

Tesis Doctoral

Desarrollo de matrices biopoliméricas como soporte de los antimicrobianos naturales natamicina y nisina para la conservación de alimentos lácteos

Ollé Resa, Carolina Patricia

2015-03-05

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ollé Resa, Carolina Patricia. (2015-03-05). Desarrollo de matrices biopoliméricas como soporte de los antimicrobianos naturales natamicina y nisina para la conservación de alimentos lácteos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Ollé Resa, Carolina Patricia. "Desarrollo de matrices biopoliméricas como soporte de los antimicrobianos naturales natamicina y nisina para la conservación de alimentos lácteos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-05.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Industrias

Desarrollo de matrices biopoliméricas como soporte de los antimicrobianos naturales natamicina y nisina para la conservación de alimentos lácteos

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área Química Industrial

Lic. Carolina Patricia Ollé Resa

Directoras de Tesis: Dra. Rosa Juana Jagus

Dra. Lía Noemí Gerschenson

Consejera de estudios: Dra. Lía Noemí Gerschenson

Lugar de trabajo: Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería,
UBA y Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
UBA

Buenos Aires, 2014.

Fecha de defensa: 05/03/2015

Desarrollo de matrices biopoliméricas como soporte de los antimicrobianos naturales natamicina y nisina para la conservación de alimentos lácteos

Resumen

En la actualidad, la exigencia de los consumidores está orientada al consumo de alimentos más saludables y seguros, formulados utilizando ingredientes y aditivos naturales. Es por ello que resulta de interés investigar el uso de antimicrobianos naturales como la nisina y natamicina. Estos se pueden aplicar directamente sobre los alimentos pero su eficiencia podría verse comprometida debido a que pueden interactuar con la matriz alimentaria o con el oxígeno y la humedad del ambiente, lo que conduciría a la pérdida de actividad. Con el objetivo de aumentar la vida útil de los alimentos y mejorar su seguridad, ha surgido un creciente interés en las películas comestibles portadoras de antimicrobianos. Estas películas representan un factor adicional de estrés a favor de la preservación de los alimentos debido a su potencialidad para liberar lentamente los antimicrobianos soportados, ayudando a su estabilidad y a mantener altas concentraciones del ingrediente activo en el lugar que se requiere. Adicionalmente, podrían reducir la cantidad de material de empaquetamiento tradicional utilizado, contribuyendo a la protección del ambiente y a la reducción del costo asociado al embalaje

En esta investigación se desarrollaron películas a base de almidón de mandioca conteniendo nisina y/o natamicina. Se evaluaron sus propiedades físico-químicas, mecánicas, de superficie y su actividad antimicrobiana frente a cultivos simples y mixtos. Se realizaron estudios de aplicación sobre la superficie de distintos tipos de queso, almacenados a distintas temperaturas. Se observó que los antimicrobianos naturales se encontraban biodisponibles, pudiendo controlar la población de los microorganismos presentes en el alimento evaluado. A su vez, estas películas mostraron ser buena barrera frente a una contaminación externa.

Palabras claves: películas comestibles, almidón de mandioca, natamicina, nisina, cultivo mixto.

Development of biopolymeric matrices for the support of the natural antimicrobials natamycin and nisin for the preservation of dairy products

Abstract

At present, consumers demand healthier and safer foods that are formulated using natural ingredients and additives. This trend promotes the research about the use of natural antimicrobials such as nisin and natamycin. These additives can be applied directly on the food but their efficiency may be compromised because they can interact with the food matrix or with atmospheric oxygen and moisture, leading to the loss of their activity. In order to increase the shelf life and improve food safety, there has been a growing interest in the use of edible films for supporting antimicrobials. These films represent an additional stress factor for the preservation of food because of their potential to slowly release antimicrobial supported, helping to maintain their stability as well as higher concentrations of the active ingredient at the site it is required. Additionally, they could reduce the amount of packaging material traditionally used, contributing to protect the environment and reducing the cost associated with packaging.

In this research, films based on cassava starch and containing nisin and/or natamycin were developed. Their physico-chemical, mechanical and surface characteristics and their antimicrobial activity against simple and mixed cultures, were evaluated. Studies of their application to the surfaces of different type of cheeses stored at different temperatures were performed. It was observed that natural antimicrobials were bioavailable, controlling the population of microorganisms in the tested food. Moreover, these films showed to be good barriers against an external contamination.

Key words: edible films, cassava starch, natamycin, nisin, mixed culture.

Agradecimientos

- ❖ A mi Directora, Rosa Jagus y a mi Directora y Consejera de estudio, Lía Gerschenson, por confiar en mí y permitirme ser parte de sus grupos de trabajo, por formarme, enseñarme, guiarme y por estar siempre presentes mostrando su apoyo y paciencia.
- ❖ A la Universidad de Buenos Aires, a la Facultad de Ingeniería y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por permitir mi formación de grado y de post-grado.
- ❖ Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por las becas que permitieron el desarrollo de mi Tesis.
- ❖ A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Industrial Victoria, Verónica, Gabriel, Sandra, por estar y compartir mates, ideas, experiencias de vida y de laboratorio.
- ❖ A todos los integrantes del Laboratorio de Optimización de la Calidad de Alimentos Preservados-LOCAP, en especial a la Dra. Silvia Flores, por hacerme sentir cómoda siempre y compartir tiempo en el laboratorio.
- ❖ A todos los integrantes del Laboratorio Biopolímeros, nanopartículas y coloides alimentarios con quienes compartimos muy lindos momentos en cumpleaños y Congresos.
- ❖ A los miembros del plantel no docente del Pabellón de Industrias, en especial a Marcelo, Daniel y Oscar por su colaboración, ayuda y sonrisa diaria a lo largo de estos años.
- ❖ A mis papás Zulma y Javier, a mis hermanos Andrea y Pablo y a Zulma, Daniel y Adriana. Por apoyarme siempre y ser mi soporte emocional indefinido.
- ❖ A Matías, por ser mi todo.
- ❖ A mis hijos Aluen y Uriel, por ser mi razón de vivir.

A mis padres y mis hermanos,
A Matías, Aluen y Uriel.

ÍNDICE

Resumen.....	i
Abstract.....	ii
Agradecimientos	iii

1. INTRODUCCIÓN GENERAL 7

1.1 QUESO 7

1.2 SUERO DE QUESO 9

1.3 SEGURIDAD ALIMENTARIA..... 11

1.3.1 Aspectos microbiológicos de la seguridad alimentaria 12

1.3.2 Levaduras de deterioro en alimentos 13

1.3.2.3 *Yarrowia lipolytica* 14

1.3.2.1 *Zygosaccharomyces rouxii* 14

1.3.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*..... 15

1.3.2.4 Estudios subcelulares: Microscopía electrónica de transmisión 16

1.3.3 Bacterias patógenas en alimentos..... 16

1.3.3.1 *Listeria*..... 17

1.3.4 Influencia del medio en la sobrevivencia de los microorganismos..... 19

1.4 TECNOLOGÍAS DE PRESERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS 22

1.5 ANTIMICROBIANOS NATURALES 24

1.5.1 Natamicina 28

1.5.1.1 Aplicación de natamicina en alimentos 30

1.5.2 Nisina 31

1.5.2.1 Aplicación de nisina en alimentos 35

1.6 PELÍCULAS COMESTIBLES..... 36

1.6.1 Almidones y derivados 41

1.6.2	Plastificantes	46
1.6.3	Aditivos	48
1.6.4	Constitución de las películas.....	49
1.6.5	Caracterización físico-química de las películas comestibles.....	50
1.6.5.1	<i>Propiedades mecánicas</i>	51
1.6.5.1.1	Ensayo de tracción.....	51
1.6.5.2	<i>Permeabilidad al vapor de agua</i>	54
1.6.5.3	<i>Solubilidad en agua</i>	55
1.6.5.4	<i>Color</i>	56
1.6.5.5	<i>Ángulo de contacto y humectabilidad</i>	58
1.6.6	Caracterización microscópica de las películas comestibles	59
1.6.6.1	<i>Microscopía óptica</i>	59
1.6.6.2	<i>Microscopía de barrido electrónico ambiental</i>	60
1.6.6.3	<i>Microscopía de fuerza atómica</i>	60
1.6.7	Actividad antimicrobiana de las películas comestibles.....	61
1.6.7.1	<i>Estudio de la liberación de los antimicrobianos desde las películas comestibles hacia un sistema modelo sólido</i>	62
1.6.7.2	<i>Estudio de la actividad de barrera de las películas comestibles sobre un sistema modelo</i> . 63	
1.6.7.3	<i>Estudio de la liberación de los antimicrobianos desde las películas comestibles hacia un alimento</i>	64
1.6.7.4	<i>Estudio de la actividad de barrera de las películas comestibles sobre un alimento</i>	65

2. OBJETIVOS..... 66

2.1 OBJETIVOS GENERALES 66

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 66

3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	67
3.1 MATERIALES.....	67
3.1.1 Insumos y materias primas	67
3.1.2 Cepas.....	67
3.1.3 Medios de cultivo.....	68
3.2 MÉTODOS	69
3.2.1 Preparación de los inóculos.....	69
3.2.2 Preparación de los cultivos	70
3.2.3 Recuento de células viables.....	70
3.2.4 Microscopía electrónica de transmisión.....	71
3.2.5 Actividad antimicrobiana de natamicina y/o nisina en un alimento modelo líquido.....	72
3.2.6 Desarrollo de las películas	73
3.2.7 Preparación de soluciones para proceso de aplicación directa.....	76
3.2.8 Caracterización mecánica y físico-química de las películas comestibles.....	77
3.2.8.1 <i>Propiedades mecánicas de las películas: ensayo de tracción</i>	77
3.2.8.2 <i>Espesor</i>	78
3.2.8.3 <i>Permeabilidad al vapor de agua</i>	78
3.2.8.4 <i>Solubilidad en agua</i>	79
3.2.8.5 <i>Color</i>	80
3.2.8.6 <i>Ángulo de contacto y humectabilidad</i>	80
3.2.9 Caracterización microscópica	82
3.2.9.1 <i>Microscopía óptica</i>	82
3.2.9.2 <i>Microscopía de barrido electrónico ambiental</i>	82
3.2.9.3 <i>Microscopía de fuerza atómica</i>	82

3.2.10 Actividad antimicrobiana de las películas comestibles portadoras de natamicina y/o nisina	83
3.2.10.1 Estudio de la actividad de barrera de la película comestible conteniendo natamicina y/o nisina sobre un sistema modelo sólido	83
3.2.10.2 Estudio de la actividad de barrera de la película comestible conteniendo natamicina y/o nisina sobre un sistema modelo sólido, frente a contaminaciones producidas a distintos tiempos	85
3.2.10.3 Estudio de la liberación de natamicina y/o nisina desde la película hacia un sistema modelo sólido.....	86
3.2.10.4 Estudio de la actividad de barrera de la película comestible conteniendo natamicina y su combinación con nisina sobre queso Por Salut	87
3.2.10.5 Estudios de la liberación de natamicina y/o nisina desde la película hacia queso Por Salut	89
3.2.10.6 Estudio de la liberación de natamicina y nisina desde la película hacia distintos quesos a temperatura de refrigeración	90
3.2.10.7 Actividad acuosa de los quesos.....	91
3.2.11 Análisis estadístico	92

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 93

4.1 PELÍCULAS COMESTIBLES CONTENIENDO NATAMICINA 93

4.1.1 Evaluación preliminar de actividad antimicrobiana de natamicina.....	93
4.1.2 Estudio del efecto de la natamicina sobre células de <i>S. cerevisiae</i> tratadas.....	96
4.1.3 Caracterización físico-química de las películas comestibles.....	98
4.1.3.1 Propiedades mecánicas de las películas: ensayo de tracción.....	98
4.1.3.2 Permeabilidad al vapor de agua	100

4.1.3.3 Solubilidad en agua	101
4.1.3.4 Color	102
4.1.4 Caracterización microscópica de las películas comestibles	103
4.1.5 Actividad antimicrobiana de las películas comestibles portadoras de natamicina	104
4.1.5.1 Estudio de la actividad de barrera de la película comestible conteniendo natamicina sobre un sistema modelo sólido.....	104
4.1.5.2 Estudio de la actividad de barrera de la película comestible conteniendo natamicina sobre un sistema modelo sólido, frente a contaminaciones producidas a distintos tiempos	107
4.1.5.4 Estudio de la liberación de natamicina desde la película hacia un sistema modelo sólido	110
4.1.5.5 Estudio de la actividad de barrera de la película comestible conteniendo natamicina sobre queso Por Salut	113
4.1.5.6 Estudios de liberación de natamicina desde la película hacia queso Por Salut	115
4.1.6 Conclusiones	118
4.2 PELÍCULAS COMESTIBLES CONTENIENDO NATAMICINA Y NISINA	120
4.2.1 Evaluación preliminar de actividad antimicrobiana de natamicina y nisina.....	120
4.2.2 Caracterización físico-química de las películas comestibles.....	122
4.2.2.1 Propiedades mecánicas: ensayo de tracción.....	122
4.2.2.2 Permeabilidad al vapor de agua	125
4.2.2.3 Solubilidad.....	126
4.2.2.4 Color	127
4.2.2.5 Ángulo de contacto y humectabilidad.....	129
4.2.3 Caracterización microscópica de las películas comestibles	132
4.2.3.1 Microscopía de barrido electrónico ambiental	132
4.2.3.2 Microscopía de fuerza atómica	134
4.2.4 Correlación entre los parámetros estudiados	137

4.2.5 Actividad antimicrobiana de las películas comestibles portadoras de natamicina y nisina	139
4.2.5.1 Estudio de la actividad de barrera de la película comestible conteniendo natamicina y nisina sobre un sistema modelo sólido	139
4.2.5.2 Estudio de la actividad de barrera de la película comestible conteniendo natamicina y nisina sobre un sistema modelo sólido, frente a contaminaciones durante el almacenamiento	140
4.2.5.3 Estudio de la liberación de natamicina y nisina desde la película hacia un sistema modelo sólido	142
4.2.5.4 Estudio de la actividad de barrera de la película comestible conteniendo natamicina y nisina sobre queso Por Salut	147
4.2.5.5 Estudio de la liberación de natamicina y nisina desde la película hacia queso Por Salut	152
4.2.5.6 Estudio de la liberación de natamicina y/o nisina desde la película hacia distintos tipos de queso a temperatura de refrigeración	155
4.2.2 Conclusiones	162

5. CONCLUSIONES GENERALES.....165

6. REFERENCIAS.....167

7. GLOSARIO187

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Queso

El queso es un antiguo alimento cuyos orígenes pueden ser anteriores a la historia escrita. Su técnica de elaboración seguramente fue descubierta por diversas comunidades al mismo tiempo. Las ovejas fueron domesticadas hace 12.000 años y en el antiguo Egipto se cuidaban vacas y se las ordeñaba para obtener la leche por lo que es lógico pensar que también harían quesos. La leche se conservaba en recipientes de piel, cerámica porosa o madera, pero como era difícil mantenerlos limpios, la leche fermentaba con rapidez. Probablemente, el siguiente paso fue el de extraer el suero de la cuajada para elaborar algún tipo de queso fresco, sin cuajo, de sabor fuerte y ácido. Existen leyendas que relatan que un pastor árabe volvía a su morada con la leche de las ovejas dentro de una bolsa hecha con la tripa de uno de sus corderos y que después de caminar a pleno sol, al abrir la bolsa la leche estaba cuajada, sólida, hecha queso (Beckett, 2010).

En la antigüedad se encuentran muchas referencias sobre el queso fresco cuajado. Los romanos lo incluían en su dieta condimentándolo con tomillo, pimienta, piñones y otros frutos secos; cuando sus soldados se asentaban en un campamento, elaboraban queso. En la antigua Grecia no se comía solo sino mezclado con harina, miel, aceite, pasas y almendras y se encuentra en recetas antiguas de platos y postres muy preciados. En la Edad Media, las órdenes religiosas se convirtieron en importantes zonas de actividad agrícola y el queso adquirió importancia durante los muchos días de ayuno en los que se prohibía comer carne, por lo que se crearon diferentes tipos de queso, aportando variedad a su limitada dieta.

Con el auge del comercio y el aumento de la población urbana, el queso se convirtió en un producto importante para la economía, empezó a comercializarse fuera de las zonas de producción y más allá de las fronteras y cuando se colonizó el Nuevo Mundo, se llevaron allí las tradiciones queseras europeas.

Inicialmente se utilizaba leche cruda, pero en la década de 1850 el microbiólogo Louis Pasteur descubrió la pasteurización, que cambió el proceso de

elaboración del queso y disminuyó considerablemente el riesgo de aparición de organismos que pudieran alterar el proceso.

La fabricación del queso se ha extendido por todo el mundo; esto ha llevado a contar con una notable diversidad de quesos que actualmente se estima en más de 1000 variedades diferentes. Los quesos pueden ser categorizados según Irlinger y Mounier, (2009) de acuerdo a:

- el origen de la leche (cabra, oveja o vaca),
- el contenido de materia grasa (extra grasa, grasa, semi grasa, bajo contenido en grasa o desgrasada),
- la consistencia de la pasta (extra duro, duro, semi duro, semi blando o blando),
- el periodo de maduración (tierno, semi curado, curado, viejo o añejo),
- el tipo de leche utilizada (leche cruda, leche pasteurizada, leche termizada o leche micro-filtrada),
- el tipo de elaboración (de granja, artesanales, de cooperativa o industriales),
- la intensidad del sabor (fresco-dulce, poco pronunciado, pronunciado, fuerte o muy fuerte),
- la tecnología de elaboración (frescos, de pasta blanda y de corteza enmohecida, de pasta blanda con corteza lavada, de pasta azul, de pasta prensada sin cocer, de pasta prensada cocida)

La producción del queso requiere de conocimientos técnicos específicos para controlar el crecimiento de los mohos, levaduras y bacterias que se inoculan en la leche y que poseen un papel importante en la obtención del sabor deseado, el aroma, la textura, el color, el aspecto y los elementos nutritivos del queso (Beresford y col., 2001; Irlinger y Mounier, 2009). Además de contener a los microorganismos inoculados en la leche necesarios para su elaboración, la superficie de los quesos puede ser colonizada por otros indeseables provenientes de una deficiente aplicación de buenas prácticas de manufactura durante el proceso, la maduración y el post-proceso. Estos microorganismos oportunistas no controlados generan mal

sabor, mal olor, decoloración y en algunas ocasiones pueden producir compuestos secundarios tóxicos. Esto es inaceptable para la mayor parte de los consumidores y riesgoso, lo cual provoca un impacto negativo en su aceptación (Lund y col., 2003). La presencia de estos microorganismos contaminantes depende de los requerimientos específicos de cada uno, de las características del queso como pH, actividad acuosa (a_w) y humedad y de la temperatura de almacenamiento (Welthagen y Viljoen, 1998).

En esta investigación se emplearon distintos tipos de queso para estudiar la actividad antimicrobiana de las películas desarrolladas. De acuerdo con el Código Alimentario Argentino (CAA, 2010), en el Capítulo VIII, se denomina Queso Por Salud (comercialmente llamado Port Salut) a un producto de alta humedad, graso, elaborado con leche entera o leche estandarizada, acidificada por cultivo de bacterias lácticas y coagulada por cuajo y/o enzimas específicas. La denominación de Queso Holanda, corresponde al producto de mediana humedad, semigraso, elaborado con leche parcialmente descremada, acidificada por cultivo de bacterias lácticas y coagulada por cuajo y/o enzimas específicas. Los quesos de menor humedad como el Queso Reggianito, son definidos por el CAA como quesos madurados que se obtienen por coagulación de la leche por medio del cuajo y/u otras enzimas coagulantes apropiadas, complementada por la acción de bacterias lácticas específicas. Son quesos de baja humedad y semigrasos o grasos. Deberán tener un contenido mínimo de 32 g de materia grasa /100 g del extracto seco.

1.2 Suero de queso

El suero de quesería es el efluente líquido producido durante la elaboración del queso. Es un material altamente nutritivo y a la vez, altamente contaminante. La elaboración del queso da inevitablemente lugar a la producción de un volumen importante de suero, generándose, en promedio, en una relación de 9:1 respecto del queso. Este efluente representa más del 93% del agua e incluye aproximadamente el 50% de los sólidos originales de la leche, comprendiendo el 25% de sus proteínas, el 8% aproximadamente de la materia grasa y el 95% de la lactosa, además de minerales y vitaminas (Gonzalez-Martinez y col., 2002).

Un aspecto importante a tener en cuenta en el proceso de elaboración de quesos es el destino final del suero producido. La eliminación del suero ha representado siempre un problema ambiental serio al contener gran cantidad de sustancias orgánicas con alta demanda biológica de oxígeno (DBO) (Korhonen y col., 1998). La DBO se define como la cantidad de oxígeno disuelto en el agua, consumido por los microorganismos para descomponer la materia orgánica. Es utilizado como parámetro del poder contaminante de las aguas. En base a la cantidad de materia orgánica que se desecha, se puede comparar el poder contaminante de una industria con el de una población en valores de número de habitantes equivalentes. Considerando que el poder contaminante de un habitante es de 70.000 mg por día de DBO y dado un efluente que tenga 35.000 mg/l de DBO como el suero de queso, con un volumen diario de ese efluente en una fábrica de queso de 30.000 litros, se infiere que el grado de contaminación diaria producida por este efluente equivale a una población de 15.000 habitantes, lo que da una idea muy clara de la magnitud de la contaminación ambiental que puede producir una sola fábrica si no se lo procesa en forma adecuada (<http://www.inti.gob.ar/lacteos/pdf/caracterizacion.pdf>).

Como solución a la contaminación ambiental derivada de este efluente, pueden aplicarse tratamientos físicos, químicos y/o biológicos con el fin de reducir la DBO, o bien, realizar el aprovechamiento integral o parcial de los efluentes para recuperar los componentes que posean una rentabilidad interesante. El procesamiento del suero como efluente resulta antieconómico dada la gran inversión necesaria para la instalación de una planta de tratamiento, siendo esta comparable a la inversión de una planta elaboradora (Leiva, 2003). Por otro lado, la fuerte demanda mundial de fuentes adicionales de proteínas, promovió un cambio de actitud hacia el suero, el cual comenzó a ser considerado como un producto de gran valor nutritivo y funcional que puede ser procesado para dar lugar a diferentes productos como la lactosa, los concentrados y los aislados proteicos. En países con una industria láctea desarrollada, el suero es procesado para su utilización en alimentos para consumo humano y, en menor medida, en alimentación animal (Korhonen y col., 1998).

1.3 Seguridad alimentaria

Los alimentos son un medio para mantener y disfrutar de la vida pero también son un vehículo de agentes extraños que pueden causar enfermedad y muerte. Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son un problema creciente de salud pública tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo.

El término "Alimentos seguros" tiene distintos significados según se tenga en cuenta opiniones de consumidores, académicos, gente de la industria o grupos con intereses especiales. Es por eso que casi cualquier definición de la seguridad alimentaria tomada en forma individual será demasiado simplista ya que no considerará el universo de opiniones al respecto (Schmidt y Rodrick, 2003). Para los consumidores, las descripciones de los alimentos seguros son en general muy prácticas y sencillas. Los consumidores difieren en edad, sexo, cultura, experiencia de vida, salud, conocimiento, necesidades nutricionales, situación familiar, poder adquisitivo, ocupación, educación y acceso a los medios de comunicación. Por lo tanto sus ideas de alimentos seguros pueden variar. Por ejemplo, algunos pueden considerar como alimentos seguros a aquellos que no producen enfermedades. Otros pueden describir alimentos seguros como los alimentos que están dentro de su vida útil y se han almacenado o distribuido a la temperatura adecuada. Algunos consumidores pueden definir alimentos seguros como los alimentos que no están "contaminados". La industria desarrolla y elabora sus productos, ocupándose de la seguridad alimentaria en concordancia con las reglamentaciones vigentes en cada país. Estas especificaciones definen los límites aceptables para los peligros químicos como las hormonas y pesticidas, los peligros físicos como fragmentos de metal y los peligros microbiológicos, como *Salmonella* spp. Y *Listeria* spp. entre otros (Elmi, 2004).

La Academia Americana de Microbiología (American Academy of Microbiology: AAM), describió alimentos seguros como: "Todos aquellos alimentos que, si se manejan adecuadamente en todas las etapas de producción, de procesamiento y de distribución, es poco probable que causen una enfermedad o lesión" (AAM, 1999). La Organización Mundial de la Salud (OMS; World Health Organization: WHO) y la Organización para la Agricultura y la Alimentación (Food and Agriculture

Organization: FAO) definen alimento seguro como “aquel alimento que es libre de todos aquellos peligros, ya sean crónicos o agudos, que puedan hacer que los alimentos perjudiquen la salud del consumidor” (FAO, 2003). Hoy en día la seguridad alimentaria es una de las 11 prioridades de la OMS y sus miembros adoptaron una resolución enérgica que reconoce la seguridad alimentaria como un tópico esencial para la salud pública (WHO, 2001).

1.3.1 Aspectos microbiológicos de la seguridad alimentaria

En el escenario de la seguridad alimentaria, el objetivo primario es garantizar la seguridad microbiológica. Los microorganismos han reemplazado a las adulteraciones químicas como el principal agente reconocido de intoxicación alimentaria en los últimos dos siglos. La situación se agrava debido a la gran cantidad de cambios a nivel internacional. Estos cambios incluyen el crecimiento exponencial de la población, la urbanización y los cambios en el estilo de vida, el consumo de alimentos mínimamente procesados listos para el consumo, el comercio internacional, el turismo internacional, y la escasez de agua potable en algunos sectores del planeta. Los alimentos son un buen sustrato para el desarrollo y contaminación microbiana, los cuales son reconocidos por los cambios indeseables y el deterioro presentado. Un aspecto más serio de la contaminación microbiana es la posibilidad de riesgos graves para la salud humana debido a la presencia de posibles microorganismos patógenos y/o sus metabolitos tóxicos los cuales llevan a brotes de intoxicación alimentaria. Los agentes patógenos reconocidos y transmitidos por los alimentos incluyen parásitos multicelulares, protozoos, hongos, bacterias, y virus (Varadaraj, 2010).

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son aquellas que se originan por la ingestión de alimentos contaminados con agentes patógenos en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor (OPS, 2002). De acuerdo a la información existente, la ocurrencia de ETA es una amenaza hacia la salud pública. Esto se debe al surgimiento de nuevas formas de transmisión, a la aparición de grupos poblacionales vulnerables y al aumento de la resistencia de los microorganismos patógenos. Los microorganismos peligrosos pueden llegar a los

alimentos en cualquier momento, desde que son producidos en el campo hasta que son servidos (Elmi, 2004).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) desarrolló las 5 claves de la Inocuidad de los Alimentos, cuya implementación constituye una manera accesible de evitar las ETA (OMS, 2004). Estas recomendaciones se basan en conservar la higiene; separar alimentos crudos y cocinados; cocinar completamente los alimentos; mantener los alimentos a las temperaturas recomendadas y usar agua potable y materias primas seguras.

1.3.2 Levaduras de deterioro en alimentos

Las levaduras son la principal fuerza impulsora detrás de varios procesos de fermentación de alimentos industriales, incluyendo la producción de cerveza, vino, sake, pan y chocolate. Históricamente, estos procesos se desarrollaron a partir de fermentaciones espontáneas, reacciones incontroladas basadas en la presencia de una mezcla compleja de microorganismos. Debido a que tales procesos espontáneos son generalmente inconsistentes e ineficaces y, a menudo conducen a la pérdida de la vida útil, la producción industrial en la actualidad utiliza cultivos iniciadores definidos (Steensels y Verstrepen, 2014). Actualmente, se han reconocido más de 800 especies de levaduras (Barnett y col., 2000). Sin embargo, sólo una pequeña fracción de éstas, aproximadamente 10 especies de levaduras, son responsables de las grandes pérdidas de alimentos procesados en todo el mundo (Pitt y Hocking, 2000) y son llamadas "levaduras de deterioro". La importancia de estas levaduras de deterioro está aumentando, ya que en el mundo moderno, una mayor proporción de alimentos está siendo procesada, conservada de alguna manera y almacenada o, está siendo transportada largas distancias antes de ser consumida. Los mecanismos por los que el crecimiento de las levaduras podrían influir en el proceso de maduración de los quesos son: la fermentación de lactosa residual, la utilización de ácido láctico (con el consiguiente aumento del pH), actividades proteolíticas y lipolíticas, y liberación de productos provenientes de autólisis (Ferreira y Viljoen, 2003).

Las levaduras son comúnmente contaminantes de la leche y productos lácteos y contribuyen al deterioro de los alimentos (Pitt y Hocking, 2000). Debido a la tolerancia de algunas especies de levaduras al bajo pH, a la baja a_w y a las altas concentraciones de NaCl, crecen bien tanto en la fabricación como en la maduración de productos lácteos (Roostita y Fleet, 1996). Las levaduras utilizadas en el desarrollo de esta investigación son *Zygosaccharomyces rouxii*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Yarrowia lipolytica*. Todas estas levaduras de deterioro comprenden cepas con características psicrotróficas por lo que podrían aumentar en número durante el almacenamiento en frío (Sorhaug y Stepaniak, 1997).

1.3.2.3 *Yarrowia lipolytica*

La levadura *Y. lipolytica* puede ser aislada de productos lácteos, así como de ensaladas que contengan carne o camarones. Se la puede encontrar con frecuencia en los quesos y también se informó que se asocia con el fenómeno de pardeamiento que se observa en este alimento (Lanciotti y col., 2005). Es incapaz de sobrevivir en condiciones anaerobias pero tiene propiedades clave que le ofrecen ventajas competitivas para el crecimiento y predominio en productos lácteos tales como la tolerancia a la alta concentración de sal y baja temperatura, capacidad de asimilación de lactato y citrato y la producción de enzimas extracelulares proteolíticas y lipolíticas (van den Tempel y Jakobsen, 2000; Suzzi y col., 2001).

1.3.2.1 *Zygosaccharomyces rouxii*

La levadura *Z. rouxii* posee características fisiológicas inusuales. Estas son en gran parte las responsables de su capacidad de causar deterioro, incluyendo la resistencia a los ácidos débiles, extrema osmotolerancia y la capacidad de fermentar los azúcares (James y Stratford, 2003; Vermeulen y col., 2012). Es una de las levaduras de deterioro más problemáticas (Martorell y col., 2005). Posee dos transportadores transmembrana con diferentes especificidades de sustrato que le confieren estas propiedades (Martorell y col., 2007; Pribylova y col., 2008). Se encuentra comúnmente en jugos de fruta, salsas, bebidas gaseosas, aderezos de ensalada, ketchup (James y Stratford, 2003) y también ha sido aislada de la

superficie de distintos quesos (Welthagen y Viljoen, 1998; Fox y col., 2004; Álvarez-Martín y col., 2007).

1.3.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *S. cerevisiae* es especialmente interesante, debido a que existe una muy buena comprensión de su fisiología, bioquímica y respuesta genética (Praphailong y Fleet, 1997; Betts y col., 2000). *S. cerevisiae* es uno de los modelos más adecuados para el estudio de problemas biológicos. Es un sistema eucariota, con una complejidad sólo ligeramente superior a la de la bacteria pero que comparte con ella muchas de sus ventajas técnicas. Suelen presentar forma esférica midiendo de 2,5 a 10 μm de ancho y de 4,5 a 21 μm de largo (**Figura 1.1**). Además de su rápido crecimiento, la dispersión de las células y la facilidad con que se replican cultivos y aíslan mutantes, destaca por un sencillo y versátil sistema de transformación de ADN (Lesage y Bussey, 2006). Por otro lado, la ausencia de patogenicidad permite su manipulación con mínimos riesgos. *S. cerevisiae* es una levadura ambiental y se aísla frecuentemente de quesos (Vasdinyei y Deák, 2003; Fox y col., 2004; Lopandic y col., 2006).

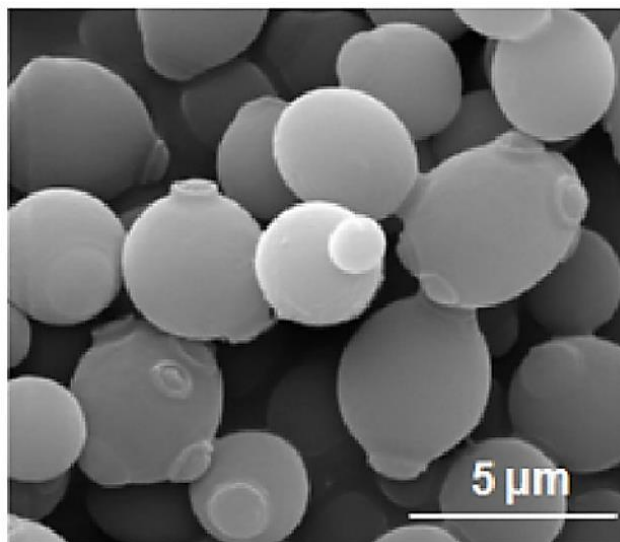


Figura 1.1: Micrografía de barrido electrónico de células de *Saccharomyces cerevisiae* (Sun y col., 2014).

1.3.2.4 Estudios subcelulares: Microscopía electrónica de transmisión

Un desafío actual de la ciencia es la visualización de la maquinaria intracelular responsable de las funciones celulares. Esto requirió una técnica microscópica innovadora capaz de estudiar las organelas celulares, muchas de las cuales son más pequeñas que la resolución ofrecida por el microscopio óptico. Para tal objetivo surgió la microscopía electrónica de transmisión (MET). Desde su invención, su principio básico se mantuvo sin cambios: el equipo cuenta con una columna que se encuentra al vacío en su interior, a través de la cual un haz de electrones alcanza la muestra. La muestra modifica la fase y amplitud del haz transmitido de modo que la imagen resultante contiene información de la muestra (Jonge y Ross, 2011). Debido a la dispersión de electrones dentro de la muestra, sólo pequeños objetos pueden ser observados con esta técnica (<0,5 µm de espesor). Las muestras de mayor tamaño deben ser seccionadas para su análisis. En el vacío presente en una columna de MET, el agua de una muestra biológica se evaporaría a temperatura ambiente modificando su estructura y dañando al microscopio. Por lo tanto es necesario eliminar el agua del material a observar. En las muestras de menor tamaño, la deshidratación se realiza mediante el secado por aire, mientras que las más grandes son fijadas químicamente antes de que el agua se sustituya por un solvente orgánico que permita la infiltración con una resina plástica. Luego, las muestras biológicas anteriormente blandas (debido a su alto contenido de agua) son lo suficientemente duras para ser cortadas en láminas delgadas y ser observadas en un MET sin dificultad. En esta preparación, la fijación química tiene dos objetivos: detener la actividad biológica de la muestra y estabilizarla para su posterior procesamiento (Hurbain y Sachse, 2011).

1.3.3 Bacterias patógenas en alimentos

Los alimentos, en algunos casos, podrían ser considerados como inseguros debido a la posible contaminación por bacterias patógenas, principalmente *Listeria monocytogenes* (Meyer Broseta y col., 2003), cepas productoras de enterotoxinas como *Staphylococcus aureus* (Lindqvist y col., 2002) y *Escherichiacoli*O157: H7 (Reitsma y Henning, 1996). En los alimentos lácteos, las fuentes de contaminación

pueden ser la leche cruda entregada desde el tambo, las condiciones ambientales y de manipulación en las etapas de procesamiento y/o postprocesamiento (Rudolf y Scherer, 2001).

1.3.3.1 *Listeria*

Las bacterias del género *Listeria* son bacilos cortos, regulares, de 0,4 a 0,5 μm de ancho por 0,5 a 2,0 μm de largo, que suelen distribuirse individualmente o en cadenas cortas con forma de "V". Son Gram positivas, no esporulan y no presentan cápsula (**Figura 1.2**). Son aerobios y anaerobios facultativos. En condiciones anaeróbicas el crecimiento es escaso (Buchrieser y col, 2003). Poseen de uno a cinco flagelos dispuestos de forma peritica que les confieren movilidad, aunque se inactivan a temperaturas superiores a 37°C (Allerberger, 2003). Es un organismo psicrótrofo con un amplio margen de temperaturas de crecimiento, entre 0°C y 45°C, siendo entre 30°C y 37°C su rango óptimo. En cuanto al pH, también tiene una amplia tolerancia pudiendo desarrollarse en valores de pH comprendidos entre 5 y 9,6, siendo 7,5 el valor óptimo.

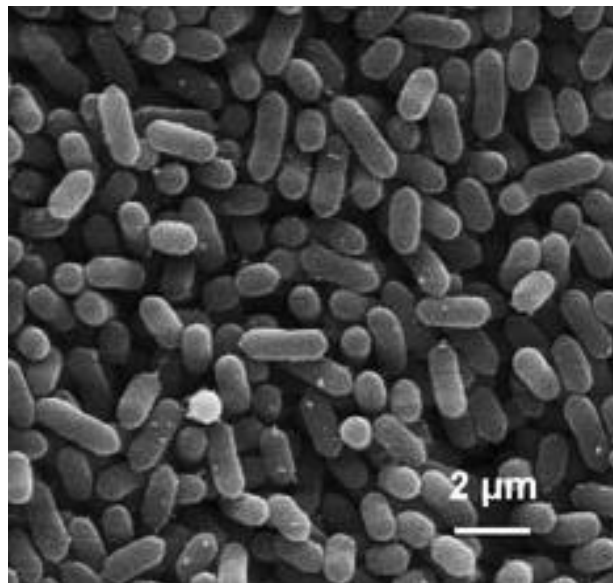


Figura 1.2: Micrografía de barrido electrónico de células de *Listeria monocytogenes* (Zameer y col, 2009).

Debido a sus características, las bacterias del género *Listeria* son muy resistentes y pueden detectarse en numerosos y diferentes lugares, aunque principalmente en sitios húmedos. *Listeria monocytogenes* es un patógeno intracelular facultativo de transmisión alimentaria que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y es el agente causante de la listeriosis, una grave enfermedad y, con frecuencia, mortal. Debido a sus elaborados mecanismos de adaptación fisiológicos, *L. monocytogenes* puede sobrevivir y proliferar en una gran variedad de alimentos, en condiciones ambientales adversas tales como bajo pH, alta salinidad y baja temperatura. Pero los alimentos mayormente implicados en los brotes de listeriosis son los alimentos listos para el consumo, tanto de origen animal como vegetal (Ryser y Marth, 2007). Particularmente, la contaminación del queso por *L. monocytogenes* recibió especial atención debido a numerosos casos de listeriosis, algunos incluyendo víctimas fatales en muchos países (De Buyser y col., 2001). Los últimos datos epidemiológicos de ocho estados de la Unión Europea (UE) indicaron que la incidencia de listeriosis en los seres humanos aumentó o se mantuvo relativamente alta desde el año 2000. La mayoría de los casos fueron relativos a ancianos y con condiciones médicas desfavorables (Angelidis y col., 2010).

Se ha determinado una cercanía filogenética importante, basada en estudios de evolución molecular y enzimática, entre *L. monocytogenes* y *Listeria innocua* (Glaser y col., 2001). *L. innocua* es una especie no patogénica empleada como marcador de *L. monocytogenes* ya que responde en forma similar frente a tratamientos físicos, químicos y térmicos (Vaz-Velho y col., 2001) y, adicionalmente, es aislada en quesos y en ambientes de plantas lácteas cuando se comprueba la contaminación de *L. monocytogenes* (Rudolf y Scherer, 2001). A su vez, varios investigadores han utilizado *L. innocua* como microorganismo no patógeno indicador de *L. monocytogenes* en la evaluación de métodos de conservación de distintos alimentos (Soares Pinto y col., 2009; Fernández y col., 2014).

1.3.4 Influencia del medio en la sobrevivencia de los microorganismos

La composición química, las condiciones de almacenamiento (temperatura, humedad, tiempo, sistema de empaquetamiento, luz) y la estructura de los alimentos, influyen en la supervivencia y el crecimiento de los microorganismos contaminantes. Wilson y col. (2002) investigaron la aplicación de modelos matemáticos para predecir el crecimiento microbiano en alimentos estructurados, y concluyeron que la estructura de los alimentos es un elemento clave para la proliferación de los microorganismos y la prolongación de la vida útil. Estos autores informaron que la estructura de los alimentos influye sobre el crecimiento microbiano, y condiciona los siguientes parámetros:

1. La distribución mecánica de agua.
2. La distribución de los productos químicos conservantes.
3. Las limitaciones físicas a la movilidad de los microorganismos.

Los microorganismos presentes en los alimentos pueden crecer tanto en la superficie como en el interior. Estos proliferan en la fase acuosa de los alimentos, sin embargo, la estructura de la fase no acuosa también es relevante para una acción eficaz de los conservantes. La combinación de diferentes microestructuras en los alimentos tiene una fuerte implicancia práctica, ya que, en cada una, el crecimiento microbiano parece ser diferente. En la **Tabla 1.1** se muestra un resumen del comportamiento de los microorganismos en las distintas microestructuras de los alimentos.

Tabla 1.1: Comportamiento de los microorganismos en las distintas microestructuras de los alimentos (adaptado de Wilson y col.(2002)).

Microestructura	Ejemplos de alimentos	Crecimiento de los microorganismos
Líquido	Sopas, jugos (líquidos uniformes con materiales en suspensión)	Crecimiento planctónico
Gel	Paté, mermeladas, quesos a base de leche descremada	Los microorganismos son inmovilizados y obligados a formar colonias
Emulsiones	Mayonesa, manteca	
Emulsiones en gel	Salchichas, queso	
Superficie	Vegetales, tejidos cárnicos	Formación de colonias en la superficie

La microestructura de los alimentos es un elemento clave para la elección de la forma de aplicación del antimicrobiano. Corbo y col. (2009) proponen tres preguntas clave en relación a este tema:

- el alimento, ¿es líquido o sólido estructurado?
- en caso que el alimento fuera estructurado, ¿le gustaría que el antimicrobiano inhiba patógenos y/o destruya la microflora interna (aplicación interna) o en la superficie (aplicación externa)?
- ¿el antimicrobiano migra hacia el interior del alimento o no?

Las respuestas a estas preguntas son claves para elegir una aplicación externa o interna del antimicrobiano. La **Figura 1.3** muestra una secuencia de decisiones para la aplicación de antimicrobianos según el tipo de microestructura del alimento y el lugar donde se sitúan los microorganismos patógenos y de deterioro de los

mismos, utilizando tecnologías de conservación. La aplicación externa se utiliza para inhibir la microflora en la superficie o en el interior del producto, si el antimicrobiano tiene la capacidad de migrar.

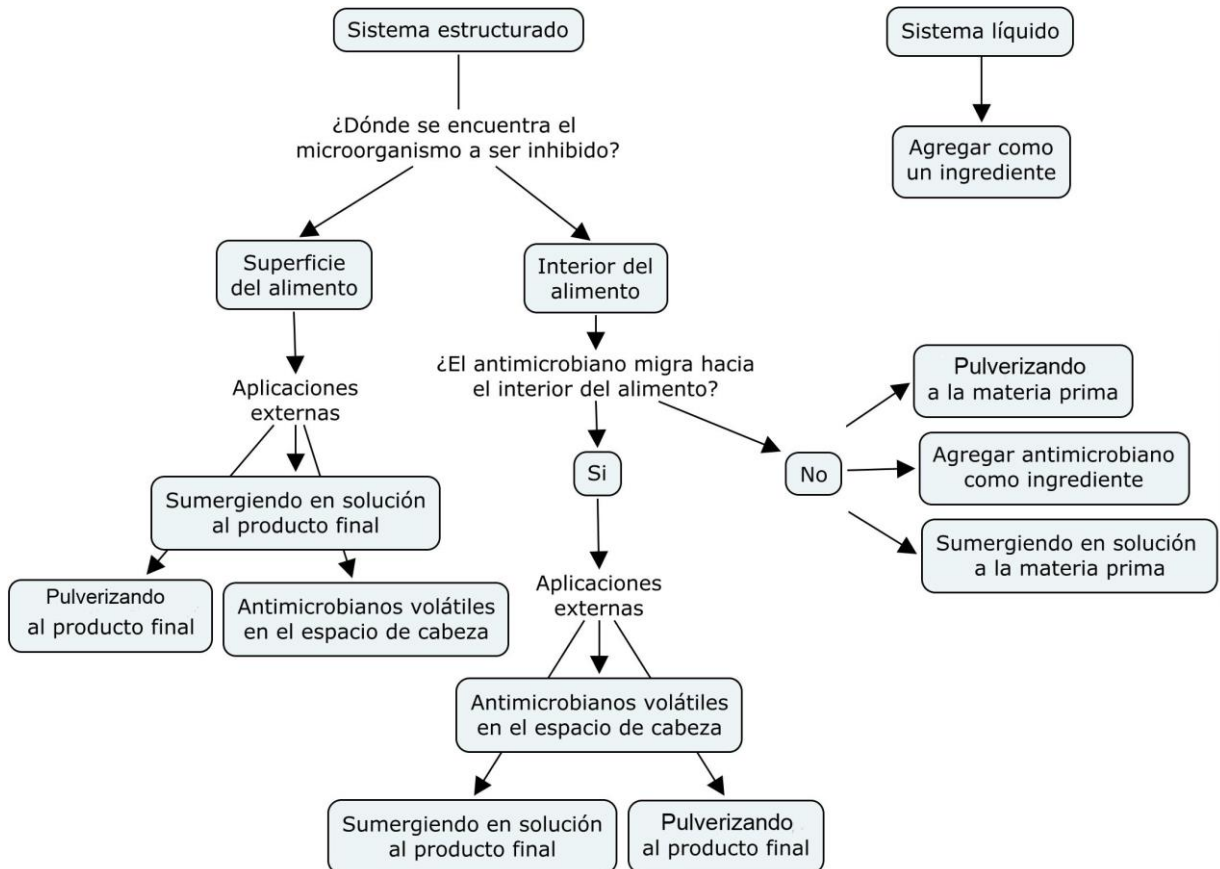


Figura 1.3: Tabla de decisiones para la aplicación de antimicrobianos según el tipo de microestructura del alimento (adaptado de Corbo y col. (2009)).

Si el agente antimicrobiano no migra y se desea inhibir el crecimiento de microorganismos en el interior del alimento, puede aplicarse durante la elaboración del alimento como un “ingrediente” adicional. Sin embargo, para la protección de la superficie de los alimentos existen distintas formas de aplicación externa, tales como inmersión del producto en una solución del antimicrobiano o aplicación directa del

mismo sobre el alimento (Corbo y col., 2008; Del Nobile y col., 2009). Una alternativa más novedosa es la incorporación de los antimicrobianos en los envoltorios de los alimentos. Esta tecnología tiene la ventaja de poder liberar estos compuestos en forma controlada hacia el seno del alimento, protegiendo a los antimicrobianos de su interacción con componentes del mismo.

1.4 Tecnologías de preservación de los alimentos

La calidad de los alimentos se encuentra afectada por factores físicos, químicos y microbiológicos (Lück y Jager, 1997). El control de dichos factores y, en especial, del microbiológico es esencial para la preservación de los alimentos. La aplicación de factores de estrés microbiológico es de gran utilidad para lograr la inhibición y/o muerte microbiana. Los factores principales que afectan la supervivencia y el crecimiento microbiano se pueden clasificar de la siguiente forma (Doyle y col., 2001):

- Factores intrínsecos: son aquellos inherentes al alimento. Incluyen los compuestos naturales que pueden estimular o retardar el crecimiento, también los compuestos añadidos como conservantes, el potencial redox, la actividad de agua y el pH entre otros.
- Factores extrínsecos: la temperatura, la humedad relativa y la composición gaseosa son los más importantes en relación al crecimiento y la fisiología microbiana.
- Factores implícitos y microbianos: son aquellos que involucran la conducta particular de cada microorganismo (tipo de microorganismo presente, velocidad y fase de crecimiento en la que se encuentran los mismos, relaciones que se establecen entre ellos, etc.)
- Factores de procesamiento: son aquellos que se aplican deliberadamente a un alimento para conservarlo con el objetivo de cambiar el tipo y número de microorganismos (cambio en la composición del alimento, bajas temperaturas, desecación, fermentación, curado/ salazón/ ahumado, liofilización, irradiación, aplicación de antimicrobianos, etc).

La mayoría de estos factores se basan principalmente en tres mecanismos (Gould, 1997):

- Prevención de acceso de los microorganismos al alimento.
- Inactivación del microorganismo en caso de haber accedido al alimento.
- Retardo o inhibición del crecimiento del microorganismo que ha accedido y no ha sido inactivado.

La tendencia del gusto del consumidor por alimentos más suaves ha hecho disminuir el empleo de factores intrínsecos tales como la acidez y la salinidad como medios únicos para salvaguardar la salubridad de los alimentos (Gould, 1992). Muchos productos alimenticios son preservados a través de la tecnología de barreras múltiples para inhibir el crecimiento microbiano, el cual establece que dos o más agentes antimicrobianos en niveles sub-óptimos pueden actuar sinérgicamente (Leistner, 2000). En la actualidad, se busca la combinación de factores que interaccionen aditiva o sinérgicamente controlando la población microbiana, evitando la aplicación de un solo factor de conservación en forma severa, lo que mejora la calidad sensorial y nutricional del alimento; permitiendo la obtención de productos similares a los frescos, más sanos, con menos aditivos y listos para preparar y servir, optimizando a su vez el factor económico.

Como respuesta a los tratamientos de conservación, los microorganismos evolucionaron desarrollando distintos mecanismos para resistir los efectos de estos factores de estrés. Estos mecanismos, denominados «mecanismos homeostáticos», actúan para mantener relativamente sin cambios los parámetros y las actividades fisiológicas claves de los microorganismos, aun cuando el medio que rodea a la célula se haya modificado y sea diferente. El gasto de energía para el mantenimiento de la homeostasis es fundamental para la vida de los microorganismos. Cuando las células derivan la energía necesaria para la biosíntesis hacia el mantenimiento de la homeostasis, su crecimiento se inhibe. En el caso donde la demanda de energía para mantener la homeostasis supera la capacidad de producción de energía de la célula, ésta muere (Doyle y col., 2001). La combinación deliberada e inteligente de los tratamientos para asegurar la estabilidad, inocuidad y calidad de los alimentos es

un método muy efectivo para vencer las respuestas homeostáticas microbianas y, al mismo tiempo, retener las características nutricionales y sensoriales deseadas (Leistner y Gould, 2002).

1.5 Antimicrobianos Naturales

Los alimentos están expuestos al deterioro microbiológico durante todo el proceso de elaboración, almacenamiento y distribución. La adición de agentes antimicrobianos puede permitir la extensión de la vida útil y la seguridad de los alimentos frescos y envasados, mediante la reducción o incluso la prevención del crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes (Franssen y col., 2004).

