

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS CÓRDOBA

**POSTGRADO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA
SUSTENTABLE**

DESARROLLO DE UNA PELÍCULA BIODEGRADABLE DE ALGINATO Y FÉCULA DE MALANGA ADICIONADA CON NISINA

MONSERRAT GUEVARA CARRIÓN

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRA EN CIENCIAS

AMATLÁN DE LOS REYES, VERACRUZ, MÉXICO

2021

La presente tesis, titulada: **“Desarrollo de una película biodegradable de alginato y fécula de malanga adicionada con nisina”** realizada por la alumna: **Monserrat Guevara Carrión**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE

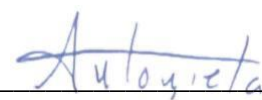
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA Y DIRECTORA DE TESIS:




Dra. Aleida Selene Hernández Cázares

ASESORA:



Dra. María Antonieta Ríos Corripio

ASESOR:



Dr. Juan Valente Hidalgo Contreras

ASESORA:



Dra. Marcela Rangel Marrón

Amatlán de los Reyes, Veracruz, México, diciembre de 2021.

DESARROLLO DE UNA PELÍCULA BIODEGRADABLE DE ALGINATO Y FÉCULA DE MALANGA ADICIONADA CON NISINA

Monserrat Guevara Carrión, M en C.

Colegio de Postgraduados, 2021

La carne de pollo es un alimento con elevado valor biológico y al ser altamente perecedero por su composición nutritiva es susceptible a microorganismos patógenos como la *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp, y *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*. El desarrollo de películas biodegradables se ha convertido en una tecnología alternativa viable para mantener la calidad e inocuidad de los alimentos y se reduce el impacto ambiental que generan los empaques y embalajes sintéticos. En el presente estudio se optimizó una película biodegradable de alginato de sodio adicionada con fécula de malanga y nisina, mediante la metodología de superficie de respuesta Box-Behnken, se consideró tres variables independientes, el contenido de nisina (500 UI/mL, 2500 UI/mL y 5000 UI/mL), el contenido de fécula de malanga (0.5, 1 y 2% p/v) y el contenido de glicerol (1, 1.5 y 2% p/v). Para obtener una película biodegradable óptima (OB), se determinó el espesor, humedad, solubilidad en agua, permeabilidad al vapor de agua, fuerza tensil, fuerza de quiebre y % de elongación y los resultados se analizaron con el software Design Expert ®. Una vez obtenida la OB esta se caracterizó según sus propiedades mecánicas, físicas y químicas, y se determinó la migración en simulantes alimentarios, la capacidad de retención y cinética de liberación de la nisina; además, se evaluó el efecto antimicrobiano de la OB contra *Listeria monocytogenes*, *in vitro* con mediciones de halos de inhibición y en carne de pollo inoculada.

La combinación óptima de componentes encontrada para el desarrollo de la película biodegradable fue con 2369 UI/mL de nisina, 1.9% p/v de fécula de malanga y 1.09% p/v de glicerol. Las variables respuesta significativas fueron la permeabilidad al vapor de agua, fuerza tensil y fuerza de quiebre; lo que comprueba que la fécula de malanga otorgó mayores niveles de fuerza tensil y de quiebre. La OB redujo significativamente la carga microbiana y permitió alargar la vida útil de la carne de pollo refrigerada (6°C) hasta 15 d. La migración total y la cinética de liberación de la nisina en simulantes alimentarios mostró que la película biodegradable puede ser aplicada en alimentos hidrofílicos y ácidos, lo que la convierten en una alternativa viable para su uso como empaque alimentario.

Palabras clave: Película biodegradable, nisina, carne de pollo, *Listeria monocytogenes*

DEVELOPMENT OF A BIODEGRADABLE FILM OF ALGINATE AND MALANGA STARCH ADDED WITH NISIN

Monserrat Guevara Carrión, M en C.

Colegio de Postgraduados, 2021

Chicken meat is a food with high biological value and being highly perishable due to its nutritional composition, it is susceptible to pathogenic microorganisms such as *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp, and *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*. The development of biodegradable film has become a viable alternative technology to maintain the quality and safety of food and reduce the environmental impact generated by synthetic packaging. In the present study, a sodium alginate biodegradable film added with taro starch and nisin was optimized, using the Box-Behnken response surface methodology, three independent variables were considered, the nisin content (500 IU / mL, 2500 IU / mL and 5000 IU / mL), taro starch content (0.5, 1 and 2%) and glycerol content (1, 1.5 and 2%). To obtain an optimal biodegradable film (OB), the thickness, humidity, solubility in water, permeability to water vapor, tensile strength, breaking strength and% elongation were determined and the results were analyzed with the Design expert ® software. Once OB was obtained, it was characterized according to its mechanical, physical and chemical properties, and migration in food simulants, retention capacity and release kinetics of nisin were determined; Furthermore, the antimicrobial effect of OB against *Listeria monocytogenes* was evaluated in vitro with measurements of inhibition halos and in inoculated chicken meat.

The optimal combination of components found for the development of the biofilm was 2369 IU / mL nisin, 1.9% w / v taro starch and 1.09% w / v glycerol. The significant response variables were water vapor permeability, tensile strength and breaking strength. This proves that taro starch had highest levels of tensile and breaking strength. The OB significantly reduced the microbial load and allowed to extend the shelf life of refrigerated chicken meat (6 ° C) up to 15 d. The total migration and release kinetics of nisin in food simulants showed that the biodegradable film can be applied in hydrophilic and acidic foods, making it a viable natural alternative for use as food packaging.

Keywords: biodegradable film, nisin, chicken meat, *Listeria monocytogenes*

DEDICATORIA

A mi mamá por ser un pilar con su incondicional apoyo, su cariño, sus mimos y sus ánimos que me permitieron seguir en una pieza. Gracias por llevarme comida cuando se me olvidaba comer y por tus desvelos acompañándome. Y por haberme forjado como la persona que soy actualmente. No me van a alcanzar las palabras para agradecerte.

A Gisela Carrera, por la infinita paciencia que me tuviste y por el apoyo. Me enseñaste muchas cosas sobre laboratorio, pero también sobre la vida y por ello te agradezco infinitamente. Es increíble que conocí a un técnico de laboratorio y salí con una amiga para toda la vida.

A Nuria Vargas y Baruc F. Corte, “jamás en toda la vida olvidaré su presencia, me acogieron destrozada y me devolvieron integra, entera”. Los amo.

A Galileo Bonilla porque sin ti parte de este trabajo no hubiese sido posible, además de ser un amigo increíble y siempre estar para nosotros a pesar de ser parco, te amo 3 millones.

A mis amigos y compañeros de maestría Lourdes Hernández, Karen Serrano (Martita), Eduardo Santos, Abigaic Santiago por su increíble apoyo, sus enseñanzas y su sentido del humor que hicieron el camino más ameno, los quiero infinitamente.

A Nancy M. Alavéz, Carlos Reyes, Hannia Cueyatle, Francisco J. Vázquez, Gerardo Caballero y Augusto Alvarado por mantenerme con los pies bien puestos en la tierra y recordarme que manada significa familia y la familia no se abandona.

A La Guardería por hacerme parte de un proyecto precioso, las amo para siempre.

Gracias.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento para realizar mis estudios de posgrado con la beca No. 956144 y con ello está investigación.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba, por el financiamiento para realizar dicha investigación.

A la Maestría en Ciencias en Innovación Agroalimentaria Sustentable y a la LGAC 2. Innovación y desarrollo de procesos agroalimentarios para el bienestar social.

A la Dra. Aleida Selene Hernández Cázares por el apoyo, la infinita paciencia, confianza y por llevarme de la mano con todo el proceso ¡Muchas gracias!

A la Dra. María Antonieta Ríos Corripio, por sus valiosos aportes y consejos. ¡Muchas gracias!

Al Dr. Juan Valente Hidalgo Contreras por todo el apoyo, la paciencia, la disposición y por encaminarme en este proyecto. ¡Muchas gracias!

A la Dra. Marcela Rangel Marrón por sus aportes, sus valiosos consejos y por su disposición para colaborar ¡Muchas gracias!

Al Laboratorio de Ciencias de los Alimentos por prestar las instalaciones para el desarrollo del proyecto.

Al Laboratorio de Biotecnología Microbiana Aplicada por prestar las instalaciones para el desarrollo del proyecto. Así como al M.C. Jesús David Castilla Marroquín por el apoyo y sus valiosos consejos.

Jesica Arisbeth Meza Corte de la Universidad Politécnica de Puebla, por su valioso apoyo en una etapa de este proyecto

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	11
Objetivos.....	13
Hipótesis.....	13
Seguridad alimentaria.....	13
Innovación.....	14
Sustentabilidad.....	15
MARCO TEORICO.....	16
1. Películas biodegradables.....	16
1.1 Composición de las películas biodegradables.....	17
1.1.1 Alginato.....	20
1.1.2 Almidón.....	22
1.2 Propiedades de las películas biodegradables.....	26
1.3 Películas biodegradables con propiedades bioactivas.....	27
1.4 Películas biodegradables antimicrobianas.....	27
1.4.1 Bacteriocinas.....	28
1.4.2 Nisina.....	30
2. Carne de pollo.....	31
2.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	32
3. Interacción empaque-alimento.....	33
4. Métodos de superficie de respuesta.....	34
4.1 Diseño Box-Behnken.....	35
LITERATURA CITADA.....	37
Optimization and characterization of a sodium alginate a biodegradable film with taro starch and nisin: antimicrobial effect on chicken meat.....	48
ABSTRACT.....	48
INTRODUCTION.....	48
2. MATERIALS AND METHODS.....	49
2.1. Materials.....	49
2.2. Preparation of the biodegradable film.....	50
2.3. Optimization of the biodegradable film.....	50
2.4. Physical and chemical characterization of the biodegradable film.....	51
2.4.1. Solubility (S).....	51
2.4.2 Water vapor permeability (WVP).....	52
2.4.3 Mechanical properties.....	52
2.4.4 FTIR spectroscopy.....	52
2.5. <i>In vitro</i> evaluation of the antimicrobial effect of the biodegradable film.....	53
2.5.1 Total migration of nisin in food simulants.....	53

2.5.2 Retention of nisin in the biodegradable films	53
2.5.3 Kinetics of the release of nisin in different food simulants	53
2.5.4 Antimicrobial activity against <i>Listeria monocytogenes</i>	54
2.6. Applying the biodegradable film on the meat.....	54
2.7. Statistical analysis	54
3. Results and discussion.....	55
3.1. Obtaining the biodegradable film.....	55
3.2 Physical and chemical characterization of the optimal biodegradable film	59
3.3 Evaluation of the antimicrobial effect of the biodegradable film	62
3.3.1 Total migration of nisin in food simulants.....	62
3.3.2 Extraction of nisin in the biodegradable films.	64
3.3.3 Kinetics of the release of nisin in different food simulants	64
3.3.4 <i>In vitro</i> antimicrobial activity against <i>Listeria monocytogenes</i>	65
3.4. Applying the biodegradable film on the meat.....	66
Conclusions	67
Acknowledgements	68
References	68
CONCLUSIONES GENERALES	75
RECOMENDACIONES GENERALES	75
ANEXOS.....	76

LISTA DE CUADROS

MARCO TEÓRICO

Cuadro 1. Contenido de amilosa y amilopectina en almidones y féculas.....22

Cuadro 2. Simulantes alimentarios en la industria alimentaria.....34

CHAPTER I

Table 1. Values of factors for the Box-Behnken experimental design.....50

Table 2. Experimental values used to evaluate the effects of the independent variables of the biodegradable film.....55

Table 3. Analysis of variance of the response variables.....57

Table 4. Characterization of a sodium alginate biodegradable film with taro starch and nisin, effect of the independent variables on the response variables of a biodegradable film.59

Table 5. Nisin extracted (% retention) at different times of contact with methanol.64

Table 6. Inhibition of the OB against *L. monocytogenes* with the Kirby Bauer method65

LISTA DE FIGURAS

MARCO TEÓRICO

Figura 1. Barrera de transferencias del exterior controladas por la	17
Figura 2. Fuentes naturales de biopolímeros utilizados para la formación de películas biodegradables.....	19
Figura 3. Modelo caja de huevos del alginato en películas biodegradables.....	21
Figura 4. Transformación de gránulos de almidón en películas biodegradables	24
Figura 5. Mecanismo de acción de la nisina	31
Figura 6. Ejemplos de superficie de respuesta a) sin curvatura b) con curvatura.....	35
Figura 7. Diseño Box-Behnken de tres factores.....	36

CAPÍTULO I

Figure 1. Correlation between the predicted and experimental values of each model: a) WVP, $R^2 = 0.89$; b) TS, $R^2 = 0.93$; y c) BF, $R^2 = 0.97$	57
Figure 2. Response surface. a) WVP of MS and G; b) TS of MS and G; c) BF of MS and G, which show the effects of the interaction of the variables.	59
Figure 4. Percentage of migration (%) of three nisin food simulants (● ethanol 10%, ▲ acetic acid 3% and △ Isooctane) in an alginate biodegradable film with added taro starch and nisin during 15 d of storage in refrigeration.....	63
Figure 5. a) Kinetics of the release of food simulants under the Sigmoidal Gompertz model. b) Linearization of the kinetics of the release. ○ ethanol 10%, ● ethanol 50%, ▲ acetic acid 3%, △ Isooctane.....	65
Figure 6. Microbial recounts in portions of chicken meat inoculated with <i>L. monocytogenes</i> (10^8 UFC/g) stored in refrigeration (6 °C) for 0, 3, 6, 9, 12 and 15 d. ● Meat inoculated with <i>L. monocytogenes</i> wrapped in the OB), ▲(Meat inoculated with <i>L. monocytogenes</i> wrapped with the biodegradable film without Nis), Meat inoculated with <i>L. monocytogenes</i> without biodegradable film).....	67

INTRODUCCIÓN GENERAL

Planteamiento del problema

En 2019 la producción mundial de carne de pollo fue de 95.5 millones de ton. México es el 6to lugar en la producción de pollo de acuerdo con el ranking mundial con 3,476,622 toneladas; la actividad avícola en el país para carne de pollo tiene mayor producción en Veracruz con 11.9%, Jalisco con 11.2% y Aguascalientes con 10.6% (SIAP. 2020).

La carne de pollo contiene aminoácidos, hierro, fósforo, potasio, niacina y zinc; además de no contener grasas mono y poliinsaturadas (USDA, 2014). En la vida útil de la carne se mantienen las características sensoriales, microbiológicas, nutricionales superando la aceptabilidad de los consumidores (Giannakourou *et al.*, 2001). Al ser altamente nutritiva es muy susceptible a microorganismos patógenos para el nombre, principalmente *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* y *Campylobacter* spp

En la industria de alimentos, el empleo de películas biodegradables son una alternativa para alargar la vida útil y obtener alimentos más duraderos (Guzmán *et al.*, 2015). Específicamente en la industria de la carne, por su composición y su susceptibilidad al ataque de microorganismos patógenos.

Una película biodegradable es definida como una matriz polimérica preformada que puede ser aplicada en la superficie de un alimento, al actuar como una barrera al intercambio de gases evita una pérdida o ganancia de humedad lo que incide en la calidad y valor nutricional del alimento, además de influir en su estabilidad química y microbiológica ocasionado por manipulación o malos manejos de producción (McHugh, 2000).

Pueden ser elaboradas por diferentes tipos de biopolímeros que pueden utilizarse solos o combinados, entre los que se destaca el alginato y almidón. El alginato es proveniente de algas pardas, tienen la ventaja de formar películas biodegradables flexibles, solubles en agua, con baja permeabilidad al O₂ y traslúcidas (Gheorghita *et al.*, 2020). Por otro lado, el almidón es utilizado como adhesivo o como materia prima de empaques biodegradables (Torres- Rapelo *et al.*, 2014).

Debido a su alto contenido de almidón, la fécula de malanga puede reemplazar a almidones convencionales como papa, yuca y maíz, al contener más del 80% (Vázquez, 2013), poder formar geles fuertes y alta viscosidad y tener potencial para el desarrollo de películas biodegradables (Sanjurjo *et al.*, 2006). Las películas biodegradables permiten la adición de diversos ingredientes funcionales en sus matrices, como antimicrobianos, colorantes, vitaminas y antioxidantes y se consideran películas activas.

Una de las ventajas de las películas biodegradables con antimicrobianos es la capacidad de poder liberarlos gradualmente, lo que extiende el efecto en los alimentos (Ávila-Sosa *et al.*, 2012). Debido a la alta demanda de productos naturales, se buscan que los antimicrobianos sean del mismo origen lo que incluye a las bacteriocinas como la nisina (Narsaiah *et al.*, 2015). La nisina es una alternativa promisorio para ser empleada como agente antimicrobiano en la carne.

Las bacterias Gram-positivas que afectan a la carne son termorresistentes y soportan pH bajo. La nisina puede mejorar la protección de la carne, al deteriorar o inhibir el ataque microbiano, aumentar la vida útil y reducir las pérdidas de los productos (Cano-Serna *et al.*, 2015).

Por lo que el objetivo de este estudio es obtener una película biodegradable compuesta a base de alginato y fécula de malanga adicionada con nisina para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos en la carne de pollo.

Objetivos

Objetivo general

Desarrollar y caracterizar una película biodegradable antimicrobiana a base de alginato y fécula de malanga adicionada con nisina para su aplicación en carne de pollo.

Objetivos específicos

- Optimizar y caracterizar física y químicamente la película biodegradable de alginato y fécula de malanga adicionada con nisina bajo el análisis de superficie de respuesta método Box-behnken
- Evaluar la actividad antimicrobiana de la película biodegradable de alginato y fécula de malanga adicionada con nisina sobre *Listeria monocytogenes* en carne de pollo.

Hipótesis

La película biodegradable de alginato y fécula de malanga adicionada con nisina inhibirá el crecimiento de *Listeria monocytogenes in vitro* y su aplicación en carne de pollo almacenada en refrigeración por 15 días.

Seguridad alimentaria

Según la FAO, en la Cumbre Mundial sobre la Alimentación (1999) definieron a la seguridad alimentaria como el acceso económico y físico a alimentos saludables y nutritivos a nivel familias, países y mundo para satisfacer necesidades nutricionales con el objetivo de llevar una vida sana y activa.

De acuerdo con a los conceptos proporcionados aportados por la FAO, la seguridad alimentaria consta de cuatro pilares representativos: 1) disponibilidad física de los alimentos, la cual debe considerar la producción, el almacenamiento y las importaciones; incluyendo las pérdidas post-cosecha, así como las exportaciones para evaluar la disponibilidad de los alimentos; 2) acceso físico y económico a los alimentos, controlando los medios de producción para asegurar el abastecimiento de los alimentos en el mercado; 3) utilización y consumo de alimentos, el consumo se relaciona con los requerimientos alimentarios que satisfacen a las necesidades nutricionales, de cultura,

diversidad y las preferencias alimentarias en los hogares y 4) la estabilidad de los alimentos, asociada a las condiciones de inseguridad alimentaria transitoria de carácter temporal o cíclico, vinculada a campañas agrícolas, ya sea por la falta de producción de alimentos en determinadas épocas del año, o la disponibilidad de alimentos. El acceso a los recursos por parte de las personas que dependen de cultivos selectos. Además, la existencia de almacenes juega un papel transcendental (Oliva, 2019).

Asociado a lo anterior, esta investigación en términos de seguridad alimentaria contribuirá a la disponibilidad física y estabilidad de los alimentos al desarrollar una película biodegradable adicionada con nisina con características antimicrobianas que permita extender la vida de anaquel de la carne de pollo. Así mismo, dar valor agregado a cultivos no convencionales como la malanga, la cual posee un alto contenido de fécula, polímero con potencial para la elaboración de películas biodegradables.

Innovación

De acuerdo con Acuña (2016) la innovación es todo cambio que genera valor. Mientras que Formichella (2005) define a la innovación como “la transformación de conocimiento en productos y servicios nuevos y explotarlos comercialmente”.

El Manual de Oslo de 2005 sostiene que innovación es la inserción de un producto, proceso, servicio, método nuevo o mejorado. Por lo tanto, cuando se habla de innovación se referencia a la generación de valor y sus consecuencias económicas.

El manual reconoce cuatro tipos de innovación: **innovación de producto**, es el adentramiento de un servicio nuevo o mejorado; la **innovación de proceso** conlleva cambios en las técnicas o materiales para mejorar un proceso de producción; **innovación de mercadotecnia**, introduce un nuevo método para comercialización lo que cambia el diseño de producto, promoción y tarifación; y la **innovación de organización** busca reducir costos administrativos al introducir nuevos (Meliá, 2014).

En la presente tesis de investigación, la innovación agroalimentaria es prioridad. Al crear un nuevo método alternativo innovador de conservación de la carne, mediante el desarrollo de una película

biodegradable de alginato y fécula de malanga adicionada con nisina, que permita en gran parte dar valor agregado al tubérculo de la malanga, y alargar la vida útil de la carne.

Sustentabilidad

La sustentabilidad es un balance entre el ambiente, sociedad y economía que satisfacen las necesidades de generaciones actuales sin comprometer a las futuras generaciones, asegurando la viabilidad de los ecosistemas (Mckeown *et al.*, 2002).

De acuerdo con la FAO (2016) en la cumbre mundial sobre el desarrollo sustentable fue establecido la división de 3 divisiones de la sustentabilidad: 1) la dimensión económica se encarga de reducir desperdicios de energía al generar políticas para un acceso igualitario a los recursos y erradicar la pobreza extrema, así como desarrollar tecnologías más limpias; 2) la dimensión social trata de mejorar la calidad de vida de la población estabilizándola, al minimizar las consecuencias de la urbanización y fomentar el desarrollo rural sustentable; 3) la dimensión ambiental buscan conservar la biodiversidad, restringen el uso de agroquímicos que impactan en los ecosistemas (Martín, 2012).

La sustentabilidad de este estudio se orienta a la generación de una película biodegradable capaz de inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos con la incorporación de nisina, bactericida antimicrobiana extraído de la bacteria ácido-láctica *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*. Desde la perspectiva ambiental surge la necesidad de otorgara los productos alimentarios un aspecto más natural o ecológico; así como reducir el impacto ambiental ocasionado por plásticos derivados del petróleo. En este estudio los componentes y el método con los que se elaboren las películas biodegradables son amigables con el ambiente, ya que se degradan por acción biológica y en corto tiempo. En la perspectiva social y económica existe la necesidad de dar valor agregado a los subproductos de fuentes de cultivo no convencionales como la malanga.

MARCO TEORICO

1. Películas biodegradables

Debido a los costos bajos, alta disponibilidad y propiedades físicas los plásticos derivados del petróleo son ampliamente utilizados; estos plásticos compuestos de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y fósforo tienen un elevado peso molecular y son fabricados mediante el procesamiento de petróleo o gas natural (Perdomo, 2002). Para la conversión de petróleo a plástico, este debe refinarse y ser dividido en moléculas más pequeñas para posteriormente mediante calor y presión ser combinadas con polímeros de cadenas más largas y así proporcionar características deseadas al material (Segura *et al.*, 2007).

Para 2019, la producción mundial de plástico fue de 400 millones de toneladas aproximadamente, se estima para 2030 aumente a 700 millones y para 2050 sea 1.800 millones. De todo el plástico producido, solo el 9% es reciclado, 12% es incinerado y el 79% se encuentra desechado en la naturaleza; anualmente, 8 millones de toneladas de plástico terminan en los océanos (Fuhr y Franklin, 2019).

En el sector alimentario los envases y empaques han sido muy importantes al cubrir características y requisitos específicos, se clasifican en tres categorías: los que están en contacto directo con el alimento se les denomina *primarios*, en esta categoría se encuentran las películas biodegradables y otros materiales flexibles; *secundarios* tienen como finalidad contener uno o más envases primarios y los *terciarios* distribuyen, unifican y protegen al producto en todo el lapso de la cadena comercial (Solano-Doblado *et al.*, 2018). Las películas biodegradables son matrices poliméricas preformadas que pueden ser aplicadas sobre la superficie de un alimento o consumidas (Sharma y Rao, 2015). En la Figura 1 se muestran sus propiedades de barrera ante el intercambio de diferentes sustancias desde el exterior hacia el alimento y viceversa, con la finalidad de evitar la pérdida o ganancia de humedad; además incide en la estabilidad química y microbiológica de los alimentos (McHugh, 2000), al poder incorporar sustancias activas como antimicrobianos, lo que permite retardar o evitar el crecimiento de bacterias, levaduras y hongos en alimentos, y así la vida útil durante el almacenamiento y distribución (Han y Gennadios, 2005).

