realizando un lavado más.

6.5.1.2. Difusión en placa

Se utilizaron 3 cepas de microorganismos, dos deterioradoras *Lactobacillus sakei* y *Leuconostoc mesenteroides* y *Listeria monocytogenes* Scott A. Se utilizó Agar Soya Tripticaseina (AST) para las cepas patógenas y para los deterioradores, Agar MRS. En tubos con 10 mL de agar fundido se inocularon 5 µL de loa cultivos previamente lavados, se agitaron en vortex y se vaciaron a cajas Petri estériles, una vez solidificadas se colocaron círculos de 1 mm de diámetro de las fibras (esterilizadas con luz UV) y se incubaron a 37°C durante 24 h. El halo de inhibición se midió con la ayuda de un vernier. En el caso de los compuestos puros, se utilizó la concentración más alta presente en las fibras.

6.6 *Análisis estadístico*

Los análisis se realizaron por triplicado y se calculó la media y el error estándar. Para ello, se empleó el paquete estadístico JMP 8, en los casos donde se encontraron efectos significativos estadísticamente, se realizó la comparación de medias entre tratamientos.

7 Resultados

7.1 Caracterización física de soluciones APA:PUL

El proceso de electroestirado esta condicionado a varios parámetros de la solución, entre los que se incluyen viscosidad, conductividad y tensión superficial, cada uno de estos parámetros afecta significativamente la morfología de las fibras obtenidas (Bhardwaj and Kundu, 2010).

Los valores de la viscosidad y la conductividad eléctrica de las soluciones se presentan en el Cuadro 5, la mezcla A que no contiene activos, presenta una conductividad y viscosidad de 7.68 ± 0.12 mS/cm y 67.39 ± 0.06 Cp, respectivamente. La incorporación de nisina y pediocina disminuyó significativamente ($P < 0.05$) ambos parámetros, la conductividad eléctrica es afectada por el tipo de polímero y tipo de disolvente, concentración del polímero y la temperatura. Cuando el polímero tiene funcionalidades iónicas como es el caso de las bacteriocinas, la conductividad de la solución depende de la concentración como se observa en los resultados en el Cuadro 5 (Okutan *et al.*, 2014). En el caso de la viscosidad, únicamente la mezcla E fue la que presentó diferencias significativas con respecto al control (mezcla A). Estos resultados son similares a los reportados por Aceituno *et al.* (2013) y Wongsasulak *et al.* (2010), quienes reportaron que al aumentar la cantidad de sustancias proteicas en las mezclas poliméricas, la viscosidad tiende a disminuir. En cuanto al diámetro de las fibras obtenidas de las mezclas con activo se puede observar una disminución significativa ($P < 0.05$) con respecto a la mezcla control, disminuyendo incluso la mitad para el caso de las mezclas C y E. Neo *et al.* (2013), informaron que al elaborar nanofibras de zeína y ácido gálico, al disminuir la conductividad y viscosidad, el diámetro de las nanofibras también disminuye.

Cuadro 5. Caracterización física de las soluciones y diámetro medio de las fibras obtenidas por el método de electroestirado.

Mezcla	Conductividad eléctrica (mS/cm)	Viscosidad (Cp)	Diámetro medio
A	7.68 ± 0.12 ^a	67.30 ± 0.06 ^a	299.6 ± 8.4
B	5.27 ± 0.28 ^b	64.01 ± 1.76 ^a	200.1 ± 3.3
C	4.68 ± 0.43 ^b	64.93 ± 0.15 ^a	153.2 ± 6.8
D	4.42 ± 0.13 ^b	63.46 ± 0.20 ^a	173.2 ± 6.8
E	3.41 ± 0.12 ^a	46.76 ± 2.74 ^b	124.1 ± 15.7

A= Mezcla 50:50 APA-PUL, B: Mezcla 50:50 con 1µg Pediocina, C: Mezcla 50:50 con 3 µg Pediocina, D: Mezcla 50:50 con 10 mg Nisina, E: Mezcla 50:50 con 20 mg Nisina Los resultados se presentan como la media ± el error estándar, letras diferentes representan diferencias significativas en la prueba de Dunnet con un nivel de significancia de P=0.05%. Los resultados del diámetro medio se tomaron de 100 nanofibras.

En la Figura 5 se muestran las imágenes de microscopia electrónica de barrido de las diferentes mezclas, en donde se observa la obtención de fibras lisas y continuas, sin ningún tipo de defectos, estos resultados son similares a los obtenidos por Aceituno *et al.* (2013), quienes mencionan que la formación de fibras lisas se relaciona con una distribución uniforme de los activos, proteína y pululano, a lo largo de las fibras, resultados atribuidos a una buena miscibilidad de los compuestos puros, resultados confirmados con las técnicas utilizadas en este estudio.