El Código Alimentario Argentino (CAA) define como conservadores a las sustancias que impiden o retardan la alteración de los alimentos provocada por microorganismos o enzimas (CAA, 2014). Existe una variedad de aditivos conservadores sintéticos y naturales que pueden extender la vida útil de los alimentos y/o inhibir patógenos, y que pueden ser aplicados solos o en combinación con otros factores de estrés. La selección y el uso de estos preservadores está regulada por la legislación de cada país o región. Idealmente, el preservador debería tener un amplio espectro de actividad frente a una contaminación microbiana y los patógenos que son comúnmente encontrados en los alimentos en los que se va a aplicar. Éste deberá ser activo, contribuyendo a la vida útil deseada en las condiciones de elaboración y almacenamiento del alimento. Debe causar el mínimo impacto organoléptico en el alimento y no debe interferir con el proceso microbiológico que está previsto que ocurra en el mismo, como en el caso de la maduración del queso o el levado de productos horneados. Los antimicrobianos son agentes químicos que actúan inhibiendo y/o disminuyendo el crecimiento de los microorganismos y, en algunos casos, pueden actuar provocando su muerte (Russell y Gould, 1991).

En la actualidad, la exigencia de los consumidores está orientada al consumo de alimentos más saludables y seguros, utilizando ingredientes naturales. En consecuencia, ha aumentado el uso de antimicrobianos naturales provenientes de una amplia variedad de fuentes naturales y esto ha sido objeto de numerosas

investigaciones (Tiwari y col., 2009). En las **Tablas 1.2, 1.3 y 1.4** se muestran distintos antimicrobianos naturales utilizados en alimentos, provenientes de distintas fuentes, y los microorganismos sobre los cuales presentan actividad.

Tabla 1.2: Antimicrobianos naturales de origen animal usados en alimentos y microorganismos sensibles (adaptado de Davidson y col. (2013) y Juneja y col. (2012)).

Compuesto antimicrobiano	Microorganismo inhibido		
	Bacterias Gram+	Bacterias Gram-	Hongos y levaduras
Quitosano	Bacterias ácido lácticas <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
Ovotransferrina	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
Lactoferrina	<i>Bacillus</i> spp. <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella</i> spp.	
Lactoferricina	Bacterias ácido lácticas <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Shigella</i> <i>Salmonella</i> spp. <i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Candida</i> spp.
Lactoperoxidasa	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella</i> spp. <i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Candida</i> spp. <i>Mucor</i> spp. <i>Rhodotorula</i> spp.
Lisozima	<i>Bacillus</i> spp. <i>Clostridium</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Micrococcus</i>	<i>Pseudomona</i> spp. <i>Salmonella</i> spp. <i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Candida</i> spp. <i>Fusarium</i> spp. <i>Penicillium</i> spp. <i>Saccharomyces</i> spp.

Tabla 1.3: Antimicrobianos naturales de origen vegetal usados en alimentos y microorganismos sensibles (adaptado de Davidson y col. (2013) y Juneja y col. (2012)).

Compuesto antimicrobiano	Microorganismo inhibido		
	Bacterias Gram+	Bacterias Gram-	Hongos y levaduras
Isotiocianato	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella</i> spp. <i>Pseudomona</i> spp. <i>Serratia grimesii</i>	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Cladosporium</i> spp. <i>Penicillium</i> spp.
Carvacrol	<i>Bacillus</i> spp. <i>Listeria innocua</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomona</i> spp. <i>Salmonella</i> spp.	<i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus flavus</i>
Cinnamaldehído	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Escherichiacoli</i> <i>Salmonella</i> spp.	<i>Candida albicans</i>
Citral	<i>Listeria innocua</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Zygosaccharomyces bailii</i>
Eugenol	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Listeria innocua</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella</i> spp. <i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Candida albicans</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Geraniol	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella</i> spp.	
Timol	<i>Bacillus</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Listeria innocua</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Campylobacter jejuni</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Salmonella</i> spp.	<i>Candida</i> spp. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Pichia subpelliculosa</i>
Saponinas	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.
Flavonoides	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomona</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Penicillium</i> spp.

Tabla 1.4: Antimicrobianos naturales de origen microbiológico usados en alimentos y microorganismos sensibles (adaptado de Davidson y col. (2013) y Juneja y col. (2012)).

Compuesto antimicrobiano	Microorganismo inhibido		
	Bacterias Gram+	Bacterias Gram-	Hongos y levaduras
Nisina	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Brochothrix thermosphacta</i> <i>Carnobacterium</i> spp.	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomona aeruginosa</i> <i>Salmonella</i> spp.	
Reuterina	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Aeromona</i> spp. <i>Campylobacter jejuni</i>	
Pediocina	<i>Listeria</i> spp.		
Natamicina			Amplia variedad de hongos y levaduras
Ácidos orgánicos			Amplia variedad de hongos y levaduras

Existen distintas formas de aplicación externa de los conservantes para la protección de la superficie de los alimentos y los métodos más utilizados son la inmersión del producto en una solución del antimicrobiano o su aplicación directa con una solución del mismo. Sin embargo, los antimicrobianos naturales también pueden ser incorporados a películas comestibles con el fin de inhibir la flora contaminante. Dichas películas podrían disminuir el riesgo de patógenos en la superficie de los alimentos, controlar la liberación del antimicrobiano hacia el seno del alimento y proteger a dichos aditivos de interacciones con otros componentes del alimento o con el oxígeno, lo cual podría afectar su actividad. De esta forma, las películas desarrollarían un importante rol en la seguridad del alimento.

En esta investigación se estudiarán los antimicrobianos natamicina y nisina por lo que se detallan a continuación sus características y propiedades más relevantes.

1.5.1 Natamicina

La natamicina (también denominada pimaricina) es un miembro de la familia de los polienos, con una gran variedad de aplicaciones. Es producida por *Streptomyces natalensis* y se utiliza para el tratamiento tópico de las infecciones por hongos, y también en la industria alimentaria para evitar la contaminación de los productos con levaduras y mohos (Te Welscher y col., 2010). Se aplica para prevenir la contaminación de distintos alimentos, particularmente en quesos (Gallo y Jagus, 2006; El-Diasty y col., 2008). Es codificada como aditivo alimentario con la sigla E235.

En la **Figura 1.4** se observa la estructura molecular de la natamicina, la cual está caracterizada por la presencia de un largo anillo macrólido conteniendo cuatro dobles enlaces conjugados y un residuo de azúcar, tiene un peso molecular de 665,7 Da. Su fórmula molecular es $C_{33}H_{47}NO_{13}$ (Capitan Vallvey, 2000). Presenta una ingesta diaria admitida (IDA) de 0-0,3 mg/kg de peso corporal (Hammond y Lambert, 1978).

La natamicina actúa uniéndose a esteroides de membrana, principalmente ergosterol, pero sin permeabilizar la membrana plasmática. Inhibe la fusión vacuolar a través de una interacción específica con el ergosterol. Por esta razón es activa frente a los hongos y levaduras, pero no contra bacterias, virus o protozoos (te Welscher y col., 2008; te Welscher y col., 2010). Es sabido que los esteroides tienen función estructural en la membrana de hongos y levaduras, y se piensa que residen en dominios específicos estando involucrados en procesos de endocitosis, exocitosis, fusión vacuolar (Wachtler y Balasubramanian, 2006), señalización de feromonas (Jin y col., 2008), compartimentalización de membranas (Klose y col., 2010), y el apropiado funcionamiento de las proteínas de membrana (Zhang y col., 2010). De acuerdo con Athar y Winner (1971), la modificación estructural y/o la disminución de la expresión del ergosterol disminuye sustancialmente la actividad fúngica de la natamicina *in vivo*. Te Welscher y col. (2010) observaron que a través

de la interacción específica con el ergosterol, la natamicina es capaz de interferir en la primeras instancias de fusión vacuolar. Durante esta fase se genera un reordenamiento de los diferentes complejos proteicos de las membranas. Por lo tanto, esto sugiere que el modo de acción de la natamicina es perturbar los reordenamientos de proteínas como resultado de su unión al ergosterol.

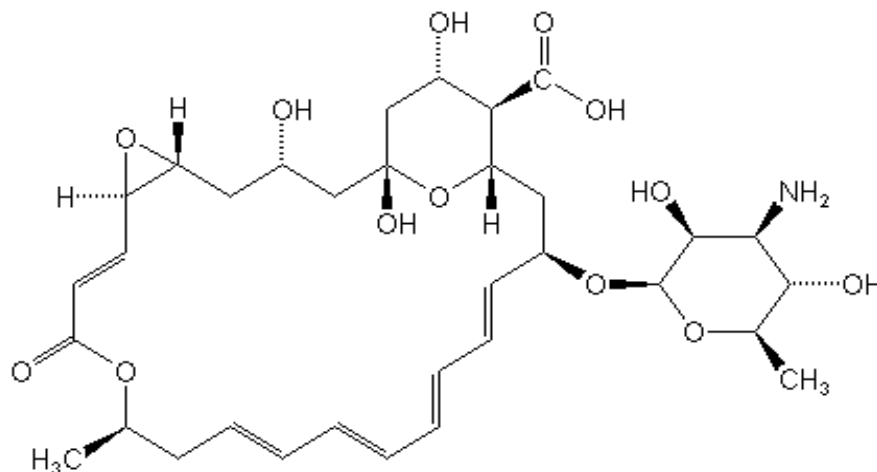


Figura 1.4: Estructura molecular de natamicina

En la **Tabla 1.5** se presenta la respuesta a la natamicina de distintos mohos y levaduras testada *in vitro*.

El aumento de las infecciones fúngicas invasivas, especialmente en personas cuyos sistemas inmunológicos están comprometidos, es una creciente amenaza para la salud humana. Sólo unos pocos agentes antifúngicos demostraron ser eficaces, incluyendo polienos, fluorocitos, y derivados de los azoles, pero se ha observado un aumento en la resistencia a los antimicrobianos (Ghannoum y Rice, 1999). Sin embargo, la resistencia a los antibióticos poliénicos sigue siendo un fenómeno poco frecuente, lo que hace que estos compuestos sean particularmente útiles como agentes antifúngicos en alimentos (te Welscher y col., 2010).

Tabla 1.5: Concentración mínima inhibitoria (CMI) de la natamicina frente a distintos hongos. Adaptado de De Boer y Stolk-Horsthuis(1977).

CMI (µg/ml)	Hongos	Levaduras
0,1-1,25	<i>Byssochlamys fulva</i>	<i>Candida</i> spp.
	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Dekkera</i> spp.
	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Saccharomyces</i> spp.
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Hansenula polymorpha</i>
	<i>Gloeosporium album</i>	
	<i>Sclerotinia fructicola</i>	
	<i>Botris</i> spp.	
	<i>Fusarium solari</i>	
4,0-8,0	<i>Absidia</i> spp.	<i>Zygosaccharomyces</i> spp.
	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Saccharomyces</i> spp.
	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Torulaspota rosei</i>
	<i>Penicillium</i> spp.	
10	<i>Fusarium</i> spp.	

1.5.1.1 Aplicación de natamicina en alimentos

La natamicina ha sido aprobada como aditivo alimentario en más de 40 países y es considerada como un producto GRAS por la FDA (Koontz y col., 2003). A su vez es reconocida como conservante natural por la Unión Europea (CEE N°235). El CAA establece que la natamicina puede ser empleada para el tratamiento de cáscara de quesos de pasta dura o semidura o de sus cubiertas protectoras y de las envolturas de embutidos secos que deban sufrir un proceso de maduración. La concentración residual en la superficie de las cáscaras o envolturas no deberá ser mayor de 1 mg/dm² de superficie de queso o embutido, no debiendo detectarse la presencia del antimicótico en el interior del producto a una profundidad mayor de

2 mm. La natamicina podrá además ser empleada en los alimentos que específicamente permita su uso como sustancia antimicótica la Autoridad Sanitaria Nacional (CAA, 2014). El Codex Alimentario permite concentraciones máximas de natamicina diferentes al Código Alimentario Argentino; las mismas y los alimentos que pueden ser tratados con este antimicrobiano se muestran en la **Tabla 1.6**.

Tabla 1.6: Aplicaciones de natamicina a distintos alimentos: concentración máxima permitida por el Codex Alimentario (adaptado de WHO(2007)).

Tipo de alimento	Concentración máxima de natamicina permitida (mg/Kg)
Análogos de quesos, quesos procesados, madurados o sin madurar, suero de queso	40
Carne triturada, curada y secada	20
Carne entera o cortada en pedazos	6

1.5.2 Nisina

Las bacteriocinas, proteínas biológicamente activas producidas por bacterias lácticas que exhiben propiedades antimicrobianas, han despertado un gran interés como alternativa para la preservación de alimentos, en reemplazo de los antimicrobianos químicos sintéticos.

La nisina es un antibiótico peptídico policíclico, usado como bioconservante. Es sintetizada por *Lactococcus lactis*. En la industria alimentaria es utilizada en huevos, carne, vegetales, pescado, bebidas y lácteos, principalmente en la elaboración de quesos (Russell y Gould 2008). Es codificada como aditivo alimentario con la sigla E234.

La estructura de la nisina fue determinada por Gross y Morell (1971) (**Figura 1.5**). Su masa molecular es de 3353 Da en su forma monomérica, aunque es más estable como dímero de 7 kDa (Gross y Morell, 1971).

La molécula es catiónica (carga neta positiva +4) por exponer combinaciones de 3 lisinas (posiciones 12, 22, 34) y una o más histidinas (posición 31 y 37, según la variante). Dado que los pKa de la histidina y de la lisina son muy distintos, la carga neta de la molécula es dependiente del pH (Liu y Hansen, 1990; Thomas y col., 2000). A pH neutro, la carga positiva de la molécula disminuye debido a una desprotonización de las histidinas y a pH ácido, es retenida debido al alto pKa de las lisinas (Rollema y col., 1995). La dependencia con el pH también tiene influencia sobre la solubilidad de la nisina en un medio acuoso. Según Liu y Hansen (1990), a pH 2,2 la solubilidad de la nisina es de 56 mg/ml; a pH 5 es de 3 mg/ml; y a pH 11 es de 1 mg/ml. Sin embargo, en los alimentos este comportamiento no resulta un inconveniente ya que las cantidades de nisina utilizadas son menores a 0,25 mg/ml.

Dentro de las bacteriocinas, la nisina está descrita como miembro de la Clase IA, el grupo que contiene a los lantibióticos (Klaenhammer, 1993). Estas moléculas son flexibles, elongadas y anfipáticas, actúan básicamente mediante la formación de poros en la membrana citoplasmática de las bacterias. Se caracterizan principalmente por poseer estructuras de anillos intramoleculares formados por uniones tioésteres de aminoácidos lantionina y metil-lantionina (Brotz y Sahl, 2000). En solución, la molécula es flexible sin una dada conformación espacial. El dominio con los anillos tioésteres resulta ser la única región bien definida en la molécula y aparece como dos fragmentos conectados por una región flexible de estructura variable, la bisagra (Sahl y col., 1995). En la membrana, la nisina adopta una estructura anfifílica alargada que tiende a agruparse según sus regiones cargadas e hidrofóbicas. La región amino-terminal de la molécula posee un alto porcentaje de residuos hidrofóbicos y la región carboxi-terminal, resulta la región más hidrofílica. En general, se considera a la actividad antimicrobiana de la nisina como un proceso secuencial. En primera instancia, ocurre la difusión de la molécula por la pared de la célula. Luego se produce una interacción entre la nisina y la membrana citoplasmática, y posteriormente penetra dentro de la bicapa lipídica. Finalmente, se

produce la formación del poro por desestabilización de la dinámica de la membrana y, consecuentemente, la inactivación microbiana (Breukink y col., 1997).

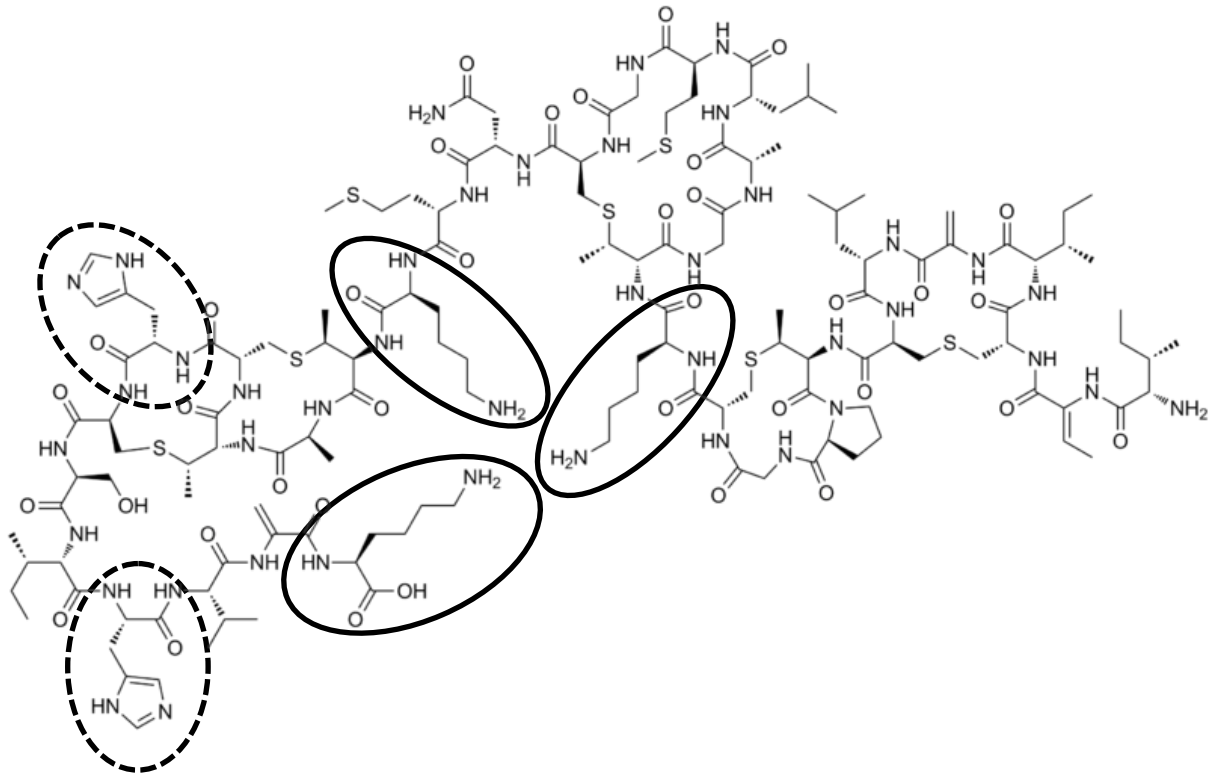


Figura 1.5: Estructura molecular de la nisina. Están destacados los aminoácidos lisina (círculo liso) e histidina (círculo punteado), responsables de la carga neta de la molécula.

Muchos estudios se han desarrollado con la finalidad de dilucidar el mecanismo de acción de la nisina y como resultado se han propuesto varios modelos. Actualmente se sabe que mediante la unión al lípido precursor bacto-prenolmonomérico del peptidoglicano II, la nisina ejerce dos mecanismos de acción: permeabiliza la membrana e inhibe la síntesis de la pared celular (Breukink y col., 1997, 1999; Brötzy y col., 1998). Breukink y col. (1999) descubrieron que la nisina se acopla al lípido II de la membrana plasmática, el cual es transportado al lado

exterior, luego de su síntesis, volviéndose disponible para interactuar con la nisina. A su vez, mostraron que la presencia del lípido II en liposomas disminuye dramáticamente la concentración de nisina requerida para su permeabilización. Por lo tanto, la interacción con el lípido II explica por qué las concentraciones nanomolares de nisina son suficientes para permeabilizar las membranas celulares, mientras que se necesitan concentraciones milimolares para la permeabilización de membranas artificiales. La unión al lípido II induce una orientación transmembrana de la nisina (van Heusden y col., 2002). Como se puede observar en la **Figura 1.6** el lípido II y la nisina forman un poro híbrido en la membrana fosfolipídica, compuesto de ocho moléculas de nisina y cuatro moléculas de lípido II (Hasper y col., 2004). Mediante la formación de poros en la membrana, se anulan los gradientes iónicos, llevando el potencial transmembrana ($\Delta\psi$) y/o el gradiente de pH (ΔpH) a cero, resultando en la fuga del material intracelular. La despolarización de la membrana citoplasmática resulta en la finalización inmediata de los procesos biosintéticos de la célula (Wiedemann y col., 2001).

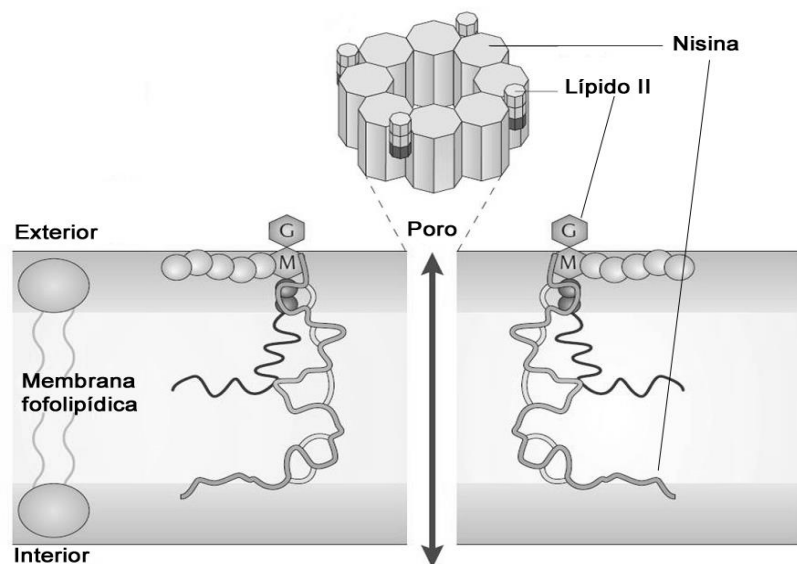


Figura 1.6: Modelo de acción de la nisina, donde la formación del poro en la membrana celular está mediada por la interacción con el lípido II (adaptado de Hasper y col.(2004)).

En consecuencia, la diversidad que se encuentra en la sensibilidad de los distintos microorganismos frente a la nisina surge de las diferentes concentraciones del lípido II en la membrana (ej, bacterias Gram positivas), o de la ausencia del lípido II (ej, levaduras y hongos), o bien de las diferencias en la accesibilidad de la nisina al lípido II (ej, bacterias Gram negativas) (Breukink y col., 1999).

La composición química y las condiciones físicas del medio pueden afectar la actividad de la bacteriocina. Por ejemplo, la concentración de nisina necesaria para producir una inhibición completa de *Listeria monocytogenes* varía desde 18,5 a 2500 µg/ml, dependiendo del medio en donde se encuentre (Benkerroum y Sandine, 1988). Dadas sus características anfipáticas, la nisina tiende a agregarse con los componentes de los alimentos (Somers y Taylor, 1987). Se asocia preferentemente con los componentes grasos debido a su naturaleza hidrofóbica (Jung y col., 1992). La nisina es inactivada por oxidantes y proteasas, y es inhibida por cationes divalentes y detergentes aniónicos. La combinación con otros procesos de conservación, como los tratamientos térmicos o no térmicos, la disminución en la actividad del agua, las bajas temperaturas, favorecen su actividad antimicrobiana (Thomas y col., 2000). La nisina actúa más eficientemente en un sistema líquido homogéneo que en un medio heterogéneo o sólido, debido a que su difusión resulta favorecida en el líquido (Delves-Broughton, 2005).

1.5.2.1 Aplicación de nisina en alimentos

Estudios toxicológicos han demostrado que la nisina es no tóxica para el consumo humano, y por lo tanto se ha permitido su utilización en más de 50 países como preservante de alimentos. Fue reconocido como preservante biológico seguro en 1969 por el Comité Experto de Aditivos de Alimentos de FAO/OMS (Thomas y col., 2000). En 1988 fue aprobada como aditivo de alimentos por la USFDA y aceptada como compuesto GRAS. Estudios de toxicidad han demostrado que el consumo humano de nisina es seguro a una dosis diaria aceptable de 2,9 mg/persona/día.

La nisina fue caracterizada por primera vez en 1947 por Mattick y Hirsch. Varios investigadores han demostrado su actividad en productos lácteos, como

quesos untables, ricota, leche y suero líquido frente a la contaminación de bacterias Gram positivas (Sobrino-López y Martín-Belloso, 2008; Martins y col., 2010; Fernández y col., 2014) y esporas resistentes a las altas temperaturas (Delves-Broughton y col., 1996). En la industria alimentaria es empleada como conservante, en especial en la prevención de posibles alteraciones microbiológicas en alimentos tales como carnes de distinto tipo y quesos (Roller, 2009). Asimismo, el deterioro por el crecimiento de bacterias ácido lácticas en alimentos como vinos, cervezas, salchichas, ricota y salsas, puede ser controlado mediante el agregado de nisina (Thomas y col., 2000).

En Argentina, el nivel máximo de nisina que se permite agregar en quesos procesados es de 500 UI/g (CAA, 2014), lo que equivale a 12,5 mg/kg, valores que coinciden con los permitidos por el Codex alimentario. En la **Tabla 1.7** se informan las concentraciones máximas permitidas de nisina y los alimentos que pueden ser tratados con este antimicrobiano.

Tabla 1.7: Aplicación de nisina a distintos alimentos: concentración máxima permitida por el Codex Alimentario (adaptado deWHO(2007)).

Tipo de alimento	Concentración máxima de natamicina permitida (mg/Kg)
Cereales y postres con almidón	3
Análogos de queso, queso madurado, crema y suero de queso	12,5

1.6 Películas comestibles

El empaquetado de alimentos es la tecnología utilizada para proteger y preservar los alimentos durante su distribución, almacenamiento y manipulación hasta que llega al consumidor, con el objetivo de mantener el producto sin

alteraciones. Los derivados del petróleo tales como las poliolefinas, los poliésteres, las poliamidas, etc, han visto incrementado su uso cada vez más como materias primas para el desarrollo de materiales de empaquetamiento, debido a su disponibilidad en grandes cantidades y a sus características favorables de funcionalidad tales como buena resistencia a la tracción y resistencia al desgarro, buenas propiedades de barrera al O₂ y compuestos aromáticos y buena capacidad de sellado térmico. Tienen una muy baja tasa de transmisión de vapor de agua. Son totalmente no biodegradables ni renovables y, por lo tanto, contribuyen al deterioro del ambiente, lo cual plantea graves problemas ecológicos. Por lo tanto, su utilización tiende a ser restringida y existe la idea de abandonar gradualmente su uso para evitar problemas relativos a la eliminación de residuos (Tharanathan y Saroja, 2001). En los últimos tiempos, se han intensificado los estudios sobre el uso de materiales biodegradables, los más estudiados son los poliésteres, ácido poliláctico, policaprolactona y polihidroxi alcanosatos entre otros. Todos ellos presentan buenas propiedades físicas y mecánicas. Sin embargo, de acuerdo a Siracusa y col. (2008) es importante estudiar su compatibilidad con los alimentos, dado que estos materiales no son comestibles y sus monómeros podrían difundir hacia el alimento. Además, sus costos de desarrollo son altos y por lo tanto no presentan un beneficio a escala económica.

Las películas comestibles no pretenden reemplazar al material de empaquetamiento tradicional, sino proveer un factor de estrés adicional a favor de la preservación de los alimentos. Dichas películas podrían reducir la cantidad de material tradicional utilizado y por lo tanto el costo (Campos y col., 2011). De este modo, ellas contribuirían a la protección del ambiente. Krochta y col. (1997) definen a las películas comestibles como capas continuas y delgadas de material comestible formadas sobre o colocadas entre los componentes de los alimentos. Proveen propiedades funcionales específicas y constituyen un medio para soportar nutrientes o aditivos. Los productos alimenticios son cubiertos por películas y recubrimientos comestibles desde hace muchos años. Uno de los métodos más antiguos para la protección de las frutas es la aplicación de una capa de cera por inmersión; este método se implementó por primera vez en los principios del siglo XII (Krotchta y

Nisperos-Carriedo, 1994), aplicando grasa animal para recubrir productos alimenticios.

Generalmente, una película comestible está integrada por tres componentes básicos: una biomolécula de alto peso molecular, un plastificante de bajo peso molecular y un solvente. Las biomoléculas utilizadas para la fabricación de películas comestibles derivan principalmente de materias primas agrícolas renovables. Hay dos tipos de biomoléculas, hidrocoloides y lípidos, que se utilizan generalmente en combinación. Individualmente ellos carecen de adecuada funcionalidad. Por ejemplo, los hidrocoloides son hidrófilos y presentan una pobre barrera contra la humedad, adicionando lípidos se compensa esta deficiencia, debido a que son hidrofóbicos. Por otra parte, los lípidos no generan películas con adecuada integridad estructural. Las películas habitualmente formuladas son una mezcla de estos y otros componentes en proporciones variables, los cuales determinan junto con la técnica de obtención, las características físico-químicas y mecánicas de las mismas.

Los diversos materiales biopoliméricos que se utilizan actualmente en la fabricación de películas comestibles se muestran en la **Figura 1.7**.

Los plastificantes más comúnmente utilizados son glicerol, sorbitol o polietilenglicol. Estos compuestos disminuyen la atracción intermolecular entre cadenas poliméricas aumentando la flexibilidad de la película. Los solventes utilizados con mayor frecuencia en la fabricación de películas comestibles son agua, etanol o una combinación de ambos (García y col., 2000).

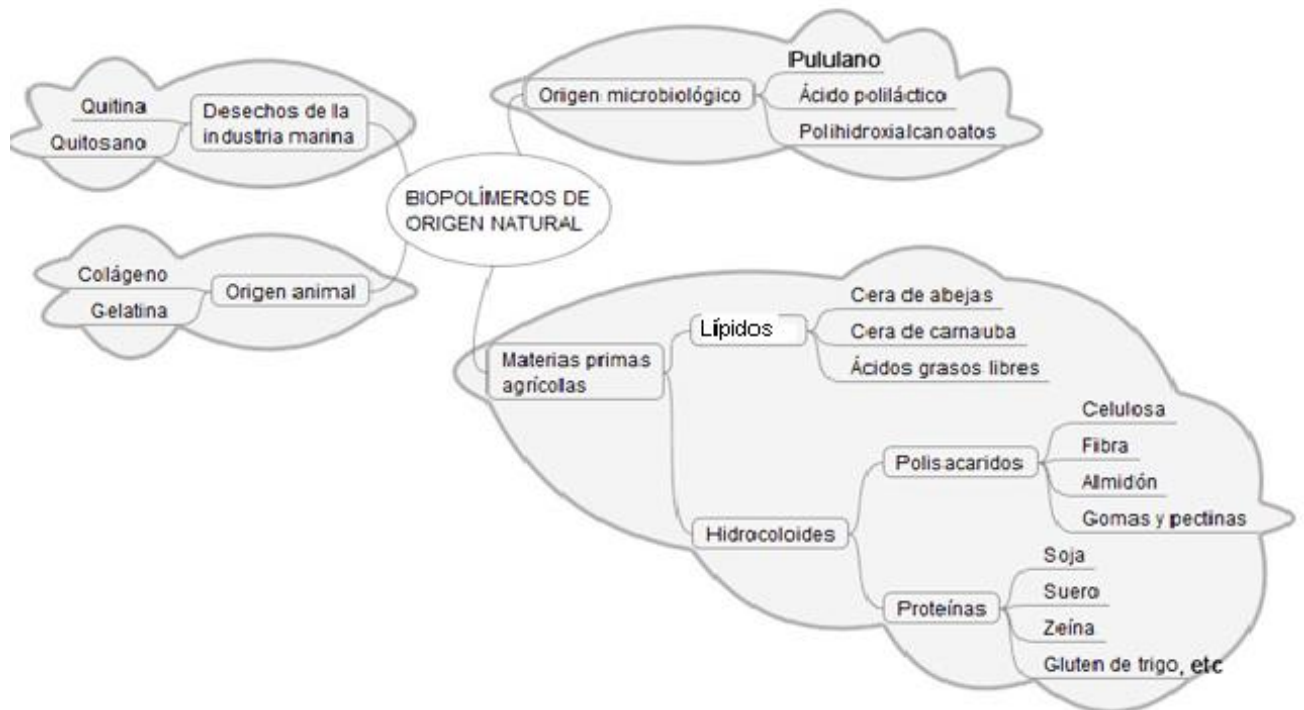


Figura 1.7: Biopolímeros de origen natural de uso en películas comestibles y biodegradables (adaptado de Tharanathan(2002)).

Dentro de las propiedades funcionales de las películas comestibles se pueden mencionar la reducción de la pérdida de agua y el control de migración de gases como CO_2 y O_2 , de grasas y aceites, y de solutos. También pueden mejorar las propiedades mecánicas y el manejo de los alimentos, proveer integridad estructural a los mismos, retener los componentes volátiles y contener aditivos (Min y col., 2005). Dichas propiedades funcionales aportadas por las películas y algunos ejemplos de aplicación se muestran en la **Tabla 1.8**.

Tabla 1.8: Propiedades funcionales de películas comestibles y aplicaciones más frecuentes (adaptada de Guilbert(1986))

Propósito	Aplicaciones
Proveer una protección individual contra la humedad y el oxígeno	Pescado fresco, queso, carne y derivados, botana
Retardar el crecimiento microbiano externo	Alimentos de humedad intermedia
Controlar el balance de humedad dentro de un alimento heterogéneo	Pizas, sándwiches, pasteles
Mejorar las propiedades mecánicas	Maní, camarones, botanas, jaibas
Proveer integridad estructural para reforzar la estructura de los alimentos	Carne reestructurada, pescado, alimentos liofilizados
Restringir la migración de humedad	Frutas, horneados, congelados
Proteger las superficies o el empackado de la absorción de humedad	Cubos de queso, fruta seca, botana, congelados
Mejorar la apariencia del alimento añadiéndole brillo	Productos de panificación, frutas, botana
Impartir o mejorar sabor color y palatabilidad	Alimentos diversos

Debido a que las películas comestibles son una parte integral de los alimentos, deben cumplir algunos requisitos tales como ser neutras respecto al alimento, es decir, no afectar sus características sensoriales, poseer estabilidad bioquímica, físico-química y microbiana, estar libres de sustancias tóxicas y ser seguras para la salud (Debeaufort y col., 1998). La seguridad en relación a la salud es una característica diferencial relevante de estas películas dado que se ingieren junto al alimento. Adicionalmente, es importante que posean buenas propiedades de barrera, que contribuyan a las propiedades mecánicas del alimento y que su proceso de constitución sea sencillo, con bajo costo en cuanto a materias primas y proceso y es deseable que este último no sea contaminante respecto al medio ambiente.

Los agentes antimicrobianos se pueden aplicar por inmersión, pulverización o pincelado sobre las superficies de los alimentos para el control del crecimiento microbiano. Sin embargo, estas técnicas de aplicación directa son laboriosas, tienen limitados beneficios (Min y col., 2005; Ture y col., 2011), y el compuesto generalmente exhibe una rápida pérdida de actividad debido a una reducción de su concentración activa resultante de la interacción o reacción con componentes de la matriz alimentaria o del ambiente. Además, cuando el aditivo difunde hacia el seno del alimento se produce un fenómeno de dilución, el cual actúa en contra de su eficacia. Las películas comestibles pueden servir como portadoras de compuestos antimicrobianos, constituyendo una forma prometedora de control de la liberación de los mismos (Pires y col., 2008; Fajardo y col., 2010; Ture y col., 2011). La incorporación de agentes antimicrobianos en los alimentos mediante el uso de películas comestibles donde son atrapadas permite su lenta liberación, disminuyendo su velocidad de difusión desde la superficie hacia el interior del producto, ayudando así al mantenimiento de altas concentraciones del ingrediente activo en la superficie cuando éste es el lugar donde es requerido (Kristo y col., 2008). Paralelamente, como consecuencia de su soporte en superficie, permite disminuir la interacción con otros aditivos o componentes del alimento debido a la compartimentalización del antimicrobiano (Campos y col., 2011).

1.6.1 Almidones y derivados

Los almidones son un recurso renovable proveniente de una amplia variedad de fuentes. Ellos son ampliamente utilizados en los alimentos y las industrias farmacéuticas y pueden ser modificados para mejorar sus propiedades funcionales (Luallen, 1985). El almidón modificado de mandioca está siendo considerado como una alternativa económica para la industria alimentaria debido al gran aumento de precio que están sufriendo los almidones tradicionales, como el almidón de maíz (Famá y col., 2006).

En la **Figura 1.8** se describe la organización de la estructura del gránulo de almidón. En el nivel más bajo de organización (**Figura 1.8a**) se muestra un gránulo de almidón con regiones alternantes cristalinas y amorfas (colores claros y oscuros,

respectivamente). Estas regiones son más delgadas hacia el exterior del gránulo debido al aumento del área superficial con una tasa de crecimiento constante. También se observa el hilum el cual es el centro de nucleación a partir del cual se forma el gránulo de almidón.

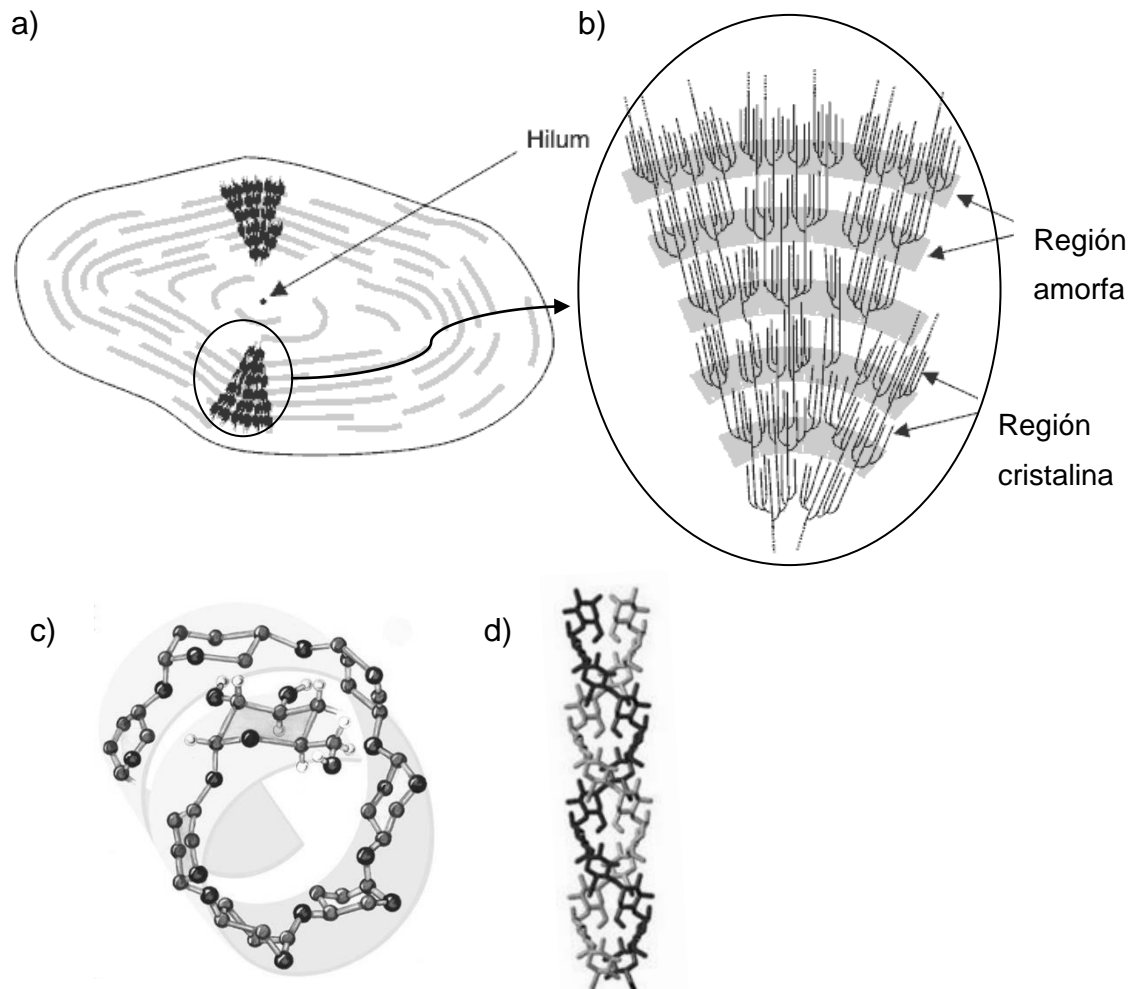


Figura 1.8: Descripción general de la estructura de un gránulo de almidón. a) gránulo de almidón. b) Modelo de clúster representando regiones amorfas y cristalinas. c) Estructura helicoidal de polímero de amilosa. d) Estructura de doble hélice de polímero de amilopectina.

En un nivel superior de estructura se muestra el modelo en clusters (**Figura 1.8b**), en el cual se puede observar que en las zonas amorfas se encuentra la mayor cantidad de ramificaciones (zona menos organizada) y en las regiones cristalinas las moléculas se encuentran linealizadas (sin ramificaciones). En el siguiente nivel de estructura se muestra que existen dos tipos de estructuras, una es helicoidal, correspondiente a un polímero de amilosa (**Figura 1.8c**) donde sus cadenas glucosídicas se disponen en forma de hélice con 6 unidades de glucosa por vuelta y otra es una doble hélice correspondiente a un polímero de amilopectina (**Figura 1.8d**). Las estructuras lineales de amilosa se enredan con las de amilopectina, sin embargo no se conoce exactamente de qué manera (Eliasson, 2004).

El polímero de amilosa está formado por α -D-glucopiranosas unidas por centenares o miles (normalmente de 300 a 3000 unidades de glucosa) mediante enlaces α -(1 \rightarrow 4) en una cadena sin ramificar. Esta cadena adopta una disposición helicoidal y tiene seis monómeros por cada vuelta de hélice (**Figura 1.9a**). El polímero de amilopectina también está formado por α -D-glucopiranosas, aunque en este caso conforma una cadena altamente ramificada en la que hay uniones α -(1 \rightarrow 4), como se indicó en el caso anterior, y muchos enlaces α -(1 \rightarrow 6) que originan lugares de ramificación cada doce monómeros. Su peso molecular es muy elevado, ya que cada molécula suele reunir de 2000 a 200000 unidades de glucosa (**Figura 1.9b**) (Famá y col., 2006).

La amilosa tiene una excelente capacidad de formar películas isotrópicas, inodoras, insípidas, incoloras, no tóxicas y biológicamente degradables (Krochta y De Mulder-Johnston, 1997). De acuerdo a García y col. (1998) la amilosa es la responsable de formar una estructura adecuada para las películas basadas en almidón. La estructura ramificada de la amilopectina generalmente conlleva a películas con pobres propiedades mecánicas (Tharanathan, 2003).

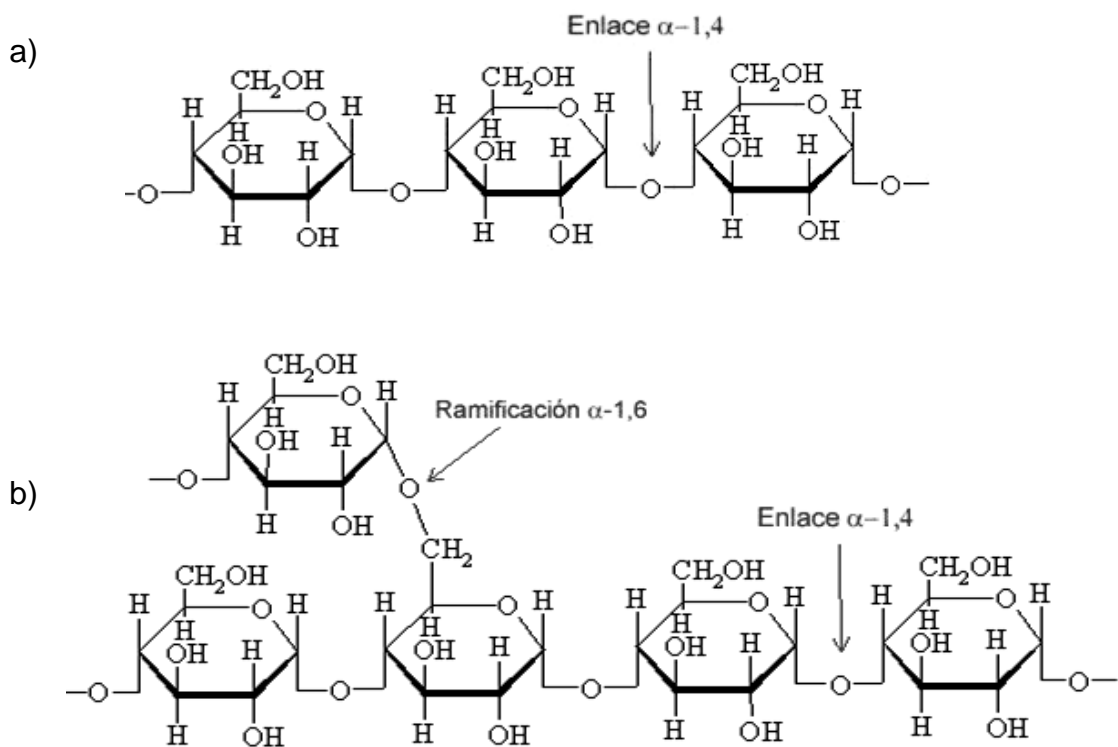


Figura 1.9: a: Estructura molecular de una fracción de polímero de amilosa. b: Estructura ramificada de una fracción de polímero de amilopectina

Para obtener películas con propiedades mecánicas adecuadas es necesario el agregado de un plastificante, el cuál proveerá de mayor flexibilidad a la película. Sin embargo, el comportamiento mecánico de la película podría verse afectado por la tendencia del almidón a la retrogradación, derivando en un reticulado físicamente más rígido (Famá y col., 2006).

En el presente trabajo se empleó en particular el almidón de mandioca para la elaboración de las películas. La Organización de la Agricultura y la Alimentación estableció que la mandioca es un buen alimento y una fuente nutritiva importante, y que su almidón posee ventajas competitivas para prosperar en el mercado global. Debido a la escasez o alto precio de las fuentes de almidón tradicionales, como el proveniente del trigo y la soja, el almidón de mandioca es visto como un ingrediente

alternativo por las compañías de alimentos (Famá y col., 2005). De acuerdo a FAO(2004), dentro de las propiedades que distinguen a este almidón pueden mencionarse:

- Alta transparencia: muy apropiado para alimentos listos para cocinar y salsas.
- Alta resistencia a los ácidos: buena aplicabilidad para salsas ácidas y mermeladas.
- Alta viscosidad: aplicable para postres, sopas, budines, rellenos y gomas.
- Alto nivel de amilopectina.
- Adecuado para alimentos dietéticos reducidos en grasa, alimentos libres de gluten y dietas anti-alérgicas debido a la ausencia de gluten, fosfatos, aceites y proteínas.
- Menor temperatura de gelatinización que otros almidones.

Los gránulos de almidón de mandioca poseen una forma redondeada (**Figura 1.10**) de superficie lisa, sin deformaciones evidentes, de tamaño homogéneo que varía entre 2 y 18 μm (Loksuwan, 2007).

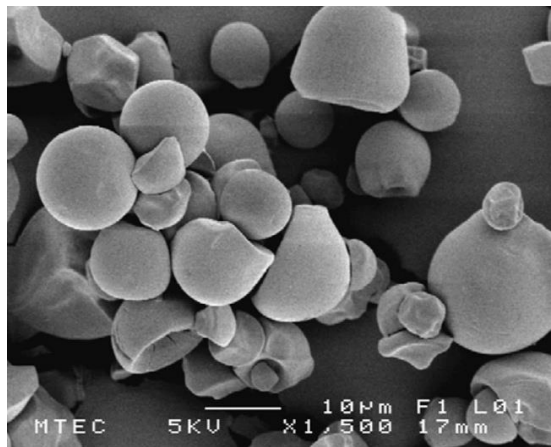


Figura 1.10: Micrografía realizada con microscopio de barrido electrónico (1500x) almidón de mandioca seco en polvo (Loksuwan, 2007).

1.6.2 Plastificantes

Los plastificantes son una clase importante de compuestos de bajo peso molecular, no volátiles que se utilizan ampliamente como aditivos en industrias de polímeros (Sejidov y col., 2005). El Consejo de la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) define un plastificante como “una sustancia o material incorporado en otro material (por lo general un plástico o elastómero) para aumentar su flexibilidad. Estas sustancias reducen la tensión de deformación, la dureza, la densidad, la viscosidad y la carga electrostática de un polímero, al mismo tiempo que aumentan la flexibilidad de la cadena del polímero, la resistencia a la fractura y la constante dieléctrica (Rosen, 1982). Otras propiedades físicas también se ven afectadas, tales como el grado de cristalinidad, la claridad óptica, la conductividad eléctrica, el comportamiento frente al fuego y la resistencia a la degradación biológica (Bialecka-Florjan y Florjan, 2007).

Los plastificantes generalmente presentan puntos de ebullición elevados, con pesos moleculares entre 300 y 600 Da, y con cadenas de carbono lineales o cíclicas (14-40 carbonos) (Greener y Fennema, 1993). El bajo peso molecular de un plastificante permite que este ocupe los espacios intermoleculares entre las cadenas de polímero, cambiando su organización molecular tridimensional, reduciendo la energía necesaria para el movimiento molecular y la formación de enlaces de hidrógeno entre las cadenas del polímero. Como consecuencia, se genera un aumento en el volumen libre y, por lo tanto, en la movilidad molecular (Wypych, 2004). Por lo tanto, el grado de plasticidad de los polímeros depende en gran medida de la estructura química del plastificante, incluyendo su composición química, peso molecular y grupos funcionales presentes (Moreno, 1992). En función de estas propiedades, un cambio en el tipo de plastificante afectará las propiedades de flexibilidad finales del producto (Cao y col., 2009).

Actualmente existe un creciente interés en el uso de plastificantes provenientes de recursos naturales, los cuales se caracterizan por su baja toxicidad y baja migración. Este grupo incluye aceites vegetales como triglicéridos epoxidados de aceite de soja, aceite de ricino, aceite de girasol, y ésteres de ácidos grasos (Gurgel y col., 2011).

Varios plastificantes, por lo general polioles, se han utilizado ampliamente para la formulación de películas comestibles, siendo el glicerol uno de los más estudiados (Araujo-Farro y col., 2010). Es un plastificante hidrófilo, y cuando se añade en la proporción correcta puede reducir fuerzas intermoleculares y aumentar la movilidad de las cadenas del polímero (Ghasemlou y col., 2011).

En el presente trabajo se empleó glicerol para la plastificación de las películas. El glicerol, es un alcohol polihídrico o poliol (1, 2, 3-propanotriol) de 3 átomos de carbono, cuya estructura química se presenta en la **Figura 1.11**.

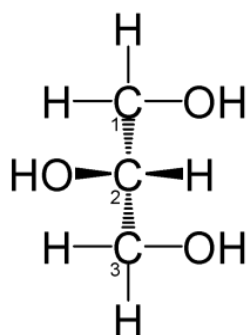


Figura 1.11: Estructura molecular del glicerol.