Por otro lado, se convierten en una favorable alternativa al envase convencional debido a su naturaleza sostenible lo que lo hace amigable con el medio ambiente (Ortega y Peña, 2019), además de facilitar la comercialización y distribución de los alimentos (Espitia *et al.*, 2014)

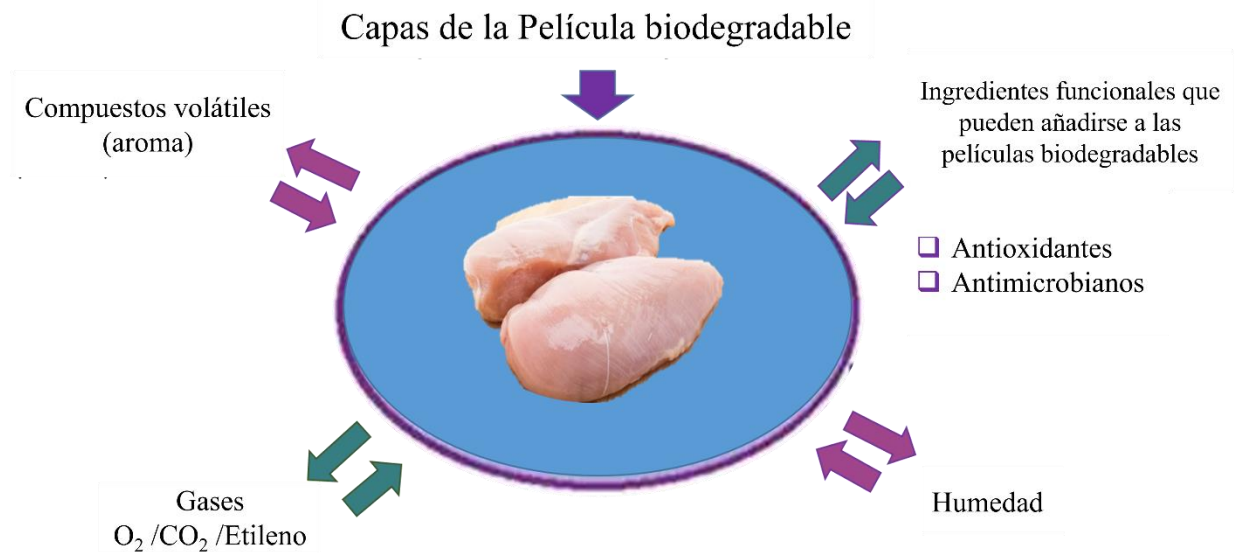


Figura 1. Barrera de transferencias del exterior controladas por la película biodegradable. Modificado de Falguera *et al.* (2011).

Existen diversas técnicas y métodos para elaborar películas biodegradables, entre los cuales se encuentra la gelación térmica, pulverización electrohidronámica, eliminación de disolvente y el método de casting (vaciado en placa), dependiendo de los biopolímeros que los componen (Solano-Doblado *et al.*, 2018). El método de casting consiste en la disolución de los componentes de la película biodegradable y esta es vertida sobre una placa. El disolvente se evapora, bajo condiciones de temperatura de 23 ± 2 °C y humedad relativa de 55 ± 5 %, lo que provoca que de la película biodegradable se forme, teniendo la ventaja de controlar el espesor de la película biodegradable resultante (Escobar *et al.*, 2009).

1.1 Composición de las películas biodegradables

La composición de las películas biodegradables depende de la aplicación deseada, lo cual es determinante para las propiedades mecánicas y de barrera requeridos. Hidrocoloides, proteínas y lípidos son los principales componentes para la formación de películas biodegradables.

Dependiendo del material base de la matriz, será necesario agregar otros componentes como plastificantes tales como glicerol o sorbitol para que la película biodegradable no resulte quebradiza (Domínguez-Courtney y Jiménez-Munguía, 2012). Cabe destacar que para la elaboración de las películas biodegradables se requiere de tres ingredientes principales: el biopolímero, el disolvente y el plastificante.

Los **biopolímeros** más utilizados en la elaboración de películas biodegradables son alginato, pectinas, zeína de maíz, gelatina, colágeno, caseína, almidón, celulosa (Fernández *et al.*, 2015). Los biopolímeros que pueden desarrollar películas biodegradables son aquellos de origen animal, marino, microbiano y agrícola (Figura 2). Los de origen agrícola se clasifican en: hidrocoloides, lípidos/grasas y compuestos.

En los **Hidrocoloides** se encuentran los polisacáridos como celulosa, carragenina, almidón, alginato y pectina; así como proteínas y sus derivados. Les proporcionan a las películas biodegradables buenas propiedades mecánicas y de barrera a los gases (O₂ y CO₂); no obstante, no impiden la transferencia de vapor de agua

Los **lípidos** comprenden componentes de ácidos grasos, acilglicerol y ceras; confieren a las películas biodegradables buenas propiedades de barrera para la humedad, sin embargo, por si solos no tienen capacidad para formar las películas biodegradables.

Los compuestos son aquellas formulaciones mixtas entre hidrocoloides y lípidos que otorgan buena resistencia al vapor de agua, buena integridad y cohesión estructural de la película biodegradable; presentan la ventaja de potenciar las propiedades de cada grupo y disminuir las limitantes individuales (Pastor *et al.*, 2005).

Entre los **disolventes** más utilizados se encuentran el agua, el alcohol y ácido acético. Para solubilizar al biopolímero, generalmente se limita el uso de agua (Taylor *et al.*, 2005); sin embargo, también se reporta el uso de alcohol para la disolución de zeína (Montalvo *et al.*, 2012), ya que este componente es insoluble en agua. Esto es debido a que la zeína es particularmente rica en ácido glutámico, leucina, prolina y alanina, lo que le confiere su naturaleza insoluble; y ácido acético para quitosano (Albarracín-Hernández y Valderrama-Bohórquez, 2014) ya que este polisacárido se disuelve en solventes medianamente ácidos o ácidos.

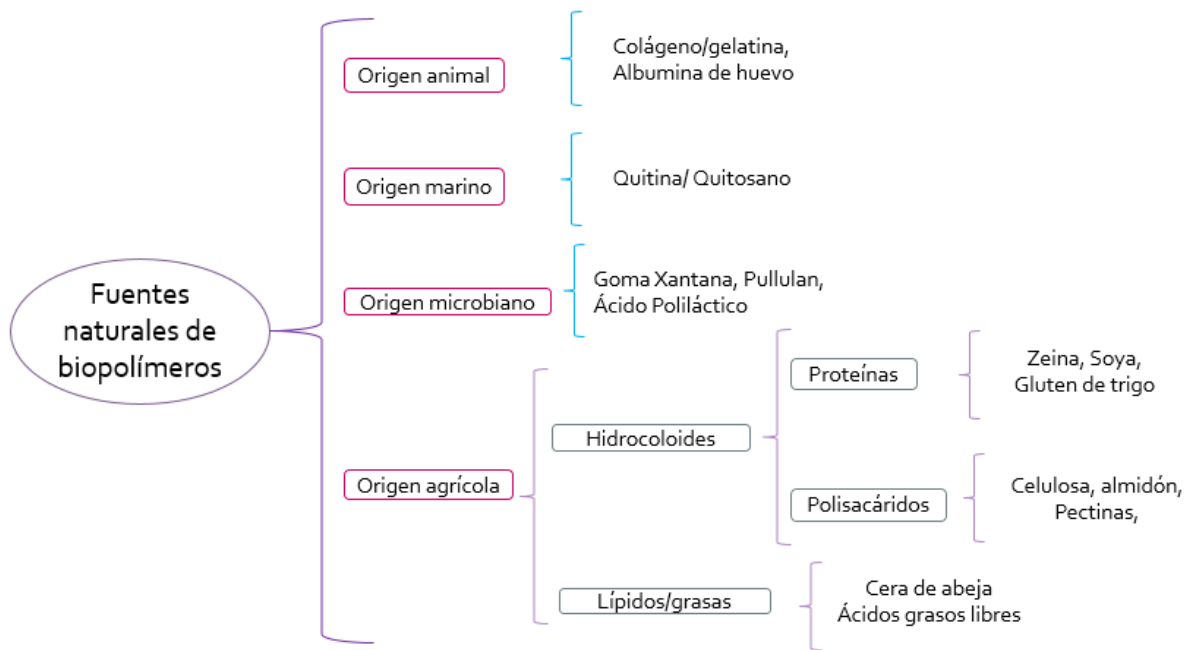


Figura 2. Fuentes naturales de biopolímeros utilizados para la formación de películas biodegradables. Modificado de Parzanese (2006).

Los **plastificantes** son aditivos de bajo peso molecular utilizados para reducir los enlaces intermoleculares de las cadenas de polímeros, lo que modifica las propiedades mecánicas y produce películas biodegradables más flexibles (Campos *et al.*, 2011). Los plastificantes más utilizados son glicerol, polietilenglicol, sorbitol, entre otros.

El glicerol ($C_3H_8O_3$) es un polialcohol incoloro e inodoro, está compuesto por tres grupos hidroxilo que le proporcionan características higroscópicas, es decir, le otorga la capacidad de ceder o absorber la humedad del ambiente que lo rodea. El glicerol es soluble en agua y alcoholes por su capacidad de formar enlaces de hidrógeno (Lafuente, 2017).

El efecto del glicerol en las películas biodegradables mejora las propiedades mecánicas, debido a la reducción de los enlaces intermoleculares de las cadenas de polímeros y hacen las películas más flexibles (Campos *et al.*, 2011). De acuerdo con Jongjareonrak *et al.* (2006) existe mayor flexibilidad y elongación, así como una reducción de fuerza tensil en películas con glicerol como plastificante en comparación con películas con etilenglicol.

Bozdemir y Tutas (2003) mencionan que, hay una relación proporcional con el aumento de la concentración del plastificante y la elongación de las películas, así como la permeabilidad al vapor de agua, y por el contrario reduce la fuerza tensil y fuerza de quiebre. Por su parte, Khairunnisa *et al.* (2018) reportan que, la disminución de la resistencia a la tracción se debe a las concentraciones elevadas de glicerol, de igual manera el porcentaje de alargamiento se vio afectado en películas de alginato

1.1.1 Alginato

El alginato es extraído principalmente de sales sódicas, cálcicas y potásicas provenientes del ácido algínico, siendo la principal macromolécula extraída de las algas pardas (Avedaño-Romero *et al.*, 2013). Los componentes del alginato se dividen en bloques de β -D-manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G) unidos por enlaces 1-4. La distribución de los grupos de β -D-manurónico y ácido α -L-gulurónico constituyen bloques bloques G (-GGG-), bloques M (-MMM-) o en bloques mixtos, o también llamados heteropolímeros donde los bloques G y M se alternan (-MGMG-). Dependiendo del contenido gulurónico, gel formado tendrá características de flexibilidad o rigidez, debido a la distribución de los monómeros en la cadena polimérica, así como la carga y volumen de los grupos carboxilo. El alginato tiene la capacidad de formar geles, que dependiendo del contenido de grupos gulurónicos, los geles tendrán determinadas características de flexibilidad o rigidez. Al haber dominancia de bloques G el gel resulta duro y frágil, contrariamente ante una mayor cantidad de bloques M, los geles son suaves y elásticos.

Los enlaces glucosídicos β (1-4) son los que unen a los bloques MM y MG, mientras que los enlaces glucosídicos α (1-4) unen a los bloques GG y GM (Lupo *et al.*, 2012). Existen cavidades en medio de los bucles de las cadenas, donde los iones de calcio pueden insertarse, lo que da lugar a cambios en su estructura que da pie a un modelo conocido como “modelo caja de huevo” (eggs-box model) (Avedaño *et al.*, 2013), tal como lo muestra la **Figura 3**, se observa el acomodo zigzagueante de dos cadenas de alginato entrelazados con cationes de calcio, lo que estabiliza la estructura por las uniones de ácidos gulurónicos (G- Ca- G), teniendo una proporción 4:1 (G-Ca) (Li *et al.*, 2007).

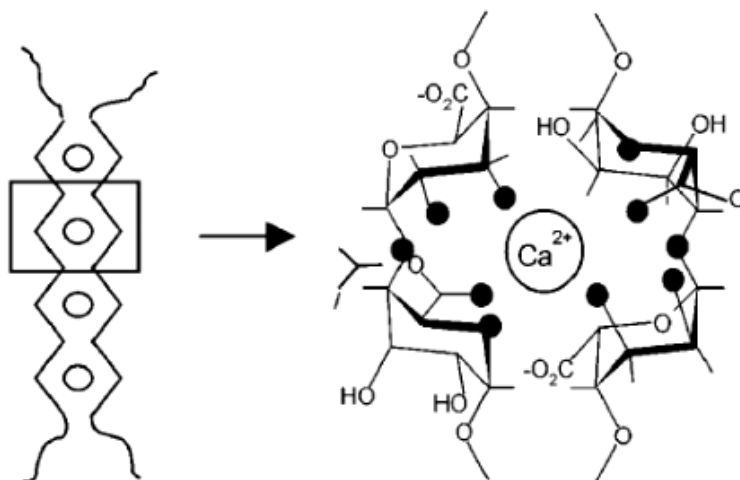


Figura 3. Modelo caja de huevos del alginato en películas biodegradables.
Modificado de Morris *et al.* (1978).

Las películas biodegradables elaboradas con alginato de sodio son muy solubles en comparación con películas a base de otros polisacáridos como carragenina (Méndez-Reyes *et al.*, 2015), eso puede atribuirse a su naturaleza hidrofílica; además, esto mismo le confiere pobres propiedades de barrera al vapor de agua (Tapia *et al.*, 2007). El alginato al mezclarse con diferentes polímeros como el almidón, amplía las funcionalidades de cada polímero como las propiedades mecánicas, otorgándole a la película flexibilidad que por sí solo, el almidón no genera (Méndez-Reyes *et al.*, 2015). Las películas biodegradables de alginato evitan la pérdida de color en carne y la transferencia de gases, además de prevenir la contaminación microbiana (Gheorghita *et al.*, 2020).

Takma y Korel (2019) encontraron que películas de PET (polímero plástico - polietileno tereftalato-poliéster) combinadas con quitosano, alginato y aceite de comino negro (BCO) tienen efecto en la calidad y vida útil de la carne de pechuga de pollo almacenada a 4°C durante 5 días, debido al efecto antimicrobiano del BCO contra *Escherichia coli* y bacterias mesófilas aerobias totales. Alboofetileh *et al.* (2014) demostraron que la aplicación de películas con aceite esencial de mejorana (1%), alginato y arcilla retrasó el crecimiento de *L. monocytogenes* en rodajas de trucha almacenada en refrigeración a 4°C hasta 6.23 log UFC / g en los 15 días de almacenamiento en comparación con las muestras de control de 7.38 log UFC / g.

Oussalah *et al.* (2007) encontraron que una película a base de alginato con aceites esenciales de canela china (*Cinnamomum cassia*) inhibieron eficazmente el crecimiento de *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes* en jamón. Kazemi y Rezaei (2015) reportan que la adición

de gelatina con alginato de sodio y aceite esencial de orégano en trucha arcoíris fresca, retrasó el crecimiento de bacterias ácido-lácticas, *P.seudomonasspp.* y *Enterobacteriaceae* durante 15 d de almacenamiento comparado con el control. Mei *et al.* (2020) reportaron que la bacteriocina EFL4 sintetizada por *Enterococcus faecalis* L04, adicionada a una película de alginato de sodio, redujo significativamente el crecimiento de *L. monocytogenes* y mantuvo la calidad de filetes de salmón fresco durante 8 d de almacenamiento a 4°C.

1.1.2 Almidón

El almidón es un polisacárido que está compuesto por dos unidades de glucosa: amilosa (cadena lineal de 1,4- α -D-glucopiranososa) y amilopectina (molécula ramificada conformada por unidades de α -1,6-glucósido). Entre las principales fuentes para obtener almidón se encuentra la yuca, papa, trigo y maíz (Marcel *et al.*, 2012). El almidón también puede ser nombrado según la fuente de extracción, como féculas cuando es extraído de tubérculos, rizomas o tallos (Rodríguez, *et al.*, 2006).

De acuerdo con la NMX-F-382-1986, la fécula se compone por gránulos pequeños, ligeros y suaves al tacto, no son solubles en agua fría y forman geles viscosos al aumentar su temperatura. Tiene un amplio rango de aplicaciones que van desde adhesivos, manufactura de papel y empaques biodegradables (Hernández *et al.*, 2008). En el Cuadro 1 se muestran el contenido de amilosa y amilopectina en almidones y féculas más comúnmente usadas en la industria.

La amilosa es capaz de formar películas biodegradables fuertes, insípidas, inodoras e incoloras, que al añadir algún plastificante, mejora sus propiedades mecánicas especialmente las que son elaboradas con almidones con alto contenido de amilosa; sin embargo, se ven afectadas por la retrogradación, debido a las dobles hélices en la amilosa y la zona cristalina de la amilopectina que ocasionan el endurecimiento de la película (Fama *et al.*, 2005).

Cuadro 1. Contenido de amilosa y amilopectina en almidones y féculas.

Tipo de almidón o fécula	Amilosa (g/100g de almidón)	Amilopectina (g/100 g almidón)
Trigo	28	72.0
Maíz	27	73.0
Maíz ceroso	0-1	99.0
Papa	21	79.0

Arroz	17	83.0
Arroz ceroso	0-2	98.0
Yuca	17	83.0
Plátano	11	89.0

Fuente: Aparicio-Sanguilán *et al.* (2005)

La gelatinización es el inicio del proceso de transformación del almidón a una película biodegradable, en esta parte los gránulos del almidón forman una red polimérica para posteriormente el gránulo hincharse lo que resulta en la desintegración de los cristales (Pelissari *et al.*, 2019). El almidón no se solubiliza en agua fría, pero cuando se somete a energía térmica y se le añade un plastificante, se revierte el proceso de cristalización volviéndose una matriz continua. En la Figura 4, se observa el proceso de conversión de gránulos de almidón a películas biodegradables: hinchamiento del gránulo, rotura de amilopectina y solubilización de amilosa/amilopectina (Pelissari *et al.*, 2019).

El hinchamiento del gránulo de almidón ocurre por la adsorción de agua además depende de la temperatura, al tener una temperatura elevada la estructura del gránulo colapsa, caso contrario si la temperatura es baja este proceso puede ser revertido. Las moléculas de agua rompen los enlaces de hidrógeno presentes en los grupos de amilopectina, solubilizando completamente las cadenas de amilosa y amilopectina. Resulta en una película de almidón al entrelazarse la amilosa y amilopectina. Dependiendo de cómo se almacenen las películas biodegradables de almidón o si la ruptura de amilosa/amilopectina es incompleto pueden ser propensas a la retrogradación, es decir que las cadenas de amilosa y amilopectina se recrystalizan con el tiempo ocasionando un reordenamiento molecular (Pelissari *et al.*, 2019).

Si el almidón es el único componente en la elaboración de películas biodegradables, resulta en películas quebradizas (Wang *et al.*, 2007), con limitadas propiedades mecánicas y alta permeabilidad al vapor de agua; por lo que, la combinación con otros biopolímeros es necesaria para la producción de mejores características, evitando así dichas limitaciones (Enríquez *et al.*, 2013).

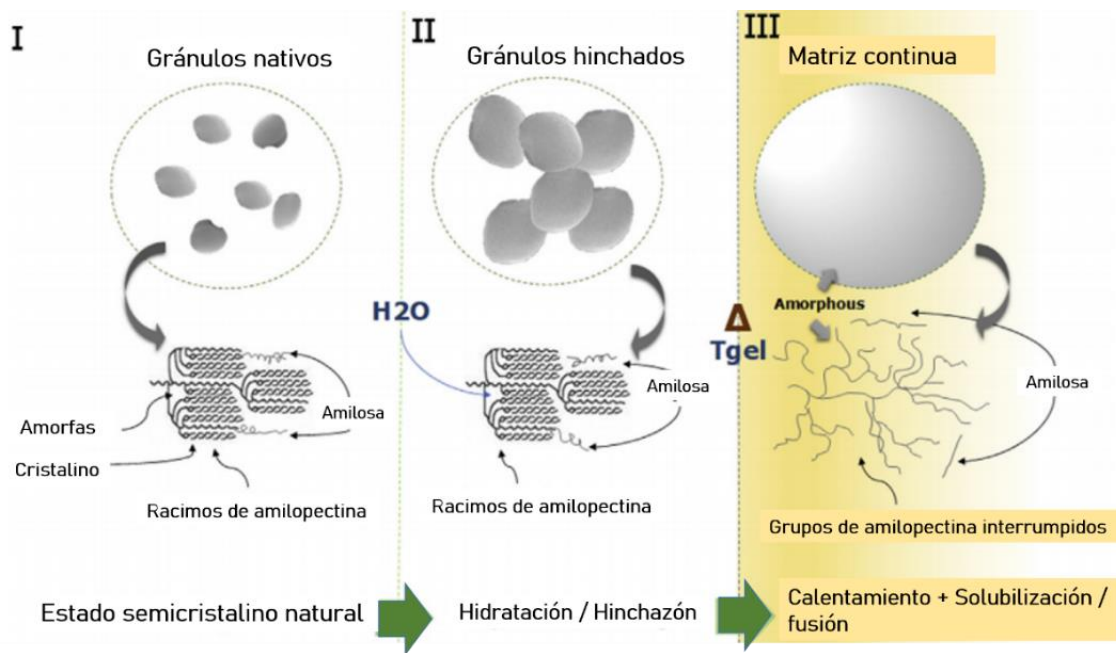


Figura 4. Transformación de gránulos de almidón en películas biodegradables.

Modificado de Pelissari *et al.* (2019)

Tharanathan (2003) menciona que existe una mayor dureza en las películas cuando hay un mayor contenido de amilosa en el almidón. Sin embargo, al adicionar plastificantes las propiedades mecánicas mejoran (Toongdeesoontorn *et al.*, 2011). Vázquez-Luna *et al.* (2019) demostraron que películas con 3% de almidón nanoestructurado con 6% de glicerol tuvieron mejor flexibilidad y son menos frágiles que películas de almidón natural a la misma concentración de glicerol. Asimismo, demostraron al aumentar el porcentaje de almidón el espesor igualmente aumenta.

Durante el calentamiento del almidón ocurre un aumento de la solubilidad, asociado al rompimiento de los gránulos y a la exposición de los grupos hidrófilos (Himeda *et al.*, 2012). Afifah *et al.* (2019) reportaron que una película de almidón de arrurruz (*Maranta arundinacea*) mezclada carragenina y glicerol, tuvo una solubilidad de 71.02%; mientras que, al adicionar antimicrobianos esta disminuyó en un rango de 66.41-60.32%, dependiendo del antimicrobiano (sorbato de potasio, benzoato de sodio y propionato de calcio). De igual manera, Vásconez *et al.* (2009) informaron que la película de almidón de tapioca con quitosano y sorbato de potasio tuvo una solubilidad de 24%, menor que la película de almidón de tapioca con quitosano con 25%.

La producción y caracterización del almidón proveniente de fuentes no convencionales, puede proveer materias primas con propiedades especiales para usos específicos en la industria, como el mango (*Mangifera indica* L.), mapuey (*Dioscorea trifida*) (Rached *et al.*, 2006), quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) (Arzapalo-Quinto *et al.*, 2015) y la malanga (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) (Bello-Pérez *et al.*, 2006) por lo que, podría ser un área de oportunidad para el desarrollo de películas biodegradables.

1.1.2.1 Fécula de malanga

La malanga (*Colocasia esculenta*) es un tubérculo comestible que pertenece a la familia de las Araceae originario de Asia, es una planta herbácea, hidrófila, suculenta. En México, solo Oaxaca, Veracruz y Puebla producen malanga en 100 hectáreas aproximadamente, teniendo alrededor de 2 mil 500 ton destinadas a exportación hacia Estados Unidos y Canadá, con una demanda anual de 30 mil t.

En Veracruz, al ser un cultivo no convencional, tiene poco consumo y difusión destinando su producción a exportación (Mazariegos *et al.*, 2017), lo que causa que la población desconozca los beneficios y propiedades entre los que se destaca un alto contenido de almidón (30-85% en base seca) y proteínas (1.4-7.0%). Contiene además fibra (0.6-0.8%), calcio, vitamina A, C, y fósforo (Dendy, 2001). En este sentido, las féculas extraídas a partir de raíces y tubérculos utilizados como materia prima para la elaboración o desarrollo de nuevos productos alimenticios, es una alternativa favorable para promover e incrementar la demanda y producción de estos (Pacheco y Techeira, 2009).

