



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

---

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN  
CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS CÓRDOBA**

**POSTGRADO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN  
AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE**

**DESARROLLO DE MATERIALES BIOPOLIMÉRICOS CON  
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA PARA EL CONTROL DE  
CONTAMINANTES BIOLÓGICOS PATÓGENOS EN  
PRODUCTOS CÁRNICOS**

**ZUEMY HERNÁNDEZ NOLASCO**

**TESIS**

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

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**AMATLÁN DE LOS REYES, VERACRUZ, MÉXICO**

2023

La presente tesis, titulada: “**Desarrollo de materiales biopoliméricos con actividad antimicrobiana para el control de contaminantes biológicos patógenos en productos cárnicos**”, realizada por la alumna: **Zuemy Hernández Nolasco**, 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**

**POSTGRADO EN 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. Patricia Haydeé Castellano

Amatlán de los Reyes, Veracruz, México, 2023.

# DESARROLLO DE MATERIALES BIOPOLIMÉRICOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA PARA EL CONTROL DE CONTAMINANTES BIOLÓGICOS PATÓGENOS EN PRODUCTOS CÁRNICOS

Zuemy Hernández Nolasco, M en C.

Colegio de postgraduados, 2023

## RESUMEN

La carne y los productos cárnicos son alimentos nutritivos susceptibles a la contaminación microbiana. Es fundamental abordar este problema de manera efectiva con el fin de garantizar la calidad, seguridad alimentaria, y proteger la salud de los consumidores. Ante esta problemática el desarrollo de innovaciones tecnológicas en el área de envasado activo representa una excelente alternativa. Los sistemas de envasado activo se definen como aquellos que incorporan deliberadamente componentes que liberan o absorben sustancias en o desde el alimento con la finalidad de prolongar su vida útil. Las películas biodegradables activas a base de polisacáridos pueden incorporar sustancias antimicrobianas de fuentes naturales como los ácidos orgánicos, como alternativa a los conservantes artificiales. En esta perspectiva, en la presente investigación se desarrollaron películas biodegradables de almidón de taro y el efecto de la concentración de (0.75-1.5%) alginato de sodio, (0.5-1%) glicerol y (1-3%) ácido láctico (LA) se optimizó de acuerdo con la metodología de superficie de respuesta. La película biodegradable optimizada (OBF) consistió en (0.75% glicerol, 1.05% alginato de sodio y 1.25% LA). La OBF mostró un espesor de 0.14 mm, WVP 1.05 (g·mm/kPa·h·m<sup>2</sup>). La fuerza de rotura (BF) para la OBF fue 1.54 veces mayor que la película biodegradable control (CBF), como resultado de las reticulaciones iónica y covalente. La reticulación covalente fue confirmada por FTIR, con la presencia de un pico característico a 1730 cm<sup>-1</sup>. La ausencia de elongación a la rotura (EAB) en CBF sugiere que la inclusión de LA en la OBF actúa como plastificante con una EAB del 23.24%. La OBF indicó actividad antibacteriana contra *E. coli* y *L. monocytogenes* de 5.81 y 5.00 cm<sup>2</sup>, respectivamente. Los resultados demostraron que el envasado activo en muestras de chorizo tipo español inhibió el crecimiento de coliformes totales durante el almacenamiento.

**Palabras clave:** envase activo, película biodegradable, antimicrobiano, optimización.

# DEVELOPMENT OF BIOPOLYMER MATERIALS WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY FOR THE CONTROL OF PATHOGENS AND CONTAMINANTS IN MEAT PRODUCTS

Zuemy Hernández Nolasco, M en C.

Colegio de Postgraduados, 2023

## ABSTRACT

Meat and meat products are nutritious foods susceptible to microbial contamination. It is essential to address this issue effectively in order to ensure quality, food safety, and protect the health of consumers. Faced with this problem, the development of technological innovations in the area of active packaging represents an excellent alternative. Active packaging systems are defined as those that deliberately incorporate components that release or absorb substances into or from food in order to prolong its shelf life. Polysaccharide-based active biodegradable films can incorporate antimicrobial substances from natural sources such as organic acids, as an alternative to artificial preservatives. In this perspective, biodegradable films of taro starch and the effect of the concentration of (0.75-1.5%) sodium alginate, (0.5-1%) glycerol and (1-3%) lactic acid (LA) was optimized according to the response surface methodology. The optimized biodegradable film (OBF) consisted of (0.75% glycerol, 1.05% sodium alginate and 1.25% LA). The OBF showed a thickness of 0.14 mm, WVP 1.05 (g·mm/kPa·h·m<sup>2</sup>). The breaking force (BF) for the OBF was 1.54 times higher than the control biodegradable film (CBF), as a result of the ionic and covalent crosslinks. The covalent crosslinking was confirmed by FTIR, with the presence of a characteristic peak at 1730 cm<sup>-1</sup>. The absence of elongation at break (EAB) in CBF suggests that the inclusion of LA in OBF acts as a plasticizer with an EAB of 23.24%. The OBF indicated antibacterial activity against *E. coli* and *L. monocytogenes* of 5.81 and 5.00 cm<sup>2</sup>, respectively. The results demonstrated that active packaging in Spanish-type chorizo samples inhibited the growth of total coliforms during storage.

**Keywords:** active packaging, biodegradable film, antimicrobial, optimization.

## DEDICATORIA

A la familia **Hernández-Nolasco**. A mis padres **Nicolás** y **Francis**. **Nicolás**, muchas gracias porque desde muy niña despertaste en mí la creatividad, mis capacidades y habilidades, así como contribuir a mi primer acercamiento a la Ciencia, cuando me regalaste mi primer set de libros: ¿Qué Quieres Saber De La Ciencia?, Ahora que recibo mi título de Maestría en Ciencias, te lo dedico papá. **Francis**, me encanta que se me halla asignado ser tu hija, eres una mamá única y especial, gracias por tu amor.

A mis hermanos: **Damaris** y **Nicolás Jr.** Por ser mi fortaleza y apoyo incondicional.

A la **Fam. Osorio Hernández**, a mis adorados sobrinos **Moroni** y **Mía** que son mi mayor inspiración. A mí segunda madre, **Eliza Baruch** gracias por creer en mí y presumirme como nadie más lo ha hecho, la vida no me alcanza para agradecerte el amor que nos brindas. **Onésimo Nolasco**<sup>†</sup> serás mi mejor ejemplo de vida en esta tierra, vives siempre en mi corazón.

*La familia es eterna.*

A IALI. Mariana Acateca, por el estrecho vínculo académico, trabajo en conjunto, amplia experiencia adquirida-compartida en el LCA y los proyectos de investigación, largas horas de planes y experimentos. Gracias por enseñarme a amar las proteínas, compartir tu experiencia y conocimiento conmigo. Agradezco tu paciencia y fuerza.

A IBT. Liliana Castillo, por coincidir en el CP, por ser un apoyo moral y un lugar seguro, gracias por que sin tu sentido del humor no recordaría los momentos más divertidos en mi fase experimental. Agradezco tu amistad espontánea y genuina.

A MGDS Anel Mora, gracias por tu apoyo moral incondicional, coincidir contigo en esta vida profesional y personal fue un gane al cierre del término de mi etapa profesional.

Con amor.

*Zuemy*

## AGRADECIMIENTOS

Es con humilde gratitud que reconozco y agradezco a la **Dra. Aleida Selene Hernández Cázares** su guía y apoyo incondicional a lo largo del camino para completar este programa de Posgrado. Agradezco la oportunidad, su entrenamiento, excelente calidad profesional y por compartir conmigo su conocimiento. Gracias por contagiarme su actitud curiosa y capacidad para cuestionar, explorar y profundizar experimentos. La **Dra. Hernández-Cázares** ha sido un ejemplo para mí, de una investigadora de principios con una preocupación genuina por sus estudiantes y personal.

También me gustaría reconocer a los demás miembros de mi comité:

**Dra. María Antonieta Ríos Corripio**, por las sugerencias, aportaciones y vinculaciones educativas en beneficio de mi investigación.

Al **Dr. Juan Valente Hidalgo Contreras**, por las valiosas aportaciones, disponibilidad y excelente calidad profesional.

A la **Dra. Patricia Haydeé Castellano**, por participar como asesora externa, por sus valiosas y acertadas aportaciones, excelente calidad profesional, disponibilidad, amabilidad y por motivarme a avanzar con mi investigación.

Agradezco a todos los miembros del consejo por su generoso tiempo y experiencia en beneficio de mi investigación.

Un agradecimiento sincero y especial a la **Q.F.B. Laura Bautista Hernández** por su apoyo incondicional, amabilidad y disponibilidad de colaboración.

Agradezco al **Colegio de Posgraduados-Campus Córdoba** y al **Posgrado en Innovación Agroalimentaria Sustentable**, así como al **Laboratorio de Ciencias de los Alimentos (LCA)**, y a las **Plantas piloto de Productos Cárnicos** y **Productos Lácteos** para el desarrollo de la presente investigación.

Finalmente, expreso mi agradecimiento al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (**CONAHCYT**) por la beca otorgada y hacer posible la realización de mis estudios de posgrado.

## CONTENIDO

|  |     |
|--|-----|
| RESUMEN.....   | III |
| ABSTRACT.....  | IV  |
| DEDICATORIA.....   | V   |
| AGRADECIMIENTOS.....   | VI  |
| INTRODUCCIÓN GENERAL.....  | 1   |
| 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....  | 1   |
| 2. HIPÓTESIS.....  | 3   |
| 3. OBJETIVOS.....  | 3   |
| OBJETIVO GENERAL .....   | 3   |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 3   |
| 4. INNOVACIÓN.....   | 4   |
| 5. SUSTENTABILIDAD .....   | 5   |
| 6. SEGURIDAD ALIMENTARIA .....   | 6   |
| 7. MARCO TEÓRICO .....   | 7   |
| 7.1 PELÍCULAS BIODEGRADABLES .....   | 7   |
| 7.2 MATERIALES BIOPOLIMÉRICOS FORMADORES DE PELÍCULAS BIODEGRADABLES ..... | 10  |
| 7.2.1 Alginato.....  | 10  |
| 7.2.2 Almidón .....  | 13  |
| 7.2.3 Glicerol .....   | 17  |
| 7.3 ANTIMICROBIANOS NATURALES.....   | 18  |
| 7.3.1 Ácido láctico .....  | 20  |
| 7.3.1.1 Mecanismo de inhibición bacteriana .....                           | 21  |
| 7.3.1.2 Usos del ácido láctico en la conservación de alimentos.....        | 22  |
| 7.4 ENVASADO ACTIVO .....  | 23  |
| 7.4.1 Carne.....   | 24  |
| 7.4.1.1 Productos cárnicos crudo curados.....                              | 24  |
| 7.4.1.2 Chorizo tipo español.....  | 25  |
| 7.4.1.2.1 <i>E. coli</i> .....   | 26  |
| 7.4.1.2.2 <i>Listeria monocytogenes</i> .....                              | 27  |
| 7.4.1.2.3 <i>Salmonella</i> .....  | 27  |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 7.5     | MÉTODO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA .....                               | 28 |
| 7.5.1   | Diseño Box-Behnken.....   | 29 |
| 8.      | LITERATURA CITADA .....   | 31 |
|         | CAPÍTULO 1 .....  | 43 |
| 1.1     | RESUMEN.....  | 43 |
| 1.2     | INTRODUCCIÓN .....  | 43 |
| 1.3     | METODOLOGÍA .....   | 44 |
| 1.3.1   | PRODUCCIÓN DE LAS PELÍCULAS BIODEGRADABLES .....                      | 44 |
| 1.3.2   | CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y QUÍMICA DE LAS PELÍCULAS BIODEGRADABLES..... | 45 |
| 1.3.2.1 | Espesor.....  | 45 |
| 1.3.2.2 | Contenido de humedad .....  | 45 |
| 1.3.2.3 | Prueba de solubilidad en agua.....                                    | 45 |
| 1.3.2.4 | Permeabilidad al vapor de agua.....                                   | 46 |
| 1.3.2.5 | Propiedades mecánicas.....  | 46 |
| 1.3.2.6 | Caracterización estructural de las películas por FTIR.....            | 46 |
| 1.3.3   | ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA <i>IN VITRO</i> .....                        | 47 |
| 1.4     | RESULTADOS .....  | 47 |
| 1.4.1   | CARACTERIZACIÓN DE LAS PELÍCULAS BIODEGRADABLES .....                 | 47 |
| 1.4.2   | CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS PELÍCULAS POR FTIR .....           | 49 |
| 1.4.3   | ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA <i>IN VITRO</i> .....                        | 50 |
| 1.5     | CONCLUSIONES.....   | 51 |
| 1.6     | RECOMENDACIONES .....   | 52 |
| 1.7     | REFERENCIAS.....  | 52 |
|         | CAPÍTULO 2 .....  | 54 |
| 2.1     | RESUMEN.....  | 54 |
| 2.2     | INTRODUCCIÓN .....  | 54 |
| 2.3     | MATERIALES Y MÉTODOS .....  | 55 |
| 2.3.1   | CEPAS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO BACTERIANO .....                   | 55 |
| 2.3.2   | PREPARACIÓN DE LAS PELÍCULAS BIODEGRADABLES .....                     | 56 |
| 2.3.3   | DISEÑO EXPERIMENTAL.....  | 56 |
| 2.3.4   | ENSAYOS DE CARACTERIZACIÓN.....                                       | 57 |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| 2.3.4.1   | Espesor, contenido de humedad, solubilidad y WVP.....              | 57 |
| 2.3.4.2   | Propiedades mecánicas.....   | 57 |
| 2.3.5     | OPTIMIZACIÓN DEL MODELO .....                                      | 57 |
| 2.3.5.1   | CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL .....                                  | 57 |
| 2.3.5.1.1 | Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) ..... | 58 |
| 2.3.5.1.2 | Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....                     | 58 |
| 2.3.5.2   | ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA <i>IN VITRO</i> .....                     | 58 |
| 2.3.5.3   | BIODEGRABILIDAD.....   | 58 |
| 2.3.6     | ELABORACIÓN Y ENVASADO DE MUESTRAS DE CHORIZO TIPO ESPAÑOL .....   | 58 |
| 2.3.6.1   | Análisis fisicoquímico .....                                       | 59 |
| 2.3.6.2   | Análisis microbiológico .....                                      | 59 |
| 2.3.6.3   | ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....   | 59 |
| 2.4       | RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....                                       | 60 |
| 2.4.1.    | ENSAYOS DE CARACTERIZACIÓN.....                                    | 60 |
| 2.4.1.1   | Espesor, humedad, solubilidad y WVP .....                          | 60 |
| 2.4.1.2   | Propiedades mecánicas.....   | 63 |
| 2.4.2     | CARACTERIZACIÓN DE LA OBF .....                                    | 66 |
| 2.4.2.1   | Caracterización estructural .....                                  | 67 |
| 2.4.2.2   | Actividad antibacteriana in vitro .....                            | 69 |
| 2.4.2.3   | Biodegradabilidad.....   | 70 |
| 2.4.3     | ANÁLISIS EN MUESTRAS DE CHORIZO TIPO ESPAÑOL .....                 | 71 |
| 2.4.3.1   | Análisis fisicoquímico .....                                       | 71 |
| 2.4.3.2   | Análisis Microbiológico.....                                       | 75 |
| 2.5.      | CONCLUSIONES.....  | 77 |
| 2.6       | LITERATURA CITADA .....  | 78 |
|           | CONCLUSIONES GENERALES.....  | 82 |
|           | RECOMENDACIONES GENERALES.....                                     | 83 |
|           | ANEXO A. ....  | 84 |
|           | ANEXO B. ....  | 90 |

## LISTA DE CUADROS

|  |    |
|--|----|
| <b>Cuadro 1.</b> Clasificación de diferentes biopolímeros para la formación de películas y recubrimientos.....   | 8  |
| <b>Cuadro 2.</b> Propiedades funcionales de películas y recubrimientos en productos alimenticios.....  | 10 |
| <b>Cuadro 3.</b> Contenido de amilosa y amilopectina de los almidones.....   | 14 |
| <b>Cuadro 4.</b> Compuestos antimicrobianos naturales de fuentes animales, vegetales y microbianas.....  | 19 |
| <b>Cuadro 5.</b> Dosis máxima de ácido láctico aplicada a diferentes tipos de alimentos.....   | 22 |
| <b>Cuadro 1-1.</b> Composición de las soluciones filmogénicas.....   | 45 |
| <b>Cuadro 1-2.</b> Caracterización física y química de las películas de almidón de malanga y alginato adicionadas con antimicrobianos.....   | 57 |
| <b>Cuadro 1-3.</b> Zona de inhibición basada en actividades antibacterianas de películas de almidón de malanga y alginato adicionadas con antimicrobianos.....                         | 51 |
| <b>Cuadro 2-1.</b> Variables respuesta del Diseño Box-Behnken con diferentes niveles de glicerol, alginato de sodio y ácido láctico en la formulación de películas biodegradables..... | 61 |
| <b>Cuadro 2-2.</b> Coeficientes de regresión, R <sup>2</sup> , y falta de ajuste para los modelos reducidos para las películas biodegradables.....                                     | 62 |
| <b>Cuadro 2-3.</b> Valores fisicoquímicos experimentales de la optimización numérica de la película biodegradable optimizada (OBF).....  | 66 |
| <b>Cuadro 2-4.</b> Actividad antibacteriana de película biodegradable control (CBF) y película biodegradable optimizada (OBF) por el método de difusión en agar.....                   | 70 |

**Cuadro 2-5.** Parámetros fisicoquímicos en chorizo tipo español envasado con película biodegradable optimizada (OBF; T3), película biodegradable control (CBF; T2) y sin recubrir (T1).....74

**Cuadro 2-6.** Evolución de los recuentos microbianos en muestras de chorizo tipo español envasado con película biodegradable optimizada (OBF; T3), película biodegradable control (CBF; T2) y sin recubrir (T1).....75

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Principales aplicaciones del alginato y almidón en diversas industrias.....  | 11 |
| <b>Figura 2.</b> Estructura química del alginato. a) Unidades monoméricas de alginato, b) Composición de la cadena polimérica, c) Distribución de bloques.....  | 12 |
| <b>Figura 3.</b> Comportamientos de unión de Ca-alginato (ALG: Alginato).....   | 13 |
| <b>Figura 4.</b> Estructura química de la amilosa (a) y amilopectina (b).....   | 15 |
| <b>Figura 5.</b> Estructura química de la molécula de glicerol.....   | 17 |
| <b>Figura 6.</b> Estructura química de los ácidos orgánicos.....  | 20 |
| <b>Figura 7.</b> Mecanismo de inhibición bacteriana por ácidos orgánicos.....   | 21 |
| <b>Figura 8.</b> Esquema de un sistema de envasado antimicrobiano a través de un sistema de absorción, liberación e inmovilización.....   | 23 |
| <b>Figura 9.</b> Clasificación de productos cárnicos curados y cocidos.....   | 25 |
| <b>Figura 10.</b> Ejemplos de gráficas de superficie de respuesta.....  | 28 |
| <b>Figura 11.</b> (a) Cubo para el BBD y tres diseños factoriales $2^2$ entrelazados, (b) Figura de tres diseños factoriales $2^2$ entrelazados y un punto central.....   | 29 |
| <b>Figura 1-1.</b> Apariencia visual de las películas biodegradables que incorporan antimicrobianos.....  | 48 |
| <b>Figura 1-2.</b> Espectros FTIR para películas de almidón de malanga y alginato incorporadas con antimicrobianos y sus compuestos base.....   | 49 |
| <b>Figura 2-1.</b> Diagramas de superficie de respuesta 3D para diseño de Box-Behnken que muestran los efectos de alginato de sodio (ALG), glicerol (G) y ácido láctico (LA), sobre las variables respuestas: espesor (a-c), humedad (d-f), solubilidad en agua (g-i), permeabilidad al vapor de agua (WVP) (j-l), resistencia a la tracción (TS) (m-ñ), fuerza de rotura (BF) (o-q) y elongación a la rotura (EAB) |    |

|  |    |
|--|----|
| (r-t) de las películas biodegradables manteniendo la tercera variable independiente en su valor medio.....   | 65 |
| <b>Figura 2-2.</b> Apariencia visual de las películas elaboradas a base de almidón de taro (TAS), alginato de sodio (ALG) y glicerol (G). <b>a.</b> Película biodegradable control (CBF) y <b>b.</b> Película biodegradable optimizada (OBF).....  | 67 |
| <b>Figura 2-3.</b> Espectros FTIR de la película biodegradable control (CBF) y película biodegradable optimizada (OBF).....  | 68 |
| <b>Figura 2-4.</b> Micrografías SEM de la superficie de la película biodegradable control CBF (a) y la película biodegradable optimizada OBF (b), (ampliación 1000x).....  | 69 |
| <b>Figura 2-5.</b> Apariencia visual: de las películas elaboradas a base de almidón de taro (TAS), alginato de sodio (ALG) y glicerol (G). <b>a.</b> Película biodegradable control (CBF) y <b>b.</b> Película biodegradable optimizada (OBF) sometidas a la prueba de biodegradabilidad.....            | 71 |
| <b>Figura 2-6.</b> Envasado del chorizo tipo español, T1 (muestras sin envasar) (a-e); T2 (muestras recubiertas con la película biodegradable control (CBF) (f-j); T3 (muestras recubiertas con la película biodegradable optimizada (OBF) (k-n), durante el almacenamiento (3, 6, 9, 12 y 15 días)..... | 72 |

# DESARROLLO DE MATERIALES BIOPOLIMÉRICOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA PARA EL CONTROL DE CONTAMINANTES BIOLÓGICOS PATÓGENOS EN PRODUCTOS CÁRNICOS

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1. Planteamiento del problema

La carne y los productos cárnicos son alimentos nutritivos susceptibles a la contaminación microbiana, la cual puede ocurrir en cualquier etapa de la cadena de producción, procesamiento, distribución y almacenamiento. La presencia de patógenos indeseados, como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* y microorganismos coliformes en estos productos puede generar graves consecuencias de salud pública, incluyendo enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) (Aiyegoro, 2022).

Según la organización mundial de la salud (OMS), alimentos contaminados por bacterias patógenas causan cerca de 600 millones de casos de enfermedades y 420,000 muertes anuales en todo el mundo (OMS, 2020). Es importante abordar el problema de la contaminación en productos cárnicos de manera efectiva, con el fin de garantizar la calidad y seguridad alimentaria, así como proteger la salud de los consumidores. La atención a este tema se considera una prioridad, debido al creciente interés y demanda de los consumidores por alimentos que sean más naturales, nutritivos, seguro y que utilicen un mínimo de aditivos sintéticos (Amin et al., 2022). Además, también se busca que los envases utilizados sean amigables con el ambiente. Estas tendencias, reflejan la creciente conciencia de los consumidores sobre la importancia de elegir alimentarias que promuevan su bienestar y el cuidado del entorno (Hoque et al., 2021). En este contexto, es importante considerar los materiales de envasado actuales, que en su mayoría se destinan a un solo uso y se distribuyen ampliamente en la cadena alimentaria (industria, supermercados y restaurantes) contribuyendo a un serio problema de contaminación terrestre y marina (Yates et al., 2021).