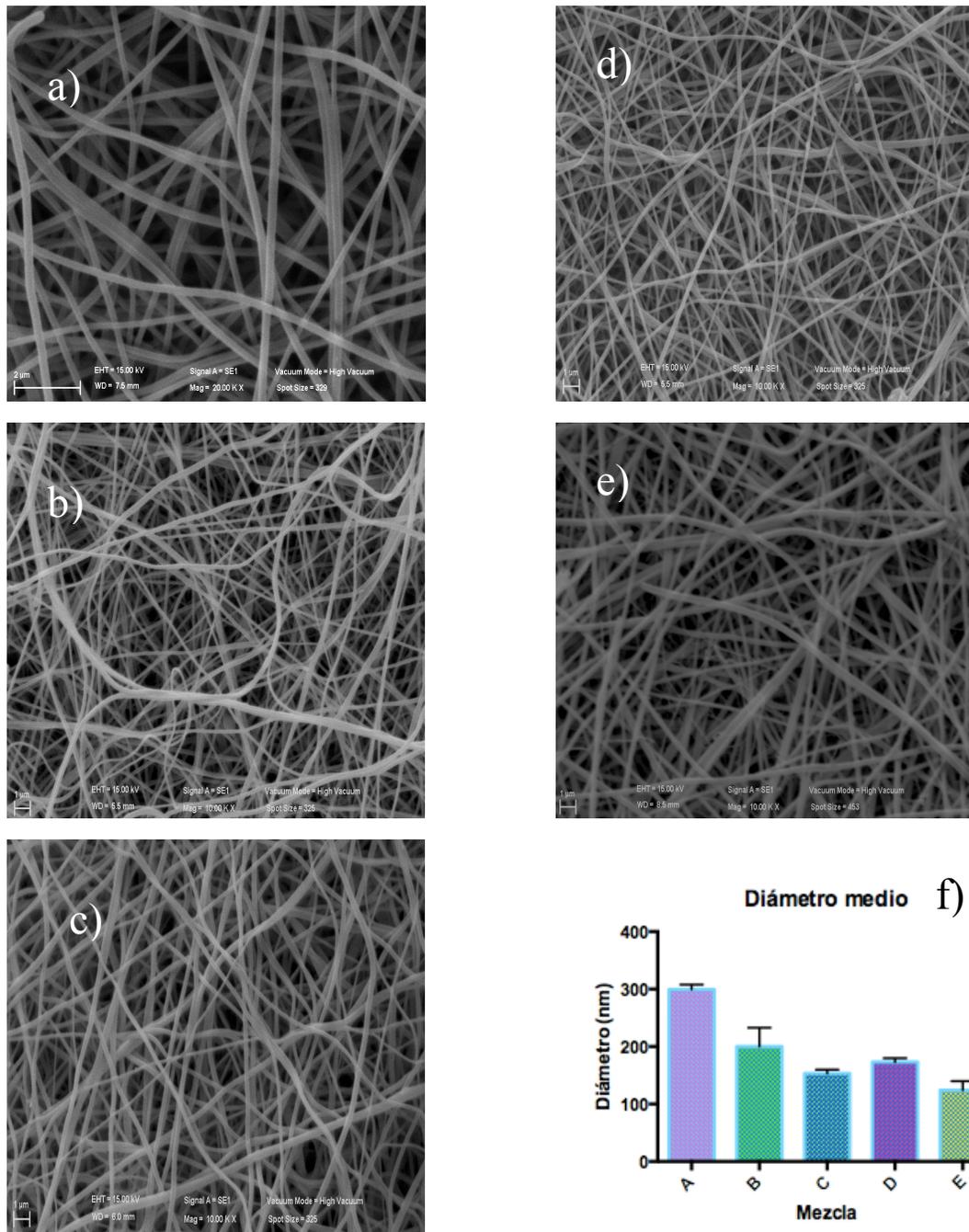


Figura 5. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de fibras 50:50 amaranto-pululano, cargadas con a) Mezcla A (50:50) APA:PUL, b) mezcla B (50:50:1) APA:PUL:Pediocina, c) mezcla C (50:50:3) APA:PUL:Pediocina, d) mezcla D (50:50:10) APA:PUL:Nisina, e) mezcla E (50:50:20) APA:PUL:Nisina y f) diámetros de nanofibras por mezcla (prueba de Dunnet P 0.5%).

7.2 Marcaje fluorescente de péptidos antimicrobianos

Las imágenes mostradas en la Figura 6, representan la microscopía de fluorescencia de las fibras marcadas con el complejo FITC-nisina y con RIBTC-pediocina. En la Figura 6a se observa que la nisina se distribuye de manera uniforme a lo largo de toda la fibra, sin presentar aglomeraciones del activo, lo que sugiere que la nisina por lo menos se encuentra embebida en la superficie de las fibras formadas en el procesos de electroestirado. Heunis *et al.* 2011 obtuvieron fibras electroestiradas con la adición de planataracina a una mezcla de oxido de polietileno (PEO) y ácido poliláctico (PDLLA), el seguimiento de la encapsulación se llevó a cabo mediante el marcaje fluorescente de los péptidos con FITC, obteniéndose resultados similares a las imágenes obtenidas para las fibras de APA-PUL.

En la Figura 6b se observa que existen zonas de la fibra en donde hay una mayor concentración de activo (mayor fluorescencia), estas zonas se relacionan con defectos en la formación de las fibras que pueden deberse a que el solvente no se evaporó por completo durante el recorrido de la aguja a la placa colectora, formando zonas en donde el activo puede liberarse.

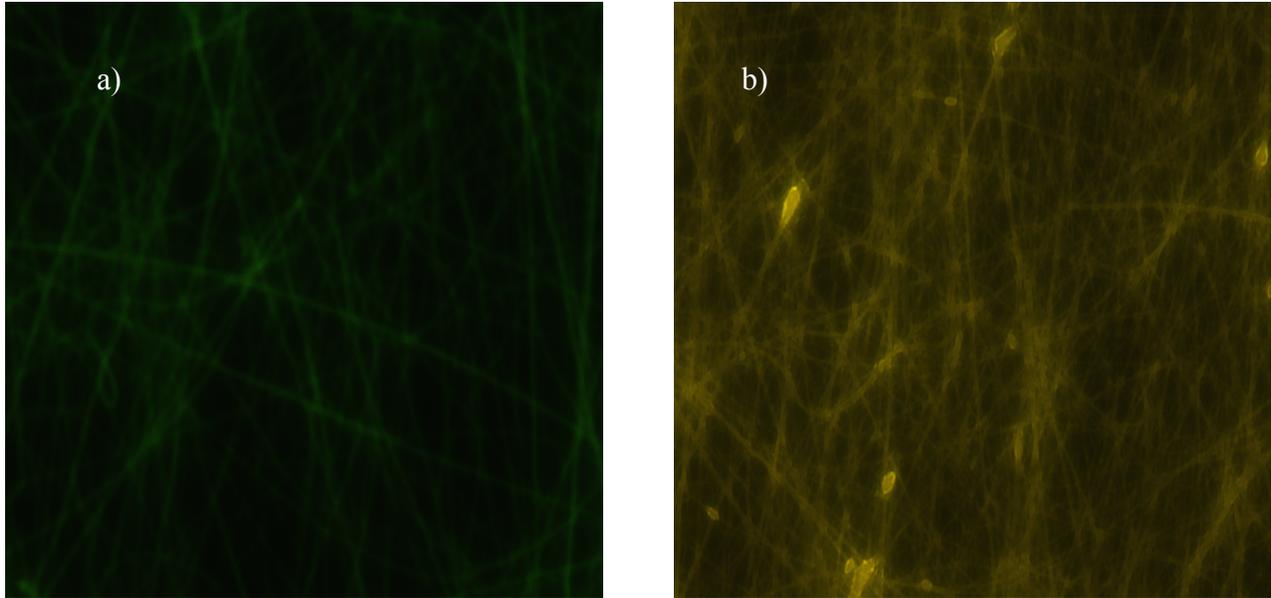


Figura 6. Imágenes de microscopía de fluorescencia de fibras electroestiradas de la mezcla 50:50 amaranto-pululano cargadas con el complejo a) FTIC-Nisina, b) RIBTC-pediocina y microscopía óptica con aumento 63X.

7.3 Espectroscopia de Infrarrojo con Reflectancia Dispersa (FTIR-DRIFTS)

La espectroscopia de infrarrojo se ha utilizado para el estudio del plegamiento de las proteínas, debido a que la banda Amida I es sensible a la estructura secundaria de las mismas (Miller *et al.*, 2013). Las bandas características de un espectro de compuestos proteicos se basan en la banda Amida I, formada por varias bandas que representan diferentes elementos estructurales como α hélice, β -plegada y estructuras irregulares, se encuentra entre 1600 y 1700 cm^{-1} y representa las vibraciones de estiramiento del grupo $\text{C}=\text{O}$ acoplado débilmente con el estiramiento del enlace $\text{C}-\text{N}$ y de flexión de $\text{N}-\text{H}$ (Figura 7). La banda Amida II se produce a $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ y se deriva principalmente del enlace $\text{C}-\text{N}$ y $\text{N}-\text{H}$ en el plano de flexión (Chen *et al.*, 2013; Glassford *et al.*, 2013; Haris and Severcan, 1999). En la Figura 8 se muestra el espectro infrarrojo del aislado

proteico de amaranto obtenido a partir de la harina Nutrisol, en el cual se observan las bandas características para compuestos proteicos, así como las posiciones a las cuales se encontraron valores similares a los mencionados anteriormente.

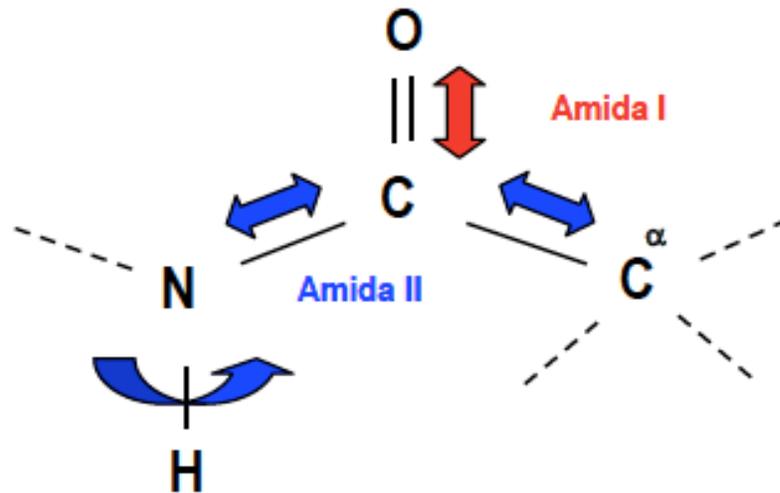


Figura 7. Vibraciones fundamentales del grupo peptídico. Bandas Amida I y II.