La extracción de las féculas de raíces y tubérculos son más fáciles y menos costosos que los almidones de cereales, al evitar procesos industrializados (Torres *et al.*, 2013). La malanga tiene propiedades funcionales como texturizante, espesante, aglutinante y gelificante lo que la vuelve idónea para la elaboración de películas biodegradables (Tapia *et al.*, 2012).

Los gránulos del almidón de malanga tienen una forma esférica y poligonal y la estructura de la amilopectina se asocia con el origen botánico, al ser más grandes pueden formar pastas con alta viscosidad, lo que influye en las propiedades fisicoquímicas, funcionales y nutricionales (Torres *et al.*, 2014). Siskawardani y Hidayat (2020) determinaron que la fécula de malanga y glicerol

influyen sobre las propiedades físico-mecánicas de una película comestible. Reportando que el mejor tratamiento fue fécula de malanga al 3% y glicerol al 25%, con espesor (0,15 mm), solubilidad (23,48%), fuerza tensil (10.63 MPa) y elasticidad (60.21%).

1.2 Propiedades de las películas biodegradables

Los componentes con los que se elaboran las películas biodegradables influyen en las propiedades que brindan (Romero y Estrada, 2011), entre las que se encuentran las propiedades de barrera, la permeabilidad al vapor de agua, las propiedades mecánicas y las propiedades físicas (ópticas, solubilidad, espesor).

Una de las características más importantes es la propiedad de barrera, se enfoca en encontrar un equilibrio ante el intercambio de O₂, CO₂ y vapor de agua, siendo dependiente de la humedad relativa del exterior de la película. La mayoría de los biopolímeros son semi permeables a los gases, como los hidrocoloides que forman redes intermoleculares convirtiéndolos en buenos materiales para la formación de películas al presentar buenas propiedades de barrera a gases y propiedades mecánicas (Silva-Weiss *et al.*, 2013).

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) de una película es una propiedad muy importante que controla el transporte de agua a través de esta (Solis, 2016). Se ve afectada por la concentración de los plastificantes ya que estos disminuyen las fuerzas intermoleculares de los biopolímeros haciendo las redes más abiertas, a mayor concentración de plastificante mayor será la permeabilidad (Arias-Moscoso, 2009). De igual manera hay una relación con el espesor de las películas: al incrementar el espesor la transferencia de masa será mayor, lo que ocasiona que la presión de vapor de agua en la superficie de la película sea mayor (Trejo *et al.*, 2001).

Las propiedades mecánicas están relacionadas con la estructura química de la película. La estructura química de la película otorga las propiedades mecánicas de estas, la fuerza tensil es la máxima resistencia que tiene la película ante el estiramiento, es parámetro más común para medirlo es MPA, la fuerza de quiebre es la fuerza necesaria para que la película se rompa; mientras que la elongación (%) es el estiramiento que resiste la película hasta el rompimiento (Yang y Paulson, 2000), en este parámetro el plastificante presenta gran influencia al eliminar enlaces de hidrógeno aumentando la movilidad de las cadenas de biopolímeros (Rosales, 2016).

1.3 Películas biodegradables con propiedades bioactivas

Con el fin de alargar la conservación o mejorar la calidad de los alimentos, se han incorporado ingredientes bioactivos a los empaques para liberarse o ser absorbidos por el alimento. Estos empaques además de proporcionar propiedades de barrera a factores externos dañinos al alimento lo protegen de alteraciones química, enzimática y biológica (Gómez-Estaca *et al.*, 2014). Dependiendo del aditivo adicionado, las propiedades bioactivas se pueden clasificar como vitaminas, saborizantes, fármacos, antioxidantes, colorantes y antimicrobianos (Bruna *et al.*, 2014).

En la industria cárnica se han empleado las películas biodegradables para reducir la pérdida de humedad y calidad de esta evitando cambios en su color, sabor y textura, además de evitar la oxidación de lípidos y mioglobina, y una menor contaminación de microorganismos patógenos (Sánchez-Ortega *et al.*, 2014). Amiri *et al.* (2019) encontraron que películas de almidón de maíz con nanoemulsión de aceite esencial de *Zataria multiflora* fortificado con cinamaldehído presenta mayor actividad antioxidante en empanadas de carne molida fresca a los 20 días de almacenamiento en refrigeración. Bojorges *et al.* (2020) reportan que la cúrcuma en una película de alginato aplicada a carne aumentó la capacidad antioxidante y extendió la vida útil de la carne de cerdo 12 d, res 16 d y pollo 12 d en almacenamiento refrigerado.

1.4 Películas biodegradables antimicrobianas

Existe una variedad de sustancias antimicrobianas que se pueden incorporar a las películas biodegradables como sorbato de potasio, aceites esenciales como el de orégano y tomillo (Solano y de Rojas-Gante, 2012), enzimas como la lisozima (Díaz-González, 2015) y bacteriocinas como la nisina y pediocina (Narsaiah *et al.*, 2015). Ortega-Toro *et al.* (2016) indican que los antimicrobianos alargan la vida útil de los alimentos al evitar o reducir el crecimiento de microorganismos. Los antimicrobianos pueden dividirse en dos grupos de acuerdo con su mecanismo de acción: 1) los que migran hacia la superficie del alimento total o parcialmente y 2) los que contienen los antimicrobianos en la superficie de una película (Vázquez-Briones y Guerrero-Beltrán, 2013).

Al incorporar antimicrobianos a las películas biodegradables se espera que pueda migrar a la superficie del alimento, esta migración depende en gran medida de las interacciones electrostáticas

que hay entre el antimicrobiano y el biopolímero, además de los cambios físicos y estructurales ocasionados por los antimicrobianos (Sebti *et al.*, 2007).

Para la difusión del antimicrobiano se debe tomar en cuenta diversas características de la película, como el biopolímero con el que está elaborada o el proceso de elaboración, además de considerarse las características del alimento que se va a aplicar como el pH o la actividad de agua; incluso las condiciones de almacenamiento como el tiempo y temperatura (Lin y Zhao, 2007). Sin embargo, se busca que los antimicrobianos sean de origen natural al verse expuestos la poca inocuidad de los aditivos químicos empleados para la elaboración de películas (Ávila-Sosa *et al.*, 2012).

1.4.1 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos producidas por bacterias ácido-lácticas (BAL), no son formadoras de esporas, tienen forma de bacilos o cocos, carecen de motilidad y durante su fermentación sintetizan ácido láctico (Siamansouri *et al.*, 2013). Son reconocidas como GRAS, no son tóxicas ya que son inactivadas por enzimas proteolíticas, presentan acción bactericida frente a diversas bacterias patógenas, actuando sobre la membrana citoplasmática del microorganismo. Al ser inactivadas por las enzimas proteolíticas no son tóxicas, lo que le vale su reconocimiento como GRAS, son bactericidas ante bacterias patógenas teniendo acción sobre la membrana citoplasmática de la bacteria (Settanni y Corsetti, 2008).

Presentan distintos mecanismos de acción, distintos pesos moleculares y propiedades fisicoquímicas (Stoyanova *et al.*, 2012). Al ser catalogadas como seguras para consumo y no tóxicas, son de gran utilidad para la industria alimentaria; además de mostrar un alto nivel de inhibición (Nes *et al.*, 2007). Al contener residuos de aminoácidos (histidina y lisina) les confiere carácter catiónico (pH neutro); además ser anfipática y tener naturaleza hidrofóbica debido al triptófano, fenilalanina, metionina, isoleucina, prolina, alanina, leucina y valina (Yusuf, 2013).

Se han categorizado en cinco clases de acuerdo con varios aspectos de clasificación entre los cuales se distinguen los microorganismos productores, propiedades físicas, estructuras químicas, pesos moleculares, características génicas y bioquímicas y el modo de acción (Balciunas *et al.*, 2013): Existen cinco clasificaciones de los péptidos, Los lantibióticos o péptidos de clase I, tienen muy bajo peso molecular, termorresistentes y están conformados estructuralmente por aminoácidos no

comunes como dehidroxilamina, dehidrobutirina, metilantionina y lantionina. Regularmente se presentan de forma lineal tal es el caso del tipo donde la más representativa es la nisina, o de forma globular donde pertenecen el tipo B, como el caso de la mersacidina. en la clase II, se localizan los péptidos termoestables, donde a su vez, esta clase ha sido dividida en cinco subclases (IIa, IIb, IIc, IId, y IIe), donde la IIa actúa fuertemente contra *Listeria*, la subclase IIb como la plantaricina, son bacteriocinas que son formadas por dos péptidos; en la subclase IIc se hallan las bacteriocinas como la lactococcina A, que no son similares con otra bacteriocina; la clase IId son péptidos lineales donde se encuentra la lacticina Q y finalmente la clase IIe donde las bacteriocinas son resultado de la degradación de proteínas más grandes.

La clase III son péptidos de elevado peso molecular, menos a 30 kDa donde la helveticina es la bacteriocina representativa. La clase IV son péptidos de estructura compleja, regularmente asociados a carbohidratos o lípidos. La clase V son péptidos de estructura circular que no poseen modificaciones post-traduccionales, siendo la enterocina AS-48 la bacteriocina representativa

Las bacteriocinas desestabilizan las funciones de la membrana, por la formación de poros. Estructuralmente se conforman por un lado hidrofóbico y otro hidrofílico, el lado hidrofóbico se sitúa cerca de los lípidos de la membrana mientras que el lado hidrofílico es el encargado de crear oligómeros que forman poros en la membrana logrando atravesarla (Chen y Hoover, 2003), resultado en lisis y pérdida de iones de potasio y ATP; lo que ocasiona pérdida de la regeneración de la membrana, energía celular y síntesis de ADN, ARN y proteínas (McAuliffe *et al.*, 2001).

De acuerdo con lo reportado por Cleveland *et al.* (2001), las bacteriocinas pueden utilizarse como iniciadores de alimentos fermentados, pueden ser añadidas directo al producto y aplicarse como aditivo en alimentos; para esto último deben cumplir con regulaciones (Gautam y Sharma, 2009), para no suponer riesgo a la salud, la cepa productora debe ser GRAS y ser inhibidoras de microorganismos patógenos

La pediocina o nisina son ejemplos de bacteriocinas con efectos favorables contra bacterias patógenas en productos cárnicos. Algunos estudios se enfocan en la adición de dichas bacteriocinas de diversas maneras, directo a la carne antes de su calentamiento o antes de su envasado y añadiéndolo a películas biodegradables (Murphy *et al.*, 2005).

1.4.2 Nisina

La nisina es un péptido de 34 aminoácidos con bajo peso molecular (3.4 kDa) producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (McAuliffe *et al.*, 2001). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) es la única bacteriocina utilizada para conservar alimentos, es eficaz con el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* spp, entre otras (Bouttefroy y Millière, 2000). Govaris *et al.* (2010) demostraron la inactividad de la nisina frente a bacterias Gram-negativas debido a una segunda membrana externa, carente en las Gram-positivas.

En la industria alimentaria ha sido utilizada como conservador en vino y cerveza, al evitar la fermentación y deterioro del producto. Existe un límite máximo de 25 mg/kg para su aplicación en carne establecido por los métodos estándares del instituto británico (FDA, 2012).

Abdollahzadeh *et al.* (2014) encontraron que la mezcla de aceite esencial de tomillo y nisina tiene un efecto bacteriostático contra *L. monocytogenes* aplicado a pescado picado almacenado en frío. Por otra parte, Kara *et al.* (2014) reportaron que la aplicación de nisina en hamburguesas de pollo inoculadas con *L. monocytogenes* redujo alrededor de 1-2 UFC/g el crecimiento de la bacteria almacenadas a 4°C por 7 d.

La nisina tiene un mecanismo de acción dual; mediante atracciones electrostáticas se adhiere a la pared celular de la bacteria como se muestra en Figura 5; para posteriormente ligarse al lípido II evitando la correcta síntesis de pared celular, formando un poro en la membrana lo que ocasiona la salida de ATP y otras moléculas causando la muerte celular (Hassan *et al.*, 2012). Basch *et al.* (2013) reportan que la combinación de nisina (3000 UI) con sorbato de potasio (0.3%), en una película de almidón (3%) e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) lograron un mejor rendimiento al combinarlos contra *Listeria innocua* que de manera separada. Además, los agentes antimicrobianos, modificaron las propiedades físicas y mecánicas de la película.

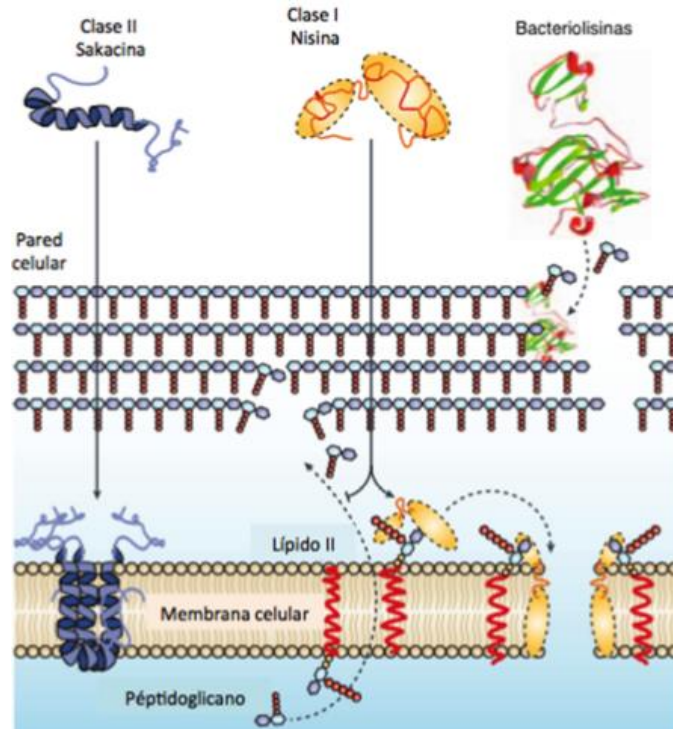


Figura 5. Mecanismo de acción de la nisina. Modificado de Cotter *et al.* (2005)

2. Carne de pollo

La carne es el resultado de una serie de conversiones bioquímicas después de la muerte del animal, que durante dicho proceso las fibras musculares se adaptan a la ausencia de nutrientes y oxígeno, modificando su metabolismo aeróbico a anaeróbico. La menor generación de ATP favorece la producción de ácido láctico que, al acumularse disminuye el pH a neutro a 5.4-5.8 del tejido. Por otra parte, las fibras no pueden mantener condiciones reductoras ocasionando el *rigor mortis* dando pie al proceso de maduración (Huff-Lonergan *et al.* 2010).

La carne de pollo es rica en hierro, potasio, fósforo, zinc, aminoácidos, omega 6 y 3 lo que la vuelve en una en una fuente de proteína con alto valor biológico y nutritivo (USDA, 2014), además de un contenido nulo de grasas (Martínez y Mora, 2010). En la vida útil de la carne se mantienen las características sensoriales, microbiológicas, nutricionales superando la aceptabilidad de los consumidores (Giannakourou *et al.*, 2001). La carne de pollo es dependiente de pH, actividad de agua, carga microbiana inicial, temperatura y empaque de almacenamiento (Málave, 2006).

El crecimiento de microorganismos en la carne dependerá de los buenos prácticas de producción, es decir del manejo del animal vivo, la matanza y la manipulación de las canales (López y Casp, 2004), ya que en la superficie existen microorganismos que influirán en la calidad de la carne (Sofos, 2003). La carne de pollo tiene una vida útil de 6 días aproximadamente, pudiendo incrementar hasta 15 días cuando se aplica un envasado modificando su atmósfera con con 60 a 80% de CO₂ lo que inhibe la microbiota aerobia (Doyle y Buchanan, 2013). Generalmente, son tres tipos de microorganismos que componen la población microbiana de la carne de pollo: la flora que se transmite en el proceso de matanza de las plumas a la piel, la floral que existe naturalmente de la piel, los que se adhieren a la piel del pollo en el procesamiento (Mead, 2005).

Al ser altamente nutritiva, la carne de pollo es muy susceptible a microorganismos patógenos principalmente: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp y *Yersinia enterocolitica* lo que repercute en la calidad de la carne al provocarle malos olores (Montville *et al.*, 2012). En caso de *Listeria*, es una bacteria que al ser termorresistente se vuelve muy infecciosa. Debe tomarse precauciones con la manipulación de carne cruda (Palacios-Aguilera, 2017).

2.1 *Listeria monocytogenes*

Es un bacilo Gram-positivo no formador de esporas, termorresistente pudiendo crecer a 4-8°C (Cruz-Pulido *et al.*, 2012; Castañeda *et al.*, 2013) y tolerante a pH ácidos y concentraciones altas de NaCl (Olivares, 2009), responsable de la listeriosis al consumir alimentos contaminados por esta bacteria. Es un patógeno anaerobio facultativo que puede multiplicarse tanto en las células endoteliales, epiteliales, hepatocitos y fagocitos (Torres *et al.*, 2005). Se ha observado que no puede multiplicarse en carne empacada con atmosferas modificadas almacenadas en frío

Sogut y Seydim (2019) probaron los efectos de películas a base de extracto de semilla de uva (GSE) (al 5, 10 y 15%) incorporado en la película de quitosano (CH) sobre la calidad de los filetes de pechuga de pollo envasados al vacío para *L. monocytogenes* inhibiéndolo en su totalidad. Martillanes *et al.* (2021) encontraron que una película de quitosano con extracto de salvado de arroz con nisina con altas presiones de 600 MPa, tiene efecto antimicrobiano contra *L. monocytogenes* aplicado a jamón ibérico curado loncheado almacenado por 36 h a 4°C.

3. Interacción empaque-alimento

Con el fin de proteger a los alimentos y conservar su calidad durante toda la cadena de comercialización, los empaques y envases juegan un papel muy importante al interferir entre ellos y el entorno, sin embargo, es trascendental que el empaque sea inocuo a la salud del consumidor (García y Pedlowski, 2014). Existen metodologías para medir la interacción del empaque y el alimento (Restrepo, 2014).

Existe evidencias que confirman la migración de los materiales de empaques hacia los alimentos, partiendo de esto la migración es la difusión o transferencia de compuestos de bajo peso molecular hacia un alimento, influyendo negativamente en la seguridad y calidad de estos (Enguita, 2020). Se calcula con la siguiente ecuación:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \right)$$

Siendo C la concentración del migrante, x la posición y t el tiempo de exposición. Para describir la velocidad y su extensión debe considerarse el estudio de la cinética y la termodinámica (Torre, 2017).

La migración debe considerarse la composición y naturaleza del empaque que permitirá conocer las sustancias a migrar; la temperatura ya que el proceso aumenta cuando la temperatura aumenta; la forma y tamaño del empaque; el estado del alimento y el tipo de contacto que el material tendrá con él y el tiempo de contacto que varía entre horas hasta años (Barnes *et al.*, 2006).

Existen factores que aumentan este proceso, como el aumento de la temperatura, aumento del tiempo de contacto o las concentraciones altas de los compuestos migrantes; existen también factores que disminuyen el proceso de la migración como las sustancias de mayor peso molecular en el material de envasado, la baja difusividad del material o los alimentos secos (Torre, 2017)

La cantidad total transferida del empaque al alimento es definida como migración global, mientras que la cantidad de una sustancia en específico que es transferida del envase al alimento es la migración específica (Otín-Acín, 2011).

Los estudios de migración se pueden realizar *in vivo* experimentando con el tejido vivo, o *in vitro* en tubos de ensayo o ambientes controlados (Pereira-Vega, 2015) utilizando simulantes alimentarios que sustituyen a los alimentos reales y simplifican los análisis de migración (Enguita, 2020) como se muestra en el Cuadro 2:

Cuadro 2. Simulantes alimentarios en la industria alimentaria.

Simulante alimentario	Abreviatura	Tipo de alimento que simulan
Etanol 10% (v/v)	Simulante alimentario A	Alimentos hidrofílicos
Ácido acético 3% (w/v)	Simulante alimentario B	Alimentos hidrofílicos con pH<4.5
Etanol 20% (v/v)	Simulante alimentario C	Alimentos hidrofílicos con alcohol <20%
Etanol 50% (v/v)	Simulante alimentario D1	Alimentos lipofílicos, alimentos sin alcohol >20% y aceite en emulsiones acuosas
Aceite vegetal	Simulante alimentario D2	Alimentos lipofílicos con grasas libre en la superficie
Poli (óxido de 2,6-difenil-p-fenileno), tamaño de partícula 60-80 malla, tamaño de poro 200 nm	Simulante alimentario E	Migración específica en alimentos secos

Fuente: (Torre, 2017).

4. Métodos de superficie de respuesta

Son una serie de técnicas matemáticas y estadísticas donde se modela y analiza problemas en los que una o más respuestas de interés son influenciadas de variables, el propósito de estas técnicas son la optimización de la variable de respuesta, esta optimización se utiliza como un sistema operativo eficiente y un proceso unitario para obtener una solución altamente aceptable (Noshad *et al.*, 2011).

Thakur *et al.* (2017) reportaron que la concentración de quitosano, almidón de guisante y glicerol tuvo efectos significativos sobre las propiedades físicas y mecánicas de la película, además la formulación óptima para la elaboración de la película comestible fue 1% de quitosano, 1,5% de almidón de guisantes y 0,5% de glicerol obteniendo películas con buenas propiedades físicas y mecánicas.

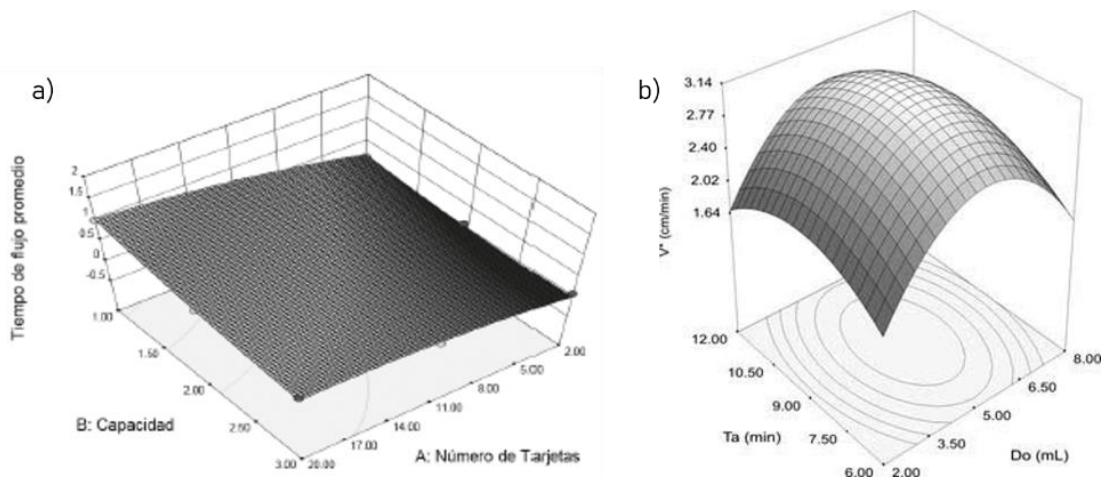


Figura 6. Ejemplos de superficie de respuesta a) sin curvatura b) con curvatura. Tomado de: Oviedo-Trespalcios y Peñabaena (2015).

Bezerra et al. (2008) establecen que el dominio experimental, comprende el campo experimental a investigar y reconoce los límites mínimo- máximo de las variables experimentales en un estudio. El diseño experimental, básicamente es todo un conjunto de experimentos específicos, que cuenta con una serie de combinaciones entre las variables que pueden manifestarse, dentro de dicho experimento, para obtener respuestas. Dentro de ese conjunto de variables, pueden reconocerse; factores o variables independientes, las cuales se definen como todas aquellas variables experimentales que tienen la posibilidad de intercambiarse independientemente unas de otras y los niveles de una variable hacen referencia a los valores diferentes que presentan o pueden presentar las variables experimentales.

Por otro lado, las variables dependientes son los valores obtenidos de los resultados de los experimentos. Y cuando se habla del residual, se hace referencia a la diferencia entre los resultados calculados y experimentales para un conjunto dado de condiciones. Un buen modelo matemático debe poder adaptarse a datos experimentales y exhibir valores residuales bajos.