Ante esta problemática, el desarrollo de innovaciones tecnológicas en el área de envasado particularmente los denominados activos, pueden aumentar la vida útil manteniendo la calidad y seguridad de los productos cárnicos. Esto garantiza alimentos seguros a los consumidores y evita pérdidas económicas a las industrias alimentarias durante la manipulación, distribución y

comercialización de los alimentos. El Reglamento Europeo ha definido a los sistemas de envasado activo como “aquellos que incorporan deliberadamente componentes que liberan o absorben sustancias en o desde el alimento con la finalidad de prolongar la vida útil o mantener/mejorar el entorno del envase” (Comisión Europea, 2004). Las películas biodegradables a base de biopolímeros como polisacáridos, proteínas y lípidos pueden incorporar sustancias bioactivas, funcionales o agentes antimicrobianos de fuentes naturales como los ácidos orgánicos como alternativa a los conservantes artificiales (Janani et al., 2020; Rocha et al., 2014; Rodríguez et al., 2020; Wu et al., 2017).

Se puede argumentar que el desarrollo de una película biodegradable a base de materiales biopoliméricos biodegradables, puede ayudar a reducir el impacto ambiental de los envases convencionales ampliamente utilizados en la industria de alimentos. Además, la inclusión de antimicrobianos en la película puede contribuir al aseguramiento de la calidad y seguridad alimentaria de los productos cárnicos. Estos beneficios están de acuerdo con el cumplimiento de los objetivos 12 y 13 de los Objetivos de Desarrollo Sostenible enfocado en la producción y consumo responsable y acción por el clima (ONU, 2015), a fin de evitar la pérdida de alimentos, un uso ecológico de los productos químicos, disminuir la generación de desechos, invertir en soluciones sostenibles y cambiar la forma en que se manejan los recursos naturales.

En esta perspectiva, la presente investigación busca desarrollar una solución sustentable y eficaz para la extensión de la vida útil de productos cárnicos de calidad y seguros. Se propone optimizar mediante el análisis de superficie de respuesta Box-Behnken una película biodegradable de almidón de taro con alginato de sodio, glicerol y ácido láctico; así como caracterizar sus propiedades físicas, químicas, mecánicas, estructurales, de barrera, actividad antibacteriana *in vitro* y biodegradabilidad. Además, se prevé evaluar el efecto antimicrobiano de la película biodegradable activa generada sobre parámetros de calidad e inocuidad en un producto cárnico curado tipo chorizo español. Por tanto, estos objetivos permitirán obtener información relevante sobre la efectividad y funcionalidad de la película biodegradable activa propuesta.

## **2. HIPÓTESIS**

La película biodegradable de almidón de taro, alginato de sodio y ácido láctico inhibe el crecimiento de *E. coli*, *Salmonella* y *L. monocytogenes in vitro* y aumenta la vida útil de un producto cárnico crudo curado.

## **3. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Desarrollar y caracterizar una película biodegradable a base de materiales biopoliméricos (alginato de sodio y almidón de taro) adicionada con ácido láctico como agente antimicrobiano para extender la vida útil de un producto cárnico crudo curado.

### **Objetivos específicos**

1. Optimizar mediante el análisis de superficie de respuesta Box-Behnken la obtención de una película biodegradable de almidón de taro y alginato de sodio adicionada con ácido láctico.
2. Caracterizar las propiedades físicas, químicas, mecánicas, estructurales, de barrera, actividad antibacteriana *in vitro* y biodegradabilidad de la película biodegradable optimizada (OBF) y de la película biodegradable control (CBF).
3. Evaluar el efecto antimicrobiano de la película biodegradable optimizada (OBF) como envase activo sobre parámetros de calidad e inocuidad en un producto cárnico crudo curado.

#### 4. INNOVACIÓN

La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) define el concepto de **innovación** como la introducción de nuevos métodos, procesos o productos mejorados (o una combinación de ellos), la cual se considera necesaria para impulsar el crecimiento y mejorar los niveles de vida (OCDE, 2010). Mientras que Suárez (2015), define el término como una nueva idea que cuando se implementa lleva a un proceso más efectivo en términos de proceso, producto, tecnología o servicio, que se presenta con una nueva cualidad radical o incremental generando un impacto, social, económico o ambiental. La **innovación** incluye cambios basados en conocimientos tecnológicos, comerciales, financieros, organizacionales o de cualquier índole que generan valor en términos de riquezas, empleos, efectos positivos en el medio ambiente en la salud animal, vegetal o humana, entre otros.

El Manual de Oslo define cuatro tipos de innovaciones: producto, proceso, organización y marketing. La **innovación en producto o servicio** incluye un nuevo o mejorado producto o servicio que difiere de los bienes o servicios anteriores y que ha sido introducido en el mercado incluyendo alteraciones significativas, mientras que una **innovación de proceso** implementa nuevos o mejorados procesos de distribución, logística o fabricación; la **innovación organizacional** ejecuta nuevos métodos organizacionales en el negocio, organización de trabajo y/o relaciones hacia el exterior y finalmente, la **innovación de marketing** establece nuevos métodos de marketing que incluyen mejoras en el diseño de un producto, embalaje, distribución, precio y promoción (OCDE, 2018).

La **innovación** es una actividad dinámica y presente en todas partes ya que ocurre en todos los sectores incluyendo el alimentario. El enfoque de este proyecto se centra en una mejora del proceso de envasado que permita la conservación y extensión de la vida útil de un producto cárnico crudo curado, a través de la elaboración de una película biodegradable activa a base de materiales biopoliméricos adicionada con ácido láctico, la cual pueda representar una ventaja competitiva sostenible para el sector alimentario.

## 5. SUSTENTABILIDAD

La comisión Brundtland de las Naciones Unidas declaró que el concepto de **sustentabilidad** implica satisfacer las necesidades del presente sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras para satisfacer sus propias necesidades (WCED, 1987). Más tarde, la Cumbre Mundial sobre el Desarrollo Social (2005), introdujo tres pilares de la sustentabilidad: **ambiental** (tiene un impacto neutro o positivo en el medio natural), **económico** (rentable en todo) y **social** (amplios beneficios para la sociedad). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura sostiene que la sustentabilidad debe proporcionar seguridad alimentaria y nutrición sin comprometer la economía, las bases sociales y ambientales que permitan seguridad alimentaria y nutricional para las generaciones futuras (FAO, 2018).

Por lo tanto, este estudio se mantiene en línea con los Objetivos: 12 - Garantizar modalidades de consumo y producción sostenibles y 13- Acción por el clima de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) establecidos por la Organización de las Naciones Unidas en 2015, apoyando la gestión ecológicamente racional de ingredientes químicos, optando por la utilización de antimicrobianos naturales con denominación GRAS, invertir en soluciones sostenibles y mediante el uso eficiente de los recursos naturales, empleando polímeros biodegradables como el almidón de malanga y el alginato de sodio, los cuales resultan ser ventajosos sobre los derivados del petróleo.

La unión internación de química pura y aplicada (IUPAC) define a los polímeros biodegradables como “sustancias poliméricas susceptibles de degradación por actividad biológica y por disminución de masas molares de las macromoléculas que forman dichas sustancias” (Vert et al., 2012), mientras que la Norma ASTM D6400-23 establece a los biopolímeros biodegradables como “aquellos polímeros cuya degradación resulta de la acción de microorganismos tales como bacterias, hongos y algas”, certificando como compostables si el biopolímero se desintegra en las primeras 12 semanas y al menos el 90% de su biodegradación ocurre dentro de 180 días (ATSM, 2023).

En este contexto, la biodegradabilidad de las películas desarrolladas minimizara los efectos adversos en el ambiente y salud humana, a la vez que contribuye a la reducción de desechos plásticos.

## 6. SEGURIDAD ALIMENTARIA

La **seguridad alimentaria** se define como un derecho a tener en todo momento, acceso físico, económico y social, permanente y oportuno a una alimentación adecuada en calidad y cantidad para mantener una vida activa y saludable (FAO, FIDA, OPS, WFP y UNICEF, 2020). Los pilares de la **seguridad alimentaria** incluyen: disponibilidad, acceso, uso y estabilidad (OPS, 2010).

El Programa Especial para la Seguridad Alimentaria (PESA) define la **inocuidad** como los riesgos asociados a la alimentación que pueden afectar la salud de las personas, incluye riesgos naturales, originados por contaminación, presencia de patógenos o cualquier otro elemento que, de alguna manera, pueda aumentar el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas (PESA, 2022). Mientras que la Organización Mundial de la Salud (OMS) concluye que la inocuidad incluye todas las medidas encaminadas a garantizar alimentos seguros que no causarán daño al consumidor si se preparan y/o ingieren de acuerdo con el uso al que estén destinados (OMS, 2021).

El desarrollo de una película biodegradable de almidón de malanga y alginato de sodio adicionada con ácido láctico, como material de envasado antimicrobiano pretende mantener y garantizar la seguridad microbiológica de un producto cárnico crudo curado favoreciendo su inocuidad.

## 7. MARCO TEÓRICO

### 7.1 Películas biodegradables

El sistema de envasado de alimentos brinda protección a los productos alimenticios de factores como la humedad, el oxígeno, el calor, enzimas y microorganismos durante su distribución, almacenamiento y distribución (Menezes y Athmaselvi, 2018).

Los polímeros derivados del petróleo, como el poliestireno (PS), polietileno (PE), polipropileno (PP) y el tereftalato de polipropileno (PP) se emplean ampliamente para el desarrollo de envases de alimentos debido a sus propiedades fisicoquímicas, tales como flexibilidad, durabilidad, disponibilidad de materias primas, peso ligero y rentabilidad, si se le compara con otros materiales convencionales (Pellis et al., 2021). Sin embargo, su falta de biodegradabilidad impacta negativamente en el ambiente. Además, las escasas tasas de reciclaje y la migración de compuestos peligrosos a los alimentos representan una de las principales desventajas de los polímeros sintéticos para aplicaciones de envasado (Hoque et al., 2021).

Con el fin de reducir la cantidad de residuos plásticos sólidos sintéticos, existe un gran interés en el desarrollo de envases para alimentos usando materiales biopoliméricos por ser reciclables, no tóxicos, biodegradables y respetuosos con el ambiente (Wankhade, 2020). Cabe mencionar, que las películas biodegradables no pretenden reemplazar los envoltorios tradicionales, sino que se plantea su uso combinado para brindar protección al producto y disminuir costos del material de empaque tradicional. Las películas biodegradables son capas delgadas de materiales biopoliméricos, que una vez formadas pueden ser colocadas como material de envoltura (Ribeiro et al., 2021).

El proceso de elaboración de películas requiere normalmente de un material formador de película (biopolímero), solvente y plastificante. Los materiales poliméricos biodegradables brindan propiedades mecánicas rentables y competitivas. Entre los biopolímeros más utilizados para elaborar películas se encuentran los polisacáridos (almidón, alginato, celulosa, pectina, etc.) que generalmente imparten buena resistencia mecánica y propiedades de barrera a los gases moderada; sin embargo, son frágiles e hidrófilas (Meritaine da Rocha et al., 2018). Las películas elaboradas a base de lípidos son comúnmente empleadas por sus excelentes características tales como elevada barrera al vapor de agua. Sin embargo, presentan barrera al oxígeno limitada por la

polaridad relativamente baja que poseen, siendo esto la principal desventaja asociada a su apariencia y sabor en los productos finales, además de carecer de suficiente integridad estructural y durabilidad si se usa en su forma pura (Hassan et al., 2018). Por tal motivo, la combinación o mezcla de biopolímeros con otros componentes se utilizan habitualmente para obtener películas con propiedades físicas, químicas y mecánicas mejoradas. Los biopolímeros más utilizados actualmente para el desarrollo de películas se muestran en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Clasificación de diferentes biopolímeros para la formación de películas y recubrimientos

| <b>Clasificación</b>  | <b>Ejemplo</b>   | <b>Fuente</b>   |
|---|--|---|
| <b>Agropolímeros</b>  | <b>Polisacáridos</b>   |   |
|   | Almidón  | Maíz, mandioca, papa, arroz, trigo.   |
|   | Pectina  | Cáscara de cítricos, orujo de manzana   |
|   | Celulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, celulosa acetato | Fibras vegetales  |
|   | Quitosano, quitina   | Exoesqueleto de langostas, cangrejos, camarón                                       |
|   | Gomas naturales, goma arábica.   |   |
|   | Alginato, carragenina, agar.   | Algas   |
|   | <b>Proteínas</b>   |   |
|   | Zeína, soja, colágeno, gelatina, suero, caseína, gluten de trigo.                    | Productos lácteos, cereales   |
|   | <b>Lípidos</b>   |   |
| Ceras (abeja, candelilla Carnauba)                                | Abejas, plantas, palmera.  |   |
| Ácidos grasos libres  |  |   |
| <b>Polímero procedente de procesos de fermentación microbiana</b> | PHA, PHB (polihidroxialcanoatos)<br>Celulosa bacteriana                              | Microorganismos, plantas modificadas genéticamente.<br><i>Acetobacter fermentum</i> |
| <b>Polímeros producidos a</b>                                     | Poly lachates  | Fermentación de azúcares,   |

|  |   |
|--|---|
| <b>partir de procesos biotecnológicos</b>                | jarabes, melazas, suero, almidón  |
| <b>Polímeros biodegradables de fuentes no renovables</b> | Politereftalato de trimetilo, co-tereftalato de adipato de poli butileno Industria petroquímica |

---

Fuente: Adaptado de Meritaine da Rocha et al. (2018); Prameela et al. (2018); Shahabi-Ghahfarrokhi et al. (2020).

La mayoría de las películas elaboradas a base de biopolímeros mantienen una estructura rígida y quebradiza como consecuencia de las interacciones ocurridas entre moléculas (Cazón et al., 2017). Estas características se pueden superar añadiendo plastificantes que se estacionan entre las cadenas de polímeros, reduciendo la fuerza de cohesión entre ellas causando una disminución de la fragilidad, aumento de la flexibilidad y resistencia. Los plastificantes ampliamente utilizados incluyen los polioles (sorbitol, glicerol y el polietilenglicol) y azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) (Vieira et al., 2011). Por otro lado, debido a que las películas están en contacto directo con los productos alimenticios estas deben ser: neutras, translúcidas a opacas, no deben impartir cambios indeseables en términos sensoriales, no tóxicas y no causar problemas de salud en los seres humanos (Hoque et al., 2021).

En cuanto a las aplicaciones funcionales más importantes de las películas se encuentra la barrera contra la humedad, el control de gases (oxígeno y dióxido de carbono); así como de grasas y aceites, movimiento de solutos y capacidad de reducir la permeabilidad al vapor de agua (Menezes y Athmaselvi, 2018). Adicionalmente, se puede incorporar agentes antioxidantes o antimicrobianos a fin de controlar el crecimiento de microorganismos mediante una liberación controlada (Al-Tayyar et al., 2020). Las propiedades funcionales más relevantes de películas aplicadas en alimentos se observan en el Cuadro 2. Como se mencionó anteriormente, las películas se pueden utilizar como agentes portadores de aditivos tales como antioxidantes, anti-oscorecedores, nutraceuticos, aceites esenciales, enzimas, extractos, especias, y antimicrobianos (Ribeiro et al., 2021).

**Cuadro 2.** Propiedades funcionales de películas en productos alimenticios.

| <b>Propósito</b>   | <b>Tipo de alimento</b>    |
|--|----------------------------|
| Reducir la pérdida de humedad, la tasa de respiración y procesos metabólicos, protección adecuada contra la actividad enzimática, efecto brillante en la superficie de las frutas. | Frutas y verduras          |
| Inhibir el desarrollo de microorganismos, control de la pérdida de humedad y la quema del congelador en carnes refrigeradas o congeladas, control de la oxidación de lípidos.      | Carne y productos cárnicos |
| Limitar el crecimiento de microorganismos patógenos o contaminantes, reducir la pérdida de agua, la dureza y cambios de color.   | Quesos                     |
| Reducción de la cinética de hidratación.   | Productos de panadería     |
| Mejorar o impartir color y sabor deseados.   | Alimentos diversos         |

Fuente: Adaptado de Galus y Kadzińska, (2015).

Estos últimos se han incorporado con éxito en las películas con el propósito de reducir, inhibir o retrasar el crecimiento de microorganismos afín de garantizar la seguridad y extender la vida útil de los alimentos (Meritaine da Rocha et al., 2018). En este sentido, los antimicrobianos permanecen en la superficie de los alimentos en altas concentraciones durante su almacenamiento y su acción consiste en la liberación lenta y controlada por difusión a una velocidad que asegura su acción efectiva contra microorganismos indeseables (Calva-Estrada et al., 2019).

## **7.2 Materiales biopoliméricos formadores de películas biodegradables**

### **7.2.1 Alginato**

El uso de biopolímeros biodegradables se está explorando en la actualidad, especialmente de los alginatos y almidones por sus variadas propiedades de interés, en la industria cosmética, médica y alimentaria (Figura 1). El alginato es un polímero lineal aniónico extraído de las paredes celulares de las algas pardas (*Laminaria digitata* y *Ascophyllum nodosum*). Su estructura química se compone por dos unidades monoméricas estructurales alternas de ácido d-

manurónico (M) enlazado a  $\beta$ -(1-4) y ácido l-gulurónico (G) enlazado a  $\alpha$ -(1-4) (Tavassoli-Kafrani et al. 2016).



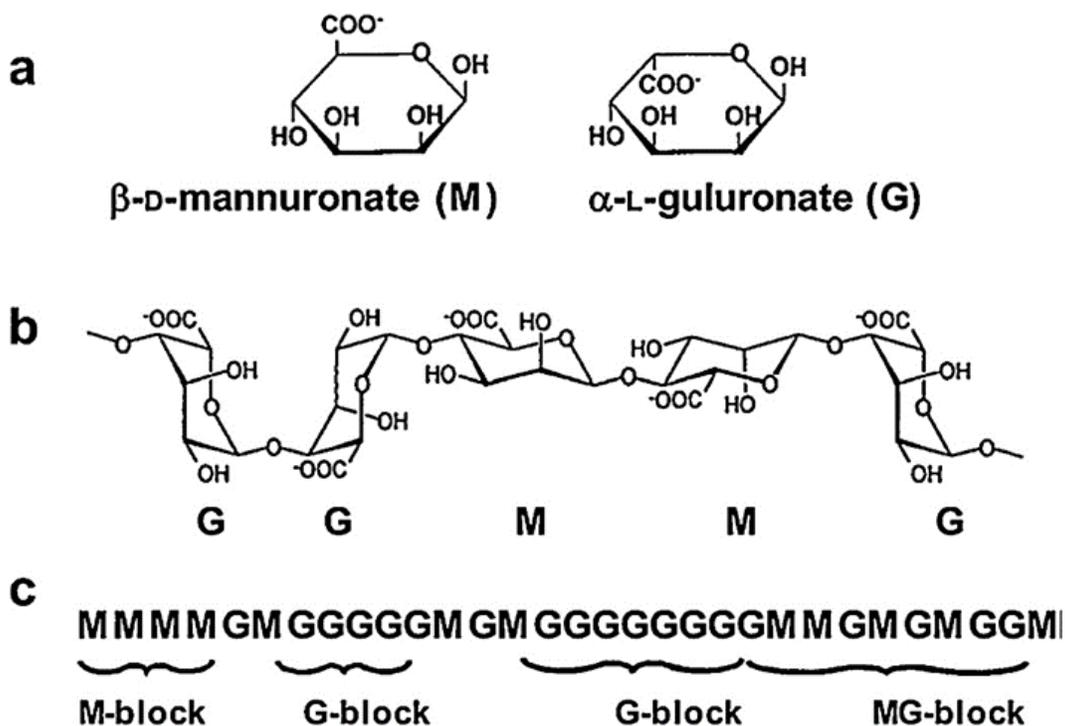
**Figura 1.** Principales aplicaciones del alginato y almidón en diversas industrias.

Adaptado de Rinaudo, (2014).

En la cadena polimérica, se identifican tres bloques o regiones en distintas proporciones y están dispuestos alternativamente en bloques GG y MM, junto con bloques MG como se muestra en la Figura 2. Los bloques G solo contienen unidades de ácido l-gulurónico que permiten una mayor resistencia del gel favoreciendo a la reactividad de unión a iones multivalentes debido a la orientación de los grupos carboxilo e hidroxilo (Choi et al., 2022). Los bloques M únicamente contienen unidades de d-manurónico y el bloque MG unidades alternas de ácido l-gulurónico y d-manurónico (Cazón et al., 2017). Los bloques de M y G se conocen como bloques homopolímeros y los bloques MG como heteropoliméricos.

La reticulación iónica es una de las propiedades funcionales únicas del alginato; es decir, mantiene la capacidad para reaccionar con cationes metálicos multivalentes, como los iones de calcio  $\text{Ca}^{2+}$  (Cao et al., 2020). El proceso de gelificación del alginato se ejemplifica con el modelo clásico de caja de huevo “Box-Egg” propuesto inicialmente por Grant et al. (1973), el

cual se describe a través de tres pasos sucesivos principales: 1. Formación de monocomplejos entre  $\text{Ca}^{2+}$  y unidades de GulA en una cadena sola de alginato; 2. Formación de dímeros de caja de huevo mediante emparejamiento de monocomplejos; 3. Formación de multímeros a través de la reticulación lateral de dímeros de caja de huevos tal como se ejemplifica en la Figura 3.

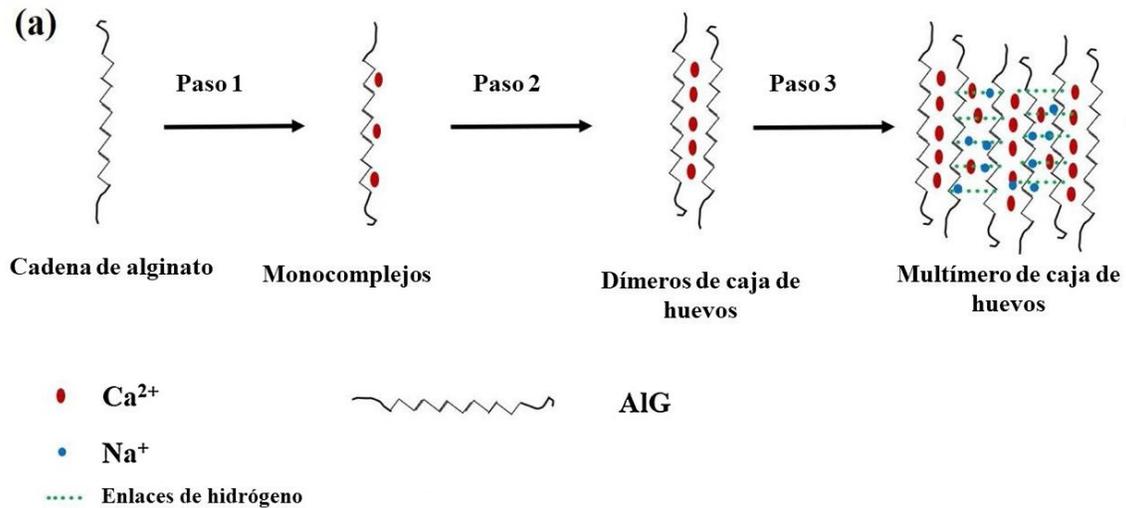


**Figura 2.** Estructura química del alginato. a) Unidades monoméricas de alginato, b) Composición de la cadena polimérica, c) Distribución de bloques. Adaptado de Tavassoli-Kafrani et al. (2016).

Se ha demostrado que la gelificación de  $\text{Ca}^{2+}$ -alginato depende de factores intrínsecos (peso molecular, los porcentajes de ácido gulurónico y ácido galacturónico, longitud y distribución de bloques de unión al calcio) y factores extrínsecos (concentración del polímero y  $\text{Ca}^{2+}$ , forma de añadir  $\text{Ca}^{2+}$ , pH, temperatura e intensidad de iones) (Cao et al., 2020).