Se trata de un líquido viscoso, de sabor dulce, sin olor ni color, completamente soluble en agua y etanol. Está presente en forma de ésteres (glicéridos), en las grasas vegetales y animales. Se obtiene comercialmente como un subproducto cuando las grasas y los aceites son hidrolizados para dar ácidos grasos y sus sales (jabones). También es sintetizado a escala comercial a partir del propileno obtenido del craqueo del petróleo. Gracias a su característica higroscópica, cumple un importante rol como humectante en muchas industrias, especialmente la farmacéutica y la cosmética (**Figura 1.12**). Su efecto plastificante, lo hace particularmente útil para optimizar la aplicación de coberturas sobre tabletas, pastillas y comprimidos farmacéuticos (Pagliaro y Rossi, 2008).

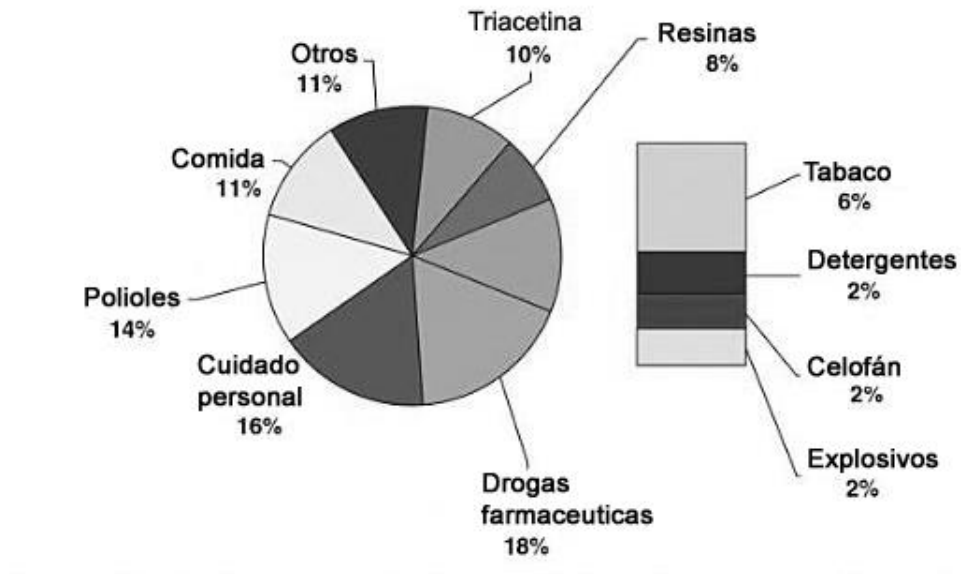


Figura 1.12: Volúmenes y usos del glicerol en la industria (Pagliaro y Rossi, 2008).

1.6.3 Aditivos

Las películas comestibles pueden ser adecuadas para su aplicación como soporte de aditivos, con el objetivo de extender la vida útil de los alimentos a los que se aplica, como así también mejorar sus propiedades físico-químicas y organolépticas. Estos aditivos pueden ser antioxidantes, antimicrobianos, vitaminas, colorantes y saborizantes entre otros (Han, 2003). La influencia que tendrá el aditivo en las propiedades de la película dependerá de la concentración, de la estructura química, del grado de dispersión en la película y de la interacción con los polímeros (Krochta, 2002).

Las películas comestibles, debido a que son una parte integral de los alimentos a los cuales se aplican, deben respetar en su formulación los requisitos que se establecen en los Códigos Alimentarios de cada país (Gontard y Guilbert, 1994). Para mantener su propiedad de ser comestible, todo componente formador de película, así como los aditivos funcionales agregados en la formulación de la misma, deben ser materiales de grado alimenticio no tóxicos (Nussinovitch, 2008).

La Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos de Norteamérica (FDA) ha establecido que cualquier compuesto que se incluya en la formulación de una película comestible debe ser GRAS o regulado como aditivo alimentario, y ser utilizado dentro de los límites especificados (FDA, 2006). La UE considera que una película comestible es una parte activa especial del alimento y, visto desde una perspectiva legal, ha de considerarse como un producto alimenticio, junto con el alimento envasado en ella, teniendo que cumplir ambos los mismos requisitos (Fabec y col., 2000). Actualmente, el uso de películas comestibles no se menciona en el CAA.

Los antimicrobianos son aditivos alimentarios cuyo principal propósito es la extensión de la vida útil de los alimentos a través del control del desarrollo de los microorganismos. Cada país tiene sus propias regulaciones que definen aquellos autorizados y sus concentraciones (Rojas-Graü y col., 2009). En este marco, la concentración de antimicrobianos presentes en películas comestibles, debe ajustarse a la legislación vigente en cada país.

1.6.4 Constitución de las películas

Se han desarrollado diferentes técnicas para la formación de películas comestibles incluyendo la eliminación del solvente, gelificación térmica y solidificación del fundido. En la mayoría de los trabajos reportados se emplea la técnica de casteo basada en la eliminación del solvente, para producir películas comestibles utilizando hidrocoloides. En este proceso, se forma una estructura continua por interacción entre las macromoléculas presentes. Para ello, la suspensión de las mismas en el solvente elegido (agua, etanol, ácido acético u otros) se dispensa en una capa delgada y una vez eliminado el solvente se constituye la película. La velocidad de secado y las condiciones ambientales influyen en el espesor final y las características estructurales de las películas resultantes. Por lo tanto, el proceso de secado debe controlarse adecuadamente a fin de obtener películas con las características deseadas.

Flores y col. (2007a) analizaron el efecto de diferentes velocidades de gelatinización y secado, en las propiedades físicas de películas de almidón de

mandioca conteniendo sorbato de potasio y obtenidas por casteo. Estos autores observaron que las bajas velocidades de gelatinización y de secado dan lugar a películas con mayor esfuerzo a ruptura, módulo elástico y grado cristalino. Por otra parte, la gelatinización y el secado más rápido influyen negativamente en el módulo elástico y en las propiedades de barrera al vapor de agua, debido a la obtención de una estructura más amorfa de la matriz de la película. Una técnica alternativa para la obtención de películas comestibles es la extrusión (Flores y col., 2010).

Para la preparación de películas comestibles utilizando la técnica de casteo, a base de proteínas (proteínas de suero, caseína, proteínas de soja, gluten de trigo), el calentamiento de la mezcla hasta desnaturalización es la técnica usada, seguida de un rápido enfriamiento. Durante la desnaturalización se clivan los enlaces disulfuro intramoleculares e intermoleculares en el complejo proteico y se reducen a grupos sulfhidrilo. La posterior formación de uniones entre las cadenas polipeptídicas da lugar a la constitución de la estructura de las películas.

En cuanto a la utilización de lípidos, en general se utiliza la mezcla de los mismos con polisacáridos o proteínas para asegurar la estabilidad estructural de las películas. La presencia de los lípidos disminuye la permeabilidad al vapor de agua (Cagri y col., 2004).

1.6.5 Caracterización físico-química de las películas comestibles

El comportamiento de los materiales que forman las películas puede estudiarse, en forma general, a través de sus propiedades físico-químicas y mecánicas.

El tipo de biomolécula constitutiva, la composición química y la conformación estructural determinan las propiedades físicas de las películas (Chen, 1995; Krochta y De Mulder-Johnston, 1997; Pavlath y col., 1999; Sabato y col., 2001). Otro factor relevante son las interacciones moleculares que se dan durante la formación de las películas (Banerjee y Chen, 1995; Anker y col., 2000).

1.6.5.1 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas describen la respuesta de un material a fuerzas o deformaciones aplicadas. Los parámetros habitualmente evaluados para su caracterización son la fuerza y el porcentaje de elongación al quiebre, el cual representa la habilidad de las películas para estirarse (Chillo y col., 2008; Lim y col., 2010).

El comportamiento mecánico incide en la durabilidad de las películas y en su habilidad para proteger y/o mejorar la integridad de los alimentos en los que se aplica. Es habitual que las evaluaciones de este comportamiento se realicen a través de ensayos de tracción y/o de punción. De acuerdo a Anker y col.(2000), las pruebas de tracción, en las cuales se somete la película a un esfuerzo normal hasta su ruptura, son las más útiles.

1.6.5.1.1 Ensayo de tracción

El esfuerzo a ruptura es una medida de la resistencia de las películas, mientras que la deformación a ruptura es una medida de su capacidad de estiramiento antes de romperse (Lim y col., 2010). Es deseable que las películas comestibles posean suficiente resistencia mecánica y extensibilidad, a fin de mantener la integridad frente a tensiones externas que pueden ocurrir durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos (Yang y Paulson, 2000).

Para entender el concepto de esfuerzo (σ) y deformación (ϵ) consideremos una muestra con forma de paralelepípedo rectangular de longitud L_0 y de sección transversal de área A sometida a una fuerza de tracción uniaxial F como se muestra en la **Figura 1.13**.

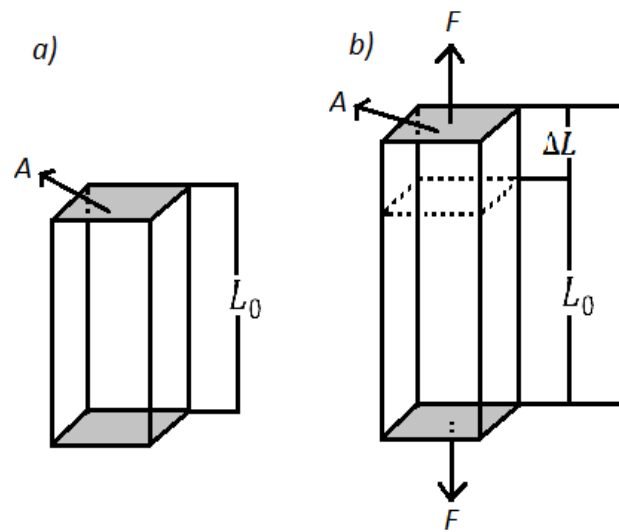


Figura 1.13: Ensayo de tracción. a) Muestra con forma de paralelepípedo rectangular previo a la aplicación de la fuerza. b) Muestra con forma de paralelepípedo rectangular una vez sometido a una fuerza de tracción uniaxial F que produce la extensión de la muestra fuerza.

Por definición, el esfuerzo σ en la muestra de paralelepípedo es igual al cociente entre la fuerza de tracción uniaxial media F y la sección transversal original A de la muestra.

$$\sigma = \frac{F}{A} \left[\frac{N}{m^2} \right] = \frac{F}{A} [Pa] (1)$$

Cuando se aplica a una muestra este tipo de fuerza, se produce una elongación de la misma en la dirección de la fuerza. Se define la deformación originada por la acción de una fuerza de tracción uniaxial sobre una muestra, como el cociente entre el cambio de longitud de la muestra en la dirección de la fuerza y la longitud original.

$$\varepsilon = \frac{(L-L_0)}{L_0} = \frac{\Delta L}{L_0} \left[\frac{m}{m} \right] (2)$$

Si el material vuelve a sus dimensiones originales cuando la fuerza cesa se dice que el material ha sufrido una “deformación elástica”. Si el material es deformado hasta el punto en el cual las moléculas constitutivas no pueden recuperar sus posiciones originales, se dice que ha experimentado una “deformación plástica”.

Durante el ensayo de tracción, la deformación se concentra en la región central de la probeta la cual, en una primera aproximación, se supone que posee una sección transversal (A) uniforme a lo largo de su longitud.

Los ensayos de tracción se realizan, en general, en máquinas universales de testeo. La muestra se sostiene por sus extremos en la máquina por medio de soportes o mordazas. Las mordazas comandadas por el motor de la máquina someten la muestra a una elongación creciente con una velocidad constante. La medición de la carga aplicada instantáneamente (F) y el cálculo de la elongación (ΔL) permiten evaluar el comportamiento del material.

Los datos de la fuerza pueden convertirse en datos de esfuerzo y los de elongación, en deformación, permitiendo la construcción de una gráfica esfuerzo-deformación como puede observarse en la **Figura 1.14**.

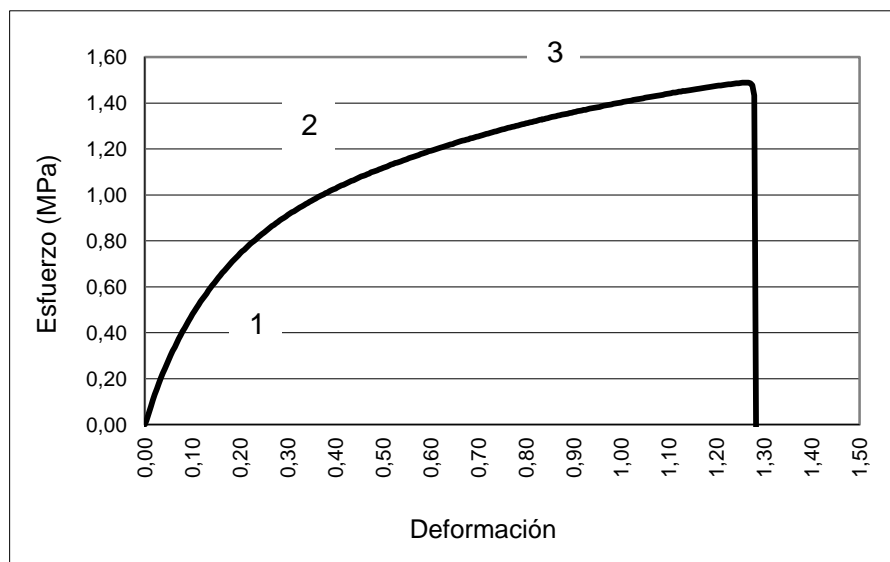


Figura 1.14: Curva esfuerzo-deformación.

En dicha curva se observan distintas regiones que se describen a continuación:

1. Zona de deformaciones elásticas: en esta zona, las deformaciones se reparten a lo largo de la muestra, son de pequeña magnitud y, si se retirara la carga aplicada, se recuperaría la forma inicial. El coeficiente de proporcionalidad entre el esfuerzo y la deformación se denomina módulo elástico o de Young y es característico del material.
2. Zona de deformaciones plásticas: en dicha zona, si se retirara la carga aplicada, la muestra recuperaría sólo parcialmente su forma quedando deformada permanentemente. Las deformaciones en esta región son mayores que en la zona elástica.
3. Zona de estricción: en dicha zona, las deformaciones se concentran en la parte central de la muestra apreciándose una acusada reducción de la sección de la misma, momento a partir del cual las deformaciones continuarán acumulándose hasta la rotura. La estricción es la responsable del descenso de la curva esfuerzo-deformación.

A partir de este ensayo, es posible obtener los parámetros esfuerzo a la ruptura (σ_r), deformación a la ruptura (ϵ_r) y el módulo de Young (E) característicos del material.

1.6.5.2 Permeabilidad al vapor de agua

Donhowe y Fennema (1994) definen la permeabilidad en películas como la transmisión de un permeato a través de un material resistente. En general, el mecanismo para el flujo de vapor de agua o de un gas a través de una película es la difusión activa en la que se incluye la solubilización del gas en la película, difusión a través de la misma y finalmente el paso hacia el otro lado de la película. El proceso de difusión depende del tamaño, la forma y la polaridad del penetrante, de la cristalinidad, de los enlaces y del movimiento de las cadenas poliméricas. La velocidad de permeación disminuye con el diámetro de la molécula permeante cuando no hay interacción entre el material permeante y el polímero (Sánchez y col., 1998).

Experimentalmente, la permeabilidad al vapor de agua (PVA) puede ser determinada por la siguiente ecuación descrita por Gennadios y col. (1994):

$$PVA = \frac{\Delta w \cdot x}{A \cdot \Delta t \cdot (p_1 - p_2)} \left[\frac{g \cdot m}{m^2 \text{ día mmHg}} \right]$$

Donde:

Δw = masa del permeado (g)

x = espesor (m)

A = área (m²)

Δt = tiempo (día)

$(p_1 - p_2)$ = diferencia de presiones parciales (mmHg) a ambos lados de la película.

La presencia en las películas de grupos funcionales altamente hidrofílicos que interaccionan fácilmente con el agua, genera la absorción de la misma a altas humedades relativas (H.R.). Se ha observado que la influencia de la H.R. en la permeabilidad de películas hidrofílicas es sustancial. Pequeñas diferencias en la H.R. resultan en cambios drásticos en la permeabilidad. La alta solubilidad del agua en los polímeros constitutivos es la responsable de la elevada permeabilidad de las películas. A su vez, esta absorción afecta las interacciones entre cadenas, conduciendo a una difusividad incrementada (McHugh y Krochta, 1994).

La permeabilidad al vapor de agua puede afectar la vida útil de los alimentos cubiertos con ellas por lo cual es importante su evaluación.

1.6.5.3 Solubilidad en agua

La solubilidad de las películas en agua es un importante parámetro en relación a las potenciales aplicaciones de dichos recubrimientos en alimentos. Para el caso de películas comestibles, se la define como el porcentaje de materia seca de la película solubilizado después de 24 horas de inmersión en agua destilada. Esta propiedad es de gran importancia para determinar la funcionalidad de la película comestible. Si la solubilidad es baja, puede ser utilizada para la protección de

alimentos en los cuales la actividad de agua es alta o la atmósfera de almacenaje es de alta humedad relativa. Por el contrario, si la solubilidad es alta, pueden utilizarse para contener porciones pre-medidas de ingredientes, las cuales van a ser agregadas a soluciones con base en agua o salsas calientes para la preparación del alimento. También, en alimentos listos para consumir, es deseable un alto porcentaje de solubilidad en agua para asegurar una respuesta positiva en la boca (Sothornvit y Krocht, 2000).

Experimentalmente la solubilidad puede ser calculada a través de la siguiente ecuación:

$$\text{Solubilidad} = \frac{(\text{masa seca inicial} - \text{masa seca final})}{\text{masa seca inicial}} * 100$$

1.6.5.4 Color

El color es un atributo organoléptico de primordial importancia dado que posee una influencia directa sobre la aceptabilidad por parte del consumidor (Hunter, 2000).

Para la cuantificación del mismo, se utilizan espacios de color elaborados por la Comisión Internacional de Iluminación (CIE). Entre ellos cabe destacar el sistema XYZ, que expresa el color por los parámetros triestímulo X, Y y Z vinculados a los colores rojo, verde y azul. Otro sistema es el CIE Lab (**Figura 1.15**), en el que el valor "L*" mide la luminosidad de la muestra, representando la aproximación matemática de la respuesta del ojo al negro-blanco. Un blanco perfecto tiene un valor de 100 y un negro perfecto tiene un valor de cero en la escala L. El valor "a*" mide la magnitud de rojo/verde, y el valor "b*" la magnitud de amarillo/azul (Nisha y col., 2004). De esta manera, los valores "a*" positivos muestran prevalencia del rojo, los valores "a*" negativos del verde, los "b*" positivos del amarillo y los "b*" negativos del azul. La información de todos ellos, unidos al valor de luminosidad "L*", permite identificar y definir todos los matices.

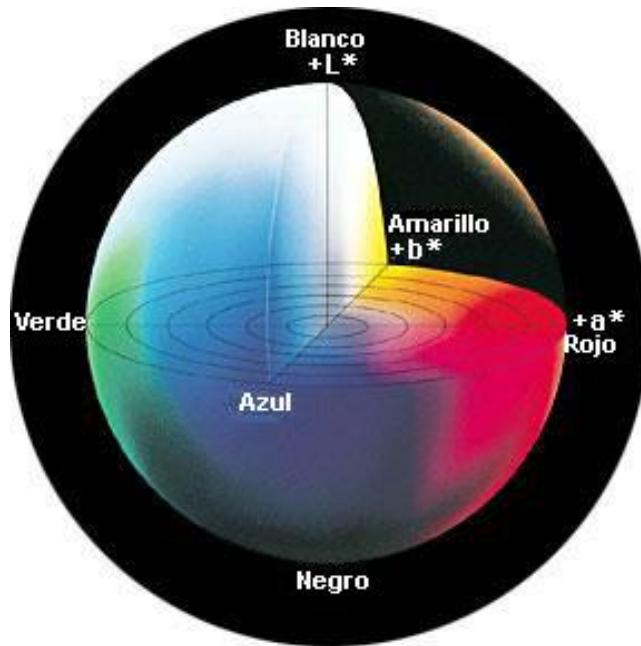


Figura 1.15: Espacio de color CIE Lab

La escala Hunter Lab usa los parámetros “L”, “a”, “b”. Aunque similar en organización al espacio CIE Lab, un color tendrá valores numéricos diferentes en estos dos espacios. Las dos escalas están matemáticamente vinculadas a los valores X, Y, Z.

Para determinar los atributos de color, es también necesario definir el tipo de iluminante (D65, C) y la posición del observador (2° o 10°) utilizado durante las mediciones.

A partir de la escala XYZ, se derivan otros parámetros como por ejemplo el índice de amarillo (Yellowness Index, YI). Este índice se utiliza para determinar el grado de amarillo de acuerdo con la Norma ASTM D1925 (1988), la cual define al YI como:

$$YI = \frac{100}{Y} (1,2769 X - 1,0592 Z)$$

Donde X, Y y Z responden a los valores triestímulo del espécimen bajo condiciones de iluminante C y observador 2°.

Un valor positivo de YI describe la presencia y magnitud de un componente amarillo, mientras que un valor negativo indica la aparición de un componente azul. Esta ecuación fue, en principio, desarrollada para determinar el grado de color amarillo de ciertos plásticos transparentes no coloreados, plásticos translúcidos u opacos casi blancos.

Otro parámetro interesante es la diferencia de color total. Cruz Rui y col. (2007) evaluaron la diferencia de color total para muestras de berro tratadas con calor y termosonicación con respecto a sus respectivos controles, utilizando la siguiente ecuación:

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

Siendo:

$$\Delta L^* = L^* - L_0^*$$

$$\Delta a^* = a^* - a_0^*$$

$$\Delta b^* = b^* - b_0^*$$

Donde L_0^* , a_0^* y b_0^* corresponden a los valores del control y L^* , a^* y b^* a los valores de las películas conteniendo antimicrobianos.

1.6.5.5 Ángulo de contacto y humectabilidad

La medición de los ángulos de contacto de líquidos sobre la superficie de un sólido es una técnica experimental apropiada para la caracterización y cuantificación de las propiedades de su superficie. Generalmente, un ángulo de contacto reducido significa una mayor facilidad de propagación del líquido sobre el sólido. Tanto las propiedades del líquido como de la matriz sólida afectan el ángulo de contacto (Zhong y col., 2014). Se utiliza el término humectabilidad o mojabilidad para describir el grado en que un líquido se extiende sobre una superficie sólida.

Las propiedades interfaciales entre un líquido y un componente sólido se caracterizan por las energías superficiales de cada fase y el ángulo de contacto

entre ellos (**Figura 1.16**). La medición del ángulo de contacto es muy útil y sensible para investigar los fenómenos interfaciales (Hameed, 2007). En el campo de las películas comestibles, el cálculo del ángulo de contacto es un buen método para determinar su hidrofiliicidad (Péroval y col., 2002) y distintos investigadores lo han aplicado para dicha caracterización (Cerqueira y col., 2009; Rotta y col., 2009; González y Alvarez Igarzabal, 2013).



Figura 1.16 Ángulo de contacto entre la superficie de una película comestible y una gota de agua destilada. Se observa el trazo de la tangente a la gota en el punto de contacto gota-superficie de la película. Adaptada de Hameed (2007).

1.6.6 Caracterización microscópica de las películas comestibles

1.6.6.1 Microscopía óptica

La microscopía es el conjunto de técnicas y métodos destinados a hacer visible los objetos de estudio que por su pequeñez están fuera del rango de resolución del ojo normal.

El microscopio óptico se sirve de la luz visible para crear una imagen aumentada del objeto. El más simple es la lente convexa doble con una distancia focal corta. Estas lentes pueden aumentar un objeto hasta 15 veces. Por lo general se utilizan microscopios compuestos, que disponen de varias lentes con las que se consiguen aumentos mayores. Algunos microscopios ópticos pueden aumentar un objeto por encima de 2000 veces pero no tienen la capacidad para resolver la estructura molecular. Tienen una resolución teórica de aproximadamente 200 nm

pero en la práctica es poco probable que se logre una resolución menor a 1 μm , aproximadamente (Groves y col., 2006).

1.6.6.2 Microscopía de barrido electrónico ambiental

La microscopía de barrido electrónico ambiental (ESEM) surgió como una alternativa al clásico microscopio de barrido electrónico, con el cual solo se pueden observar muestras deshidratadas debido a que el equipo cuenta con una columna que se encuentra al vacío en su interior, a través de la cual un haz de electrones alcanza la muestra. Los microscopios de barrido electrónico ambiental tienen una columna de bombeo de electrones diferencial, en conjunción con un sistema para permitir una diferencia de presión entre la columna y la cámara contenedora de la muestra (por ejemplo una o más aberturas). Esto permite que la columna de electrones se mantenga al alto vacío, mientras que la cámara se pueda mantener a presiones de alrededor de 2500 Pa (James, 2009). La ESEM se emplea cuando se desea minimizar los cambios en la muestra durante su preparación, sin embargo este beneficio se ve minimizado por las condiciones de la cámara contenedora de la muestra que se encuentra a muy baja humedad relativa lo cual deshidrata progresivamente la muestra, dificultando la óptima captura de imágenes (Edwards y col., 2008).

La microscopía de barrido electrónico ambiental se utiliza en la caracterización de la morfología de las secciones transversales de las películas comestibles (Jonge y Ross, 2011; Arzate-Vázquez y col., 2012).

1.6.6.3 Microscopía de fuerza atómica

La microscopía de fuerza atómica (MFA) es una técnica poderosa que puede proporcionar información directa de la morfología de la superficie con una resolución nanométrica, lo que permite estudiar la topografía de las superficies y la rugosidad. Existen en la literatura numerosas aplicaciones de MFA (Smith y col., 1996; Fang y col., 2005) las cuales permiten realizar caracterizaciones que serían a menudo, inaccesibles a través de cualquier otra técnica experimental (Elofsson y col., 1997).

En el campo de las películas comestibles, esta técnica puede ser útil para identificar diferencias estructurales en las películas preparadas por diferentes métodos (Ghanbarzadeh y Oromiehi, 2008). También se utiliza la MFA para evaluar cambios en las características de la superficie de un material antes y después de diferentes tratamientos (Jones y col., 2005).

1.6.7 Actividad antimicrobiana de las películas comestibles

Las películas comestibles pueden presentar actividad antimicrobiana debido a que la macromolécula constituyente presenta esta actividad, como es el caso del quitosano, o debido a la presencia de un aditivo antimicrobiano en su formulación. En este último caso, es posible cuantificar la biodisponibilidad del antimicrobiano contenido en la película a través de un microorganismo indicador, el cual puede estar presente en el medio receptor. Este microorganismo debe ser representativo de la flora nativa habitualmente presente y/o de las contaminaciones comúnmente halladas en el alimento de interés.

Se han desarrollado películas comestibles conteniendo antimicrobianos con el fin de controlar el crecimiento de microorganismos patogénicos y de deterioro que podrían estar presentes en los alimentos o incorporarse como contaminación post-proceso (Hsu y col., 2005; Fajardo y col., 2010; Campos y col., 2011; Ramos y col., 2012). Se han desarrollado diversas técnicas para evaluar la funcionalidad de estas películas. Cuando el antimicrobiano se concibe como un inhibidor del desarrollo de los microorganismos en superficie, es necesario evaluar su efectividad en dicho lugar. En cambio, si lo que se desea es inhibir el desarrollo de los microorganismos en el seno del alimento, es importante evaluar la difusión del antimicrobiano desde la película hacia el alimento y su posterior difusión hacia el seno del mismo (Franssen, 2002). A su vez, cuando lo que se busca conocer es la capacidad de barrera de la película en cuestión, se hace necesario contar con técnicas para llegar a este objetivo.

1.6.7.1 Estudio de la liberación de los antimicrobianos desde las películas comestibles hacia un sistema modelo sólido

La técnica más explorada en cuanto a disponibilidad de un antimicrobiano en medio sólido, es la determinación de las zonas de inhibición (halos) en el desarrollo de un microorganismo seleccionado, que ha sido sembrado en la superficie de un medio de cultivo favorable para su desarrollo.

Con este objetivo, como se muestra en la **Figura 1.17a**, se aplican sobre la superficie inoculada, discos de película conteniendo el preservador y se procede a la incubación a la temperatura adecuada para el desarrollo del microorganismo utilizado. En el caso que el antimicrobiano se encuentre biodisponible, y actúe frente al microorganismo evaluado, se observará una zona clara de no crecimiento alrededor de los discos de película, como se muestra en la **Figura 1.17b**. Esta zona clara, denominada halo, será un indicador de la difusión del antimicrobiano desde la película hacia el agar, y de su actividad.

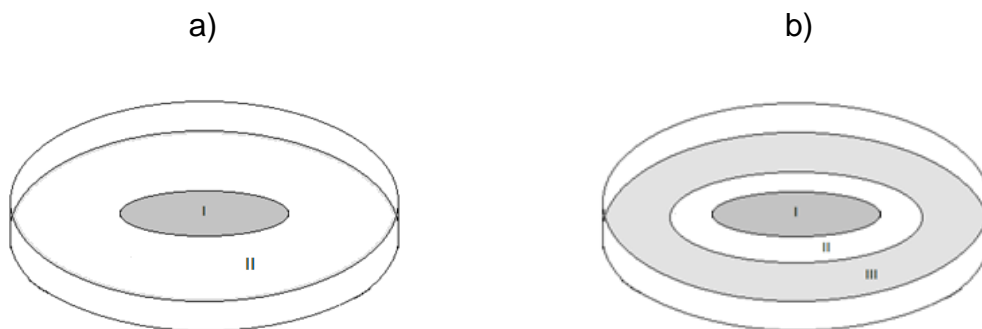


Figura 1.17: Esquema de ensayo del estudio de la liberación de los antimicrobianos desde la película hacia un sistema modelo sólido. a) Primer día del ensayo: placa de Petri conteniendo agar inoculado (II) y disco de película comestible conteniendo antimicrobianos apoyado sobre el agar (I), y b) Último día del ensayo: placa de Petri conteniendo disco de película comestible conteniendo antimicrobianos (I), zona clara sin crecimiento de los microorganismos debido a la acción de los antimicrobianos difundidos (II) y césped de microorganismo (III).

Numerosos autores han evaluado la efectividad de antimicrobianos a través de esta técnica. Lim y col. (2010) incorporaron extracto de semilla de pomelo a películas biodegradables a base de nano-arcilla de *Gelidium corneum* estudiaron la inhibición del crecimiento de *L. innocua* y *E. coli*. Ramos y col. (2012) analizaron la actividad antimicrobiana de películas de proteínas de suero de queso portadoras de ácido láctico y natamicina frente a varios microorganismos (*E. coli*, *S. aureus* y *Y. lipolytica*). Ture y col. (2008) elaboraron películas comestibles a base de almidón de trigo portadoras de natamicina y/o aceite esencial de romero y evaluaron su actividad frente a *Aspergillus niger* y *Penicillium roquefortii*.

1.6.7.2 Estudio de la actividad de barrera de las películas comestibles sobre un sistema modelo

Estudios recientes se han centrado en la aplicación de películas comestibles sobre la superficie de los alimentos con el fin de prevenir la contaminación postproceso (Ozdemir y Floros, 2001; Franssen, 2002; Sebtí y col., 2004). Con el objeto de poner a prueba la capacidad de barrera de las películas, se han desarrollado distintas técnicas. Sanjurjo y col. (2006), quienes evaluaron la efectividad de películas de almidón de mandioca conteniendo distintas concentraciones de nisina como barrera frente a *L. innocua*, utilizaron una placa de Petri conteniendo un agar apropiado para el desarrollo de este microorganismo. Como se muestra en la **Figura 1.18**, estos investigadores utilizaron placas conteniendo el agar apropiado para el crecimiento de la bacteria evaluada. Sobre el mismo colocaron un disco de película comestible conteniendo antimicrobianos, al que luego inocularon con el cultivo simulando una contaminación externa. Finalizada la incubación verificaron la sobrevivencia de los microorganismos sobre la película, y, si los mismos fueron capaces de atravesarla y contaminar el agar.

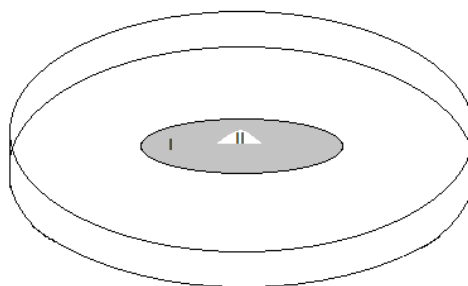


Figura 1.18: Estudio de capacidad de barrera de la película: agar con disco de película comestible conteniendo antimicrobianos (I) y gota de cultivo (II).

Flores y col. (2007b) incorporaron sorbato de potasio a películas comestibles a base de almidón de mandioca y evaluaron su capacidad para prevenir una contaminación externa de *Z. bailii*. Vásconez y col. (2009) elaboraron películas comestibles a base de almidón de mandioca, quitosano y sorbato de potasio evaluando su capacidad como barrera frente a *Z. bailii*.

1.6.7.3 Estudio de la liberación de los antimicrobianos desde las películas comestibles hacia un alimento

Con el objetivo de evaluar la biodisponibilidad de los antimicrobianos contenidos en la película, varios investigadores han estudiado la efectividad en distintos tipos de alimentos. Coma y col. (2002) evaluaron la efectividad del quitosano contenido en la matriz de la película frente a *L. innocua* presente en la superficie de queso Emental. Moreira y col. (2011) estudiaron la microflora de zanahoria, salame y queso cubiertos con películas comestibles a base de quitosano y caseinato de sodio. Cerqueira y col., (2009) evaluaron la microflora de queso de pasta semidura cubierto con película a base de galactomanano y quitosano. Fajardo y col. (2010) evaluaron la difusión de natamicina contenida en coberturas a base de quitosano sobre la superficie de queso Saloio previamente inoculado con *Aspergillus niger*.

En todos los casos, la película fue colocada sobre el alimento previamente inoculado, como se muestra en la **Figura 1.19**. Posteriormente se evaluó la sobrevivencia de los microorganismos inoculados en cada alimento.

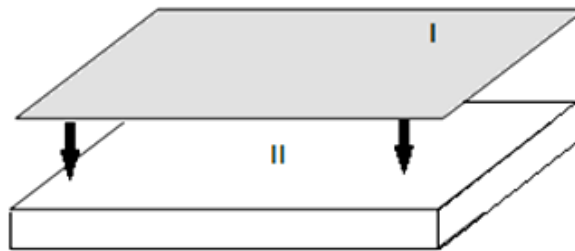


Figura 1.19 Esquema representativo de la liberación de los antimicrobianos desde películas comestibles hacia un alimento. Película comestible conteniendo antimicrobianos (I) y superficie del alimento inoculado (II).

1.6.7.4 Estudio de la actividad de barrera de las películas comestibles sobre un alimento

Con el objetivo de evaluar la capacidad de barrera de las películas comestibles frente a una contaminación postproceso, se debe estudiar la respuesta de los microorganismos inoculados sobre una película que recubre el alimento. De acuerdo a esta respuesta se puede determinar si la película inhibe el microorganismo en cuestión, y si permite o no su paso hacia el alimento.

Si bien se han aplicado técnicas para evaluar la capacidad de barrera de películas comestibles en sistemas modelos (Basch y col., 2011; Flores y col., 2007; Sanjurjo y col., 2006), no se ha encontrado en bibliografía estudios de esta propiedad para alimentos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos generales

✓ Estudiar y desarrollar, en sus aspectos básicos y aplicados, procesos novedosos que contribuyan a optimizar la calidad de los alimentos.

✓ Estudiar la potencialidad de los antimicrobianos naturales y de sus distintas formas de aplicación.

2.2 Objetivos específicos

✓ Desarrollar películas comestibles conteniendo natamicina y/o nisina con estructuras, propiedades y actividad antimicrobiana adecuadas, para su aplicación como estrategia para prolongar la vida útil de alimentos lácteos.

✓ Evaluar las propiedades estructurales, mecánicas, físico-químicas y de superficie de las películas desarrolladas.

✓ Evaluar la actividad antimicrobiana de películas conteniendo natamicina y/o nisina, en sistemas alimenticios lácteos, particularmente quesos, con el objetivo de prolongar su vida útil.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Insumos y materias primas

- ✓ Almidón de mandioca (Industrias del Maíz S.A., Argentina).
- ✓ Glicerol (Mallickrodt, Argentina).
- ✓ Natamicina comercial (Delvolid® Salt) conteniendo 50% p/p de NaCl y 50% p/p de natamicina (DSM, Países Bajos).
- ✓ Nisina comercial (DelvoPlus®) conteniendo 97,5% p/p de NaCl y 2,5% p/p de nisina (DSM, Países Bajos).
- ✓ Quesos de pasta blanda Por Salut, de pasta semidura Holanda y de pasta dura Reggianito (La Serenísima, Argentina).
- ✓ Concentrado proteico de suero (Arla S.A., Argentina) con 35% de proteína p/p (WPC35). Su composición: lactosa 48,8% p/p; proteína 38,3% p/p; cenizas 7,5% p/p, humedad 3,2% p/p y grasa 2,2% p/p.
- ✓ Película comercial constituida por copolímero de cloruro de polivinilo/cloruro de polivinilideno (Cryovac®, Sealed Air Argentina S.A.) denominada "COMERCIAL".

3.1.2 Cepas

Las cepas de levaduras utilizadas fueron:

- *Saccharomyces cerevisiae* (CBS 1171, cepa de colección SC),
- *Zygosaccharomyces rouxii* (ATCC 28.253)
- *Yarrowia lipolytica* (cepa donada por el Instituto Nacional de enfermedades infecciosas "Dr. Carlos G. Malbrán", CABA, Argentina, N° 113942)

La cepa bacteriana utilizada fue:

- *Listeria innocua* (CIP 8011-CCMA 29- Facultad de Farmacia y Bioquímica)

Las cepas de levaduras y bacterias utilizadas se mantuvieron en heladera a 4°C en estrías de agar Sabouraud (Biokar Diagnostics, Francia) y caldo tripton de soja enriquecido con extracto de levaduras (TSYE, Biokar Diagnostics, Francia) respectivamente. Las estrías fueron repicadas mensualmente.

3.1.3 Medios de cultivo

Para el crecimiento de levaduras se utilizó:

- Caldo Sabouraud: triptona (5,0 g/l); digesto papaínico de carne (5,0 g/l) y glucosa (20,0 g/l).

Para el recuento de levaduras en placa y el ensayo de difusión en agar:

- Agar YGC (Biokar Diagnostics, Francia), medio de cultivo selectivo para aislamiento de hongos y levaduras: extracto de levadura (5,0 g/l); glucosa (20,0 g/l); cloranfenicol (0,1 g/l); y agar para cultivo (15,0 g/l). Las preparaciones se completaron con agua destilada y se autoclavaron (autoclave Villar Y Zaurdo S.R.L., Industria Argentina) durante 15 minutos a 120°C. El cloranfenicol es un agente bacteriostático que inhibe la síntesis proteica en bacterias, permitiendo el crecimiento de las levaduras.

Para el crecimiento de *L. innocua* se utilizó:

- Caldo TSYE, medio nutriente universal: triptona (17 g/l); digesto papáico (3 g/l); glucosa (2,5 g/l); fosfato dipotásico (2,5 g/l); cloruro de sodio (5 g/l); y extracto de levaduras (6 g/l).

Para el recuento de *L. innocua* en placa:

- Agar Oxford, medio selectivo para aislamiento de *L. innocua*, se elabora mediante la preparación y esterilización de agar y el agregado posterior de un vial conteniendo el suplemento selectivo (Biokar Diagnostics, Francia). La composición completa es: polipeptona (20 g/l); extracto de levadura (3 g/l); almidón (1 g/l); cloruro de sodio (5 g/l); esculina (1g/l); citrato férrico de amonio (0,5 g/l); cloruro de litio (15 g/l); cicloheximida (400 mg/l); sulfato de colistina (20 mg/l); cefotetan (2 mg/l); fosfomicina (10 mg/l); acriflavina (5 mg/l); y agar para cultivo (13g/l).

Para el ensayo de difusión en agar:

- Agar TSYE, medio nutriente universal: triptona (17 g/l); digesto papáico (3 g/l); glucosa (2,5 g/l); fosfato dipotásico (2,5 g/l); cloruro de sodio (5 g/l); extracto de levaduras (6 g/l); agar para cultivo (15 g/l).
- Agar TSYE_C medio nutriente universal excluyente para hongos y levaduras: triptona (17 g/l); digesto papaínico de carne (3 g/l); glucosa (2,5 g/l); fosfato dipotásico (2,5 g/l); cloruro de sodio (5 g/l); cicloheximida (50 mg/l); extracto de levaduras (6 g/l); agar para cultivo (15 g/l). La cicloheximida inhibe la síntesis proteica en células eucariotas como las levaduras, permitiendo el crecimiento de bacterias.

Todas las preparaciones se completaron con agua destilada y se autoclavarón durante 15 minutos a 120°C.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparación de los inóculos

Los inóculos de levaduras se prepararon partiendo de estrías stock de *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica* o *Z. rouxii*. Se utilizó un ansa en condiciones de esterilidad y se inocularon 150 ml de caldo Sabouraud para cada inóculo. Este cultivo fue incubado durante 16-18 horas a 28°C con agitación continua a velocidad constante, o hasta obtener la densidad óptica correspondiente a la densidad poblacional inicial deseada para cada tratamiento, verificada por densitometría (λ : 630 nm), de acuerdo a las curvas de crecimiento de las levaduras realizadas previamente.

Para la preparación del inóculo de *L. innocua*, se tomó una alícuota desde la estría stock utilizando un ansa en condiciones de esterilidad y se inocularon 150 ml de caldo TSYE. Este precultivo fue incubado durante 16-18 horas a 28°C con agitación continua a velocidad constante. Una alícuota (2 ml) de este precultivo fue transferida a 150 ml de caldo fresco TSYE e incubado en idénticas condiciones que el precultivo hasta obtener la densidad óptica correspondiente a la densidad poblacional inicial deseada para cada tratamiento, verificada por densitometría

(λ : 540 nm), de acuerdo a la curva de crecimiento de la bacteria realizada previamente.

3.2.2 Preparación de los cultivos

Para la preparación de los cultivos simples se tomaron alícuotas de 20 ml del cultivo inoculado y fueron centrifugadas a 10000 rpm en una centrífuga refrigerada (Eppendorf® Modelo 5804 R). El tiempo de centrifugación dependió de cada microorganismo, siendo de 10 minutos para levaduras y 40 minutos para *L. innocua*. El pellet de células obtenido fue resuspendido en el mismo volumen del medio a evaluar.

Para la preparación del cultivo mixto, cada uno de los microorganismos se cultivó en su correspondiente caldo para lograr la densidad deseada. A partir de entonces, alícuotas de 30 ml de cada uno de los cultivos se centrifugaron a la velocidad necesaria requerida por cada microorganismo y cada pellet se resuspendió en 15 ml de caldo TSYE. Las dos suspensiones se mezclaron entre sí para llegar a un volumen final de 30 ml.

3.2.3 Recuento de células viables

Se determinó la viabilidad de las células por recuento en placa aplicando el método de la gota. Las células fueron diluidas serialmente, en diluciones al décimo con agua peptonada estéril (peptona de carne 1 g/l, Laboratorios Britania S.A., Buenos Aires, Argentina). Se sembraron por duplicado alícuotas de 20 μ l de las diluciones en la superficie de placas de Petri conteniendo el agar más apropiado para el desarrollo del microorganismo en evaluación. Luego fueron incubadas a 37°C por 24 horas las bacterias y a 28°C por 48-72 horas las levaduras.

Las colonias formadas se informan como el logaritmo del número de unidades formadoras de colonias por mililitro (log UFC/ml) según la siguiente ecuación:

$$\log \text{UFC}/_{ml} = \log \frac{\text{colonias contadas} * \text{factor de dilución}}{\text{volumen de siembra}}$$

Para determinar la viabilidad de las células presentes en baja concentración se empleó el método de sembrado en superficie. Se sembraron 100 µl de las células a evaluar en la superficie de placas de Petri conteniendo el agar más apropiado para el desarrollo del microorganismo en evaluación. Posteriormente, se rastrilló la superficie y las placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas en el caso de las bacterias y a 28°C por 48-72 horas para las levaduras.

3.2.4 Microscopía electrónica de transmisión

La tecnología de microscopía electrónica de transmisión (MET) se utilizó para estudiar células de *S. cerevisiae* en fase estacionaria cultivadas en caldo Sabouraud (sin tratar) o en caldo Sabouraud suplementado con 50 ppm de natamicina y almacenadas durante 24 horas a 28 °C (tratadas), con el fin de caracterizar el efecto de la natamicina sobre la levadura.

Se realizó una prueba de tinción negativa con el objetivo de ver proteínas sobre la superficie de las células: una gota de suspensión de cada tratamiento se montó sobre una rejilla de cobre de 200 cuadrantes recubierta con carbono y se tiñó con una gota de acetato de uranilo al 1% durante 90 segundos. Las muestras fueron examinadas utilizando un microscopio electrónico de transmisión (Philips EM 301).

También se realizó una fijación con glutaraldehído con el objetivo de ver organelas: células tratadas y no tratadas fueron fijadas con glutaraldehído (2,5 g/100ml buffer fosfato, 0,1 mol/l pH 7,4) durante 18 horas, se enjuagaron tres veces durante 10 minutos con buffer fosfato (0,1 mol/l pH 7,4) y luego se fijaron con tetróxido de osmio (1 g/100ml) durante 2 horas a 4°C. Después de la fijación, las células se enjuagaron tres veces durante 10 minutos con buffer fosfato (0,1 mol/l pH 7,4) y se deshidrataron usando 30, 50, 70 y 95 ml/100 ml de acetona secuencialmente durante 15 minutos cada uno. A continuación, las células fueron deshidratadas durante 30 minutos con acetona pura. Las células deshidratadas se trataron con óxido de propileno dos veces durante 10 minutos a 4°C. Luego se infiltraron secuencialmente con una mezcla de óxido de propileno: ACM resina epoxi de Durcupan (03:01, 01:01 y 01:03) durante 45 minutos. Para formar bloques de muestra se polimerizó la resina en un horno a 60°C durante 72 horas. Los bloques

de muestras se cortaron con un cuchillo de diamante en un ultra micrótomo Sorvall MT2 Porter-Blum (DuPont Instruments, Operaciones Sorvall, Newton, Connecticut, EE.UU.) a mano. Se colocaron secciones delgadas (70-80 nm) en rejillas de cobre con una malla de 300 cuadrantes. Las secciones fueron teñidas durante 15-20 minutos en uranilo: alcohol etílico (01:01), se lavaron tres veces durante 2 minutos y después se incubaron con una gota de citrato de plomo de Reynold. Las muestras fueron examinadas utilizando un microscopio electrónico de transmisión (Philips EM 301).

3.2.5 Actividad antimicrobiana de natamicina y/o nisina en un alimento modelo líquido

Este ensayo se utilizó para determinar la eficacia antimicrobiana de la natamicina y/o nisina aplicadas directamente a un alimento líquido modelo frente a un cultivo simple de levaduras o un cultivo mixto.

Para la evaluación en un cultivo simple: se prepararon cultivos de *S. cerevisiae* o *Z. rouxii* o *Y. lipolytica*, se centrifugaron y se resuspendieron en concentrado proteico de suero líquido (CPSL) 16% p/p; en todos los casos se ajustó el pH en 5,5 con una solución de HCl 5 M y las mediciones de pH se realizaron con un medidor de pH, (HANNA® Instruments, modelo 8424, España). Se dispensaron alícuotas en eppendorf estériles y se agregaron 20 µl de una suspensión de natamicina de concentración tal que se obtuvieron los siguientes sistemas:

- CONTROL: suspensión CPSL 16% p/p.
- 20 ppm natamicina: suspensión CPSL 16% p/p y 20 ppm de natamicina
- 50 ppm natamicina: suspensión CPSL 16% p/p y 50 ppm de natamicina

Para la evaluación en un cultivo mixto: se preparó un cultivo mixto de *S. cerevisiae* y *L. innocua*. De acuerdo a lo descrito en el apartado 3.2.2 cada pellet se resuspendió en CPSL 16% p/p y se unificaron en un mismo erlenmeyer, se ajustó el pH en 5,5 con una solución de HCl 5 M. Luego se dispensó en eppendorf estériles

y se agregaron 20 µl de una suspensión de natamicina y 20 µl de una suspensión de nisina con concentraciones tales que se obtuvieron los siguientes sistemas:

- CONTROL: suspensión CPSL 16% p/p.
- 50 ppm natamicina: suspensión CPSL 16% p/p y 50 ppm de natamicina
- 50 ppm natamicina/12,5 ppm nisina: suspensión CPSL 16% p/p, 50 ppm de natamicina y 12,5 ppm de nisina
- 12,5 ppm nisina: suspensión CPSL 16% p/p y 12,5 ppm de nisina

Todos los sistemas se incubaron a 25 °C y se tomaron muestras periódicamente para poner a prueba la viabilidad de los microorganismos. A cada tiempo evaluado se tomaron muestras contenidas en tubos eppendorf y se agitaron con un agitador vortex (Vicking, Argentina) durante 2 minutos. Se hicieron las diluciones correspondientes y se realizó el recuento de células viables.

Las determinaciones se realizaron por duplicado en dos corridas experimentales independientes.

3.2.6 Desarrollo de las películas

Se prepararon diferentes mezclas de almidón, glicerol, agua y antimicrobianos naturales (solos o en combinación). Con la finalidad de obtener películas comestibles con propiedades de manejo adecuadas, fue necesario formular las mezclas con diferentes cantidades de glicerol, el compuesto utilizado como plastificante. Estudios previos sugirieron que las formulaciones descritas en la **Tabla 3.1** eran las adecuadas para este objetivo. En todos los casos, la masa total de sistema preparado fue de 300 gramos, y las concentraciones finales de los antimicrobianos presentes en cada formulación son las que se expresan en la **Tabla 3.2**.

Tabla 3.1: Composición de las mezclas utilizadas para la formular las distintas películas.

		PELÍCULAS							
		CNA	NA ₁	NA ₂	NA ₃	CNANI	NANI	CNI	NI
COMPONENTES	Agua (g)	266,5	266,5	266,5	266,5	259	259	270	270
	Glicerina (g)	8,5	8,5	8,5	8,5	6	6	5	5
	Almidón (g)	15	15	15	15	15	15	15	15
	Agua para solución de natamicina (g)	10	10	10	10	10	10	-	-
	Natamicina (mg)	-	17,5	35	81,5	-	81,5	-	-
	Agua para solución de nisina (pH 2 ajustado con HCl) (g)	-	-	-	-	10	10	10	10
	Nisina (mg)	-	-	-	-	-	97,8	-	97,8

CNA: control de las películas con natamicina. NA₁, NA₂ y NA₃: películas conteniendo natamicina. CNANI: control de la película con natamicina y nisina. NANI: película con natamicina y nisina. CNI: control de la película con nisina. NI: película con nisina.