4.1 Diseño Box-Behnken

El diseño Box-Behnken se utiliza con tres factores y tres niveles por factor como mínimo (-1, 0, +1) con el fin de poder ajustar superficies de respuesta. Sin embargo, no considera puntos en los vértices del diseño cúbico o puntos factoriales. El número de experimentos requeridos procede de la ecuación $N=2k(k-1) + np$ donde k es el número de factores y np el número de puntos centrales,

los factores solo se logran ajustar a tres niveles en intervalos iguales entre los niveles (Ferreira *et al.*, 2007).

Dado que los diseños Box-Behnken generalmente tienen menos puntos de diseño, presentan la ventaja de ser menos costosos de realizar que los diseños centrales compuestos con el mismo número de factores como se muestra en la Figura 7.

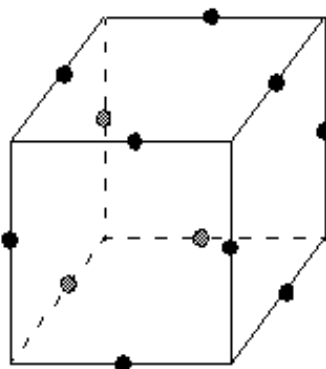


Figura 7. Diseño Box-Behnken de tres factores. Tomado de Bezerra *et al.* (2008).

Los diseños de Box-Behnken al no tener puntos axiales, garantiza que todos los puntos del diseño estén dentro de la zona de operación segura. También aseguran que no se establezcan todos los factores se fijen en su nivel alto al mismo tiempo (Yaguas, 2016).

Rangel-Marrón *et al.* (2019) encontraron que utilizando un diseño Box-Behnken, las variables independientes (glicerol, alginato y ácido cítrico), afectaron a la fuerza de punción y al porcentaje de elongación, esto debido al aumento de la concentración de glicerol, las películas de puré de papaya se volvían más permeables al vapor de agua.

LITERATURA CITADA

- Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., Hosseini, H., 2014. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*, 35:1.
- Alboofetileh, M., Rezaei, M., Hosseini, H., Abdollahi, M. 2014. Antimicrobial activity of alginate/clay nanocomposite films enriched with essential oils against three common foodborne pathogens. *Food Control*, 36(1): 1-7.
- Acuña, P. V. R. 2016. La innovación como proceso y su gestión en la organización: una aplicación para el sector gráfico colombiano. *Suma de negocios*, 7(16): 125-140.
- Afifah, N., Ratnawati, L., Darmajana, D. A. 2019. Evaluation of plasticizer addition in composite edible coating on quality of fresh-cut mangoes during storage. In IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science*, 251 (1).
- Albarracín-Hernández, W., y Valderrama-Bohórquez, N. 2014. Chemical compounds inclusion in chitosan polymeric matrices and their effect on film properties. *Vitae*, 21(1): 49-59.
- Arias-Moscoso, J. L. 2009. Estudio de biopelículas de compositos de colágeno de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) y quitosina. Master's tesis.
- Arzapalo-Quinto, D., Huamán-Cóndor, K., Quispe-Solano, M., Espinoza-Silva, C. 2015. Extracción y caracterización del almidón de tres variedades de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) negra collana, pasankalla roja y blanca junín. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 81(1): 44-54.
- Amiri, E., Aminzare, M., Azar, H. H., Mehrasbi, M. R. 2019. Combined antioxidant and sensory effects of corn starch films with nanoemulsion of *Zataria multiflora* essential oil fortified with cinnamaldehyde on fresh ground beef patties. *Meat Science*, 153: 66-74.
- Aparicio-Saguilán, A., E. Flores-Huicochea, J. Tovar, F. García-Suárez, F. Gutiérrez-Meraz, L. A. Bello-Pérez. 2005. Resistant starch-rich powders prepared by autoclaving of native and lintnerized banana starch: partial characterization. *Starch/ Stärke*, 57: 405-412.
- Avendaño-Romero, G., A. López-Malo, E. Paolu, 2013, Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(1): 87-96.
- Ávila-Sosa, R., E. Palou, M.T.J. Munguía, G.V. Névarez-Moorillón, A.R.N. Cruz, A. López-Malo, 2012, Antifungal activity by vapor contact of esencial oils added to amaranth, chitosan or starch edible films. *International Journal of Food Microbiology*, 153 (1-2): 66-67.
- Balciunas, E.M., Castillo M, F.A., Todorov, S.D., Franco, B.D.G.D.M., Converti, A., Oliverira, R.P.D.S. 2013. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 32 (1): 134-142.
- Basch, C. Y., Jagus, R. J., Flores, S. K. 2013. Physical and antimicrobial properties of tapioca starch-HPMC edible films incorporated with nisin and/or potassium sorbate. *Food and Bioprocess Technology*, 6(9): 2419-2428.

- Barnes K. M., Sinclair R., Watson D. 2006. (1ed). Chemical migration and food contact materials. Reino Unido: Woodhead Publishing.
- Bello-Pérez, L., Gutiérrez-Meraz F., Rivero M., Soto R., Vargas-Torres A. 2006. Extrusión de almidones de fuentes no convencionales para la producción de almidón resistente. *Agrociencia*, ISSN 1405-3195, 40 (4): 441-448.
- Bezerra, M., Santelli, R., Oliveira, E., Villar, L., Escaleira, L. 2008. Response Surface Methodology (RSM) as a Tool for Optimization in Analytical Chemistry. *Talanta*, 76: 965-77.
- Bojorges, H., Ríos-Corripio, M. A., Hernández-Cázares, A. S., Hidalgo-Contreras, J. V., Contreras-Oliva, A. 2020. Effect of the application of an edible film with turmeric (*Curcuma longa* L.) on the oxidative stability of meat. *Food Science & Nutrition*, 8(8): 4308-4319.
- Bouttefroy A, Mansour M, Linder M, Milliere J. 2000. Inhibitory combinations of nisin, sodium chloride, and pH on *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in broth by an experimental design approach. *International Journal Food Microbiology*, 54:109-115.
- Bozdemir, Ö., Tutas, M. 2003. Plasticizer effect on water vapour permeability properties of locust bean gum-based edible films. *Turkish Journal of Chemistry*, 27(6): 773-782.
- Bruna, J.E., Castillo, M., Ocampo, R., Rodríguez, F., Guarda, A., Galotto, Ma J. 2014. Eco-compositos basados en un desecho agroindustrial y poliácido láctico con actividad antimicrobiana y antioxidante para potencial uso en envases de alimentos. En Libro de Actas del Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos CIBIA 9. 1: 413- 420.
- Campos, C.A., Gerschenson, L.N., Flores, S.K. 2011. Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food Bioprocess Technoligal*, 4:849-875.
- Cano-Serna D, Gómez-Marín A, Oviedo-Gallego V, Ríos-Osorio LA. 2015. Nisina como conservante de alimentos: revisión sistemática de la literatura. *Hechos Microbiológicos*, 6 (1-2):52-64.
- Castañeda S, M. del P., Braña V, D., Rosario C, C., Martínez V, W. 2013. Calidad microbiológica de la carne de pollo. Libro técnico. Fisiología y mejoramiento animal.
- Chen, H., Hoover, D.G. 2003. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews. Food Science and Food Safety*, 2:82-100.
- Cleveland, J., Monteville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71(1):1-20.
- Cotter, P.D., Hill, C., Roos, R.P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10): 777-788.
- Cruz-Pulido, W.L., Rivera-Sánchez, G., Ávila-Aguilar, S., Cantú-Ramírez, R., Garza-González, E., Sierra-Juárez, G., Téllez-Luis, S., Bocanegra-García, V. 2012. *Listeria* sp. y *Listeria monocytogenes* en pollo congelado: detección por NOM-143-SSA1-1995 y PCR de

- expendios comerciales de Matamoros y Reynosa, Tamaulipas, México. *Ciencia UAT*, 6 (3): 41-47.
- Dendy, D.A. 2001. Composite and alternative flours. In *Cereal Products*. Eds. Dendy D.A. & Dobraszczyk B.J. Aspen Publisher Inc. 263-275.
- Díaz-González R. 2015. Films biodegradables antimicrobianos a base de almidón y gelatina. Universitat Politècnica de Valencia, 1-21.
- Domínguez-Courtney, M. F., y Jiménez-Munguía, M. T. (2012). Películas comestibles formuladas con polisacáridos: propiedades y aplicaciones. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6(2): 110–121.
- Doyle, M.P., Buchanan, I.P. 2013. *Food microbiology: Fundamentals and frontiers* 4^a Edn American society for microbiology press, Washington.
- Enguita P, A. 2020. Migración de sustancias desde materiales en contacto con alimentos/ simulantes alimentarios. Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, España.
- Escobar, D., Sala, A., Silvera, C., Harispe, R., Márquez, R. 2009. Películas biodegradables y comestibles desarrolladas en base a aislado de proteínas de suero lácteo: estudio de dos métodos de elaboración y del uso de sorbato de potasio como conservador. *Revista del Laboratorio tecnológico del Uruguay*, 4: 33-36.
- Espitia, P. J. P., Du, W. X., Avena-Bustillos, R. D. J., Soares, N. D. F. F., McHugh, T. 2014. Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties-a review. *Food Hydrocolloids*, 35: 287– 296.
- Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A., Ibarz, A. 2011. Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6): 292-303.
- Fama, L., Rojas, A. M., Goyanes, S., Gerschenson, L. 2005. Mechanical properties of tapioca-starch edible films containing sorbates. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 38(6): 631-639.
- FAO. 1999. Cumbre Mundial sobre la Alimentación
- Ferreira S. L. C., R. E. Bruns, H. S. Ferreira, G. D. Matos, J. M. David, G. C. Brandão, E. G. P. da Silva, L. A. Portugal, P. S. dos Reis, S. Souza, and W. N. L. dos Santos. 2007. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597: 179-186
- Fernández V, D., Bautista B, S., Fernández V, D., Ocampo R, A., García P, A., Falcón R, A. 2015. Películas y recubrimientos comestibles: una alternativa favorable en la conservación poscosecha de frutas y hortalizas. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 24(3): 52-57
- Formichella, M. 2005. La evolución del concepto de innovación y su relación con el desarrollo. Argentina: INTA.
- Fuhr, L., Franklin, M. 2019. Atlas del plástico: datos y cifras sobre el mundo de los polímeros sintéticos. Segunda edición. Talleres Gráficos UCA, El Salvador.

- García, M. B., Pedlowski, L. M. 2014. Evaluación del conocimiento del consumidor acerca de los riesgos asociados al uso de recipientes plásticos durante el calentamiento de alimentos (Doctoral dissertation, Universidad Argentina de la Empresa).
- Gautam, N., Sharma, N. 2009. Bacteriocin: safest approach to preserve food products. *Indian Journal of Microbiology*, 49(3): 204-211.
- Gheorghita Puscaselu, R., Lobiuc, A., Dimian, M., Covasa, M. 2020. Alginate: From food industry to biomedical applications and management of metabolic disorders. *Polymers*, 12(10): 2417.
- Giannakourou, M., Koutsoumanis, K., Nychas, G., Taoukis, P. 2001. Development and assessment of an intelligent shelf life decision system (SLDS) for quality optimization of the food chill chain. *Journal of Food Protection*, 64 (7): 1051-1057.
- Gómez-Estaca, J., López-de-Dicastillo, C., Hernández-Muñoz, P., Catalá, R., Gavara, R. 2014. Advances in antioxidant active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 35(1): 42-51.
- Govaris, A., Solomakos, N., Pexara, A., Chatzopoulou, P. S. 2010. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella Enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage. *International journal of food microbiology*, 137(2-3): 175-180.
- Guzmán, L. E., Acevedo, D., Romero, L., Estrada, J. 2015. Elaboración de una película comestible a base de colágeno incorporado con nisina como agente antimicrobiano. *Información tecnológica*, 26(3):17-24.
- Han, J. H. y Gennadios, A. 2005. Edible films and coating: a review. En: J. H. Han (Eds). *Innovations in food packaging. Elsevier Academic Press*, 239-276.
- Hassan, M., Kjos, M., Nes, I. F., Diep, D. B., Lotfipour, F. 2012. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *Journal of applied microbiology*, 113(4): 723-736.
- Hernández, M., Torruco, J.G., Chel, L., Betancur, D. 2008. Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(3): 718-726.
- Himeda M., Njintang N., Nguimbou R., Gaiani C., Scher J., Facho J., Mbofung C. 2012. Physicochemical, rheological and thermal properties of taro (*Colocasia esculenta*) starch harvested at different maturity stages. *International Journal of Biosciences*, 2: 14-27.
- Huff-Lonergan, E., Zhang, W., Lonergan, S.M. 2010. Biochemistry of postmortem muscle – lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Science*, 86:184–195.
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Tanaka, M. 2006. Effect of plasticizers on the properties of edible films from skin gelatin of bigeye snapper and brownstripe red snapper. *European Food Research and Technology*, 222 (3-4): 229-235.

- Kara, R., Yaman, H., Gök, V., Akkaya, L. 2014. The effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in chicken burgers. *Indian Journal Of Animal Research*, 48:171-176.
- Kazemi, S. M., Rezaei, M. 2015. Antimicrobial effectiveness of gelatin–alginate film containing oregano essential oil for fish preservation. *Journal of food safety*, 35(4): 482-490.
- Khairunnisa, S., Junianto, J., Zahidah, Z., Rostini, I. 2018. The effect of glycerol concentration as a plasticizer on edible films made from alginate towards its physical characteristic. *World Scientific News*, 112: 130-141.
- Lafuente A, G. 2017. Glicerol: síntesis y aplicaciones. Máster universitario en ciencia y tecnología química. Universidad Nacional de Educación a Distancia.
- Li, L., Fang, Y., Vreeker, R., Appelqvist, I. 2007. Reexamining the egg-box model in calcium-alginate gels with X-ray diffraction. *Biomacromolecules*, 8(2):464-468.
- Lin, D., Zhao, Y. 2007. Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 6(3): 60-75.
- López, R., Casp, A. 2004. Tecnología de mataderos. Ed. Mundi-Prensa. 431.
- Lupo P. B., González A.C. Maestro G. A. 2012. Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 3 (1): 130-151.
- Málave, A.M. 2006. Determinación del largo de vida útil de masitas de cerdo marinadas y empacadas al vacío. Mayagüez, (P.R): Universidad de Puerto Rico, Departamento de ciencia y tecnología de alimentos.
- Marcel, N. R., Makhlof, H., Nicolas, N. Y., Léopold, T. N., Balaam, F., Joel, S., Carl, M. F. 2012. Comparative physicochemical, thermal and microstructural properties of starches from two underutilized taro ecotypes. *International Journal of Bioscience*, 2: 64-74.
- Martillanes, S., Rocha-Pimienta, J., Llera-Oyola, J., Gil, M. V., Ayuso-Yuste, M. C., García-Parra, J., Delgado-Adámez, J. 2021. Control of *Listeria monocytogenes* in sliced dry-cured Iberian ham by high pressure processing in combination with an eco-friendly packaging based on chitosan, nisin and phytochemicals from rice bran. *Food Control*, 124.
- Martín, G. 2012. Introducción al conocimiento y prevención de los contaminantes orgánicos persistentes. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Gobierno de España. V.A Impresores.
- Martínez J, T., Mora R, D. 2010. Conocimientos y opiniones sobre la carne de pollo de dos comunidades rural-urbana de Costa Rica. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 19(1): 03-11.
- Mazariegos, S., Águila, G. A., Milla, S.J.M., Espinosa, Z. A.I., S.; Martínez, C. J., López, S. C. 2017. Cultivo de malanga (*Colocasia esculenta* Schott) en Tuxtla Chico, Chiapas, México. *Agroproductividad*, 10: 75-80.
- Mead, G. C. 2005. Food safety control in the poultry industry. (Ed.). CRC Press.

- McAuliffe O, Ross R, Hill C. 2001. Lantibiotics: estructura, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol Reviews*, 25(3):285-308.
- McHugh, T. H. 2000. Protein-Lipid interactions in edible films and coatings. *Nahrung*, 44: 148-151.
- Mckeown, R., Hopkins, C. A., Rizzi, R., Chrystallbridge, M. 2002. Manual de Educación para el Desarrollo Sostenible. Number 865.
- Meliá, D. J. M. 2014. La innovación, concepto e importancia económica. In Sexto congreso de Economía de Navarra.
- Mei, J., Shen, Y., Liu, W., Lan, W., Li, N., Xie, J. 2020. Effectiveness of sodium alginate active coatings containing bacteriocin EFL4 for the quality improvement of ready-to-eat fresh salmon fillets during cold storage. *Coatings*, 10(6): 506.
- Méndez-Reyes, D.A., Quintero-Cerón, J.P., Váquiro-Herrera, H.A., Solanilla-Duque, J.F. 2015. Sodium alginate in the development of edible films. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 5 (2): 089-113.
- Montalvo, C., López-Malo, A., Palou, E. 2012. Películas comestibles de proteína: características, propiedades y aplicaciones. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 2:32-46.
- Montville, T.J., Matthews, K.R., Kniel, K.E. 2012. Food microbiology. 3rd Edición
- Morris, E. R., Rees, D. A., Thom, D., Boyd, J. 1978. Chiroptical and stoichiometric evidence of a specific, primary dimerisation process in alginate gelation. *Carbohydrate Research*, 66(1):145-154.
- Murphy, R.Y., Hanson, R.E., Feze, N. 2005. Eradicating *Listeria monocytogenes* from fully cooked franks by using an integrated pasteurization-packaging system. *Journal Food Protection*, 68: 507–511.
- Narsaiah, K., Wilson, R. A., Gokul, K., Mandge, H. M., Jha, S. N., Bhadwal, S., Anurag R.K. Malik R.K., Vij, S. 2015. Effect of bacteriocin-incorporated alginate coating on shelf-life of minimally processed papaya (*Carica papaya* L.) *Postharvest Biology and Technology*, 100: 212-218.
- Nes, I. F., Yoon, S. S., Diep, D. B. 2007. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review. *Food Science and Biotechnology*, 16(5): 675-690.
- Noshad, M., Mohebbi, M., Shahidi, F., Mortazavi, S. 2011. Multi-Objective Optimization of Osmotic-Ultrasonic Pretreatments and Hot-Air Drying of Quince Using Response Surface Methodology. *Food and Bioprocess Technology*, 5: 1-13.
- Norma Mexicana NMX-F-382-1986. Alimentos - almidón o fécula de maíz.
- Oliva M, S. 2019. UnADM Boletín edición especial Seguridad alimentaria.
- Olivares, R. 2009. *Listeria monocytogenes*: an old bacteria, an ongoing challenge. *Medwave*, 9(6).

- Ortega-Toro, R., Muñoz, A., Talens, P., Chiralt, A. 2016. Improvement of properties of glycerol plasticized starch films by blending with a low ratio of polycaprolactone and/ or polyethylene glycol. *Food Hydrocolloids*, 56: 9-19.
- Ortega-Varelas, L. M., Peña Duque, V. 2019. *Procesamiento de un material comestible para el desarrollo de contenedores para bebidas alcohólicas*. Bachelor's thesis, Escuela Arquitectura y Diseño.
- Otín-Acín, J. M. 2011. Estudio de la difusión del carvacrol y el eugenol desde películas de proteína de suero lácteo a diferentes simulantes alimentarios. Tesis de maestría Pamplona España
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., Lacroix, M. 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food control*, 18(5): 414-420.
- Oviedo-Trespacios, O., Peñabaena-Niebles, R. 2015. Optimización de sistemas simulados a través de técnicas de superficie de respuesta. *Ingeniare*, 23: 421.
- Pacheco, E., Techeira, N. Propiedades químicas y funcionales del almidón nativo y modificado de ñame (*Dioscorea alata*). *Revista Interciencia*, 34(4): 280- 285.
- Palacios-Aguilera, A. C. 2017. Estudio de la microbiota presente en superficies vivas e inertes en locales de venta de carnes crudas en el mercado 3 de Noviembre del catón Cuenca (Master's thesis, Universidad del Azuay).
- Pastor, C., Vargas, M., González-Martínez, C. 2005. Recubrimientos comestibles: Aplicación a frutas y hortalizas. *Revista: Alimentación, Equipos y Tecnología*, 197(24):130-135.
- Parzanese, M. 2006. Tecnologías para la industria alimentaria, películas y recubrimientos comestibles. Ficha técnica no. 07.
- Pelissari, F.M., Ferreira, D.C., Louzada, L.B., dos Santos, F., Corrêa, A.C., Moreira, F.K.V., Mattoso, L.H. 2019. Starches for Food Application. Starch-Based Edible Films and Coatings: An Ecofriendly Alternative for Food Packaging, *Starches for Food Application*, 359–420.
- Perdomo M., G.A., 2002. Plásticos y medio ambiente. *Revista Iberoamericana Polímeros*, 3(2).
- Pereira-Vega, Z. 2016. Oferta y demanda de estudios de equivalencia terapéutica (*in vitro* e *in vivo*) de medicamentos en Costa Rica. *Tecnología en Marcha*, 29, 1: 18-27.
- Rached L., Vizcarrondo, C., Rincon M., Padilla, F. 2006. Evaluación de harinas y almidones de mapuey (*Dioscorea trifida*), variedades blanco y morado. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 56(4): 375-383.
- Rangel-Marrón, M., Mani-López, E., Palou, E., López-Malo, A. 2019. Effects of alginate-glycerol-citric acid concentrations on selected physical, mechanical, and barrier properties of papaya puree-based edible films and coatings, as evaluated by response surface methodology. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 101: 83-91.

- Restrepo Velásquez, J. D. 2014. Evaluación de la migración de agentes antimicrobianos en películas de proteína de suero y su efecto sobre la extensión de vida útil en arepas de maíz blanco. Tesis de maestría Medellín Colombia.
- Rodríguez, M., Osés, J., Ziani, K., Mate, J. I. 2006. Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. *Food Research International*, 39(8): 840-846.
- Romero Bonivento, L., Estrada Berrocal, Y. 2011. Elaboración de una película comestible a base de colágeno incorporado con nisina como agente antimicrobiano para reducir la pérdida de humedad y oxidación de las grasas en filetes de carne de cerdo en refrigeración (Doctoral dissertation, Universidad de Cartagena).
- Rosales, A. D. L. Á. 2016. Obtención de biopolímero plástico a partir del almidón de malanga (*Colocasia esculenta*), por el método de polimerización por condensación en el laboratorio 110 de la UNAN-Managua (Doctoral dissertation, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua).
- Sánchez-Ortega, I., García-Almendárez, B. E., Santos-López, E. M., Amaro-Reyes, A., Barboza-Corona, J. E., Regalado, C. 2014. Antimicrobial edible films and coatings for meat and meat products preservation. *The Scientific World Journal*, 2014 (18).
- 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.
- Sebti, I., Chollet, E., Degraeve, P., Noel, C., Peyrol, E. 2007. Water sensitivity, antimicrobial, and physicochemical analyses of edible films based on HPMC and/or chitosan. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(3): 693-699.
- Segura, D., Noguez, R., Espín, G. 2007. Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables. *Biotecnología*, 14(3): 361-372.
- Settanni, L., Corsetti, A. 2008. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 121:123-138.
- Sharma, S., Rao, T. R. 2015. Xanthan gum based edible coating enriched with cinnamic acid prevents browning and extends the shelf-life of fresh-cut pears. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 62(1): 791-800.
- SIAP. 2018. Atlas Agroalimentario 2012-2019.
- Siamansouri, M., Mozaffari, S., Alikhani, F. E. 2013. Bacteriocins and lactic acid bacteria. *Journal of Biology*, 2(5): 227-234.
- Silva-Weiss, A., Ihl, M., Sobral, P. D. A., Gómez-Guillén, M. C., Bifani, V. 2013. Natural additives in bioactive edible films and coatings: functionality and applications in foods. *Food Engineering Reviews*, 5(4): 200-216.
- Siskawardani, D. D., Hidayat, R. 2020. Physic-mechanical properties of edible film based on taro starch (*Colocasia esculenta* L. Schoott) with glycerol addition. In IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science*, 458(1).