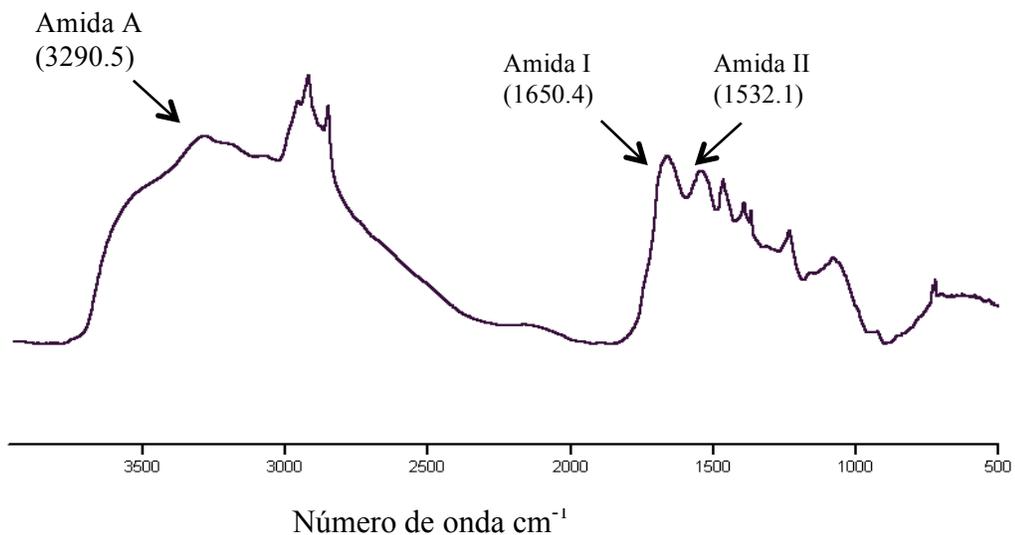


Figura 8. Espectro FTIR de Reflectancia difusa del Aislado Proteico de Amaranto, donde se representan las bandas características de un espectro proteico.

La Figura 9 muestra el espectro de las fibras obtenidas de la mezcla 50:50 APA-PUL y de los compuestos usados para su elaboración, se puede observar que la línea b, presenta las bandas características del pululano en frecuencias entre 1250 cm^{-1} y 500 cm^{-1} , observándose a 925.45 cm^{-1} la banda característica al enlace glicosídico (α -1,6) y a 843.19 , la del enlace glicosídico (α -1,4), representativas de la estructura química del pululano (Figura 3) (Karim *et al.*, 2009; Mitic *et al.*, 2009). También se pueden apreciar las bandas características del aislado proteico, observándose que tienen un desplazamiento a frecuencias menores de la banda Amida I, lo que podía deberse a la formación de enlaces de hidrógeno entre el carbohidrato y el aislado proteico, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Aceituno *et al.*, 2013, Karim *et al.*, 2009 y Li *et al.*, 2013.

En la Figura 10, se presentan los espectros de los productos electroestirados de las mezclas formuladas, debido a las concentraciones tan pequeñas de los activos no fue posible observar cambios en las frecuencias de las bandas características de los compuestos proteicos, ni en las del pululano, sin embargo se observa un desplazamiento a frecuencias menores de la banda a 3300.8 cm^{-1} , lo que sugiere la formación de enlaces de hidrógeno entre los polímeros. Hosseini *et al.* en 2014, observaron resultados similares al incorporar nisina en nanopartículas de almidón resistente y alginato, observando disminución a frecuencias menores de la banda característica al estiramiento del OH.

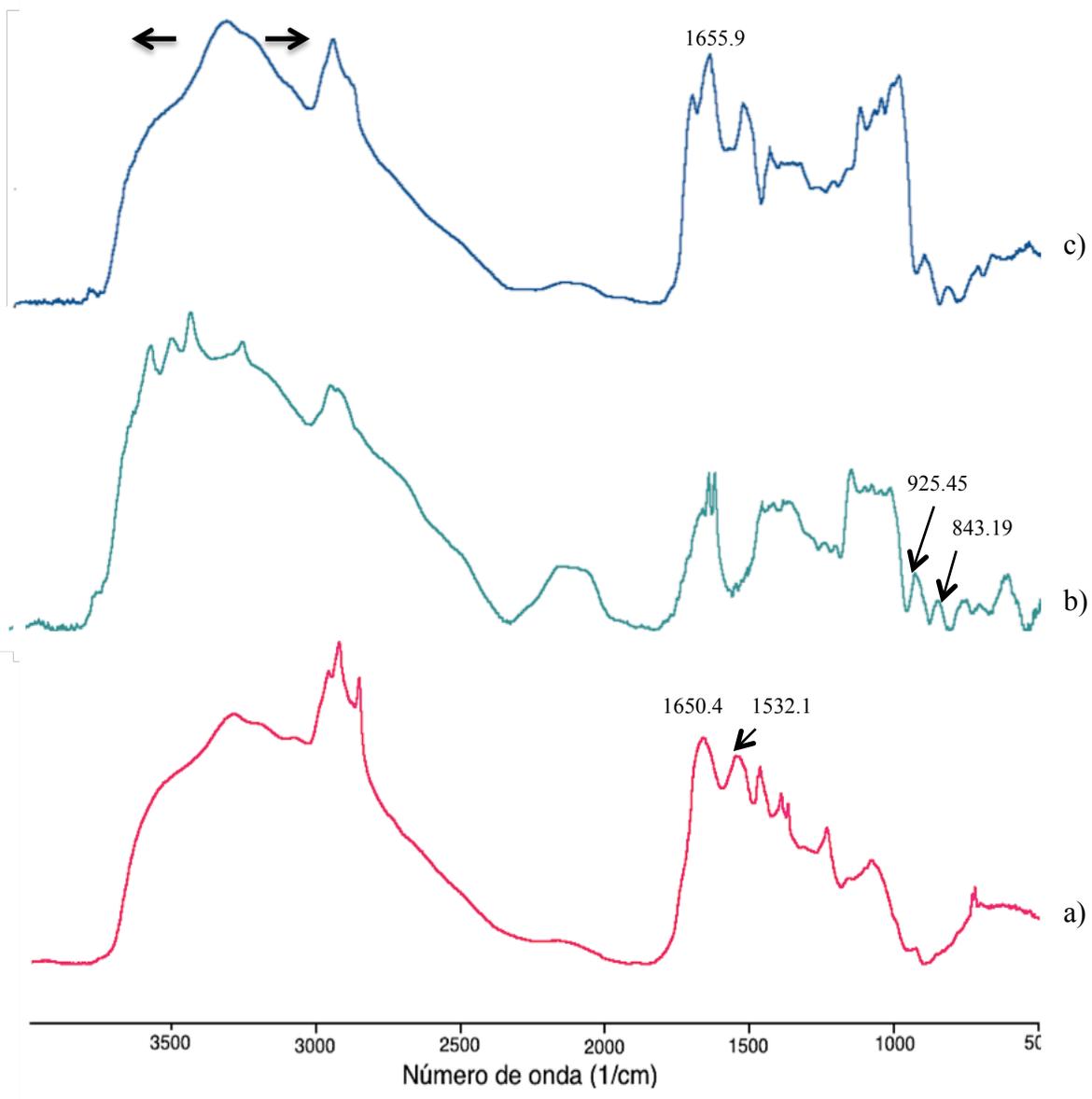


Figura 9. Espectro FTIR de las fibras obtenidas a) aislado proteico de amaranto b) Pululano, c) Mezcla 50:50 APA-PUL .