El alginato reticulado iónicamente forma geles fuertes mejorando las propiedades mecánicas y de barrera en el desarrollo de películas biodegradables (Choi et al., 2022; Zhou et al., 2022). Además, debido a su biocompatibilidad se ha propuesto la elaboración de películas compuestas mejorando así sus propiedades mecánicas, de barrera y antimicrobianas. Alarcón-Moyano et al. (2017) fabricaron una película antibacteriana de alginato incorporada con aceite esencial de limoncillo, la cual demostró una significativa inhibición contra *E. coli*, mientras que Oliveira

Filho et al. (2019) observó un efecto similar frente a contra *S. aureus* usando una película funcionalizada con hidrolizados de proteína de semilla de algodón.



**Figura 3.** Comportamientos de unión de Ca-alginato (AIG: Alginato),  
Adaptado de Cao et al. (2020).

## 7.2.2 Almidón

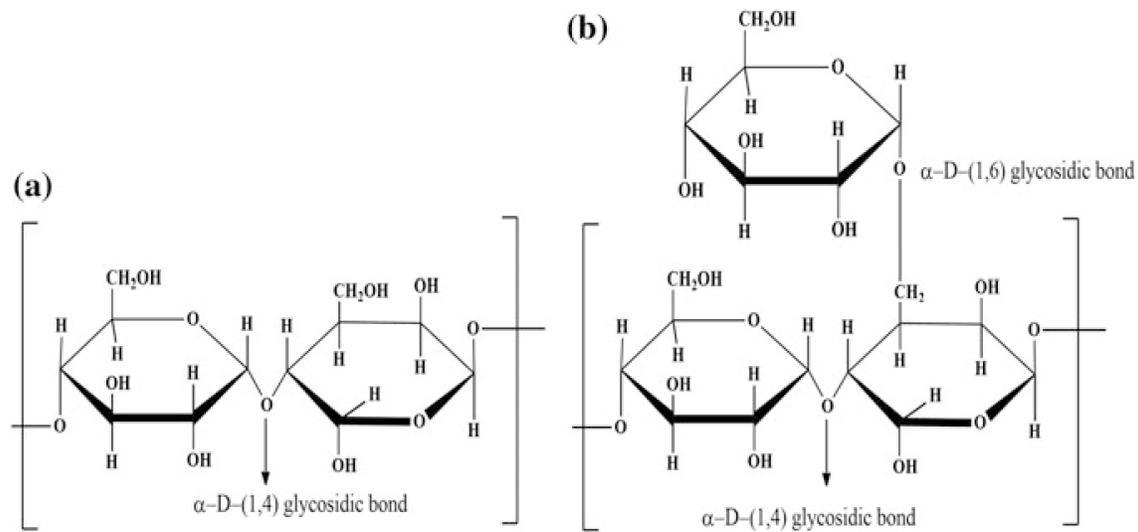
Las fuentes de origen natural se utilizan ampliamente para la producción de bioplásticos debido a la facilidad de mantenimiento en comparación con fuentes de origen animal o microbiana. Entre los polímeros naturales el almidón se considera un candidato prometedor en numerosas aplicaciones alimentarias como espesante, estabilizador, agentes gelificantes, emulsionante y producción de películas biodegradables debido a su comportamiento termoplástico, rentabilidad, abundancia y biodegradabilidad (Figura 1). El almidón es un recurso renovable muy abundante en la naturaleza. Es una fuente importante de energía y las principales fuentes son las legumbres (25-50%), tubérculos (60-90%) y cereales (30-70%) (Katiyar et al., 2019). En el Cuadro 3 se muestran algunos almidones convencionales y no convencionales respecto a sus contenidos de amilosa, amilopectina y propiedades. El almidón natural está presente en forma de gránulos semicristalinos que varían en forma (poligonal, redondo, lenticular) con dimensiones entre 1 y 100  $\mu\text{m}$  de diámetro, distribución de tamaño (unimodal o bimodal) y asociación (individual o grupo de gránulos) (Pelissari et al., 2019).

**Cuadro 3.** Contenido de amilosa y amilopectina de los almidones.

| <b>Fuente</b> | <b>Amilosa (%)</b> | <b>Amilopectina (%)</b> | <b>Tipo</b>  | <b>Propiedades</b>   |
|---------------|--------------------|-------------------------|--------------|--|
| Maíz          | 26- 29             | 71-74                   | Cereal       | Espesante, aglutinante y formador de película  |
| Arroz         | 20-25              | 75-80                   | Cereal       | Agente emulsionante, estabilidad de congelación y descongelación, adhesivo y agente formador de película |
| Avena         | 2-34               | 66-98                   | Cereal       | Espesante y gelificante  |
| Yuca          | 15-27              | 75-83                   | Raíz         | Estabilidad congelación-descongelación, propiedad de pegado y opacidad                                   |
| Papa          | 17-25              | 75-83                   | Tubérculo    | Espesante, agente formador de película y aglutinante de agua   |
| Papa dulce    | 20-25              | 75-80                   |              |  |
| Trigo         | 25-27              | 71-74                   | Cereal       | Adhesivo, espesante y gelificante  |
| Sorgo         | 24-30              | 70-76                   | Cereal       | Gelificante  |
| Centeno       | 20-25              | 75-80                   | Cereal       | Viscosante y gelificante   |
| Quinua        | 3-20               | 80-97                   | Pseudocereal | Gelificante  |
| Lenteja       | 26-35              | 65-74                   | Legumbre     | Viscosante, espesante y gelificante  |
| Guisante      | 38-49              | 51-62                   | Legumbre     | Buena estabilidad térmica, agente formador de película. y gelificante                                    |

Fuente: Adaptado de Dharmalingam y Anandalakshmi, (2019) y Pelissari et al. (2019).

El almidón está compuesto por dos polímeros, amilosa y amilopectina. Ambos consisten en unidades de D-glucopiranosas unidas por enlaces glicosídicos  $\alpha$ -1,4 en la cadena principal y enlaces de tipo  $\alpha$ -1,6 en las ramificaciones tal como se observa en la Figura 4 (Dome et al., 2020).



**Figura 4.** Estructura química de la amilosa (a) y amilopectina (b),

Adaptado de Katiyar et al. (2019).

El mecanismo para la formación de películas utilizando almidón consiste en dos procesos principales, gelatinización y recristalización. La ruptura de los gránulos de almidón ocurre en tres pasos: hinchazón granular (absorción de moléculas de agua en dominios amorfos), ruptura de los grupos de amilopectina y solubilización de amilosa/amilopectina (Pelissari et al., 2019). La hinchazón de los gránulos comienza cuando el agua ingresa a la amilosa reduciendo la cristalinidad de amilopectina, provocando la separación de fases. Con frecuencia el primer paso para producir películas biodegradables es calentar el almidón con un alto contenido de agua, las pequeñas moléculas de agua se difunden con facilidad a través de los grupos de amilopectina semicristalina, rompiendo enlaces de hidrógeno y causando desorden en la estructura molecular, desintegrando así las cadenas de amilosa y amilopectina hasta su solubilización completa (Katiyar et al., 2019).

Además, los grupos de las cadenas separadas de amilosa y amilopectina forman un enlace de hidrógeno con las moléculas de agua, de esta manera los gránulos de almidón absorben agua y se hinchan. El hinchamiento y la solubilidad del almidón dependen de la estructura, peso molecular y longitud de la cadena de amilosa-amilopectina. Algunos almidones poseen temperaturas de gelatinización de entre 60 y 80 °C (Katiyar et al., 2019). En el proceso de retrogradación, las moléculas de amilosa forman doble hélice y las moléculas de amilopectina se vuelven a

cristalizar por sus cadenas cortas más externas. La amilosa y la amilopectina se entrelazan en una fase continúa formando la película de almidón.

La malanga o taro es una planta perenne tuberosa que se cultiva en zonas tropicales y subtropicales. Su nombre botánico es *Colocasia esculenta* y pertenece a la familia *Araceae*. Mundialmente es la decimosexta hierba más cultivada alrededor de sesenta países y la razón principal de su producción se relaciona con los contenidos de almidón (70-80%) que presentan los bulbos subterráneos (Sharma et al., 2020). En 2018, se reportó una producción de 9.54 millones de toneladas de taro entre los diez principales países productores (FAOSTAT, 2020). En México, 679 ha representan la superficie sembrada con una producción de 35,190 t. Dentro de los productores más importantes se encuentran los estados de Oaxaca, Puebla, Tabasco, Nayarit y Veracruz el cual destaca como productor competitivo pues representa el 84.80% del total nacional (577 ha) (SIAP, 2021).

El almidón de taro presenta una calidad nutricional elevada con un contenido de cenizas (0.85%), proteínas (5.6%), fósforo (0.4%) y bajo contenido de lípidos (0.28%) (Kaushal et al., 2015). Los gránulos de almidón de taro poseen forma esférica y poligonal, las cadenas de amilopectina en taro son cortas y poseen una longitud de cadena promedio larga que propicia la formación de un gel firme con elevada elasticidad cuando se calienta, formando gránulos en una estructura discreta semicristalina (Pramodrao y Riar, 2014). Este tubérculo destaca por sus principales propiedades funcionales ya que actúa como gelificante, texturizante, espesante, aglutinante y su capacidad para formar películas.

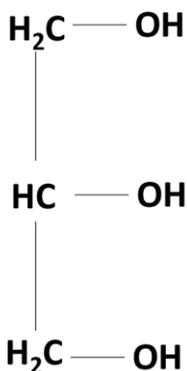
Se han desarrollado películas biodegradables que utilizan almidón de taro, las cuales han demostrado una mejora en las propiedades mecánicas (Shanmathy et al., 2021; Mohite y Chandel, 2020; Siskawardani et al. 2020) mientras que More et al. (2022) usando una película similar (almidón de taro al 5%) funcionalizada con extracto de cáscara de granada micelar obtuvieron un film con una excelente barrera para la permeabilidad al vapor de agua.

Por otro lado, el cultivo de malanga o taro es de gran importancia económica y social. Además, presenta una producción sostenible y ecológica, existiendo disponibilidad local, factores que hacen factible la utilización de esta materia prima debido a sus múltiples aplicaciones en alimentos. Su combinación con otros biopolímeros y componentes antimicrobianos naturales,

que cumplen con las exigencias de seguridad ambiental y sustentabilidad, potencia su uso como material de envasado.

### 7.2.3 Glicerol

El glicerol ( $C_3H_8O_3$  o  $CH_2OH-CHOH-CH_2OH$ ), conocido comercialmente como glicerina y propano-1,2,3- triol (PubChem, 2022b). Es un alcohol polihídrico por la presencia de tres grupos hidroxilo dentro de una molécula de glicerol (Figura 5). Es soluble en agua y su capacidad de unión resulta en un alto punto de ebullición ( $290^\circ C$ ), con alta compatibilidad como plastificante competente en sistemas de envasado de alimentos como las películas biodegradables (Ben et al., 2022).



**Figura 5.** Estructura química de la molécula de glicerol,  
Adaptado de (Ben et al., 2022).

El plastificante es un aditivo polimérico que se añade con frecuencia para disminuir la fragilidad y mejorar la flexibilidad de las películas biodegradables provocando una reducción de fuerzas intermoleculares y un aumento en la movilidad de las cadenas poliméricas (Ben et al., 2022). El pequeño tamaño molecular del glicerol llena los espacios entre las cadenas poliméricas, provocando espacios intermoleculares y afectando la interacción polímero-polímero, pero induciendo interacciones de tipo polímero-glicerol (Basiak et al., 2018). Los cambios físicos de las películas se reflejan en las propiedades mecánicas, es decir aumento de elongación a la rotura y disminución de la resistencia a la tracción (E et al., 2022; Tabatabaei et al., 2022; Quispe et al., 2021).

### 7.3 Antimicrobianos naturales

La contaminación de los alimentos es un problema común causado principalmente por microorganismos. Esto representa una preocupación importante que debe abordarse, ya que no solo afecta la calidad de los alimentos, sino que también contribuye a su deterioro y se convierte en una fuente de enfermedades (PESA, 2022). Para hacer frente a este desafío, los antimicrobianos pueden ser utilizados para controlar y prevenir la contaminación microbiana en alimentos. Aunque el uso de los antimicrobianos está regulado por cada país, un antimicrobiano debe ser eficaz a bajas concentraciones en su forma natural, ser rentable, no ser tóxicos, no provocar cambios sensoriales indeseables en los productos alimenticios e inhibir una amplia gama de microorganismos patógenos y deteriorantes (Davidson et al., 2013).

Actualmente hay una creciente demanda de los consumidores por alimentos mínimamente procesados que contengan ingredientes naturales, con altos estándares de calidad, seguridad y que sean saludables. En respuesta a esto, se ha intensificado el uso de antimicrobianos obtenidos a partir de diferentes fuentes naturales en las últimas décadas. En el Cuadro 4 se resumen los principales antimicrobianos naturales aplicados en la industria de alimentos.

Antimicrobianos como enzimas, aceites esenciales, extractos, bacteriocinas y ácidos orgánicos se han incorporado con éxito a películas elaboradas a base de biopolímeros demostrando ser excelentes empaques funcionales en la tecnología de envasado activo de alimentos. Estos compuestos antimicrobianos pueden ser aplicados sumergiendo el producto completamente en una solución conteniéndolos o ser incorporados a recubrimientos previamente elaborados. Además, mediante el método de vertido de placa o “casting” pueden obtenerse películas activas poniendo en contacto el material de empaque con los compuestos antimicrobianos. Estas películas deben estar en contacto con la superficie del alimento para que los compuestos antimicrobianos penetren en él, ejerciendo su acción inhibitoria sobre microorganismos contaminantes y/o patógenos (Chawla et al., 2021).

**Cuadro 4.** Compuestos antimicrobianos naturales de fuentes animales, vegetales y microbianas.

| Compuesto antimicrobiano | Microorganismo inhibido  |   |  |
|--------------------------|--|---|--|
|                          | Gram positivas   | Gram negativas  | Hongos y levaduras   |
| <b>Fuente animal</b>     |  |   |  |
| <b>Lisozima</b>          | <i>L. monocytogenes</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. faecalis</i> ,<br><i>Clostridium</i> spp.,<br><i>Lactobacillus</i> spp. | <i>Y. enterocolitica</i><br><i>Salmonella</i> spp.<br><i>Pseudomonas</i> spp.   | <i>Aspergillus</i> spp., <i>Candida</i> spp.<br><i>Fusarium</i> spp., <i>Sporothrix</i> spp.<br><i>Paecilomyces</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Saccharomyces</i> spp. |
| <b>Lactoperoxidasa</b>   | <i>L. monocytogenes</i><br><i>S. aureus</i><br><i>B. cereus</i>  | <i>C. jejuni</i> , <i>E. coli</i> O157:H7,<br><i>Salmonella</i> spp.<br><i>Y. enterocolitica</i><br><i>Cronobacter</i> spp. | <i>Aspergillus</i> , <i>Byssochlamys fulva</i> , <i>Candida</i> ,<br><i>Mucor</i> , <i>Rhodotorula</i>   |
| <b>Quitosano</b>         | <i>L. monocytogenes</i><br><i>L. fructivorans</i> .  | <i>Salmonella</i> spp.<br><i>Y. enterocolitica</i>  | <i>Aspergillus flavus</i> ,<br><i>Saccharomyces cerevisiae</i><br><i>Zygosaccharomyces bailii</i> ,<br><i>Botrytis cinérea</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i>                  |
| <b>Fuente natural</b>    |  |   |  |
| <b>Flavonoides</b>       | <i>L. monocytogenes</i><br><i>S. aureus</i>  | <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> ,<br><i>H. pylori</i><br><i>Campylobacter</i> spp.                                       |  |
| <b>Fuente microbiana</b> |  |   |  |
| <b>Nisina</b>            | <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. botulinum</i><br><i>C. perfringens</i> , <i>B. cereus</i>                 | <i>E. coli</i><br><i>P. aeruginosa</i><br><i>Salmonella</i> spp.  |  |
| <b>Natamicina</b>        |  |   | Gran variedad de levaduras y hongos  |
| <b>Ácido láctico</b>     | <i>B. coagulans</i><br><i>L. monocytogenes</i>   | <i>Salmonella</i> spp.<br><i>E. coli</i><br><i>Enterobacteriaceae</i>   | Gran variedad de levaduras y hongos  |

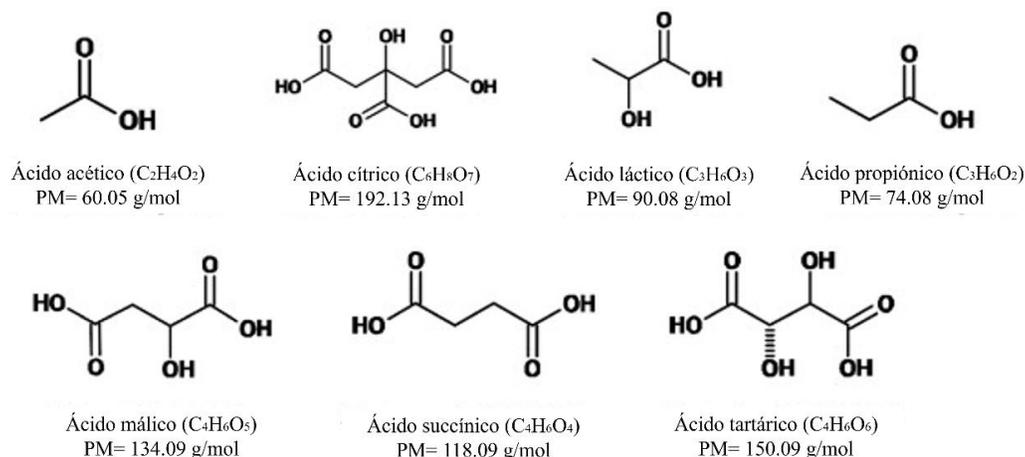
Fuente: Adaptado de Arias-Ríos et al. (2017); Coban, (2020); Davidson et al. (2015).

La lenta penetración de los antimicrobianos de la película es más ventajosa que rociar o sumergir los alimentos (Kirtonia et al., 2021). De este modo, alimentos percederos como frutas, hortalizas, productos lácteos y cárnicos altamente susceptibles a la contaminación microbiana pueden ser protegidos utilizando este tipo de envasado.

### 7.3.1 Ácido láctico

Los ácidos orgánicos son compuestos que presentan uno o más grupos carboxilo. Los ácidos carboxílicos (R-COOH) son los ácidos orgánicos más comunes, y su acidez se debe al grupo carboxilo (-COOH), tal como se muestra en la Figura 6 (Shi et al., 2022). Los ácidos orgánicos se pueden clasificar según su estructura molecular, el número de grupos carboxilo que poseen y si son ácidos saturados o insaturados.

Nuevos sistemas de envasado que incluyen antimicrobianos naturales como los ácidos orgánicos permiten mantener la calidad de los alimentos y mejorar la seguridad alimentaria (Abdollahzadeh et al., 2021). Además, los ácidos orgánicos tienen denominación GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros) por la FDA para productos cárnicos. Los tratamientos con distintos ácidos orgánicos resultan ser simples, baratos y eficaces (Mani-López et al., 2012).



**Figura 6.** Estructura química de los ácidos orgánicos,

Adaptado de Mani-López et al. (2012).

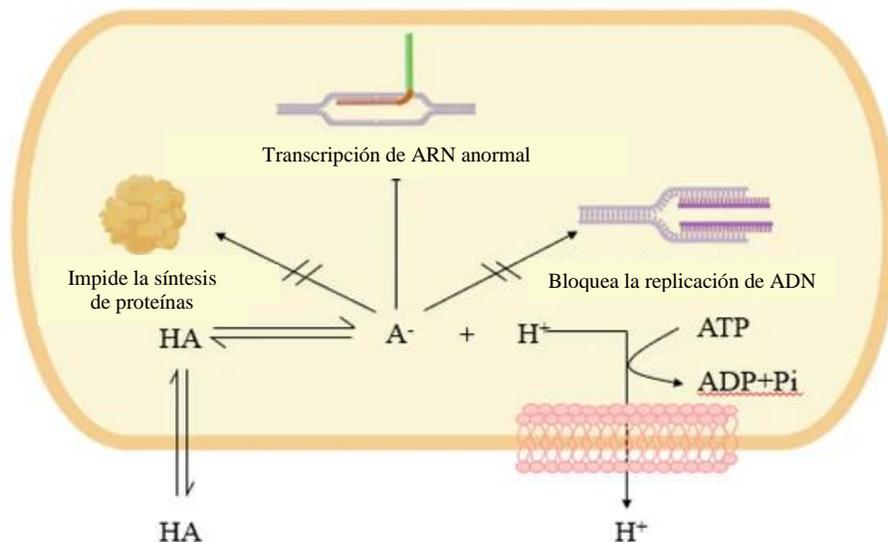
El ácido láctico es un ácido orgánico de tres carbonos (ácido 2-hidroxipropanoico); un átomo de carbono terminal es parte de un grupo ácido o carboxilo, el átomo de carbono central tiene un alcohol y el otro átomo de carbono terminal es parte de un grupo metilo o hidrocarburo (Bhatt,

2018). Es un disolvente orgánico soluble en agua, con baja volatilidad. Posee un peso molecular de  $90.08 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $pK_a$  ácido de 3.83 (D) y 3.79 (L); densidad de  $1.249 \text{ g mL}^{-1}$ ; punto de ebullición de  $122^\circ\text{C}$  a  $15 \text{ mmHg}$  y comercialmente es una sustancia incolora (PubChem, 2022a).

### 7.3.1.1 Mecanismo de inhibición bacteriana

Los mecanismos de acción de los ácidos orgánicos sobre la inhibición de crecimiento bacteriano no están dilucidados completamente; sin embargo, se cree que la eficacia antibacteriana de los ácidos orgánicos se debe a que sus moléculas no disociadas pueden penetrar al citoplasma por difusión a través de la membrana plasmática, como se muestra en la Figura 7 (Hirshfield et al., 2003). Luego, dentro de la célula; el ácido láctico se disocia en un anión lactato y un protón debido a su valor de  $pK_a$  ácido de 3.83 (D) y 3.79 (L), siendo estos más bajos que el pH intracelular (7.0-7.4), lo que favorece su disociación ácida inmediata (Shi et al., 2022).

Los protones disociados y los iones ácidos no pueden atravesar la membrana por difusión libre, lo que provoca la acumulación de  $\text{H}^+$  y, en consecuencia, la acidificación citoplasmática (Davidson et al., 2014). Posteriormente se produce la inhibición de enzimas sensibles al pH ácido, incluyendo a aquellas involucradas en la glucólisis.



**Figura 7.** Mecanismo de inhibición bacteriana por ácidos orgánicos, Adaptado de Shi et al. (2022).

Para mantener el potencial de membrana, la célula reacciona expulsando el exceso de protones intercambiándolo por algún otro catión (por ejemplo, K, Na, Ca<sup>2+</sup>); esto se conoce como teoría quimiosmótica (Mitchell y Moyle, 1969) lo que provoca un gasto de energía perjudicial para su normal crecimiento. La acumulación de iones ácidos en las bacterias interfiere o bloquea la síntesis de ADN en el núcleo, inhibiendo la división y proliferación bacteriana (Shi et al., 2022). La acumulación de aniones ácidos en el interior de la célula puede inhibir rutas metabólicas importantes, aumentar la osmolaridad con posibilidades de una posible presión de turgencia letal (Carpenter y Broadbent, 2009).