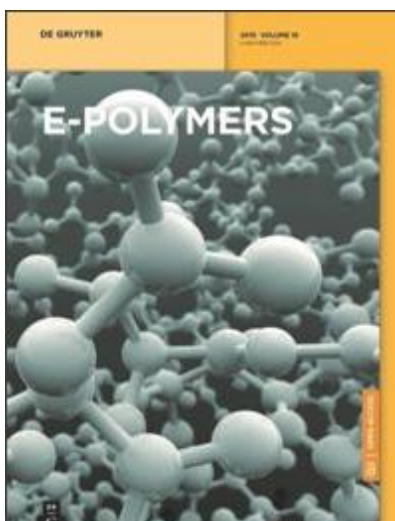
- Sofos, J.N., 2003. Riesgos microbiológicos en la carne y los productos cárnicos: programas nacionales para reducir la contaminación. II Seminario Internacional Fundisa. Ed. FUNDISA (Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria).
- Sogut, E., Seydim, A. C. 2019. The effects of Chitosan and grape seed extract-based edible films on the quality of vacuum packaged chicken breast fillets. *Food Packaging and Shelf Life*, 18: 13-20.
- Solano-Doblado, L.G., Alamilla-Beltrán, L., Jiménez-Martínez, C. 2018. Películas y recubrimientos comestibles funcionalizados. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 21: 30-42
- Solano, A. C. V., De Rojas Gante, C. 2012. Two different processes to obtain antimicrobial packaging containing natural oils. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6): 2522-2528.
- Solis Rivera, S. I. 2016. Elaboración y caracterización de películas comestibles elaboradas con hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Universidad Autónoma del Estado de México. Tesis de licenciatura.
- Stoyanova, L.G., Ustyugova, E.A., Netrusov, A.L. 2012. Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: their diversity and properties. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48(3): 229-243.
- Takma, D. K., Korel, F. 2019. Active packaging films as a carrier of black cumin essential oil: Development and effect on quality and shelf-life of chicken breast meat. *Food Packaging and Shelf Life*, 19: 210-217.
- Thakur, R., Saberi, B., Pristijono, P., Stathopoulos, C. E., Golding, J. B., Scarlett, C. J., Bowyer, M. Vuong, Q. V. 2017. Use of response surface methodology (RSM) to optimize pea starch–chitosan novel edible film formulation. *Journal of food science and technology*, 54(8): 2270-2278.
- Tapia, S. María., Pérez, E., Rodríguez, E. P., Guzmán, R., Ducamp, C. M. N., Tran, T., Rolland, S. A. 2012. Some properties of starch and starch edible films from under-utilized roots and tubers from the Venezuelan Amazons. *Journal of Cellular Plastics*, (6):526-544.
- Tapia, M., Rojas-Graü, M., Rodríguez, F., Rodríguez, J., Carmona, A., Martín-Belloso, O. 2007. Alginate and gellan-based edible films for probiotic coatings on fresh-cut fruits. *Journal of Food Science*, 72(4):190-196.
- Taylor, J., Taylor, J. R. N., Dutton, M. F. y Kock, S. 2005. Identification of kafirin film casting solvents. *Food Chemistry*, 90(3):401–408.
- Tharanathan, R.N. 2003. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science and Technology*, 14(3):71.
- Toongdeesootorn, W., Mauer, L.J., Wongrupng, S., Sriburi, P., Rachtanapun, P. 2011. Effect of carboxymethyl cellulose concentration on physical properties of biodegradable cassava starch-based films. *Chemistry Central Journal*, 5(6):1-8.

- Torre P, A. 2017. Migración en diferentes simulantes alimentarios de productos de degradación de poli (ácido láctico) reciclado. Tesis de Ingeniería química. Universidad Politécnica de Madrid.
- Torres, A., Montero, P. y Duran, M. 2013. Propiedades fisicoquímicas, morfológicas y funcionales del almidón de malanga (*Colocasia esculenta*). *Revista Lasallista de Investigación*, 10(2): 52-61.
- Torres, K., Sierra, S., Poutou, R., Carrascal, A., Mercado, M. 2005. Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente. *Revista MVZ Córdoba*, 10 (1): 511-543.
- Torres-Rapelo, A.L., Montero-Castillo, P.M., Julio-González, L.C. 2014. Utilización de almidón de malanga (*Colocasia esculenta* L.) En la elaboración de salchichas tipo Frankfurt. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12(2): 97-105.
- Trejo, V., Aragón, N., Miranda, P. 2001. Estimación de la permeabilidad al vapor de agua en películas a base de quitosán. *Revista de la Sociedad Química de México*, 45(1): 01-05.
- USDA. 2019. Proyecciones de mundiales de producción de Carne de Pollo.
- USDA. 2014. National Nutrient Database for Standard Reference
- Vasconez, M. B., Flores, S. K., Campos, C. A., Alvarado, J., Gerschenson, L. N. 2009. Antimicrobial activity and physical properties of chitosan–tapioca starch based edible films and coatings. *Food Research International*, 42(7): 762-769.
- Vázquez-Briones, M. C., Guerrero-Beltrán, J. A., 2013. Recubrimientos de frutas con biopelículas. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(2): 5-14.
- Vázquez-Luna, A., Santiago, M., Rivadeneyra-Domínguez, E., Díaz-Sobac, R. 2019. Películas comestibles a base de almidón nanoestructurado como material de barrera a la humedad. *Ciencia UAT*, 13(2): 152-164.
- Wang, L.Z., Li, L., Holmes, J., Kerry, J.f., Kerry, J.P. 2007. Assessment of film-forming potential and properties of protein and polysaccharide-based biopolymer films. *International Journal of Food Science and Technology*, 42(9):1128-1138.
- Yaguas, O. 2016. Response surface methodology for the optimization of an agricultural production. *Revista Ingeniería Industrial*, 16(2): 205-222.
- Yang, L., Paulson, A. T. 2000. Mechanical and water vapour barrier properties of edible gellan films. *Food Research International*, 33(7): 563-570.
- Yusuf, Moshood & Tengku Abdul Hamid, Tengku. 2013. Lactic Acid Bacteria: Bacteriocin Producer: A Mini Review. *IOSR Journal of Pharmacy*, 3: 44-50.

CHAPTER I

Optimization and characterization of a sodium alginate a biodegradable film with taro starch and nisin: antimicrobial effect on chicken meat

ENVIADO A LA REVISTA:
E-POLYMERS



Optimization and characterization of a sodium alginate a biodegradable film with taro starch and nisin: antimicrobial effect on chicken meat

Monserrat Guevara Carrión¹, María Antonieta Ríos Corripio², Juan Valente Hidalgo Contreras¹, Marcela Rangel Marrón³, Aleida Selene Hernández Cázares^{1*},

¹ Colegio de Postgraduados. Campus Córdoba. Congregación Manuel León, Amatlan de los Reyes, Córdoba, Ver. C.P. 94500, México.

² CONACYT - Colegio de Postgraduados. Campus Córdoba. Congregación Manuel León, Amatlán de los Reyes, Córdoba, Ver. C.P. 94500, México

³ Facultad de Química, Universidad Autónoma del Carmen, Calle 56 Num. 4 Esq. Ave. Concordia, Col. Benito Juárez, Ciudad del Carmen C.P. 24180, Campeche, Mexico.

Corresponding authors: aleyse@colpos.mx

ABSTRACT

The development of a biodegradable film based on polymers from renewable resources has become a feasible technology to preserve the quality and innocuousness of foods. In this study, a sodium alginate biodegradable film with added taro starch and nisin was optimized to have a highest TS and BF and a lower WVP, under a Box-Behnken response surface design, and its antimicrobial effect was evaluated for use as packaging material for chicken meat. The biodegradable film was characterized with the analysis of its mechanical, physical, and chemical properties; in addition, the total migration was also analyzed, along with its retention ability, the kinetics of the release of nisin in food simulants and the antimicrobial ability against *Listeria monocytogenes* in vitro and on inoculated meat. The resulting optimal biodegradable film (OB) was produced with 1.9% taro starch, 1% glycerol, and 2,369 IU/mL of nisin, which displayed adequate mechanical properties and permeability to water vapor. The OB significantly reduced the microbial load and helped extend the shelf life of the chicken meat under refrigeration (6°C) up to 15 d. Total migration and the kinetics of the release of nisin showed that the biodegradable film can be used on hydrophilic and acidic foods, making it a feasible natural alternative for use as food packaging.

Keywords: Nisin, taro starch, chicken meat, biodegradable film, antimicrobial film.

INTRODUCTION

The increase in environmental awareness by consumers of foods has directed investigation towards contributing and developing alternatives that satisfy these needs. The impact has pointed towards

reducing environmental pollution, particularly with the use of synthetic plastic packages and containers. A sustainable alternative for this problem is to promote the use of polymers made from renewable and biodegradable materials that mitigate the environmental impact (1); but that also provide functional properties for their use as packages and containers (2).

The materials used for the formation of biodegradable films for their use with foods must be recognized as safe (GRAS), approved by the Food and Drug Administration (FDA) and must be biodegradable (3). Among these films are included pectin, alginate (4), cellulose, chitosan (5), starch (1), casein, collagen (6), gelatin (7), corn zein (8), and others. Alginate is the most widely used polymer; it provides films with resistant mechanical properties (9), while starch, an important component in tubercle such as taro (10), also promotes viscosity due to its amylopectin (72-83%) and amylose (17-28 %) content (11). However, adding starch as the only component in the film-forming solution results in brittle films, with limited mechanical properties and with high water vapor permeability, therefore its combination with other biopolymers is necessary (12).

On the other hand, film with antimicrobial activity is based on the effect on the food one intends to enhance. In the case of antimicrobial activity, essential oils (13, 14), chitosan (5), enzymes such as lysozyme (15) and bacteriocins as nisin (16) have been used mainly. Nisin is widely used to inhibit the microbial growth of pathogenic bacteria such as *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* and its effectiveness depends on its ability of diffusion throughout the food product (17).

This study carried out the optimization and characterization of a biodegradable film based on materials from renewable biodegradable resources such as alginate, taro starch and nisin for its evaluation as an antimicrobial package for chicken meat.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

The sodium alginate was purchased from Sigma (St. Louis MO, USA), the glycerol (Monarca Aditivos, Mexico), taro starch was obtained from the laboratory of Food Science of Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba, Veracruz, México, nisin (Zhejiang Silver-Elephant Bio-engineering Co., Ltd.) and HCl from J.T. Baker (Pennsylvania, USA). The chicken breast (*Pectoralis major*) was acquired in a commercial area in the Córdoba, Veracruz, 24 h *postmortem*,

and the strain used was *Listeria monocytogenes* Scott A., donated by Universidad de las Américas Puebla (UDLAP).

2.2. Preparation of the biodegradable film

The biodegradable film was prepared using the casting method (18). The film-forming solution was prepared by homogenizing taro starch (MS) and distilled water at room temperature (25°C) for 20 min, with constant stirring, and then raising the temperature to 85°C for 30 min. After the temperature was reduced to 70°C, the alginate (SA) and glycerol (G) were added, with stirring for 30 min. Nisin (Nis) (previously dissolved in HCl, 50,000 IU/mL) was added and stirred for 30 min. After the solution cooled down (35-40 °C), it was placed under vacuum for 20 min, and 35 mL of the solution was poured into Petri dishes, and it is placed in a dehydrator for 12 h at 41°C to form the film.

2.3. Optimization of the biodegradable film.

To perform the optimization of the biodegradable film, the response surface method was used, following a Box-Behnken experimental design (20). We used Nis (500-5000 IU/mL), MS (0.5-2% w/v), G (1-2% w/v) contents as factors and the content of alginate was kept as a constant (1% w/v). Fifteen runs were obtained with two repetitions of the central point, as shown in Table 1.

Table 1. Values of factors for the Box-Behnken experimental design.

Run	Nis (IU/mL)	MS (% w/v)	G (% w/v)
1	500	2	1.5
2	5000	0.5	1.5
3	2750	2	1
4	500	1.25	1
5	500	1.25	2
6	5000	2	1.5
7	2750	1.25	1.5
8	2750	1.25	1.5
9	5000	1.25	1
10	5000	1.25	2
11	500	0.5	1.5
12	2750	0.5	2
13	2750	2	2
14	2750	1.25	1.5
15	2750	0.5	1

Note: nisin (Nis), malanga starch (MS), glycerol (G)

The response variables to optimize the biofilm were thickness, Moisture content, solubility in water, water vapor permeability (WVP), tensile strength (TS), breaking force (BF) and elongation percent (E). The effect of each independent variable over every response variable was determined using the experimental data, adjusted as shown by Eq. 1.

$$Y=b_0+b_1x_1+b_2x_2+b_3x_3+b_4x_1^2+b_5x_2^2+b_6x_3^2+b_7x_1x_2+b_8x_1x_3+b_9x_2x_3 \quad (1)$$

where Y is the variable of response, x_1 is the nisin content, x_2 is the starch content and x_3 is the glycerol content; b_0 is the intersection; b_1 , b_2 and b_3 are the coefficients of the linear terms; b_4 , b_5 and b_6 coefficients of the quadratic terms; and b_7 , b_8 and b_9 are the coefficients of the terms of interaction.

The optimization process was generated using the Design Expert ® statistical program. For this, square root, potency, or natural logarithm transformations were carried out when the residues showed no normality or when the model displayed a significant lack of adjustment. Once the optimal biodegradable film (OB) was obtained, its characterization was carried out again and all measurements were carried out in triplicate.

2.4. Physical and chemical characterization of the biodegradable film

The thickness of the biodegradable film was measured using a micrometer (Model 25, AMES, USA) in five random positions. The moisture content was determined by the loss in weight of the biodegradable film after being dried in an oven at 105 °C for 24 h (21).

2.4.1. Solubility (S)

The solubility of the biodegradable film was determined following method (18). Dry biodegradable film samples (2 x 2 cm) were immersed in 20 mL of distilled water, stirring constantly for 24 h to finally weigh the remaining biodegradable film. The solubility of the biodegradable film (S) was calculated by the difference in weight with the following equation and was expressed as a percentage of solubility in water (Eq. 2).

$$\%S = \frac{W_i - W_f}{W_i} \times 100 \quad (2)$$

where W_i is the initial weight of the biodegradable film and W_f is the weight of the biodegradable film after the solubility test.

2.4.2 Water vapor permeability (WVP)

The (WVP) was determined using a modification of the “glass method” of the gravimetric technique according to ASTM E96-95. Each biodegradable film was placed in glasses and the top was sealed using Parafilm. Each glass was placed inside a dryer containing a saturated solution of $MgCl_2$ (33% relative humidity) at 25°C. The glasses were weighed every 24 h for 5 days. The PVA was determined following equations 3 and 4, and the data were expressed as $g \text{ mm kPa}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ m}^{-2}$ (Eq. 3, 4)

$$VTVA = \left(\frac{g}{h \text{ m}^2} \right) = \frac{G/t}{A} \quad (3)$$

$$WVP = \left(\frac{g \text{ mm}}{\text{kPa} \text{ h} \text{ m}^2} \right) = \frac{VTVA}{\Delta P} \times e \quad (4)$$

where, G/t : slope of weight gain vs time (g/h); A : film area (m^2); ΔP : vapor pressure difference between calcium chloride and sodium chloride (kPa); E : film thickness (mm).

2.4.3 Mechanical properties

Mechanical tests were carried out in a texturometer (SHIMADZU EZ-S 500 N, Japan). The tensile strength (TS), breaking force (BF), and the percentage of elongation (E) tests were carried out using the standard ASTM D882-95 method (19) on 2 x 5 cm strips of biodegradable film at a speed of 50 mm/s and 50 mm.

2.4.4 FTIR spectroscopy

The structural characterization of the OB what is carried out with a Fourier transform infrared spectrometer (FTIR; Bruker model Vertex 70, Wisconsin, USA) in the attenuated total reflection sampling mode was employed. All measurements were made in the spectral range from 4000 cm^{-1} to 400 cm^{-1} , using 120 scans for each sample, with a resolution of 4 cm^{-1} .

2.5. *In vitro* evaluation of the antimicrobial effect of the biodegradable film

2.5.1 Total migration of nisin in food simulants

The total migration of the nisin added in the OB was quantified in three different types of food simulants, ethanol 10% (hydrophilic foods, v/v), acetic acid 3% (hydrophilic foods with a pH below 4.5, w/v), and isooctane (lipophilic foods with free fats on the surface). The proportion between film and simulant was 6 dm²/kg, and the contact between both was maintained for 15 d at 20 °C. The simulant was evaporated for 24-48 h on a stove at 60°C. The residue was weighed to establish the total migration, represented as the mass of constituents released per dm² of food contact surface (mg/dm²). The results were expressed in % of migration over time (22).

2.5.2 Retention of nisin in the biodegradable films

The mass of the nisin retained on the biodegradable film was quantified by extracting it in methanol, where 2 x 2 cm biodegradable film samples were immersed in 100 mL methanol after 24, 48 and 72 h at room temperature and under constant stirring. The extracted nisin content was quantified by spectrophotometry at 282 nm, using methanol as a control (22) The percentage of retention of nisin in the biodegradable films was calculated by referring the mass of nisin extracted in methanol to the initially incorporated nisin mass (Ec. 5).

$$\% \text{ Retention} = \frac{\text{g Nis extracted in methanol}}{\text{g Nis incorporated}} \times 100 \quad (5)$$

2.5.3 Kinetics of the release of nisin in different food simulants

The kinetics of the release of nisin was carried out in four food simulants: ethanol in water (10% v/v), ethanol in water (50% v/v), acetic acid at 3% (w/v) and isooctane; each corresponding simulant was used as a control. Samples of biodegradable film, 4 cm² each, were placed in 100 mL of each simulant, at room temperature and in constant stirring for different amounts of time until 5 h were completed. The absorbance of each solution was determined at 282 nm, to quantify the nisin released into the simulant. To repair a standard curve, each food simulant was used as a control. The ratio between the mass of nisin in time (g) (m_t) and the asymptotic value of the mass of nisin released into the simulant (m_∞) was calculated.

To model the kinetics, the four-parameter Sigmoidal Gompertz model was used, with its equation expressed as $f = y_0 + a \cdot \exp(-\exp(-(x-x_0)/b))$, together with a linearization to calculate the velocity with a linear adjustment.

2.5.4 Antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes*

Antimicrobial activity was determined by measurements of the inhibition halos. Biodegradable film disks, 2 mm in diameter, were sterilized with UV light in a laminar flow cabinet for 3 h. Petri dishes was inoculated on the surface with 20 mL of solidified *Listeria* agar with 10 μ L of culture containing 1.5×10^8 CFU/mL of *L. monocytogenes* Scott A. and subsequently, the medium was covered with the biodegradable film disks and with the biodegradable control film without nisin. The dishes were incubated at 37 °C for 24 h (23).

2.6. Applying the biodegradable film on the meat

The chicken breast was sliced into round portions, each 50 mm in diameter (10 g), and sterilized with UV type C light with a wavelength of 253.7 nm in a laminar flow cabinet for 3 h. The meat samples were divided into 3 lots and each sample was placed in a Petri dish, in triplicate. All lots were inoculated with 100 μ L of the *L. monocytogenes* strain (1.5×10^8 CFU/mL). In the first lot, the inoculated meat samples without biodegradable film were placed; in the second lot, the OB was placed on the meat sample of the same diameter (50 mm), previously sterilized. In the third lot, the OB without nisin was placed on the meat. The dishes were sealed and evaluated at different times (0, 3, 6, 9, 12 and 15 d) at 6 °C.

At each analysis time, the meat samples were removed from the Petri dishes with sterilized forceps and homogenized with 90 mL of peptone water for 2 min. Viable cells count was performed by serial dilutions in peptone water for subsequent seeding. The dishes were incubated at 37 °C for 24h.

2.7. Statistical analysis

The optimization process was carried out using the response surface methodology through a Box-Behnken design with fifteen combinations chosen at random. The effect of each independent

variable on each response variable was determined using the adjusted experimental data, through an analysis of variance (ANOVA). The design and analysis were carried out using the statistical program Design Expert ® (ver. 11). For the *in vitro* analysis of the antimicrobial effect of the biodegradable film applied on the meat, a completely randomized design was used, with a factorial structure in the treatments. The factors were: the storage factor (0, 3, 6, 9, 12 and 15 d) and the biodegradable film factor (with and without biodegradable film). The means test was performed using Tukey test, with a significance level of $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Obtaining the biodegradable film

The experimental responses obtained after having applied the Box-Behnken experimental design to design the composition an alginate biodegradable film added with taro starch and nisin, are shown in Table 2, which shows the experimental values of the independent variables of the fifteen combinations designed; the thickness of the biodegradable film was higher when the contents of starch and glycerol increases. The moisture was also higher when the glycerol content increases and solubility was related to the starch content, since the less starch content, the higher the solubility. TS and BF are directly proportional to the content of MS and the biodegradable films that displayed the higher elasticity were those with the highest content of G.

Table 2. Experimental values used to evaluate the effects of the independent variables of the biodegradable film.

Run	Nis (X1) IU/mL w/v	MS (X2) %w/v	G (X3) %w/v	Thickness (mm)	Moisture (%)	Solubility (%)	WVP (g mm/ kPa h m ²)	TS (MPa)	BF (MPa)	Elongation (%)
1	500	2	1.5	0.02	27.25	1.41	0.03	5.29	21.93	16.56
2	5000	0.5	1.5	0.02	46.1	1.09	0.22	1.86	7.94	12.05
3	2750	2	1	0.02	9.7	1.09	0.02	4.14	16.84	0
4	500	1.25	1	0.01	13.81	0.82	0.04	7.45	23.72	11.29
5	500	1.25	2	0.02	32.54	1.17	0.23	1.79	7.51	11.6
6	5000	2	1.5	0.04	12.26	1.62	0.05	1.92	6.72	0
7	2750	1.25	1.5	0.02	37.47	1.1	0.03	3.56	12.4	13
8	2750	1.25	1.5	0.02	32.31	0.97	0.07	4.1	11.93	23.48

9	5000	1.25	1	0.02	12.91	0.85	0.05	2.11	7.45	6.75
10	5000	1.25	2	0.03	44.61	1.33	0.04	1.96	7.32	15.84
11	500	0.5	1.5	0.02	43.47	1.75	0.34	2.24	8.34	10.44
12	2750	0.5	2	0.02	33.03	100	0.47	1.64	5.75	12.95
13	2750	2	2	0.02	26.66	1.15	0.16	2.53	9.24	20.36
14	2750	1.25	1.5	0.02	36.66	0.8	0.08	2.63	8.68	8.02
15	2750	0.5	1	0.02	23.07	100	0.01	2.9	9.61	18.51

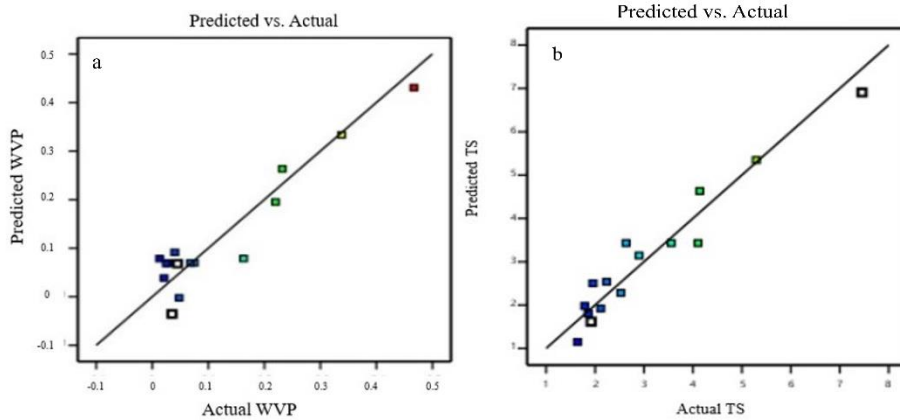
Note: X1 is an independent variable, codified for the nisin content (Nis), X2 e is an independent variable, codified for the starch content (MS), X3 is an independent variable, codified for the glycerol content(G). Water vapor permeability (WVP), tensile strength (TS) and breaking force (BF).

The models of estimation for the response variables are shown un equations 6, 7 and 8, where value R^2 for the response variables were used to predict these variables in the design space, for thickness (0.7381), moisture (0.8830), solubility (0.6866), WVP (0.8890) (Figure 1a), TS (0.9296) (Figure 1b), BF (0.9729) (Figure 1c) and elasticity (0.7429). This indicates that, for humidity, WVP, TS and BF, the adjustments to the quadratic model were adequate.

$$WVP = -0.2708 + 1.69^{-5} X_1 - 0.2611 X_2 + 0.5815 X_3 + 2.04^{-5} X_1 X_2 - 4.556^{-5} X_1 X_3 - 0.2080 X_2 X_3 + 1.91^{-9} X_1^2 + 0.1545 X_2^2 \quad (6)$$

$$TS = 7.8346 - 0.0017 X_1 + 4.9627 X_2 - 4.4712 X_3 - 4.44^{-4} X_1 X_2 + 0.0012 X_1 X_3 - 0.2364 X_2 X_3 - 7.61^{-9} X_1^2 - 1.0051 X_2^2 - 0.2581 X_3^2 \quad (7)$$

$$BF = 22.1341 - 0.0051 X_1 + 15.6326 X_2 - 11.4328 X_3 - 0.0022 X_1 X_2 + 0.0036 X_1 X_3 - 2.4876 X_2 X_3 + 1.352^{-7} X_1^2 - 0.8076 X_2^2 - 0.7446 X_3^2 \quad (8)$$



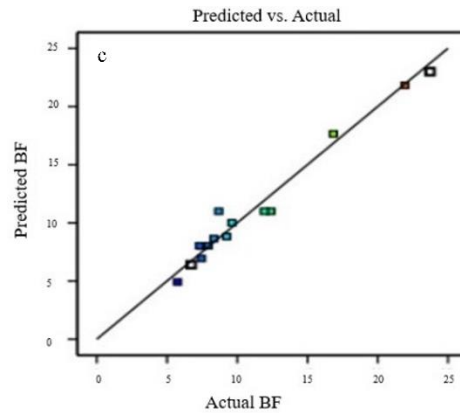


Figure 1. Correlation between the predicted and experimental values of each model: a) WVP, $R^2 = 0.89$; b) TS, $R^2 = 0.93$; y c) BF, $R^2 = 0.97$.