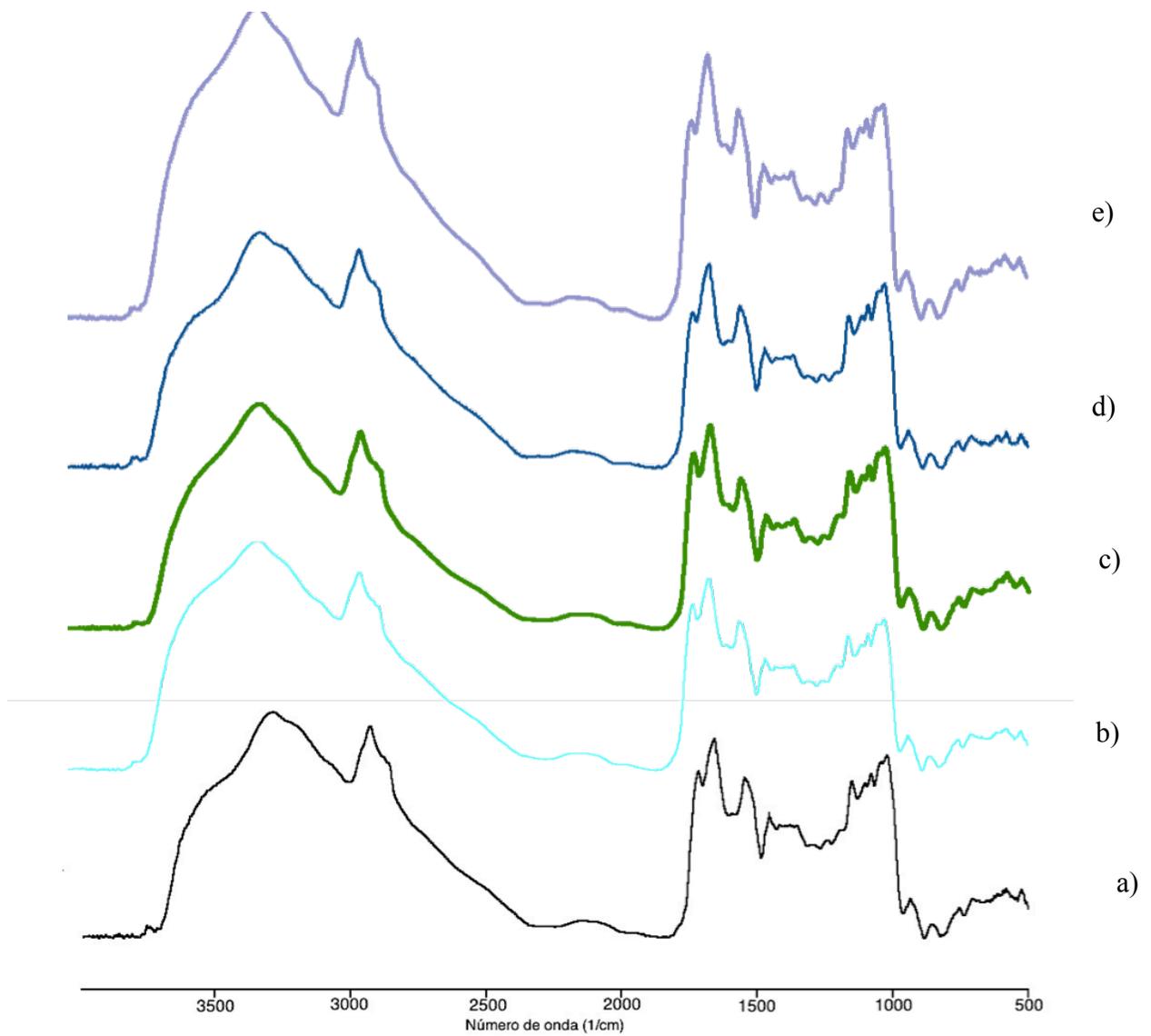


Figura 10. Espectro FTIR de los productos electroestirados a) 50:50 APA-PUL pediocina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, b) 50:50 APA-PUL pediocina 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, c) Mezcla 50:50 APA-PUL, d) 50:50 APA-PUL nisina 10 mg/mL y e) 50:50 APA-PUL nisina 10 mg/mL

7.1 Calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica primaria que mide las propiedades térmicas de los materiales, para establecer relaciones entre la temperatura y las propiedades físicas específicas de las sustancias (Gill *et al.*, 2010). En las muestras, se observaron dos eventos térmicos durante el ciclo de calentamiento, el primero corresponde a la temperatura de transición vítrea (T_g), definida como la temperatura a la cual un material pasa de un estado rígido y quebradizo como el vidrio a un estado de menor rigidez como el caucho, este cambio se relaciona con una mayor movilidad molecular al interior del material, pues los valores del C_p son mayores por encima de la temperatura de transición vítrea (Suriñach *et al.*, 1992). El segundo evento endotérmico fue el correspondiente al proceso de fusión del material, y es representado como la temperatura de fusión (T_m), que se relaciona con la estabilidad térmica de los polímeros y en el caso de proteínas con la desnaturalización por calentamiento (Johnson, 2013).

En la Cuadro 6 se presentan los valores de la temperatura de transición vítrea de los polímeros puros y de las mezclas electroestiradas, en cuanto a los valores de T_g se observa que las mezclas se encuentran en un intervalo entre los valores de T_g de los polímeros puros (62.13 - 92.78 °C), lo cual es un indicio de la miscibilidad que presentan los compuestos. Resultados similares han sido reportados por autores como Heunis *et al.* (2011), quienes elaboraron nanofibras de ácido poliláctico con la adición de planataracina, una bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum*, y observaron miscibilidad de los compuestos en la fase amorfa. En cuanto a la temperatura de fusión (Fig. 11) relacionada con la cristalinidad y la estabilidad térmica, se observó que al realizarse el proceso de electroestirado, el pico se desplazó a temperaturas mayores. Oliveira *et al.* (2014), reportó resultados similares al elaborar nanofibras de zeína cargadas con taninos, encontrando picos de 83 °C para zeína pura y de 120 °C para las mezclas electroestiradas. El aumento en la estabilidad térmica puede estar relacionado con

la formación de enlaces de hidrógeno entre el pululano y el aislado proteico de amaranto.

Cuadro 6. Propiedades térmicas de los polímeros y de las fibras electroestiradas.

Muestra	Tg (°C)	Tm (°C)	ΔH (J/g)
APA	67.13±0.15 ^e	171.92 ±2.77 ^{ab}	166.40±2.26 ^b
Pululano	92.87±0.8 ^a	165.82±1.97 ^b	156.83±0.94 ^a
A	76.42±0.77 ^{bc}	174.96±3.69 ^a	63.19±2.44 ^c
B	78.41±0.9 ^b	180.83±0.41 ^a	70.80±1.65 ^c
C	76.36±0.95 ^{cd}	173.17±2.16 ^a	64.19±3.92 ^c
D	73.99±0.4 ^{cd}	173.41±1.91 ^a	66.59±3.92 ^c
E	74.02±0.83 ^d	176.08±2.91 ^a	62.14±2.05 ^c

A= Mezcla 50:50 APA-PUL, B: Mezcla 50:50 con 1 μg Pediocina, C: Mezcla 50:50 con 3 μg Pediocina, D: Mezcla 50:50 con 10 mg Nisina, E: Mezcla 50:50 con 20 mg Nisina Los resultados se presentan como la media ± el error estándar, letras diferentes representan diferencias significativas en la prueba de Tukey con un nivel de significancia de P=0.05%.