Tabla 3.2: Concentración de antimicrobianos en las distintas películas formuladas

		PELÍCULAS							
		CNA	NA ₁	NA ₂	NA ₃	CNANI	NANI	CNI	NI
Natamicina	mg natamicina/dm² de película	-	1,85	3,7	9,25	-	9,25	-	-
	ppm natamicina en queso de 4 kg	-	10	20	50	-	50	-	-
	mg natamicina/kg de queso	-	10	20	50	-	50	-	-
Nisina	mg nisina/dm² de película	-	-	-	-	-	2,31	-	2,31
	ppm nisina en queso de 4 Kg	-	-	-	-	-	12,5	-	12,5
	mg nisina/kg de queso	-	-	-	-	-	12,5	-	12,5

La fabricación de las películas se realizó aplicando la técnica de casteo. Este proceso comprende tres etapas: la hidratación del almidón, la gelatinización del mismo y, finalmente, la obtención de la película mediante el secado del gel obtenido.

- Etapa 1: Hidratación del almidón

Se taró un vaso de precipitados de 1000 ml mediante una balanza analítica Mettler (precisión de 0,0001 g) y se pesó la cantidad correspondiente de agua y glicerol. Luego se colocó el conjunto sobre un agitador magnético (IKA® modelo MS 3 Basic) dotado de platina calefactora y se homogeneizó el sistema durante 5 minutos. El almidón fue posteriormente incorporado a la solución en forma lenta mientras se agitaba continuamente. Las soluciones se mantuvieron en agitación durante 10 minutos para lograr la hidratación de los gránulos de almidón.

- Etapa 2: Proceso de gelatinización

Manteniendo la agitación, se procedió a la gelatinización mediante el calentamiento. Previo a ello se cubrió el vaso de precipitado con papel aluminio para minimizar la pérdida por evaporación. La velocidad de calentamiento fue de aproximadamente 2°C/min, hasta alcanzar una temperatura final de 82°C. Para el caso de las películas conteniendo antimicrobianos y, con el objetivo de minimizar la pérdida de actividad del aditivo durante el calentamiento, la solución conteniendo el antimicrobiano correspondiente a cada formulación, fue agregada durante el proceso de gelatinización, una vez que el gel de almidón alcanzó una temperatura de 70°C.

- Etapa 3: Casteo y eliminación de las burbujas

En todos los sistemas, para evitar la presencia de burbujas de aire en las películas, se realizó una desgasificación mediante centrifugación a 20°C y a 2000 rpm durante 30 minutos (Eppendorf® Modelo 5804 R). En el caso de los sistemas conteniendo exclusivamente natamicina, fue necesario aplicar vacío previo a la centrifugación, para asegurar la ausencia de burbujas en las películas. En todos los casos, se vertieron 12 gramos de gel en moldes de silicona de 7 cm de diámetro. Posteriormente, los mismos fueron

colocados en una estufa con convección forzada de aire a 37°C, durante 24 horas (sistemas con 8,5 gramos de glicerol) y 48 horas (sistemas con 6 y 5 gramos de glicerol).

Las películas, una vez constituidas, se retiraron de los moldes y se dejaron estabilizar dentro de un desecador sobre solución saturada de NaBr (actividad de agua, $a_w \cong 0,575$) durante 7 días a 28°C, previo a su utilización.

3.2.7 Preparación de soluciones para proceso de aplicación directa

Con el objetivo de comparar la efectividad antimicrobiana de las películas con otros sistemas de aplicación en superficie, se utilizaron soluciones conteniendo antimicrobianos. Para ello se prepararon distintas soluciones madre cuyas composiciones fueron: solución de natamicina 12500 ppm, solución de nisina 3125 ppm y solución de natamicina y nisina con 12500 ppm y 3125 ppm, respectivamente. Se colocaron 20 µl de cada solución sobre la superficie del queso y luego se distribuyó con espátula de drigalsky estéril. Esto permitió tener una concentración de antimicrobianos en la superficie del alimento comparable a la contenida en las películas NA₃, NI y NANI (**Tabla 3.3**).

Tabla 3.3: Concentración de antimicrobianos (ppm) en los quesos tratados con cada solución en forma directa.

	Tratamientos		
	ADNA	ADNI	ADNANI
Natamicina (ppm)	50	-	50
Nisina (ppm)	-	12,5	12,5

ADNA: tratamiento con natamicina en superficie. ADNI: tratamiento con nisina en superficie. ADNANI: tratamiento con natamicina y nisina en superficie.

3.2.8 Caracterización mecánica y físico-química de las películas comestibles

3.2.8.1 Propiedades mecánicas de las películas: ensayo de tracción

Para este ensayo se utilizó la máquina universal de testeo Instron 3345 (USA) provista de mordazas neumáticas con una presión de ajuste de aproximadamente 25 Psi. Se estudió el comportamiento de esfuerzo-deformación a la tracción de las películas, usando una velocidad de deformación de 0,8 mm/seg y el experimento se llevó a cabo hasta la ruptura. Las muestras utilizadas tenían una longitud de 60 mm y un ancho de 6 mm. La distancia inicial entre mordazas fue de 20 mm. Los ensayos se realizaron diez veces para cada muestra.

Se registraron las curvas de fuerza (N) en función del desplazamiento (mm) y, a partir de ellas, se obtuvieron las curvas de esfuerzo (σ) (MPa) en función de la deformación (ϵ) mediante las siguientes expresiones:

$$\sigma = \frac{F}{A} \epsilon = \frac{\Delta L}{L_0}$$

Donde

F = Fuerza

A = Área de la sección transversal inicial de la muestra

L_f = Longitud final de la muestra

L_0 = Longitud inicial de la muestra

$\Delta L = L_f - L_0$ = Elongación de la muestra

A partir de las curvas obtenidas, se determinaron los siguientes parámetros:

- Esfuerzo a ruptura (σ_r): Máximo esfuerzo soportado previo a la ruptura de la muestra
- Deformación a ruptura (ϵ_r): Deformación en el punto de ruptura de la muestra
- Firmeza ($F_r = \sigma_r / \epsilon_r$): Es una medida de la rigidez del material en el punto de ruptura de la muestra.

También se calculó el Módulo elástico o módulo de Young (E), el cual se evaluó a partir de la pendiente de la zona inicial de la curva esfuerzo-deformación. Este parámetro brinda información del comportamiento elástico de la película.

3.2.8.2 Espesor

Se midió el espesor de las películas utilizando un micrótopo digital (Mitutoyo, Japón) (error: 0,01 μm). El mismo se evaluó en tres posiciones diferentes en cada película. Estos datos fueron utilizados para los cálculos de la permeabilidad al vapor de agua y del esfuerzo a la tracción de las películas.

3.2.8.3 Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas se determinó gravimétricamente a 25°C utilizando una modificación al procedimiento especificado por ASTM E96-00 (2000). Para la realización de este ensayo se utilizaron celdas de permeación de acrílico, con las siguientes dimensiones: diámetro interno de 4,4 cm y diámetro externo de 8,4 cm, resultando en un área expuesta de 15,205 cm^2 ; y 3,5 cm de profundidad.

En el interior de cada celda se colocó CaCl_2 dejando libre no menos de 1 cm en la parte superior para evitar cualquier contacto accidental entre la película y la sal. De esta manera se generó una atmósfera de 0% H.R dentro de la celda, o lo que es lo mismo, 0 Pa de presión parcial de vapor de agua. Se ubicó cada película en la parte superior de la celda y se colocó la tapa ajustándola con cuatro tornillos mariposa. Para ayudar a asegurar un buen cierre, se utilizaron sellos de caucho y grasa de vacío. Posteriormente, las celdas de permeación se pesaron y luego se colocaron en una cámara con temperatura y humedad relativa controladas (Ibertest, España), las cuales fueron ajustadas a 25°C y 70% H. R. (\cong 2288 Pa de presión parcial de vapor de agua).

La diferencia de presión parcial de vapor de agua existente a ambos lados de la película proporciona una fuerza impulsora para el flujo de vapor de agua a través de la misma. Después de 16-20 horas aproximadamente, se alcanzó una tasa de transmisión de vapor de agua estacionaria y, desde ese momento, se registraron

diariamente los cambios en el peso de la celda de permeación durante un período de 5 días. Los cambios de peso se registraron mediante una balanza analítica. La ganancia de peso de las celdas fue graficada en función del tiempo, obteniéndose una dependencia lineal y mediante regresión lineal se calculó la pendiente de la rectas (G).

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) fue calculada de acuerdo a lo propuesto por Gennadios y col. (1994):

$$PVA = \frac{G * L}{A * \Delta P}$$

Donde G es la pendiente de la recta de cambio de peso en función del tiempo, L es el espesor de la película, A es el área expuesta de la película y ΔP es la diferencia de presión de vapor de agua a través de la película. Todas las pruebas se llevaron a cabo, por lo menos, por triplicado.

3.2.8.4 Solubilidad en agua

La solubilidad se define como el porcentaje de materia seca de película solubilizada después de 24 horas de inmersión en agua destilada (Gontard y col., 1992).

Discos de película de 2 cm de diámetro se pesaron en balanza analítica por triplicado para cada sistema. Luego se secaron en una estufa de vacío a 100°C durante 24 horas a fin de determinar su masa seca inicial. Por otro lado, se pesaron discos de 2 cm de diámetro y cada uno se colocó en un recipiente conteniendo 50 ml de agua destilada a 25°C durante 24 horas. Transcurrido dicho tiempo, las películas se retiraron de los recipientes y se secaron de la manera previamente descrita para poder calcular la materia seca final luego del tratamiento en agua.

La solubilidad se reporta como la diferencia entre la materia seca inicial y final con respecto a la materia seca inicial, expresada en porcentaje.

$$Solubilidad = \frac{(masa\ seca\ inicial - masa\ seca\ final)}{masa\ seca\ inicial} * 100$$

3.2.8.5 Color

Para realizar las determinaciones de color se colocaron discos de películas de diámetro adecuado sobre fondo blanco estándar (Trezza y Krochta 2000). Las mediciones se realizaron con un colorímetro modelo CM-508d (Minolta, Tokio, Japón) usando una abertura de 1,5 cm de diámetro. El área expuesta fue lo suficientemente grande con respecto a la zona iluminada para evitar cualquier efecto de entrada de luz. Los parámetros CIE Lab: L^* , a^* y b^* , y el índice de amarillo (YI) se evaluaron de acuerdo con un método estandarizado (ASTM D 1925, 1995) en, por lo menos, cinco posiciones seleccionadas al azar en cada muestra. Los cálculos fueron realizados para un iluminante D-65 y un observador de 2°.

Se evaluó la diferencia de color total (ΔE) (Cruz Rui y col., 2007) para las muestras tratadas con respecto a sus respectivos controles, utilizando la siguiente ecuación:

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

Donde:

$$\Delta L^* = L^* - L_0^*$$

$$\Delta a^* = a^* - a_0^*$$

$$\Delta b^* = b^* - b_0^*$$

Donde L_0^* , a_0^* y b_0^* corresponden a los valores del control y L^* , a^* y b^* a los valores de las películas conteniendo antimicrobianos.

3.2.8.6 Ángulo de contacto y humectabilidad

El ángulo de contacto de las películas se estimó por el método de la gota sésil, basado en el método óptico de ángulo de contacto, siguiendo el procedimiento de Choi y Han (2002). Se llevaron a cabo las mediciones del ángulo de contacto usando un tensiómetro interfacial (PAT-1, SINTERFACE Technologies, Alemania) equipado con una cámara digital. Una gota de agua destilada (3 μ l) se depositó con una

jeringa de pistón automática sobre la superficie de la película montada en una plataforma diseñada a tal fin. La cámara se colocó horizontalmente con el fin de capturar la imagen de la gota. Se utilizó un software de análisis de imágenes (Perfil Análisis tensiómetro PAT-1, Alemania) para medir el ángulo formado entre la superficie de la película en contacto con la gota y la tangente a la gota de líquido en el punto de contacto con la superficie de la película. Se evaluaron ambas superficies de la película y se realizaron veinte mediciones en cada superficie.

Según Zisman (1964), en los sistemas que tienen una tensión superficial inferior a 100 mN/m (superficies de baja energía), el ángulo de contacto formado por una gota de líquido sobre la superficie sólida es una función lineal de la tensión superficial del líquido, Y_{LV} (donde la fase V es el aire saturado con el vapor del líquido, L).

Si θ es el ángulo de contacto entre el líquido y un sólido (con Y_{LV} conocido), la interacción puede ser descrita en términos del trabajo reversible de adhesión, W_a como:

$$W_a = Y_{LV}(1 + \cos \theta)$$

También es posible definir el coeficiente de cohesión (W_c), o el trabajo de cohesión, a través de:

$$W_c = 2Y_{LV}$$

Dicho trabajo está relacionado con el trabajo reversible requerido para separar un líquido en dos partes. Mientras que las fuerzas de adhesión hacen que el líquido se extienda sobre la superficie, las fuerzas de cohesión hacen que el líquido se contraiga. El balance entre W_c y W_a da el coeficiente de extensión, W_s , de acuerdo a:

$$W_s = W_a - W_c$$

El coeficiente de extensión o humectabilidad o mojabilidad representa la habilidad de un dado líquido para extenderse en una superficie sólida. El valor máximo que se puede obtener para este coeficiente es cero (Ribeiro y col., 2007).

3.2.9 Caracterización microscópica

3.2.9.1 Microscopía óptica

Con el objetivo de evaluar los cambios morfológicos que sufrieron las películas por su contacto con un sistema modelo con alta a_w , se diseñó el siguiente ensayo. Las distintas películas se pusieron en contacto con una superficie de agar TSYE (a_w 0,99) para simular el contacto con un alimento con alta a_w . A distintos tiempos de contacto se retiraron muestras y se realizaron cortes transversales a cada película; luego, los cortes se colocaron entre porta y cubreobjeto con una gota de agua destilada y se observaron con diferentes aumentos en un microscopio óptico (Olympus ® BX43, Japón). Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital (Q-color 3C) y luego se analizaron con un programa analizador de imágenes (Qcapture Pro ® 6.0, QImaging, Canadá).

3.2.9.2 Microscopía de barrido electrónico ambiental

El análisis microestructural de las secciones transversales de las películas se llevó a cabo mediante el uso de un microscopio de barrido electrónico ambiental (ESEM). Este microscopio permite el estudio de muestras biológicas húmedas y sin preparación previa (James, 2009). Las películas se congelaron con nitrógeno líquido y se fracturaron en piezas de $5 \times 10 \text{ mm}^2$ aproximadamente. Luego, se fijaron en el soporte del microscopio con un ángulo de 90° a la superficie lo que permitió la observación de la sección transversal de las mismas. Se observaron las películas usando un voltaje de aceleración de 10 kV.

3.2.9.3 Microscopía de fuerza atómica

La topografía de la superficie de las películas se estudió con un microscopio de fuerza atómica-AFM (Nano Scopellla, Quadrex, Instrument Digital. Veeco, Melville, Nueva York, EE.UU.) provisto con un cantiléver de silicona con una constante

elástica de 0,06 N/m operando a una frecuencia de resonancia de 300 kHz. El tamaño de escaneado se estableció para obtener imágenes de 5,0 μm x 5,0 μm . Dos a tres áreas de cada película fueron escaneadas utilizando el modo de contacto intermitente en atmósfera de nitrógeno. Se obtuvieron imágenes en 3D con el software WS x M 4.0 Beta 4.3 (2011, Nanotec Electronica S.L., Madrid, España), que también se utilizó para el análisis de imágenes (Horcas y col., 2007).

El parámetro cuantitativo rugosidad (Rq) se calculó con los datos de las micrografías topográficas por medio del software mencionado anteriormente y utilizando la siguiente expresión:

$$Rq = \sqrt{\frac{\sum_{ij}(z_{ij}-\bar{z})^2}{N}} \quad \text{con} \quad \bar{z} = \frac{\sum_{ij} z_{ij}}{N}$$

Siendo Z_{ij} el valor de la altura de cada punto individual (μm), \bar{z} la altura media (μm) y N el número de puntos experimentales.

3.2.10 Actividad antimicrobiana de las películas comestibles portadoras de natamicina y/o nisina

3.2.10.1 Estudio de la actividad de barrera de la película comestible conteniendo natamicina y/o nisina sobre un sistema modelo sólido

El protocolo de este ensayo se adaptó a partir del diseño experimental propuesto por Sanjurjo y col. (2006) y se aplicó con el objetivo de poner a prueba la eficacia de las películas de almidón de mandioca para actuar como barrera frente a una contaminación externa postproceso: para inhibir los microorganismos sobre la superficie de la película y capacidad para impedir el paso a través de la misma.

Se utilizaron discos de 1 cm de diámetro provenientes de las películas de los distintos sistemas. Se apoyaron dos discos de cada película en placas de Petri conteniendo 15 ml de agar solidificado como sistema modelo de un alimento de alta humedad (a_w : 0,99). Se colocó sobre cada disco una gota de 10 μl de cultivo

conteniendo 1×10^4 CFU/ml del microorganismo a estudiar. Las placas con los discos inoculados fueron incubadas a 25°C durante 168 horas.

Se realizaron dos ensayos diferentes siguiendo este protocolo:

- Respuesta de cultivo simple de *S. cerevisiae* o *Z. rouxii* o *Y. lipolytica*, se utilizó agar YGC para soportar los discos inoculados y se evaluaron las siguientes películas:
 - Película de almidón de mandioca con natamicina (NA₁)
 - Película de almidón de mandioca con natamicina (NA₂)
 - Película de almidón de mandioca con natamicina (NA₃)
 - Película sin antimicrobiano (CNA)

- Respuesta de cultivo mixto de *S. cerevisiae* y *L. innocua*, se utilizaron los agares YGC, TSYE y TSYE_C para soportar los discos inoculados y se evaluaron las siguientes películas:
 - Película de almidón de mandioca con natamicina (NA₃)
 - Película de almidón de mandioca con natamicina y nisina (NANI)
 - Película de almidón de mandioca con nisina (NI)
 - Película sin antimicrobiano (CNA)

Se tomaron muestras periódicamente, para poner a prueba la viabilidad de los microorganismos. A cada tiempo evaluado se levantaron los discos en esterilidad y se colocaron en tubos de vidrio con 1 ml de agua peptonada estéril y se agitaron con vortex durante 2 minutos. Se tomaron 600 µl de los tubos anteriores y se pasaron a eppendorf estériles. Se hicieron las diluciones correspondientes y se realizó el recuento de células viables.

Con el fin de investigar si la película impidió la contaminación del agar durante el ensayo, después de la remoción de la película, cada sistema se incubó a la temperatura óptima para el crecimiento de los microorganismos contaminantes, con el objetivo de observar la potencial aparición de colonias. Las determinaciones se realizaron por duplicado en dos corridas experimentales independientes.

3.2.10.2 Estudio de la actividad de barrera de la película comestible conteniendo natamicina y/o nisina sobre un sistema modelo sólido, frente a contaminaciones producidas a distintos tiempos

El objetivo de este ensayo fue simular contaminaciones externas postproceso del alimento a distintos tiempos de almacenamiento, y evaluar si la película mantiene su actividad antimicrobiana durante su contacto con el alimento a lo largo del almacenamiento.

Se utilizaron discos de 1 cm de diámetro provenientes de las distintas películas. Se apoyaron dos discos de cada película en placas de Petri conteniendo 15 ml de agar solidificado como sistema modelo de un alimento de alta humedad (a_w : 0,99). Después de diferentes tiempos de contacto (0, 6 y 10 días), se colocó sobre cada disco una gota de 10 μ l de cultivo conteniendo 1×10^4 CFU/ml del microorganismo a estudiar, con el fin de simular una contaminación durante el almacenamiento. Las placas con los discos inoculados fueron incubadas a 25°C durante 168 horas.

Se realizaron dos ensayos diferentes siguiendo este protocolo:

- Respuesta de cultivo simple de *S. cerevisiae*, se utilizó agar YGC para soportar los discos inoculados y se evaluaron las siguientes películas:
 - Película de almidón de mandioca con natamicina (NA₁)
 - Película de almidón de mandioca con natamicina (NA₂)
 - Película de almidón de mandioca con natamicina (NA₃)
 - Película sin antimicrobiano (CNA)

- Respuesta de un cultivo mixto de *S. cerevisiae* y *L. innocua*, se utilizó agar TSYE para soportar los discos inoculados y se evaluaron las siguientes películas:
 - Película de almidón de mandioca con natamicina (NA₃)
 - Película de almidón de mandioca con natamicina y nisina (NANI)
 - Película de almidón de mandioca con nisina (NI)
 - Película sin antimicrobiano (CNA)

Se tomaron muestras periódicamente, para evaluar la viabilidad de los microorganismos. A cada tiempo evaluado se levantaron los discos y se trataron de igual manera que en el apartado 3.2.10.1.

3.2.10.3 Estudio de la liberación de natamicina y/o nisina desde la película hacia un sistema modelo sólido

La prueba de difusión en agar se utilizó para determinar el efecto antimicrobiano de las películas sobre los microorganismos estudiados a través de la liberación del antimicrobiano desde la película hacia el sistema modelo. Para la realización del ensayo se plaquearon 15 ml de cada uno de los medios de cultivo óptimos para el crecimiento de los microorganismos testeados y se lo dejó solidificar. Se colocaron 100 μ l del inóculo conteniendo 1×10^4 CFU/ml del microorganismo en estudio y se extendieron sobre la superficie del medio de cultivo solidificado y se dejaron secar en estufa a 4°C.

Posteriormente, se cortaron discos de cada una de las películas estudiadas (7 mm de diámetro) y se colocaron sobre las placas previamente inoculadas. Las placas se pre-incubaron a 4°C durante 48 horas y luego se incubaron a 28°C las placas que contenían levaduras y a 37°C las placas que contenían bacterias (Hanušová y col., 2010). La actividad inhibidora se cuantificó midiendo el diámetro total del halo (diámetro película más zona de no crecimiento).

Se realizaron dos ensayos diferentes siguiendo este protocolo:

- Respuesta de un cultivo simple *S. cerevisiae* o *Z. rouxii* o *Y. lipolytica*, utilizando placas conteniendo agar YGC para soportar los discos. Se evaluaron las siguientes películas:
 - Película de almidón de mandioca con natamicina (NA₃)
 - Película sin antimicrobiano (CNA)

- Respuesta de cultivo mixto de *S. cerevisiae* y *L. innocua*, utilizando placas conteniendo agar YGC, agar TSYE y agar TSYE_c para soportar los discos y se evaluaron las siguientes películas:
 - Película de almidón de mandioca con natamicina (NA₃)
 - Película de almidón de mandioca con natamicina y nisina (NANI)
 - Película de almidón de mandioca con nisina (NI)
 - Película sin antimicrobiano (CNA)

Las determinaciones se realizaron por duplicado en dos corridas experimentales independientes.

3.2.10.4 Estudio de la actividad de barrera de la película comestible conteniendo natamicina y su combinación con nisina sobre queso Por Salut

Con el fin de evaluar la eficacia como barrera antimicrobiana de las películas formuladas aplicadas sobre una matriz alimentaria, se utilizaron placas de Petri conteniendo paralelepípedos de queso Por Salut (2,5 x 2,5 x 0,5 cm) con un peso de $5 \pm 0,3$ gramos. Se cortaron trozos de películas de 5 cm de lado y se pusieron en contacto con la superficie de la cara superior del queso. Inmediatamente, se dispensaron sobre las películas 20 μ l de cultivo conteniendo $1 \times 10^{3-4}$ CFU/ml del microorganismo a estudiar. Las muestras fueron incubadas a 25°C durante 168 horas.

Se realizaron dos ensayos diferentes siguiendo este protocolo:

- Respuesta de cultivo simple de *S. cerevisiae*, se evaluaron los siguientes tratamientos:
 - Película de almidón de mandioca con natamicina (NA₃)
 - Película sin antimicrobiano (CNA)
 - Película comercial (COMERCIAL)
 - Queso sin película y sin inocular (SP sin inóculo)
 - Queso sin película (SP con inóculo)

- Respuesta de cultivo mixto de *S. cerevisiae* y *L. innocua*, se evaluaron los siguientes tratamientos:
- Película sin antimicrobiano (CNANI)
 - Película conteniendo natamicina y nisina (NANI)
 - Película comercial (COMERCIAL)
 - Aplicación directa de solución conteniendo 50 ppm de natamicina y 12,5 ppm de nisina (ADNANI)
 - Queso sin película y sin inocular (SP sin inóculo)
 - Queso sin película (SP con inóculo)

Se tomaron muestras periódicamente, para poner a prueba la viabilidad de los microorganismos. A cada tiempo evaluado se levantaron las películas en esterilidad y se colocaron en tubos falcon con 30 ml de agua peptonada estéril y se agitaron con vortex durante 2 minutos. Se hicieron las diluciones correspondientes y se realizó el recuento de células viables.

A su vez se evaluó el crecimiento de microorganismos en el queso luego de la remoción de la película a diferentes tiempos de almacenamiento. Se tomó el cubo de queso en esterilidad y se colocó en una bolsa de stomacher con 45 ml de agua peptonada estéril (homogeneización del queso 01:10). Se agitó en stomacher (Bag Mixer ® 400, Inglaterra) durante 1 minuto. Se tomaron 1000 µl de las bolsas anteriores y se pasaron a tubos de vidrio conteniendo 9 ml de agua peptona estéril. Se hicieron las diluciones correspondientes y se realizó el recuento de células viables.

También se evaluaron la película y el cubo de queso en conjunto, dado que se deseaba comparar con el tratamiento de aplicación directa en superficie. Se tomó el cubo de queso y la película en esterilidad y se colocaron en una bolsa de stomacher con 45 ml de agua peptonada estéril (homogeneización del queso 01:10). Se agitó en stomacher durante 1 minuto. Se tomaron 1000 µl de las bolsas anteriores y se pasaron a tubos de vidrio conteniendo 9 ml de agua peptona estéril. Se hicieron las diluciones correspondientes y se realizó el recuento de células viables.

Las determinaciones se realizaron por duplicado en dos corridas experimentales independientes.

3.2.10.5 Estudios de la liberación de natamicina y/o nisina desde la película hacia queso Por Salut

El ensayo de difusión en queso se utilizó para determinar el efecto antimicrobiano de las películas en un sistema alimenticio real. Se utilizaron placas de Petri conteniendo paralelepípedos de queso Por Salut ($2,5 \times 2,5 \times 0,5 \text{ cm}^3$) con un peso de $5 \pm 0,3$ gramos. Se dispensaron sobre la superficie de los cubos de queso, $20 \mu\text{l}$ de cultivo conteniendo $1 \times 10^{3-4}$ CFU/ml del microorganismo a estudiar. Se cortaron cuadrados de películas de $5,0 \text{ cm}$ de lado y se pusieron en contacto con la superficie de la cara superior del queso previamente inoculado. En el caso de aplicación directa de los antimicrobianos, se dispensaron $20 \mu\text{l}$ de solución sobre el paralelepípedo de queso inoculado y se distribuyó uniformemente sobre su superficie con una espátula de drigalsky estéril. Posteriormente las muestras fueron incubadas a 25°C durante 216 horas.

Se realizaron dos ensayos diferentes siguiendo este protocolo:

- Respuesta de cultivo simple de *S. cerevisiae* o *Z. rouxii* o *Y. lipolytica*. Se aplicaron los siguientes tratamientos:
 - Película de almidón de mandioca con natamicina (NA_3)
 - Aplicación directa de solución conteniendo 50 ppm de natamicina (ADNA)
 - Película comercial (COMERCIAL)
 - Queso sin película (SP)

- Respuesta de cultivo mixto de *S. cerevisiae* y *L. innocua*, se aplicaron los siguientes tratamientos:
 - Película de almidón de mandioca con natamicina (NA_3)
 - Película de almidón de mandioca con natamicina y nisina (NANI)
 - Película de almidón de mandioca con nisina (NI)

- Aplicación directa de solución conteniendo 50 ppm de natamicina (ADNA)
- Aplicación directa de solución conteniendo 12,5 ppm de nisina (ADNI)
- Aplicación directa de solución conteniendo 50 ppm de natamicina y 12,5 ppm de nisina (ADNANI)
- Película comercial (COMERCIAL)
- Queso sin película (SP)

Se tomaron muestras periódicamente, para poner a prueba la viabilidad de los microorganismos. A cada tiempo evaluado se tomó el cubo de queso en esterilidad y se colocó en una bolsa de stomacher con 45 ml de agua peptonada estéril (homogeneización del queso 01:10). Se agitó en stomacher durante 2 minutos. Se tomaron 1000 μ l de las bolsas anteriores y se pasaron a tubos de vidrio conteniendo 9 ml de agua peptona estéril. Se hicieron las diluciones correspondientes y se realizó el recuento de células viables.

Las determinaciones se realizaron por duplicado utilizando agar YGC y agar Oxford (según requerimientos de cada microorganismo) en dos corridas experimentales independientes.

3.2.10.6 Estudio de la liberación de natamicina y nisina desde la película hacia distintos quesos a temperatura de refrigeración

El ensayo de difusión en queso se utilizó para determinar el efecto antimicrobiano de las películas en un sistema alimenticio real. Se utilizaron placas de Petri conteniendo paralelepípedos de queso Por Salut, Holanda y Reggianito ($2,5 \times 2,5 \times 0,5 \text{ cm}^3$) con un peso de $5 \pm 0,3$ gramos. Se dispensaron sobre la superficie de los cubos de queso, 20 μ l de cultivo conteniendo $1 \times 10^{3-4}$ CFU/ml del microorganismo a estudiar. Se cortaron cuadrados de películas de 5 cm de lado y se pusieron en contacto con la superficie de la cara superior del queso previamente inoculado. En el caso de aplicación directa de los antimicrobianos, se dispensaron 20 μ l de solución sobre el paralelepípedo de queso inoculado y se distribuyó

uniformemente sobre su superficie con una espátula de drigalsky estéril. Las muestras fueron incubadas a 7°C durante 10 días.

Se evaluó el comportamiento de un cultivo mixto de *S. cerevisiae* y *L. innocua*, y se aplicaron los siguientes tratamientos:

- Película sin antimicrobiano (CNANI)
- Película conteniendo natamicina y nisina (NANI)
- Aplicación directa de 50 ppm de natamicina y 12,5 ppm de nisina (ADNANI)
- Película comercial (COMERCIAL)

Se tomaron muestras periódicamente, para poner a prueba la viabilidad de los microorganismos. A cada tiempo evaluado se levantaron las películas y se descartaron. Se tomó el cubo de queso en esterilidad y se colocó en una bolsa de stomacher con 45 ml de agua peptonada estéril (homogeneización del queso 01:10). Se agitó en stomacher durante 1 minuto. Se tomaron 1000 µl de las bolsas anteriores y se pasaron a tubos de vidrio conteniendo 9 ml de agua peptona estéril. Se hicieron las diluciones correspondientes y se realizó el recuento de células viables.

Las determinaciones se realizaron por duplicado utilizando agar YGC y agar Oxford (según requerimientos de cada microorganismo) en dos corridas experimentales independientes.

3.2.10.7 Actividad acuosa de los quesos

Se evaluó la actividad acuosa (a_w) de los quesos estudiados utilizando un medidor de actividad acuosa (Aqualab Serie 3, Decagon Devices, Inc., EE.UU.). Se colocó una muestra de queso (1,5 gramos aproximadamente) en un recipiente apropiado perfectamente cerrado. Se almacenó a 20°C durante no más de 2 horas. A continuación, se midió la a_w con una precisión de 0,010.

3.2.11 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados a través del análisis de varianza (ANOVA) con $\alpha = 0,05$ y se aplicó el test de Tukey. Los resultados se presentan como la media y la desviación estándar (Sokal y Rohlf, 2000).

La correlación entre el ángulo de contacto, la rugosidad y la presión de vapor de agua se analizó a través de la correlación de Pearson, ampliamente utilizada como una medida del grado de dependencia lineal entre dos variables (Rodgers y Nicewander, 1988).

Se utilizó el software GraphPad Prism®, versión 5.01 (GraphPad Software, Inc., California) para el tratamiento y análisis de los datos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Películas comestibles conteniendo natamicina

Aunque existe una amplia variedad de literatura referente a las propiedades antimicrobianas de la natamicina, los datos acerca de su actividad frente a diferentes levaduras cuando se incorpora sola o soportada en películas comestibles son escasos, particularmente en el caso de películas comestibles a base de almidón de mandioca.

Por lo tanto, los objetivos de este capítulo fueron:

- Desarrollar películas comestibles conteniendo natamicina.
- Evaluar las características estructurales, mecánicas y físico-químicas de las películas diseñadas.
- Evaluar la actividad de dichas películas frente a las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii* y *Yarrowia lipolytica* en un sistema sólido modelo y en una matriz alimentaria sólida real. Comparar su eficiencia con la aplicación directa del antimicrobiano en el alimento.

4.1.1 Evaluación preliminar de actividad antimicrobiana de natamicina

Con el objetivo de evaluar el comportamiento de las levaduras *S. cerevisiae*, *Z. rouxii* o *Y. lipolytica* frente al antimicrobiano natamicina, se realizaron ensayos preliminares en un sistema modelo constituido por concentrado proteico de suero líquido (CPSL 16% p/p). La actividad antimicótica de natamicina frente a estas levaduras se muestra en la **Figura 4.1.1**.

En ausencia de natamicina, se observó un aumento de los recuentos en todas las levaduras evaluadas. Si bien la natamicina no mostró un efecto instantáneo, su actividad se pudo observar a lo largo del almacenamiento. El-Diasty y col. (2008) también reportaron que la natamicina ejerce su actividad antifúngica frente a distintas especies de hongos y levaduras en yogurt a lo largo del almacenamiento.

La inactivación se incrementó al aumentar la concentración de natamicina en todas las levaduras evaluadas. Particularmente para *S. cerevisiae* (**Figura 4.1.1a**), una dosis de 20 ppm de natamicina en presencia de una población inicial de 4 ciclos log, permitió una reducción de 2,25 ciclos log después de 96 horas de contacto, y a partir de ahí tuvo un efecto fungistático en el tiempo adicional evaluado. El tratamiento con 50 ppm de natamicina con la misma población inicial, produjo una mayor reducción de las células, y después de 96 horas mostró menos de 10 CFU/ml. Gallo y Jagus (2006) estudiaron la inactivación de *S. cerevisiae* en suero de queso líquido tratado con diferentes concentraciones de natamicina (12,5 ppm a 100 ppm) y con distintos tamaños de población inicial. Los autores demostraron que la inactivación de *S. cerevisiae* aumentó con el tiempo de almacenamiento y con la concentración de natamicina.

Z. rouxii fue menos sensible a la natamicina (**Figura 4.1.1b**). Partiendo de una población inicial de 4 ciclos log, la presencia de 20 ppm y 50 ppm de este antimicrobiano redujo los recuentos iniciales 0,5 y 1,3 ciclos log respectivamente y tuvieron efecto fungistático hasta el final del almacenamiento. No hay registro de que otros autores estudiaran la actividad de la natamicina contra *Z. rouxii*. Sin embargo se han estudiado otros antimicrobianos naturales sobre esta levadura. Cerrutti y Alzamora, (1996) demostraron que es posible inhibir el crecimiento de *S. cerevisiae*, *Z. rouxii*, y otras levaduras en puré de manzana (pH 3,5) conteniendo 2000 ppm de vainillina almacenándolo durante 40 días a 27°C. Por el contrario, la adición de estos antimicrobianos en puré de plátano (pH 4) no era eficaz para inhibir el crecimiento de *Z. rouxii* y *S. cerevisiae*. Estos investigadores atribuyeron la falta de actividad antimicrobiana a los altos niveles de lípidos y proteínas que se encuentran en el puré de plátanos, ya que las interacciones podrían reducir la cantidad del antimicrobiano disponible para actuar como agente inhibidor de las levaduras estudiadas.

Y. lipolytica presentó una respuesta diferente al tratamiento con natamicina. Una concentración de 20 ppm de natamicina ejerció un efecto fungicida, pero la levadura retomó el crecimiento después de 100 horas de almacenamiento (**Figura 4.1.1c**). Una concentración más alta del antimicótico (50 ppm) mantuvo la población de *Y. lipolytica* en menos de 10 CFU/ml hasta el final del almacenamiento.

En coincidencia con estos resultados, Ramos y col. (2012) observaron que la concentración mínima inhibitoria (CMI) de natamicina contra *Y. lipolytica* es de 50 ppm.

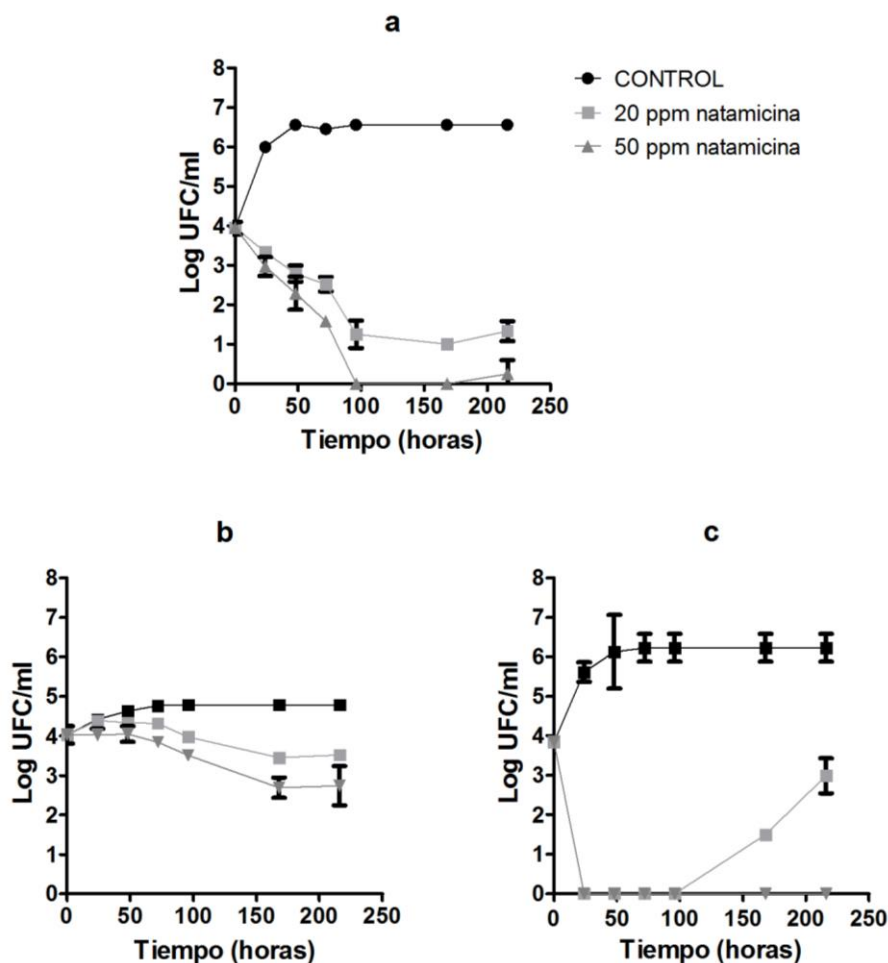


Figura 4.1.1: Actividad antifúngica de 0 ppm, 20 ppm y 50 ppm de natamicina en un alimento líquido modelo (CPSL 16%) almacenado a 25°C frente a: *Saccharomyces cerevisiae*, b: *Zygosaccharomyces rouxii* y c: *Yarrowia lipolytica*.

Estos resultados indican que las levaduras estudiadas fueron sensibles a la natamicina en el sistema alimentario líquido estudiado, exhibiendo diferentes grados de eficacia (fungicida o fungistático) en función de su concentración y del tipo de levadura.

4.1.2 Estudio del efecto de la natamicina sobre células de *S. cerevisiae* tratadas

Con el objetivo de investigar el tipo de daño producido en las células de *S. cerevisiae* por la actividad de natamicina, se desarrollaron estudios de microscopía electrónica de transmisión.

A través de la prueba de tinción negativa, fue posible observar que las células de levadura no tratadas presentaban una capa externa intacta (punta de flecha de **Figura 4.1.2a**). Por el contrario, las células tratadas mostraron una capa externa proteica dañada. Se sabe que la natamicina interactúa con proteínas (patente EP0865738A1) y es probable que interactúe con las manoproteínas de la capa externa generando los cambios que se observan en la **Figura 4.1.2b**.

Después de la fijación con glutaraldehído, las micrografías de las levaduras sin tratar mostraron células con una ultraestructura normal, con núcleo, membrana citoplasmática continua, compacta y pared celular definida (**Figura 4.1.2c**).

Es notable que las levaduras tratadas con natamicina revelaron cambios dramáticos en las estructuras sub-celulares (**Figura 4.1.2d**), tales como un aumento en el grosor de la pared celular, un citoplasma denso, acumulación de sustratos en las vacuolas e hinchamiento mitocondrial.

Estos hallazgos son similares a los reportados por Belanger y col. (1997), Koul y col. (1999) y Ishida y col. (2009). Estos autores mostraron que el tratamiento con diferentes azoles sobre células de *Candida* spp. Produjo anomalías similares a las informadas en el presente trabajo.

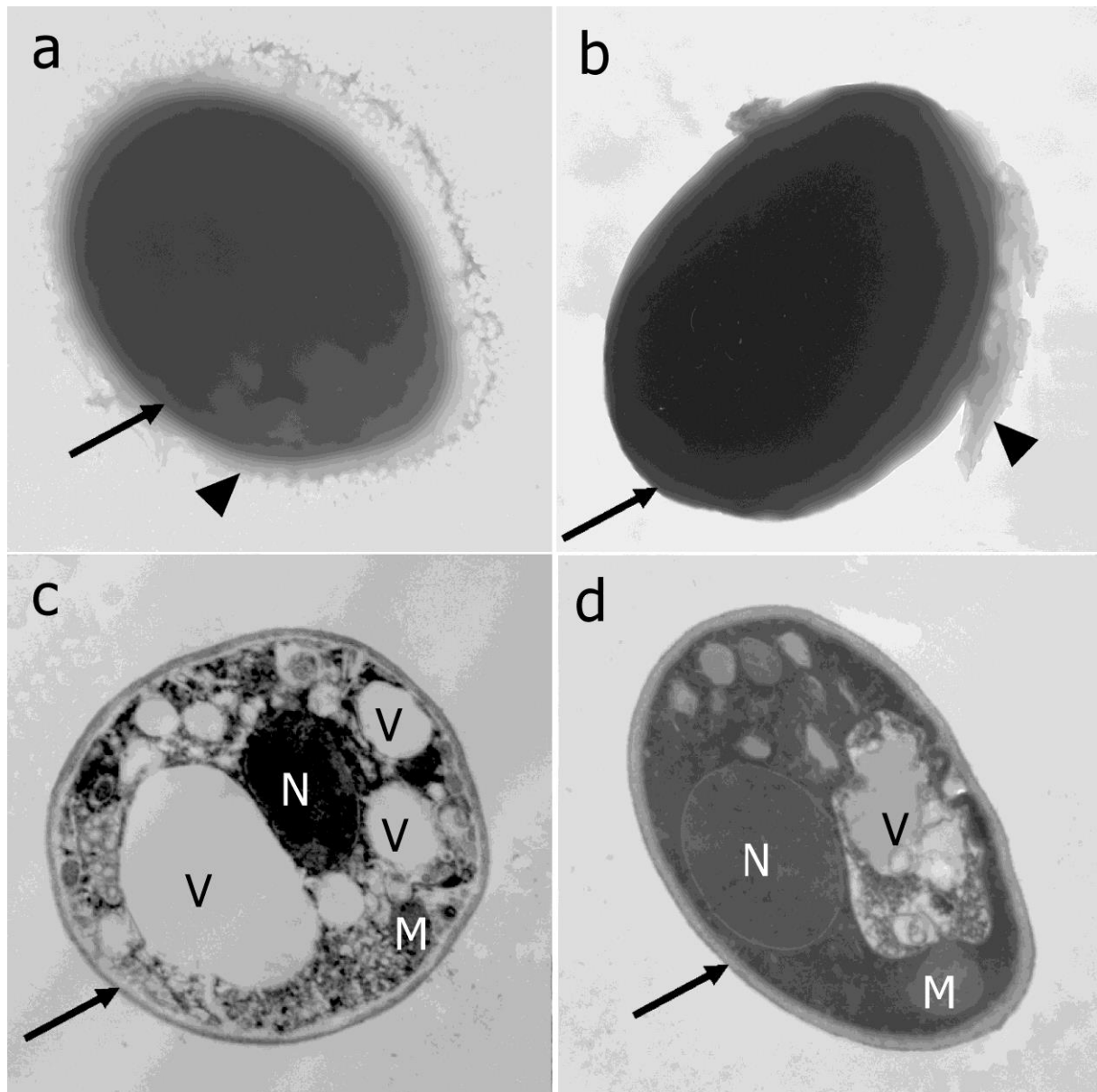


Figura 4.1.2: Micrografías de microscopía electrónica de transmisión de *Saccharomyces cerevisiae*: sin tratar (paneles a y c) y tratada con 50 ppm de natamicina (paneles b y d). Ensayo de tinción negativa (paneles a y b) y ensayo de fijación con glutaraldehído (paneles c y d). Núcleo (N), vacuola (V), mitocondria (M), capa proteica externa (indicada por punta de flecha) y pared celular (indicada por flecha completa). Dimensión: 5 x 5 μm .

4.1.3 Caracterización físico-química de las películas comestibles

4.1.3.1 Propiedades mecánicas de las películas: ensayo de tracción

Los geles de almidón pueden ser considerados como un material compuesto donde los gránulos hinchados (partículas) están insertos en el polímero y refuerzan una matriz continua de moléculas de amilosa entrelazadas. Las propiedades mecánicas de los sistemas de almidón (películas comestibles) se ven influenciadas por las características reológicas de la matriz de gel de amilosa, la fracción de volumen y la rigidez de los gránulos gelatinizados, así como por las interacciones entre los gránulos de almidón.

Es deseable que las películas comestibles posean suficiente resistencia mecánica y extensibilidad, a fin de mantener la integridad a pesar de las tensiones externas que puedan ocurrir durante el procesamiento y el almacenamiento de los alimentos (Yang y Paulson, 2000). El esfuerzo a la rotura es una medida de la resistencia de la película, mientras que la deformación a la rotura es una medida de la capacidad de estiramiento de las mismas antes de romperse. Ambas propiedades son muy importantes y deben ser caracterizadas en un material de envasado (Krochta y De Mulder-Johnston, 1997).

Las películas comestibles a base de almidón de mandioca, desarrolladas en el presente trabajo, son sistemas de almidón que fueron plastificados con glicerol y que sufrieron retrogradación. A modo de ejemplo se muestra en la **Figura 4.1.3** las curvas de esfuerzo versus deformación de la película sin antimicrobianos (CNA) y de la película conteniendo la mayor cantidad de natamicina estudiada (película NA₃). Se puede observar que la naturaleza de deformación de los polímeros a temperatura ambiente, bajo un esfuerzo aplicado, fue típico de plásticos dúctiles en términos de esfuerzo y deformación. Como ocurre generalmente con esos materiales, las películas exhibieron dos regiones características en cuanto a su comportamiento de deformación a la tracción. En deformaciones bajas (inferiores a 10 %) el esfuerzo aumentó rápidamente con un aumento en la deformación y las pendientes iniciales fueron elevadas en esta región elástica, lo que indica el alto módulo elástico de los materiales. A deformaciones mayores (mayores a 10 %) las películas mostraron un menor incremento en el esfuerzo con el aumento de la deformación. Es importante

remarcar que la pendiente inicial de las curvas esfuerzo-deformación, que se define como módulo de Young (E) depende de la temperatura y la velocidad de deformación (Mano y Viana, 2001).

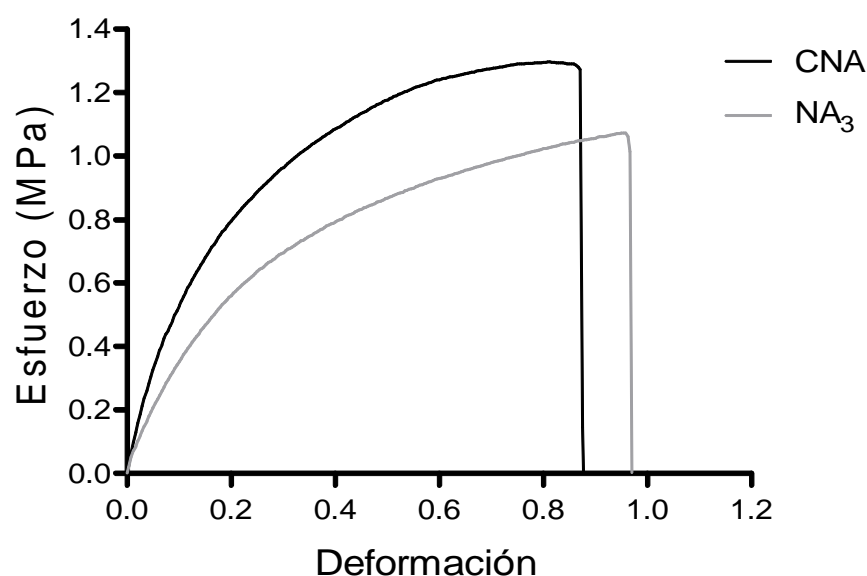


Figura 4.1.3: Curva de esfuerzo versus deformación de las películas comestibles control (CNA) y conteniendo natamicina (NA₃).

La **Tabla 4.1.1** muestra los parámetros texturales de todas las películas elaboradas con y sin natamicina (NA₁, NA₂, NA₃ y CNA). Se puede observar que la película control (CNA) presenta una deformación a la ruptura inferior a la de las películas con natamicina aunque no siempre esta diferencia fue significativa.

Con respecto al esfuerzo a la ruptura, aunque se observó una tendencia a valores más bajos cuando el antimicótico estaba presente, sólo se detectaron diferencias significativas cuando la película contenía la mayor concentración de natamicina (NA₃). La firmeza, en general, descendió en presencia del antimicrobiano y el módulo de Young tendió a descender en presencia del mismo pero las diferencias fueron significativas sólo para NA₂.

Tabla 4.1.1: Parámetros texturales obtenidos de un ensayo de tracción de las películas comestibles control (CNA) y conteniendo natamicina (NA₁, NA₂ y NA₃).

Película	Esfuerzo a ruptura (MPa)	Deformación a ruptura	Firmeza (MPa)	Módulo de Young (MPa)
CNA	1,349 ± 0,149 ^a	0,838 ± 0,088 ^a	1,619 ± 0,181 ^a	6,206 ± 0,841 ^a
NA₁	1,240 ± 0,169 ^a	1,018 ± 0,339 ^{a,b}	1,289 ± 0,349 ^{a,b}	5,318 ± 0,602 ^a
NA₂	1,271 ± 0,164 ^a	1,147 ± 0,105 ^b	1,119 ± 0,199 ^b	4,936 ± 1,022 ^b
NA₃	1,202 ± 0,022 ^b	1,067 ± 0,266 ^a	1,127 ± 0,040 ^b	5,044 ± 0,825 ^a

Se informan la media y la desviación estándar. Distintas letras en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras.