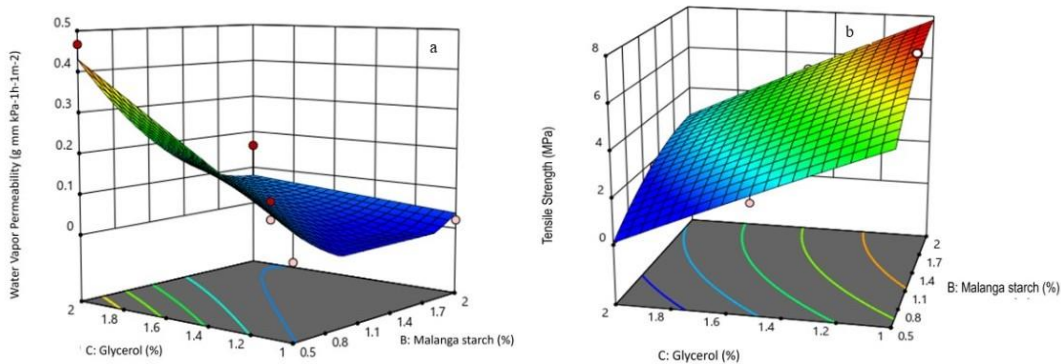
The ANOVA for the estimation models and the P test for dependent variables WVP (0.0211), BF ($p > 0.0021$) and TS ($p > 0.0205$) were significant in the model (Table 3). The biodegradable film with the highest WVP was the one containing minimal amounts of starch and the highest amounts of glycerol. The highest the plasticizer content, the higher the WVP will be, since glycerol reduces the intermolecular strengths of the biopolymer, thus generating more molecular mobility, increasing the permeability of the biodegradable film (24). This was due to the hydrophilic nature of the starch; the water vapor permeation barrier was less and less as the concentration of the biopolymer was reduced (25). The results obtained for WVP (0.013-0.467 g mm/kPa h m²) were similar to those reported for a whey protein isolation, glycerol and nisin film with 0.15 g mm/ kPa h m² (26) and on a whey protein, malic acid and nisin film with a WVP of 0.064 g mm/ kPa h m² (27).

Table 3. Analysis of variance of the response variables

Response	Source	Sum of squares	df	R ²	P- value	
Thickness	Model	0.0027	8	0.7381	0.1887	No significant
	Residual	0.0009	6	-	-	-
	Lack of Fit	0.0007	4	-	0.4924	No significant
	Pure Error	0.0003	2	-	-	-
	Total	0.0036	14	-	-	-
Moisture	Model	1921.97	9	0.8830	0.0645	No significant
	Residual	254.67	5	-	-	-
	Lack of Fit	253.30	3	-	0.0081	Significant
	Pure Error	1.37	2	-	-	-
	Total	2176.64	14	-	-	-
Solubility	Model	1.35	9	0.6866	0.4359	No significant
	Residual	0.6159	5	-	-	-

	Lack of Fit	0.5539	3	-	0.1471	No significant
	Pure Error	0.0620	2	-	-	-
	Total	1.97	14	-	-	-
WVP	Model	0.2312	8	0.8890	0.0211	Significant
	Residual	0.0289	6	-	-	-
	Lack of Fit	0.0276	4	-	0.0833	No significant
	Pure Error	0.0012	2	-	-	-
	Total	0.2600	14	-	-	-
TS	Model	33.89	9	0.9296	0.0205	Significant
	Residual	2.57	5	-	-	-
	Lack of Fit	1.46	3	-	0.5695	No significant
	Pure Error	1.10	2	-	-	-
	Total	36.46	14	-	-	-
BF	Model	417.67	9	0.9729	0.0021	Significant
	Residual	11.63	5	-	-	-
	Lack of Fit	3.42	3	-	0.8403	No significant
	Pure Error	8.21	2	-	-	-
	Total	429.31	14	-	-	-
Elongation	Model	457.68	9	0.7429	0.3130	No significant
	Residual	158.35	5	-	-	-
	Lack of Fit	33.80	3	-	0.9014	No significant
	Pure Error	124.56	2	-	-	-
	Total	616.04	14	-	-	-

The biodegradable film that displayed the highest TS and BF was the one in which the MS content was highest and lowest in G and Nis. That was to say that the MS content was directly proportional to the TS and BF, as shown in Figure 2. The results obtained for TS (1.64-7.45 MPa) and BF (5.75-23.72 MPa) (Table 1) coincide with those reported for a soy protein and nisin film with a TS of 5.11 MPa (28) and for an acetylated corn starch film, gelatin with 15% glycerol with BF of 22.25 MPa (29).



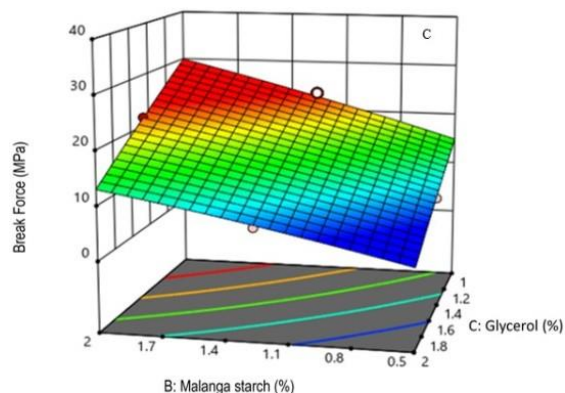


Figure 2. Response surface. a) WVP of MS and G; b) TS of MS and G; c) BF of MS and G, which show the effects of the interaction of the variables.

When developing the biodegradable film, it was observed that adding more than 2% of MS to the forming solution inhibit its formation, which means that there was a technological limitation in this component. Films with a high content of yucca starch (1-3%) and gelatin are considerably harder and brittle, breaking before the mechanical tests had been carried out (30).

In this sense, a biodegradable film with a low WVP was considered a decision criterion to select the OB to avoid weight loss in meat samples. In a gelatin film reticulated by the enzyme MTGase (microbial transglutaminase) added nisin and catechin, with a WVP of $8.3 \text{ g mm}^{-1}\text{h}^{-1}\text{m}^{-2}\text{kPa}^{-1}$ a dry surface of pig meat was observed, and only prolonged its shelf life up to 7 d (31). An alginate film with a WVP of $1.73 \text{ g mm kPa}^{-1}\text{h}^{-1}\text{m}^{-2}$ added with turmeric displayed no significant changes in the appearance or the pH of chicken meat refrigerated for 12 d (32). Another OB selection criterion was the significant effect that the independent variables had on the values of the response variables. Therefore, it was established that the optimum conditions for the formulation of the biodegradable film for the packaging was 2369 IU/mL of Nis, 1.9% of MS and 1.09% of G. In addition, it worth highlighting that this biodegradable film was designed for the packaging of a meat matrix, for which the variables BF, TS and WVP were determinant in the selection of an optimal formulation.

3.2 Physical and chemical characterization of the optimal biodegradable film

The values of the physical and chemical characterization of the OB are shown in Table 4. The experimental values were compared with the values predicted by the optimization analysis and a higher similarity was shown, confirmed by the quadratic mean (%RMS).

The thickness of the OB was 0.01 mm, a lower value than reported for a gelatin film with incorporated nisin (0.042 mm) (31); the increase in the content of total solids increases the viscosity of the film-forming solution by increasing the density (33). Humidity was 9.13%, lower than reported for a kafirin film applied on chicken fillets (13.20%) with a concentration of polyethylene glycol, lactic acid, and glycerol as 5.6% 1:1:1 w/w plasticizers (34). Since the three hydroxyl groups found in the glycerol provide it with a highly hygroscopic nature, the humidity content increases when increasing its concentration (35).

The solubility of the OB in water was 1.03%, perhaps due to the addition of MS; the highest the content of starch in biodegradable films, the lower the number of hydroxyl groups in the film-forming solution, which in turn reduce water capture and biodegradable films become less soluble (36). Additionally, a high content of amylose in the starch provides it with more intermolecular strength (37), making the entry of water into the networks in biodegradable films more difficult. The results obtained are significantly lower than those reported in a film made of alginate, turmeric and glycerol that had a solubility of 100% (32).

The WVP of the OB displayed a value of $0.03 \text{ g mm}^{-1}\text{h}^{-1}\text{m}^{-2}\text{kPa}^{-1}$ due to the glycerol content. Due to the hydrophilic nature of glycerol, it can form hydrogen bridges with the water molecules, making the film have a higher WVP value (38). Likewise, the ramifications of the amylopectin reduce the permeability of water vapor by introducing the vapor molecules into the matrix of the starch (98). The values obtained were lower than those reported for an alginate, turmeric, and glycerol film (32) with a value of $1.73 \text{ g mm}^{-1}\text{h}^{-1}\text{m}^{-2}\text{kPa}^{-1}$. The TS (3.43 MPa) and BF (17 MPa) of the OB were than those reported for a taro starch film at 3% and glycerol at 25% (TS =10.63 MPa) (36), values that coincide with a gellan gum, sorbitol, and glycerol film (BF= 17 MPa) (40). This may be due to the hydrogen bridges in the starch chains; the amylose/amylopectin ratio induces significant changes in the mechanical properties of the biodegradable films; the highest the amylopectin content in the starch, the higher its tendency will be to retrograde, which causes an elevation in TS and BF (25).

The elasticity obtained for OB was 8.17%, which coincides with reports for a Nis, WPI (whey protein isolation), sorbitol and beeswax film with 7.25% (26). The role of the plasticizer consists in the elimination of the hydrogen bridges and an increase in the free volume, which leads it to a

higher mobility in starch chains. Therefore, the more glycerol was added, the highest the elasticity of the film (41).

Table 4. Characterization of a sodium alginate biodegradable film with taro starch and nisin, effect of the independent variables on the response variables of a biodegradable film.

Variables	Predicted	Experimental	RMS (%)
Thickness (mm)	0.02	0.01 ± 0.002	8.7
Moisture content (%)	10.92	9.13 ± 1.36	8.94
Solubility (%)	1.17	1.03 ± 0.12	9.33
Water Vapor Permeability g mm-1h-1m-2kPa-1	0.03	0.03 ± 0.01	8.43
Tensile S (MPa)	4.94	3.43 ± 0.77	14.21
Break Force (MPa)	18.56	17.00 ± 0.46	3.29
Elongation (%)	5.01	8.17 ± 0.52	12.89

Note: the data are expressed as mean ± standard deviation %RMS: quadratic mean, water vapor permeability (WVP), tensile strength (TS), breaking force (BF).

The analysis of the FTIR spectra helped observe the presence of each of the components in the OB (Figure 3A). The SA spectrum displayed absorption bands in the 1200-800 cm^{-1} region, linked to the presence of carbohydrates (Figure 3Ab). Bands were found in 1595 cm^{-1} , indicating a vibration of asymmetric tension of the COO^- and 1411 cm^{-1} , a symmetric vibration of COO^- (42). On the other hand, the bands on 1081 and 1022 cm^{-1} related to the asymmetric stretching and flexing of C-O (43), band 947 cm^{-1} displays the type of C-O bond (44), and finally, the C-C bond, related to bands 887 and 815 cm^{-1} .

The spectrum of the MS (Figure 3Ac) displayed similar bands to those in SA in the region of the carbohydrates, it displayed absorption bands in 1149 cm^{-1} related to the flexing of the C-OH bonds of the hydroxyl groups, bands in 1078, 999, 925 cm^{-1} related to the crystalline and amorphous properties of the MS (45), and the C-C bond related to band 854 cm^{-1} . The spectrum of glycerol (Figure 3Ad) displayed absorption bands in 1109 cm^{-1} related to the C-O bond of C_2 carbon (intermediate carbon), the signal in 1031 cm^{-1} related to the vibrations corresponding to the C-O bond of C_1 and C_3 carbons (extreme carbons), the band in 993 cm^{-1} is assigned to vibrations in the C-C bonds in the skeleton of G, one band in 925 cm^{-1} related to the elongation of the C-O bond, and finally, in 851 cm^{-1} related to the elongation of groups O-O (46).

The Nis spectrum (Figure 3Ae) displayed absorption bands in the region of 1650-1531 cm^{-1} related to the presence of amino groups, the band in 1251 cm^{-1} that corresponds to the deformation in the plane of the O-H, the band in 1124 cm^{-1} related to the CH-OH vibration, and finally, the band 1043 cm^{-1} related to the $\text{CH}_2\text{-OH}$ vibration. The spectrum of the OD displayed a similarity in characteristic bands to the compounds used, indicating the presence of each one of them in the. On the other hands, the presence of new bands was found in 1608, 1542 and 995 cm^{-1} , indicating the interactions between these groups and the way in which they fit together to form the biodegradable film. Figure 3B shows the spectra of the OB (Figure 3Ba) and without Nis (Figure Bb), where the similarity was observed between both spectra in their base line related to the presence of the compounds that constitute them, with slight changes, and where the band in 1542 cm^{-1} , related to amino groups due to the presence of Nis in the OB, stands out. The lack of drastic changes between both spectra suggests that the chemical stability of the OB was not jeopardized by the presence of Nis.

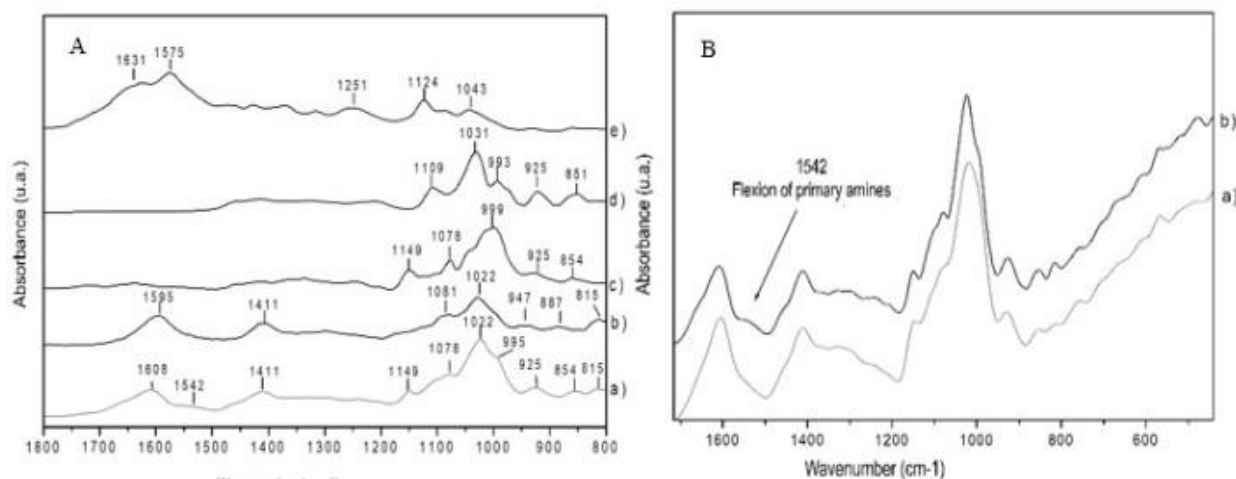


Figure 3. FTIR spectra of A) Components of the OB: a) taro starch, glycerol, nisin and sodium alginate; b) sodium alginate; c) taro starch; d) glycerol and e) nisin in the region of 1800-800 cm^{-1} . B) Spectrum of the biodegradable film: a) with and b) without nisin in the region of 1800- 400 cm^{-1} .

3.3 Evaluation of the antimicrobial effect of the biodegradable film

3.3.1 Total migration of nisin in food simulants

The total migration values in the three food simulations (ethanol 10%, acetic acid 3% and isooctane) are shown in Figure 4. The total migration of nisin was based on the type of simulant

used, in relation to its pH and polarity, and to the solubility of the components of the biodegradable film (47). The nisin migration was higher in the isooctane; a migration of over 50% was observed starting on day 6 in comparison with the other simulants. The hydrophilic components of a film based on chitosan and bergamot oil have proven to have little affinity towards nonpolar solvents; swelling and solubility are reduced, and the structure of the biodegradable film was maintained (48).

While the acetic acid at 3% reached a migration of 80% on day 9. A low pH in the medium has been found to cause the biodegradable film to swell, which favors the solubilization of the nisin (49). In migration of 0.71 mg of silver in polylactic acid and silver zeolite films in contact with the 3% acetic acid at 20 °C for 80 h helped control the deterioration of food products and increase their shelf life (50).

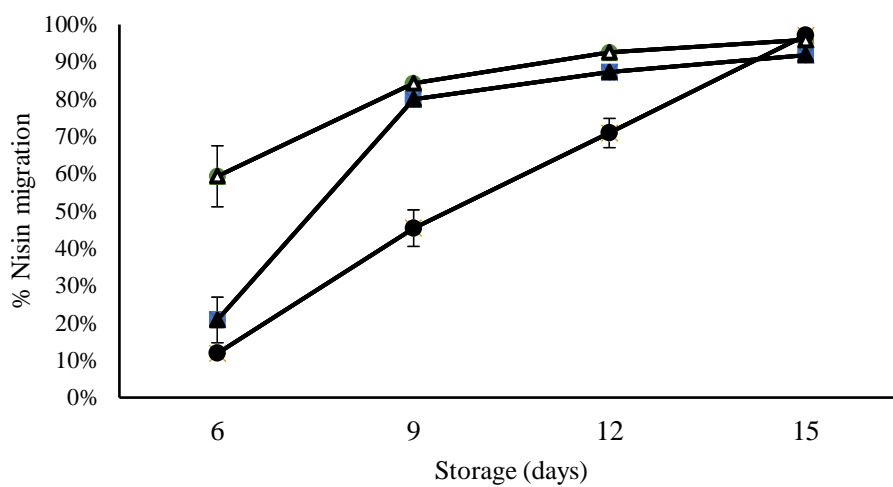


Figure 4. Percentage of migration (%) of three nisin food simulants (● ethanol 10%, ▲ acetic acid 3% and △ Isooctane) in a sodium alginate biodegradable film with taro starch and nisin during 15 d of storage in refrigeration.

Ethanol at 10 % as a food simulant displayed a slow migration, being gradually released until day 15 (97 %), due probably to the hydrophilic nature of the components, favoring the gradual migration and extending the shelf life of hydrophilic foods (8). In this sense, biodegradable films could be considered apt for use in the packaging of hydrophilic foods such as meats. Even when results surpass legislations (10 mg/dm²) for plastic materials in contact with food (51), the nisin must be in contact with the food (17) for the antimicrobial activity to take place. In addition, the presence of alginate in the biodegradable film produces an encapsulation effect and a gradual

release of nisin (52), which generates a slow release to the surface of the food, where most bacterial contamination occurs (16).

3.3.2 Extraction of nisin in the biodegradable films.

The mass of Nis extracted in methanol (analytical grade) was higher for the 24 h it remained in contact (Table 5); therefore, we can claim that it was more efficient in this time, having extracted $42.29\% \pm 1.37$. Methanol is a polar solvent. It has two positive poles and one negative pole, conferred by oxygen, making it a hydrophilic solvent (48) and favoring the quick release of the components of the biodegradable film.

Table 5. Nisin extracted (% retention) at different times of contact with methanol.

Exhibition time (h)	% Extraction (g nisin extracted in methanol / 100g nisin incorporated into the biodegradable film)		
	24	48	72
Alginate biodegradable film with Nis (2369 IU/mL), MS (1.9%) y G (1%)	42.29±1.37	25.74±0.34	20.02±0.68

Note: the data are expressed as mean \pm standard deviation. Nisin, MS: taro starch, G: glycerol. Average values and standard deviation.

3.3.3 Kinetics of the release of nisin in different food simulants

The kinetics of the release of nisin in different food simulants was shown in Figure 5a; once adjusted to the four-parameter Sigmoidal Gompertz model, an R^2 of 0.9948 was obtained, indicating that the model was adjusted to the experimental data and was apt to describe the behavior of nisin against the food simulants.

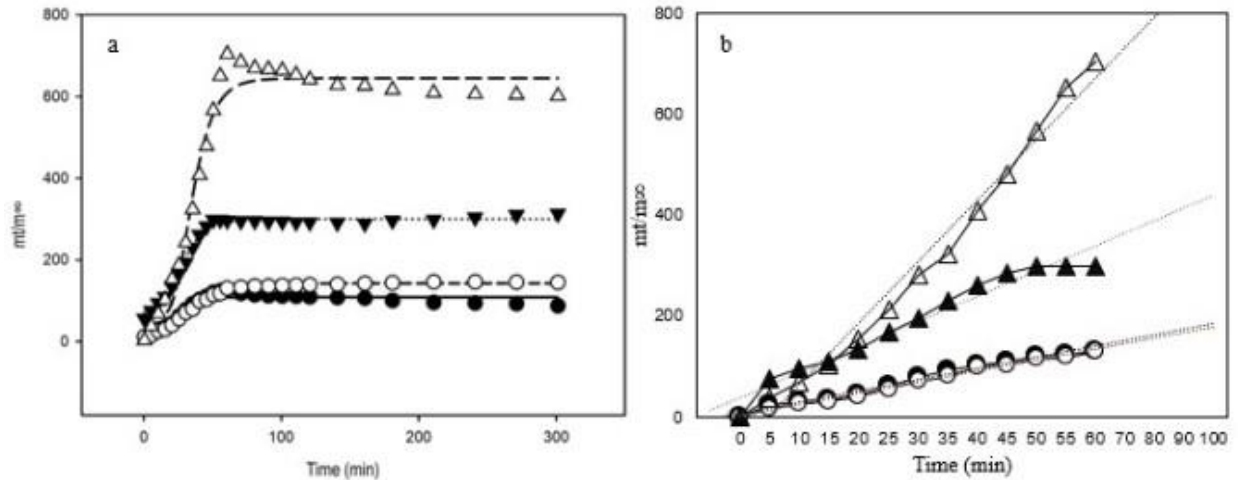


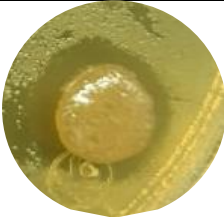
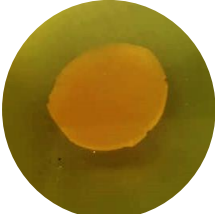
Figure 5. a) Kinetics of the release of food simulants under the Sigmoidal Gompertz model. b) Linearization of the kinetics of the release. ○ ethanol 10%, ● ethanol 50%, ▲ acetic acid 3%, Δ Isooctane.

The highest speed of the release of Nis was found in the simulant isooctane, at a speed of $60.568 \text{ m}_t/\text{m}_\infty/60 \text{ min}$. (Figure 5b). The Nis loses effectiveness in lipophilic simulants due to its rapid release, since it confers Nis a low solubility and quick diffusion towards the simulant (17), as Figure 4 also shows, and the shelf lives of foods are reduced. Followed by acetic acid $25.01 \text{ m}_t/\text{m}_\infty/60\text{min}$, the Nis molecule displays the most solubility at an acidic pH, since this molecule is acidic (49). In ethanol 10% and ethanol 50%, the speed of release was 11.05 and 11.02 respectively. There was an influence of the hydrophilic compounds of the biodegradable film towards the equally hydrophilic simulant, favoring release (50).