### 7.3.1.2 Usos del ácido láctico en la conservación de alimentos

Los ácidos orgánicos tienen un amplio uso en la industria alimentaria, tanto en aplicaciones superficiales como en el tratamiento directo de los productos alimenticios (Singh et al., 2015). El Codex Alimentarius menciona que el ácido láctico como aditivo está regulado de conformidad a las buenas prácticas de fabricación (BPF), limitándose a dosis mínimas, cantidades que pasen a ser parte del producto final como parte del sistema de envasado se reducirán en la medida que sea posible (CODEX STAN 192-1995). Para productos cárnicos procesados, la NOM- 213-SSA1-2002, permite el uso de ácido láctico conforme a las BPF. Las dosis permitidas en diferentes alimentos se observan en el Cuadro 5.

**Cuadro 5.** Dosis máxima de ácido láctico aplicada a diferentes tipos de alimentos.

| <b>Alimento</b>  | <b>Dosis máxima permitida</b> |
|--|-------------------------------|
| Productos lácteos/quesos                                   | BPF                           |
| Hortalizas y productos a base de hortalizas                | BPF                           |
| Pastas y fideos frescos/deshidratados y productos análogos | BPF                           |
| Pescado y productos pesqueros                              | BPF                           |
| Productos a base de huevo                                  | BPF                           |
| Productos cárnicos procesados                              | BPF                           |
| Alimentos complementarios para lactantes y niños pequeños  | 2000 mg/kg                    |

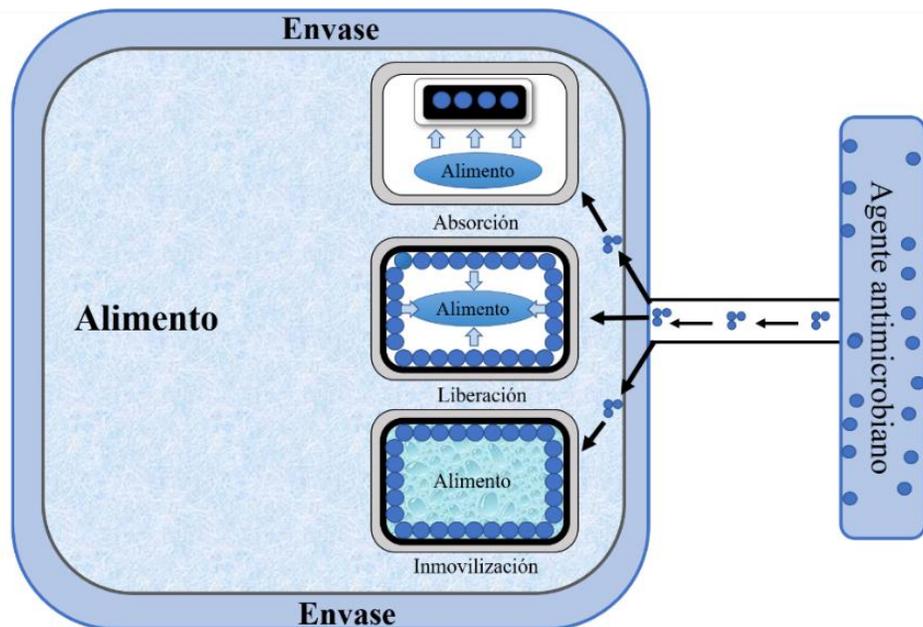
BPF: buenas prácticas de fabricación

Fuente: Adaptado del CODEX STAN 192-1995 y NOM- 213-SSA1-2002.

## 7.4 Envasado activo

Un sistema de envasado permite contener y proteger alimentos de factores microbiológicos, ambientales y físicos durante todo su ciclo, desde la producción hasta el consumo (Robertson, 2006; Ghaani et al., 2016). El envasado activo es una forma avanzada de tecnología de envasado que cumple funciones adicionales a las de protección convencional, ya que además de proporcionar una barrera frente al entorno externo, está diseñado para garantizar la calidad, integridad, seguridad y vida útil de los alimentos (Guo et al., 2023). El reglamento europeo (CE) no. 450/2009, define que el envasado activo está diseñado para incorporar componentes que liberan sustancias en el alimento envasado (Comisión Europea, 2009). Un sistema de envasado antimicrobiano está compuesto de una matriz polimérica y agentes antimicrobianos (García Ibarra et al., 2016) cuya función es controlar/prevenir el crecimiento microbiano posterior al procesamiento de los alimentos (Roopa et al., 2023), manteniendo la calidad, seguridad y prolongando la vida útil de diversos productos alimentarios.

Dependiendo del mecanismo de acción de los compuestos antimicrobianos, se puede clasificar al sistema de envasado en tres tipos: liberación, absorción e inmovilización como se muestra en la Figura 8.



**Figura 8.** Esquema de un sistema de envasado antimicrobiano a través de un sistema de absorción, liberación e inmovilización. Adaptado de García Ibarra et al. (2016).

En el primer tipo, la liberación del antimicrobiano puede ser o no controlada y entra en contacto directo con el alimento evitando el crecimiento de bacterias no deseadas (Motelica et al., 2020). En el sistema de envasado por absorción los agentes antimicrobianos eliminan el oxígeno y la humedad para suprimir el crecimiento de microorganismos aeróbicos, bacterias, hongos y levaduras. En el sistema de envasado por inmovilización, el compuesto antimicrobiano se encuentra en o sobre la matriz polimérica y no se libera; sin embargo, suprime el crecimiento de microorganismos en la superficie de contacto (García Ibarra et al., 2016).

Es posible utilizar películas biodegradables como nuevos sistemas de envasado activo en una gran diversidad de productos alimenticios como: Frutas y vegetales (Amiri et al., 2021; Murmu y Mishra, 2018; Roshandel-hesari et al., 2022; Yang et al., 2023), productos lácteos (Dıblan y Kaya, 2023; Giannakas et al., 2022; Kouser et al., 2023; Nottagh et al., 2020; Silva et al., 2023), carne y productos cárnicos (Marzlan et al., 2022; Mehdizadeh et al., 2020; Yıldırım-Yalçın et al., 2021; Yuan et al., 2022; Zheng et al., 2022), ya que estas modifican las propiedades del sistema alimentario al reducir la permeabilidad al vapor de agua, mejorar las propiedades de barrera, crear una barrera antimicrobiana activa, etc.

#### **7.4.1 Carne**

La carne se define como una serie de cambios complejos energéticos, bioquímicos y físicos que inician en el músculo inmediatamente después del periodo *post-mortem* (Lawrie, 2006; Matarneh et al., 2023). La carne y los productos cárnicos son una excelente fuente de energía y algunos nutrientes esenciales, incluidas las proteínas de alto valor biológico, aminoácidos esenciales, vitaminas, hierro y zinc (Wang et al., 2023). Los productos cárnicos son aquellos que se someten a un proceso de curado y/o maduración con la finalidad de modificar sus características sensoriales y de conservación (FAO, 2014).

##### **7.4.1.1 Productos cárnicos crudo curados**

El término curado hace referencia al uso de sales como cloruro de sodio con nitrato y/o nitrito que otorga color rojizo/rosa curado y sabor (Toldrá, 2023). La clasificación de los productos curados se observa en la Figura 9, como productos curados en seco (la sal de cura se coloca sobre la superficie de la carne o mezclada con carne picada) y en húmedo o en escabeche (la salmuera es inyectada en la carne) (Toldrá, 2004). Los productos fermentados en seco se

maduran y se secan por periodos de tiempo prolongados (semanas, meses, años). Por el contrario, los productos cárnicos curados en húmedo se someten a procesos de cocción.



**Figura 9.** Clasificación de productos cárnicos curados y cocidos.  
Adaptado de Flores y Toldrá, (1993).

#### 7.4.1.2 Chorizo tipo español

El chorizo tipo español es un producto cárnico crudo curado sometido a procesos de fermentación y maduración/secado que implica la molienda de carne y grasa, mezcla de sales, azúcares, condimentos, paprika (que le otorga un color rojo fuerte característico) y el envasado en tripas (Toldrá, 2004). Las tripas naturales se usan comúnmente en procesos de producción tradicional, mientras que las tripas artificiales se utilizan en productos para ser cortados por sus excelentes propiedades a la resistencia y permeabilidad al vapor de agua (Arnau et al., 2007). Durante la fabricación del chorizo español el procesamiento de picado, relleno y mezcla conlleva a un alto riesgo de contaminación superficial por microorganismos patógenos (Feng et al., 2017).

Investigaciones actuales están enfocadas en prolongar la vida útil y aumentar la seguridad alimentaria de estos productos a través de tratamientos físicos, químicos y mejoras en el envasado. Adzaly et al. (2015) desarrollaron una tripa novedosa basada en quitosano, cinamaldehído y Tween 80 demostrando propiedades mecánicas igual a la tripa de colágeno, menor solubilidad en agua y mayor transparencia, mientras que Comaposada et al. (2018) estudiaron películas húmedas de alginato de calcio adicionadas con aceite y tensioactivos las cuales disminuyeron la tasa de pérdida de peso y la permeabilidad al vapor de agua. Feng et al. (2017) encontraron que las características de dureza de salchichas no fueron afectadas por un envase antimicrobiano de quitosano con alcohol polivinílico. Marcos et al. (2020) estudiaron los recubrimientos compuestos de alginato coextruido en la elaboración de salchichas fermentadas en seco reportando que su aplicación no afectó la estabilidad del producto. Shafipour Yordshahi et al. (2020) desarrollaron un novedoso material de envoltura antimicrobiano que incorpora *Lactobacillus plantarum*, el cual permitió una reducción logarítmica de hasta 5 ciclos logarítmicos para *Listeria monocytogenes* en carne molida almacenada durante 9 días a 4°C.

Estos estudios revelan un potencial mejoramiento en la seguridad microbiológica y en aspectos tecnológicos en presencia de envasado activo. Además, si bien el nitrito inhibe efectivamente el crecimiento de las esporas de *Clostridium botulinum* y controla el desarrollo de *L. monocytogenes* bajo condiciones de refrigeración, es incapaz de eliminarla por completo (Sebranek et al., 2012). Más aún, esta sal de curado no produce la inhibición de otros patógenos entéricos Gram negativos tales como *E. coli* y *Salmonella* (Toldrá, 2023), bacterias causantes de enfermedades transmitidas por los alimentos (EFSA y ECDC, 2019).

#### **7.4.1.2.1 *E. coli***

*E. coli* es una bacteria gram-negativa no formadora de esporas, anaerobia facultativa, móvil por flagelos que habita en el intestino de los seres humanos y animales de sangre caliente. Si bien la mayoría de las cepas de *E. coli* son inocuas como parte de un tracto intestinal saludable, otras pueden ser potencialmente peligrosas (OMS, 2018a). Las distintas cepas de *E. coli* que provocan enfermedades se han clasificado en seis categorías: *E. coli* enteropatógena, *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteroagregativa, *E. coli* enteroinvasiva y *E. coli* difusamente adherente (CDC, 2019a).

Debido a la elevada presencia en el intestino, la *E. coli* es utilizada comúnmente como un indicador primordial para detectar y medir la contaminación fecal en la evaluación de la inocuidad de los alimentos (FAO, 2011). Este patógeno representa un problema de salud pública debido a su capacidad de infectar productos cárnicos, lo cual puede ocasionar pérdidas económicas para la industria alimentaria y poner en riesgo la seguridad alimentaria (CDC, 2021).

#### **7.4.1.2.2 *Listeria monocytogenes***

*L. monocytogenes* es una bacteria ubicua, gram-positiva, con forma de bastón, no forma esporas, móvil, la cual puede sobrevivir en condiciones extrema: temperaturas de 0-44 °C, pH entre 4.4-9.4 y elevadas concentraciones de NaCl (CDC, 2019b). El consumo de carnes y productos cárnicos contaminado con *L. monocytogenes* representa la principal vía de infección (OMS, 2018b; CDC, 2023). Niveles superiores a 100 UFC/g se asocian a brotes de listeriosis en alimentos y representa el límite al final del periodo de validez en carne y productos cárnicos listos para consumo comercializados durante su vida útil (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) et al., 2018; Reglamento (CE) no 2073/2005, 2005).

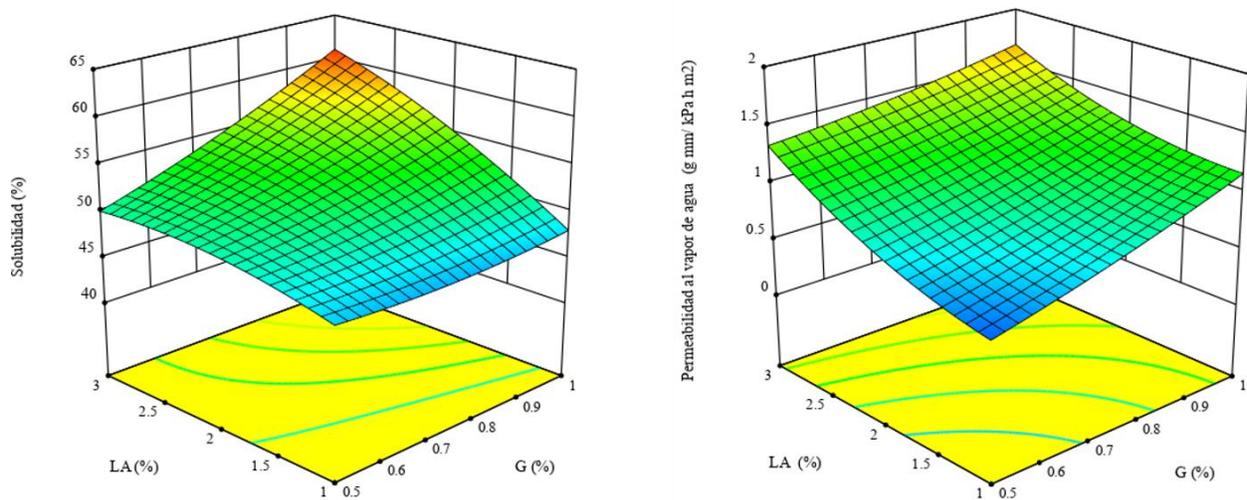
#### **7.4.1.2.3 *Salmonella***

*Salmonella* es una bacteria gram-negativa móvil en forma de bastón, no formadora de esporas perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Dentro del género *salmonella* se agrupan dos especies: *Salmonella entérica* y *Salmonella bongori*, de éstas se han identificado más de 2500 serotipos los cuales generan miles de infecciones anuales (OMS, 2018c). Las intoxicaciones alimentarias por *salmonella* pueden provocar desde una gastroenteritis aguda (salmonelosis no tifoidea) causada por la mayoría de otras especies de *salmonella*, hasta fiebre tifoidea (*Typhi* y *Paratyphi*) (CDC, 2020). La presencia de este patógeno se asocia frecuentemente con alimentos como la carne, huevos, leche y alimentos crudos, siendo especialmente común en aves de corral. Se ha demostrado que su impacto negativo en la salud y la seguridad humana es mayor que otros patógenos transmitidos en alimentos (Wu et al., 2021).

## 7.5 Método de superficie de respuesta

El método de superficie de respuesta es una colección de técnicas matemáticas y estadísticas que permiten: establecer una serie de experimentos (diseño) para a ver predicciones adecuadas de una determinada variable de respuesta, ajustar un modelo hipotético (empírico) a los datos obtenidos con el diseño elegido, buscar e identificar las configuraciones óptimas en las variables de entrada (control) del modelo que conducen valores de respuesta máximos (o mínimos) dentro de una determinada región de interés (Khuri, 2017). El método de superficie de respuesta fue introducido por Box y Wilson en 1951 (Box y Wilson, 1992). A modo de ejemplo se presentan gráficos 3D de superficies de respuesta generadas por el modelo (Figura 10).

Los objetivos principales de la metodología de superficie de respuesta son utilizar una secuencia de experimentos que han sido diseñados para estimar la interacción y los efectos cuadráticos, generando así la forma de la superficie de respuesta que se investiga con el fin de buscar una respuesta óptima y evaluar la relación funcional cercana a respuesta óptima (Gupta et al., 2020). Durante los procedimientos de optimización existen dos tipos de variables: factores (variables independientes) y las respuestas (variables de pendientes). Los valores de las respuestas son dependientes de los factores, los cuales pueden clasificarse en cualitativos o cuantitativos (Ferreira et al., 2007).



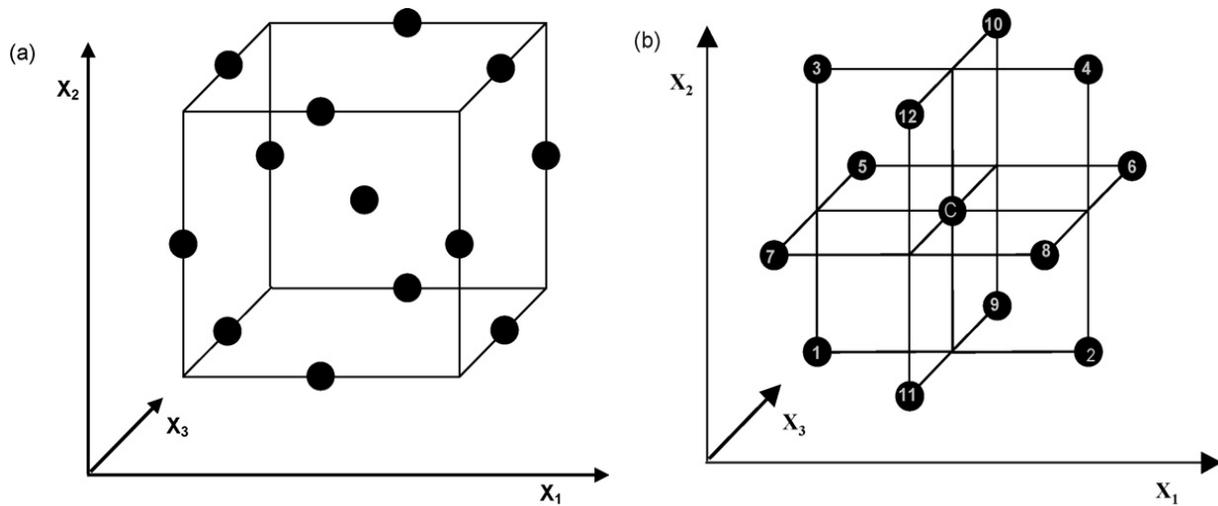
**Figura 10.** Ejemplos de gráficas de superficie de respuesta.

Fuente: Elaboración propia, (2023).

Los diseños de métodos de superficie de respuesta muestran gran utilidad para encontrar condiciones de proceso mejoradas u óptimas, dar solución a problemas de procesos o puntos débiles o hacer que un proceso o producto sea más insensible a esas influencias externas y no controlables (Khuri, 2017). Las amplias aplicaciones de la metodología de superficie de respuesta incluyen disciplinas como la medicina, agricultura, biotecnología, química, alimentos, etc. Dentro de los diseños de superficie de respuesta más destacados se encuentra el diseño central compuesto (CCD) y el diseño Box-Behnken (BBD).

### 7.5.1 Diseño Box-Behnken

Los diseños de Box-Behnken son una clase de diseño de segundo orden casi giratorios que proporciona tres niveles para cada factor y consiste en un subconjunto de las combinaciones factoriales del diseño factorial incompleto siendo útil para estimar los coeficientes en un polinomio graduado de segundo orden (Box y Behnken, 1960). La representación gráfica para los tres factores se observa en la Figura 11.



**Figura 11.**(a) Cubo para el BBD y tres diseños factoriales  $2^2$  entrelazados, (b) Figura de tres diseños factoriales  $2^2$  entrelazados y un punto central.

Adaptado de Ferreira et al. (2007).

El número de experimentos (N) necesarios para el desarrollo de BBD se define como:

$$N = 2k(k - 1) + C_0 \quad (1)$$

Donde k es el número de factores y  $C_0$  el número de puntos centrales.

El modelo Box-Behnken se construye a partir de una matriz de diseño experimental que involucra un conjunto de puntos de prueba (combinaciones de valores de las variables de entrada). Los puntos de prueba son seleccionados de manera que la distancia entre ellos sea uniforme, con el objetivo de minimizar la variabilidad en las variables respuestas. Los puntos de prueba son ejecutados y se miden las respuestas correspondientes. Posteriormente, se utiliza un análisis estadístico que permite el ajuste de un modelo matemático de acuerdo con los datos obtenidos.

El modelo será de utilidad para predecir la respuesta para cualquier combinación de valores de entrada que no se encuentren en el conjunto de puntos de prueba (Myers et al., 2016). Se ha demostrado que estos diseños son ligeramente más eficientes ya que requiere menos ensayos en comparación con el CCD y no contiene combinaciones en condiciones extremas, casi hasta los límites del contorno. Sin embargo, se debe considerar que la aplicación de este diseño no está indicado para situaciones en las que nos gustaría conocer las respuestas de los extremos (vértices del cubo) (Ferreira et al., 2007).

En este sentido, esta metodología fue empleada por Istiqomah et al. (2022) a fin de optimizar la formulación de una película biodegradable a base de quitosano, almidón y glicerol como factores, evaluando las variables respuesta: espesor, solubilidad, contenido de humedad, nivel de biodegradación, módulo elástico y resistencia a la tracción considerando un diseño Box-Behnken (BBD) que permitió una optimización adecuada para su aplicación en el envasado de alimentos.

La aplicación de esta metodología determina la relación existente entre las variables respuestas y los factores, es decir, se pueden obtener valores óptimos de los factores dependiendo el enfoque que se desee.

## 8. LITERATURA CITADA

- Abdollahzadeh, E., Nematollahi, A., & Hosseini, H. (2021). Composition of antimicrobial edible films and methods for assessing their antimicrobial activity: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *110*, 291-303. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.084>.
- Adzaly, N. Z., Jackson, A., Villalobos-Carvajal, R., Kang, I., & Almenar, E. (2015). Development of a novel sausage casing. *Journal of Food Engineering*, *152*, 24-31. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.10.032>.
- Aiyegoro, O. A. (2022). Microbial contamination of processed meat. Reference Module in Food Science. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85125-1.00167-8>
- Alarcón-Moyano, J. K., Bustos, R. O., Herrera, M. L., & Matiacevich, S. B. (2017). Alginate edible films containing microencapsulated lemongrass oil or citral: Effect of encapsulating agent and storage time on physical and antimicrobial properties. *Journal of Food Science and Technology*, *54*(9), 2878-2889. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2726-1>.
- Al-Tayyar, N. A., Youssef, A. M., & Al-hindi, R. (2020). Antimicrobial food packaging based on sustainable Bio-based materials for reducing foodborne Pathogens: A review. *Food Chemistry*, *310*, 125915. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125915>.
- Amin, U., Khan, M. K. I., Maan, A. A., Nazir, A., Riaz, S., Khan, M. U., Sultan, M., Munekata, P. E. S., & Lorenzo, J. M. (2022). Biodegradable active, intelligent, and smart packaging materials for food applications. *Food Packaging and Shelf Life*, *33*, 100903. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100903>.
- Amiri, A., Ramezani, A., Mortazavi, S. M. H., Hosseini, S. M. H., & Yahia, E. (2021). Shelf-life extension of pomegranate arils using chitosan nanoparticles loaded with *Satureja hortensis* essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *101* (9), 3778-3786. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11010>.
- Arias-Ríos, E. V., Cabrera-Díaz, E., Márquez-González, M., & Castillo, A. (2017). Natural food antimicrobials of animal origin. V. K. Juneja, H. P. Dwivedi, & J. N. Sofos (Eds.), *Microbial Control and Food Preservation: Theory and Practice*, 55-83. Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7556-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7556-3_4).
- Arnau, J., Serra, X., Comaposada, J., Gou, P., & Garriga, M. (2007). Technologies to shorten the drying period of dry-cured meat products. *Meat Science*, *77*(1), 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.03.015>.
- ASTM. (2023). ASTM D6400-23. Standard specification for labeling of plastics designed to be aerobically composted in municipal or industrial facilities. ASTM International, West Conshohocken, PA. <https://doi.org/10.1520/D6400-23>.
- Basiak, E., Lenart, A., & Debeaufort, F. (2018). How glycerol and water contents affect the structural and functional properties of starch-based edible films. *Polymers*, *10*(4), 412. <https://doi.org/10.3390/polym10040412>.