4.1.3.2 Permeabilidad al vapor de agua

Una de las propiedades más ampliamente estudiada en películas comestibles es la permeabilidad al vapor de agua (PVA), debido principalmente a la importancia del agua en las reacciones de deterioro (Cerqueira y col., 2009). La **Tabla 4.1.2** muestra la PVA de las películas desarrolladas. Solo se observaron diferencias significativas en la película conteniendo la mayor concentración de natamicina (NA₃) respecto a la película control (CNA), mostrando una disminución del valor de PVA.

En general, la incorporación de antimicrobianos a películas comestibles aumenta la permeabilidad al vapor de agua, probablemente debido a la distensión de la red polimérica. Esta tendencia se observó para la adición de sorbato de potasio a películas en base a almidón de mandioca y quitosano (Vásconez y col., 2009) y de la nisina a películas en base a quitosano (Pranoto y col., 2005). En cuanto a los valores observados para la PVA de diferentes películas comestibles, distintos autores (Flores y col., 2007a; Flores y col., 2010) reportaron valores de (0,6 - 2,0) · 10⁻⁹ g/seg m Pa para diferentes técnicas de elaboración de películas, en la presencia o ausencia de sorbato de potasio. En particular, los resultados obtenidos en esta investigación fueron 4,10⁻⁹ g/seg m Pa que son más altos que los anteriormente mencionados y se modificaron con la adición de la natamicina.

Tabla 4.1.2: Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas comestibles control (CNA) y conteniendo natamicina (NA₁, NA₂ y NA₃).

Película	PVA .10 ⁻⁹ (g/ seg m Pa)
CNA	3,92 ± 0,01 ^a
NA ₁	3,71 ± 0,02 ^a
NA ₂	3,91 ± 0,02 ^a
NA ₃	3,69 ± 0,02 ^b

Se informan la media y la desviación estándar.

Las distintas letras indican diferencias significativas (p <0,05).

4.1.3.3 Solubilidad en agua

La solubilidad de las películas comestibles indica su integridad en un entorno acuoso, donde una mayor solubilidad indicaría una menor resistencia al agua. Una alta solubilidad puede ser una ventaja para algunas aplicaciones como la envoltura de un caramelo con una película comestible ya que la misma debe disolverse rápidamente en la boca mientras se funde el caramelo suavemente (Sothornvit y Krocht, 2000). En la **Tabla 4.1.3** se muestran los resultados obtenidos para la solubilidad en agua de las películas estudiadas y se puede observar que no se presentan diferencias significativas entre las formulaciones. Sin embargo otros autores informaron un aumento de la solubilidad con el agregado de natamicina en películas comestibles de alginato y pectina (Bierhalz y col., 2012).

La solubilidad de las películas depende en gran medida de la cantidad de entrecruzamientos entre los materiales que conforman la película. Cuanto mayor cantidad de entrecruzamientos, menor es la solubilidad de las películas (Mei y col., 2013). Según esta afirmación y observando los resultados de solubilidad presentados en la **Tabla 4.1.3** se puede concluir que la natamicina no afectaría la red de entrecruzamientos presentes en la película comestible a base de almidón de mandioca.

Tabla 4.1.3: Solubilidad de las películas comestibles control (CNA) y conteniendo natamicina (NA₁, NA₂ y NA₃).

Película	Solubilidad (%)
CNA	21,81 ± 7,42 ^a
NA₁	17,98 ± 6,20 ^a
NA₂	24,40 ± 4,24 ^a
NA₃	18,72 ± 6,65 ^a

Se informan la media y la desviación estándar.

Distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras.

4.1.3.4 Color

El color y la transparencia (u opacidad) son características importantes de las películas comestibles, sobre todo cuando las mismas están destinadas al envasado de alimentos, ya que los consumidores se sienten atraídos por estos atributos, tanto en el momento de la compra como en el momento del consumo (Kunte y col., 1997).

La **Tabla 4.1.4** muestra los parámetros de color obtenidos de las películas conteniendo distintas concentraciones de natamicina y de la película control.

Tabla 4.1.4: Parámetros del sistema de color CIE Lab de las películas comestibles control (CNA) y conteniendo natamicina (NA₁, NA₂ y NA₃).

Película	L*	a*	b*	YI	ΔE
CNA	88,32 ± 0,45 ^a	-1,2 ± 0,03 ^a	3,76 ± 0,16 ^a	6,77 ± 0,31 ^a	0 ^a
NA₁	88,29 ± 0,35 ^a	-1,29 ± 0,02 ^b	4,11 ± 0,18 ^a	7,41 ± 0,35 ^a	0,37 ± 0,17 ^b
NA₂	88,62 ± 0,40 ^{ab}	-1,41 ± 0,03 ^c	4,39 ± 0,16 ^b	7,84 ± 0,31 ^b	0,73 ± 0,23 ^c
NA₃	88,70 ± 0,53 ^b	-1,58 ± 0,03 ^b	5,06 ± 0,17 ^b	9,02 ± 0,36 ^b	1,41 ± 0,19 ^d

Se informan la media y la desviación estándar. Las distintas letras en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La adición de natamicina (películas NA₁, NA₂ y NA₃), produjo un aumento de los parámetros b*, YI, ΔE y L* y una disminución del parámetro a* respecto a la película sin antimicrobiano (CNA), siendo mayores y significativas las diferencias para las mayores concentraciones de natamicina. Las películas se tornan más verde/amarillo y luminosas con el aumento en la concentración del antimicótico. Esta característica adquiere relevancia en el momento de elegir estas películas para cubrir un alimento.

4.1.4 Caracterización microscópica de las películas comestibles

Con el objetivo de analizar el comportamiento observado para las películas conteniendo natamicina cuando la contaminación se produce a lo largo del almacenamiento, se caracterizó la morfología de dichas matrices mediante microscopía óptica.

En la **Figura 4.1.6** se presentan microfotografías ópticas mostrando la morfología de la matriz de la película CNA y de la película NA₃, después de diferentes tiempos de contacto con un agar de alta a_w (0,99).

La película control mostró una matriz homogénea (**Figura 4.1.6a**) y sin cambios a lo largo del ensayo (imágenes no mostradas). Sin embargo, la película NA₃ presentó irregularidades (**Figura 4.1.6b**), observándose inclusiones de estructuras cristalinas de natamicina, con bordes rectos y definidos. A lo largo del tiempo de contacto con la superficie de alta a_w, se modificó la estructura de los cristales de natamicina, perdiendo su forma y presentando un tamaño menor (**Figura 4.1.6c**). Probablemente, estos cristales actuaron como reservorios de natamicina y la pérdida de su forma con el tiempo pudo ser debida a su disolución e incorporación en la matriz de la película prolongando la actividad de la natamicina a lo largo del almacenamiento.

En la evaluación de las películas NA₁ y NA₂ también se observaron inclusiones de estructuras cristalinas de natamicina pero en menor proporción que en NA₃ (imágenes no mostradas).

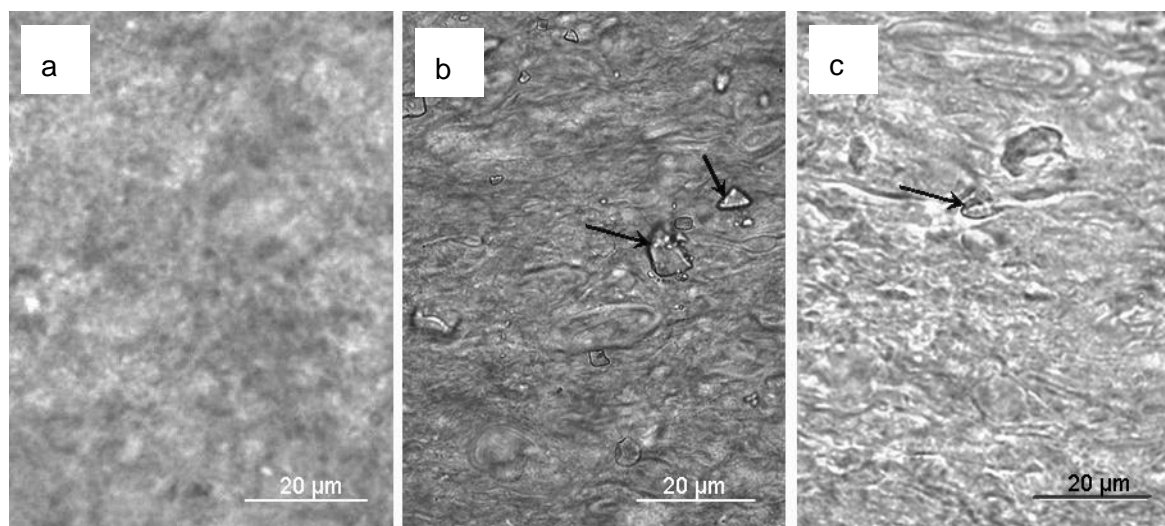


Figura 4.1.6: Micrografía óptica superficial de películas comestibles después de diferentes tiempos de contacto con una superficie de alta a_w . a: película comestible control (CNA) después de 0 días de contacto, b: Película comestible conteniendo natamicina (NA_3) después de 0 días de contacto, c: Película comestible con teniendo natamicina (NA_3) después de 10 días de contacto (aumento: 400x).

4.1.5 Actividad antimicrobiana de las películas comestibles portadoras de natamicina

4.1.5.1 Estudio de la actividad de barrera de la película comestible conteniendo natamicina sobre un sistema modelo sólido

Para evaluar la actividad de barrera de películas comestibles, es necesario conocer si la película permite o no el paso de los microorganismos contaminantes hacia la matriz evaluada. Adicionalmente es importante evaluar qué ocurre en la superficie exterior del conjunto alimento-película durante el almacenamiento. Para ello, se debe evaluar el desarrollo microbiano en la película y en la matriz alimentaria.

Varios autores han estudiado el comportamiento de películas comestibles como barreras a una contaminación microbiana con distintos procedimientos (Ozdemir y Floros, 2001; Franssen, 2002; Sebti y col., 2004; Flores y col., 2007b). En esta investigación el experimento diseñado por Sanjurjo y col. (2006) fue adaptado y

aplicado para poner a prueba la eficacia de las películas de almidón de mandioca conteniendo natamicina, contra una contaminación externa por levaduras. El crecimiento microbiano en las películas comestibles durante el almacenamiento a 25°C se muestra en la **Figura 4.1.4**.

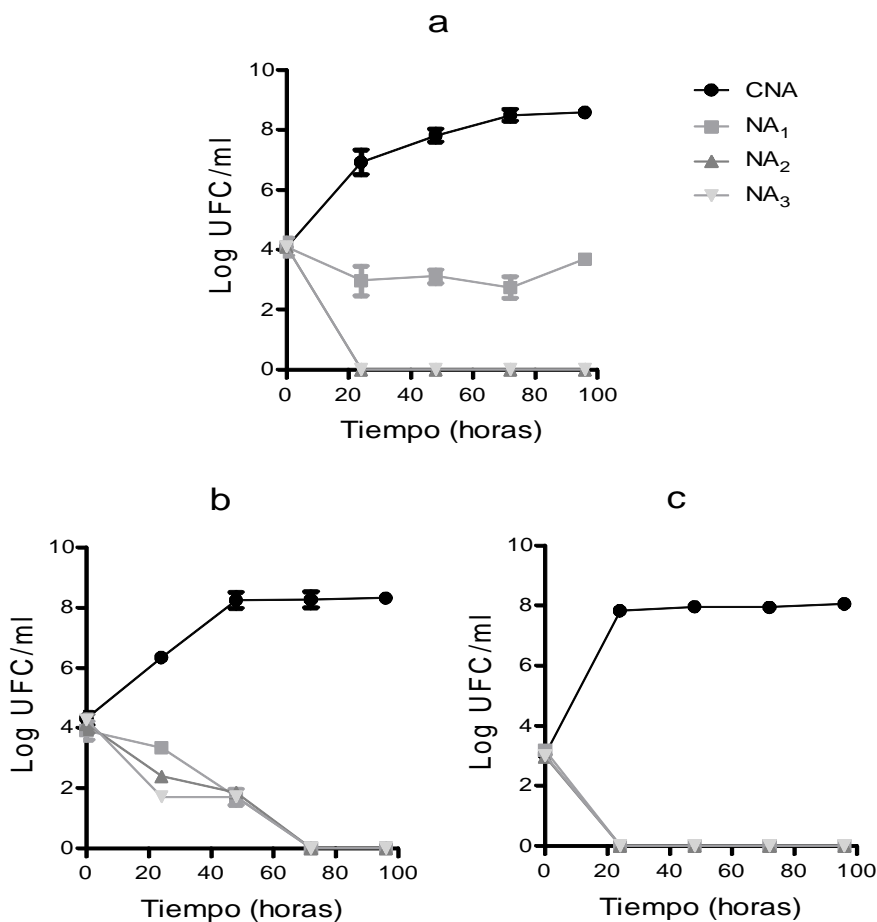


Figura 4.1.4: Efectividad de películas comestibles control (CNA) y conteniendo natamicina (NA₁, NA₂ y NA₃) como barrera frente a una contaminación postproceso de un cultivo simple de levaduras, almacenado a 25°C. a: *Saccharomyces cerevisiae*, b: *Zygosaccharomyces rouxii* y c: *Yarrowia lipolytica*.

Se observó que las películas mostraban un comportamiento diferente en función del microorganismo contaminante y de la concentración de natamicina contenida en la misma. La película de almidón de mandioca sin natamicina (CNA) permitió el crecimiento de las levaduras sin restricciones. Por lo tanto, esta película no fue adecuada para actuar como barrera contra una contaminación externa de levaduras.

Por el contrario, para las películas de almidón de mandioca conteniendo natamicina, los resultados mostraron que el antimicrobiano estaba disponible para evitar una contaminación externa de *S. cerevisiae*. El efecto antimicótico ejercido por las películas aumentó con el contenido de natamicina en las mismas. La película NA₁ ejerció una ligera reducción en las primeras 75 horas. A partir de ese momento, el crecimiento fue reestablecido, alcanzando al final del almacenamiento una población de 4 ciclos log inferior a la película CNA. Las películas NA₂ y NA₃ mostraron acción fungicida y mantuvieron un recuento inferior a 10 UFC/ml hasta el final del almacenamiento (**Figura 4.1.4a**).

Z. rouxii mostró una sensibilidad dependiente de la concentración de natamicina hasta 48 horas de almacenamiento, pero finalmente, en todos los casos, la acción fue fungicida. Todas las concentraciones evaluadas ejercieron el mismo efecto, independientemente de la concentración del antimicrobiano (**Figura 4.1.4b**).

La levadura *Y. lipolytica* mostró ser muy sensible a la presencia de natamicina y se observó un efecto fungicida, para todas las concentraciones evaluadas (**Figura 4.1.4c**).

Otros autores estudiaron la capacidad de películas para actuar como barrera a una contaminación externa con diferentes matrices y antimicrobianos. Ramos y col. (2012) estudiaron la eficacia de películas comestibles a base de proteína de suero, glicerol y natamicina como agente antimicrobiano. Estos investigadores mostraron a través del ensayo de recuento de células viables que la natamicina incorporada en las películas presentaba un efecto importante contra *Y. lipolytica*. Este antimicrobiano llevó la levadura al agotamiento en el transcurso de las primeras 3 horas de almacenamiento a 30°C. Basch y col. (2011) estudiaron el comportamiento de nisina, sorbato de potasio y su combinación, incorporados a

películas a base de almidón de mandioca e hidroxipropilmetil celulosa. En el caso de una contaminación externa por *Zygosaccharomyces bailii*, películas con sorbato de potasio disminuyeron la tasa de crecimiento de la levadura. Sin embargo, las películas conteniendo la combinación de antimicrobianos mostró un mejor comportamiento que las películas conteniendo sólo sorbato de potasio, presentando después de 24 horas, un crecimiento 1,4 ciclos log inferior que las películas sin antimicrobianos.

Adicionalmente, en todos los casos, se estudió el desarrollo microbiológico en la superficie del alimento modelo luego de la remoción de las películas. Se observó que no se desarrollaron colonias en la superficie del agar luego de 24 horas adicionales de almacenamiento a 28°C, indicando que las películas evaluadas no permitieron el paso hacia el alimento modelo de una contaminación de levaduras postproceso.

4.1.5.2 Estudio de la actividad de barrera de la película comestible conteniendo natamicina sobre un sistema modelo sólido, frente a contaminaciones producidas a distintos tiempos

La contaminación microbiana de los alimentos puede producirse en las distintas etapas del proceso de elaboración, almacenamiento y/o distribución. El presente ensayo se realizó con el fin de simular una posible contaminación por *S. cerevisiae* en las etapas de almacenamiento y distribución de dicho producto.

En la **Figura 4.1.5** se muestra la capacidad de las películas para actuar como barrera cuando son inoculadas después de diferentes tiempos de contacto (0, 6 ó 10 días) con el medio sólido. De la misma forma que en los ensayos anteriores, la película control (CNA) no presentó actividad antimicrobiana frente a la contaminación de *S. cerevisiae*. Si bien las películas conteniendo natamicina presentaron actividad frente a la levadura contaminante, esta disminuyó con el aumento del tiempo de contacto de la película con el sistema sólido previo a la inoculación de la levadura. Ello se puede observar comparando el comportamiento de las películas en las **Figuras 4.1.5a, 4.1.5b y 4.1.5c**. Por ejemplo, en el caso de la película NA₁, luego de 10 días de contacto con la matriz previo a la inoculación, se

observó un aumento del crecimiento de la levadura a las 72 horas (**Figura 4.1.5c**), mientras que ello no se observó para los tiempos de contacto inferiores.

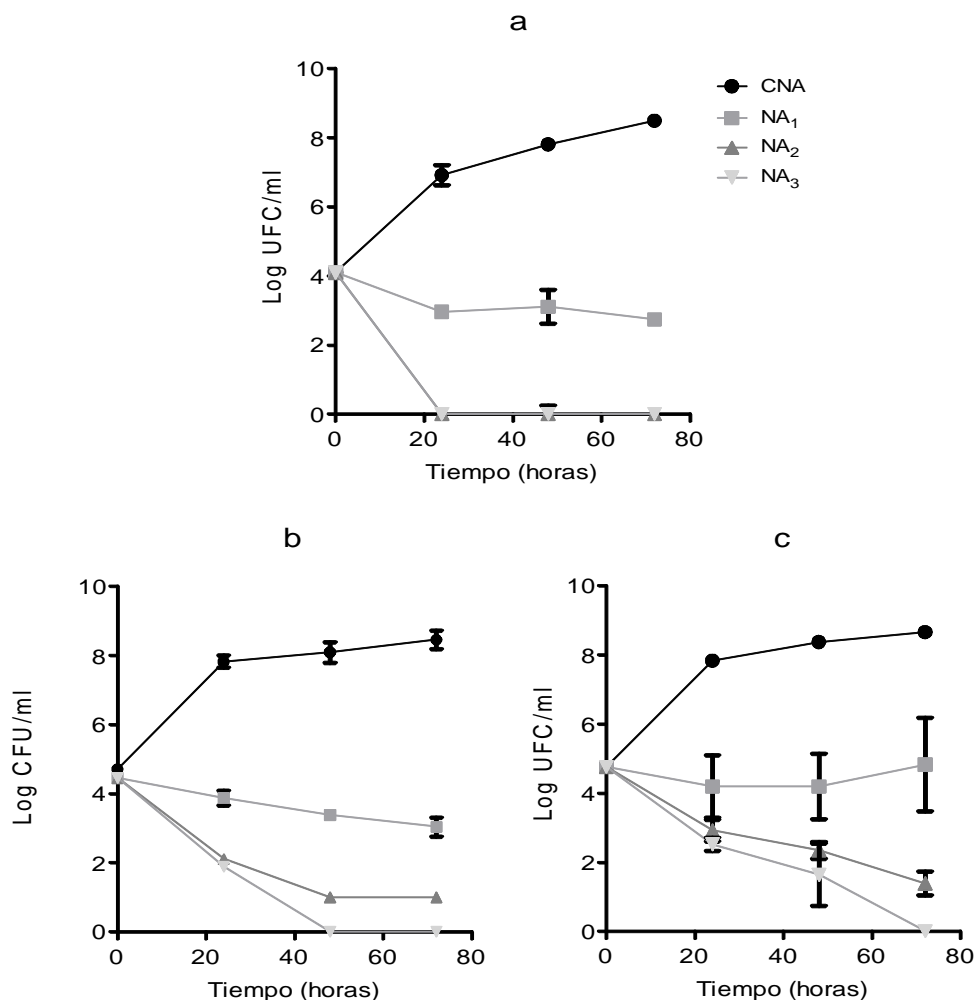


Figura 4.1.5: Capacidad de las películas comestibles control (CNA) y conteniendo natamicina (NA₁, NA₂ y NA₃) como barrera frente a una contaminación externa de *Saccharomyces cerevisiae* a distintos tiempos (a: 0 días, b: 6 días y c: 10 días) de contacto de las películas comestibles con el medio sólido. El tiempo indicado en el eje x corresponde al almacenamiento a 25°C contado a partir de la contaminación.

Aunque la actividad de la natamicina cambió con el tiempo de contacto, en particular, en las películas NA₂ y NA₃ se observó un comportamiento antimicrobiano adecuado aún después de un contacto de 10 días previos a la inoculación. Las microscopías correspondientes a las películas conteniendo distintas concentraciones de natamicina (apartado 4.1.4, **Figura 4.1.6**) indicaron que aún después de 10 días de contacto de la película con un medio de alta a_w , se observan cristales de natamicina. Por lo tanto estas podrían actuar como reservorio y dan como resultado esta actividad a lo largo del almacenamiento.

Fajardo y col. (2010) estudiaron la liberación de natamicina de películas comestibles a base de quitosano analizando el proceso de difusión hacia diferentes medios de contacto: un alimento sólido y medio líquido (solución buffer fosfato). En este último caso, determinaron un coeficiente de difusión mayor que el obtenido para la liberación hacia un medio sólido. Atribuyeron el aumento del coeficiente de difusión al efecto del hinchamiento de la matriz en contacto con un medio de alta actividad de agua. De la misma manera, en este trabajo, la reducción de la actividad antimicrobiana a lo largo del tiempo de contacto con un medio de alta actividad de agua (**Figura 4.1.5**), se podría atribuir al aumento de las dimensiones de la matriz de la película. Ello conduciría a una apertura de la estructura lo que podría permitir la difusión de la natamicina hacia el medio sólido a lo largo del tiempo del ensayo, conduciendo a una menor concentración del conservante en la película. Este proceso daría lugar a la disminución de actividad observada con el tiempo para actuar como barrera frente a una contaminación externa.

Adicionalmente, en todos los casos, se estudió el desarrollo microbiológico en la superficie del alimento modelo luego de la remoción de las películas. Se observó que no se desarrollaron colonias en la superficie del agar luego de 24 horas adicionales de almacenamiento a 28°C, indicando que las películas evaluadas no permitieron el paso hacia el alimento modelo de una contaminación de levaduras postproceso.

Para los ensayos siguientes se seleccionó a la película NA₃ como modelo de una película portadora de natamicina. El motivo de esta elección es que la película NA₃ es la que mostró los mejores resultados microbiológicos sin mayores

modificaciones de las propiedades físico-químicas respecto a la película sin natamicina (CNA).

4.1.5.4 Estudio de la liberación de natamicina desde la película hacia un sistema modelo sólido

Con el objetivo de estudiar la liberación de la natamicina desde la película hacia un medio sólido modelo se utilizó el ensayo del halo.

Como se mencionó en 4.1.5.2 se evaluó el comportamiento de la película NA₃ frente a las 3 levaduras en estudio, dado que en los ensayos previos se observó un importante efecto de la concentración usada en esta película.

En la prueba de difusión en agar se observó que la película CNA permitió el crecimiento de todas las levaduras (datos no mostrados), mientras que la película NA₃ presentó zonas claras de diferentes diámetros según el microorganismo contaminante (**Tabla 4.1.5**), siendo *Y. lipolytica* la que mostró un diámetro de inhibición más pequeño.

Tabla 4.1.5: Diámetro de inhibición de distintas levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* y *Zygosaccharomyces rouxii*) por acción de la natamicina liberada desde la película comestible conteniendo natamicina (NA₃).

	Diámetro de inhibición (cm)
<i>S. cerevisiae</i>	2,950 ± 0,071 ^a
<i>Z. rouxii</i>	3,100 ± 0,141 ^a
<i>Y. lipolytica</i>	2,250 ± 0,212 ^b

Se informan la media y la desviación estándar.

Las distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Es importante destacar que el diámetro de la zona de inhibición está dado por el balance entre la velocidad de difusión del antimicrobiano hacia el agar y la tasa de crecimiento del microorganismo contaminante. Teniendo en cuenta que la matriz

donde está contenida la natamicina (película NA₃) y el medio donde debe difundir (agar YGC), son los mismos para la evaluación de las 3 levaduras, la diferencia observada en los diámetros de los halos formados se puede atribuir a las diferentes tasas de crecimiento y sensibilidades de cada levadura frente a la natamicina. En la **Figura 4.1.7** se observan los halos de inhibición de las distintas levaduras estudiadas, generados a partir de la natamicina liberada al medio de crecimiento.

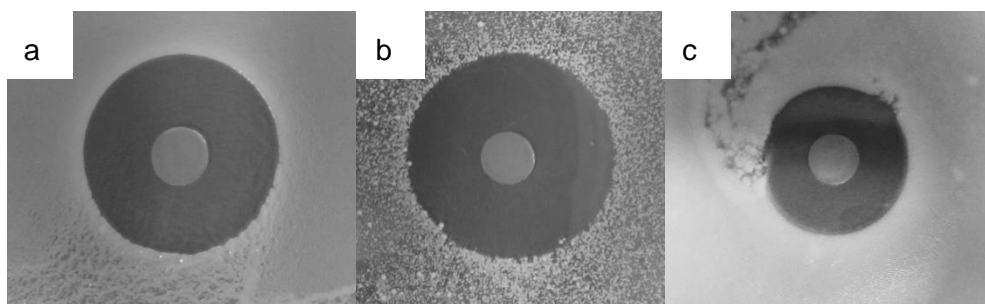


Figura 4.1.7: Fotografías a escala real de halos de inhibición de distintas levaduras, generados a partir de la liberación de natamicina contenida en la película comestible conteniendo natamicina (NA₃). a: *Saccharomyces cerevisiae*, b: *Zygosaccharomyces rouxii* y c: *Yarrowia lipolytica*.

Pintado y col. (2010) estudiaron el efecto de nisina, natamicina y ácido málico incorporados en una película de concentrado de proteína de suero de leche frente a *Y. lipolytica*. Estos autores observaron que las películas conteniendo natamicina y ácido málico produjeron una zona de inhibición de 8,0 mm y 11,9 mm, respectivamente. Estos valores son similares a los obtenidos en el presente estudio ya que el diámetro de la inhibición de *Y. lipolytica* fue de 2,25 cm, que corresponde a una zona de inhibición (diámetro total – diámetro de la película) de 6,7 mm. Es importante remarcar que las películas probablemente crecieron en tamaño a lo largo del experimento debido al aumento de sus dimensiones por incorporación de agua

dado su carácter hidrofílico, hecho que podría haber influido en los resultados observados (Flores y col, 2007b).

Otros investigadores han estudiado la liberación de natamicina a medios líquidos o sólidos evaluando su magnitud a través de la evaluación del coeficiente de difusión. Fajardo y col. (2010) estudiaron la liberación de natamicina a partir de películas a base de quitosano a un medio líquido (solución buffer fosfato) y obtuvieron valores de coeficientes de difusión de $(3,60 \times 10^{-10} \pm 0,26 \times 10^{-10}) \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ a 4°C, los cuales son similares a los obtenidos por Hanušová y col. (2010) a 23°C para natamicina soportada en cloruro de polivinilo. Bierhalz y col. (2012) informaron que la segunda ley de Fick ajustó adecuadamente los datos experimentales de liberación de natamicina desde películas comestibles hacia el agua, con valores de difusividad efectiva de $3,2 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (películas de pectina) y $9,2 \times 10^{-12} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (películas de alginato). Fajardo y col. (2010) también estudiaron la liberación de natamicina a un queso utilizado como modelo de alimento sólido y obtuvieron valores más bajos del coeficiente de difusión $(1,29 \times 10^{-12} \pm 0,35 \times 10^{-12}) \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ a 4°C; como ya se comentó previamente, estos autores atribuyeron esta diferencia al tipo de matriz del sistema queso el cual es sólido y con menor actividad de agua que en el caso del sistema líquido previamente mencionado. Sin embargo, el 80% de la natamicina presente en las películas fue liberada al queso después de 23 días de almacenamiento.

Cabe destacar que en el ensayo de barrera, la levadura *Y. lipolytica* fue inhibida en mayor proporción que las otras levaduras por la natamicina disponible en la superficie de la película, aún en aquellos casos de películas con menores concentraciones del antimicrobiano. Como contrapartida, fue la que presentó menor halo de inhibición en el ensayo de difusión en agar. Dado que las matrices de estudio para las 3 levaduras fueron las mismas, se puede pensar que el interjuego de la velocidad de difusión del antimicrobiano y velocidad de crecimiento de la levadura en cuestión, determinó una mayor tasa de crecimiento de *Y. lipolytica* dando como resultado una menor efectividad en la inhibición cuando esta levadura se encontraba sobre la superficie del sistema modelo (ensayo del halo). En el caso de las otras levaduras, probablemente el balance de ambas velocidades fue distinto, determinando la tendencia observada para ellas.

Para los ensayos siguientes se seleccionó a *S. cerevisiae* como modelo del estudio de la respuesta de las levaduras frente a los distintos tratamientos desarrollados. El motivo de esta elección es que, como ya se mencionó anteriormente, existe una muy buena comprensión de su fisiología, bioquímica y respuesta genética; es uno de los modelos más adecuados para el estudio de problemas biológicos. Adicionalmente, es un sistema eucariota con una complejidad sólo ligeramente superior a la de la bacteria pero que comparte con ella muchas de sus ventajas técnicas.

4.1.5.5 Estudio de la actividad de barrera de la película comestible conteniendo natamicina sobre queso Por Salut

Para evaluar la actividad de barrera de películas comestibles, es necesario conocer si la película permite o no el paso de la contaminación hacia la matriz evaluada y si puede reducir o eliminar la contaminación que se produjo sobre su superficie durante el almacenamiento. Para ello, se debe evaluar el desarrollo microbiano sobre la película y en la matriz alimentaria cuando se produce una contaminación postproceso.

En la **Figura 4.1.8a** se muestra la sobrevivencia de *S. cerevisiae* inoculada sobre la superficie de una película comercial (COMERCIAL) y de películas comestibles con (NA₃) o sin natamicina (CNA). Se puede observar que de la misma manera que en el ensayo de barrera hacia un sistema modelo, la película conteniendo natamicina (NA₃) tuvo un efecto fungicida a las 24 horas de almacenamiento. Las películas sin antimicrobianos (CNA y COMERCIAL) permitieron el crecimiento de la levadura sobre su superficie.

El análisis microbiológico del queso Por Salut utilizado en el estudio de la actividad barrera se muestra en la **Figura 4.1.8b**. Se puede observar que el queso sin película inoculado (SP con inóculo) muestra un recuento inicial de 4 ciclos log y el mismo incrementa su valor hasta llegar al final del almacenamiento a 8 ciclos log. El queso sin película y sin inocular (SP sin inóculo) muestra un recuento inferior a 10 UFC/ml hasta las primeras 24 horas, luego incrementó el crecimiento de

S. cerevisiae hasta llegar al final del almacenamiento a 8 ciclos log, similar al queso SP con inóculo. Este resultado evidencia la presencia de flora nativa.

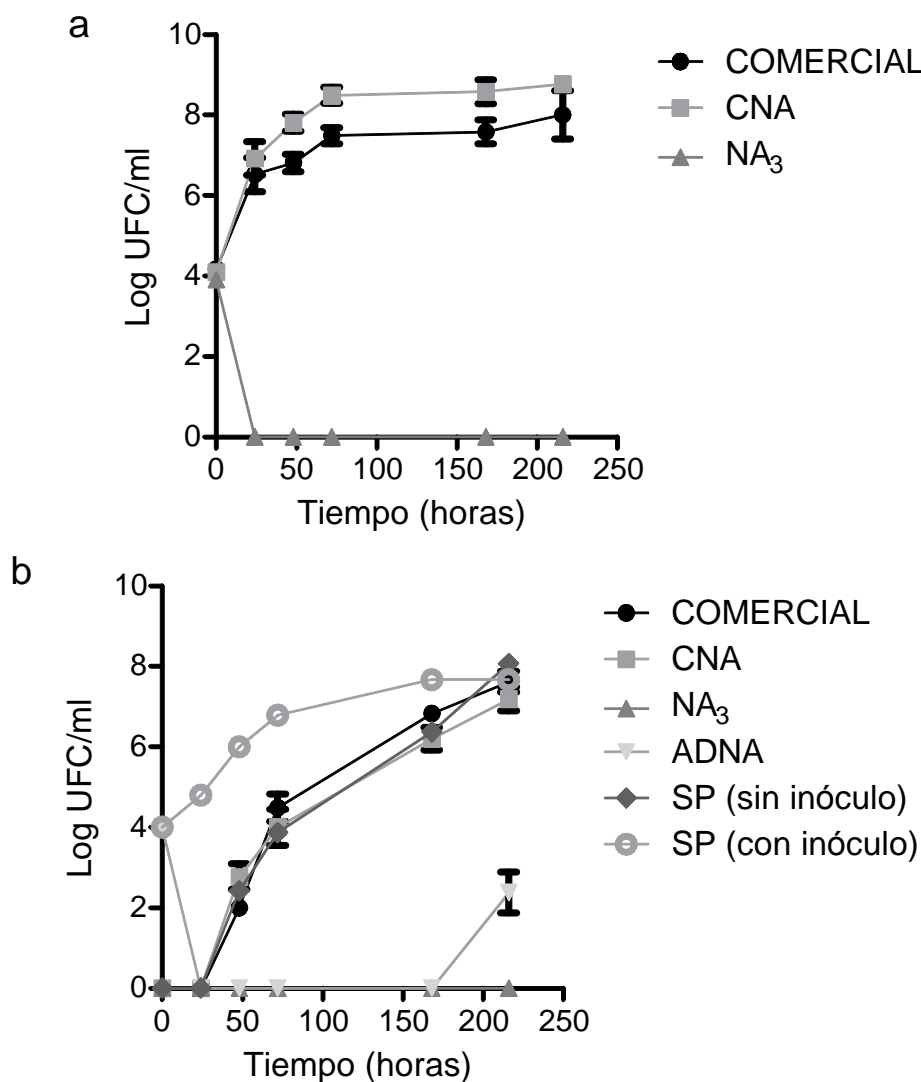


Figura 4.1.8: Ensayo de barrera frente a una contaminación externa de *Saccharomyces cerevisiae* empleando películas comercial (COMERCIAL), comestible control (CNA), comestible conteniendo natamicina (NA₃), aplicación directa de natamicina (ADNA) y queso sin película (SP) con inóculo y sin inóculo, a: análisis microbiológico de las películas evaluadas, b: análisis microbiológico del queso Por Salut.

Las películas COMERCIAL y CNA mostraron un recuento de levaduras similar al queso sin película sin inocular, indicando que estas películas no permitieron la contaminación del queso desde el exterior pero permitieron el crecimiento de la flora nativa. La película conteniendo natamicina (NA₃) presentó un recuento inferior a 10 UFC/ml a lo largo de todo el ensayo, sin permitir el crecimiento de la flora nativa. El queso tratado con la aplicación directa con la solución de natamicina (ADNA) redujo el recuento de *S. cerevisiae* inmediatamente y mantuvo su recuento inferior a 10 UFC/ml a lo largo del almacenamiento, pero reanudando finalmente su crecimiento alcanzando un valor de 2,5 ciclos log.

Estos resultados indican que todas las películas con y sin natamicina previnieron el paso desde el exterior de una contaminación postproceso hacia el queso Por Salut. Pero sólo la película con natamicina (NA₃) actuó como barrera inhibiendo el desarrollo de la flora nativa de levaduras a lo largo de todo el almacenamiento, mostrando ser un método sumamente efectivo para controlar la población de levaduras presentes a ambos lados de la película (es decir, entre la superficie del queso y la película y sobre la superficie de la película).

4.1.5.6 Estudios de liberación de natamicina desde la película hacia queso Por Salut

Con el objetivo de estudiar la liberación de natamicina soportada en películas comestibles hacia queso Por Salut, se evaluó la estabilidad microbiológica del queso en presencia de película comercial (COMERCIAL), película control (CNA), película con natamicina (NA₃), aplicación directa de natamicina (ADNA) y queso sin cubrir (SP).

Al analizar los resultados se observó que el comportamiento del queso en presencia de película comercial, película control y queso sin película, fue similar. Por ello, sólo se muestra en la **Figura 4.1.9**, el comportamiento del queso sin película.

Debido a que el queso presenta flora nativa (**Figura 4.1.9b**), incluyendo hongos y levaduras, se evaluó la funcionalidad de la película NA₃ respecto a esta flora. La **Figura 4.1.9a** muestra que las levaduras presentes en el queso (flora nativa) fueron inhibidas por la presencia de la película NA₃. Por el contrario, con la aplicación de

ADNA o SP, las levaduras reanudaron el crecimiento después de 48 horas y 24 horas de almacenamiento, respectivamente. Por lo tanto la natamicina contenida en la película fue más efectiva que la aplicada en forma directa en la conservación del queso sin inocular.

La película NA₃ ejerció inicialmente un efecto fungicida sobre la levadura *S. cerevisiae* (Figura 4.1.9b). Sin embargo, se restauró posteriormente el crecimiento, llegando al final del almacenamiento a una población de 5 ciclos log inferior al queso SP, aproximadamente. Por el contrario, ADNA sólo produjo una ligera reducción en las primeras 24 horas, y después reasumió el crecimiento, alcanzando una población similar a SP al final del periodo evaluado.

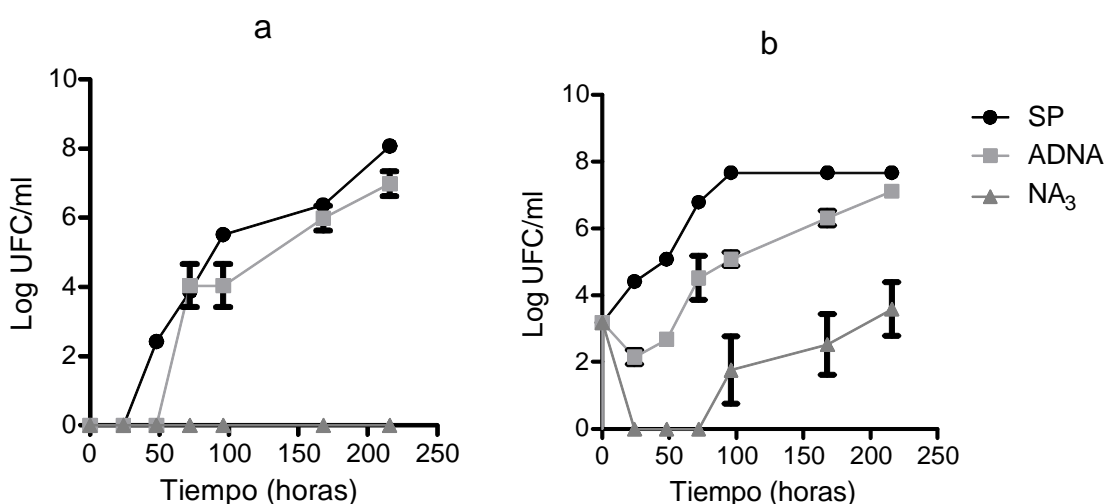


Figura 4.1.9: Crecimiento de levaduras presentes sobre la superficie de queso Por Salut, durante el almacenamiento a 25°C, evaluado sin cobertura (SP), aplicación directa de solución de natamicina (ADNA) y cubierto con película comestible conteniendo natamicina (NA₃). a: sin inocular, b: inoculado con *Saccharomyces cerevisiae*.

Estos resultados muestran la eficacia de las películas a base de almidón de mandioca conteniendo natamicina, para actuar como reservorio e inhibir el crecimiento tanto de las levaduras nativas como las inoculadas, probablemente debido a la lenta liberación del antimicrobiano hacia el alimento.

Fajardo y col. (2010), informaron que la liberación controlada de la natamicina contenida en una película de quitosano hacia una matriz de queso, constituye una alternativa interesante para evitar la pérdida rápida del antimicrobiano que ocurriría cuando éste se aplica directamente sobre la superficie del queso.

4.1.6 Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran que:

- ✓ Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii* y *Yarrowia lipolytica* fueron sensibles a la natamicina en el sistema alimentario líquido estudiado. Este antimicrobiano exhibió para cada levadura estudiada diferentes grados de eficacia (fungicida o fungistática). Por lo tanto, estos resultados indicaron que este antimicrobiano natural puede ser utilizado potencialmente para el control de levaduras en sistemas alimentarios líquidos.
- ✓ En el caso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, tomada como modelo y utilizando estudios de microscopía electrónica de transmisión, se observó que la natamicina actuó a nivel de la membrana plasmática, dañando la pared celular y desencadenando anomalías en las estructuras subcelulares.
- ✓ Es posible formular películas comestibles a base de almidón de mandioca conteniendo distintas concentraciones de natamicina. En el rango de concentraciones del antimicrobiano ensayadas, se observó que la presencia de natamicina no produjo cambios importantes en la deformación y esfuerzo a ruptura pero produjo un descenso de la firmeza.
- ✓ La solubilidad de las películas comestibles no se vio afectada por la presencia de distintas concentraciones de natamicina, pero la permeabilidad al vapor de agua disminuyó significativamente para su más alta concentración.
- ✓ Los cambios observados en el color con la presencia de natamicina en películas comestibles a base de almidón de mandioca corresponden a un incremento del verde y del amarillo.
- ✓ La natamicina contenida en las películas desarrolladas ejerció un importante efecto de barrera frente a *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii* y *Yarrowia lipolytica* cuando se la colocó sobre un sistema modelo

actuando como fungicida o fungistático dependiendo de su concentración y de la levadura evaluada, pero mostrando estar siempre biodisponible. Se observó un aumento de efectividad con el aumento de su concentración para todas las levaduras evaluadas. A su vez, el antimicrobiano se encontró biodisponible incluso cuando la contaminación se produjo diez días después de la aplicación de la película sobre el modelo alimentario, mostrando la funcionalidad de la misma a lo largo del tiempo.

- ✓ La natamicina contenida en las películas desarrolladas, difundió hacia el sistema modelo alimentario estudiado, afectando el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii* y *Yarrowia lipolytica*, presentando diferentes halos de inhibición debido a las diferentes tasas de crecimiento y a las distintas sensibilidades de las levaduras al antimicótico.
- ✓ Todas las películas con y sin natamicina colocadas sobre un queso Por Salut actuaron como barrera a una contaminación postproceso de *Saccharomyces cerevisiae* impidiendo su paso hacia el alimento. Sin embargo, solo la película con natamicina (NA₃) inhibió el desarrollo de la flora nativa de levaduras a lo largo de todo el almacenamiento, mostrando ser sumamente efectiva para controlar la población de levaduras presentes a ambos lados de la película.
- ✓ Las películas desarrolladas conteniendo natamicina fueron efectivas en la inhibición de *Saccharomyces cerevisiae* y flora nativa de levaduras presentes en la superficie de un queso Por Salut. Estas películas mostraron una mayor efectividad que la aplicación directa de igual concentración de natamicina.

Estos resultados indican que este antimicrobiano natural puede ser utilizado para el control de levaduras en los sistemas alimentarios estudiados y su soporte en matrices biopoliméricas de almidón de mandioca es apropiado para su desempeño. A su vez su efectividad antimicótica es superior al observado en el agregado directo de la natamicina.

4.2 Películas comestibles conteniendo natamicina y nisina

Con el objetivo de simular un escenario más cercano a situaciones reales, enfrentadas por los alimentos a lo largo de su procesamiento y almacenamiento las cuales involucran la presencia de comunidades de microorganismos, se desarrollaron películas comestibles con características adecuadas para su aplicación. Las mismas se diseñaron en base a estructuras capaces de soportar los antimicrobianos natamicina y nisina conjuntamente y con capacidad de presentar actividad frente a una población mixta. Se estudió su comportamiento frente a un cultivo mixto de *S. cerevisiae* y *L. innocua*.

Existe una amplia variedad de literatura referente a las propiedades antimicrobianas de natamicina y nisina. Sin embargo, los datos acerca de su actividad en conjunto frente a un cultivo mixto cuando se incorporan solos o soportados en películas comestibles son escasos. Y no existen datos en absoluto que informen sobre la incorporación conjunta de estos antimicrobianos en películas comestibles de almidón de mandioca.

El diseño de estas películas se realizó con la mayor concentración de natamicina (NA₃) utilizada en los estudios previos, y se seleccionó a la levadura *S. cerevisiae* como modelo.

Por lo tanto, los objetivos de este capítulo fueron:

- Desarrollar películas comestibles conteniendo natamicina y nisina.
- Evaluar las características estructurales, mecánicas, físico-químicas y de superficie de las películas diseñadas.
- Evaluar la actividad de dichas películas frente a un cultivo mixto de *Saccharomyces cerevisiae* y *Listeria innocua*, en un sistema sólido modelo y en una matriz alimentaria sólida real. Comparar su eficiencia con la aplicación directa de los antimicrobianos en el alimento.

4.2.1 Evaluación preliminar de actividad antimicrobiana de natamicina y nisina

Con el objetivo de evaluar el comportamiento del cultivo mixto compuesto por *S. cerevisiae* y *L. innocua* frente a los antimicrobianos natamicina y nisina, se

realizaron ensayos preliminares en un sistema modelo líquido constituido por concentrado proteico de suero líquido (CPSL). La actividad de los antimicrobianos solos y combinados, a 25°C, se muestra en la **Figura 4.2.1**. El CPSL inoculado sin antimicrobianos es utilizado como control.

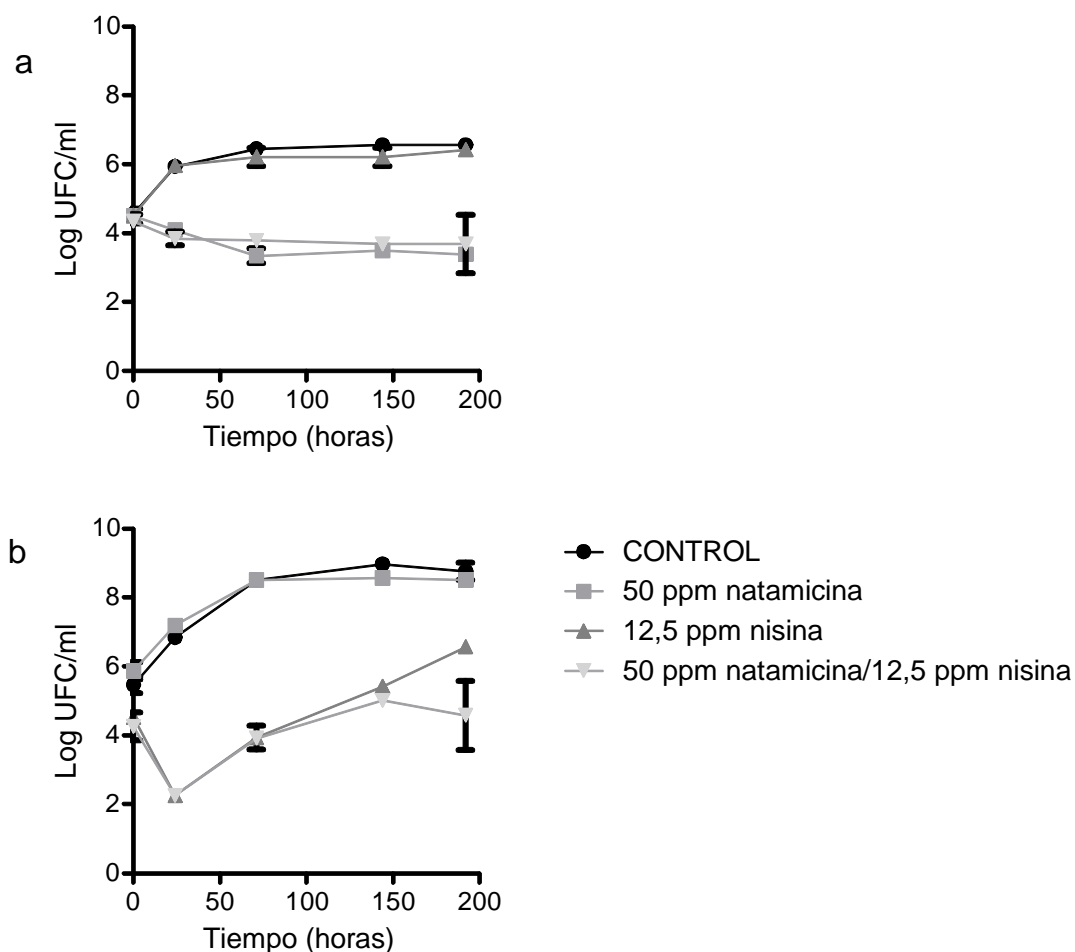


Figura 4.2.1: Actividad antimicrobiana de 50 ppm de natamicina, 12,5 ppm de nisina y su combinación en un alimento líquido modelo (CPSL) almacenado a 25°C frente a cultivo mixto de a: *Saccharomyces cerevisiae* y b: *Listeria innocua*.

Se observó que la ausencia de antimicrobianos permitió el crecimiento de los microorganismos involucrados en el cultivo mixto. Dado que la natamicina sólo es efectiva para levaduras, el tratamiento con 50 ppm de natamicina no afectó el crecimiento de *L. innocua*. A su vez *S. cerevisiae* no se vio afectada por la presencia de nisina.

En la evaluación de *S. cerevisiae* (**Figura 4.2.1a**), no se observaron diferencias significativas en la respuesta a los tratamientos con natamicina (50 ppm natamicina/12,5 ppm nisina y 50 ppm natamicina), generando a las 48 horas una reducción del recuento de células de 1 ciclo log respecto al inóculo inicial y manteniendo a partir de ese momento un efecto fungistático en el tiempo adicional evaluado. Al final del almacenamiento, el desarrollo de la levadura es aproximadamente 3 ciclos log inferior al sistema sin antimicrobiano (CONTROL).

Los tratamientos con nisina (12,5 ppm nisina y 50 ppm natamicina/12,5 ppm nisina) generaron un efecto inmediato sobre *L. innocua* (**Figura 4.2.1b**) reduciendo los recuentos iniciales en 2 ciclos log aproximadamente a las 24 horas, reasumiendo luego su crecimiento llegando al final del almacenamiento (192 horas) a 3 y 4 ciclos log inferiores al control respectivamente.

4.2.2 Caracterización físico-química de las películas comestibles

4.2.2.1 Propiedades mecánicas: ensayo de tracción

En la **Tabla 4.2.1** se muestran los valores de las propiedades físico-químicas de la película conteniendo natamicina (NA₃) y su respectivo control (CNA), presentado anteriormente en la **Tabla 4.1.1**, cuando se evaluaron las propiedades físico-químicas de películas comestibles conteniendo distintas concentraciones de natamicina. Como se afirmó previamente, no se observaron cambios importantes en la deformación y esfuerzo a ruptura pero se observó un descenso de la firmeza con la presencia de natamicina (NA₃).