3.3.4 *In vitro* antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes*

The OB displayed an inhibition of 2.42 mm in comparison with the biodegradable film without nisin (Table 6). The mechanism of action of the Nis was based on the formation of pores on the cell membrane by electrostatic forces, since the bacteriocins are positively charged and they interact with the phospholipids of the bacterial membranes that are negatively charged (53). An inhibition of 2 mm was found in a tapioca starch film with added nisin ($1322 \text{ IU}/\text{cm}^2$) against *Listeria innocua* (54). While an inhibition of 1.57 mm was reported in a polybutylene adipate-co-terephthalate (PBAT) film with $3000 \text{ IU}/\text{cm}^2$ of nisin against *Listeria innocua* (55).

Table 6. Inhibition of the OB against *L. monocytogenes* with the Kirby Bauer method

	<i>L. monocytogenes</i>	Zone of inhibition (mm)
OB 1.96% de MS + 2369 IU de Nis + 1.09% de G		2.42 ± 0.66
Nisin-free biodegradable film		No inhibition

Note: the data are expressed as mean ± standard deviation. Nisin, MS: taro starch, G: glycerol. Average values and standard deviation.

3.4. Applying the biodegradable film on the meat

Figure 6 shows the *L. monocytogenes* growth curves in chicken meat inoculated during storage in refrigeration, and it also shows that the meat samples inoculated with *L. monocytogenes* covered with the BOs displayed a significant antimicrobial effect (0.971 ± 0.17 CFU/g, $p < .0001$) by inhibited the growth of the bacteria for 15 d under storage in refrigeration. The lot of meat samples inoculated with *L. monocytogenes* were applied with biodegradable film without nisin and without biodegradable film displayed an exponential growth of the bacteria of 6.393 ± 0.17 and 7.163 ± 0.17 CFU/g, ($p < .0001$), respectively. Furthermore, after day 6, a loss in muscular structure was visually found, along with the natural meat decomposition process.

In addition, in all the meat inoculated in all lots during the first 3 d of storage, no bacterial growth or reduction was observed, perhaps because of the temperature at which it was stored (6°C). The growth of *L. monocytogenes* and the process of migration of the Nis was affected by the low temperature (56). However, the lot with meat inoculated without a film and with a film without nisin, growth levels reached 15.32 and 15.74 UFC/mL, respectively, after 15 d of storage. As opposed to the meat samples inoculated with OB, an inhibition was observed in the growth of *L. monocytogenes*, at the same time of storage (0.38 UFC/mL), which ratifies the mechanism of action of Nis against Gram-positive bacteria (53).

The inhibition of the bacteria with the OB was higher to the pullulan, lauric alginate and nisin-based film that reduced up to 7.5 UFC/cm² against *L. monocytogenes* in slices of ham stored at 4°C for 28 d, with one (57), and lower than the reduction of 0.7 CFU/cm² of *L. monocytogenes* inoculated in meat for 10 days at 4 ° C in tapioca starch films with cellulose nanocrystals and Viognier grape variety extract (1).

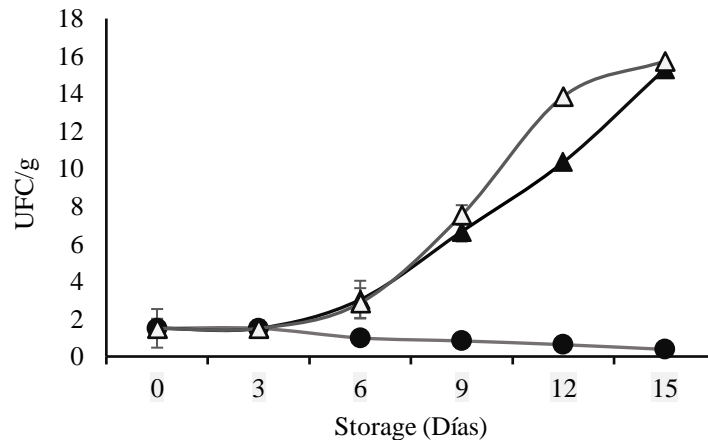


Figure 6. Microbial recounths in portions of chicken meat inoculated with *L. monocytogenes* (10^8 UFC/g) stored in refrigeration (6 °C) for 0, 3, 6, 9, 12 and 15 d. ● Meat inoculated with *L. monocytogenes* wrapped in the OB), ▲(Meat inoculated with *L. monocytogenes* wrapped with the biodegradable film without Nis), Δ Meat inoculated with *L. monocytogenes* without biodegradable film)

Conclusions

The components of the formation of biodegradable films and the food matrix to which it will be applied are aspects to consider obtaining the desirable characteristics. The response surface method helped to adequately optimize the biopolymers for the development of biodegradable film for the packaging of foods. Taro starch, as a package made from a renewable resource, displayed desirable physical and chemical characteristics for the formation of biodegradable films (2%); however, with a highest amount of starch, the mechanical properties of the biodegradable film will be negatively affected, resulted in breakable biodegradable films which represents a technological limitation. Despite this, the optimum combination of alginate, taro starch, glycerol and nisin had an antimicrobial effect to extend the shelf life of the refrigerated chicken meat to 15 d compared to

control. This biodegradable film could even be applied, with higher efficiency, on foods with hydrophilic and acidic properties.

Acknowledgements

To the Universidad de las Américas Puebla for the donation of the *Listeria monocytogenes* strain used in this investigation. To the Master's in Science Innovación Agroalimentaria Sustentable, and to the LGAC 2 of the Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba; as well as to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for their support in this investigation.

Author contribution

Monserrat Guevara-Carrión: Writing – original draft, Formal analysis, Methodology; Aleida S. Hernández-Cázares: Writing – original draft, Writing – review and editing, Methodology, Visualization, Investigation; M. Antonieta Ríos-Corripio: Writing – original draft, Writing – review and editing, Data curation, Formal analysis, Methodology; Juan V. Hidalgo-Contreras: Writing – review and editing, Data curation, Formal analysis, Validation-Verification, Visualization; Marcela Rangel-Marrón: Writing – original draft, Data curation, Formal analysis, Writing – review and editing.

Conflict of interest: Authors state no conflict of interest.

References

1. Xu, Y., Rehmani, N., Alsubaie, L., Kim, C., Sismour, E., Scales, A. Tapioca starch active nanocomposite films and their antimicrobial effectiveness on ready-to-eat chicken meat. *Food packaging and shelf life*, 2018;(16):86-91.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.02.006>.
2. Ayala, SLG., Sanabria, FLY. Aprovechamiento de recursos renovables en la obtención de nuevos materiales. *Ingenierías USBMed*, 2018;9(1):69-74. DOI: <https://doi.org/10.21500/20275846.3008>.
3. Tsanaktsis, V., Terzopoulou, Z., Exarhopoulos, S., Bikiaris, DN., Achilias, DS., Papageorgiou, DG., Papageorgiou, GZ. 2015. Sustainable, eco-friendly polyesters synthesized from renewable resources: Preparation and thermal characteristics of poly (dimethyl-propylene furanoate). *Polymer Chemistry*, 2015;6(48):8284-8296. DOI: [10.1039 / C5PY01367D](https://doi.org/10.1039/C5PY01367D).

4. Takma, DK., Korel, F. Active packaging films as a carrier of black cumin essential oil: Development and effect on quality and shelf-life of chicken breast meat. *Food Packaging and Shelf Life*, 2019;19:210-217. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.11.002>
5. Sogut, E., Seydim, AC. The effects of chitosan-and polycaprolactone-based bilayer films incorporated with grape seed extract and nanocellulose on the quality of chicken breast fillets. *Food Science and Technology*, 2019;101:799-805. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.097>.
6. Guzmán, LE., Acevedo, D., Romero, L., Estrada, J. Elaboración de una película comestible a base de colágeno incorporado con nisina como agente antimicrobiano. *Información tecnológica*, 2015;26(3):17-24. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642015000300004>.
7. Gómez-Estaca, J., López-Caballero, ME., Martínez-Bartolomé, MÁ., de Lacey, AML., Gómez-Guillen, MC., Montero, MP. The effect of the combined use of high-pressure treatment and antimicrobial edible film on the quality of salmon carpaccio. *International Journal of Food Microbiology*, 2018;283:28-36. DOI: 10.1016 / j.ijfoodmicro.2018.06.015.
8. Fernández V, D., Bautista Baños, S., Fernández Valdés, D., Ocampo Ramírez, A., García Pereira, A., Falcón Rodríguez, A. Películas y recubrimientos comestibles: una alternativa favorable en la conservación postcosecha de frutas y hortalizas. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 2015;24 (3):52-57.
9. Avendaño-Romero, G., López-Malo, A., Paolu, E. Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 2013;7(1):87-96.
10. Púa, AL., Barreto, GE., Zuleta, JL., Herrera, OD. Análisis de Nutrientes de la Raíz de la Malanga (*Colocasia esculenta* Schott) en el Trópico Seco de Colombia. *Información tecnológica*, 2019;30(4):69-76. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642019000400069>
11. Torres-Rapelo, A., Montero-Castillo, P., Duran-Lengua, M. Physical-chemical, morphologic and functional properties of malanga starch (*Colocasia esculenta*). *Revista Lasallista de Investigación*, 2013;10(2):52-61.
12. Wang, LZ., Li, L., Holmes, J., Kerry, JF., Kerry, JP. Assessment of film-forming potential and properties of protein and polysaccharide-based biopolymer films. *International Journal of Food Science and Technology*, 2007;42(9):1128-1138. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01440.x>.

13. Sarıcaoglu, FT., Turhan, S. Physicochemical, antioxidant and antimicrobial properties of mechanically deboned chicken meat protein films enriched with various essential oils. *Food Packaging and Shelf Life*, 2020;25. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100527>
14. Almasi, L., Radi, M., Amiri, S., McClements, DJ. Fabrication and characterization of antimicrobial biopolymer films containing essential oil-loaded microemulsions or nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, 2021;117. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106733>.
15. Narsaiah, K., Wilson, RA., Gokul, K., Mandge, HM., Jha, SN., Bhadwal, S., Anurag RK. Malik RK., Vij, S. Effect of bacteriocin-incorporated alginate coating on shelf-life of minimally processed papaya (*Carica papaya* L.) *Postharvest Biology and Technology*.2015;100:212-218. DOI: [10.1016/j.postharvbio.2014.10.003](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.10.003).
16. Luciano, CG., Tessaro, L., Lourenço, RV., Bittante, AMQB., Fernández, AM., Morales, ICF., do Amaral Sobral, PJ. Effects of nisin concentration on properties of gelatin film-forming solutions and their films. *International Journal of Food Science & Technology*, 2021;56(2):587-599. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijfs.14731>
17. Cano-Serna D, Gómez-Marín A, Oviedo-Gallego V, Ríos-Osorio LA. Nisina como conservante de alimentos: revisión sistemática de la literatura. *Hechos Microbiológicos*, 2015;6(1-2):52-64.
18. Rangel-Marrón, M., Mani-López, E., Palou, E., López-Malo, A. Effects of alginate-glycerol-citric acid concentrations on selected physical, mechanical, and barrier properties of papaya puree-based edible films and coatings, as evaluated by response surface methodology. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 2019;101:83-91. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.005>.
19. ASTM. Standard test methods for water vapor transmission of materials (E96-95). En *Annual book of ASTM standards*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 1995; 697:704.
20. Kurek, M., Galus, S., Debeaufort, F. 2014. Surface, mechanical and barrier properties of bio-based composite films based on chitosan and whey protein. *Food Packaging and Shelf Life*, 2014;1(1):56-67. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2014.01.001>.
21. ASTM. *Annual book of ASTM standards*. ASTM International, Philadelphia, PA, USA, 2004.

22. Arvanitoyannis, IS., Bosnea, L. 2004. Migration of substances from food packaging materials to foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2004;44(2);63-76. DOI: 10.1080 / 10408690490424621.
23. Resa, CPO., Gerschenson, LN., Jagus, RJ. 2014. Natamycin and nisin supported on starch edible films for controlling mixed culture growth on model systems and Port Salut cheese. *Food Control*, 2014;44,:46-151. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.054>.
24. Basiak, E., Lenart, A., Debeaufort, F. 2018. How glycerol and water contents affect the structural and functional properties of starch-based edible films. *Polymers*, 2018;10(4):412. DOI: 10.3390/polym10040412.
25. Bertuzzi, MA., Vidaurre, EC., Armada, M., Gottifredi, JC. Water vapor permeability of edible starch-based films. *Journal of food engineering*, 2007;80(3):972-978. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.07.016>.
26. Rossi-Márquez, G., Han, J., García-Almendárez, B., Castaño-Tostado, E., Regalado, C. Effect of temperature, pH, and film thickness on nisin release from antimicrobial whey protein isolate edible films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2009;89:2492 - 2497. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.3751>.
27. Pintado, CMBS., Sousa, I., Ferreira, MAAS. Edible films with bioactive characteristics against *Listeria monocytogenes*. *Annual Meeting/Total Food 2006–Sustainability of the Agri-Food Chain*; 2006
28. Sivarooban, T., Hettiarachchy, NS., Johnson, MG. Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Research International*. 2008;41(8):781-785. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.04.007>.
29. León-Leyva, IL. Camacho-Hernández, JJ. Zazueta-Morales, A. Calderón-Castro, PR. Fitch-Vargas, N. Desarrollo y caracterización de películas comestibles elaboradas a partir de almidón acetilado por extrusión y gelatina. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2018;714-720.
30. Silva, OA., Pella, MG., Pella, MG., Caetano, J., Simões, MR., Bittencourt, PR., Dragunski, DC. 2019. Synthesis and characterization of a low solubility edible film based on native cassava starch. *International journal of biological macromolecules*, 2019;128: 290-296. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.132>.

31. Kaewprachu, P., Amara, CB., Oulahal, N., Gharsallaoui, A., Joly, C., Tongdeesontorn, W., Degraeve, P. Gelatin films with nisin and catechin for minced pork preservation. *Food Packaging and Shelf Life*, 2018;18:173-183. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.10.011>.
32. Bojorges, H., Ríos-Corripio, A., Hernández-Cázares, AS., Hidalgo-Contreras, JV., Contreras-Oliva, A. Effect of the application of an edible film with turmeric (*Curcuma longa* L.) on the oxidative stability of meat. *Food Science & Nutrition*, 2020;8(8):4308-4319. DOI: 10.1002 / fsn3.1728.
33. Vázquez-Luna, A., Santiago, M., Rivadeneyra-Domínguez, E., Díaz-Sobac, R. 2019. Películas comestibles a base de almidón nanoestructurado como material de barrera a la humedad. *Ciencia UAT*, 2019;13(2):152-164. DOI: <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v13i2.1105>.
34. Giteru, SG., Oey, I., Ali, MA., Johnson, SK., Fang, Z. Effect of kafirin-based films incorporating citral and quercetin on storage of fresh chicken fillets. *Food Control*, 2017;80:37-44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.029>.
35. Bergo, P., Sobral, PJA., Prison, JM. Effect of glycerol on physical properties of cassava starch films. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2010;34:401-410. DOI: 10.1111 / j.1745-4549.2008.00282.x.
36. Siskawardani, DD., Hidayat, R. 2020. Physic-mechanical properties of edible film based on taro starch (*Colocasia esculenta* L. Schoott) with glycerol addition. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2020;458:1. DOI: 10.1088 / 1755-1315 / 458/1/012039.
37. Luchese, AC., Spada, JC., Tessaro, IC. Starch content affects physicochemical properties of corn and cassava starch-based films. *Industrial Crops and Products*, 2017;109:619–626. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.020>.
38. Enríquez, M., Velasco, R., Ortiz, V. Composición y procesamiento de películas biodegradables basadas en almidón. *Revista de biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 2012;10(1):182-192.
39. Tavares, KM., de Campos, A., Mitsuyuki, MC., Luchesi, BR., Marconcini, JM. 2019. Corn and cassava starch with carboxymethyl cellulose films and its mechanical and hydrophobic properties. *Carbohydrate polymers*, 2019;223. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115055>.

40. Bertuzzi, MA., Gottifredi, JC., Armada, M. Mechanical properties of a high amylose content corn starch-based film, gelatinized at low temperature. *Brazilian Journal of Food Technology*, 2012;15:219-227. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1981-67232012005000015>.
41. Ivanic, F., Joheć-Mošković, D., Janigová, I., Chodák, I. Physical properties of starch plasticized by a mixture of plasticizers. *European Polymer Journal*, 2017;93:843-849. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2017.04.006.
42. Valdés O, Agüero L, Zaldivar D, Solís Y, Katime I. Obtención de un complejo interpolimérico entre el poli (cloruro de acrililoiloxietil– trimetilamonio – co – metacrilato de 2-hidroxietilo) y el alginato de sodio. *Revista Iberoamerica Pol*, 2005;6(3):287-298.
43. Castro, C., Gargallo, L., Radic, D., Kortaberria, G., Mondragón, I. Blends containing chitosan and poly (sodium-4-styrene sulphonate). Compatibility behavior, *Carbohydrate Polymers*, 2011;83(1):81–87. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.07.027>.
44. Xu, SW. Preparation and catalytic properties of novel alginate-silica dehydrogenase. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2006;511-517. DOI: <https://doi.org/10.1021/ie050940y>.
45. Van Soest, J.J.G., Tournois, H., De Wit, D., Vliegthart, J.F.G. Short-range structure in (partially) crystalline potato starch determined with attenuated total reflectance Fourier-transform IR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 1995;(279):201–214. DOI: [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(95\)00270-7](https://doi.org/10.1016/0008-6215(95)00270-7).
46. Caicedo, CH., Ayala, G., Agudelo, AC. y Vargas, RA. Effect of glycerol on the electrical properties, phase behavior and water vapor permeability in films based on potato starch. *Revista Colombiana de Física*, 2010;42:439-448.
47. Navia, DP., Ayala, AA., Villada, HS. Interacciones empaque-alimento: migración. *Revista Ingenierías Universidad de Medellín*, 2014;13(25):99-113.
48. Sánchez-González, L., Cháfer, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., Desobry, S. Study of the release of limonene present in chitosan films enriched with bergamot oil in food simulants. *Journal of Food Engineering*, 2011;105:138-143. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2011.02.016.
49. Sánchez-Martín, MA., Salgado-Calvo, MT., San-Miguel-Hernández, Á., Pachón-Julián, J., Rodríguez-Barbero, E., Pastor-Martín, MR., Cabrero-Lobato, P. Nisina (N 234), aditivo utilizado como conservante en alimentos. *Gaceta Médica de Bilbao*, 2019;116(4):166-173.

50. Fernández, A., Soriano, E., Hernández-Muñoz, P., Gavara, R. Migration of antimicrobial silver from composites of polylactide with silver zeolites. *Journal of Food Science*, 2010;75(3):186-193. DOI: 10.1111 / j.1750-3841.2010.01549.x.
51. EUR-Lex, E. L. Reglamento (UE) No 10/2011 de la Comisión, de 14 de enero de 2011, sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 15. 2011.
52. Méndez-Reyes, DA., Quintero-Cerón, JP., Váquiro-Herrera, HA., Solanilla-Duque, JF. Sodium alginate in the development of edible films. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 2015;5(2):089-113.
53. Heredia-Castro, PY., Hernández-Mendoza, A., González-Córdova, AF., Vallejo-Córdova, B. Bacteriocinas de bacterias ácido-lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*, 2017;42(6):340-346.
54. Sanjurjo, K., Flores, S., Gerschenson, L., Jagus, R. Study of the performance of nisin supported in edible films. *Food Research International*, 2006;39(6):749-754. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.01.016>.
55. Bastarrachea, L., Dhawan, S., Sablani, SS., Powers, J. Release kinetics of nisin from biodegradable poly (butylene adipate-co-terephthalate) films into water. *Journal of Food Engineering*, 2010;100(1):93-101. DOI: 10.1016 / j.jfoodeng.2010.03.032.
56. Osimani, A., Clementi, F. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in mass catering: An overview in the European Union. *International Journal of Hospitality Management*, 2016;57:9-17. DOI: 10.1016 / j.ijhm.2016.05.005.
57. Pattanayaiying, R., Aran, H., Cutter, CN. Incorporation of nisin Z and lauric alginate into pullulan films to inhibit foodborne pathogens associated with fresh and ready-to-eat muscle foods. *International Journal of Food Microbiology*, 2015;207:77-82. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.045>.

CONCLUSIONES GENERALES

La metodología de superficie de respuesta Box-Behnken, fue una herramienta estadística que permitió conocer el contenido óptimo de polímeros (fécula de malanga, nisina y glicerol) con alginato para obtener una biopelícula con excelentes propiedades mecánicas, física, químicas y con propiedades antimicrobianas contra *Listeria monocytogenes* en carne de pollo.

La fécula de malanga mostró ser un polímero viable para formar biopelículas en combinación con otros polímeros, con buenas propiedades mecánicas. No obstante, durante el estudio se evidenció limitantes tecnológicas cuando se adiciona más del 2% en la solución formadora de biopelícula.

La nisina como componente antimicrobiano dentro de la biopelícula puede ser aplicada en alimentos hidrofílicos y con bajos pH, la liberación paulatina en carne de pollo permito alargar la vida útil hasta 15 d en almacenamiento en refrigeración.

RECOMENDACIONES GENERALES

Se recomienda para futuras investigaciones:

- La película biodegradable desarrollada mostro eficientes características antimicrobianas; no obstante, se requiere evaluar la calidad de la carne de pollo con la biopelícula como empaque y rectificar la vida útil de la carne en fresco.
- Evaluar la migración y la cinética de liberación de la nisina *in vitro* a la temperatura de almacenamiento de la carne.
- Evaluar otras bacteriocinas que tengan efecto sobre otros microorganismos presentes en la carne, como es *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*.
- Los rangos establecidos permitieron la optimización de la película biodegradable, sin embargo, al presentarse limitantes tecnológicas se recomienda modificar las concentraciones de fécula de malanga y glicerol para poder obtener las curvas características de superficie de respuesta.