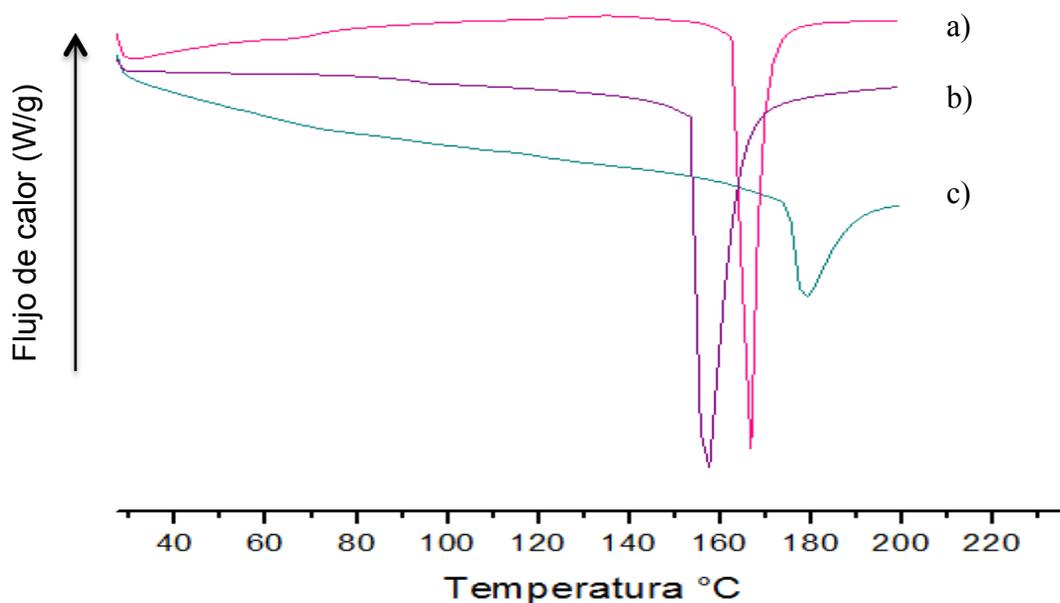


Figura 11. Termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido de a) Aislado Proteico de Amaranto (APA) b) Pululano y c) Mezcla A 50:50 APA:PUL.

7.2 Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación se relaciona con factores como la concentración del activo y el diámetro de las fibras, en el caso de las fibras de proteína de amaranto y pululano la eficiencia de encapsulación aumento conforme la concentración de activos incrementaba, este aumento esta relacionado con una mayor probabilidad de que las bacteriocinas interaccionen con el aislado proteico o pululano durante el proceso de electroestirado (Ji *et al.*, 2014), aumentando así la eficiencia de encapsulación, en el caso de pediocina se observa que la eficiencia incremento un 3% y en el de la nisina un 15% , alcanzando hasta un 95.41% de eficiencia de encapsulación en la concentración mas alta de nisina, los resultados obtenidos son superiores a los reportados por Prombutara *et al.*, en 2012 quienes elaboraron nanopartículas solido-lípido adicionadas con nisina alcanzando eficiencias hasta del 73,3%, lo cual puede deberse a la mayor afinidad entre los compuestos utilizados para la formación de las fibras como se demostró mediante los análisis térmicos y de espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier.

Cuadro 7. Eficiencias de encapsulación de las diferentes mezclas electroestiradas

Mezcla	Cantidad de activo	Eficiencia de encapsulación (%)
B	1 μ g	87 \pm 0.01 ^c
C	2 μ g	90.03 \pm 0.19 ^b
D	10 mg	80.82 \pm 0.06 ^d
E	20mg	95.41 \pm 0.10 ^a

B: Mezcla 50:50 con 1 μ g Pediocina, C: Mezcla 50:50 con 3 μ g Pediocina, D: Mezcla 50:50 con 10 mg Nisina, E: Mezcla 50:50 con 20 mg Nisina Resultados reportados como la media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa con un nivel de significancia de P=0.05% mediante la prueba de Tukey.

7.3 Análisis microbiológico

La descomposición de los alimentos es consecuencia de la actividad de los microorganismos que lo han contaminando, de la composición del alimento, del tiempo y de las condiciones en las que son almacenados. La acción microbiana predominante sobre las proteínas, lípidos o carbohidratos provoca cambios distintos, aun tratándose del mismo alimento (Fernández, 2000).

Los microorganismos deterioradores son aquellos que producen en alimento cambios organolépticos característicos del deterioro (Calleja *et al.*, 2010). Entre los principales microorganismos deterioradores encontramos a las bacterias ácido lácticas grupo del cual es característico el genero *Leuconostoc*, que se aísla de productos lácteos y cárnicos, vinos, frutas, hortalizas (en particular la remolacha), vegetales en fermentación, productos de panificación y de soluciones viscosas de azúcar. Son cocos en pares o en cadenas como los *Streptococcus* pero esta bacteria es heterofermentativa. Produce ácido láctico levógiro D(+), etanol y CO₂. Estas especies son mesófilas (óptimo: 20-30°C) y se caracterizan por la producción de ácido a partir del citrato de la leche, algunas bacterias pueden fermentar la crema con producción de diacetilo y a veces por la síntesis de dextranos y de levanos extracelulares en presencia de sacarosa. Se encuentra involucrado en el deterioro de alimentos ricos en carbohidratos simples, pero utilizados en forma controlada, se usan en la elaboración de algunos quesos debido a la generación de aromas apreciables (Jay, 1992). Otro grupo representativo es el genero *Lactobacillus* comprende bacterias Gram positivas, en forma de bastoncillos, esporógenas, catalasa negativa, aerotolerantes o anaerobios, acidófilos, con requerimientos nutricionales muy complejos, vitaminas, aminoácidos. Incluye especies homofermentativas obligadas las cuales se dividen en termófilos y mesófilos, heterofermentativas facultativas y heterofermentativas obligadas. Producen mayor cantidad de ácido láctico que los *Streptococcus* y tienen una intensa actividad proteolítica, la cual se aprovecha en la maduración de

los quesos (Leveau y Bouix, 2000).. En este grupo encontramos a *Lactobacillus sakei* implicadas en la aparición de mucosidad en productos cárnicos como las salchichas (Calleja *et al.*, 2010), mientras que *Listeria monocytogenes* es un patógeno Gram-positivo importante que puede ser transmitido al ser humano a través del consumo de contaminados alimentos, es un microorganismo ubicuo en el medio ambiente, es la principal causa de hospitalización y muerte en Europa (Spanu *et al.*,2015; Gómez *et al.*,2014). Estos microorganismos son objeto de estudio en el presente trabajo, el cuadro 8 podemos observar los resultados de la actividad antimicrobiana la cual fue medida mediante la técnica de difusión en placa, en donde podemos observar que la mezcla A, correspondiente a las fibras que no contiene activos encapsulados, no presentó actividad antimicrobiana (Figura 12), demostrándose que la actividad antimicrobiana se atribuye únicamente a las bacteriocinas presentes en las muestras de fibras cargadas.