La **Tabla 4.2.1** muestra que la presencia de nisina (películas NI y NANI) dio lugar a los menores valores del esfuerzo a ruptura, firmeza y módulo de Young y los mayores valores de la deformación a ruptura con respecto a las películas control.

Dado que, como se comentó previamente, las películas contenían distinto contenido de glicerol, es importante comentar que las distintas películas control no vieron afectada su firmeza por sus distintos contenidos de glicerol, obteniéndose un valor de ~1,65 MPa para todos los controles. Sin embargo, la presencia de los antimicrobianos redujo los valores significativamente.

Tabla 4.2.1: Parámetros texturales obtenidos de un ensayo de tracción de las películas comestibles control (CNA, CNANI y CNI) y conteniendo antimicrobianos (NA₃, NANI y NI).

Película	Esfuerzo a ruptura (MPa)	Deformación a ruptura	Firmeza (MPa)	Módulo de Young (MPa)
CNA	1,349 ± 0,149 ^a	0,838 ± 0,088 ^a	1,619 ± 0,181 ^a	6,206 ± 0,841 ^a
NA₃	1,202 ± 0,022 ^b	1,067 ± 0,266 ^a	1,127 ± 0,040 ^b	5,044 ± 0,825 ^a
CNANI	1,637 ± 0,308 ^c	1,480 ± 0,301 ^b	1,708 ± 0,242 ^{a,b}	11,250 ± 1,963 ^b
NANI	0,273 ± 0,021 ^d	2,823 ± 0,307 ^c	0,097 ± 0,008 ^c	0,315 ± 0,024 ^c
CNI	1,935 ± 0,294 ^c	1,180 ± 0,315 ^b	1,647 ± 0,248 ^a	12,320 ± 2,607 ^b
NI	0,432 ± 0,097 ^d	2,752 ± 0,387 ^c	0,153 ± 0,040 ^c	0,842 ± 0,194 ^c

Se informan la media y la desviación estándar. Distintas letras en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras.

Se puede observar en la **Figura 4.2.2** que CNA es la película control con menor esfuerzo a la rotura probablemente debido a su mayor contenido de glicerol lo cual afecta la red de polímero. Inesperadamente también se observó en estas películas una menor deformación a la rotura.

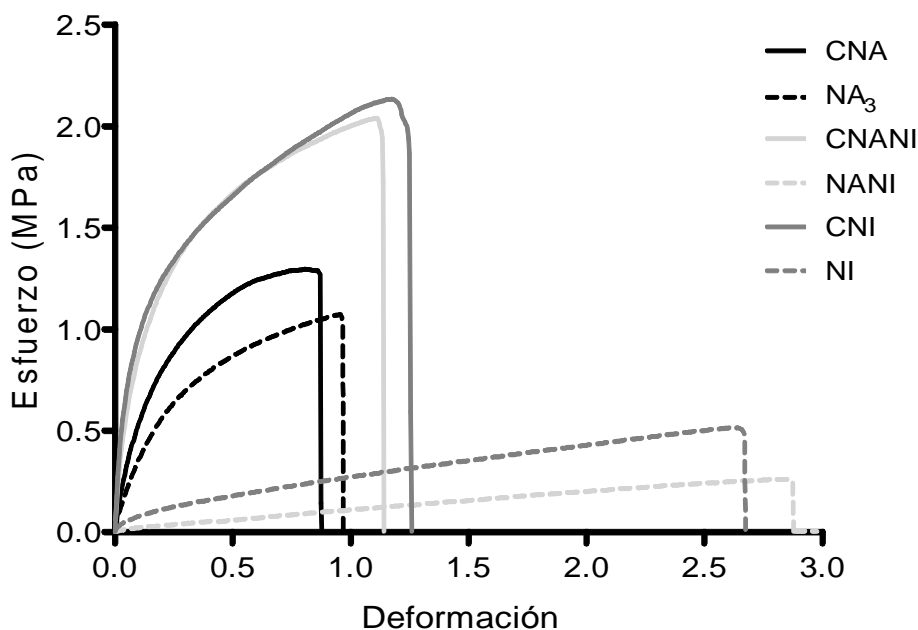


Figura 4.2.2: Curva de esfuerzo versus deformación de las películas comestibles control (CNA, CNANI y CNI) y conteniendo antimicrobianos (NA₃, NANI y NI).

En general, la adición de antimicrobianos muestra un efecto de disminución del esfuerzo a la rotura y un aumento de la deformación a la ruptura, tendencia que puede ser atribuida a la acción plastificante del antimicrobiano estudiado (Ramos y col., 2012).

Las películas NANI y NI tuvieron valores similares de esfuerzo y de deformación a la rotura, mostrando un menor esfuerzo y una mayor deformación a la rotura que la película NA₃, probablemente debido al fuerte carácter plastificante de la nisina. Basch y col., (2012) también observaron en películas comestibles constituidas por una mezcla de almidón de mandioca e hidroxipropil metil celulosa, que la adición de nisina causó una disminución del esfuerzo a la rotura y aumento de la deformación.

4.2.2.2 Permeabilidad al vapor de agua

El estudio de la permeabilidad al vapor de agua (PVA) permite evaluar el grado de protección que las películas comestibles presentarán hacia el alimento. Dado que muchas reacciones de deterioro se ven favorecidas por el incremento de la actividad acuosa, es importante formular las películas con el objetivo de disminuir este parámetro.

La **Tabla 4.2.2** muestra la PVA de las diferentes películas estudiadas. Se observó una diferencia significativa entre los valores de las películas con diferentes concentraciones de glicerol. Un aumento en la concentración de glicerol, en general, determinó un aumento en la PVA de las películas. El glicerol es una molécula hidrófila relativamente pequeña, que se puede insertar entre cadenas poliméricas adyacentes, generando una disminución de las fuerzas intermoleculares y un aumento de la movilidad molecular en la matriz de la película. El aumento de la movilidad resulta en un aumento del volumen libre y movimientos segmentados, lo que facilita la migración de las moléculas de vapor de agua a través de la película (Rodríguez y col., 2006). Adicionalmente, cuando el glicerol se encuentra en altas concentraciones puede polimerizarse y de este modo abrir la estructura de la matriz de almidón, aumentando la permeabilidad de la película a la humedad (Yang y Paulson, 2000). El mismo comportamiento fue observado en investigaciones de Ghanbarzadeh y col. (2006) y Ghasemlou y col. (2011), quienes informaron que el aumento de la concentración de glicerol aumentó la PVA de películas de zeína y películas de kefirán, respectivamente.

De la misma manera que se informó en el estudio de permeabilidad al vapor de agua de películas comestibles conteniendo distintas concentraciones de natamicina (**Tabla 4.1.2**), se observa en **Tabla 4.2.2** que el agregado de nisina (NI) o ambos antimicrobianos (NANI) a las películas no modificó significativamente los valores de permeabilidad al vapor de agua respecto a las películas sin el antimicótico (CNA, CNI y CNANI respectivamente). Grower y col. (2004) encontraron que películas comestibles a base de metil celulosa con diferentes concentraciones de nisina presentaban la misma tendencia.

En el caso del agregado de natamicina (NA) se observa un descenso significativo de aproximadamente un 10 % en la PVA respecto a su control (CNA).

Tabla 4.2.2: Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas comestibles control (CNA, CNANI y CNI) y conteniendo antimicrobianos (NA₃, NANI y NI).

Película	PVA .10 ⁻⁹ (g/ seg m Pa)
CNA	3,92 ± 0,01 ^a
NA ₃	3,69 ± 0,02 ^b
CNANI	0,89 ± 0,60 ^c
NANI	0,99 ± 0,12 ^c
CNI	0,76 ± 0,008 ^c
NI	0,79 ± 0,04 ^c

Se informan la media y la desviación estándar.

Distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras.

4.2.2.3 Solubilidad

Con el objetivo de estudiar la integridad de las películas en un entorno acuoso para su posible aplicación en alimentos, se estudió la solubilidad en agua destilada de las distintas películas desarrolladas. En la **Tabla 4.2.3** se pueden observar los resultados de este ensayo.

Como se explicó previamente, las películas con los distintos antimicrobianos fueron formuladas con distintos niveles de glicerol para garantizar su adecuado manejo. El efecto del contenido de glicerol puede evaluarse a través de la comparación de las distintas películas control, observándose que la reducción de su concentración (glicerol CNA > glicerol CNANI > glicerol CNI), presentó una tendencia no significativa a la disminución de la solubilidad. Ahmadi y col. (2012) mostraron que la solubilidad en agua de películas de hidrocoloides de *psyllium* aumentó significativamente con el agregado de glicerol. En este sentido, Ghasemlou y col. (2011) informaron que el aumento de glicerol cambió la estructura molecular del

biopolímero a través de una disminución de la interacción entre las moléculas, y por lo tanto aumentó la solubilidad en agua de las películas.

Tabla 4.2.3: Solubilidad de las películas comestibles control (CNA, CNANI y CNI) y conteniendo antimicrobianos (NA₃, NANI y NI).

Película	Solubilidad (%)
CNA	21,81 ± 7,42 ^a
NA₃	18,72 ± 6,65 ^a
CNANI	15,83 ± 5,64 ^a
NANI	16,35 ± 7,76 ^a
CNI	11,77 ± 5,32 ^a
NI	18,20 ± 7,04 ^a

Se informan la media y la desviación estándar.

Distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras.

La comparación de cada película con su control (**Tabla 4.2.3**) muestra también la ausencia de una tendencia clara en la variación de la solubilidad con el agregado del antimicrobiano. Probablemente los antimicrobianos al nivel agregado en las películas no afecten los entrecruzamientos presentes en las mismas. De acuerdo a Mei y col. (2013) estos entrecruzamientos son los responsables de la integridad de las películas. Sin embargo Flores y col. (2010) informaron que la adición de nisina a películas a base de almidón de mandioca producía un aumento de las regiones amorfas, aumentando la interacción con el agua y consecuentemente aumentando la solubilidad.

4.2.2.4 Color

Con el objetivo de evaluar el efecto de las películas en el color de los alimentos recubiertos lo cual podría condicionar la aceptación de dichos alimentos, se estudiaron los distintos parámetros de color de las películas desarrolladas

conteniendo nisina y/o natamicina. La **Tabla 4.2.4** muestra que los distintos parámetros de color estudiados no se vieron afectados por el distinto contenido de glicerol de las películas control sin antimicrobianos (CNA, CNANI y CNI).

Tabla 4.2.4: Parámetros del sistema de color CIE Lab de las películas comestibles control (CNA, CNANI y CNI) y conteniendo antimicrobianos (NA₃, NANI y NI).

Película	L*	a*	b*	YI	ΔE
CNA	88,32 ± 0,45 ^{a,d}	-1,2 ± 0,03 ^a	3,76 ± 0,16 ^a	6,77 ± 0,31 ^a	0 ^a
NA₃	88,70 ± 0,53 ^{b,e}	-1,58 ± 0,03 ^b	5,06 ± 0,17 ^b	9,02 ± 0,36 ^b	1,41 ± 0,19 ^d
CNANI	89,07 ± 1,07 ^{a,e}	-1,25 ± 0,06 ^a	2,99 ± 0,25 ^a	5,17 ± 0,54 ^a	0 ^a
NANI	85,41 ± 1,61 ^c	-1,18 ± 0,55 ^a	12,30 ± 2,12 ^c	23,60 ± 4,20 ^c	10,00 ± 2,36 ^e
CNI	89,20 ± 1,05 ^{a,e}	-1,27 ± 0,049 ^a	2,94 ± 0,19 ^a	5,04 ± 0,42 ^a	0 ^a
NI	87,99 ± 1,13 ^{d,b}	-1,21 ± 0,18 ^a	7,36 ± 1,15 ^d	13,85 ± 2,45 ^d	4,67 ± 1,35 ^f

Se informan la media y la desviación estándar. Distintas letras en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras.

Se puede observar que las películas conteniendo nisina (NI y NANI) presentan mayores valores de b* y YI y menores valores de L* que las películas control (CNI y CNANI, respectivamente) es decir que la adición de nisina afecta estos parámetros de color. Y este fenómeno se produjo en mayor medida, por la presencia conjunta de natamicina y nisina (NANI vs CNANI). Basch y col. (2012) observaron efectos similares en relación a la adición de nisina a películas comestibles a base de almidón de mandioca e hidroxipropilmetil celulosa.

Coincidentemente, se observa en la tabla que la adición de natamicina (NA₃) o nisina (NI) aumentó el parámetro ΔE en relación a las películas sin antimicrobianos (CNA y CNI, respectivamente) y se observaron los mayores valores de este parámetro cuando se añadieron los dos antimicrobianos juntos (NANI vs CNANI).

4.2.2.5 Ángulo de contacto y humectabilidad

Para describir la hidrofobicidad/hidrofilicidad de una película comestible se puede analizar el ángulo de contacto formado por una gota de agua en contacto con una superficie. Un alto ángulo de contacto (θ) mayor de 70° indica una superficie hidrofóbica y un bajo ángulo de contacto ($\theta < 20^\circ$) es característico de una superficie hidrofílica (Tang y Jiang, 2007).

En la **Figura 4.2.3**, se observan, a modo de ejemplo, las distintas formas que adoptaron gotas de agua destilada sobre la superficie de las películas comestibles formuladas. Se puede destacar que las películas control (CNA, CNANI y CNI) y NA_3 no permiten observar la forma de la gota debido a que la misma presentó un ángulo de contacto muy reducido.

En la **Tabla 4.2.5** se puede observar que el aumento de concentración del glicerol disminuyó significativamente el ángulo de contacto del agua con las películas. El ángulo es de aproximadamente $31,71^\circ$ para la película CNI (1,7% de glicerol en la mezcla que da origen a la película), descendiendo a un valor de aproximadamente $7,80^\circ$ para la película CNA (2,8% de glicerol en la mezcla que da origen a la película). Estos resultados muestran que la hidrofobicidad de la superficie de películas comestibles de almidón de mandioca disminuyó con el aumento de la concentración de glicerol, por ser el mismo una sustancia hidrofílica (Carneiro-da-Cunha y col., 2009). Un resultado similar fue observado por Ahmadi y col. (2012), quienes informaron que el aumento del glicerol en películas de *psyllium* redujo el ángulo de contacto de una gota de agua depositada sobre la superficie de las mismas como ya se comentó previamente.

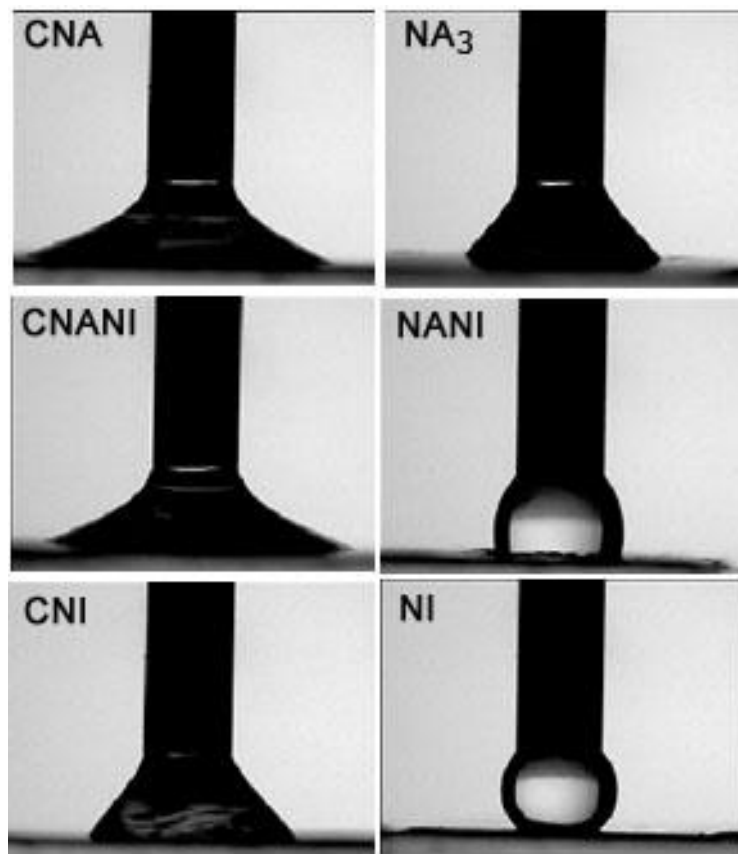


Figura 4.2.3: Imágenes del aspecto presentado por gotas de agua destilada depositadas sobre la superficie de películas comestibles control (CNA, CNANI y CNI) y conteniendo antimicrobianos (NA_3 , NANI y NI).

Por otra parte, se puede observar en la **Tabla 4.2.5** que la adición de antimicrobianos aumentó el ángulo de contacto (NA_3 vs CNA, NANI vs CNANI y NI vs CNI) lo que indica que la hidrofobicidad de las películas aumentó. Los mayores ángulos de contacto se observaron para las películas NI y NANI. Bierhalz y col. (2012) analizaron el ángulo de contacto formado sobre una película de alginato conteniendo natamicina y sus resultados mostraron que la presencia del antimicrobiano condujo a un mayor ángulo de contacto, señalando que las superficies se hicieron más hidrofóbicas. En la bibliografía disponible no existen estudios previos que evalúen el ángulo de contacto y/o la hidrofobicidad de películas

comestibles conteniendo nisina o ambos antimicrobianos juntos tal como se ha realizado en esta investigación.

Tabla 4.2.5: Ángulo de contacto de películas comestibles control (CNA, CNANI y CNI) y conteniendo antimicrobianos (NA₃, NANI y NI).

Películas	Ángulo de contacto (°)
CNA	7,80 ± 3,33 ^a
NA₃	29,00 ± 7,06 ^b
CNANI	16,89 ± 9,24 ^c
NANI	55,60 ± 7,33 ^d
CNI	31,71 ± 3,01 ^b
NI	60,85 ± 2,87 ^d

Se informan la media y la desviación estándar. Distintas letras en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras.

La humectabilidad es una importante propiedad de las películas comestibles ya que permite entender la interacción interfacial película-agua y está relacionada a la resistencia al agua de dichas películas (Rotta y col., 2009). En la **Figura 4.2.4** puede observarse que con el aumento de la concentración de glicerol (**Figura 4.2.4a**), se obtuvieron películas con mayores valores de humectabilidad (**Figura 4.2.4b**) y que la adición de los antimicrobianos redujo los valores de este parámetro.

Por lo tanto estos resultados son de gran relevancia ya que permiten conocer la compatibilidad de una película con el alimento a cubrir. En el caso de diseñar una película para cubrir un alimento con alto contenido de lípidos, como algunos quesos, las películas conteniendo nisina o natamicina y nisina, serán las más adecuadas debido a que presentan un alto ángulo de contacto y baja humectabilidad, ofreciendo entonces una mayor compatibilidad interfacial debido a su mayor carácter hidrofóbico.

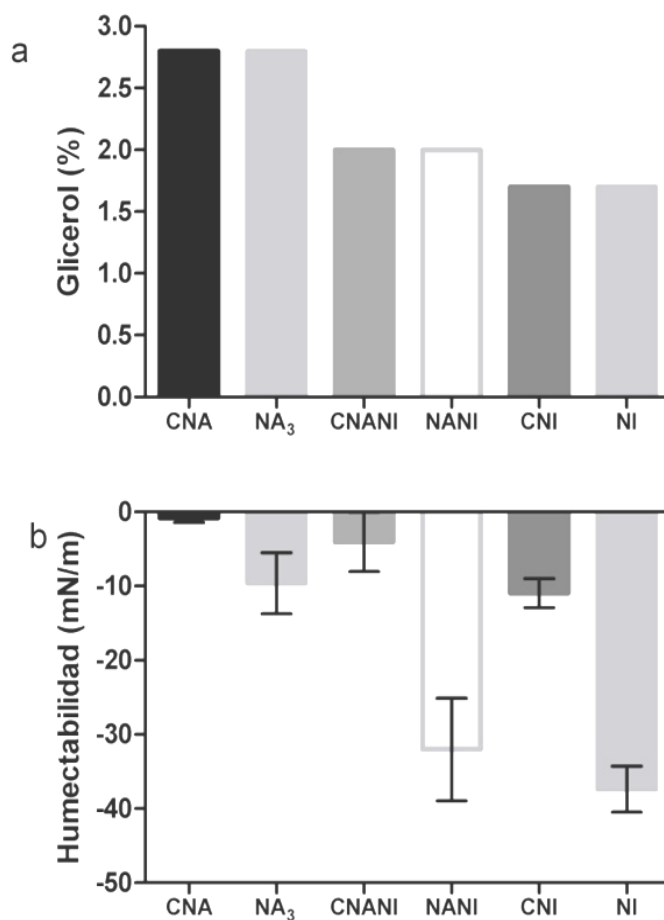


Figura 4.2.4: Contenido de glicerol (a) y humectabilidad (b) de las películas comestibles control (CNA, CNANI y CNI) y conteniendo antimicrobianos (NA₃, NANI y NI).

4.2.3 Caracterización microscópica de las películas comestibles

4.2.3.1 Microscopía de barrido electrónico ambiental

Con el objetivo de estudiar las características microestructurales de las películas vinculadas a sus distintas formulaciones, se aplicó la técnica de microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM). Para llevar adelante el estudio fue necesario utilizar una sección transversal de las películas (**Figura 4.2.5**). La cara superior de las imágenes corresponde a la superficie de evaporación y la cara inferior corresponde a la superficie de contacto con el molde de silicona durante el

proceso de casteo. Ambas superficies de todas las películas estudiadas presentaron un aspecto liso y continuo. Es importante destacar que el secado generó una notable heterogeneidad en la sección transversal en esta escala de observación. Como muestra la **Figura 4.2.5**, las películas sin antimicrobianos mostraron grietas que se generaron hacia la superficie de evaporación de las películas y no hubo diferencias distinguibles entre las distintas formulaciones, independientemente de la concentración de glicerol utilizado (**Figura 4.2.5a, 4.2.5c y 4.2.5e**). Fontes y col. (2011) estudiaron la sección transversal de películas de metilcelulosa y observaron que el seno de la película era denso, compacto y mostraba pequeñas rayas blancas insertas en la matriz polimérica, hecho que podría estar relacionado con la exudación del plastificante (glicerol) a partir de la matriz.

Las películas con antimicrobianos mostraron una estructura más regular que las películas control. La película NA₃ mostró una superficie lisa y uniforme, sin poros o grietas, pero se observaron pequeños cristales en las proximidades de la superficie de evaporación (**Figura 4.2.5b**), corroborando lo observado en esta película con microscopía óptica (**Figura 4.1.4**). La micrografía de la película NANI fue similar pero con menor cantidad de cristales (**Figura 4.2.5d**). Bierhalz y col. (2012 y 2013) detectaron una distribución no uniforme de los cristales en la superficie en micrografías obtenidas con microscopía electrónica de barrido (SEM) de películas de alginato conteniendo natamicina. En forma similar, Pires y col. (2008) también observaron en películas de celulosa conteniendo natamicina la presencia de cristales del antimicrobiano a través de microscopía de barrido electrónico. La película NI (**Figura 4.2.5f**) mostró una matriz de aspecto similar a las películas control. Grower y col. (2004) elaboraron películas de polietileno de baja densidad con y sin nisina y las observaron mediante microscopía de barrido electrónico. De la misma manera que en la presente investigación, no encontraron diferencias entre las matrices de las películas conteniendo o no el antimicrobiano.

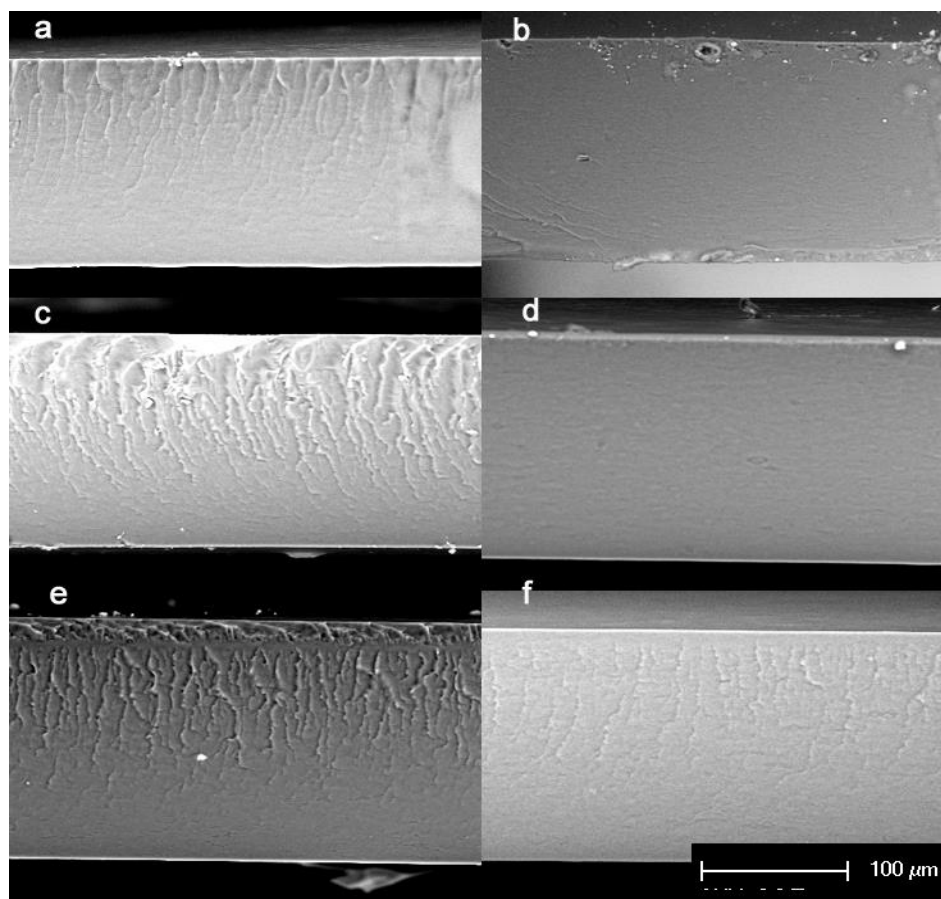


Figura 4.2.5: Micrografías ESEM de la sección transversal de películas comestibles control, a: CNA, c: CNANI y e: CNI y conteniendo antimicrobianos, b: NA_3 , d: NANI y f: NI.

4.2.3.2 Microscopía de fuerza atómica

El análisis por MFA se utilizó para caracterizar la topografía de las películas a altos niveles de aumento. Se estudió la topografía (parámetro cualitativo) y la rugosidad (parámetro cuantitativo) de películas comestibles de almidón de mandioca a través de microscopía de fuerza atómica (MFA).

En la **Figura 4.2.6** se muestran las imágenes topográficas en 3 dimensiones de las películas estudiadas.

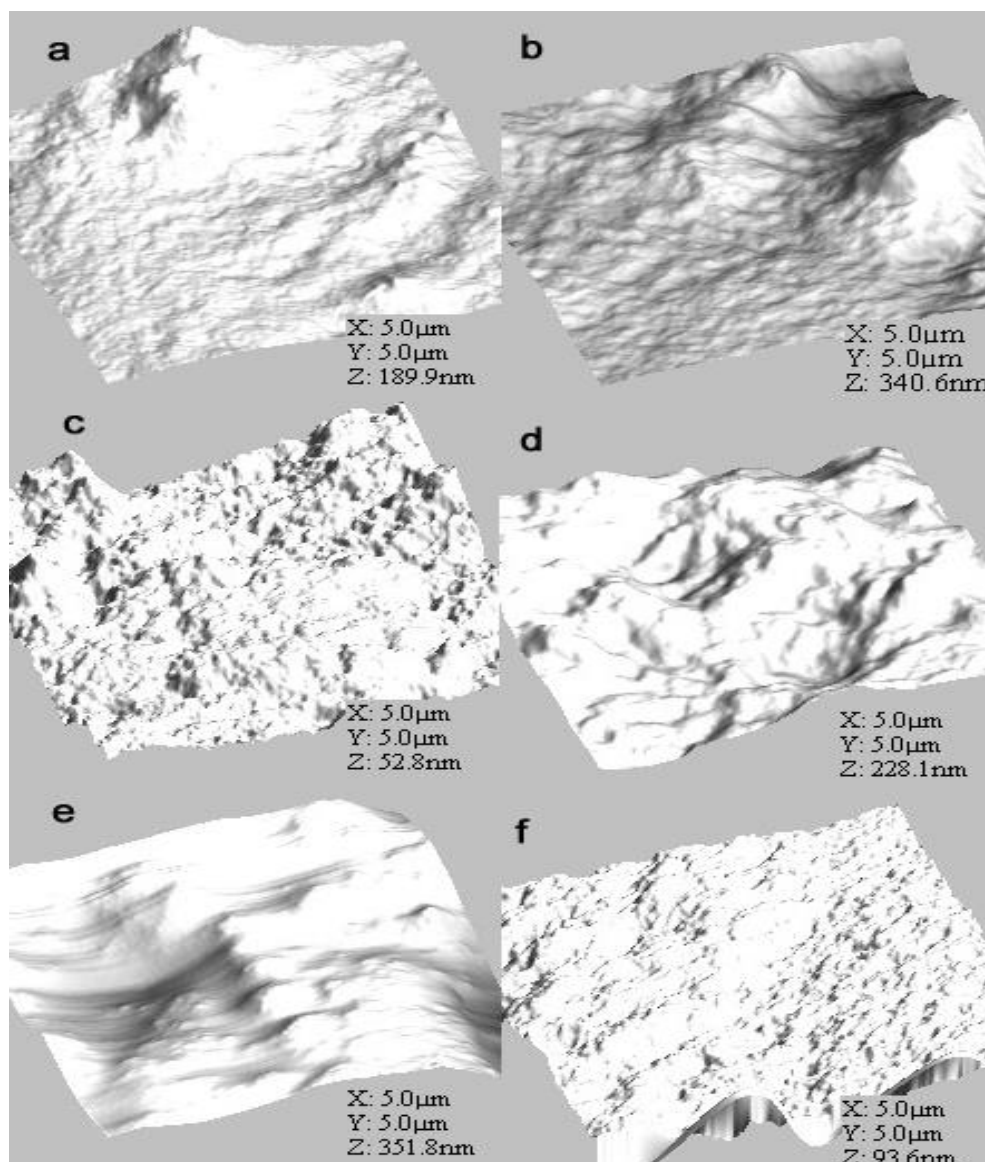


Figura 4.2.6: Imágenes tridimensionales de MFA de películas comestibles control(a: CNI, c: CNANI, e: CNA) y conteniendo antimicrobianos (b: NI, d: NANI, f: NA_3). (Dimensión: 5,0 x 5,0 μm).

Los valores de rugosidad se informan en la **Tabla 4.2.6**. Se observaron diferencias significativas entre los valores de rugosidad de las películas control con diferentes concentraciones de glicerol. Un aumento en la concentración de glicerol produjo una reducción en la rugosidad de las películas estudiadas (rugosidad CNA

<rugosidad CNANI <rugosidad CNI). Este fenómeno es atribuible a que el glicerol, al actuar como plastificante, afecta la formación de la red de almidón aumentando el carácter poco rugoso de las matrices obtenidas (Lin y col., 2009).

Tabla 4.2.6: Rugosidad de las películas comestibles control (CNA, CNANI y CNI) y conteniendo antimicrobianos (NA₃, NANI y NI).

Película	Rugosidad (nm)
CNA	10,86 ± 1,97 ^a
NA₃	9,93 ± 1,55 ^a
CNANI	17,79 ± 2,35 ^b
NANI	32,85 ± 1,55 ^c
CNI	26,78 ± 2,15 ^d
NI	39,78 ± 1,98 ^e

Se informan la media y la desviación estándar.

Distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras.

Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en los valores de rugosidad entre películas con y sin natamicina (CNA vs NA₃). Arzate-Vázquez y col. (2012) informaron parámetros de rugosidad similares para las películas a base de quitosano con o sin natamicina. Sin embargo, la adición de nisina generó películas más rugosas (rugosidad CNANI <rugosidad NANI y rugosidad CNI <rugosidad NI). La Storia y col., (2008) quienes estudiaron películas de polietileno conteniendo nisina, observaron un considerable aumento de la rugosidad de la superficie debido a la presencia del antimicrobiano. Sin embargo, no se ha podido encontrar en bibliografía estudios referentes a la rugosidad de películas comestibles conteniendo nisina, ni su combinación con natamicina, que puedan ser utilizadas a los efectos de comparación.

4.2.4 Correlación entre los parámetros estudiados

Con el fin de evaluar la relación entre los parámetros ángulo de contacto, rugosidad y PVA, se realizó un análisis de correlación. En la **Tabla 4.2.7** se pueden observar los resultados de los coeficientes de correlación de Pearson. También se muestra, en negrita, la significatividad estadística expresada a través del valor p. Las propiedades interfaciales entre un líquido y un polímero son caracterizadas por las energías superficiales de cada fase y el ángulo de contacto entre ellas (Hameed, 2007). De acuerdo a lo expresado por Good y col. (1998) y Bico y col. (2002), para superficies hidrófilas, la rugosidad mejora la humectación de las superficies determinando una disminución del ángulo de contacto entre ellas. Sin embargo, en el presente trabajo se pudo observar que la rugosidad y el ángulo de contacto mostraron un coeficiente de correlación positivo y significativo (**Tabla 4.2.7**). Muscat y col. (2013) estudiaron el comportamiento filmógeno y la hidrofobicidad de almidón de alta amilosa en la presencia de tres ceras naturales diferentes (cera de abejas, cera de candelilla y cera de carnauba) y, en la presencia y ausencia de Tween-80 y al igual que en este trabajo, observaron que los mayores ángulos de contacto se obtenían cuando la cera carnauba y el Tween-80 estaban presentes y esta tendencia estaba relacionada a la mayor rugosidad de estas películas.

La **Tabla 4.2.7** muestra un coeficiente de correlación negativo y significativo entre la rugosidad y la PVA. En un material sin defectos como agujeros o grietas, el mecanismo principal para la movilidad del gas y el vapor de agua a través de una película o recubrimiento es una difusión activa. Esto significa que el permeado se disuelve en la matriz de la película en el lado de mayor concentración, difunde a través de la película, impulsado por un gradiente de concentración y se evapora en la otra superficie (Siracusa, 2012). Escamilla-García y col. (2012) caracterizaron películas comestibles de quitosano y zeína y observaron que la mayor rugosidad generaba la menor permeabilidad. Bosquez-Molina y col. (2010) estudiaron la morfología de la superficie y la PVA de recubrimientos a base de cera de candelilla/aceite mineral en goma de mezquita y observaron que la adición de CaCl_2 contribuyó a un aumento de la rugosidad de la superficie y que esta rugosidad contribuyó a un mejor "acoplamiento" del material estructural en torno a

la fase dispersa lipofílica resultando en una película más compacta con propiedades mejoradas para evitar o minimizar la difusión del vapor de agua y, por lo tanto, con una menor PVA. Por lo tanto, el coeficiente de correlación negativo observado para Rq y PVA en la presente investigación puede ser atribuido a que la relación interfacial entre el agua y la superficie de la película se ve dificultada con el aumento de la rugosidad. Ello determinaría la disminución de la solubilidad del agua en la película y de su difusión, lo cual conduciría a un decrecimiento de la PVA. Esta disminución sería positiva porque se incrementarían las características de barrera de las películas estudiadas.

Tabla 4.2.7: Parámetros de correlación entre las propiedades físicas estudiadas (ángulo de contacto, rugosidad y PVA). En negrita se observa el parámetro estadístico p marcado con asterisco cuando presenta un valor significativo respecto al nivel de confianza (α : 0,05)

	Ángulo de contacto	Rugosidad	PVA
Ángulo de contacto		0,8853	-0,7136
		0,0190*	0,1113
Rugosidad	0,8853		-0,9008
	0,0190*		0,0144*
PVA	-0,7136	-0,9005	
	0,1113	0,0144*	

4.2.5 Actividad antimicrobiana de las películas comestibles portadoras de natamicina y nisina

4.2.5.1 Estudio de la actividad de barrera de la película comestible conteniendo natamicina y nisina sobre un sistema modelo sólido

Distintos autores han evaluado las propiedades de barrera de la nisina y la natamicina soportada en diferentes matrices (Cong y col., 2007; Fajardo y col., 2010; Pintado y col., 2010; Ture y col., 2008). El presente ensayo es una adaptación del diseñado por Sanjurjo y col. (2006) y fue aplicado con el objetivo de poner a prueba la eficacia de las películas de almidón de mandioca conteniendo conjuntamente natamicina y nisina frente a una contaminación microbiológica postproceso. Los resultados obtenidos durante el almacenamiento a 25°C se presentan en la **Figura 4.2.7**.

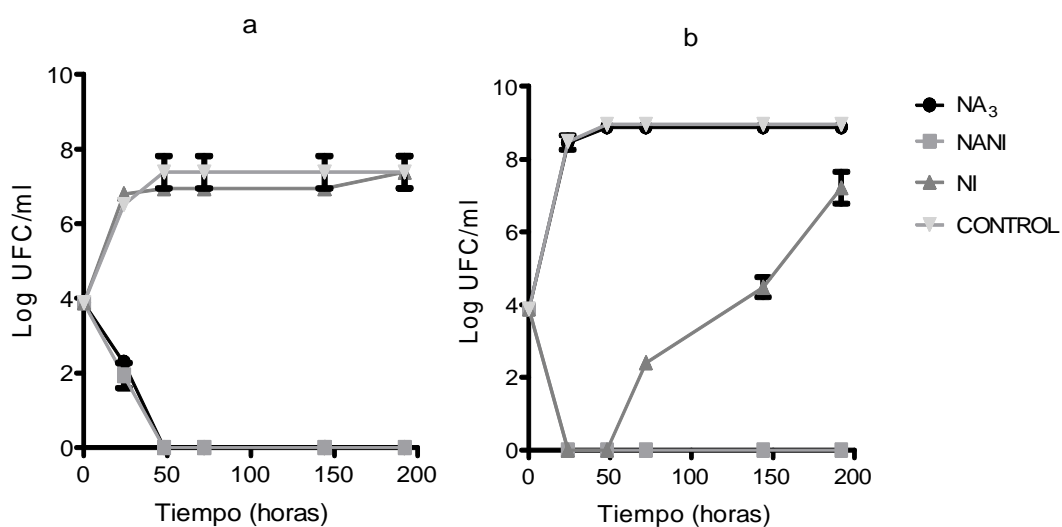


Figura 4.2.7: Efectividad de películas comestibles conteniendo natamicina (NA₃), nisina (NI) y su combinación (NANI), como barrera frente a una contaminación postproceso de un cultivo mixto, almacenado a 25°C. a: *Saccharomyces cerevisiae*, b: *Listeria innocua*.

Las películas control (CNA, CNANI y CNI) no mostraron actividad antimicrobiana. Por lo tanto, estas películas no son adecuadas para actuar como barrera frente a una contaminación externa mixta de *S. cerevisiae* y *L. innocua*. Debido a esto es que en la **Figura 4.2.7** se muestra la película CNANI a modo de ejemplo del comportamiento de las películas CONTROL.

La natamicina presente en las películas NA₃ y NANI fue eficaz para prevenir una contaminación postproceso de *S. cerevisiae* (**Figura 4.2.7a**) manteniendo un efecto fungicida a lo largo del almacenamiento evaluado (196 horas).

La película NI sólo fue efectiva como barrera frente a *L. innocua* durante las primeras 48 horas después de inoculación. Posteriormente, las bacterias reanudaron su crecimiento llegando al final del almacenamiento a una población similar a la película CONTROL (**Figura 4.2.7b**). La actividad de la nisina presente en la película NANI fue extremadamente eficaz como barrera para *L. innocua* (sin crecimiento hasta 196 horas) (**Figura 4.2.7b**); probablemente la presencia de natamicina esté afectando la red polimérica de la película permitiendo que la nisina se encuentre más biodisponible.

En este ensayo, adicionalmente, todas las películas con y sin antimicrobianos previnieron la contaminación del agar, no mostrando crecimiento. Por otra parte, es importante tener en cuenta que NA₃ y NANI inhibieron el crecimiento de *S. cerevisiae* y NI y NANI controlaron el crecimiento de *L. innocua* sobre la película actuando como barrera permitiendo al consumidor recibir un producto más seguro.

4.2.5.2 Estudio de la actividad de barrera de la película comestible conteniendo natamicina y nisina sobre un sistema modelo sólido, frente a contaminaciones durante el almacenamiento

El presente ensayo fue desarrollado con el objetivo de poner a prueba la eficacia de las películas de almidón de mandioca conteniendo natamicina y nisina frente a una contaminación microbiológica externa producida a los 5 días de almacenamiento posteriores a la elaboración de los alimentos. Los resultados obtenidos durante el almacenamiento a 25°C se muestran en la **Figura 4.2.8**.

De la misma manera que en el ensayo barrera frente a una contaminación inicial (apartado 4.2.5.1), las películas control (CNA, CNANI y CNI) no mostraron actividad en ninguna de las situaciones evaluadas en este ensayo. Por lo tanto, estas películas no son adecuadas para actuar como barrera frente a una contaminación postproceso de un cultivo mixto de *S. cerevisiae* y *L. innocua*. Debido a esto es que en la **Figura 4.2.8** se muestra el desempeño de la película CNANI como ejemplo de comportamiento de las películas CONTROL.

La natamicina presente en las películas NA₃ y NANI fue eficaz para prevenir una contaminación externa de *S. cerevisiae* cuando la inoculación se generó después de 5 días de almacenamiento a 25°C (**Figura 4.2.8a**). Igual tendencia se observó cuando la contaminación se produjo al inicio del almacenamiento (apartado 4.2.5.1).

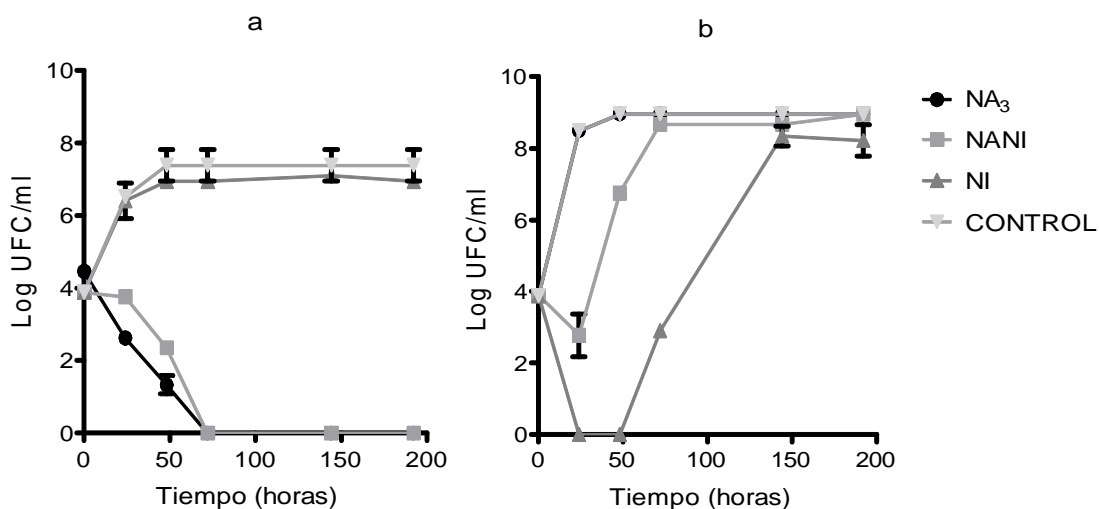


Figura 4.2.8: Efectividad de películas comestibles conteniendo natamicina (NA₃), nisina (NI) y su combinación (NANI), como barrera frente a una contaminación externa por cultivos mixtos después de 5 días de contacto de la película con el agar, almacenados a 25°C. a: *Saccharomyces cerevisiae* y b: *Listeria innocua*.

La película NI inoculada a los 5 días de almacenamiento tuvo un comportamiento similar al mostrado en el ensayo barrera frente a una contaminación inicial (apartado 4.2.5.1), siendo sólo efectiva como barrera frente a *L. innocua* durante las primeras 48 horas después de la inoculación. Sin embargo, la bacteria reanudó su crecimiento, llegando al final del almacenamiento con una población similar a la observada sobre la película CONTROL (**Figura 4.2.8b**).

Cuando la contaminación se generó después de 5 días de contacto se observó una reducción inicial de *L. innocua*, seguido por un posterior crecimiento. Este comportamiento muestra que la película NANI presentó una eficacia menor que la película NI (**Figura 4.2.8b**). Como ya se mencionó en el apartado 4.2.5.1, probablemente la presencia de natamicina afecte la red polimérica de la película permitiendo que la nisina se encuentre más biodisponible al inicio del almacenamiento. Sin embargo, este cambio de estructura también permitiría una mayor liberación de la nisina desde la película hacia el alimento modelo durante el almacenamiento, lo que determinaría una menor disponibilidad en la película a los 5 días de almacenamiento, tornándola de esta manera menos eficaz frente a la bacteria estudiada. Por lo tanto se puede concluir que la actividad de la nisina presente en la película NANI se vio afectada negativamente luego de 5 días de contacto con el alimento modelo.

Es de destacar que cuando se evaluó la presencia de microorganismos debajo de las películas en contacto con el alimento modelo, se observó que todas las películas con y sin antimicrobianos, previnieron la contaminación del agar.

4.2.5.3 Estudio de la liberación de natamicina y nisina desde la película hacia un sistema modelo sólido

El ensayo de difusión en agar se aplicó para estudiar la liberación de los antimicrobianos soportados en la película. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 4.2.8**. La observación de las placas conteniendo los discos de películas reveló la existencia de zonas claras alrededor de los mismos, hecho que mostró la actividad inhibidora ejercida por los antimicrobianos liberados desde la película al

sistema modelo. Esta actividad se cuantificó mediante la medición del diámetro de inhibición.

Tabla 4.2.8: Diámetro (cm) de las zonas de inhibición de los cultivos simples y mixtos generados a partir de películas comestibles conteniendo antimicrobianos (NA₃, NANI y NI).

	Cultivo mixto (<i>S. cerevisiae</i> + <i>L. innocua</i>)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. innocua</i>	
Agar YGC	3,25 ± 0,17 ^{a,A}	2,97 ± 0,17 ^{a,A}	S/C	NA₃ Película
Agar TSYE	3,15 ± 0,17 ^{a,A}	2,95 ± 0,17 ^{a,A}	S/H	
Agar TSYE_c	S/H	S/C	S/H	
Agar YGC	S/H	S/H	S/C	NI Película
Agar TSYE	1,95 ± 0,07 ^{b,A}	S/H	1,84 ± 0,07 ^{a,A}	
Agar TSYE_c	2,04 ± 0,40 ^{b,A}	S/C	1,84 ± 0,07 ^{a,A}	
Agar YGC	3 ± 0,07 ^{a,A}	2,85 ± 0,07 ^{a,A}	S/C	NANI Película
Agar TSYE	Doble halo: 3,05 ± 0,07 ^{a,A} y 1,85 ± 0,07 ^{b,A}	2,95 ± 0,07 ^{a,A}	1,85 ± 0,07 ^{a,A}	
Agar TSYE_c	2,25 ± 0,40 ^{b,A}	S/C	1,85 ± 0,07 ^{a,A}	

Película conteniendo natamicina: NA₃ o nisina: NI o natamicina y nisina: NANI.

S/C: sin crecimiento; S/H: sin halo. Diferentes letras minúsculas en la misma columna y diferentes letras mayúsculas en la misma fila indican diferencias significativas (p<0,05).

Los resultados obtenidos mostraron que las películas a base de almidón de mandioca sin antimicrobianos (CNA, CNI y CNANI) no presentaron halo de inhibición y tampoco inhibieron el desarrollo de microorganismos en la interfase película/medio. Esto indica que ni el almidón ni el glicerol ejercieron un efecto antimicrobiano. En contraste, la natamicina contenida en las películas NA₃ y liberada

en el agar (**Figura 4.2.9**), fue eficaz para inhibir el crecimiento de *S. cerevisiae* en cultivos simples y mixtos. Es de destacar que en el agar TSYE donde se sembró en superficie al cultivo mixto, por debajo del halo de inhibición de la levadura, se observó el crecimiento de bacterias, ya que éstas no fueron inhibidas por la natamicina liberada al medio. Estos resultados son similares a los informados por otros autores con diferentes matrices comestibles. Fajardo y col. (2010) mostraron que películas a base de quitosano tienen la capacidad de soportar y liberar natamicina. También Ramos y col. (2012) evaluaron la incorporación de natamicina en películas obtenidas a partir de proteína de suero; estos autores observaron que la natamicina mostró un fuerte efecto sobre *Y. lipolytica*.

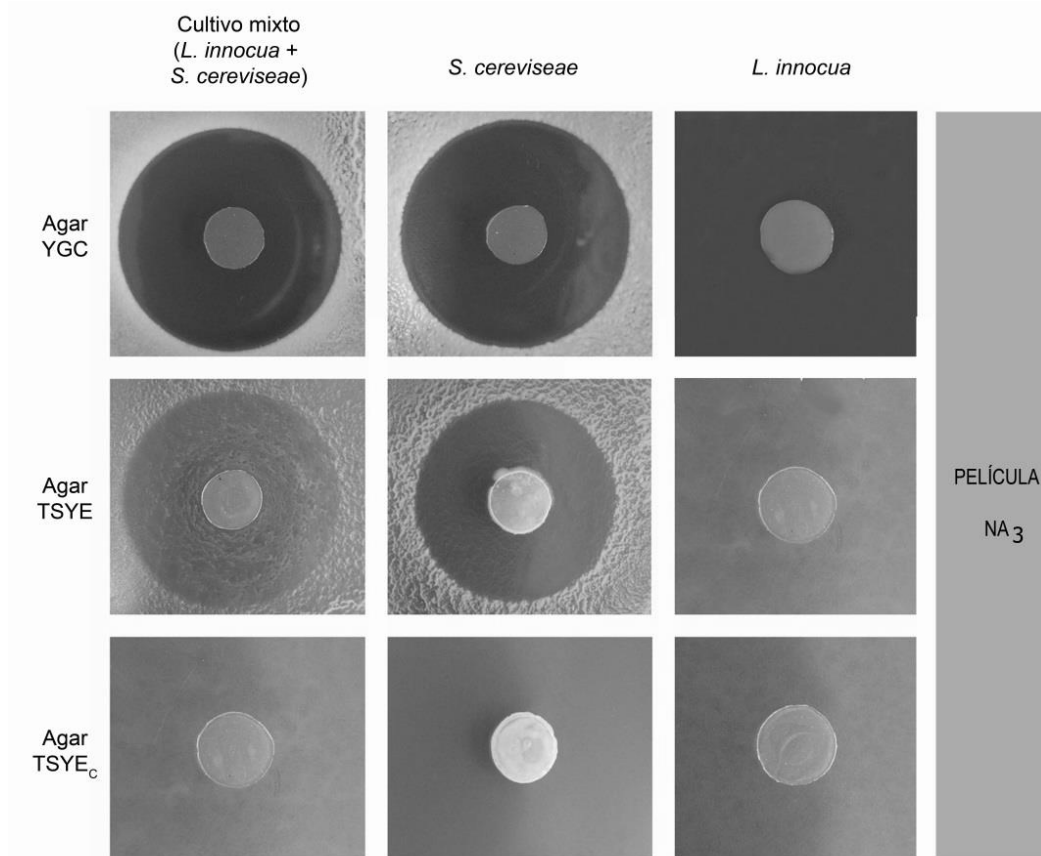


Figura 4.2.9: Ensayo de difusión en agar. Imágenes de las zonas de inhibición a escala real de los cultivos simples y mixtos generados a partir de la liberación de antimicrobianos contenidos en distintas películas: película conteniendo natamicina (NA₃).