ANEXOS

A1. Anexos del Capítulo I

A 1.1 Elaboración de biopelículas

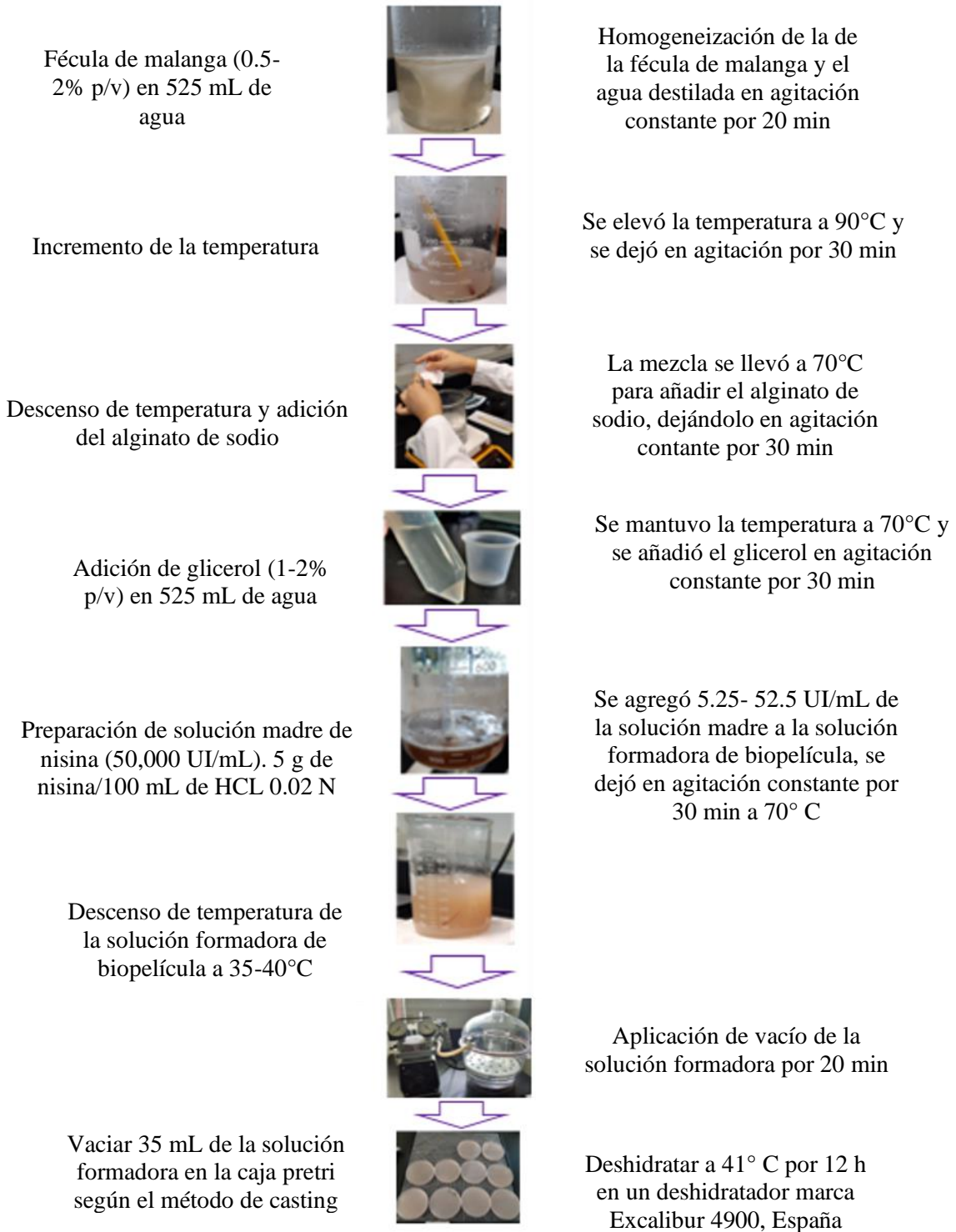


Figura 1. Pasos de preparación de biopelículas de alginato de sodio, fécula de malanga adicionados con nisina

A 1.2 Ecuaciones de las variables de respuesta

El efecto de cada variable independiente sobre cada variable de respuesta se muestra en las siguientes ecuaciones, se utilizó los datos experimentales ajustados:

$$\text{Espesor} = 0.0444 + 5.5735^{-7} X_1 + 0.0129 X_2 + 0.0919 X_3 + 4.6560^{-6} X_1 X_2 - 1.5022^{-6} X_1 X_3 - 0.0173 X_2 X_3 + 3.5529^{-10} X_1^2 + 0.0034 X_2^2 + 0.0174 X_3^2 \dots$$

$$\text{Humedad} = -71.1038 + 0.0002 X_1 + 6.4689 X_2 + 129.5746 X_3 - 0.0026^{-6} X_1 X_2 + 0.0028^{-6} X_1 X_3 + 4.6609 X_2 X_3 - 2.3391^{-7} X_1^2 - 7.1644 X_2^2 - 41.3289 X_3^2$$

$$\text{Solubilidad} = -1.8698 + 7.6552^{-6} X_1 + 2.5175 X_2 + 1.7749 X_3 - 6.515^{-6} X_1 X_2 - 1.344^{-5} X_1 X_3 - 0.0342 X_2 X_3 + 1.8219^{-8} X_1^2 - 0.8075 X_2^2 - 0.6343 X_3^2$$

$$\text{PVA} = -0.2708 + 1.69^{-5} X_1 - 0.2611 X_2 + 0.5815 X_3 + 2.04^{-5} X_1 X_2 - 4.556^{-5} X_1 X_3 - 0.2080 X_2 X_3 + 1.91^{-9} X_1^2 + 0.1545 X_2^2$$

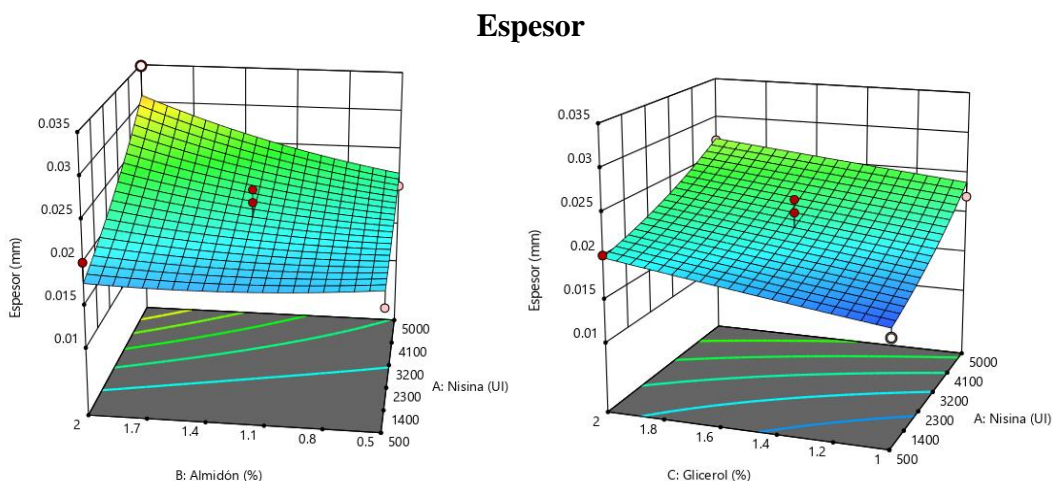
$$\text{Fuerza tensil} = 7.8346 - 0.0017 X_1 + 4.9627 X_2 - 4.4712 X_3 - 4.44^{-4} X_1 X_2 + 0.0012 X_1 X_3 - 0.2364 X_2 X_3 - 7.61^{-9} X_1^2 - 1.0051 X_2^2 - 0.2581 X_3^2$$

$$\text{Fuerza de Quiebre} = 22.1341 - 0.0051 X_1 + 15.6326 X_2 - 11.4328 X_3 - 0.0022 X_1 X_2 + 0.0036 X_1 X_3 - 2.4876 X_2 X_3 + 1.352^{-7} X_1^2 - 0.8076 X_2^2 - 0.7446 X_3^2$$

$$\text{Elasticidad} = 31.7842 + 0.0032 X_1 - 13.6073 X_2 - 19.2781 X_3 - 0.0027 X_1 X_2 + 0.0019 X_1 X_3 + 17.2832 X_2 X_3 - 6.58^{-7} X_1^2 - 3.1014 X_2^2 - 0.5454 X_3^2$$

A 1.3 Superficies de respuesta de las 7 variables respuesta

En la Figura 2 se muestra que el espesor aumenta cuando los contenidos de las variables independientes aumentan.



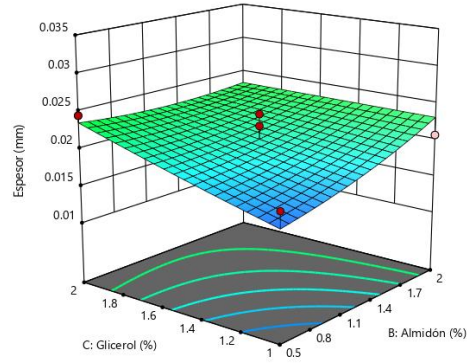


Figura 2. Superficies de respuesta para la variable respuesta espesor que muestran las variables independientes

Humedad

En la Figura 3 se muestra que a mayor contenido de nisina y de glicerol aumenta la humedad.

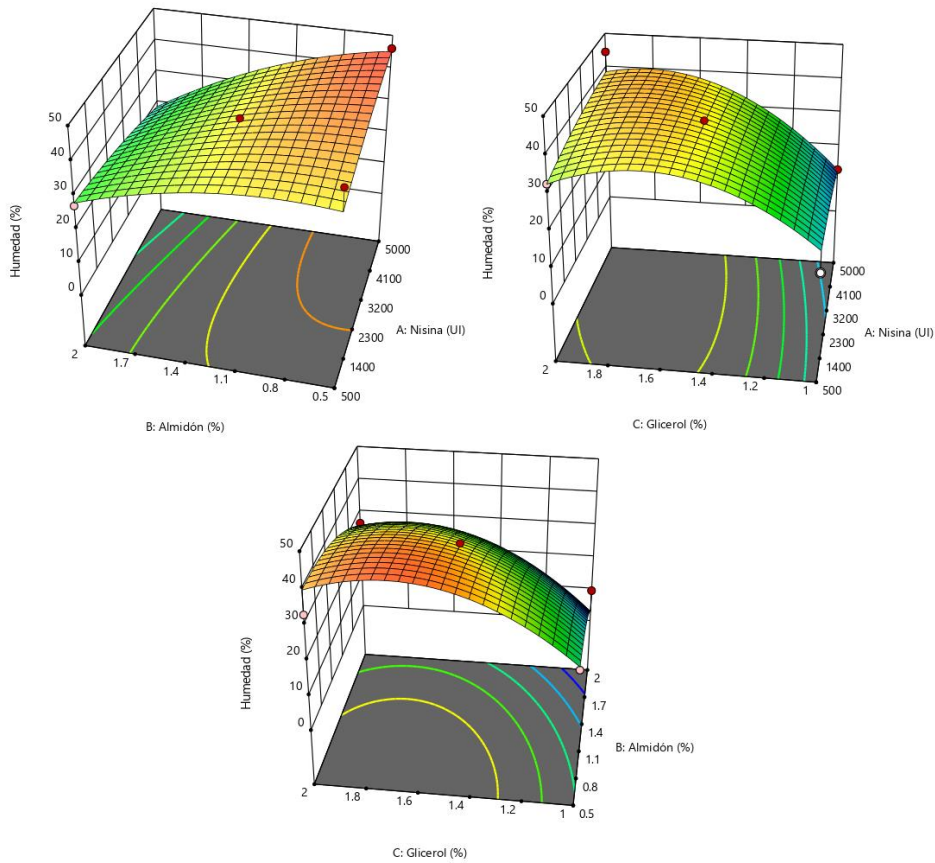


Figura 3. Superficies de respuesta para la variable respuesta humedad que muestran las variables independientes

Solubilidad en agua

En la Figura 4 no se muestran efectos de las variables independientes sobre la solubilidad de la biopelícula en agua

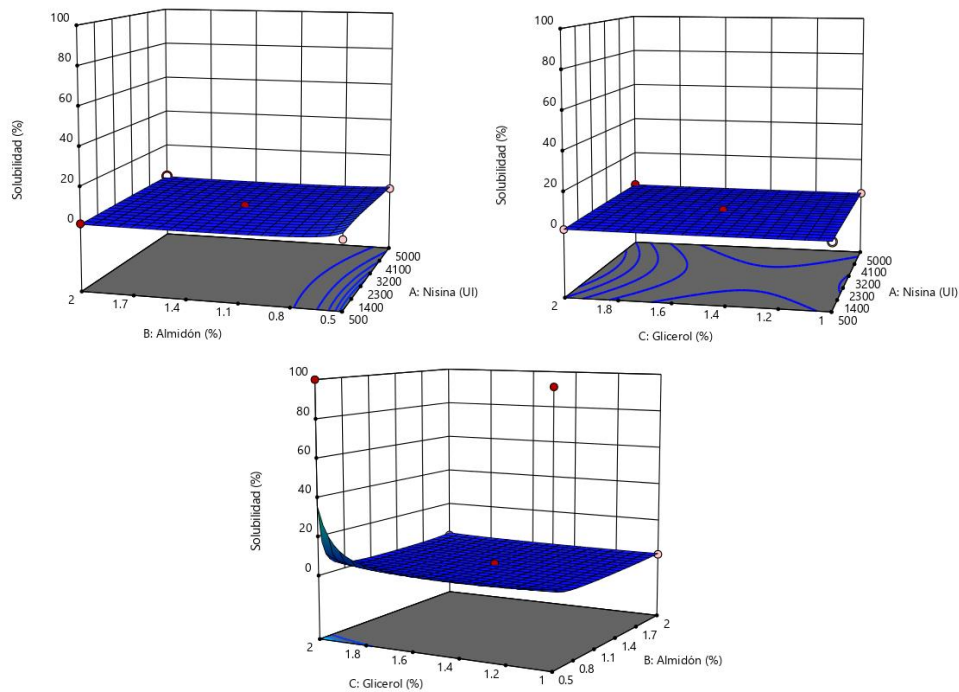
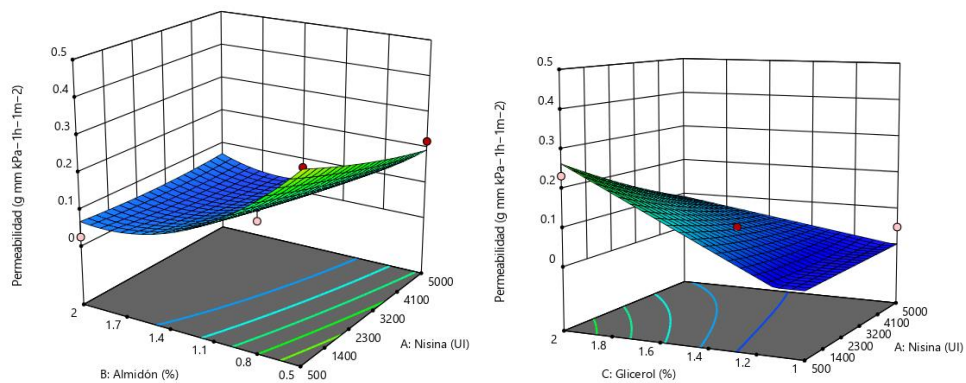


Figura 4. Superficies de respuesta para la variable respuesta solubilidad que muestran las variables independientes

Permeabilidad al vapor de agua

En la Figura 5 se muestra que la Permeabilidad al vapor de agua aumenta con el contenido de glicerol y disminuye con el contenido mínimo de fécula de malanga.



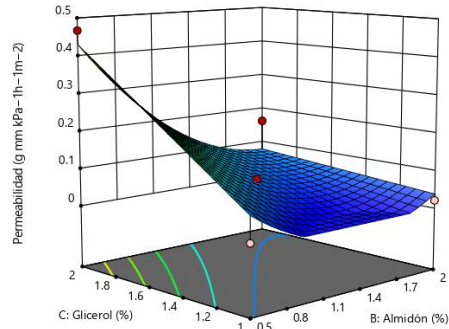


Figura 5. Superficies de respuesta para la variable respuesta permeabilidad al vapor de agua que muestran las variables independientes.

Fuerza tensil

La Fuerza tensil está relacionada con el contenido máximo de fécula de malanga y los contenidos mínimos de glicerol y nisina

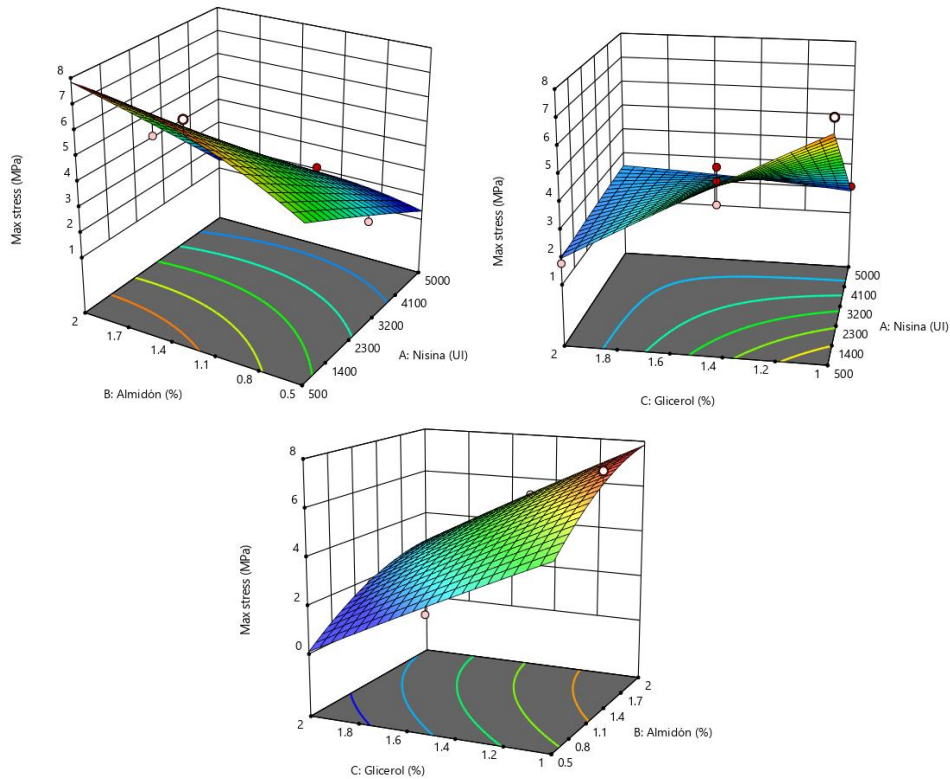


Figura 5. Superficies de respuesta para la variable respuesta fuerza tensil que muestran las variables independientes

Fuerza de quiebre

La Figura 6 muestra que la fuerza de quiebre aumenta con el contenido máximo de fécula y mínimo de glicerol y nisina

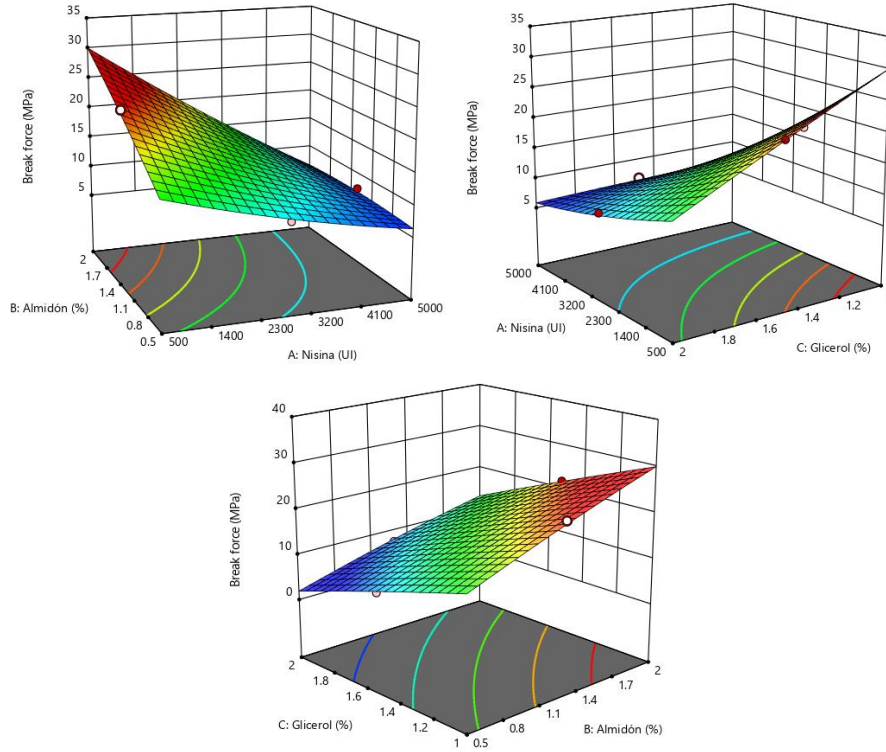
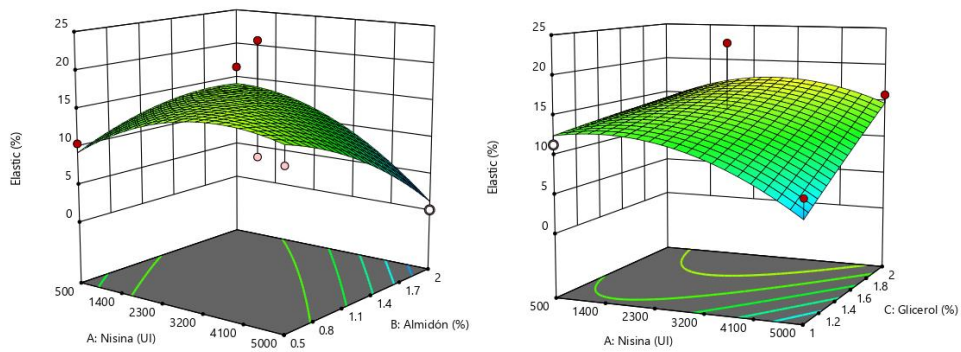


Figura 6. Superficies de respuesta para la variable respuesta fuerza de quiebre que muestran las variables independientes

Elasticidad

La elasticidad se ve afectada con el aumento de contenido de glicerol y el contenido mínimo de fécula de malanga



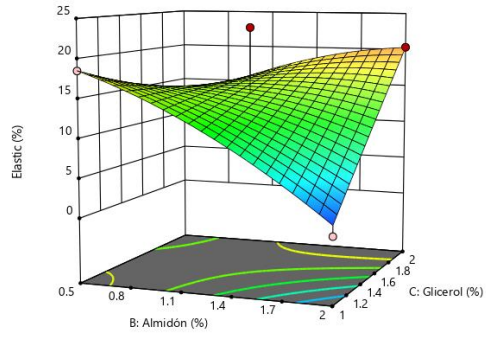


Figura 7. Superficies de respuesta para la variable respuesta porcentaje de elongación que muestran las variables independientes

A 1.4 Evaluación de la migración total de nisina en simulantes alimentarios (Soler, 2016).

Pesado de tubo de cristal (15 mL), biopelícula y simulante alimentario



Los tubos previamente puestos a peso constante se pesaron, se adicionó la biopelícula y 15 mL de cada simulante (etanol 10%, ácido acético 3% e iso-octano)



La migración de la nisina se evaluó a los 6, 9, 12 y 15 d a 20°C, con 3 repeticiones.



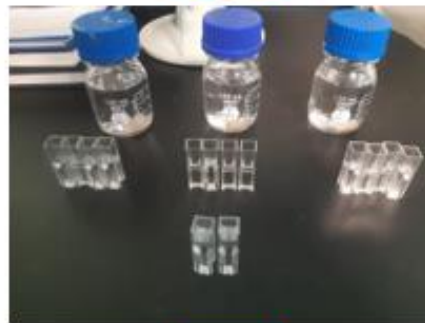
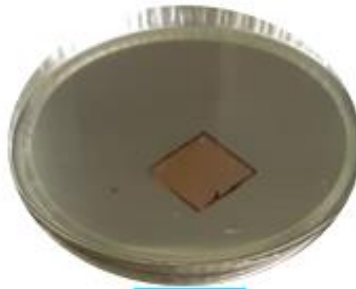
Finalizado el contacto de la biopelícula con el simulante, en cada tiempo establecidos se llevó a evaporación a 60°C durante 24-48 h



Se pesó el residuo generado para determinar la migración total de nisina.

Figura 8. Elaboración de la migración de nisina en simulantes alimentarios
A 1.5 Extracción de nisina en las biopelículas (Soler, 2016)

Se recortó muestras de
4 cm² de biopelícula



Se pusieron en contacto
con 100 mL de metanol
durante 24, 48 y 72 h a
temperatura ambiente y
en agitación constante,
por triplicado

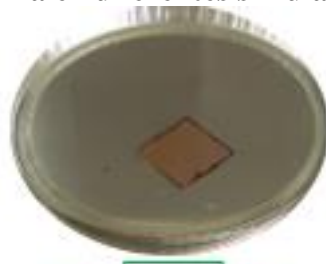


Pasado el tiempo
respectivo, la
concentración de
nisina extraído se
cuantificó
mediante
espectrofotometría
a 282 nm

Figura 9. Proceso de extracción de nisina en la biopelícula óptima en metanol.

A 1.6 Cinética de liberación de nisina en diferentes simulantes alimentarios (Soler. 2016)

Muestras de biopelícula de 4 cm² se pusieron en contacto con 100 mL de simulante (etanol 10%, etanol 50%, ácido acético 3% e isoctano)



Los frascos con la biopelícula y el simulante fueron cerrados para evitar la evaporación del simulante



Los frascos se pusieron en agitación y se evaluaron a diferentes tiempos (cada 5 min, 10 min, 20 min y 30 min).



La liberación de la cinética se midió a una absorbancia de cada solución se determinó a 282 nm.

Figura 10. Proceso de análisis de la cinética de liberación de nisina en la biopelícula óptima en simulantes alimentarios (etanol 10%, etanol 50%, ácido acético 3% e isoctano).

A 1.7 Evaluación antimicrobiana de la película óptima, aplicación de la biopelícula en la carne.



Muestras de pechuga de pollo en porciones redondas de 50 mm de diámetro.

Las muestras de carne se dividieron en 3 lotes (Carne+Biopelícula óptima, Carne con biopelícula sin nisina y Carne inoculada con *Listeria monocytogenes*), cada muestra se colocó en una caja Petri, por triplicado



Esterilización de las muestras de carne en campana de flujo laminar con luz UV



Inoculación de la carne



Todos los lotes de carne se inocularon con 100 μ L de la cepa *L. monocytogenes* para colocar la biopelícula óptima sobre la superficie y puestos en refrigeración

Remoción de la biopelícula en la carne



La biopelícula fue retirada de la carne en el respectivo día



Para homogenizar las muestras, se colocaron en vasos de licuadora previamente esterilizados



La carne se homogenizó por 2 min con 90 mL de agua peptonada



De la mezcla resultante se hicieron diluciones con 1 mL de agua peptonada para disminuir la carga bacteriana y obtener organismos aislados



La dilución 3 se sembró en caldo de *Listeria* para hacer el recuento de células viables

Figura 11. Evaluación antimicrobiana de la biopelícula óptima en carne inoculada con *Listeria monocytogenes*. 87