Todas las fibras con activo presentaron actividad antimicrobiana contra los tres microorganismos. Existió una disminución de la actividad con respecto al control (activo libre), esto se debe a que la nisina no se libera por completo a las 24 horas de incubación, por lo tanto no ejerce la misma actividad antimicrobiana que el compuesto puro. Podemos observar que los diámetros de inhibición son proporcionales a la concentración de bacteriocinas adicionadas, tal como lo observaron Nguyen *et al.* 2008 y Gao *et al.* 2014, en películas de celulosa con nisina y ϵ -polilisina, respectivamente, teniendo la mayor actividad frente a *L. sakei*.

Cuadro 8. Diámetros de los halos de inhibición de las fibras cargadas con bacteriocinas y los compuestos puros

Mezcla	<i>L. mesenteroides</i> (mm)	<i>Lactobacillus sakei</i> (mm)	<i>L. monocytogenes</i> (mm)
Nisina	20 ± 0.152	12 ± 0.14	11.5 ± 0.5
Pediocina	13.5 ± 0.5	25.6 ± 0.31	14. ± 0.02
A	--	--	--
B	7.5 ± 0.07	10 ± 0.1	11.5 ± 0.05
C	12 ± 0.14	22 ± 0.09	14. ± 0.1
D	15.5 ± 0.35	8.5 ± 0.5	7.5± 0.5
E	16.5± 0.05	9.5 ± 0.5	9 ± 0.05

A= Mezcla 50:50 APA-PUL, B: Mezcla 50:50 con 1µg Pediocina, C: Mezcla 50:50 con 3 µg Pediocina, D: Mezcla 50:50 con 10 mg Nisina, E: Mezcla 50:50 con 20 mg Nisina Resultados reportados como la media ± error estándar

-- No presenta actividad antimicrobiana

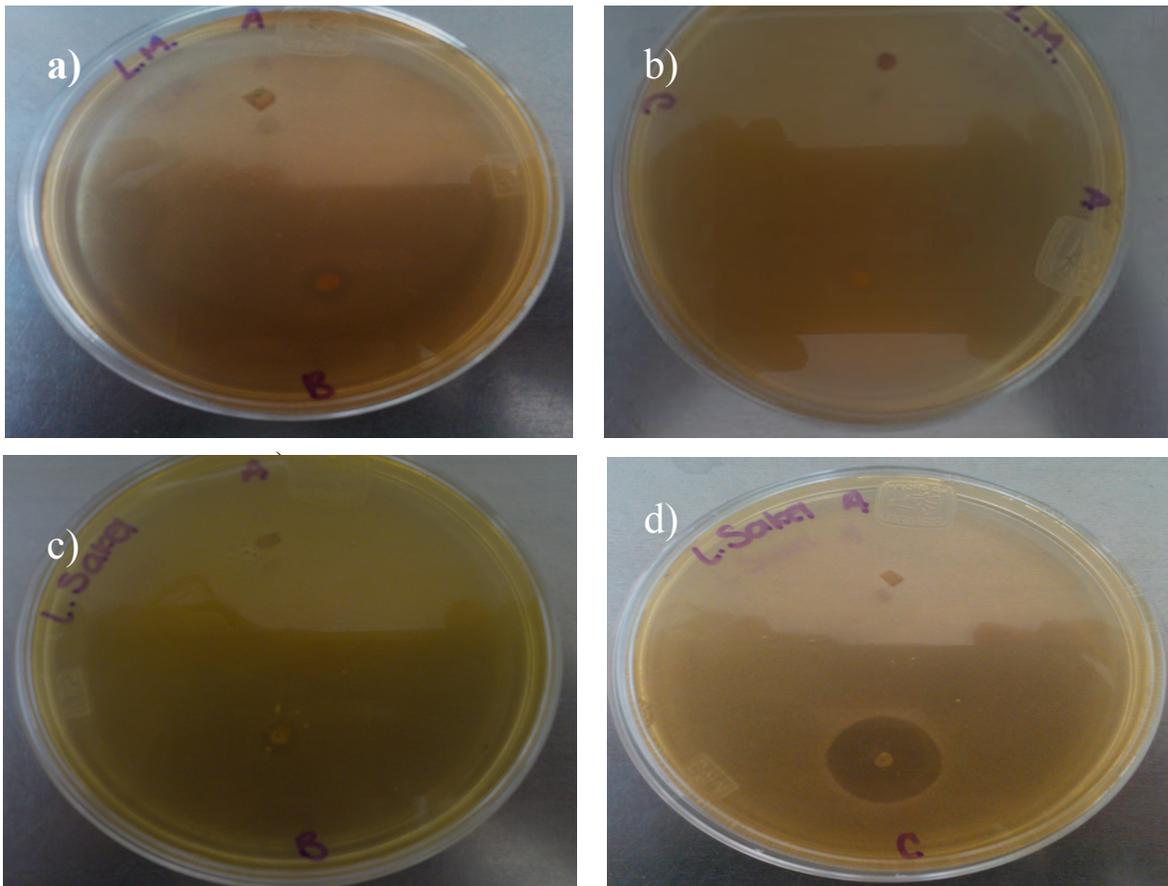


Figura 12. Actividad antimicrobiana de las diferentes fibras obtenidas en el proceso de electroestirado, contra *Leuconostoc mesenteroides* a) pediocina 1 mg/mL b) nisina 5 mg/mL y *Lactobacillus sakei* c) pediocina 1 mg/mL d) nisina 10 mg/mL

8 Conclusiones

La viscosidad y la conductividad eléctrica de las soluciones poliméricas utilizadas en el proceso de electroestirado se ven afectadas por la adición de bacteriocinas, estos cambios en la propiedades de la solución se ven reflejados en la morfología de las fibras obtenidas, principalmente en el diámetro, el cual disminuye hasta en un 50% en la mezcla con una mayor concentración de nisina.

La caracterización química de las fibras electroestiradas indica que existe miscibilidad entre los compuestos utilizados para su elaboración y que las interacciones que se llevan a cabo son por enlaces de hidrógeno, que mejoran propiedades de estabilidad térmica.

Las fibras electroestiradas presentan actividad antimicrobiana después del proceso de electroestirado.

Se logró incorporar bacteriocinas a estructuras nanométricas unidimensionales como las nanofibras electroestiradas. La ventaja de utilizar ingredientes permitidos en la industria de alimentos representa un potencial de aplicación. Por lo anterior se requieren estudios de liberación bajo diferentes condiciones de pH y actividad enzimática de las nanofibras cargadas con nisina, ligados ensayos microbiológicos.

9 Bibliografía

- Abugoch Lilian E., Martínez E. Nora, and Añón M. Cristina. (2003). Influence of the extracting solvent upon the structural properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) glutelin. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 51:4060-4065.
- Aceituno-Medina Marysol. (2011). Desarrollo y caracterización de nanofibras electroestiradas basadas en proteína aislada de amaranto como vehículos para la encapsulación de compuestos antioxidantes. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Aceituno-Medina Marysol, López-Rubio Amparo, Mendoza Sandra, Lagarón José María. (2013) Development of novel ultrathin structures based in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolate through electrospinning. *Food Hydrocolloids* 31:289-298.
- Alquicira Páez Lizbeth. (2006). Determinación del mecanismo de resistencia a la acción inhibitoria de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Arqués J.L., Rodríguez E., Nuñez M., Medina M. (2008). Antimicrobial activity of nisin, reuterin, and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in cuajada, a semisolid dairy product manufactured in Spain. *Journal of Dairy Science* 91:70–75.
- Arqués J.L., Rodríguez E. , Nuñez M., Medina M. (2011). Combined effect of reuterin and lactic acid bacteria bacteriocins on the inactivation of food-borne. pathogens in milk. *Food Control* 22:457-461.