- Ben, Z. Y., Samsudin, H., & Yhaya, M. F. (2022). Glycerol: Its properties, polymer synthesis, and applications in starch-based films. *European Polymer Journal*, *175*, 111377. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111377>.
- Bhatt, S. M. (2018). Economical lactic acid production and optimization strategies. S. Kumar, P. Dheeran, M. Taherzadeh, & S. Khanal (Eds.), *Fungal Biorefineries*, 85-105. Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-90379-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-90379-8_5).
- Box, G. E. P., & Behnken, D. W. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, *2*(4), 455-475. <https://doi.org/10.1080/00401706.1960.10489912>.
- Box, G. E. P., & Wilson, K. B. (1992). On the experimental attainment of optimum conditions. S. Kotz & N. L. Johnson (Eds.), *Breakthroughs in Statistics*, 270-310. Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4380-9\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4380-9_23).
- Calva-Estrada, S. J., Jiménez-Fernández, M., & Lugo-Cervantes, E. (2019). Protein-based films: Advances in the development of biomaterials applicable to food packaging. *Food Engineering Reviews*, *11*(2), 78-92. <https://doi.org/10.1007/s12393-019-09189-w>.
- Cao, L., Lu, W., Mata, A., Nishinari, K., & Fang, Y. (2020). Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: A review. *Carbohydrate Polymers*, *242*, 116389. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116389>.
- Carpenter, C. e., & Broadbent, J. r. (2009). External Concentration of Organic Acid Anions and pH: Key Independent Variables for Studying How Organic Acids Inhibit Growth of Bacteria in Mildly Acidic Foods. *Journal of Food Science*, *74*(1), R12-R15. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00994.x>.
- Cazón, P., Velazquez, G., Ramírez, J. A., & Vázquez, M. (2017). Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. *Food Hydrocolloids*, *68*, 136-148. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.009>.
- CDC (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades). (2019a). Questions and Answers | *E. coli* | CDC. 11 de enero de 2019, <https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>.
- CDC (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades). (2019b). *Listeria* (Listeriosis) | *Listeria* | CDC en Español. 5 de marzo de 2019, <https://www.cdc.gov/spanish/listeria/index.html>.
- CDC (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades). (2020). *Salmonella* Página principal. <https://www.cdc.gov/salmonella/general/index.html>.
- CDC (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades). (2021). La *E. coli* y la seguridad de los alimentos. Centers for Disease Control and Prevention, 22 de junio de 2021, <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/communication/ecoli-and-food-safety.html>.
- CDC (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades). (2023). *Listeria* outbreaks | *listeria* | cdc. (2023, febrero 15). <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.html>.

- Chawla, R., Sivakumar, S., & Kaur, H. (2021). Antimicrobial edible films in food packaging: Current scenario and recent nanotechnological advancements- a review. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2, 100024. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2020.10002>.
- Choi, I., Lee, Y., Lyu, J. S., Lee, J.-S., & Han, J. (2022). Characterization of ionically crosslinked alginate films: Effect of different anion-based metal cations on the improvement of water-resistant properties. *Food Hydrocolloids*, 131, 107785. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107785>.
- Coban, H. B. (2020). Organic acids as antimicrobial food agents: Applications and microbial productions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(4), 569-591. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02256-w>.
- CODEX STAN 192-1995. Norma general para los aditivos alimentarios. CODEX STAN 192-1995.
- Comaposada, J., Marcos, B., Bou, R., & Gou, P. (2018). Influence of surfactants and proteins on the properties of wet edible calcium alginate meat coatings. *Food Research International*, 108, 539-550. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.002>.
- Comisión Europea. (2004). Reglamento (EC) No 450/2009 Regulation of the European parliament and of the council de 29 de mayo de 2009 sobre materiales y objetos activos e inteligentes destinados a entrar en contacto con alimentos. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:135:0003:0011:ES:PDF>.
- Comisión Europea. (2009). EU Guidance to the Commission Regulation (EC) No 450/2009 of 29 May 2009 on active and intelligent materials and articles intended to come into the contact with food (version 1.0). Available from: [https://ec.europa.eu/food/safety/chemical\\_safety/food\\_contact\\_materials\\_en](https://ec.europa.eu/food/safety/chemical_safety/food_contact_materials_en). Accessed 2017 October 24.
- Davidson, P. M., Critzer, F. J., & Taylor, T. M. (2013). Naturally occurring antimicrobials for minimally processed foods. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4, 163-190. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182535>.
- Davidson, P. M., Taylor, T. M., & Schmidt, S. E. (2014). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. M. P. Doyle & R. L. Buchanan (Eds.), *Food Microbiology* (pp. 765-801). ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555818463.ch30>.
- Davidson, P. M., Cekmer, H. B., Monu, E. A., & Techathuvanan, C. (2015). 1 - The use of natural antimicrobials in food: An overview. T. M. Taylor (Ed.), *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality* (pp. 1-27). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-034-7.00001-3>.
- Dharmalingam, K., & Anandalakshmi, R. (2019). Polysaccharide-based films for food packaging applications. V. Katiyar, R. Gupta, & T. Ghosh (Eds.), *Advances in Sustainable Polymers* (pp. 183-207). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-32-9804-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-981-32-9804-0_9).

- Dıblan, S., & Kaya, S. (2023). Shelf life modelling of kaşar cheese packaged with potassium sorbate, nisin, silver substituted zeolite, or chitosan incorporated active multilayer plastic films. *International Dairy Journal*, *140*, 105596. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105596>.
- Dome, K., Podgorbunskikh, E., Bychkov, A., & Lomovsky, O. (2020). Changes in the crystallinity degree of starch having different types of crystal structure after mechanical pretreatment. *Polymers*, *12*(3), 641. <https://doi.org/10.3390/polym12030641>.
- E, Y., Qi, Q., Chang, Z., Jiang, J., Yao, X., Li, P., Lei, F., & Wang, K. (2022). Fabrication of pH-sensitive galactomannan/glycerol bio-composite films for food packaging applications. *Reactive and Functional Polymers*, *181*, 105465. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2022.105465>.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., Fernández Escámez, P. S., Girones, R., Herman, L., Koutsoumanis, K., Nørrung, B., Robertson, L., Ru, G., Sanaa, M., Simmons, M., Skandamis, P., Snary, E., Speybroeck, N., Ter Kuile, B. Lindqvist, R. (2018). *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *EFSA Journal*, *16*(1). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5134>.
- EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control). (2019). The european union one health 2018 zoonoses report. *EFSA Journal*, *17*(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (2011). PREVENCIÓN de la *E. coli* en los ALIMENTOS | CRISIS DE LA CADENA ALIMENTARIA |: [https://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/fcc/news/FAO\\_PREVENCION.de.la.E.Coli.en.los.ALIMENTOS\\_FCC\\_ES.pdf](https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/fcc/news/FAO_PREVENCION.de.la.E.Coli.en.los.ALIMENTOS_FCC_ES.pdf).
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (2014). | Inpho | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Recuperado 26 de marzo de 2023, de <https://www.fao.org/in-action/inpho/publicaciones/detail/es/c/2470/>.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (2018). Sustainable Food Systems, Concept and Framework. <http://www.fao.org/3/ca2079en/CA2079EN.pdf>.
- FAO, FIDA, OPS, WFP y UNICEF. (2020). Panorama de la seguridad alimentaria y nutrición en América Latina y el Caribe 2020. Santiago de Chile. <https://doi.org/10.4060/cb2242es>.
- FAOSTAT (Base de datos estadísticos corporativos de la Organización para la Agricultura y la Alimentación). (2020). Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>. Consultado en enero de 2020.
- Feng, C.-H., Liu, Y.-W., Makino, Y., García Martín, J. F., & Cummins, E. (2017). Evaluation of modified casings and chitosan-PVA packaging on the physicochemical properties of

- cooked Sichuan sausages during long-term storage. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(8), 1777-1788. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13451>.
- Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., da Silva, E. G. P., Portugal, L. A., dos Reis, P. S., Souza, A. S., & dos Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2), 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>.
- Flores, J., Toldrá, F. (1993). Curing: processes and applications. In: Macrae, R., Robinson, R., Sadle, M., Fullerlove, G. (Eds.), *Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*. Academic Press, London, UK, pp. 1277-1282.
- Galus, S., & Kadzińska, J. (2015). Food applications of emulsion-based edible films and coatings. *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 273-283. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.011>.
- García Ibarra, V., Sendón, R., & Rodríguez-Bernaldo De Quirós, A. (2016). Antimicrobial food packaging based on biodegradable materials. *Antimicrobial Food Packaging* (pp. 363-384). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00029-2>.
- Ghaani, M., Cozzolino, C. A., Castelli, G., & Farris, S. (2016). An overview of the intelligent packaging technologies in the food sector. *Trends in Food Science & Technology*, 51, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.02.008>.
- Giannakas, A. E., Salmas, C. E., Moschovas, D., Zaharioudakis, K., Georgopoulos, S., Asimakopoulos, G., Aktypis, A., Proestos, C., Karakassides, A., Avgeropoulos, A., Zafeiropoulos, N. E., & Nychas, G.-J. (2022). The increase of soft cheese shelf-life packaged with edible films based on novel hybrid nanostructures. *Gels*, 8(9), 539. <https://doi.org/10.3390/gels8090539>.
- Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. C., & Thom, D. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Letters*, 32(1), 195-198. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(73\)80770-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(73)80770-7).
- Guo, M., Zhang, X., & Jin, T. Z. (2023). Active food packaging. Reference Module in Food Science. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822521-9.00078-2>
- Gupta, B. C., Guttman, I., & Jayalath, K. P. (2020). *Statistics and probability with applications for engineers and scientists using minitab, R and jmp (1.a ed.)*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/978111951665>.
- Hassan, B., Chatha, S. A. S., Hussain, A. I., Zia, K. M., & Akhtar, N. (2018). Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 1095-1107. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.097>.
- Hirshfield, I. N., Terzulli, S., & O'Byrne, C. (2003). Weak organic acids: A panoply of effects on bacteria. *Science Progress*, 86(4), 245-270. <https://doi.org/10.3184/003685003783238626>.

- Hoque, M., Gupta, S., Santhosh, R., Syed, I., & Sarkar, P. (2021). 3—Biopolymer-based edible films and coatings for food applications. K. Pal, I. Banerjee, P. Sarkar, A. Bit, D. Kim, A. Anis, & S. Maji (Eds.), *Food, Medical, and Environmental Applications of Polysaccharides* (pp. 81-107). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819239-9.00013-0>.
- Istiqomah, A., Utami, M. R., Firdaus, M., Suryanti, V., & Kusumaningsih, T. (2022). Antibacterial chitosan-*Dioscorea alata* starch film enriched with essential oils optimally prepared by following response surface methodology. *Food Bioscience*, *46*, 101603. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101603>
- Janani, N., Zare, E. N., Salimi, F., & Makvandi, P. (2020). Antibacterial tragacanth gum-based nanocomposite films carrying ascorbic acid antioxidant for bioactive food packaging. *Carbohydrate Polymers*, *247*, 116678. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116678>.
- Katiyar, V., Gupta, R., & Ghosh, T. (Eds.). (2019). *Advances in sustainable polymers: Processing and applications*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-32-9804-0>.
- Kaushal, P., Kumar, V., & Sharma, H. K. (2015). Utilization of taro (*Colocasia esculenta*): A review. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(1), 27-40. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-0933-y>.
- Khuri, A. I. (2017). Response surface methodology and its applications in agricultural and food sciences. *Biometrics & Biostatistics International Journal*, *5*(5). <https://doi.org/10.15406/bbij.2017.05.00141>.
- Kirtonia, K., Salauddin, M., Bharadwaj, K. K., Pati, S., Dey, A., Shariati, M. A., Tilak, V. K., Kuznetsova, E., & Sarkar, T. (2021). Bacteriocin: A new strategic antibiofilm agent in food industries. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *36*, 102141. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102141>.
- Kouser, F., Kumar, S., Bhat, H. F., Noor, S., Manzoor, M., Dar, B. N., Hassoun, A., Ait-Kaddour, A., Shabbir, M. A., Aadil, R. M., & Bhat, Z. F. (2023). Effectiveness of *Terminalia bellerica* based bioactive edible film in controlling the microbial growth and lipid oxidation of cheese during storage. *Food Chemistry Advances*, *2*, 100213. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100213>.
- Lawrie, R. A. (2006). Chapter 5—The conversion of muscle to meat. R. A. Lawrie (Ed.), *Lawrie's Meat Science* (Seventh Edition) (pp. 128-156). *Woodhead Publishing*. <https://doi.org/10.1533/9781845691615.128>.
- Mani-López, E., García, H. S., & López-Malo, A. (2012). Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Research International*, *45*(2), 713-721. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.043>.
- Marcos, B., Gou, P., Arnau, J., Guàrdia, M. D., & Comaposada, J. (2020). Co-extruded alginate as an alternative to collagen casings in the production of dry-fermented sausages: Impact

- of coating composition. *Meat Science*, *169*, 108184. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108184>.
- Marzlan, A. A., Muhialdin, B. J., Zainal Abedin, N. H., Manshoor, N., Ranjith, F. H., Anzian, A., & Meor Hussin, A. S. (2022). Incorporating torch ginger (*Etilingera elatior* Jack) inflorescence essential oil onto starch-based edible film towards sustainable active packaging for chicken meat. *Industrial Crops and Products*, *184*, 115058. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115058>.
- Matarneh, S. K., Scheffler, T. L., & Gerrard, D. E. (2023). Chapter 5—The conversion of muscle to meat. F. Toldrá (Ed.), *Lawrie's Meat Science* (Ninth Edition) (pp. 159-194). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85408-5.00010-8>.
- Mehdizadeh, T., Tajik, H., Langroodi, A. M., Molaei, R., & Mahmoudian, A. (2020). Chitosan-starch film containing pomegranate peel extract and *Thymus kotschyianus* essential oil can prolong the shelf life of beef. *Meat Science*, *163*, 108073. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108073>.
- Menezes, J., & Athmaselvi, K. A. (2018). Report on edible films and coatings. *Food Packaging and Preservation* (pp. 177-212). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811516-9.00005-1>.
- Meritaine da Rocha, de Souza, M. M., & Prentice, C. (2018). Biodegradables films: An alternative food packaging. *Food Packaging and Preservation* (pp. 307-342). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811516-9.00009-9>.
- Mitchell, P., & Moyle, J. (1969). Estimation of membrane potential and ph difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria. *European Journal of Biochemistry*, *7*(4), 471-484. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1969.tb19633.x>.
- Mohite, A. M., & chandel, D. (2020). Formulation of edible films from fenugreek mucilage and taro starch. *SN Applied Sciences*, *2*(11), 1900. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-03710-1>.
- More, P. R., Pegu, K., & Arya, S. S. (2022). Development and characterization of taro starch-casein composite bioactive films functionalized by micellar pomegranate peel extract (Mppe). *International Journal of Biological Macromolecules*, *220*, 1060-1071. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.08.147>.
- Motelica, L., Fikai, D., Fikai, A., Oprea, O. C., Kaya, D. A., & Andronesu, E. (2020). Biodegradable antimicrobial food packaging: Trends and perspectives. *Foods*, *9*(10), 1438. <https://doi.org/10.3390/foods9101438>.
- Murmu, S. B., & Mishra, H. N. (2018). The effect of edible coating based on Arabic gum, sodium caseinate and essential oil of cinnamon and lemon grass on guava. *Food Chemistry*, *245*, 820-828. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.104>.

- Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2016). Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments (Fourth edition). Wiley.
- NOM-213-SSA1-2002, Norma Oficial Mexicana Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
- Nottagh, S., Hesari, J., Peighamardoust, S. H., Rezaei-Mokarram, R., & Jafarizadeh-Malmiri, H. (2020). Effectiveness of edible coating based on chitosan and Natamycin on biological, physico-chemical and organoleptic attributes of Iranian ultra-filtrated cheese. *Biologia*, 75(4), 605-611. <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00378-w>.
- OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos). (2010). The OECD innovation strategy: Getting a head start on tomorrow - OECD. Recuperado 28 de marzo de 2023, de <https://www.oecd.org/sti/inno/theoecdinnovationstrategygettingaheadstartontomorrow.htm>.
- OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos). (2018). Oslo Manual 2018: Guidelines for Collecting, Reporting and Using Data on Innovation, 4th Edition. Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD iLibrary, [https://www.oecd-ilibrary.org/science-and-technology/oslo-manual-2018\\_9789264304604-en;jsessionid=aYv8tkFePDSH-NM5m0Fy8-bh.ip-10-240-5-172](https://www.oecd-ilibrary.org/science-and-technology/oslo-manual-2018_9789264304604-en;jsessionid=aYv8tkFePDSH-NM5m0Fy8-bh.ip-10-240-5-172). Accedido 4 de marzo de 2022.
- Oliveira Filho, J. G. de, Rodrigues, J. M., Valadares, A. C. F., Almeida, A. B. de, Lima, T. M. de, Takeuchi, K. P., Alves, C. C. F., Sousa, H. A. de F., Silva, E. R. da, Dyszy, F. H., & Egea, M. B. (2019). Active food packaging: Alginate films with cottonseed protein hydrolysates. *Food Hydrocolloids*, 92, 267-275. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.052>.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2018a). Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) WHO Media Centre: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2018b). Listeriosis. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis>. Accedido 3 de marzo de 2022.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2018c). *Salmonella* (no tifoidea) página principal. *Salmonella* (no tifoidea) (who.int).
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2020. Food safety. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2021). Draft WHO global strategy for food safety 2022-2030, towards stronger food safety systems and global cooperation, Department of Nutrition and Food Safety Prepared by WHO Secretariat. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240057685>.

- OPS (Organización Panamericana de la Salud). (2010). Seguridad alimentaria y nutricional— OPS/OMS | Organización panamericana de la salud. (s. f.). Recuperado 26 de marzo de 2023, de <https://www.paho.org/es/noticias/3-10-2010-seguridad-alimentaria-nutricional>.
- ONU (Organización de las Naciones Unidas). (2015). Transformar nuestro mundo: la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible. Objetivo 12: Garantizar patrones de producción y consumo sostenibles. Recuperado de <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/sustainable-consumption-production/>.
- Pelissari, F. M., Ferreira, D. C., Louzada, L. B., dos Santos, F., Corrêa, A. C., Moreira, F. K. V., & Mattoso, L. H. (2019). Starch-based edible films and coatings. *Starches for Food Application*, 359-420). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809440-2.00010-1>.
- Pellis, A., Malinconico, M., Guarneri, A., & Gardossi, L. (2021). Renewable polymers and plastics: Performance beyond the green. *New Biotechnology*, 60, 146-158. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.10.003>.
- PESA (Programa Especial para la Seguridad Alimentaria Centroamérica). (2022). | Conceptos Básicos | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <https://www.fao.org/in-action/pesa-centroamerica/temas/conceptos-basicos/es/#:~:text=Inocuidad%3A%20La%20inocuidad%20se%20refiere,enfermedades%20cr%C3%B3nicas%20como%20c%C3%A1ncer%20enfermedades>. Accedido 13 de abril de 2022.
- Prameela, K., Murali Mohan, C., & Ramakrishna, C. (2018). Biopolymers for food design: Consumer-friendly natural ingredients. *Biopolymers for Food Design* (pp. 1-32). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811449-0.00001-3>.
- Pramodrao, K. S., & Riar, C. S. (2014). Comparative study of effect of modification with ionic gums and dry heating on the physicochemical characteristic of potato, sweet potato and taro starches. *Food Hydrocolloids*, 35, 613-619. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.08.006>.
- PubChem. (2022a). Lactic acid. Recuperado 4 de diciembre de 2022, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/612>.
- PubChem. (2022b). Glycerol. Recuperado 27 de diciembre de 2022, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/753>.
- Quispe, M. M., Lopez, O. V., Boina, D. A., Stumbé, J.-F., & Villar, M. A. (2021). Glycerol-based additives of poly(3-hydroxybutyrate) films. *Polymer Testing*, 93, 107005. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2020.107005>.
- Reglamento (CE) no 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (Texto pertinente a efectos del EEE), 338 OJ L (2005). <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj/spa>.

- Ribeiro, A. M., Estevinho, B. N., & Rocha, F. (2021). Preparation and incorporation of functional ingredients in edible films and coatings. *Food and Bioprocess Technology*, 14(2), 209-231. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02528-4>.
- Rinaudo, M. (2014). Biomaterials based on a natural polysaccharide: Alginate. TIP. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1), 92-96. [https://doi.org/10.1016/S1405-888X\(14\)70322-5](https://doi.org/10.1016/S1405-888X(14)70322-5).
- Robertson, G.L., (2006). *Food Packaging Principles and Practice*, second ed. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Rotan, FL (Chapter 1, pp. 1–7 (a); Chapter 6 (b)).
- Rocha, M. da, Loiko, M. R., Tondo, E. C., & Prentice, C. (2014). Physical, mechanical and antimicrobial properties of Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) protein films incorporated with organic acids. *Food Hydrocolloids*, 37, 213-220. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.017>.
- Rodríguez, G. M., Sibaja, J. C., Espitia, P. J. P., & Otoni, C. G. (2020). Antioxidant active packaging based on papaya edible films incorporated with *Moringa oleifera* and ascorbic acid for food preservation. *Food Hydrocolloids*, 103, 105630. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105630>.
- Roopa, H., Panghal, A., Kumari, A., Chhikara, N., Sehgal, E., & Rawat, K. (2023). Active packaging in food industry. N. Chhikara, A. Panghal, & G. Chaudhary (Eds.), *Novel Technologies in Food Science* (1.a ed., pp. 375-404). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119776376.ch10>.
- Roshandel-hesari, N., Mokaber-Esfahani, M., Taleghani, A., & Akbari, R. (2022). Investigation of physicochemical properties, antimicrobial and antioxidant activity of edible films based on chitosan/casein containing *Origanum vulgare L.* essential oil and its effect on quality maintenance of cherry tomato. *Food Chemistry*, 396, 133650. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133650>.
- Sebranek, J. G., Jackson-Davis, A. L., Myers, K. L., & Lavieri, N. A. (2012). Beyond celery and starter culture: Advances in natural/organic curing processes in the United States. *Meat Science*, 92(3), 267-273. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.03.002>.
- Shafipour Yordshahi, A., Moradi, M., Tajik, H., & Molaei, R. (2020). Design and preparation of antimicrobial meat wrapping nanopaper with bacterial cellulose and postbiotics of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 321, 108561. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108561>.
- Shahabi-Ghahfarrokhi, I., Almasi, H., & Babaei-Ghazvini, A. (2020). Characteristics of biopolymers from natural resources. *Processing and Development of Polysaccharide-Based Biopolymers for Packaging Applications* 49-95. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818795-1.00003-4>.
- Shanmathy, M., Mohanta, M., & Thirugnanam, A. (2021). Development of biodegradable bioplastic films from Taro starch reinforced with bentonite. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2, 100173. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100173>.