La nisina contenida en las películas NI y liberada al agar (**Figura 4.2.10**) fue eficaz para inhibir el crecimiento de *L. innocua*, independientemente de la presencia de *S. cerevisiae*, ya que el halo del cultivo simple no mostró diferencias significativas con el del cultivo mixto. También se observó que en el agar TSYE, cuando fue sembrado el cultivo mixto, por debajo del halo de inhibición de las bacterias se desarrolló la levadura, ya que no fue inhibida por la nisina liberada en el medio. Basch y col. (2012) realizaron un ensayo de difusión en agar utilizando películas comestibles conteniendo nisina y tampoco observaron una zona de inhibición contra *Zygosaccharomyces bailii*.

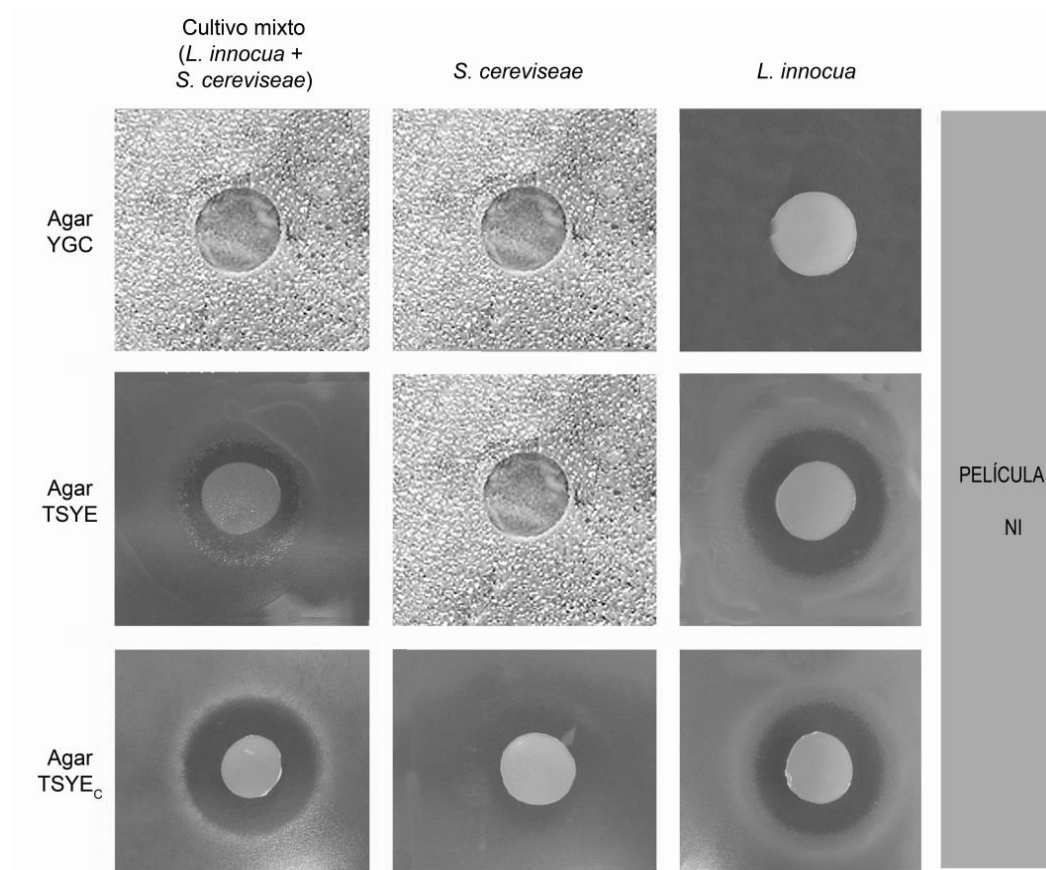


Figura 4.2.10: Ensayo de difusión en agar. Imágenes de las zonas de inhibición a escala real de los cultivos simples y mixtos generados a partir de la liberación de antimicrobianos contenidos en distintas películas: película conteniendo nisina (NI).

La película conteniendo nisina y natamicina (NANI) fue eficaz en la inhibición del crecimiento del cultivo simple de *S. cerevisiae* en los agares YGC y TSYE, y el diámetro de inhibición fue similar al observado con la película NA₃. Cuando la película combinada se evaluó en presencia de un cultivo mixto, en agar YGC y agar TSYE, el diámetro de inhibición de la levadura fue similar al observado cuando *S. cerevisiae* se encontraba presente como cultivo simple. La película NANI mostró inhibición contra *L. innocua*, mostrando un diámetro de 1,85 cm en los agares TSYE y TSYE_C en cultivos simples o mixtos y similar a la película NI (**Tabla 4.2.8**).

Cuando la película NANI se enfrentó a un cultivo mixto en agar TSYE (crecimiento sin restricciones de ambos microorganismos), se observaron dos diámetros (**Figura 4.2.11**). Se verificó que el más pequeño correspondía a la inhibición del crecimiento de *L. innocua* y el mayor al de *S. cerevisiae*. Ambos diámetros fueron similares a los observados cuando la bacteria y la levadura fueron probadas individualmente. A partir de este ensayo se puede concluir que la nisina y la natamicina son igualmente efectivas solas o combinadas entre sí a pesar de las peculiaridades reportadas para nisina en el ensayo de barrera (4.2.5.1 y 4.2.5.2).

Pintado y col. (2010) estudiaron el efecto de películas de proteína de suero conteniendo nisina y natamicina solas y en combinación, contra microorganismos aislados a partir de la superficie de queso. Estos autores observaron la formación de halos con tamaño similares a los obtenidos en el presente estudio y reportaron una diferencia nula entre las zonas de inhibición obtenidas con la nisina sola o en combinación con natamicina contra las bacterias estudiadas (*Listeria monocytogenes* y *Pseudomona aeruginosa*), o entre las zonas de inhibición obtenidas con la natamicina sola o en combinación con la nisina frente a la levadura y hongo estudiados (*Yarrowia lipolytica* y *Penicillium roqueforti*).

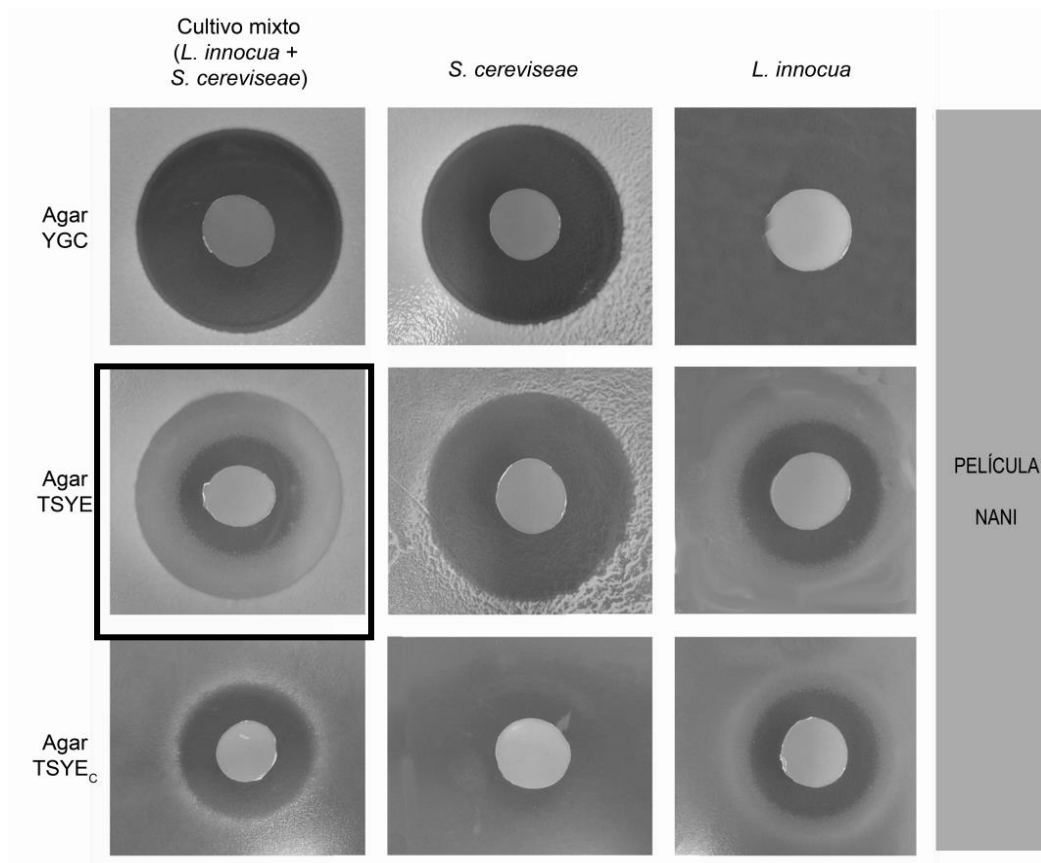


Figura 4.2.11: Ensayo de difusión en agar. Imágenes de las zonas de inhibición a escala real de los cultivos simples y mixtos generados a partir de la liberación de antimicrobianos contenidos en las películas: película natamicina y nisina (NANI).

4.2.5.4 Estudio de la actividad de barrera de la película comestible conteniendo natamicina y nisina sobre queso Por Salut

Para evaluar la actividad de barrera de películas comestibles, es necesario conocer si la película permite o no el paso de la contaminación hacia la matriz evaluada y si puede reducir o eliminar la contaminación que se produjo sobre su superficie durante el almacenamiento. Para ello, se debe evaluar el desarrollo microbiano sobre la película y en la matriz alimentaria cuando se produce una contaminación postproceso, de la misma manera que en el apartado 4.1.5.5.

En la **Figura 4.2.12a** se muestra la sobrevida de *S. cerevisiae* presente en un cultivo mixto inoculado sobre la superficie de distintas películas, colocadas sobre

trozos de queso Por Salut almacenados a 25°C. Las películas sin antimicrobianos (CNANI y COMERCIAL) permitieron el crecimiento de la levadura sobre su superficie. Por el contrario, se puede observar que la película conteniendo natamicina y nisina (NANI) tuvo un efecto fungicida desde las primeras 24 horas y hasta el final del almacenamiento (216 horas).

El análisis microbiológico del queso Por Salut utilizado en este ensayo se presenta en la **Figura 4.2.12b**. Se puede observar que el queso sin película inoculado (SP con inóculo) muestra un recuento inicial de 4 ciclos log de levaduras y el mismo incrementa su valor hasta llegar al final del almacenamiento a 7 ciclos log. El queso sin película y sin inocular (SP sin inóculo) muestra un recuento de levaduras inferior a 10 UFC/ml hasta las primeras 72 horas; sin embargo, luego reanuda el crecimiento hasta llegar al final del almacenamiento a 6 ciclos log, similar al queso SP con inóculo. Este resultado evidencia la presencia de flora nativa. Los quesos cubiertos con las películas COMERCIAL y CNANI mostraron un recuento de levaduras similar al queso sin película y sin inocular (SP sin inocular), indicando que estas películas no permitieron el pasaje de la levadura contaminante. Sin embargo no ejercieron ningún efecto antimicrobiano sobre la flora nativa presente en el queso evaluado. El queso cubierto con la película conteniendo natamicina y nisina (NANI) presentó un recuento inferior a 10 UFC/ml a lo largo de todo el ensayo, sin permitir el crecimiento de la flora nativa. El queso tratado con la aplicación directa de solución de natamicina y nisina (ADNANI) redujo el recuento de levaduras inmediatamente y mantuvo un recuento inferior a 10 UFC/ml hasta las 168 horas, reanudando finalmente su crecimiento alcanzando un valor de 2,5 ciclos log a las 216 horas.

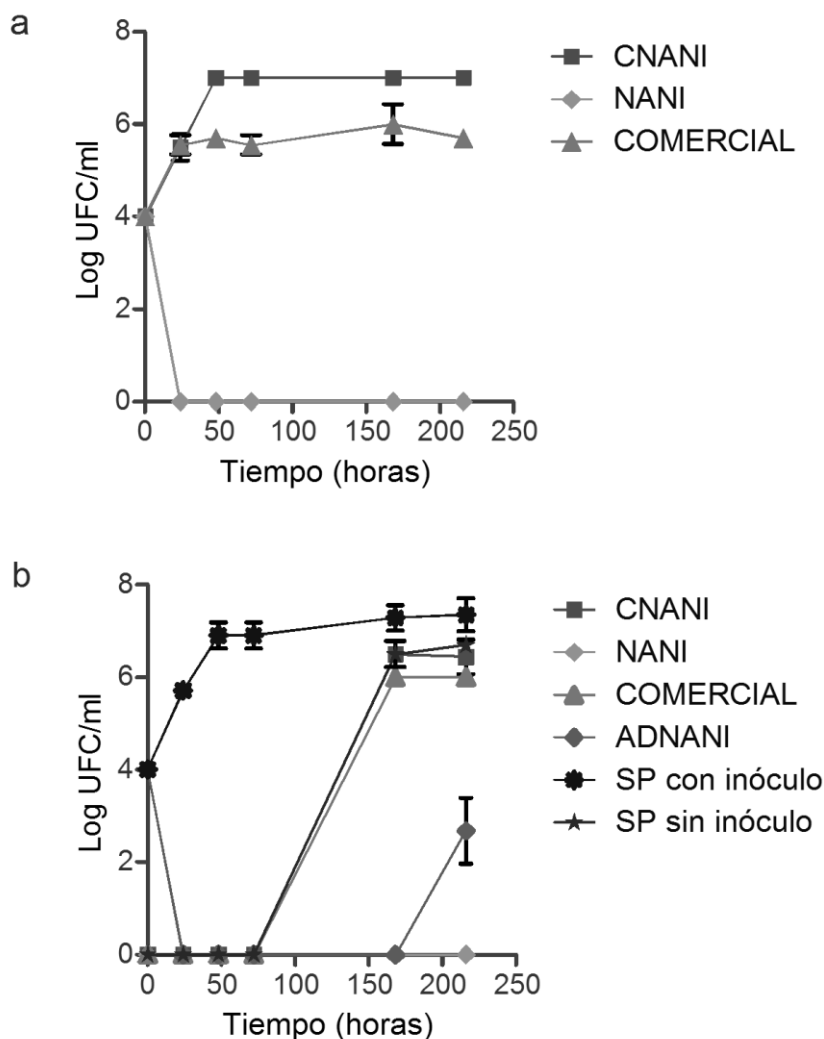


Figura 4.2.12: Ensayo de barrera sobre queso Por Salut frente a una contaminación externa de *Saccharomyces cerevisiae* presente en un cultivo mixto empleando películas comestible control (CNANI), conteniendo natamicina y nisina (NANI), comercial (COMERCIAL), aplicación directa con solución de natamicina y nisina (ADNANI), queso sin película (SP) con inóculo y sin inóculo, a: análisis microbiológico de las películas, b: análisis microbiológico del queso Por Salut.

En la **Figura 4.2.13a** se muestra la sobrevivencia de *L. innocua* presente en un cultivo mixto inoculado sobre la superficie de distintas películas, colocadas sobre trozos de queso Por Salut almacenados a 25°C. Las películas sin antimicrobianos

(CNANI y COMERCIAL) permitieron el crecimiento de *L. innocua* sobre su superficie, presentando un recuento de la bacteria de 7 ciclos log. Por el contrario, la película conteniendo natamicina y nisina (NANI) tuvo un efecto bactericida a lo largo de todo el almacenamiento.

El análisis microbiológico del queso Por Salut utilizado en este ensayo se muestra en la **Figura 4.2.13b**. Se puede observar que el queso sin película inoculado (SP con inóculo) muestra un recuento inicial de 4,5 ciclos log y el mismo incrementa su valor hasta llegar al final del almacenamiento a 7 ciclos log. El queso sin película y sin inocular (SP sin inóculo) muestra un recuento inferior a 10 UFC/ml a lo largo de todo el almacenamiento. Este resultado evidencia la buena calidad del queso, presentando ausencia de *Listeria* spp. Los quesos cubiertos con las películas COMERCIAL, CNANI y NANI mostraron un recuento de bacterias similar al queso sin película sin inocular (inferior a 10 UFC/ml a lo largo de todo el almacenamiento), indicando que estas películas no permitieron el pasaje de la bacteria contaminante. El queso tratado con la aplicación directa de natamicina y nisina (ADNANI) redujo el recuento de *L. innocua* inmediatamente y mantuvo su recuento inferior a 10 UFC/ml hasta las 48 horas de almacenamiento, reanudando luego su crecimiento alcanzando un valor de 3 ciclos log y manteniendo ese valor hasta el final del almacenamiento.

Estos resultados indican que todas las películas (comercial y comestible con y sin antimicrobianos) actuaron como barrera a una contaminación postproceso del queso Por Salut. Esto significa que en caso que se produzca una contaminación de este tipo, la presencia de estas películas impediría que el microorganismo contaminante acceda al alimento. Sin embargo, es de destacar que solo la película conteniendo ambos antimicrobianos (NANI) inhibió el desarrollo del cultivo mixto inoculado sobre la misma a lo largo de todo el almacenamiento. Adicionalmente, esta película inhibió el desarrollo de las levaduras originalmente presentes en el queso estudiado. Este resultado evidenció que la película NANI es un método sumamente efectivo para controlar la población de microorganismos presentes a ambos lados de la película es decir, entre la superficie del queso y la película y

sobre la superficie de la película, permitiendo ofrecer al consumidor un producto más seguro.

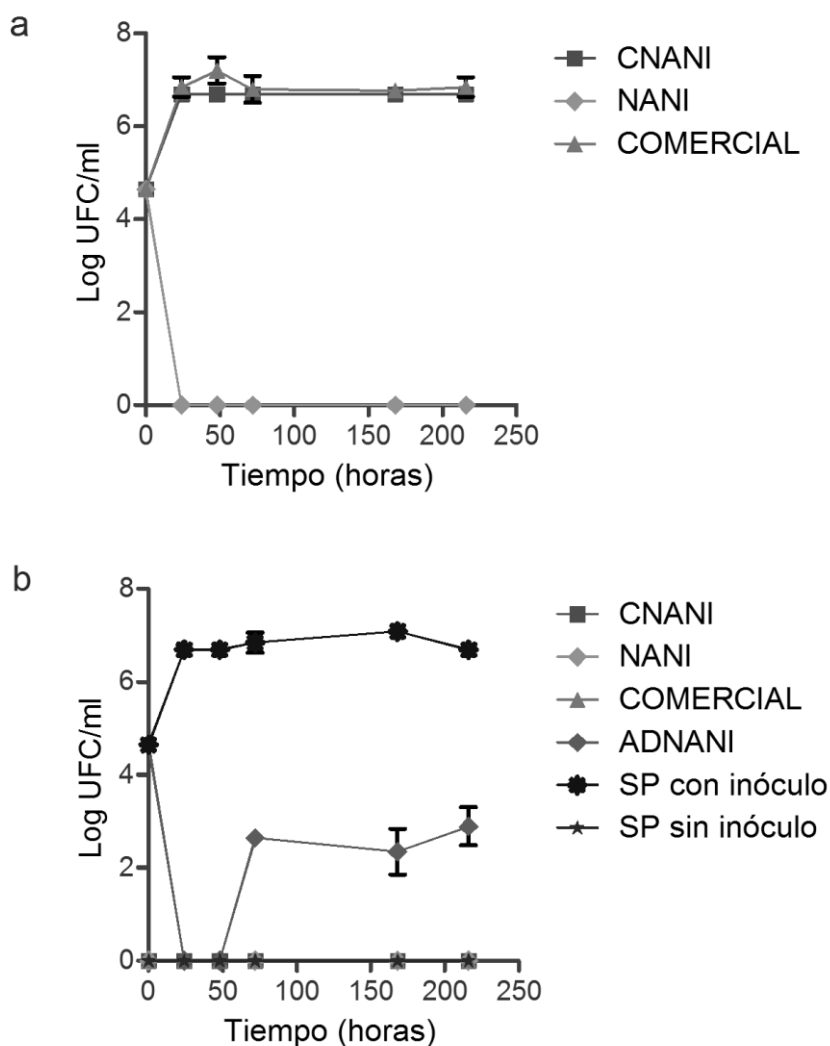


Figura 4.2.13: Ensayo de barrera sobre queso Por Salut frente a una contaminación externa de *Listeria innocua* presente en un cultivo mixto empleando películas comestible control (CNANI), conteniendo natamicina y nisina (NANI), comercial (COMERCIAL), aplicación directa de natamicina y nisina (ADNANI), queso sin película (SP) con inóculo y sin inóculo, a: análisis microbiológico de las películas evaluadas, b: análisis microbiológico del queso Por Salut.

Dado que las películas comestibles se consumen junto con el alimento, es importante que no se presente desarrollo microbiano sobre las mismas, lo cual destaca a NANI como película comestible adecuada. En el caso de la película comercial, la misma se retira en el momento del consumo del queso, pero este proceso puede producir la contaminación del alimento en cuestión si ella no tiene un adecuado estado microbiológico, por lo cual la capacidad de evitar el paso de microorganismos a través ella no es suficiente para asegurar la calidad microbiológica del queso.

4.2.5.5 Estudio de la liberación de natamicina y nisina desde la película hacia queso Por Salut

Uno de los métodos utilizados actualmente en la industria para la protección de la superficie de alimentos sólidos y semisólidos es la aplicación directa de antimicrobianos. Sin embargo, el compuesto generalmente exhibe una rápida pérdida de actividad debido a una reducción de su concentración activa resultante de la interacción o reacción con componentes de los alimentos (Pires y col., 2008). Por lo tanto, en el presente ensayo se buscó comparar la efectividad de las películas portadoras de antimicrobianos con su aplicación directa, sobre la superficie de un alimento sólido.

Los resultados obtenidos en los estudios de liberación de nisina y/o natamicina, presentes en películas comestibles o su aplicación directa y su efectividad frente a un cultivo mixto, presente en la superficie de queso Por Salut almacenado a 25°C, se muestran en la **Figura 4.2.14**. La respuesta de *S. cerevisiae* observada en la **Figura 4.2.14a** en el queso tratado con la película NI indicaría que la presencia de nisina no afectó el crecimiento de la levadura. También se puede observar que a las 24 horas, la presencia conjunta de natamicina y nisina (NANI y ADNANI) ejerció un efecto positivo, disminuyendo los recuentos iniciales de la levadura en 2 ciclos log, reasumiendo posteriormente el crecimiento. Al final del almacenamiento (196 horas) la presencia de natamicina (ADNA, ADNANI, NA₃ y NANI) redujo la población de *S. cerevisiae* llegando a 1,5 ciclos log aproximadamente por debajo de los sistemas

sin antimicótico (SOLO, ADNI y NI), siendo la película conteniendo ambos antimicrobianos (NANI) el tratamiento más eficaz.

Cuando se evaluó el crecimiento de *L. innocua*, se pudo observar que la aplicación directa de nisina (ADNI y ADNANI) produjo una disminución de sus recuentos a niveles inferiores a 10 UFC/ml a las 24 horas de almacenamiento (**Figura 4.2.14b**). Estas tendencias indicarían que la presencia de la natamicina no afectó la biodisponibilidad de la nisina.

Los quesos tratados exclusivamente con nisina (ADNI y NI) mostraron un recuento de la bacteria inferior a 10 UFC/ml a las primeras 24 horas de almacenamiento e inmediatamente después se observó un aumento de los recuentos llegando a 4 y 1 ciclos log respectivamente al finalizar el almacenamiento (196 horas).

Los quesos tratados con ambos antimicrobianos (ADNANI y NANI) presentaron recuentos de *L. innocua* inferiores a 10 UFC/ml hasta el final del almacenamiento, resultando en un excelente tratamiento para el control de esta bacteria. Es de destacar que NA₃ y ADNA mostraron inesperadamente un efecto bacteriostático sobre *L. innocua* en este cultivo mixto. Es sabido que *S. cerevisiae* responde al incremento de osmolaridad externa aumentando la síntesis de glicerol intracelular (Blomberg y Adler, 1992, Mager y Varela, 1993) con producción de etanol como metabolito secundario (Michnick y col., 1997). Teniendo en cuenta que la matriz alimenticia de este ensayo es queso y que el soporte de natamicina tiene una alta concentración de NaCl, se podría pensar que la osmolaridad del sistema daría lugar a la síntesis de etanol, el cual podría actuar como barrera adicional de estrés para la bacteria en los quesos tratados con natamicina (NA₃, ADNA, NANI y ADNANI) inhibiendo de esta manera el crecimiento de *L. innocua* presente en el cultivo mixto estudiado con mayor eficiencia que en los tratamientos ADNI y NI. Otros autores también han observado la sensibilidad de bacterias del género *Listeria* al etanol (Oh y Marshall, 1993).

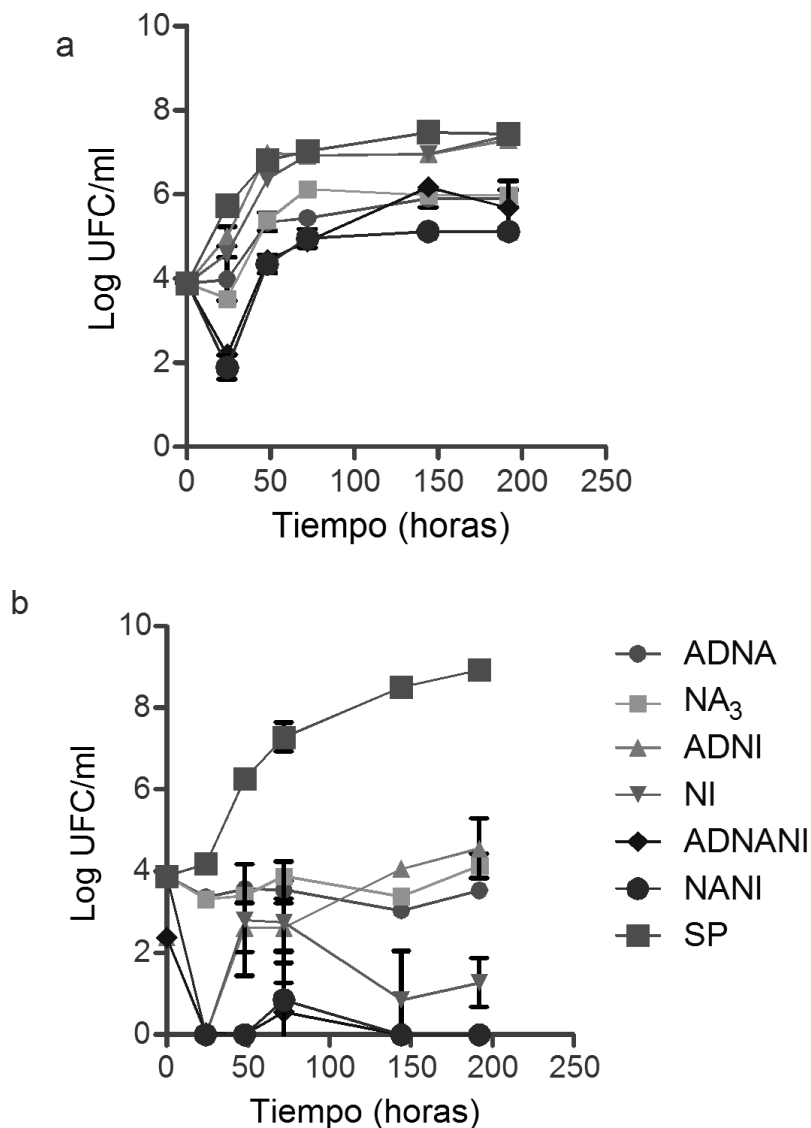


Figura 4.2.14: Crecimiento de cultivos mixtos presente sobre la superficie de queso Por Salut, durante el almacenamiento a 25°C, aplicación directa de antimicrobianos (ADNA, ADNI y ADNANI) o cubierto con películas comestibles conteniendo antimicrobianos (NA₃, NANI y NI) o sin cobertura (SP), a: *Saccharomyces cerevisiae*, b: *Listeria innocua*.

4.2.5.6 Estudio de la liberación de natamicina y/o nisina desde la película hacia distintos tipos de queso a temperatura de refrigeración

Con el objetivo de evaluar la incidencia de la matriz alimentaria en la liberación y consecuente efectividad de los antimicrobianos, este ensayo se realizó en quesos de distinta pasta.

Habitualmente el queso se encuentra refrigerado a 7°C, por lo tanto es interesante evaluar las propiedades microbiológicas de la película conteniendo ambos antimicrobianos a esta temperatura. Utilizando la misma metodología que la aplicada en el apartado 4.2.5.5, se estudió la liberación de los antimicrobianos desde la película NANI hacia queso de pasta blanda (Por Salut) en comparación con su aplicación directa (ADNANI) durante el almacenamiento a 7°C. A su vez, con el objetivo de establecer la eficiencia de esta película en otras matrices alimentarias, se evaluaron quesos de pasta semidura y pasta dura, en iguales condiciones.

En la **Figura 4.2.15a** se muestra el comportamiento de *S. cerevisiae* presente en un cultivo mixto sobre la superficie de queso de pasta blanda almacenado a 7°C, evaluado sin cobertura y tratado con aplicación directa de distintas soluciones antimicrobianas o cubierto con distintas películas. Los sistemas conteniendo natamicina (NANI y ADNANI) presentaron un efecto antimicrobiano menor que a 25°C. En este caso, se observa un efecto fungistático en los primeros 3 días de almacenamiento. Luego, *S. cerevisiae* reasumió su crecimiento, presentando a las 192 horas, un recuento 1,5 ciclos log inferior al obtenido en los sistemas sin antimicrobianos (CNANI y COMERCIAL). Si se compara la respuesta microbiológica del queso cubierto con la película conteniendo natamicina y nisina (NANI) respecto a la aplicación directa de natamicina y nisina (ADNANI), se observa que no presentan diferencias entre ellas, demostrando que no se modifica la biodisponibilidad de los antimicrobianos por encontrarse incorporados en la matriz de la película comestible, en comparación con la aplicación directa.

El comportamiento de *L. innocua* presente en el cultivo mixto estudiado sobre la superficie de queso de pasta blanda se observa en la **Figura 4.2.15b**. De la misma manera que ocurre con la levadura, los sistemas conteniendo nisina (NANI y ADNANI) presentaron un efecto antimicrobiano menor que a 25°C. La película NANI

provocó un efecto bactericida sobre *L. innocua* hasta los primeros 6 días, reasumiendo posteriormente su crecimiento y llegando a un valor de 4 ciclos log aproximadamente inferior a los sistemas CNANI y COMERCIAL. La aplicación directa (ADNANI) tuvo un efecto bacteriostático a lo largo de todo el ensayo manteniendo el valor inicial de 4 ciclos log. En cuanto a la actividad de la nisina, resulta interesante comparar la diferencia de comportamiento entre la película (NANI) y la aplicación directa (ADNANI). En el caso de ADNANI, el antimicrobiano pudo entrar en contacto inmediato con la matriz alimentaria. Las proteínas y lípidos presentes en el queso podrían interactuar con la nisina disminuyendo su efectividad. Por el contrario, la película estaría liberando lentamente la nisina, reduciendo esta interacción y estando así más biodisponible a lo largo del tiempo.

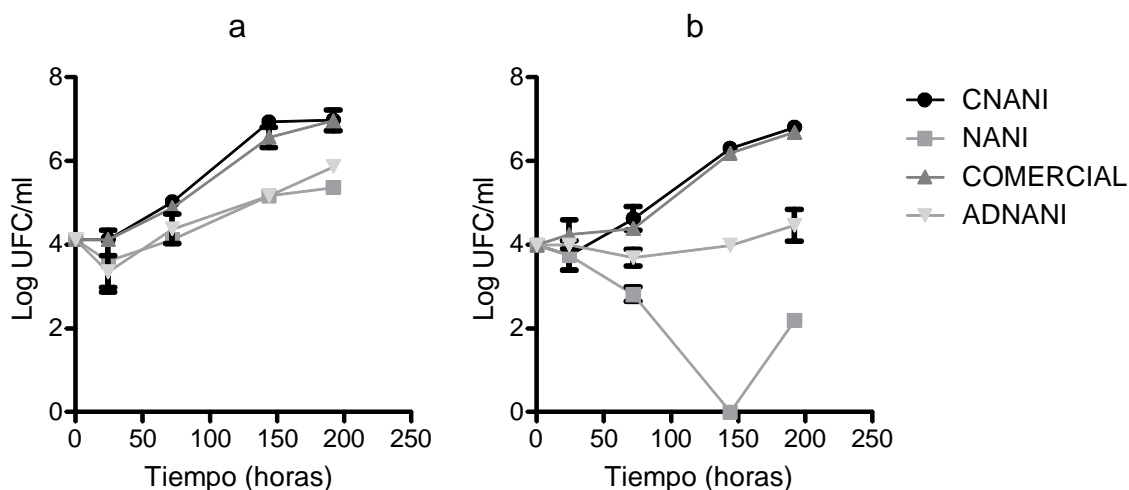


Figura 4.2.15: Crecimiento de cultivo mixto presente sobre la superficie de queso de pasta blanda, durante el almacenamiento a 7°C, cubierto con películas comestibles control (CNANI) o conteniendo antimicrobianos (NANI) o cubierto con película comercial (COMERCIAL) o aplicación directa de antimicrobianos (ADNANI); a: *Saccharomyces cerevisiae*, b: *Listeria innocua*.

Al analizar los resultados informados en las **Figuras 4.2.14** y **4.2.15** se puede concluir que la temperatura de almacenamiento del queso Por Salut inoculado con un cultivo mixto está afectando la respuesta observada. Esa influencia depende del balance entre distintos factores como por ejemplo la temperatura óptima de crecimiento para cada microorganismo, la actividad acuosa de la matriz que se está evaluando y su evolución durante el almacenamiento a cada temperatura, la difusión del antimicrobiano a cada temperatura.

A la temperatura de 7°C también se evaluaron quesos de pasta semidura y pasta dura con el objetivo de establecer la eficiencia de esta película en otras matrices lácteas.

El estudio sobre el queso de pasta semidura almacenado a 7°C se muestra en la **Figura 4.2.16**. La levadura *S. cerevisiae* presente en la superficie del queso (**Figura 4.2.16a**) no mostró sensibilidad diferencial entre la película NANI y la aplicación directa ADNANI. Ambos sistemas tuvieron efecto fungistático sobre la levadura las primeras 48 horas, luego la misma reasumió el crecimiento hasta llegar al final del almacenamiento a un valor de 2 ciclos log aproximadamente menor que los sistemas sin antimicrobianos (COMERCIAL y CNANI).

En la **Figura 4.2.16b** se muestran la respuesta de *L. innocua* presente en la superficie de queso de pasta semidura. Los tratamientos sin antimicrobianos no controlaron el desarrollo de la bacteria. Se pudo observar que la película NANI ejerció un efecto bactericida inmediato, presentando un recuento inferior a 10 UFC/ml a los 3 días de almacenamiento reasumiendo luego el crecimiento de la bacteria, llegando a 3 ciclos log inferior a los sistemas sin antimicrobianos (COMERCIAL y CNANI) al finalizar el almacenamiento. El sistema ADNANI presentó una reducción del recuento inicial de *L. innocua* de 1 ciclo log el primer día de almacenamiento, sin embargo, luego se incrementó el recuento de la bacteria a los valores iniciales manteniendo este valor hasta el final del almacenamiento.

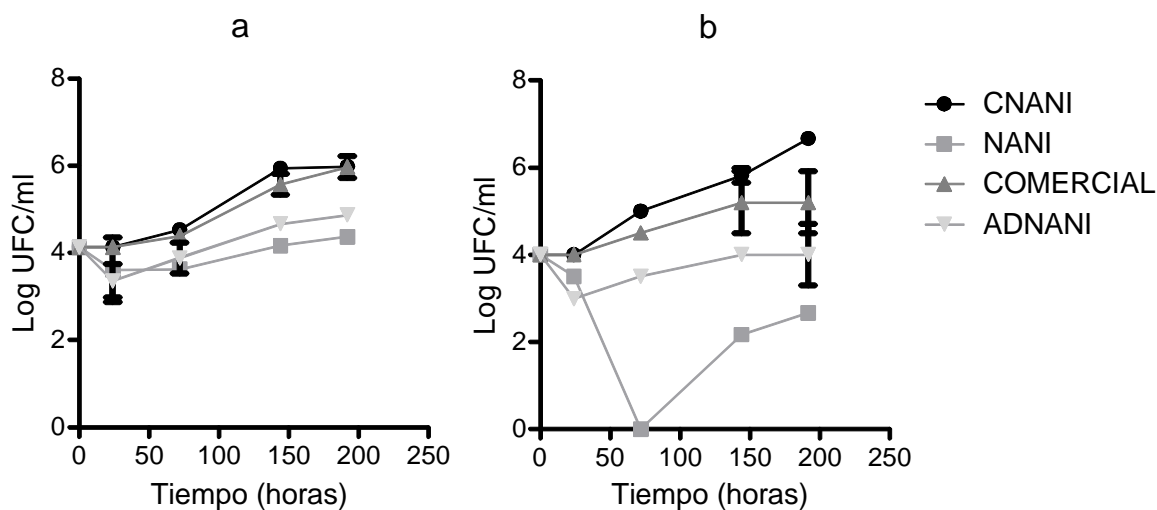


Figura 4.2.16: Crecimiento de cultivo mixto presente sobre la superficie de queso de pasta semidura inoculado con un cultivo mixto almacenado a 7°C, cubierto con películas comestibles control (CNANI) o conteniendo antimicrobianos (NANI) o cubierto con película comercial (COMERCIAL) o aplicación directa de antimicrobianos (ADNANI); a: *Saccharomyces cerevisiae* y b: *Listeria innocua*.

En la **Figura 4.2.17** se muestra la respuesta de los microorganismos presentes sobre el queso de pasta dura, sin cobertura y cubierto de distintas formas y almacenado a 7°C. La respuesta de *S. cerevisiae* se muestra en la **Figura 4.2.17a**; se observó que los sistemas con natamicina (NANI y ADNANI) ejercieron un efecto fungistático, en cambio los sistemas sin antimicrobianos (COMERCIAL y CNANI), permitieron un crecimiento de hasta 5,5 ciclos log de la levadura. Al final del almacenamiento los quesos cubiertos con NANI y ADNANI presentaron un recuento 1,5 ciclos log menor que los sistemas COMERCIAL y CNANI.

En la **Figura 4.2.17b** se muestra la respuesta de *L. innocua*, pudiéndose observar que los tratamientos NANI y ADNANI provocaron un efecto bactericida instantáneo presentando un recuento inferior a 10 UFC/ml. El queso cubierto con la película NANI mantuvo este valor hasta el final del almacenamiento; sin embargo, el queso con la aplicación directa ADNANI reasumió el crecimiento a los 6 días,

llegando a 3,5 ciclos log inferior al control al final del almacenamiento. Los quesos cubiertos con películas sin antimicrobianos mantuvieron el recuento inicial de *L. innocua* de 4 log UFC/ml hasta los 10 días de almacenamiento, probablemente como consecuencia de la baja humedad de este tipo de queso, lo cual presenta un factor de estrés para su desarrollo.

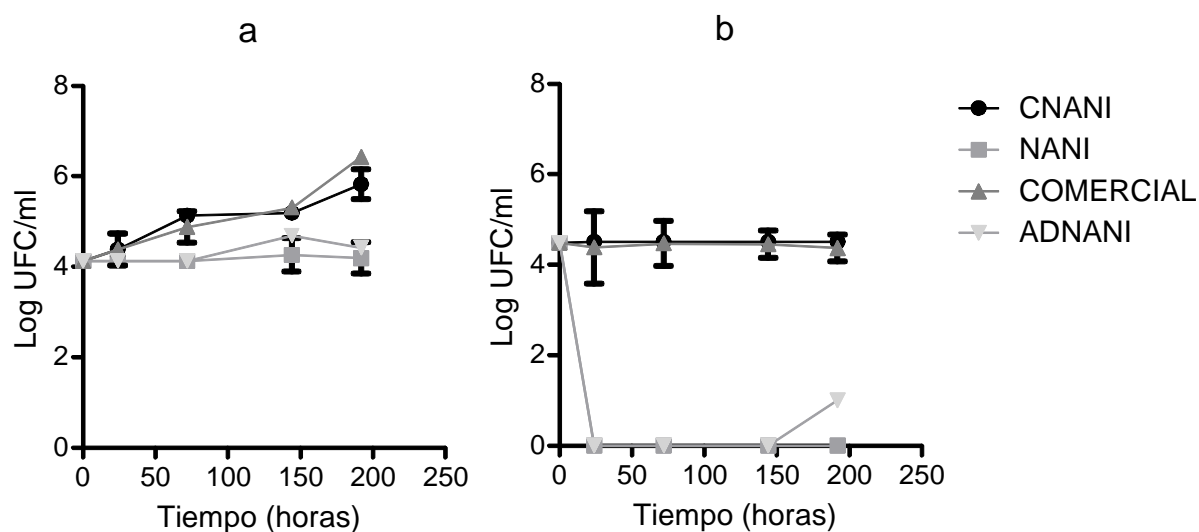


Figura 4.2.17: Crecimiento de cultivo mixto presente sobre la superficie de queso de pasta dura inoculado con un cultivo mixto almacenado a 7°C, cubierto con películas comestibles control (CNANI) o conteniendo antimicrobianos (NANI) o cubierto con película comercial (COMERCIAL) o aplicación directa de antimicrobianos (ADNANI); a: *Saccharomyces cerevisiae* y b: *Listeria innocua*.

Con el objetivo de analizar las tendencias observadas a 7°C para los tres quesos estudiados, se decidió realizar experiencias adicionales.

Las características del medio donde se encuentran los microorganismos tienen mucha influencia sobre su desarrollo y prevalencia. La presencia y disponibilidad de agua es uno de los factores más importantes que afectan dicho desarrollo. Esta disponibilidad puede cuantificarse a través de la actividad de agua (a_w). Un bajo nivel

de a_w limita el crecimiento de los microorganismos (Gunde-Cimerman y col., 2003). Por lo tanto, se evaluó la a_w inicial en queso Por Salut (pasta blanda), en queso Holanda (pasta semidura) y en queso Reggianito (pasta dura) para ayudar al análisis de los resultados previamente informados. Estos resultados se muestran en la **Tabla 4.2.9**.

Tabla 4.2.9: Actividad acuosa (a_w) inicial de los quesos estudiados.

	PASTA BLANDA	PASTA SEMIDURA	PASTA DURA
a_w inicial	$0,917 \pm 0,010^a$	$0,929 \pm 0,010^a$	$0,887 \pm 0,010^b$

Se informan la media y la desviación estándar. Distintas letras en una misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre quesos.

Con el fin de estudiar el comportamiento de los quesos durante el almacenamiento, se evaluó la actividad acuosa de los mismos cubiertos con distintas películas y sin cubrir, almacenados a 7°C durante 8 días (**Figura 4.2.18**). Los quesos de pasta blanda y semidura no presentaron variación de la a_w con el almacenamiento y tampoco con el tipo de tratamiento. Sin embargo, el queso de pasta dura mostró una a_w reducida luego de 8 días de almacenamiento, alcanzando al final del mismo un valor de 0,84, aproximadamente, en todos los sistemas evaluados (CNANI, NANI, COMERCIAL y SP), valor significativamente menor al inicial. La diferencia observada en la a_w del queso de pasta dura indicaría que las características composicionales y/o estructurales de su matriz favorecerían la pérdida de agua durante el almacenamiento.

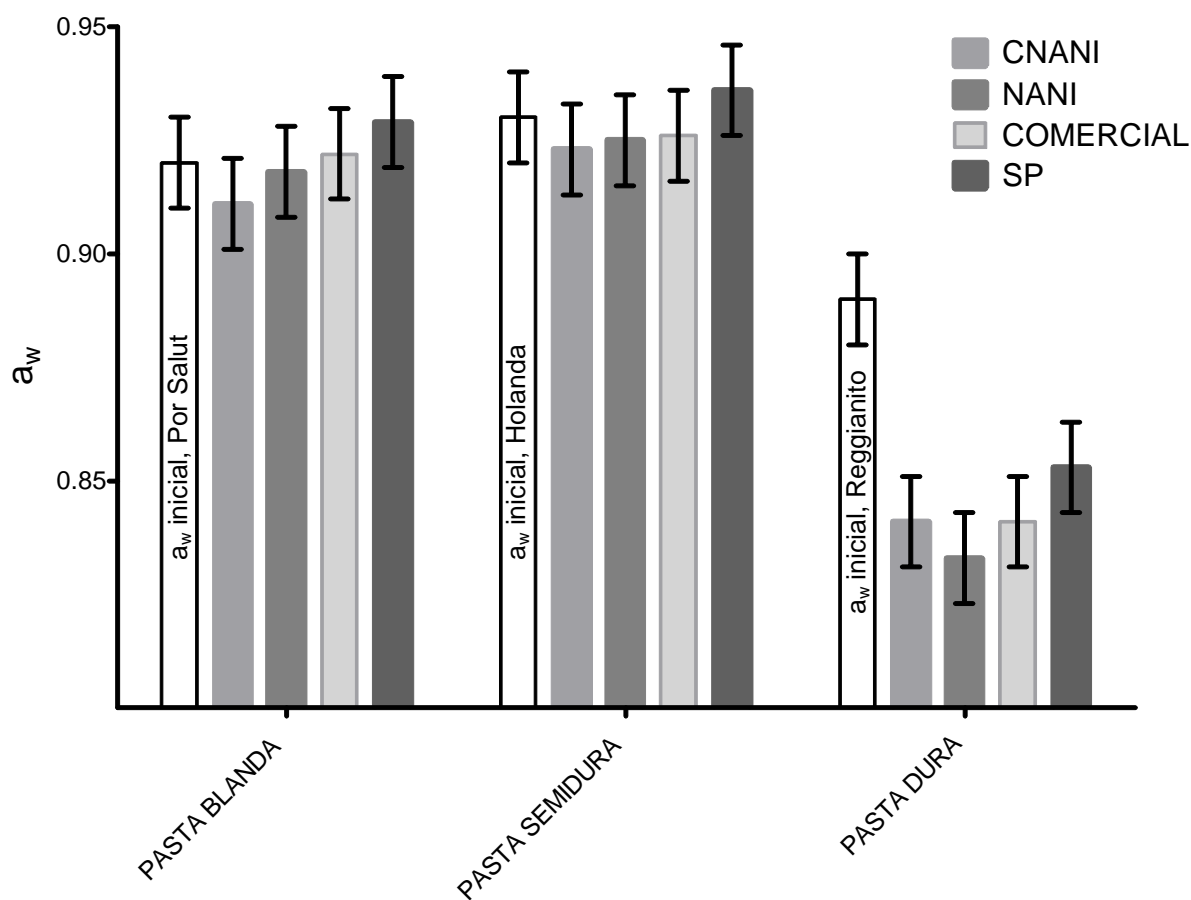


Figura 4.2.18: Actividad acuosa (a_w) de los distintos quesos estudiados a tiempo inicial y a los 8 días de almacenamiento a 7°C y cubiertos con película comestible control (CNANI), película comestible conteniendo antimicrobianos (NANI), película comercial (COMERCIAL) o sin cobertura (SP).

Al analizar los resultados informados en las **Figuras 4.2.15**, **Figura 4.2.16** y **Figura 4.2.17** se puede concluir que adicionalmente a las diferencias estructurales y composicionales de cada uno de los quesos, los cambios de la actividad acuosa a lo largo del almacenamiento, están afectando la respuesta observada, dando como resultado un menor crecimiento de ambos microorganismos en el queso duro el cual presenta una menor a_w al cabo del almacenamiento (**Figura 4.2.18**).

4.2.2 Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran que:

- ✓ En sistemas líquidos modelo, la natamicina presentó un efecto fungistático frente a *Saccharomyces cerevisiae* y la nisina, un efecto bacteriostático frente a *Listeria innocua*, estando presentes en forma de cultivo mixto. Por lo tanto, estos resultados indican que ambos antimicrobianos naturales pueden ser utilizados potencialmente para el control de cultivos mixtos en sistemas alimentarios líquidos.
- ✓ Es posible formular películas comestibles a base de almidón de mandioca conteniendo natamicina y nisina. Las que presentaron mayores cambios en las propiedades físico-químicas estudiadas fueron las películas conteniendo nisina (NI y NANI), mostrando el menor esfuerzo y la mayor deformación a la rotura. También se observó un aumento del índice de amarillo de estas películas, especialmente en las películas con los dos antimicrobianos.
- ✓ Las películas conteniendo nisina (NI y NANI) presentaron un aumento en la rugosidad de sus superficies respecto a las películas sin antimicrobiano. Adicionalmente mostraron un mayor ángulo de contacto, presentando por lo tanto un comportamiento más hidrofóbico. La menor hidrofiliidad de estas películas determinada por la presencia de nisina es una característica interesante que puede contribuir a su utilización en alimentos con mayor contenido de lípidos.
- ✓ El aumento en el contenido de glicerol afectó las propiedades mecánicas de las películas estudiadas, tornándolas más plásticas. También se observó un aumento de la permeabilidad al vapor de agua y una reducción de la rugosidad de la superficie de las películas.
- ✓ Se observó una correlación significativa entre la rugosidad y el ángulo de contacto, y la rugosidad y la permeabilidad al vapor de agua, mostrando que la

hidrofilicidad y las propiedades de barrera se ven afectadas por la morfología de la superficie, que está determinada por la composición de las películas.