- Balciunas Eduardo Marcos, Castillo Martinez Fabio Andres , Dimitrov Todorov Svetoslav, Gombossy de Melo Franco B. D., Converti Attilio, Pinheiro Ricardo. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. *Food Control* 32: 134-142.
- Bhardwaj Nandana and Kundu Subhas C. (2010). Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* 28: 325–347.
- Bi Lin, Yang Lei, Narsimhan Ganesan, Bhunia Arun K., Yao Yuan. (2011). Designing carbohydrate nanoparticles for prolonged efficacy of antimicrobial peptide. *Journal of Controlled Release* 150: 150–156.
- Calleja Carlos A., Álvarez Lanzarote Ignacio, Björkroth Johana. (2010). Nuevas tecnologías en la conservación y transformación de alimentos. Instituto Tomás Pascual Sanz. Madrid, España.
- Caracciolo P. C., Buffa F. A. y Abraham G. A. (2008). Matrices poliuretánicas nanofibrosas obtenidas por el proceso de electrospinning. Segundo Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales.
- Castro Gustavo, Valbuena Emiro, Bríñez Wilfido, Sánchez Egar, Vera Henry y Tovar Armando. (2009). Comparación del empleo de nisina y cultivos de *Lactococcus lactis subsp. Lactis* para la biopreservación de queso blanco. *Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias-LUZ* 14(2): 201–209.
- Chen H. and Hoover D.G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Food Science and Food Safety* 2: 82–100.

- Chen Xiangyan, Rua Yi, Chen Fengliang , Wang Xianchang, Zhao Xiaoyan , Ao Qiang. (2013). FTIR spectroscopic characterization of soy proteins obtained through AOT reverse micelles. *Food Hydrocolloids* 31: 435-437.
- Colla E., Sobral P. J. A. and Menegalli F. (2006). Effect of composite edible coating from *Amaranthus cruentus* flour and stearic acid on refrigerated strawberry (*Fragaria ananassa*) quality. *Latin American Applied Research* 36: 449-254.
- Condés María Cecilia, Speroni Francisco, Mauri Adriana, Añón María Cristina. (2012). Physicochemical and structural properties of amaranth protein isolates treated with high pressure. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 14:11–17.
- Cordero de los Santos M.Y., Osuna-Castro J.A., Borodanenko A.,O. Paredes-López. (2005). Physicochemical and functional characterization of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates obtained by isoelectric precipitation and micellisation. *Food Science and Technology International* 1(4): 269–280.
- Deitzel, J. M., Keinmeyer, J., Harris, D., & Tan, N. C. B. (2001). The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer* 42: 261-272.
- Díez Aldama Lorena. (2011). Efecto de agentes enológicos y pediocina Pa-1 sobre bacterias lácticas del vino. Tesis doctoral. Universidad de la Rioja, España.
- Duque Sánchez Lina Marcela, Rodríguez Leonardo, López Marcos. (2013). Electrospinning: la era de las nanofibras. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 14(1): 10-27.

- Frenot Audrey and Loannis S. Chronakis. (2003). Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 8: 64–75.
- Gamboa W.; Mantilla O.; Castillo V. (2007). Producción de micro y nanofibras a partir de la técnica de “electrospinning” para aplicaciones farmacológicas. Séptimo Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería.
- Gao C., Yan T., Du J. He F., Luo H., Wan Y. (2014). Introduction of broad spectrum antibacterial properties to bacterial cellulose nanofibers via immobilising ϵ -polylysine nanocoatings. *Food Hydrocolloids* 36: 204-211.
- Gill Pooria, Moghadam Tahereh Tohidi and Ranjbar Bijan. (2010). Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience. *Journal of Biomolecular Techniques* 21:167–193.
- Glassford Stefanie E., Byrne Bernadette, Kazarian Sergei G. (2013). Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1834: 2849–2858.
- Gorinstein, S., Delgado-Licon, E., Pawelzik, E., Permady, H.H., Weisz, M., Trakhtenberg, S. (2001). Characterization of soluble amaranth and soybean proteins based on fluorescence, hydrophobicity, electrophoresis, amino acid analysis, circular dichroism, and differential scanning calorimetry measurements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5595-5601.
- Haris Parvez I. and Severcan Feride. (1999). FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 7: 207–221.

- Heunis Tiaan, Bshena Osama, Klumperman Bert and Dicks Leon. (2011). Release of bacteriocins from nanofibers prepared with combinations of poly (D,L-lactide) (PDLLA) and poly(ethylene oxide) (PEO). *International Journal of Molecular Science* 12: 2158-2173.
- Hill C., Ness I., and Ross P. (2011). Bacteriocins and the LAB Symposia: a celebration of 30 years of progress. In the 10 LAB Symposium. Ed.24 Media.
- Homayoni Homa, Seyed Abdolkarim Hosseini Ravandi , Valizadeh Masoumeh. (2009). Electrospinning of chitosan nanofibers: processing optimization. *Carbohydrate Polymers* 77:656–661.
- Ibarguren Carolina, Naranjo Pablo M., Stötzel Christian, Audisio M. Carina, Shama Edgardo L., Farfán Torres E. Mónica, Müller Frank A. (2014). Adsorption of nisin on raw montmorillonite. *Applied Clay Science* 90: 88–95.
- Ignatova Milena; Manolova Nevena; Rashkov Iliya. (2007). Novel antibacterial fibers of quaternized chitosan and poly (vinyl pyrrolidone) prepared by electrospinning. *European Polymer Journal* 43: 1112-1122.
- Imran Muhammad, Revol-Junelles Anne-Marie, René Noémie, Jamshidian Majid, Javeed Akhtar Muhammad, Arab-Tehrany Elmira, Jacquot Muriel, Desobry Stéphane.(2012). Microstructure and physico-chemical evaluation of nano-emulsion-based antimicrobial peptides embedded in bioactive packaging films. *Food Hydrocolloids* 29: 407-419.
- Jay, J. M. (1992). *Microbiología moderna de los alimentos*. (Eds). ACRIBIA, Zaragoza, España pp. 441-449.

- Jia Baoquan, Zhou Jinping , Zhang Lina. (2011). Electrospun nano-fiber mats containing cationic cellulose derivatives and poly (vinyl alcohol) with antibacterial activity. *Carbohydrate Research* 346: 1337–1341.
- Joerger R. D. (2003). Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry Science* 82:640–647.
- Johnson Christopher M. (2013). Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 531: 100–109.
- Karim Mohammad Rezaul, Lee Hyun Woo, Kim Ran, Ji Byung Chul, Cho Jin Won, Son Tae Won, Oh Weontae, Hyun Yeuma Jeong. (2009). Preparation and characterization of electrospun pullulan/montmorillonite nanofiber mats in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers* 78: 336–342.
- Kong Lingyan and Ziegler Gregory R. (2014). Fabrication of pure starch fibers by electrospinning. *Food Hydrocolloids* 36: 20-25.
- Li Kang-Kang, Yin Shou-Wei, Yin Ye-Chong, Tang Chuan-He, Yang Xiao-Quan, Wen Shao-Hong. (2013). Preparation of water-soluble antimicrobial zein nanoparticles by a modified antisolvent approach and their characterization. *Journal of Food Engineering* 119: 343–352.
- Leveau, J. y Bouix, M. (2000). *Microbiología Industrial, Los microorganismos de interés industrial*. (Eds). ACRIBIA, Zaragoza, España pp. 220-242.
- Magalhães Luana and Nitschke Marcia. (2013). Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. *Food Control* 29:138-142.