- Sharma, S., Jan, R., Kaur, R., & Riar, C. S. (2020). Taro (*Colocasia esculenta*). G. A. Nayik & A. Gull (Eds.), *Antioxidants in Vegetables and Nuts—Properties and Health Benefits* (pp. 341-353). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-7470-2\\_18](https://doi.org/10.1007/978-981-15-7470-2_18).
- Shi, Y., Pu, D., Zhou, X., & Zhang, Y. (2022). Recent progress in the study of taste characteristics and the nutrition and health properties of organic acids in foods. *Foods*, *11*(21), 3408. <https://doi.org/10.3390/foods11213408>.
- SIAP (Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera). (2021). Disponible en: <https://www.gob.mx/siap>. Consultado en enero de 2022.
- Silva, S. P. M., Teixeira, J. A., & Silva, C. C. G. (2023). Application of enterocin-whey films to reduce *Listeria monocytogenes* contamination on ripened cheese. *Food Microbiology*, *109*, 104134. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104134>.
- Singh, M., Smith, J., & Bailey, M. (2015). Using natural antimicrobials to enhance the safety and quality of poultry. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality* (pp. 375-401). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-034-7.00018-9>.
- Siskawardani, D. D., Warkoyo, Hidayat, R., & Sukardi. (2020). Physic-mechanical properties of edible film based on taro starch (*Colocasia esculenta L. Schoott*) with glycerol addition. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *458*(1), 012039. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/458/1/012039>.
- Suárez, R. (2015). El desafío de la empresa innovadora. Editorial CODEU. Quito.
- Tabatabaei, S. D., Ghiasi, F., Hashemi Gahrue, H., & Hosseini, S. M. H. (2022). Effect of emulsified oil droplets and glycerol content on the physicochemical properties of Persian gum-based edible films. *Polymer Testing*, *106*, 107427. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2021.107427>.
- Tavassoli-Kafrani, E., Shekarchizadeh, H., & Masoudpour-Behabadi, M. (2016). Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. *Carbohydrate Polymers*, *137*, 360-374. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.074>.
- Toldrá, F. (Ed.). (2004). Dry-cured meat products. *Food & Nutrition Press, Inc.* <https://doi.org/10.1002/9780470385111>.
- Toldrá, F. (2023). Chapter 9—*The storage and preservation of meat. III—Meat processing*. F. Toldrá (Ed.), *Lawrie's Meat Science (Ninth Edition)* (pp. 281-314). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85408-5.00002-9>.
- Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K.-H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo, M., & Schué, F. (2012). Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*, *84*(2), 377-410. <https://doi.org/10.1351/PAC-REC-10-12-04>.
- Vieira, M. G. A., da Silva, M. A., dos Santos, L. O., & Beppu, M. M. (2011). Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *European Polymer Journal*, *47*(3), 254-263. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.12.011>.

- Wang, J., Chen, J., Sun, Y., He, J., Zhou, C., Xia, Q., Dang, Y., Pan, D., & Du, L. (2023). Ultraviolet-radiation technology for preservation of meat and meat products: Recent advances and future trends. *Food Control*, *148*, 109684. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109684>.
- Wankhade, V. (2020). Animal-derived biopolymers in food and biomedical technology. *Biopolymer-Based Formulations* (pp. 139-152). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816897-4.00006-0>.
- WCED (World Commission on Environment and Development). (1987). Our Common Future. Oxford University Press, Oxford (often referred to simply as the UN's "Brundtland Commission Report").
- Wu, Y., Wu, M., Liu, C., Tian, Y., Fang, S., Yang, H., Li, B., & Liu, Q. (2021). Colloidal gold immunochromatographic test strips for broad-spectrum detection of *Salmonella*. *Food Control*, *126*, 108052. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108052>.
- Wu, Z., Wu, J., Peng, T., Li, Y., Lin, D., Xing, B., Li, C., Yang, Y., Yang, L., Zhang, L., Ma, R., Wu, W., Lv, X., Dai, J., & Han, G. (2017). Preparation and application of starch/polyvinyl alcohol/citric acid ternary blend antimicrobial functional food packaging films. *Polymers*, *9*(3), 102. <https://doi.org/10.3390/polym9030102>.
- Yang, Z., Guan, C., Zhou, C., Pan, Q., He, Z., Wang, C., Liu, Y., Song, S., Yu, L., Qu, Y., & Li, P. (2023). Amphiphilic chitosan/carboxymethyl gellan gum composite films enriched with mustard essential oil for mango preservation. *Carbohydrate Polymers*, *300*, 120290. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120290>.
- Yates, J., Deeney, M., Rolker, H. B., White, H., Kalamatianou, S., & Kadiyala, S. (2021). A systematic scoping review of environmental, food security and health impacts of food system plastics. *Nature Food*, *2*(2), 80-87. <https://doi.org/10.1038/s43016-021-00221-z>.
- Yıldırım-Yalçın, M., Sadıkoğlu, H., & Şeker, M. (2021). Characterization of edible film based on grape juice and cross-linked maize starch and its effects on the storage quality of chicken breast fillets. *LWT*, *142*, 111012. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111012>.
- Yuan, D., Hao, X., Liu, G., Yue, Y., & Duan, J. (2022). A novel composite edible film fabricated by incorporating W/O/W emulsion into a chitosan film to improve the protection of fresh fish meat. *Food Chemistry*, *385*, 132647. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132647>.
- Zheng, K., Zhang, J., Yang, F., Wang, W., Li, W., & Qin, C. (2022). Properties and biological activity of chitosan-coix seed starch films incorporated with nano zinc oxide and *Artemisia annua* essential oil for pork preservation. *LWT*, *164*, 113665. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113665>.
- Zhou, H., Yang, N., Hou, J., Yu, C., Jin, Z., Zeng, P., Yang, L., Fu, Y., Shen, Y., & Guo, S. (2022). Effects of CaCl<sub>2</sub>, HCl, acetic acid or citric acid on dynamic mechanical performances and physicochemical properties of sodium alginate edible films. *Food Packaging and Shelf Life*, *34*, 100935. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100935>.

## CAPÍTULO 1

### CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN ANTIBACTERIANA DE PELÍCULAS A BASE DE POLISACÁRIDOS QUE INCORPORAN NISINA Y ÁCIDO LÁCTICO

#### 1.1 RESUMEN

Se utilizó ácido láctico, nisina, almidón de malanga, alginato de sodio y glicerol para preparar películas biodegradables. Se estudiaron las propiedades físicas, químicas y mecánicas las cuales mostraron valores en un rango de 0.14-0.35 mm para espesor, humedad 26.26-41.52%; solubilidad en agua 28.90-61%; permeabilidad al vapor de agua (WVP) 1.06-2.93 (g·mm/kPa·h·m<sup>2</sup>); resistencia a la tracción 2.62-11.15 Mpa y fuerza de rotura 16.59-44.18 Mpa. Se observó que al adicionar ácido láctico e incrementar su concentración aumenta el espesor, la solubilidad, la humedad y la WVP. La película que contiene ácido láctico 3% mejora las propiedades mecánicas en 1.41 y 1.98 veces la TS y BF en comparación con la película sin antimicrobiano. La caracterización estructural de las películas mediante FTIR mostró la aparición de picos a 1652 cm<sup>-1</sup> relacionados a la presencia de grupos amida de nisina y picos a 1720 cm<sup>-1</sup> que revelan vibraciones de estiramiento C=O para ácido láctico. Se observó mayor susceptibilidad para *E. coli* con zonas de inhibición que superan los 20 mm para todos los tratamientos excepto para la película sin antimicrobiano y nisina 2369 UI.

**Palabras clave** — *Película biodegradable activa, antimicrobiano, nisina, ácido láctico.*

#### 1.2 INTRODUCCIÓN

La contaminación por del suelo y a la vida marina se ve afectada gravemente por envases plásticos que tardan mucho tiempo en degradarse, esto representa un problema grave que debe ser atendido (Kirtonia et al., 2021). Las investigaciones recientes han avanzado significativamente en el desarrollo, formulación y caracterización de películas biodegradables a base de biopolímeros, hacia un enfoque más sustentable. Las películas biodegradables son finas capas delgadas producidas exclusivamente a partir de ingredientes renovables y comestibles que una vez formadas se utilizan para envolver una gran variedad de alimentos (Paul, 2020). Un avance revelador involucra la inclusión de agentes antimicrobianos en las películas, generando películas activas. Las bacteriocinas como la nisina y la adición de ácidos orgánicos como el

ácido láctico solos o en combinación aumentan la vida útil y la seguridad microbiológica de diversos productos alimenticios, sobre microorganismos patógenos.

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos producidas a partir de cepas bacterianas que matan o inhiben el crecimiento de otros microorganismos (Kirtonia et al., 2021). Actualmente existe un gran interés en la aplicación de bacteriocinas como alternativa en la conservación de alimentos. La nisina es una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* utilizada como conservante de alimentos, se trata de un polipéptido catiónico, hidrófobo y termoestable es soluble en condiciones ácidas en un rango de pH de 2-3 (Gharsallaoui et al., 2016). Mientras que el ácido láctico es un ácido orgánico de tres carbonos; un átomo de carbono terminal es parte de un grupo ácido o carboxilo, el átomo de carbono central tiene un alcohol y el otro átomo de carbono terminal es parte de un grupo metilo o hidrocarburo (Bhatt, 2018). Por tanto, el objetivo de este estudio se basa en desarrollar películas a base de almidón de malanga y alginato de sodio como materiales de base biológica que incorporan nisina y ácido láctico solos o en combinación y estudiar su efecto antibacteriano *in vitro* en tres bacterias comúnmente transmitidas por alimentos.

## 1.3 METODOLOGÍA

### 1.3.1 Producción de las películas biodegradables

La película biodegradable basadas en alginato de sodio, almidón de malanga, glicerol, nisina y ácido láctico se preparó en un base al método descrito previamente (Escobar et al., 2009). El almidón de malanga (obtenido en el Laboratorio de Ciencias de los Alimentos del Colegio de Postgraduados) al 0.5% (p/v) fue disuelto en agua destilada a temperatura ambiente durante 20 min, luego se elevó la temperatura a 85°C, continuando la agitación constante por 30 min. Posteriormente a la solución se le añadió un 1.5% (p/v) de alginato de sodio (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EE. UU.) y 1% (p/v) de glicerol (Meyer, CDMX, México) como plastificante, manteniendo en agitación por 30 min (por cada componente) a 70-75 °C. La composición de los antimicrobianos añadidos a las soluciones formadoras de películas se muestran en la Cuadro 1-1. Manteniendo la temperatura a 70°C se añadió la nisina (Danisco, CDMX, México) (disuelta previamente en 50,000 UI/mL de HCl (J.T. Baker, Nueva Jersey, EE. UU.) y se agitó durante 30 minutos. Cuando la solución se mantuvo a 60°C se añadió el ácido láctico (Hebbe Cosmetics,

México) homogenizando por 20 min. Volúmenes de 35 mL de las soluciones filmogénicas se transfirieron a placas (100 x 15 mm), las cuales fueron secadas a 45 °C por 12 h.

**Cuadro 1-1.** Composición de las soluciones filmogénicas

| <b>Antimicrobianos</b> |                    |                             |
|------------------------|--------------------|-----------------------------|
| <b>Tratamientos</b>    | <b>Nisina (UI)</b> | <b>Ácido láctico% (v/v)</b> |
| T1                     | -                  | -                           |
| T2                     | 2369               | -                           |
| T3                     | 2369               | 2                           |
| T4                     | 2369               | 3                           |
| T5                     | -                  | 2                           |
| T6                     | -                  | 3                           |

### 1.3.2 Caracterización física y química de las películas biodegradables

#### 1.3.2.1 Espesor

El espesor de la película se obtuvo utilizando un micrómetro digital (Modelo MDC-1 "SB", AMES, EE. UU.) Se tomaron cinco mediciones en posiciones aleatorias de la muestra y se calculó el valor promedio.

#### 1.3.2.2 Contenido de humedad

El contenido de humedad se determinó por pérdida de peso de la película. Las películas se secaron en un horno (Ecoshel, 9025H, CDMX, México.) a 103°C durante 24 h. Se determinó el contenido de humedad sobre una base seca de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$\% MC = \frac{W_i - W_D}{W_D} \times 100\%$$

Donde  $W_i$  es el peso inicial y  $W_D$  es el peso seco de la película.

#### 1.3.2.3 Prueba de solubilidad en agua

La solubilidad en agua de las muestras de película se determinó de acuerdo con (Rangel-Marrón et al., 2019). Las muestras de película seca se seccionaron en trozos de 2 x 2 cm y se pesaron previamente  $W_0$ . Cada muestra se colocó en un tubo de 50 mL con 20 mL de agua destilada y se mantuvo a 25°C durante 24 h. El residuo se secó a 103°C (Ecoshel, 9025H, CDMX, México).

durante 24 h y se registró el peso  $W_1$ . La solubilidad se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$\% S = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \times 100$$

#### 1.3.2.4 Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad de vapor de agua (WVP) se determinó mediante el método gravimétrico basado en la norma ASTM E96 (ASTM,2016). Las muestras triplicadas de película se cortaron en círculos (2.5 cm de diámetro), se colocaron en pesafiltros que contenían cloruro de calcio anhidro y se secaron en desecadores que contenían solución saturada de NaCl (75% HR, 25°C). Las muestras se pesaron periódicamente cada 24h por cinco días. La WVP fue calculado por la siguiente ecuación.

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

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

Donde,  $G / t$ : pendiente de la ganancia de peso frente al tiempo (g/h);  $A$ : área de la película ( $\text{m}^2$ );  $\Delta P$ : diferencia de presión parcial de vapor entre el cloruro de calcio y el cloruro de sodio (kPa);  $e$ : espesor de la película (mm).

#### 1.3.2.5 Propiedades mecánicas

La resistencia a la tracción (TS) y la fuerza de rotura (BF) se determinaron de acuerdo con ASTM D882-91 utilizando un texturómetro (Shimadzu EZ-SX) a una velocidad de tracción de  $50 \text{ mm}/\text{min}^{-1}$ . Cinco muestras de cada película se cortaron en rectángulos de 50 mm de largo y 20 mm de ancho.

#### 1.3.2.6 Caracterización estructural de las películas por FTIR

Se analizó la estructura de las películas preparadas mediante la aplicación de la espectrometría de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) (ThermoScientific, iS50, Bruker, Vertex, Wisconsin, EE. UU.). Los espectros de FTIR (64 escaneos, resolución de  $4 \text{ cm}^{-1}$ ) se midieron en la región espectral de  $4000$  a  $400 \text{ cm}^{-1}$  por triplicado.

### **1.3.3 Actividad antibacteriana *in vitro***

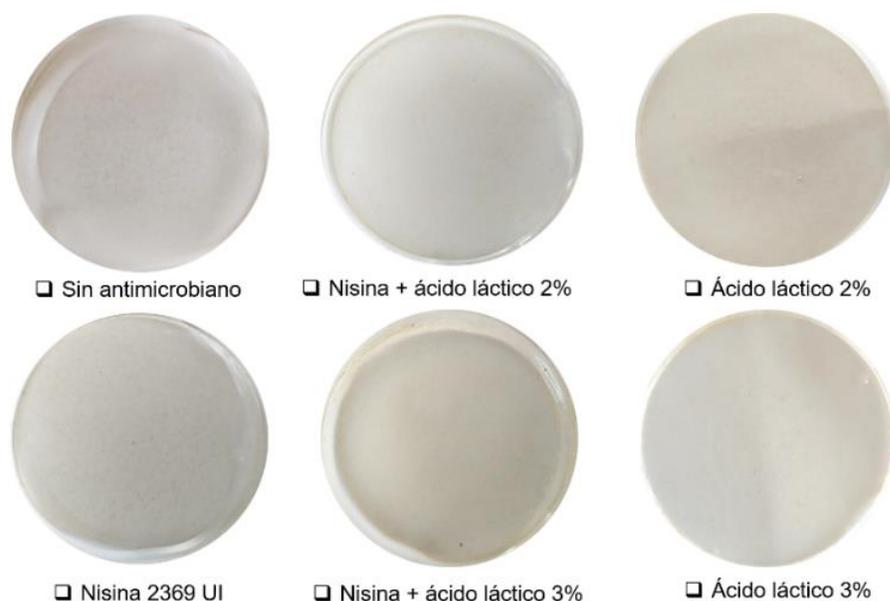
La actividad antibacteriana de las películas se evaluó por el método de difusión en disco contra las bacterias *Escherichia coli*, *Salmonella* y *listeria monocytogenes*. Alícuotas de 100 µL de cada suspensión bacteriana  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL en la escala de McFarland se extendieron en placas de agar SS (agar *Salmonella-shigella*), EMB (Agar Eosina y Azul de Metileno) y agar listeria (Becton Dickinson, CDMX, México.) Discos de ensayo de 1.3 cm de diámetro se colocaron cuidadosamente sobre las placas de agar y se incubaron a  $37^\circ\text{C} \pm 1$  durante 24 h. La zona clara de inhibición se midió alrededor del disco y se restó el área del disco de película. Los resultados promedio se expresaron en mm.

## **1.4 RESULTADOS**

### **1.4.1 Caracterización de las películas biodegradables**

Se logró incorporar con éxito el ácido láctico solo o en combinación y la nisina en las películas biodegradables las cuales mostraron ser transparentes, con superficies lisas y libres de burbujas (Figura 1-1). La caracterización física y química para las películas elaboradas se muestra en el Cuadro 1-2. Se observó que al adicionar ácido láctico (aún en las películas combinadas T3 y T4) e incrementar su concentración aumenta el espesor, la solubilidad, la humedad y la WVP. Es probable que la reacción de reticulación aumente el movimiento de las moléculas, afectando las interacciones entre polímeros lo que incrementa la transmisión al vapor de agua. Resultados similares han sido reportados por Rangel-Marrón et al., 2019 y Rocha et al., 2014 en películas biodegradables que incorporan ácidos orgánicos.

Se considera útil determinar las propiedades mecánicas de las películas biodegradables para determinar su idoneidad en aplicaciones alimentarias. En este contexto, la película que contiene ácido láctico 3% (T3) muestra mejoras notables en las tales propiedades en 1.41 y 1.98 veces la TS y BF en comparación con la película sin antimicrobiano (T1).



**Figura 1-1.** Apariencia visual de las películas biodegradables que incorporan antimicrobianos.

Estudios recientes sugieren que la incorporación de ácidos orgánicos en películas elaboradas a partir de diferentes polisacáridos aumenta la fuerza de rotura debido a la reticulación (formación de enlace éster) (Gebresas et al., 2023).

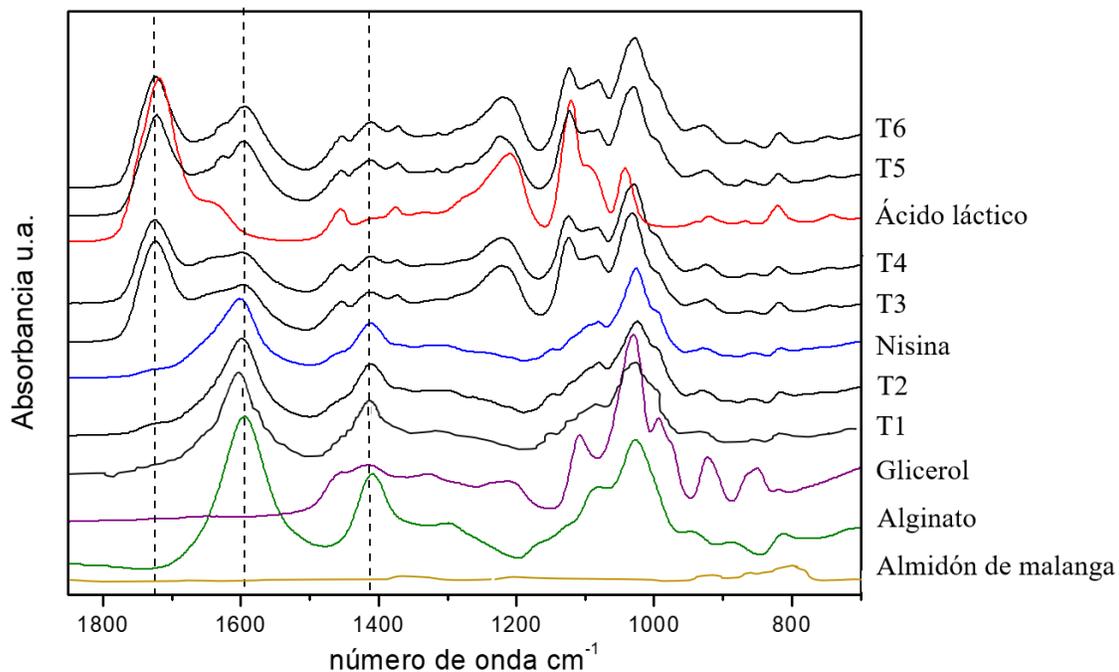
**Cuadro 1-2.** Caracterización física y química de las películas de almidón de malanga y alginato adicionadas con antimicrobianos.

| Tratamiento                          | Espesor (mm) | Humedad (%)  | Solubilidad (%) | WVP (g·mm/kPa·h·m <sup>2</sup> ) | Resistencia a la tracción (TS) (MPa) | Fuerza de rotura (BF) (MPa) |
|--------------------------------------|--------------|--------------|-----------------|----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| T1 Sin antimicrobiano                | 0.14 ± 0.00  | 26.26 ± 0.57 | 28.90 ± 1.36    | 1.068 ± 0.093                    | 7.90 ± 0.23                          | 22.24 ± 0.66                |
| T2 Nisina 2369 UI                    | 0.15 ± 0.00  | 28.25 ± 0.03 | 39.36 ± 2.09    | 1.741 ± 0.091                    | 5.50 ± 0.39                          | 16.59 ± 1.18                |
| T3 Nisina 2369 UI + ácido láctico 2% | 0.19 ± 0.00  | 36.21 ± 0.12 | 61.00 ± 1.60    | 2.406 ± 0.109                    | 2.62 ± 0.05                          | 18.59 ± 0.41                |
| T4 Nisina 2369 UI + ácido láctico 3% | 0.20 ± 0.02  | 37.82 ± 0.89 | 60.06 ± 1.01    | 2.5 ± 0.162                      | 4.06 ± 0.65                          | 16.82 ± 2.71                |
| T5 Ácido láctico 2%                  | 0.24 ± 0.02  | 41.52 ± 0.39 | 58.53 ± 0.11    | 2.314 ± 0.160                    | 5.91 ± 1.14                          | 19.85 ± 6.82                |
| T6 Ácido láctico 3%                  | 0.35 ± 0.02  | 39.17 ± 0.38 | 59.59 ± 0.78    | 2.938 ± 0.021                    | 11.15 ± 0.77                         | 44.18 ± 3.06                |

Los valores se expresan como media ± DE.

### 1.4.2 Caracterización estructural de las películas por FTIR

El análisis FTIR tuvo como objetivo determinar las alteraciones a nivel molecular inducidas por la incorporación de la nisina y el ácido láctico en las cadenas poliméricas. La Figura 1-2 muestra los espectros de absorción FTIR de los estándares (almidón de malanga, alginato, glicerol, nisina y ácido láctico) y de la estructura de las películas biodegradables elaboradas (T1-T6) en la región de 2000-700  $\text{cm}^{-1}$ . El alginato mostró picos distintivos en las regiones de 1597, 1404 y 1025  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden a las vibraciones de tensión asimétricos de los enlaces C-O, simétricos del grupo  $\text{COO}^-$  y del estiramiento antisimétrico de C-O-C, respectivamente. El almidón de malanga mostró bandas en 1145  $\text{cm}^{-1}$  afines a la flexión de enlaces C-OH de los grupos hidroxilo, mientras que las propiedades cristalinas y amorfas se asocian a bandas en 1076, 997 y 923  $\text{cm}^{-1}$ . El glicerol presentó una banda de deformación en la región de 1200-800  $\text{cm}^{-1}$ . Mostrando picos distintivos en 1125-1000, 930 y 850  $\text{cm}^{-1}$  relacionados con las vibraciones correspondientes a los enlaces CH-OH, C-O y O-O respectivamente.