- ✓ La natamicina y la nisina contenidas simultáneamente en las películas ejercieron un importante efecto de barrera, impidiendo la contaminación del sistema modelo sólido. Adicionalmente, las películas conteniendo natamicina (NA₃ y NANI) inhibieron el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y las películas conteniendo nisina (NI y NANI) controlaron el crecimiento de *Listeria innocua* sobre la superficie de las mismas, permitiendo que el consumidor reciba un producto más seguro. A su vez, la natamicina se encontró biodisponible incluso cuando la contaminación se produjo cinco días después de la aplicación de las películas (NA₃ y NANI) sobre el modelo alimentario, mostrando la funcionalidad de las mismas a lo largo del tiempo. Sin embargo, los cambios ocurridos en la película NANI durante los 5 días de contacto afectaron negativamente la biodisponibilidad de la nisina en esta película, permaneciendo sin cambios durante las primeras 48 horas y luego disminuyendo su efectividad.
- ✓ La natamicina y la nisina contenidas simultáneamente en las películas difundieron hacia el sistema alimentario modelo sólido estudiado, afectando el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y de *Listeria innocua*, siendo igualmente efectivas solas o combinadas entre sí. En presencia de un cultivo mixto, únicamente la película conteniendo simultáneamente nisina y natamicina presentó un halo sin crecimiento de microorganismos sobre un agar sin restricciones.
- ✓ La película conteniendo ambos antimicrobianos (NANI) fue efectiva como barrera inhibiendo el desarrollo de un cultivo mixto inoculado sobre la misma, a lo largo de todo el almacenamiento de queso Por Salut. Adicionalmente, esta película inhibió el desarrollo de las levaduras originalmente presentes en el queso estudiado. Este resultado evidenció que la película NANI es un método

sumamente efectivo para controlar la población de microorganismos presentes a ambos lados de la película es decir, entre la superficie del queso y la película y sobre la superficie de la película, permitiendo ofrecer al consumidor un producto más seguro.

- ✓ Las películas desarrolladas conteniendo natamicina y nisina controlaron el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* e inhibieron el crecimiento de *Listeria innocua*, presentes conjuntamente en la superficie de queso Por Salut. La temperatura de almacenamiento influyó en los resultados obtenidos.
- ✓ La película conteniendo ambos antimicrobianos fue efectiva para el control de un cultivo mixto presente en la superficie de quesos de pasta blanda, semidura o dura. La actividad acuosa de los quesos condicionó el grado de efectividad.

Estos resultados indican que la incorporación de nisina y natamicina conjuntamente en matrices de almidón de mandioca puede ser utilizada para controlar la contaminación por un cultivo mixto, constituido por *S. cerevisiae* y *L. innocua*, en un sistema modelo alimentario y en distintos tipos de queso. Por lo tanto, esta matriz biopolimérica tiene un gran potencial para ser usada como estrategia para el soporte de los antimicrobianos estudiados con el objetivo de prolongar la vida útil en quesos.

5. CONCLUSIONES GENERALES

✓ En esta investigación fue posible desarrollar matrices biopoliméricas capaces de soportar los antimicrobianos natamicina y/o nisina, con adecuadas propiedades estructurales, mecánicas, físico-químicas y de superficie. La composición de las mismas en lo referente al contenido de glicerol y a la presencia de los antimicrobianos, condicionó fuertemente las propiedades previamente nombradas.

✓ Las películas biopoliméricas constituidas a base de almidón de mandioca y conteniendo natamicina fueron efectivas para reducir la contaminación de *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii* y *Yarrowia lipolytica*, previa al envasado del queso, como así también la producida postproceso sobre el recubrimiento/embalaje del queso.

✓ Las películas biopoliméricas constituidas a base de almidón de mandioca conteniendo natamicina y nisina en forma conjunta, fueron efectivas para reducir la contaminación de una población mixta de *Saccharomyces cerevisiae* y *Listeria innocua* producida previa al envasado del queso, como así también la producida postproceso sobre el recubrimiento/embalaje del queso.

✓ Las películas conteniendo natamicina o natamicina y nisina son una mejora, respecto al agregado directo de los antimicrobianos, en el control de levaduras o cultivo mixto de *Saccharomyces cerevisiae* y *Listeria innocua* respectivamente.

Por lo tanto la incorporación de natamicina y nisina en matrices de almidón de mandioca, puede ser utilizada para controlar la contaminación de un sistema alimentario modelo sólido y de queso, presentando estas películas un gran potencial para ser utilizadas como factor de estrés adicional en la preservación de alimentos, aumentando la eficiencia de los antimicrobianos, permitiendo así disminuir la concentración necesaria de los mismos. Adicionalmente, su efecto como barrera,

permitiría en el futuro considerar su combinación con materiales de empaquetamiento tradicionales con el objetivo de contribuir a la disminución de la cantidad de desechos provenientes de materiales derivados del petróleo que afectan la calidad del medio ambiente.

6. REFERENCIAS

- AAM. (1999). Food safety: current status and future needs. *Washington DC, American Academy of Microbiology*.
- Ahmadi, R., Kalbasi-Ashtari, A., Oromiehie, A., Yarmand, M., & Jahandideh, F. (2012). Development and characterization of a novel biodegradable edible film obtained from psyllium seed (*Plantago ovata* Forsk). *Journal of Food Engineering*, 109(4), 745–751.
- Allerberger, F. (2003). *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 35(3), 183–189.
- Álvarez-Martín, P., Flórez, A., López-Díaz, T., & Mayo, B. (2007). Phenotypic and molecular identification of yeast species associated with Spanish blue-veined Cabrales cheese. *International Dairy Journal*, 17(8), 961–967.
- Angelidis, A., Boutsouki, P., & Papageorgiou, D. (2010). Loss of viability of *Listeria monocytogenes* in contaminated processed cheese during storage at 4, 12 and 22°C. *Food Microbiology*, 27(6), 809–818.
- Anker, M., Stading, M., & Hermansson, A. (2000). Relationship between the microstructure and the mechanical and barrier properties of whey protein films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3806–3816.
- Araujo-Farro, P., Podadera, G., Sobral, P., & Menegalli, F. (2010). Development of films based on quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willdenow) starch. *Carbohydrate Polymers*, 81(4), 839–848.
- Arzate-Vázquez, I., Chanona-Pérez, J., Calderón-Domínguez, G., Terres-Rojas, E., Garibay-Febles, V., Martínez-Rivas, A., & Gutiérrez-López, G. (2012). Microstructural characterization of chitosan and alginate films by microscopy techniques and texture image analysis. *Carbohydrate Polymers*, 87, 289–299.
- ASTM D1925, A. (1988). Standard Test Method for Yellowness Index of Plastics. *Philadelphia: American Society for Testing and Materials*.
- ASTM E96-00. (2000). Standard test method for water vapour transmission of materials. *American Society for Testing and Materials, Philadelphia (2000)*.
- Athar, A., & Winner, H. (1971). Development of resistance by *Candida* species to polyene antibiotics in vitro. *Journal of Med Microbiology*, 4, 505–517.
- Banerjee, R., & Chen, H. (1995). Functional properties of edible films using whey protein concentrate. *Journal of Dairy Science*, 78(8), 1673–1683.

- Barnett, J., Payne, R., & Yarrow, D. (2000). *Yeasts: characteristics and identification* (Press, Cam.). Cambridge University.
- Basch, C., Carpenco, J., Jagus, R., & Flores, S. (2011). Individual and combined performance of nisin and potassium sorbate supported in tapioca starch edible films. *Proceedings of the 11th. International Congress on Engineering and Food (ICEF 11)*, 2, 979–980.
- Basch, C., Jagus, R., & Flores, S. (2013). Physical and antimicrobial properties of tapioca Starch-HPMC edible films incorporated with nisin and/or potassium sorbate. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 2419–2428.
- Belanger, P., Nast, C., Fratti, R., Sanati, H., & Ghannoum, M. (1997). Voriconazole (UK-109,496) inhibits the growth and alters the morphology of fluconazole-susceptible and -resistant *Candida* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(8), 1840–1844.
- Benkerroum, N., & Sandine, W. (1988). Inhibitory Action of Nisin Against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science*, 71(12), 3237–3245.
- Beresford, T., Fitzsimons, N., Brennan, N., & Cogan, T. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11, 259–274.
- Betts, G., Linton, P., & Betteridge, R. (2000). Synergistic effect of sodium chloride, temperature and pH on growth of a cocktail of spoilage yeasts: a research note. *Food Control*, 17, 47–52.
- Białecka-Florjan, E., & Florjan, Z. (2007). *Solubility of Plasticizers, Polymers and Environmental Pollution*. (T. Letcher, Ed.) (pp. 397–407). New York.
- Bico, J., Thiele, U., & Quéré, D. (2002). Wetting of textured surfaces. *Colloids and Surfaces*, 206, 41–46.
- Bierhalz, A., da Silva, M., de Sousa, H., Braga, M., & Kieckbusch, T. (2013). Influence of natamycin loading methods on the physical characteristics of alginate active films. *The Journal of Supercritical Fluids*, 76, 74–82.
- Bierhalz, A., da Silva, M., & Kieckbusch, T. (2012). Natamycin release from alginate/pectin films for food packaging applications. *Journal of Food Engineering*, 110(1), 18–25.
- Blomberg, A., & Adler, L. (1992). Physiology of osmotolerance in fungi. *Advances in Microbial Physiology*, 33, 145–212.
- Bosquez-Molina, E., Tomás, S. a., & Rodríguez-Huezo, M. E. (2010). Influence of CaCl₂ on the water vapor permeability and the surface morphology of mesquite

- gum based edible films. *LWT - Food Science and Technology*, 43(9), 1419–1425.
- Bradley, R., & Vanderwarn, M. (2001). Determination of moisture in cheese and cheese products. *Journal of AOAC International*, 84(2), 570–92.
- Breukink, E., van Kraaij, C., Demel, R., Siezen, R., Kuipers, O., & de Kruijff, B. (1997). The C-terminal region of nisin is responsible for the initial interaction of nisin with the target membrane. *Biochemistry*, 36(23), 6968–6976.
- Breukink, E., Wiedemann, I., Van Kraaij, C., Kuipers, O., Sahl, H., & De Kruijff, B. (1999). Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science*, 278, 2361–2364.
- Brötz, H., Josten, M., Wiedemann, I., Schneider, U., Götz, F., Bierbaum, G., & Sahl, H. G. (1998). Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Molecular Microbiology*, 30(2), 317–327.
- Brotz, H., & Sahl, H. (2000). New insights into the mechanism of action of lantibiotics — diverse biological effects by binding to the same molecular target. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46, 1–6.
- Buchrieser, C., Rusniok, C., Kunst, F., Cossart, P., & Glaser, P. (2003). Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* : clues for evolution and pathogenicity. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 35(3), 207–213.
- CAA. (2010). Alimentos lácteos. In *CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO* (p. Artículos 553 al 642).
- CAA. (2014). Aditivos Alimentarios. In *CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO* (p. Artículos: 1391 al 1406).
- Cagri, A., Ustunol, Z., & Ryser, E. (2004). Antimicrobial edible films and coatings. *Journal of Food Protection*, 67(4), 833–848.
- Campos, C., Gerschenson, L., & Silvia, S. (2011). Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. *Journal of Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 849–875.
- Cao, N., Yang, X., & Fu, Y. (2009). Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 729–735.

- Capitan Vallvey, L. (2000). Rapid Ultraviolet Spectrophotometric and Liquid Chromatographic Methods for the Determination of Natamycin in Lactoserum Matrix. *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL*, 83(4), 802–808.
- Carneiro-da-Cunha, M., Cerqueira, M., Souza, B., Souza, M., Teixeira, J., & Vicente, A. (2009). Physical properties of edible coatings and films made with a polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. *Journal of Food Engineering*, 95(3), 379–385.
- Cerqueira, M., Lima, A., Souza, B., Teixeira, J., Moreira, R., & Vicente, A. (2009). Functional polysaccharides as edible coatings for cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1456–1462.
- Cerrutti, P., & Alzamora, S. (1996). Inhibitory effects of vanillin on some food spoilage yeasts in laboratory media and fruit purées. *International Journal of Food Microbiology*, 29, 379–386.
- Chen, H. (1995). Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 78(11), 2563–2583.
- Chillo, S., Flores, S., Mastromatteo, M., Conte, A., Gerschenson, L., & Del Nobile, M. (2008). Influence of glycerol and chitosan on tapioca starch-based edible film properties. *Journal of Food Engineering*, 88(2), 159–168.
- Choi, W., & Han, J. (2002). Film-forming Mechanism and Heat Denaturation Effects on the Physical and Chemical Properties of Pea-Protein-Isolate Edible Films. *Journal of Food Science*, 67(4), 1399–1406.
- Coma, V., Martial-Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., Salin, F., & Deschamps, A. (2002). Edible Antimicrobial Films Based on Chitosan Matrix. *Journal of Food Science*, 67(3), 636–848.
- Cong, F., Zhang, Y., & Dong, W. (2007). Use of surface coatings with natamycin to improve the storability of Hami melon at ambient temperature. *Postharvest Biology and Technology*, 46(1), 71–75.
- Corbo, M., Bevilacqua, A., Campaniello, D., D'Amato, D., Speranza, B., & Sinigaglia, M. (2009). Prolonging microbial shelf life of foods through the use of natural compounds and non-thermal approaches - a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(2), 223–241.
- Corbo, M. R., Speranza, B., Filippone, A., Granatiero, S., Conte, A., Sinigaglia, M., & Del Nobile, M. a. (2008). Study on the synergic effect of natural compounds on the microbial quality decay of packed fish hamburger. *International Journal of Food Microbiology*, 127(3), 261–267.

- Cruz Rui, M., Vieira, M., Silva, C., & Cruz, R. (2007). Modelling kinetics of watercress (*Nasturtium officinale*) colour changes due to heat and thermosonication treatments. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(2), 244–252.
- Davidson, P., Critzer, F., & Taylor, T. (2013). Naturally occurring antimicrobials for minimally processed foods. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4, 163–190.
- De Boer, E., & Stolk-Horsthuis, M. (1977). Sensitivity to natamycin (pimaricin) of fungi isolated in cheese warehouses. *Journal of Food Protection*, 40, 533–536.
- De Buyser, M., Dufour, B., & Maire, M. (2001). Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *International Journal of Food Microbiology*, 67(1-2), 1–17.
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J., & Voilley, A. (1998). Edible films and coatings: tomorrow's packagings: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(4), 299–313.
- Del Nobile, M. a, Di Benedetto, N., Suriano, N., Conte, A., Lamacchia, C., Corbo, M. R., ... Benedetto, Nd. (2009). Use of natural compounds to improve the microbial stability of Amaranth-based homemade fresh pasta. *Food Microbiology*, 26(2), 151–156.
- Delves-Broughton, J. (2005). Nisin as a food preservative. *Food Australia*, 57, 525–527.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R., & Hugenholtz, J. (1996). Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69, 193–202.
- Donhowe, I., & Fennema, O. (1994). Edible films and coatings: characteristics, formation, definitions, and testing methods. In *Edible coatings and films to improve food quality* (pp. 1–24).
- Doyle, M., Beuchat, L., & Montville, T. (2001). *Food microbiology. Fundamentals and frontiers*. Washinton DC: American Society for Microbiology.
- Edwards, M., Osborne, B., & Henry, R. (2008). Effect of endosperm starch granule size distribution on milling yield in hard wheat. *Journal of Cereal Science*, 48(1), 180–192.
- El-Diasty, E., El-Kaseh, R., & Salem, R. (2008). The effect of natamycin on keeping quality and organoleptic characters of yoghurt. *Arab Journal of Biotechnology*, 12(1), 41–48.
- Eliasson, A. (2004). *Starch in food: Structure, function and applications*. (A. Eliasson, Ed.). CRC press.

- Elmi, M. (2004). Food safety : current situation , unaddressed issues and the. *La Revue de Santé de La Méditerranée Orientale*, 10(6), 794–800.
- Elofsson, C., Dejmek, P., Paulsson, M., & Burling, H. (1997). Characterization of a Cold-Gelling Whey Protein Concentrate. *International Dairy Journal*, 7(8-9), 601–608.
- Escamilla-García, M., Farrera-Rebollo, R., Martínez-Rivas, A., & Calderón-Domínguez, G. (2012). Characterization of carbohydrate-protein edible films using nano- technology. *Wcigr.ageng*.
- Fabec, B., Hellstrom, T., Henrysdotter, G., Hjulmand-Lassen, M., Nilsson, J., Rüdinger, L., ... Tuomala, V. (2000). Active and intelligent food Packaging. A Nordic report on the legislative aspects. In *Nordic co-operation* (pp. 21–22).
- Fajardo, P., Martins, J., Fuciños, C., Pastrana, L., Teixeira, J., & Vicente, A. (2010). Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. *Journal of Food Engineering*, 101, 349–356.
- Famá, L., Flores, S., Gerschenson, L., & Goyanes, S. (2006). Physical characterization of cassava starch biofilms with special reference to dynamic mechanical properties at low temperatures. *Carbohydrate Polymers*, 66(1), 8–15.
- Famá, L., Rojas, A., Goyanes, S., & Gerschenson, L. (2005). Mechanical properties of tapioca-starch edible films containing sorbates. *LWT - Food Science and Technology*, 38(6), 631–639.
- Fang, T., Chang, W., & Weng, C. (2005). Surface analysis of nanomachined films using atomic force microscopy. *Materials Chemistry and Physics*, 92, 379–383.
- FAO. (2004). Food and Agriculture Organization. *Proceedings of the Validation Forum on the Global Cassava Development Strategy. In: Global Cassava Market Study Business Opportunities for the Use of Cassava*, 6.
- FAO, W. (2003). Assuring food safety and quality: guidelines for strengthening national food control systems. *Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization*.
- FDA. (2006). Food additives permitted for direct addition to food for human consumption. *Coatings, Films and Related Substances*.
- Fernández, M., Jagus, R., & Mugliaroli, S. (2014). Effect of combined natural antimicrobials on spoilage microorganisms and *Listeria innocua* in a whey cheese “ricotta.” *Food and Bioprocess Technology*, 1–10.

- Ferreira, A., & Viljoen, B. (2003). Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 131–140.
- Flores, S., Costa, D., Yamashita, F., Gerschenson, L., & Grossmann, M. (2010). Mixture design for evaluation of potassium sorbate and xanthan gum effect on properties of tapioca starch films obtained by extrusion. *Materials Science and Engineering: C*, 30(1), 196–202.
- Flores, S., Famá, L., Rojas, A., Goyanes, S., & Gerschenson, L. (2007a). Physical properties of tapioca-starch edible films. Influence of filmmaking and potassium sorbate. *Food Research International*, 40(2), 257–265.
- Flores, S., Haedo, A., & Campos, C. (2007b). Antimicrobial performance of potassium sorbate supported in tapioca starch edible films. *Eur Food Res Technology*, 225, 375–384.
- Fontes, L., Ramos, K., Sivi, T., & Queiroz, F. (2011). Biodegradable edible films from renewable sources-potential for their application in fried foods. *American Journal of Food Technology*, 6(7), 555–567.
- Fox, P., McSweeney, P., Cogan, T., & Guinee, T. (2004). *Cheese chemistry physics and microbiology*. (P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, & T. P. Guinee, Eds.) *Microbiology* (Vol. 2, pp. 193–255). Academic Press.
- Franssen, L. (2002). *Antimicrobial properties and diffusion modeling of preservative-containing whey protein films and coatings cheddar cheese* (p. 196).
- Franssen, L., Rumsey, T., & Krochta, J. (2004). Whey protein film composition effects on potassium sorbate and natamycin diffusion. *Journal of Food Science*, 69(5), 347–350.
- Gallo, L., & Jagus, R. (2006). Modelling *Saccharomyces cerevisiae* inactivation by natamycin in liquid cheese whey. *Brazilian Journal of Food Technology*, 9(4), 311–316.
- García, A., Martino, M., & Zaritzky, N. (1998). Starch-based coatings: effect on refrigerated strawberry (*Fragaria ananassa*) quality. *Journal of Science Food Agriculture*, 76, 411–420.
- García, M., Martino, M., & Zaritzky, N. (2000). Microstructural Characterization of Plasticized Starch-Based Films. *Starch*, 52, 118–124.
- Gennadios, A., Weller, C., & Gooding, C. (1994). Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. *Journal of Food Engineering*, 21, 395–409.

- Ghanbarzadeh, B., & Oromiehi, A. (2008). Biodegradable biocomposite films based on whey protein and zein: barrier, mechanical properties and AFM analysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43(2), 209–15.
- Ghanbarzadeh, B., Oromiehie, A., Musavi, M., Rezayi, K., Razmi, E., & Milani, J. (2006). Investigation of water vapour permeability, hydrophobicity and morphology of zein films plasticized by polyols. *Iranian Polymer Journal*, 15(9), 691–700.
- Ghannoum, M., & Rice, L. (1999). Antifungal agents : mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology*, 12, 501–517.
- Ghasemlou, M., Khodaiyan, F., Oromiehie, A., & Yarmand, M. (2011). Development and characterisation of a new biodegradable edible film made from kefiran, an exopolysaccharide obtained from kefir grains. *Food Chemistry*, 127(4), 1496–1502.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Cossart, P. (2001). Comparative genomics of *Listeria* species. *Science (New York, N. Y.)*, 294, 849–852.
- Gontard, N., & Guilbert, S. (1994). Biopackaging: Technology and properties of edible and/or biodegradable materials of agricultural origin. In *Food Packaging and Preservation* (In M. Math., pp. 159–181). United Kingdom.
- Gontard, N., Guilbert, S., & Cuq, J. (1992). Edible wheat gluten films: Influence variables on film properties using methodology of the main process response surface. *Journal of Food Science*, 57(1), 190–195.
- González, A., & Alvarez Igarzabal, C. (2013). Soy protein – Poly (lactic acid) bilayer films as biodegradable material for active food packaging. *Food Hydrocolloids*, 33(2), 289–296.
- Gonzalez-Martinez, C., Becerra, M., Cháfer, M., Albors, A., Carot, J., & Chiralt, A. (2002). Influence of substituting milk powder for whey powder on yoghurt quality. *Trends in Food Science & Technology*, 13, 334–340.
- Good, R., Chaudhury, M., & Yeung, C. (1998). A new approach for determining roughness by means of contact angles on solids. In *First International Congress on Adhesion Science And Technology* (pp. 181–197).
- Gould, G. (1992). Ecosystem approaches to food preservation. *Society for Applied Bacteriology Symposium Series*, 73, 58–68.
- Gould, G. (1997). Methods of preservation and extension of shelf life. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 51–64.

- Greener, I., & Fennema, O. (1993). The effects of plasticizers on crystallinity, permeability and mechanical properties of methylcellulose films. *Journal of Food Processing and Preservation*, 17(4), 247–257.
- Gross, E., & Morell, J. (1971). Structure of nisin. *Journal of American Chemical Society*, 93(18), 4634–4635.
- Groves, K., Gaonkar, A., & Mc Pherson, A. (2006). Microscopy: a tool to study ingredient interactions in foods. In *Ingredient interactions: effects on food quality* (pp. 21–48).
- Grower, J., Cooksey, K., & Getty, K. (2004). Development and characterization of an antimicrobial packaging film coating containing nisin for inhibition of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 67(3), 475–479.
- Guilbert, S. (1986). Technology and application of edible protective films. In M. Mathlouthi (Ed.), *Food packaging and Preservation - Theory and practice* (pp. 371–394). New York: Elsevier Applied Science Publishers.
- Gunde-Cimerman, N., Sonjak, S., Zalar, P., Frisvad, J., Diderichsen, B., & Plemenitaš, A. (2003). Extremophilic fungi in arctic ice: a relationship between adaptation to low temperature and water activity. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*, 28, 1273–1278.
- Gurgel, M., Altenhofen, M., Oliveira, L., & Masumi, M. (2011). Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *European Polymer Journal*, 47(3), 254–263.
- Hameed, N. (2007). Morphology and contact angle studies of poly(styrene-co-acrylonitrile) modified epoxy resin blends and their glass fibre reinforced composites. *Express Polymer Letters*, 1(6), 345–355.
- Hammond, S., & Lambert, P. (1978). Membrane-active antimicrobial agents. In *Antibiotics and Antimicrobial Action* (pp. 34–36). London: Edward Arnold Publishers Limited.
- Han, J. (2003). Antimicrobial food packaging. In *Novel food packaging techniques* (pp. 50–70).
- Hanušová, K., Šťastná, M., Votavová, L., Klaudivsová, K., Dobiáš, J., Voldřich, M., & Marek, M. (2010). Polymer films releasing nisin and/or natamycin from polyvinylidene chloride lacquer coating: Nisin and natamycin migration, efficiency in cheese packaging. *Journal of Food Engineering*, 99(4), 491–496.
- Hasper, H., de Kruijff, B., & Breukink, E. (2004). Assembly and stability of nisin-lipid II pores. *Biochemistry*, 43(36), 11567–11575.

- Horcas, I., Fernandez, R., Gomez-Rodriguez, J., & Colchero, J. (2007). WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Review of Scientific Instruments*, 78(1), 013705.
- Hsu, B., Weng, Y., Liao, Y., & Chen, W. (2005). Structural investigation of edible zein films/coatings and directly determining their thickness by FT-Raman spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(13), 5089–5095.
- Hunter, L. (2000). No Title. *Applications Notes*, 12(5), 1–8.
- Hurbain, I., & Sachse, M. (2011). The future is cold: cryo-preparation methods for transmission electron microscopy of cells. *Biology of the Cell / under the Auspices of the European Cell Biology Organization*, 103(9), 405–420.
- Irlinger, F., & Mounier, J. (2009). Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(2), 142–148.
- Ishida, K., Cola Fernandes Rodrigues, J., Dornelas Ribeiro, M., Vierira Machado Vila, T., de Souza, W., Urbina, J., ... Rozental, S. (2009). Growth inhibition and ultrastructural alterations induced by Delta24(25)-sterol methyltransferase inhibitors in *Candida* spp. isolates, including non-*albicans* organisms. *BMC Microbiology*, 9(74), 1–12.
- James, B. (2009). Advances in “wet” electron microscopy techniques and their application to the study of food structure. *Trends in Food Science & Technology*, 20(3-4), 114–124.
- James, S., & Stratford, M. (2003). *Yeasts in food: Spoilage yeasts with emphasis on the genus Zygosaccharomyces*. (T. Boekhout & V. Robert, Eds.) (pp. 171–191). Behr's Verlag, Hamburg.
- Jin, H., McCaffery, J., & Grote, E. (2008). Ergosterol promotes pheromone signaling and plasma membrane fusion in mating yeast. *The Journal of Cell Biology*, 180(4), 813–826.
- Jones, V., Strobel, M., & Prokosch, M. (2005). Development of Poly(propylene) Surface Topography During Corona Treatment. *Plasma Processes and Polymers*, 2(7), 547–553.
- Jonge, N., & Ross, F. (2011). Electron microscopy of specimens in liquid. *Nature Nanotechnology*, 6(10), 695–704.
- Juneja, V., Dwivedi, H., & Yan, X. (2012). Novel natural food antimicrobials. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 381–403.

- Jung, D., Bodyfelt, F., & Daeschel, M. (1992). Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. *Journal of Dairy Science*, 75(2), 387–393.
- Klaenhammer, T. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1-3), 39–85.
- Klose, C., Ejsing, C., García-Sáez, A., Kaiser, H., Sampaio, J., Surma, M., ... Simons, K. (2010). Yeast lipids can phase-separate into micrometer-scale membrane domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(39), 30224–30232.
- Koontz, J., Marcy, J., Barbeau, W., & Duncan, S. (2003). Stability of natamycin and its cyclodextrin inclusion complexes in aqueous solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(24), 7111–7114.
- Korhonen, H., & Pihlanto-Leppälä, A. Rantamäki, P. (1998). The functional and biological properties of whey proteins: prospects for the development of functional foods. *Agricultural and Food Science*, 7, 283–296.
- Kosikowski, F., & Mistry, V. (1977). *Cheese and fermented milk foods*. Westport, CT, USA.
- Koul, A., Vitullo, J., Reyes, G., & Ghannoum, M. (1999). Effects of voriconazole on *Candida glabrata* in vitro, 44, 109–112.
- Kristo, E., Koutsoumanis, K., & Biliaderis, C. (2008). Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids*, 22, 373–386.
- Krochta, J. (2002). Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status, and opportunities. In *Protein-based films and coatings* (pp. 1–41).
- Krochta, J., & De Mulder-Johnston, C. (1997). Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Journal of Food Technology*, 51(2), 61–74.
- Krochta, J., & Nisperos-Carriedo, M. (1994). *Edible coatings and films to improve food quality*. CRC Press.
- Kunte, L., Gennadios, A., Cuppett, S., Hanna, M., & Weller, C. (1997). Cast films from soy protein isolates and fractions. *Journal of Cereal Chemistry*, 74, 115–118.
- La Stora, A., Ercolini, D., Marinello, F., & Mauriello, G. (2008). Characterization of bacteriocin-coated antimicrobial polyethylene films by atomic force microscopy. *Journal of Food Science*, 73(4), 48–54.

- Lanciotti, R., Vannini, L., Chavez Lopez, C., Gobbetti, M., & Guerzoni, M. (2005). Evaluation of the ability of *Yarrowia lipolytica* to impart strain-dependent characteristics to cheese when used as a ripening adjunct. *International Journal Of Dairy Technology*, 58(2), 89–99.
- Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, 55, 181–186.
- Leistner, L., & Gould, G. (2002). *Hurdle technologies: combination treatments for food stability, safety and quality*. Springer.
- Leiva, S. (2003). Análisis técnico y económico de la conversión de una planta productora de leche en polvo en una planta productora de suero de quesería en polvo. *Trabajo Profesional de Ingeniería Industrial, UBA*.
- Lesage, G., & Bussey, H. (2006). Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 70(2), 317–43.
- Lim, G., Jang, S., & Song, K. (2010). Physical and antimicrobial properties of *Gelidium corneum*/nano-clay composite film containing grapefruit seed extract or thymol. *Journal of Food Engineering*, 98(4), 415–420.
- Lin, C., Hu, C., & Lee, T. (2009). Electropolishing of 304 stainless steel: Interactive effects of glycerol content, bath temperature, and current density on surface roughness and morphology. *Surface and Coatings Technology*, 204(4), 448–454.
- Lindqvist, R., Sylve, S., & Vagshol, I. (2002). Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1-2), 155–170.
- Liu, W., & Hansen, J. (1990). Some chemical and physical properties of nisin , a small-Protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(8), 2551–2558.
- Loksuwan, J. (2007). Characteristics of microencapsulated β -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloids*, 21(5-6), 928–935.
- Lopandic, K., Zelger, S., Bánszky, L., Eliskases-Lechner, F., & Prillinger, H. (2006). Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiology*, 23(4), 341–350.
- Luallen, T. (1985). Starch as a functional ingredient. *Food Technol*, 39(1), 59–63.

- Lück, E., & Jager, M. (1997). Antimicrobial food additives: characteristics, uses, effects. In E. Lück (Ed.), *Antimicrobial food additives* (pp. 35–197). New York: Springer-Verlag.
- Lund, F., Nielsen, A., & Skouboe, P. (2003). Distribution of *Penicillium commune* isolates in cheese dairies mapped using secondary metabolite profiles, morphotypes, RAPD and AFLP fingerprinting. *Food Microbiology*, *20*(6), 725–734.
- Mager, W., & Varela, J. (1993). MicroReview Osmostress response of the yeast *Saccharomyces*. *Molecular Microbiology*, *10*(2), 253–258.
- Mano, J., & Viana, J. (2001). Effects of the strain rate and temperature in stress-strain tests: study of the glass transition of a polyamide-6. *Polymer Testing*, *20*, 937–943.
- Martins, J., Cerqueira, M., Souza, B., Carmo Avides, M., & Vicente, A. (2010). Shelf life extension of ricotta cheese using coatings of galactomannans from nonconventional sources incorporating nisin against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(3), 1884–1891.
- Martorell, P., Fernández-Espinar, M., & Querol, A. (2005). Molecular monitoring of spoilage yeasts during the production of candied fruit nougats to determine food contamination sources. *International Journal of Food Microbiology*, *101*, 293–302.
- Martorell, P., Stratford, M., Steels, H., Fernández-Espinar, M., & Querol, A. (2007). Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *International Journal of Food Microbiology*, *114*(2), 234–242.
- McHugh, T., & Krochta, J. (1994). Sorbitol- vs Glycerol-Plasticized Whey Protein Edible Films: Integrated Oxygen Permeability and Tensile Property Evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *42*(2), 841–845.
- Mei, J., Yuan, Y., Wu, Y., & Li, Y. (2013). Characterization of edible starch-chitosan film and its application in the storage of Mongolian cheese. *International Journal of Biological Macromolecules*, *57*, 17–21.
- Meyer Broseta, S., Diot, A., Bastian, S., Rivière, J., & Cerf, O. (2003). Estimation of low bacterial concentration: *Listeria monocytogenes* in raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, *80*(1), 1–15.
- Michnick, S., Roustan, J., Remize, F., Barre, P., & Dequin, S. (1997). Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for GPD1 encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *Yeast (Chichester, England)*, *13*(9), 783–93.

- Min, L., Harris, J., & Krochta, J. (2005). Antimicrobial effects of lactoferrin, lysozyme, and the lactoperoxidase system and edible whey protein films incorporating the lactoperoxidase system against *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Science*, 70, 332–338.
- Moreira, M., Pereda, M., Marcovich, N., & Roura, S. (2010). Antimicrobial effectiveness of bioactive packaging materials from edible chitosan and casein polymers: assessment on carrot, cheese, and salami. *Journal of Food Science*, 76(1), 54–63.
- Moreno, R. (1992). The role of slip additives in tape casting technology. II: Binders and plasticizers. *Journal of American Ceramic Society Bulletin*, 71(11), 1647–1657.
- Muscat, D., Adhikari, R., McKnight, S., Guo, Q., & Adhikari, B. (2013). The physicochemical characteristics and hydrophobicity of high amylose starch–glycerol films in the presence of three natural waxes. *Journal of Food Engineering*, 119(2), 205–219.
- Nisha, P., Singhal, R., & Pandit, A. (2004). A study on the degradation kinetics of visual green colour in spinach (*Spinacea oleracea* L.) and the effect of salt therein. *Journal of Food Engineering*, 64(1), 135–142.
- Nussinovitch, A. (2008). *Water-soluble polymer applications in foods*. John Wiley & Sons.
- Oh, D., & Marshall, D. (1993). Antimicrobial activity of ethanol, glycerol monolaurate or lactic acid against *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 20(4), 239–246.
- Ollé Resa, C., Gerschenson, L., & Jagus, R. (2013). Effect of natamycin on physical properties of starch edible films and their effect on *Saccharomyces cerevisiae* activity. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 3124–3133.
- OMS. Salud y alimentyos en Europa: nuevas bases de acción (2004).
- OPS. Enfermedades transmitidas por los alimentos (2002).
- Ozdemir, M., & Floros, J. (2001). Analysis and modeling of potassium sorbate diffusion through edible whey protein films. *Journal of Food Engineering*, 47, 149–155.
- Pagliaro, M., & Rossi, M. (2008). *The future of glycerol. New usages for a versatile raw material*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Pavlath, A., Houssard, C., Camirand, W., & Robertson, G. (1999). Clarity of films from wool keratin. *Textile Research Journal*, 69(7), 539–541.

- Péroval, C., Debeaufort, F., Despré, D., & Voilley, A. (2002). Edible arabinoxylan-based films. 1. Effects of lipid type on water vapor permeability, film structure, and other physical characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(14), 3977–3983.
- Pintado, C., Ferreira, M., & Sousa, I. (2010). Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. *Food Control*, *21*(3), 240–246.
- Pires, A., Soares, N., Andrade, N., Silva, L., Camilloto, G., Bernardes, P., ... Campos Bernardes, P. (2008). Development and evaluation of active packaging for sliced mozzarella preservation. *Packaging Technology and Science*, *21*(7), 375–383.
- Pitt, J., & Hocking, A. (2000). *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic and Professional. Blackie Academic and Professional, London.
- Pranoto, Y., Rakshit, S., & Salokhe, V. (2005). Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT - Food Science and Technology*, *38*(8), 859–865.
- Praphailong, W., & Fleet, G. (1997). The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of spoilage yeasts. *Food Microbiology*, *14*, 459–468.
- Pribylova, L., Papouskova, K., & Sychrova, H. (2008). The salt tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* possesses two plasma-membrane Na⁺/H⁺-antiporters (ZrNha1p and ZrSod2–22p) playing different roles in cation homeostasis and cell physiology. *Fungal Genetics and Biology*, *45*(10), 1439–1447.
- Ramos, O., Fernandes, J., Silva, S., Pintado, M., & Malcata, F. (2012). Edible films and coatings from whey proteins: a review on formulation, and on mechanical and bioactive properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *52*(6), 533–552.
- Ramos, O., Silva, S., Soares, J., Fernandes, J., Poçasa, M., Pintado, M., & Malcata, F. (2012). Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. *Food Research International*, *45*(1), 351–361.
- Reitsma, C., & Henning, D. (1996). Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 during the manufacture and curing of Cheddar cheese. *Journal of Food Protection*, *59*(5), 460–464.
- Ribeiro, C., Vicente, A., Teixeira, J., & Miranda, C. (2007). Optimization of edible coating composition to retard strawberry fruit senescence. *Postharvest Biology and Technology*, *44*(1), 63–70.

- Rodgers, J., & Nicewander, W. (1988). Thirteen Ways to Look at the Correlation Coefficient. *The American Statistician*, 42(1), 59–66.
- Rodríguez, M., Osés, J., Ziani, K., & Maté, J. (2006). Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. *Food Research International*, 39(8), 840–846.
- Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(10), 438–447.
- Rollema, H., Kuipers, O., Both, P., de Vos, W., & Siezen, R. (1995). Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), 2873–2878.
- Roller, S. (2009). *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods*.
- Roostita, R., & Fleet, G. (1996). The occurrence and growth of yeasts in Camembert and blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 28(3), 393–404.
- Rosen, S. (1982). *Fundamental principles of polymeric materials*. New York.
- Rotta, J., Ozório, R., Kehrwald, A., de Oliveira Barra, G., de Melo Castanho Amboni, R., & Barreto, P. (2009). Parameters of color, transparency, water solubility, wettability and surface free energy of chitosan/hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films plasticized with sorbitol. *Materials Science and Engineering: C*, 29(2), 619–623.
- Rudolf, M., & Scherer, S. (2001). High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 63(1-2), 91–98.
- Rui, M., Margarida, C., & Cristina, L. (2007). Modelling kinetics of watercress (*Nasturtium officinale*) colour changes due to heat and thermosonication treatments. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(2), 244–252.
- Russell, N., & Gould, G. (1991). Factors affecting growth and survival. *Food Preservatives*, 13–21.
- Russell, N., & Gould, G. (2008). *Food preservatives*.
- Ryser, E., & Marth, E. (2007). *Listeria, listeriosis, and food safety*. CRC press.
- Sabato, S., Ouattara, B., Yu, H., D'aprano, G., Le Tien, C., Mateescu, M., & Lacroix, M. (2001). Mechanical and barrier properties of cross-linked soy and whey

- protein based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1397–1403.
- Sahl, H., Jack, R., & Bierbaum, G. (1995). Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *European Journal of Biochemistry*, 230, 827–853.
- Sánchez, A., Popineau, Y., Mangavel, C., Larré, C., & Guéguen, J. (1998). Effect of Different Plasticizers on the Mechanical and Surface Properties of Wheat Gliadin Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(11), 4539–4544.
- Sanjurjo, K., Flores, S., Gerschenson, L., & Jagus, R. (2006). Study of the performance of nisin supported in edible films. *Food Research International*, 39(6), 749–754.
- Schmidt, R., & Rodrick, G. (2003). Definition of food safety. In *Food safety handbook*. New Jersey, Hoboken, John Wiley and Sons Inc.
- Sebti, I., Blanc, D., Carnet-Ripoche, A., Saurel, R., & Coma, V. (2004). Experimental study and modeling of nisin diffusion in agarose gels. *Journal of Food Engineering*, 63, 185–190.
- Sejidov, F., Mansoori, Y., & Goodarzi, N. (2005). Esterification reaction using solid heterogeneous acid catalysts under solvent-less condition. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 240, 186–190.
- Siracusa, V. (2012). FoodPackaging permeability behaviour: a report. *International Journal of Polymer Science*, 2012, 1–11.
- Siracusa, V., Rocculi, P., Romani, S., & Rosa, M. (2008). Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 19(12), 634–643.
- Smith, P., Chun, I., Liu, G., Dimitrievich, D., Rasburn, J., & Vancso, G. (1996). Studies of optical haze and surface morphology of blown polyethylene films using atomic force microscopy. *Polymer Engineering & Science*, 36(16), 2129–2134.
- Soares Pinto, M., Fernandez de Carvalho, A., Dos Santos Pires, A., de Paula, J., Sobral, D., & Resplande Magalhães, F. (2009). Survival of *Listeria innocua* in Minas Traditional Serro cheese during ripening. *Food Control*, 20(12), 1167–1170.
- Sobrino-López, A., & Martín-Belloso, O. (2008). Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal*, 18, 329–343.

- Sokal, R., & Rohlf, J. (2000). *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. San Francisco, California: W. H. Freeman and Company.
- Somers, E., & Taylor, S. (1987). Antibotulinal effectiveness of nisin in pasteurized process cheese spreads. *Journal of Food Protection*, 50, 842–848.
- Sorhaug, T., & Stepaniak, L. (1997). Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products : Quality aspects. *Trends in Food Science and Technology*, 8, 35–41.
- Sothornvit, R., & Krocht, J. (2000). Water vapor permeability and solubility of films from hydrolyzed whey protein. *Food Engineering and Physical Properties*, 65(4), 700–703.
- Steensels, J., & Verstrepen, K. (2014). Taming Wild Yeast: Potential of Conventional and Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations. *Annual Review of Microbiology*, 68, 61–80.
- Sun, M., Yu, Q., Hu, M., Hao, Z., Zhang, C., & Li, M. (2014). Lead sulfide nanoparticles increase cell wall chitin content and induce apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Hazardous Materials*, 273, 7–16.
- Suzzi, G., Lanorte, M., Galgano, F., Andrighetto, C., Lombardi, A., Lanciotti, R., & Guerzoni, M. (2001). Proteolytic, lipolytic and molecular characterisation of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 69(1-2), 69–77.
- Tang, C., & Jiang, Y. (2007). Modulation of mechanical and surface hydrophobic properties of food protein films by transglutaminase treatment. *Food Research International*, 40(4), 504–509.
- Te Welscher, Y., Jones, L., van Leeuwen, M., Dijksterhuis, J., De Kruijff, B., Eitzen, G., & Breukink, E. (2010). Natamycin inhibits vacuole fusion at the priming phase via a specific interaction with ergosterol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(6), 2618–2625.
- Te Welscher, Y., Ten Napel, H., Balagué, M., Souza, C., Riezman, H., De Kruijff, B., & Breukink, E. (2008). Natamycin blocks fungal growth by binding specifically to ergosterol without permeabilizing the membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(10), 6393–6401.
- Tharanathan, R. (2002). Food-derived carbohydrates--structural complexity and functional diversity. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(1), 65–84.
- Tharanathan, R. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Critical Review in Food Science and Technology*, 14, 71–78.

- Tharanathan, R., & Saroja, N. (2001). Hydrocolloid-based packaging films—alternate to synthetic plastics. *Journal of Scientific and Industrial Research*, *60*, 547–559.
- Thomas, L., Clarkson, M., & Delves-Broughton, J. (2000). *Nisin* (pp. 463–524). Boca Raton: Natural Food Antimicrobial Systems.
- Tiwari, B., Valdramidis, V., O'Donnell, C., Muthukumarappan, K., Bourke, P., & Cullen, P. (2009). Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(14), 5987–6000.
- Trezza, T., & Krochta, J. (2000). Color Stability of Edible Coatings During Prolonged Storage. *Journal of Food Science*, *65*(1), 1166–1169.
- Ture, H., Eroglu, E., Ozen, B., & Soyer, F. (2011). Effect of biopolymers containing natamycin against *Aspergillus niger* and *Penicillium roquefortii* on fresh kashar cheese. *International Journal of Food Science Technology*, *46*(1), 154–160.
- Ture, H., Eroglu, E., Soyer, F., & Ozen, B. (2008). Antifungal activity of biopolymers containing natamycin and rosemary extract against *Aspergillus niger* and *Penicillium roquefortii*. *International Journal of Food Science and Technology*, *43*(11), 2026–2032.
- Van den Tempel, T., & Jakobsen, M. (2000). The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. *International Dairy Journal*, *10*(4), 263–270.
- Van Heusden, H., de Kruijff, B., & Breukink, E. (2002). Lipid II induces a transmembrane orientation of the pore-forming peptide lantibiotic nisin. *Biochemistry*, *41*(40), 12171–12178.
- Varadaraj, M. (2010). Capacity Building : Building Analytical Capacity for Microbial Food Safety. In C. Boisrobert, A. Stjepanovic, O. Sangsuk, & H. Lelieveld (Eds.), *Ensuring Global Food Safety* (First Edit., pp. 151–176). San Diego: Elsevier Inc.
- Vásconez, M., Flores, S., Campos, C., Alvarado, J., & Gerschenson, L. (2009). Antimicrobial activity and physical properties of chitosan–tapioca starch based edible films and coatings. *Food Research International*, *42*(7), 762–769.
- Vasdinyei, R., & Deák, T. (2003). Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. *International Journal of Food Microbiology*, *86*(1-2), 123–130.
- Vaz-Velho, M., Fonseca, M., Silva, M., & Gibbs, P. (2001). Is *Listeria innocua* 2030c , a tetracycline-resistant strain , a suitable marker for replacing *L . monocytogenes* in challenge studies with cold-smoked fish? *Food Control*, *12*, 361–364.

- Vermeulen, A., Daelman, J., Van Steenkiste, J., & Devlieghere, F. (2012). Screening of different stress factors and development of growth/no growth models for *Zygosaccharomyces rouxii* in modified Sabouraud medium, mimicking intermediate moisture foods (IMF). *Food Microbiology*, 32(2), 389–396.
- Wachtler, V., & Balasubramanian, M. (2006). Yeast lipid rafts? – An emerging view. *Trends in Cell Biology*, 16(1).
- Welthagen, J., & Viljoen, B. (1998). Yeast profile in Gouda cheese during processing and ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 41(3), 185–194.
- WHO. (2001). Global surveillance of foodborne disease: developing a strategy and its interaction with risk analysis. Geneva, World Health Organization.
- WHO. (2007). Evaluation of certain food additives and contaminants. *WHO Expert Committee on Food Additives*, 940.
- Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O., Bierbaum, G., de Kruijff, B., & Sahl, H. (2001). Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(3), 1772–1779.
- Wilson, P., Brocklehurst, T., Arino, S., Thuault, D., Jakobsen, M., Lange, M., ... Van Impe, J. (2002). Modelling microbial growth in structured foods: towards a unified approach. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 275–289.
- Wypych, G. (Ed.). (2004). *Handbook of plasticizers*. ChemTec Publishing.
- Yang, L., & Paulson, A. (2000). Mechanical and water vapour barrier properties of edible gellan films. *Food Research International*, 33, 563–570.
- Zameer, F., Gopal, S., Krohne, G., & Kreft, J. (2009). Development of a biofilm model for *Listeria monocytogenes* EGD-e. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(6), 1143–1147.
- Zhang, Y., Gamarra, S., Garcia-Effron, G., Park, S., Perlin, D., & Rao, R. (2010). Requirement for ergosterol in V-ATPase function underlies antifungal activity of azole drugs. *PLoS Pathogens*, on line.
- Zhong, Y., Cavender, G., & Zhao, Y. (2014). Investigation of different coating application methods on the performance of edible coatings on Mozzarella cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 56(1), 1–8.
- Zisman, W. (1964). Relation of the equilibrium contact angle to liquid and solid constitution. In *Contact Angle, Wettability, and Adhesion* (pp. 1–51). Washington DC: Advances in Chemistry, Vol. 43.

7. GLOSARIO

A	Área de la sección transversal original de la muestra de paralelepípedo sometida a ensayo de tracción
a*	Magnitud rojo/verde de la muestra en el sistema CIE Lab
AAM	Academia Americana de Microbiología
ADNA	Aplicación directa de solución conteniendo 50 ppm de natamicina
ADNANI	Aplicación directa de solución conteniendo 50 ppm de natamicina y 12,5 ppm de nisina
ADNI	Aplicación directa de solución conteniendo 12,5 ppm de nisina
A _p	Área de película susceptible a ser atravesada por permeado en el ensayo de permeabilidad al vapor de agua
a _w	Actividad de agua
b*	Magnitud amarillo/azul de la muestra en el sistema CIE Lab
CAA	Código Alimentario Argentino
caldo TSYE	Caldo triptona de soja enriquecido con extracto de levadura
CIE	Comisión Internacional de Iluminación
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria

CNA	Película comestible control de las películas NA ₁ , NA ₂ y NA ₃
CNANI	Película comestible control de la película NANI
CNI	Película comestible control de la película NI
COMERCIAL	Película comercial de polipropileno
CPS35	Concentrado Proteico de Suero conteniendo 35% de proteína p/p
CPSL	Concentrado Proteico de Suero Líquido
DBO	Demanda Biológica de Oxígeno
<i>E</i>	Módulo de Young
ESEM	EnvironmentalScanningElectronMicroscopy: microscopio de barrido electrónico ambiental
ETA	Enfermedades Transmitidas por Alimentos
F	Fuerza de tracción uniaxial
FAO	Food and AgricultureOrganization: Organización para la agricultura y la Alimentación
GRAS	Generalmente reconocido como seguro
H.R.	Humedad relativa

L*	Luminosidad de la muestra en el sistema CIE Lab
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
MFA	Microscopía de fuerza atómica
NA ₁	Película comestible conteniendo 10 ppm de natamicina y 8,5 gramos de glicerol
NA ₂	Película comestible conteniendo 20 ppm de natamicina y 8,5 gramos de glicerol
NA ₃	Película comestible conteniendo 50 ppm de natamicina y 8,5 gramos de glicerol
NANI	Película comestible conteniendo 50 ppm de natamicina, 12,5 ppm de nisina y 6 gramos de glicerol
NI	Película comestible conteniendo 12,5 ppm de nisina y 5 gramos de glicerol
OMS	Organización Mundial de la Salud
PVA	Permeabilidad al vapor de agua
R _q	Parámetro cuantitativo de la rugosidad de las películas
SP	Queso sin película
SP con inóculo	Queso sin película y con inóculo

SP sin inóculo	Queso sin película y sin inóculo
TSYE	Medio nutriente universal
TSYE _c	Medio nutriente universal excluyente para hongos y levaduras
UE	Unión Europea
W_a	Trabajo reversible de adhesión, indica la interacción entre un líquido y un sólido
W_c	Coefficiente de cohesión
WHO	WorldHealthOrganization
W_s	Coefficiente de extensión o humectabilidad
x	Espesor de las películas
YGC	Medio de cultivo selectivo para aislamiento de hongos y levaduras
YI	Índice de amarillo en la muestra
Y_{LV}	Tensión superficial entre un líquido y un gas
ΔE	Diferencia de color total de la muestra
ΔL	Elongación total que sufre una muestra con forma de paralelepípedo sometida a ensayo de tracción

Δw	Masa del permeado, en el ensayo de permeabilidad al vapor de agua
ε	Deformación originada por la fuerza de tracción uniaxial sobre una muestra con forma de paralelepípedo, sometida a ensayo de tracción
ε_r	Deformación a la ruptura
σ	Esfuerzo en una muestra con forma de paralelepípedo. Es el cociente entre la fuerza de tracción uniaxial y la sección transversal original de la muestra
σ_r	Esfuerzo a la ruptura