- Martínez E.N. and Añón M.C. (1996). Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 2523-2530.
- Mattilaa Kirsi, Sarisb Per, Työppoönen Susanna. (2003). Survival of *Listeria monocytogenes* on sliced cooked sausage after treatment with pediocin ach. *International Journal of Food Microbiology* 89: 281–286.
- Mendonça Simone, Saldiva Paulo H., Cruz Robison J., Arêas José A.G. (2009). Amaranth protein presents cholesterol-lowering effect. *Food Chemistry* 116: 738–742.
- Miller Lisa M., Bourassa Megan W. Smith Randy J. (2013). FTIR spectroscopic imaging of protein aggregation in living cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1828: 2339–2346.
- Mitić Ž., Nikolić, Cakić G.S. M., Premović, P. Ilić Lj. (2009). FTIR spectroscopic characterization of Cu (II) coordination compounds with exopolysaccharide pullulan and its derivatives. *Journal of Molecular Structure* 924–926: 264–273.
- Moreno Cortez I. (2010). Inmovilización de enzimas en nanofibras poliméricas mediante la técnica de electrohilado para su aplicación en biosensores y sistemas de liberación de proteínas. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Nguyen, V. T., Gidley, M. J., & Dykes, G. A. (2008). Potential of a nisin-containing bacterial cellulose film to inhibit *Listeria monocytogenes* on processed meats. *Food Microbiology* 25(3), 471-478.
- Nieuwland M., Geerdink P., Brier P., Eijnden P. van den, Henket Jolanda T.M.M.,

Okutan Nagihan, Terzi Pinar, Altay Filiz. (2014). Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers. *Food Hydrocolloids* 39: 19-26.

Okutan Nagihan, Terzi Pinar, Altay Filiz. (2014). Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers. *Food Hydrocolloids* 39: 19-26.

Oliveira Mori Cláudia L.S. de, Passosa Nathália Almeida dos, Oliveira Juliano Elvis, Capparelli Mattosod Luiz Henrique, Akira Moric Fábio, Guimarães Carvalhoc Amélia, Souza Fonseca Alessandra de, Denzin Tonoli Gustavo Henrique. (2014) Electrospinning of zein/tannin bio-nanofibers. *Industrial Crops and Products* 52 298: 304.

P201131705 Patent Application. (2011). Micro, submicro y nanoestructuras basadas en proteína de amaranto. Inventors: A. López-Rubio, J. M. Lagaron, M. Aceituno-Medina, & S. Mendoza. Holder entity: CSIC & University of Querétaro.

Ping Neo Yun, Ray Sudip, Jin Jianyong, Gizdavic-Nikolaidis Marija, Nieuwoudt Michel K., Liu Dongyan, Young Quek Siew. (2013). Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique: A physicochemical study based on zein–gallic acid system. *Food Chemistry* 136: 1013–1021.

Prombutara Pinitphon, Kulwatthanasal Yokruethai, Supaka Nuttapun Sramala, Issara, Chareonpornwattana Supat. (2012). Production of nisin-loaded solid lipid nanoparticles for Sustained antimicrobial activity. *Food Control* 24: 184-190.

- Renye Jr. J.A., Somkuti G.A., Garabal J.I., L. Duc. (2011). Heterologous production of pediocin for the control of *Listeria monocytogenes* in dairy foods. *Food Control* 22: 1887-1892.
- Reviriego Herráez Carlota. (2009). *Lactococcus lactis* productores de pediocina Pa-1 y enterococos aislados de leche materna como agentes bioconservantes en quesos. Tesis de doctorado. Universidad Complutense de Madrid.
- Rogina Anamarija. (2014). Electrospinning process: Versatile preparation method for biodegradable and natural polymers and biocomposite systems applied in tissue engineering and drug delivery. *Applied Surface Science* 296:221–230.
- Saeed, K., & Park, S. (2010). Preparation and characterization of multiwalled carbon nanotubes/polyacrylonitrile nanofibers. *Journal of Polymer Research*, 17: 535-540.
- Sanz-Penella J.M., Wronkowska M., Soral-Smietana M., Haros M. (2013). Effect of whole amaranth flour on bread properties and nutritive value. *Lwt -Food Science and Technology* 50: 679-685.
- Settanni Luca and Corsetti Aldo. (2008). Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* 121: 123–138.
- Sohrabi A. P Shaibani.M., H Etayash, K Kaur. Thundat T. (2013). Sustained drug release and antibacterial activity of ampicillin incorporated poly (methyl methacrylate) enylon 6 core/shell nanofibers. *Polymer* 54 (11): 2699–2705.
- Subbiah Thandavamoorthy; Bhat G. S.; Tock R. W.; Parameswaran S.; Ramkumar S. S. (2005). Electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 96:557-569.

- Sun Zhizeng, Zhong Jin, Liang Xiaobo, Liu Jiale, Chen Xiuzhu, and Huan Liandong. (2009). Novel mechanism for nisin resistance via proteolytic degradation of nisin by the nisin resistance protein nsr. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53(5): 1964–1973.
- Suriñach S., M. D. Baro, Bordas S., Clavaguera N., Clavaguera-Mora M. T. (1992). La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la Ciencia de Materiales. *BOL. SOC. ESP. CERAM. VIDR.* 31: 11:17.
- Thompson C.J., Chase G.G., Yarin A.L., Reneker D.H. (2007). Effects of parameters on nanofiber diameter determined from electrospinning model. *Polymer* 48: 6913-6922.
- Ventureira J.L., Martínez E.N., Añón M.C. (2012). Effect of acid treatment on structural and foaming properties of soy amaranth protein mixtures. *Food Hydrocolloids* 29: 272-279.
- Wongsasulak S., Patapeejumruswong M., Weiss J., Supaphol P., Yoovidhya T. (2010). Electrospinning of Food-Grade Nanofiber from cellulose acetate-egg albumen blends. *Journal of Food Engineering* 93: 370-376.
- Wu Jia, Zhong Fang, Li Yue, Shoemaker C.F., Xia Wenshui. (2013). Preparation and characterization of pullulanechitosan and pullulanecarboxymethyl chitosan blended films. *Food Hydrocolloids* 30:82-91.
- Xiao Dan and Zhong Qixin. (2011). In vitro release kinetics of nisin as affected by tween 20 and glycerol co-encapsulated in spray-dried zein capsules. *Journal of Food Engineering* 106:65–73.

Xiao Qian, Tong Qunyi, Lim Loong-Tak. (2014). Drying process of pullulan edible films forming solutions studied by ATR-FTIR with two-dimensional correlation spectroscopy. *Food Chemistry* 150:267–273.

Cuadro 9-1 Abreviatura revistas científicas

Food chemistry	J Mater Sci: Mater Med
Food Hydrocolloids	LWT - Food Science and Technology
Food Microbiology	Materials Letters
Food Technol.	
J. Agric. Food Chem.	
Food Control	
Acta Chim. Slov	

Cuadro 9-1 Abreviaturas

An.mat	análisis matemático	Min.	minutos
etc.	etcétera	h	horas
fig.	figura	µl	microlitros
°C	Grado centigrado	mS	mili Siemens
cl	centilitro	Cp	Centiposios
cm	centímetro	FTIR	Espectroscopía de infrarrojo
°K	grado Kelvin	µg	microgramos
mg	miligramo	EE	Eficiencia de encapsulación
mL	mililitro		
log	logaritmo base 10		
log _a	logaritmo base a		
mV	milivolts		
µm	micrometro		
nm	nanometro		
MJ	megajoule (s)		
ml	mililitro (s)		
mm	milímetro		