**Figura 1-2.** Espectros FTIR para películas de almidón de malanga y alginato incorporadas con antimicrobianos y sus compuestos base.

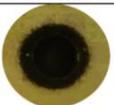
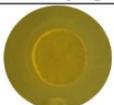
La nisina presentó bandas de absorción en la región de 1700-900  $\text{cm}^{-1}$ . Los picos a 1652, 1449 y 1033  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a los enlaces O-H y N-H de grupos amida, a la presencia de vibraciones de tensión simétricos del grupo COO- y la vibración de CH<sub>2</sub>-OH, respectivamente. El ácido láctico presentó bandas de absorción en la región de 1213-1048  $\text{cm}^{-1}$  estiramientos de -C-O- del grupo ácido y un pico característico en 1720 debido al estiramiento del grupo C=O. El espectro FTIR de T1 presentó bandas similares al del alginato y glicerol, por otra parte, T2-T6 presentaron similitud en sus bandas asociadas a la presencia de los compuestos base (alginato y glicerol), así como de la presencia o ausencia de nisina y ácido láctico en picos característicos.

### **1.4.3 Actividad antibacteriana *in vitro***

La actividad antibacteriana de las películas fue evaluada con tres bacterias asociadas comúnmente a alimentos, dos especies Gramnegativas (*E. coli* y *Salmonella*) y una grampositiva (*L. monocytogenes*) y las zonas de inhibición obtenidas se muestran en el Cuadro 1-3. La mayor inhibición de las tres bacterias estudiadas ocurrió en el T6. No se observó inhibición para el T1 y T2, ni el efecto mejorado de inhibición cuando se combinaron nisina y ácido láctico (T3 y T4) pues los valores obtenidos no eran superiores que los reportados para el T5 y T6. La acción antibacteriana de la nisina podría verse afectada por la interacción de sus moléculas con carga positiva y las moléculas disociadas del ácido láctico (Eswaranandam et al. 2004). Para los T3-T4 la actividad antibacteriana mejora cuando se aumenta la concentración del ácido láctico. La eficacia antibacteriana del ácido láctico se enfoca en que las moléculas del ácido penetran las membranas celulares hacia el citoplasma, donde sufren una disociación que provoca la acumulación de protones y en consecuencia una acidificación citoplasmática que afecta la célula en términos de gasto energético y bloqueo de la actividad enzimática (Shi et al, 2022).

Se observó mayor susceptibilidad para *E. coli* con zonas de inhibición que superan los 20 mm para todos los tratamientos excepto para la película sin antimicrobiano y con nisina 2369 UI. *E. coli* tiene flagelos fuera de su pared celular que permite mayor movilidad, igualmente posee fimbrias, lo cual demostró que la bacteria fue más absorbible a las películas (Jou et al. 2007).

**Cuadro 1-3.** Zona de inhibición basada en actividades antibacterianas de películas de almidón de malanga y alginato adicionadas con antimicrobianos.

| Tratamientos                         | Salmonella  | ZI             | E. coli   | ZI             | L. monocytogenes  | ZI             |
|--------------------------------------|---|----------------|---|----------------|---|----------------|
| T1 Sin antimicrobiano                |  | Sin inhibición |  | Sin inhibición |  | Sin inhibición |
| T2 Nisina 2369 UI                    |  | Sin inhibición |  | Sin inhibición |  | Sin inhibición |
| T3 Nisina 2369 UI + ácido láctico 2% |  | 15 ± 0.00      |  | 21 ± 0.00      |  | 12 ± 0.00      |
| T4 Nisina 2369 UI + ácido láctico 3% |  | 16.5 ± 0.7     |  | 26 ± 0.57      |  | 17 ± 0.00      |
| T5 Ácido láctico 2%                  |  | 17 ± 0.14      |  | 22.3 ± 1.15    |  | 15.5 ± 0.7     |
| T6 Ácido láctico 3%                  |  | 21 ± 0.0       |  | 26.5 ± 0.00    |  | 18.5 ± 0.7     |

Los valores se expresan como media ± DE. ZI: Zona de inhibición (mm).

Este estudio estuvo de acuerdo con Eswaranandam et al. (2004) quienes probaron una película de proteína de soja incorporada con nisina (205 UI) y ácido láctico al 2.6% confirmando que *S. gaminara* fue más susceptible al ácido láctico que *L. monocytogenes*. Adicionalmente la actividad antilisteria fue superior a la reportada por Pintado et al. (2009) en una película a base de aislado de proteína de suero con 3.0% de ácido láctico y 50 UI/mL de nisina la cual permitió zonas de inhibición de 2.14 mm. Otros estudios demuestran que la incorporación de ácidos orgánicos en películas ejerce actividad contra las tres bacterias estudiadas (Rocha et al., 2014; Sözbilen et al., 2022).

### 1.5 CONCLUSIONES

Se desarrollaron y caracterizaron muestras de películas de almidón de malanga y alginato de sodio utilizando antimicrobianos de origen bacteriano y como plastificantes agua y glicerol. Los resultados de la caracterización física y química revelaron que la combinación de ambos antimicrobianos y el aumento en la concentración del ácido láctico aumenta el espesor, la solubilidad, la humedad y WVP. El tratamiento T6 mostró los mejores valores para las pruebas

mecánicas medidas y así como excelente actividad antibacteriana; sin embargo, la WVP es notablemente afectada por la adición del 3% ácido láctico. Los espectros FTIR demostraron la presencia de la nisina y el ácido láctico en las cadenas poliméricas.

## 1.6 RECOMENDACIONES

Trabajos futuros sugieren la aplicación de las películas obtenidas en productos alimentarios de baja acidez y la evaluación del efecto antimicrobiano en parámetros de calidad e inocuidad para entender aún más la funcionalidad de las películas activas. Adicionalmente, se sugiere el estudio de la incorporación del ácido láctico en concentraciones que incluyan un rango más amplio y su interacción con los demás componentes de película (glicerol y materiales biopoliméricos) para obtener películas óptimas con propiedades de barrera mejoradas.

## 1.7 REFERENCIAS

- ASTM. 2017. ASTM E96. Standard test methods for water vapor transmission of materials. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- ASTM. 2018. ASTM D882-18. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- Bhatt, S. M. (2018). Economical lactic acid production and optimization strategies. En S. Kumar, P. Dheeran, M. Taherzadeh, & S. Khanal (Eds.), *Fungal Biorefineries* (pp. 85-105). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-90379-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-90379-8_5)
- 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
- Eswaranandam, S., Hettiarachchy, N. S., & Johnson, M. G. (2006). Antimicrobial activity of citric, lactic, malic, or tartaric acids and nisin-incorporated soy protein film against *listeria monocytogenes*, *escherichia coli* o157:h7, and *salmonella* gaminara. *Journal of Food Science*, 69(3), FMS79-FMS84. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb13375.x>
- Gebresas, G. A., Szabó, T., & Marossy, K. (2023a). Effects of acidity, number of hydroxyl group, and carbon chain length of carboxylic acids on starch cross-linking. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 6, 100354. <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2022.100354>
- Gharsallaoui, A., Oulahal, N., Joly, C., & Degraeve, P. (2016). Nisin as a food preservative: Part 1: physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses. *Critical Reviews in*

- Jou, C.-H., Lin, S.-M., Yun, L., Hwang, M.-C., Yu, D.-G., Chou, W.-L., Lee, J.-S., & Yang, M.-C. (2007a). Biofunctional properties of polyester fibers grafted with chitosan and collagen. *Polymers for Advanced Technologies*, 18(3), 235-239. <https://doi.org/10.1002/pat.866>
- Kirtonia, K., Salauddin, M., Bharadwaj, K. K., Pati, S., Dey, A., Shariati, M. A., Tilak, V. K., Kuznetsova, E., & Sarkar, T. (2021). Bacteriocin: A new strategic antibiofilm agent in food industries. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 36, 102141. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102141>
- Paul, S. K. (2020). Edible films and coatings for fruits and vegetables. En S. Hashmi & I. A. Choudhury (Eds.), *Encyclopedia of Renewable and Sustainable Materials* (pp. 363-376). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.11509-7>
- Pintado, C. M. B. S., Ferreira, M. A. S. S., & Sousa, I. (2009). Properties of whey protein-based films containing organic acids and nisin to control *listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 72(9), 1891-1896. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.9.189>
- 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>.
- Rocha, M. da, Loiko, M. R., Tondo, E. C., & Prentice, C. (2014). Physical, mechanical and antimicrobial properties of Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) protein films incorporated with organic acids. *Food Hydrocolloids*, 37, 213-220. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.017>
- Shi, Y., Pu, D., Zhou, X., & Zhang, Y. (2022). Recent progress in the study of taste characteristics and the nutrition and health properties of organic acids in foods. *Foods*, 11(21), 3408. <https://doi.org/10.3390/foods11213408>
- Sözbilen, G. S., Çavdaroğlu, E., & Yemenicioğlu, A. (2022). Incorporation of organic acids turns classically brittle zein films into flexible antimicrobial packaging materials. *Packaging Technology and Science*, 35(1), 81-95. <https://doi.org/10.1002/pts.2610>

## CAPÍTULO 2

### OPTIMIZACIÓN DE UNA PELÍCULA BIODEGRADABLE COMPUESTA DE ALGINATO DE SODIO/ ALMIDÓN DE TARO/ ÁCIDO LÁCTICO: EFECTO ANTIMICROBIANO EN UN PRODUCTO CÁRNICO.

#### 2.1 RESUMEN

Se desarrollaron películas biodegradables de almidón de taro, optimizando la concentración de alginato de sodio (ALG), glicerol (G) y ácido láctico (LA) mediante la metodología de superficie de respuesta. La película biodegradable optimizada (OBF) consistió en (1.05% ALG, 0.75% G, y 1.25% LA). La OBF mostró una permeabilidad al vapor de agua de  $1.05 \text{ g}\cdot\text{mm}/\text{kPa}\cdot\text{h}\cdot\text{m}^2$ . El LA en la OBF aumentó su elongación a la rotura en un 23.24%. La OBF mostró áreas de inhibición de  $5.81$  y  $5.00 \text{ cm}^2$  contra *E. coli* y *L. monocytogenes*, respectivamente. El envase activo en chorizo tipo español, suprimió el crecimiento de coliformes totales ( $<1 \text{ UFC/g}$ ), redujo mesófilos y BAL en  $\sim 1$  ciclo logarítmico durante 15 días a  $18 \pm 2$ . La OBF redujo el pH, pero no más de una unidad en comparación con las muestras sin y con envase; la dureza aumentó en el día 9. El uso de la OBF activada con LA mejora la estabilidad microbiana y la seguridad en la conservación del chorizo tipo español.

**Palabras clave:** Envase activo, producto cárnico, antimicrobiano, ácido láctico, preservación, optimización.

#### 2.2 INTRODUCCIÓN

Los problemas de seguridad alimentaria en la industria cárnica son una seria amenaza de salud pública y aún persiste como una preocupación común a nivel mundial (Horita et al., 2018). La contaminación en productos cárnicos se asocia principalmente con peligros microbianos, particularmente de bacterias patógenas como *L. monocytogenes*, *E. coli* O157: H7 y *Salmonella* (Warmate & Onarinde, 2023). Los impactos de estos brotes, impacta la confianza de los consumidores quienes demandan alimentos seguros como resultado de la mejora constante en la calidad de vida (Amin et al., 2022). El envasado activo ha surgido como una solución prometedora para abordar estos desafíos, al cumplir con funciones adicionales a las de protección convencional, pues está diseñado para garantizar la calidad, vida útil y seguridad de los alimentos (Guo et al., 2023).

Polímeros naturales como los polisacáridos representan una alternativa para producir películas biodegradables activas por su alta disponibilidad, biodegradabilidad y bajo costo. Gran variedad de polisacáridos se ha utilizado para desarrollar películas biodegradables como el alginato de sodio (Costa et al., 2018) y diversas fuentes de almidón de recursos naturales no convencionales. Entre la gran variedad de almidones, se aprecia que el almidón de taro permite la formación de películas con propiedades mecánicas y de barrera mejoradas (Shanmathy et al., 2021). El uso del almidón de taro en esta investigación se relaciona con la producción sostenible, disponibilidad local e importancia social y cultural.

Los esfuerzos recientes están dirigidos en mejorar las propiedades mecánicas, de barrera y antimicrobianas de las películas biodegradables activas con el uso de ingredientes o aditivos naturales como alternativa viable a los conservadores artificiales (Amin et al., 2022). El ácido láctico y sus sales pueden ser utilizados como antimicrobianos en productos cárnicos por su denominación GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro) (Horita et al., 2018). El mecanismo de acción del ácido láctico se basa en la acidificación citoplasmática provocada por un exceso de protones, perjudicial para la célula bacteriana (Shi et al., 2022). Varios estudios de películas biodegradables que incorporan ácidos orgánicos se han desarrollado (Pintado et al., 2009; Rocha et al., 2014), pero muy pocos incluyen al ácido láctico en la matriz de película (Manab et al., 2011, Pavoni et al., 2019, Sözbilen et al., 2022).

El objetivo del presente estudio fue optimizar, las concentraciones de alginato de sodio (ALG), glicerol (G) y ácido láctico (LA) para formar una película biodegradable óptima (OBF). Asimismo, caracterizar sus propiedades físicas, químicas, mecánicas, estructurales, de barrera, actividad antibacteriana *in vitro* y biodegradabilidad. Finalmente, evaluar el efecto antimicrobiano de la película biodegradable sobre parámetros microbiológicos y fisicoquímicos en un producto cárnico tipo chorizo español.

## **2.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.3.1 Cepas y condiciones de crecimiento bacteriano**

*E. coli*, *Salmonella* y *L. monocytogenes* fueron cultivadas en EMB (agar Eosina y Azul de metileno), SS (agar *Salmonella shigella*) y agar listeria a 35°C por 24 h. Las cepas se mantuvieron y almacenaron a -20°C. Todos los medios microbiológicos fueron obtenidos de Becton Dickinson (CDMX, México).

### 2.3.2 Preparación de las películas biodegradables

El almidón de taro (TAS) fue obtenido del Laboratorio de ciencias de los alimentos del Colegio de Postgraduados, ALG, G y cloruro de calcio fueron adquiridos de Meyer (CDMX, México) y el ácido láctico de Hebbe Cosmetics (CDMX, México). La película biodegradable basada en TAS, ALG, G y LA se preparó de acuerdo con el método descrito por Shanmathy et al. (2021) con algunas modificaciones, (Cuadro 2-1). Para inducir la gelatinización del TAS (0.5 g/100 mL), la mezcla se calentó gradualmente hasta 85°C bajo agitación constante por 30 min. Luego a la solución se le añadió de 0.75-1.5 g/100 mL de ALG y 0.5-1 g/100 mL de G manteniendo en agitación por 30 min a 70-75 °C. El homogenizado se dejó enfriar hasta alcanzar 60°C y se añadió de 1-3 mL/100 mL de LA bajo agitación por 20 min. Volúmenes de 35 mL de la solución filmogénica se depositó en placas de tereftalato de polietileno (100 x 15 mm), las cuales fueron secadas a 45 °C por 14 h. Se realizó entrecruzamiento polimérico con CaCl<sub>2</sub> al 1% p/v.

### 2.3.3 Diseño experimental

La metodología de superficie de respuesta (RSM) fue utilizada para estudiar los efectos de las variables independientes (ALG, G y LA) sobre las variables respuesta evaluadas: propiedades físicas (espesor), de barrera (humedad, solubilidad y WVP) y mecánicas (TS, BF y EAB) (Cuadro 2-1). Los rangos de las variables independientes fueron seleccionados en base a ensayos preliminares. Los experimentos se realizaron mediante el diseño Box-Behnken que generó 15 formulaciones experimentales aleatorias, con 3 repeticiones del punto central. El diseño experimental, el análisis de datos y el proceso de optimización se realizó mediante el software Design-Expert Versión 8.0 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA). Se ajustaron los datos experimentales a una ecuación polinomial de segundo orden, que describe el efecto de las variables independientes sobre las variables respuesta (Y) (1).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (1)$$

Donde Y es la variable respuesta;  $\beta_0$  es la intersección;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , y  $\beta_3$ , son los coeficientes de los términos lineales;  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$ , y  $\beta_{33}$ , son los coeficientes cuadráticos;  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$ , y  $\beta_{23}$  son los coeficientes de interacción; y  $X_1$ ,  $X_2$ , y  $X_3$  son las concentraciones de las variables independientes. Mediante el coeficiente de regresión lineal ( $R^2$ ) y la prueba de falta de ajuste se estableció la adecuación de las ecuaciones polinómicas para cada variable respuesta (**Anexo A1**;

**Eq.S1-S7**). Se realizaron transformaciones de raíz cuadrada cuando los residuos no mostraban normalidad, una falta significativa de ajuste. Se evaluó la significancia del modelo y de los términos mediante el análisis de superficie de respuesta del diseño experimental, manteniendo los términos significativos ( $p < 0.05$ ). Se generaron diagramas de superficie de respuesta para visualizar los efectos de las variables independientes sobre las variables respuesta, así como para inferir las condiciones óptimas.

## **2.3.4 Ensayos de caracterización**

### **2.3.4.1 Espesor, contenido de humedad, solubilidad y WVP**

El espesor de la película se midió con un micrómetro digital (Modelo MDC-1 "SB", AMES, EE. UU.). Se tomaron cinco mediciones en posiciones aleatorias de la película. El contenido de humedad y solubilidad en agua de las muestras de películas se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Rangel-Marrón et al. (2019). La WVP se determinó mediante el método de prueba estándar ASTM E96 (ASTM, 2016) por triplicado.

### **2.3.4.2 Propiedades mecánicas**

La resistencia a la tracción (TS), fuerza de rotura (BF) y elongación a la rotura (EAB) de las películas (50 x 20 mm) se evaluaron utilizando un texturómetro (Shimadzu EZ-SX) según el método ASTM D882-91 (ASTM, 2018) a una velocidad de tracción de 50 mm/min<sup>-1</sup>.

## **2.3.5 Optimización del modelo**

Para determinar la formulación óptima (ALG, G y LA) de la película biodegradable se realizó la optimización numérica de las variables respuestas (espesor y WPV) de mayor importancia para la funcionalidad deseable de las películas. El análisis numérico se definió para alcanzar valores mínimos de espesor y WPV. Las concentraciones óptimas de ALG, G y LA se predijeron en 1.04 g/100 mL, 0.75 g/100 mL y 1.25 mL/100 mL, respectivamente. Se consideró un control (CBF) basado en las concentraciones obtenidas para la OBF sin LA. Ambas películas se caracterizaron de acuerdo con la sección 2.3.5.1-2.3.5.3 (en la OBF para la validación experimental del modelo), en términos estructurales, actividad antibacteriana *in vitro* y biodegradabilidad.

### **2.3.5.1 Caracterización estructural**

#### **2.3.5.1.1 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)**

La estructura de la OBF y CBF se analizó con un espectrómetro FTIR (Thermo Scientific, iS50, Bruker, Vertex, Wisconsin, EE. UU.). Los espectros de FTIR (64 escaneos, resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$ ) se midieron en la región espectral de  $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$  por triplicado.

#### **2.3.5.1.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Las microestructuras superficiales de las películas OBF y CBF se observaron mediante microscopía electrónica de barrido Quanta FEG 250 (FEI, Oregon, EUA)  $10.0\text{ kV}$ .

#### **2.3.5.2 Actividad antibacteriana *in vitro***

La actividad antibacteriana de las películas se evaluó por el método de Kirby-Bauer contra las bacterias *E. coli*, *Salmonella* y *L. monocytogenes* según la metodología descrita por Sözbilen et al. (2022). Los resultados se expresaron de acuerdo con el área de inhibición observado en  $\text{cm}^2$ .

#### **2.3.5.3 Biodegradabilidad**

La prueba de biodegradabilidad de las películas se realizó de acuerdo con Medina et al. (2016). Muestras de película de  $20\text{ mm}$  de diámetro, fueron enterradas a  $1\text{ cm}$  de profundidad en charolas que contenían composta orgánica ( $\text{pH } 5.8 \pm 0.05$ ), las cuales se mantuvieron a temperatura ambiente y en condiciones aeróbicas por  $60$  días.

### **2.3.6 Elaboración y envasado de muestras de chorizo tipo español**

La pechuga de pollo (*Pectoralis major*) y la grasa se compró en un mercado local. La formulación consistió en  $70\%$  de carne de pollo y  $30\%$  de grasa y una unidad comercial de aditivos. La carne y la grasa se trituró con cedazos de  $3/8''$  y  $3/16''$ , respectivamente, y se mezclaron manualmente con el resto de los ingredientes (Día 0). La mezcla se dejó reposar a  $5-7\text{ }^\circ\text{C}$  durante  $24\text{ h}$  para permitir la incorporación de todos los ingredientes. El envasado consideró muestras de chorizo ( $13\text{ g}$ ) sin película (T1), envueltas completamente con la CBF (T2) y OBF (T3). El proceso de fermentación y secado se llevó cabo en condiciones climáticas naturales ( $18 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ ). Los análisis fisicoquímicos y microbiológicos se llevaron a cabo a los  $0,3,6,9,12$  y  $15$  días de almacenamiento.

### **2.3.6.1 Análisis fisicoquímico**

Los valores de humedad, pH y acidez titulable fueron determinados bajo las normas internacionales establecidas por la AOAC, 2005. La pérdida de peso se calculó con un porcentaje de peso inicial registrando las pérdidas de peso en las muestras individuales durante el almacenamiento. La actividad de agua ( $a_w$ ) se obtuvo utilizando un equipo (AquaLAB, Pawkit, EE. UU) con control interno de temperatura a 25 °C, previamente calibrando. Se calculó la dureza (Kg) a partir del análisis de perfil de textura (TPA), utilizando un texturómetro (Shimadzu EZ-SX) equipado con una celda de carga de 500 N. Se realizó una doble compresión con 50% de deformación a una velocidad de 2 mm s<sup>-1</sup>, en muestras de 30 x 18 x 12 mm en muestras sin película.

### **2.3.6.2 Análisis microbiológico**

Muestras representativas de chorizo tipo español (10 g) de cada tratamiento, se homogenizó en 90 mL de agua peptonada al 0.1% p/v durante 1 min. La mezcla se utilizó para preparar diluciones en serie. Las poblaciones de bacterias aeróbicas mesofílicas totales (TMAB), microorganismos coliformes totales (TCM) y *Salmonella* se determinaron mediante vertido en placa en TGEA (agar triptona glucosa extracto de levadura), RVBA (agar bilis rojo violeta) y SS (agar *Salmonella shigella*) incubadas a 35°C por 24-48 h. Se utilizó agar MRS para el recuento de bacterias ácido lácticas totales (TLAB), a 35°C en condiciones anaeróbicas por 72 h. Los resultados fueron expresados como unidades formadoras de colonias por g de muestra (UFC/g).

### **2.3.6.3 Análisis estadístico**

Se utilizó un ANOVA factorial para analizar los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos. Las diferencias significativas fueron comparadas con la prueba de Tukey utilizando un nivel de significancia de 0.05, utilizando el software MINITAB 17 (Minitab Inc., State College, PA, EE.UU.)

## 2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.4.1. Ensayos de caracterización

#### 2.4.1.1 Espesor, humedad, solubilidad y WVP

El espesor es un factor intrínseco que influye principalmente en la WVP y propiedades mecánicas de las películas biodegradables. Los valores de espesor de las películas oscilaron entre 0.116 y 0.248 mm (Cuadro 2-1). La Figura 2-1 (a-c) muestran que el aumento en la concentración de LA y ALG aumenta el espesor. El término cuadrático de la concentración de ALG y la interacción ALG-LA (Cuadro 2-2) afectan significativamente ( $p < 0.05$ ) el espesor de las películas. Por otro lado, la calidad de los alimentos envasados es afectada por el nivel de humedad del envase. En este caso, el contenido de humedad se situó entre 28.03 y 57.51% (Cuadro 2-1) y se observa que un aumento en la cantidad de G y LA incrementa la humedad de las películas (Figura 2-1 (d-f)). El término cuadrático de LA (Cuadro 2-2) afecta significativamente ( $p < 0.05$ ) el contenido de humedad. Cuando la concentración de glicerol aumenta se crea un ambiente de alta humedad relacionado con los grupos hidroxilo del plastificante dando paso a la unión de moléculas de agua dentro de la matriz de las películas a través de enlaces de hidrógeno (Ben et al., 2022).

La solubilidad de las películas se encontró entre 44.723 y 61.478% (Cuadro 2-1). En los gráficos de superficie 3D el punto más alto (Figura 2-1 (h)), se observa utilizando la mayor cantidad de LA y G. Este parámetro se ve afectado significativamente ( $p < 0.05$ ) por los términos cuadráticos del ALG y LA (Cuadro 2-2). El aumento de la concentración de glicerol ocasiona una modificación de la red molecular de los polímeros al alterarse con enlaces hidrogeno, aumentando la solubilidad de las películas. Costa et al. (2018) indicaron valores similares de solubilidad en películas de alginato al 1-1.5%.

**Cuadro 2-1.** Variables respuesta del Diseño Box-Behnken con diferentes niveles de glicerol, alginato de sodio y ácido láctico en la formulación de películas biodegradables.

| Valores codificados |    |    |    | Variables independientes |                |                | Variables dependientes (Respuestas) |              |                 |                                  |                                      |                             |                                  |
|---------------------|----|----|----|--------------------------|----------------|----------------|-------------------------------------|--------------|-----------------|----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| Run                 | X1 | X2 | X3 | G (g/100 mL)             | ALG (g/100 mL) | LA (mL/100 mL) | Espesor (mm)                        | Humedad (%)  | Solubilidad (%) | WVP (g·mm/kPa·h·m <sup>2</sup> ) | Resistencia a la tracción (TS) (MPa) | Fuerza de rotura (BF) (MPa) | Elongación a la rotura (EAB) (%) |
| 1                   | 0  | 0  | 0  | 0.75                     | 1.125          | 2              | 0.15 ± 0.01                         | 44.46 ± 0.26 | 52.93 ± 0.82    | 1.01 ± 0.02                      | 7.43 ± 0.62                          | 23.34 ± 1.96                | 25.97 ± 2.16                     |
| 2                   | 0  | 1  | 1  | 0.75                     | 1.5            | 3              | 0.24 ± 0.01                         | 43.92 ± 1.83 | 54.87 ± 0.83    | 1.25 ± 0.19                      | 6.31 ± 0.24                          | 31.31 ± 1.17                | 25.80 ± 1.14                     |
| 3                   | 0  | -1 | -1 | 0.75                     | 0.75           | 1              | 0.11 ± 0.00                         | 44.34 ± 1.39 | 44.72 ± 1.07    | 0.97 ± 0.04                      | 6.23 ± 0.19                          | 14.46 ± 0.43                | 20.68 ± 1.54                     |
| 4                   | 1  | 0  | 0  | 1                        | 1.5            | 2              | 0.19 ± 0.00                         | 44.83 ± 0.91 | 54.97 ± 0.39    | 1.19 ± 0.15                      | 9.88 ± 0.35                          | 37.64 ± 1.21                | 35.22 ± 1.00                     |
| 5                   | -1 | -1 | 0  | 0.5                      | 0.75           | 2              | 0.14 ± 0.00                         | 46.44 ± 1.17 | 48.54 ± 1.21    | 1.05 ± 0.16                      | 4.35 ± 0.19                          | 12.62 ± 0.54                | 13.34 ± 0.55                     |
| 6                   | -1 | 0  | -1 | 0.5                      | 1.125          | 1              | 0.19 ± 0.00                         | 28.03 ± 0.31 | 47.16 ± 2.83    | 0.48 ± 0.09                      | 10.77 ± 1.07                         | 25.30 ± 1.97                | 34.68 ± 3.15                     |
| 7                   | 0  | 1  | -1 | 0.75                     | 1.5            | 1              | 0.15 ± 0.00                         | 33.45 ± 0.09 | 48.78 ± 0.78    | 0.72 ± 0.03                      | 15.96 ± 1.17                         | 48.47 ± 0.82                | 53.38 ± 0.29                     |
| 8                   | 1  | 0  | 1  | 1                        | 1.125          | 3              | 0.19 ± 0.01                         | 50.92 ± 1.11 | 61.47 ± 1.11    | 1.71 ± 0.08                      | 4.17 ± 0.04                          | 15.98 ± 0.45                | 14.13 ± 1.07                     |
| 9                   | 0  | -1 | 1  | 0.75                     | 0.75           | 3              | 0.17 ± 0.00                         | 57.51 ± 1.18 | 51.80 ± 1.06    | 1.73 ± 0.18                      | 2.44 ± 0.30                          | 8.74 ± 1.08                 | 9.88 ± 1.04                      |
| 10                  | 1  | -1 | 0  | 1                        | 0.75           | 2              | 0.15 ± 0.00                         | 53.83 ± 0.72 | 54.80 ± 0.95    | 1.37 ± 0.22                      | 3.70 ± 0.04                          | 11.47 ± 0.14                | 13.16 ± 0.50                     |
| 11                  | 0  | 0  | 0  | 0.75                     | 1.125          | 2              | 0.16 ± 0.00                         | 46.09 ± 0.66 | 51.59 ± 1.86    | 0.90 ± 0.01                      | 7.24 ± 0.33                          | 23.21 ± 1.12                | 25.43 ± 3.75                     |
| 12                  | -1 | 1  | 0  | 0.5                      | 1.5            | 2              | 0.18 ± 0.00                         | 40.82 ± 0.72 | 49.00 ± 0.56    | 0.70 ± 0.08                      | 11.25 ± 0.47                         | 43.15 ± 3.22                | 42.23 ± 0.93                     |
| 13                  | -1 | 0  | 1  | 0.5                      | 1.125          | 3              | 0.19 ± 0.01                         | 52.96 ± 1.40 | 50.88 ± 0.57    | 1.29 ± 0.07                      | 4.76 ± 0.04                          | 18.49 ± 0.39                | 16.90 ± 1.90                     |
| 14                  | 1  | 0  | -1 | 1                        | 1.125          | 1              | 0.14 ± 0.00                         | 46.10 ± 0.75 | 47.20 ± 0.81    | 1.19 ± 0.16                      | 7.22 ± 0.56                          | 23.72 ± 1.70                | 14.90 ± 1.10                     |
| 15                  | 0  | 0  | 0  | 0.75                     | 1.125          | 2              | 0.17 ± 0.00                         | 46.45 ± 1.62 | 52.04 ± 1.51    | 1.13 ± 0.05                      | 7.12 ± 0.24                          | 23.47 ± 1.74                | 26.00 ± 3.27                     |

Nota: Los valores se expresan como media ± DE (n = 3). WVP: permeabilidad al vapor de agua.

**Cuadro 2-2.** Coeficientes de regresión,  $R^2$ , y falta de ajuste para los modelos reducidos para las películas biodegradables.

| Películas biodegradables      |                      |                      |                      |  |  |                                   |  |
|-------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--|--|-----------------------------------|--|
|                               | Espesor<br>(mm)      | Humedad<br>(%)       | Solubilidad<br>(%)   | Permeabilidad al<br>vapor de agua<br>(WVP)<br>(g·mm/kPa·h·m <sup>2</sup> ) | Resistencia<br>a la tracción<br>(TS) (MPa) | Fuerza de<br>rotura (BF)<br>(MPa) | Elongación<br>a la rotura<br>(EAB) (%) |
| Transformación                | Ninguna              | Ninguna              | Ninguna              | Ninguna  | Raíz<br>cuadrada                           | Raíz<br>cuadrada                  | Raíz<br>cuadrada                       |
| X <sub>0</sub>                | 0.1631               | 45.6698              | 52.1901              | 1.0202   | 2.69                                       | 4.83                              | 5.07                                   |
| <b>Lineal</b>                 |                      |                      |                      |  |  |                                   |  |
| X <sub>1</sub>                | 0.0056 <sup>a</sup>  | 3.4289 <sup>a</sup>  | 2.8573 <sup>a</sup>  | 0.2423 <sup>a</sup>  | -0.1384 <sup>a</sup>                       | -0.1324 <sup>a</sup>              | -0.3704 <sup>a</sup>                   |
| X <sub>2</sub>                | 0.0237 <sup>a</sup>  | -4.8889 <sup>a</sup> | 0.9704 <sup>a</sup>  | -0.1577 <sup>a</sup>   | 0.6169 <sup>a</sup>                        | 1.45 <sup>a</sup>                 | 1.23 <sup>a</sup>                      |
| X <sub>3</sub>                | 0.0337 <sup>a</sup>  | 6.6726 <sup>a</sup>  | 3.8970 <sup>a</sup>  | 0.3270 <sup>a</sup>  | -0.5198 <sup>a</sup>                       | -0.4770 <sup>a</sup>              | -0.6892 <sup>a</sup>                   |
| <b>Cuadrático</b>             |                      |                      |                      |  |  |                                   |  |
| X <sub>1</sub> X <sub>1</sub> | -0.0030              | 0.2563               | 0.6371               | 0.0336   | -0.0806 <sup>a</sup>                       | -0.0997 <sup>a</sup>              | -0.3806 <sup>a</sup>                   |
| X <sub>2</sub> X <sub>2</sub> | 0.0093 <sup>a</sup>  | 0.5575               | -0.9965 <sup>a</sup> | 0.0302   | 0.0130                                     | 0.1800 <sup>a</sup>               | 0.2354 <sup>a</sup>                    |
| X <sub>3</sub> X <sub>3</sub> | 0.0032               | -1.4199 <sup>a</sup> | -1.1445 <sup>a</sup> | 0.1211 <sup>a</sup>  | -0.0671 <sup>a</sup>                       | -0.1814 <sup>a</sup>              | -0.2910 <sup>a</sup>                   |
| <b>Interacción</b>            |                      |                      |                      |  |  |                                   |  |
| X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> | -0.0014              | -0.8462              | -0.0748              | 0.0442   | -0.0127                                    | -0.0666                           | -0.1350                                |
| X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> | -0.0070 <sup>a</sup> | -5.0250 <sup>a</sup> | 2.6383 <sup>a</sup>  | -0.0720  | 0.1137 <sup>a</sup>                        | -0.0360                           | 0.4192 <sup>a</sup>                    |
| X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> | 0.0064 <sup>a</sup>  | -0.6748              | -0.2486              | -0.0560  | -0.1361 <sup>a</sup>                       | -0.1288 <sup>a</sup>              | -0.2057 <sup>a</sup>                   |
| R <sup>2</sup>                | 0.9347               | 0.9609               | 0.9062               | 0.9043   | 0.9775                                     | 0.9893                            | 0.9471                                 |
| Falta de ajuste (p)           | 0.6706               | 0.2498               | 0.4248               | 0.4704   | 0.0237 <sup>a</sup>                        | 0.0197 <sup>a</sup>               | 0.0067 <sup>a</sup>                    |

Nota:<sup>1</sup> X<sub>0</sub>: término de intercepción, X<sub>1</sub>: Glicerol (G) (g/100 mL), X<sub>2</sub>: Alginato de sodio (ALG) (g/100 mL), X<sub>3</sub>: Ácido láctico (LA) (mL/100 mL).<sup>2</sup> <sup>a</sup> Significativo ( $p < 0.05$ ).

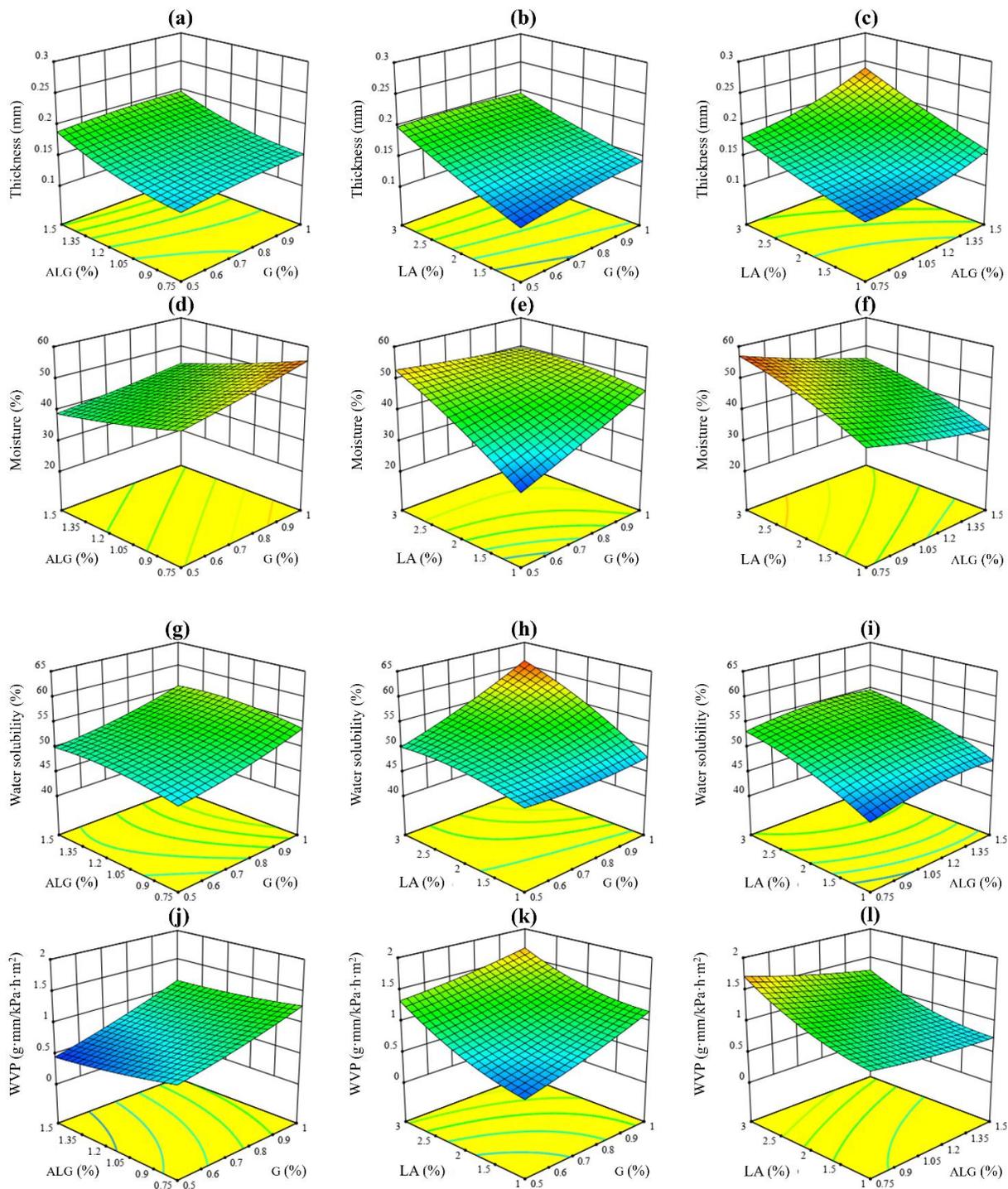
En el envasado de alimentos la WVP permite el movimiento del vapor de agua a través de las películas evitando la condensación de agua que puede ser una fuente para el crecimiento microbiano no deseado. Los valores de WVP de las películas se encontraron en un rango de 0.488 y 1.734 g·mm/kPa·h·m<sup>2</sup> (Cuadro 2-1). De acuerdo con los gráficos Figura 2-1 (j-l) se logran los valores más altos de WVP a mayor cantidad de LA y G. La WVP es afectada significativamente ( $p < 0.05$ ) por el término cuadrático de LA (Cuadro 2-2). El efecto plastificante del LA se consideró como la razón de encontrar valores elevados de WVP (Cagri et

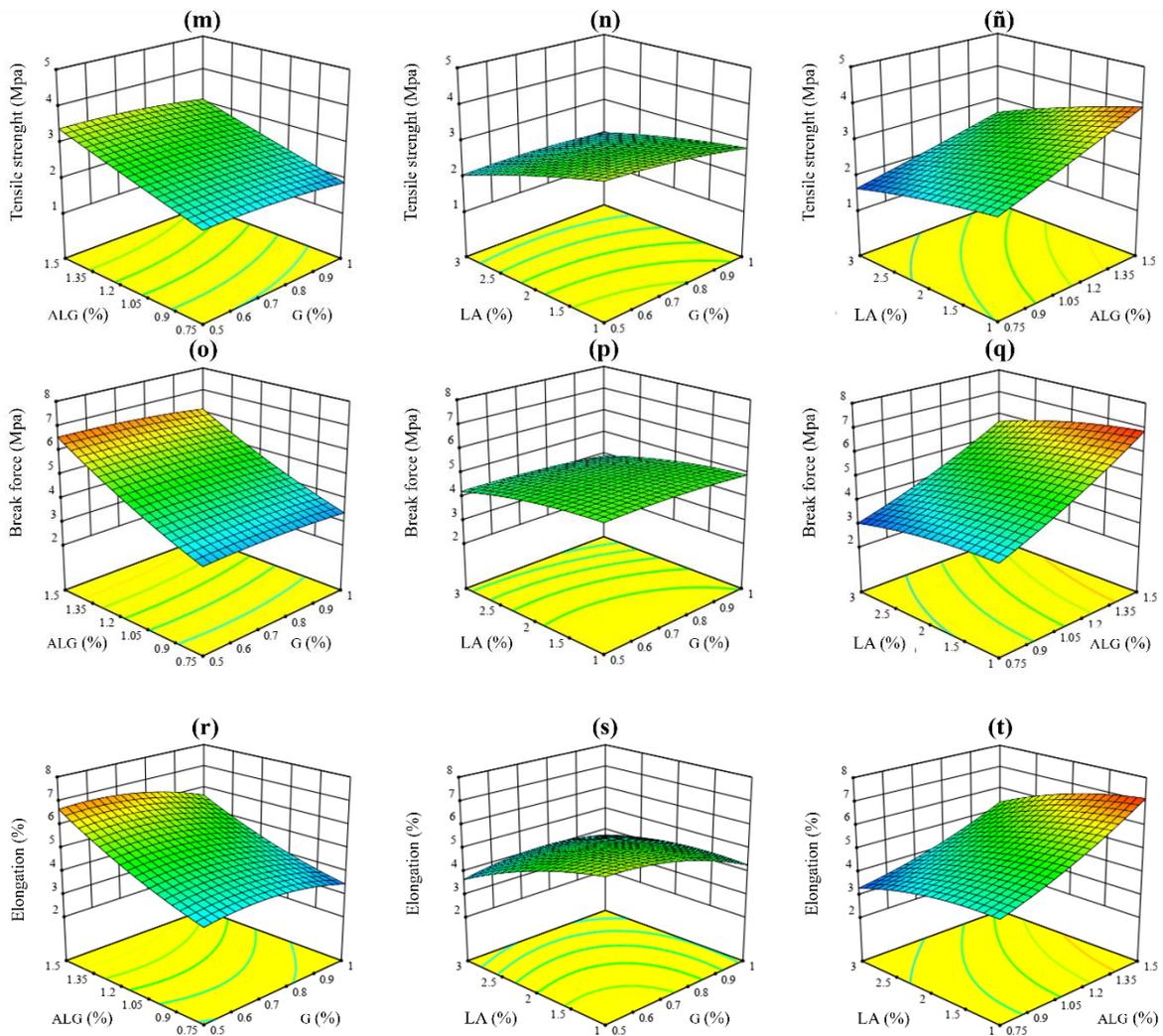
al., 2010, Sözbilen et al., 2022). Nandi y Guha, (2021) reportaron valores similares de WVP en películas adicionadas con diferentes ácidos orgánicos. Adicionalmente, la naturaleza hidrofílica del glicerol permite el ensanchamiento de la red de almidón incrementando el coeficiente de difusión de humedad (Ben et al., 2022). La WVP en las películas también depende de la relación hidrófila-hidrófoba de los polímeros formadores de película, grado de entrecruzamiento, plastificante y agente antimicrobiano (Garavand et al., 2017). En general, todas las variables respuestas evaluadas se ven afectadas significativamente ( $p < 0.05$ ) por los términos lineales de la concentración de G, ALG y LA y por la interacción G-LA a excepción de la WVP y la TS (Cuadro 2-2).

#### **2.4.1.2 Propiedades mecánicas**

El material de embalaje debe ser resistir la tensión mecánica y prevenir la integridad del alimento durante el envío, manipulación y almacenamiento. Los valores más altos obtenidos para la EAB, TS y BF fueron 53.38%, 15.96 y 48.47 Mpa (Cuadro 2-1). La Figura 2-1 (m-t) sugiere que cuando se aumenta la concentración de ALG se obtienen los valores máximos en todas las pruebas. El resumen del modelo (Cuadro 2-2) muestra que los términos cuadráticos de G y LA y la interacción ALG-LA ejercen un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre las propiedades mecánicas. Algunos autores también informaron que la adición de diferentes ácidos orgánicos en la formulación de películas con diferentes biopolímeros aumenta la BF y EAB, pero disminuye la TS (Nandi y Guha, 2021, Gebresas et al., 2023).

Los valores de TS podrían ser atribuidos a la reticulación covalente por LA y adicionalmente a la reticulación iónica con  $\text{CaCl}_2$  que sugieren interacciones moleculares y enlaces hidrógeno fuertes. Costa et al. (2018) reportaron mejores propiedades mecánicas para la reticulación iónica con  $\text{CaCl}_2$  en una película de alginato plastificada con glicerol en comparación con la reticulación covalente en películas de alginato con ácidos orgánicos diseñadas por Singh et al. (2020).





**Figura 2-1.** Diagramas de superficie de respuesta 3D para diseño de Box-Behnken que muestran los efectos de alginato de sodio (ALG), glicerol (G) y ácido láctico (LA), sobre las variables respuestas: espesor (a-c), humedad (d-f), solubilidad en agua (g-i), permeabilidad al vapor de agua (WVP) (j-l), resistencia a la tracción (TS) (m-ñ), fuerza de rotura (BF) (o-q) y elongación a la rotura (EAB) (r-t) de las películas biodegradables manteniendo la tercera variable independiente en su valor medio.

## 2.4.2 Caracterización de la OBF

Las concentraciones óptimas de las variables independientes fueron 1.04 g/100 mL ALG, 0.75 g/100 mL G y 1.25 mL/100 mL LA, con un valor de deseabilidad de 0.77. Los valores de las variables respuestas predichas por el programa fueron comparables con los valores experimentales obtenidos (Cuadro 2-3), indicando que el modelo es idóneo para predecir eficientemente las características deseables de la película biodegradable.

**Cuadro 2-3.** Valores fisicoquímicos experimentales de la optimización numérica de la película biodegradable optimizada (OBF).

| <b>Criterio</b>                      | <b>Meta</b> | <b>Limite</b> | <b>Valor predicho<sup>a</sup></b> | <b>Valor experimental<sup>a</sup></b> | <b>CBF</b>    |
|--------------------------------------|-------------|---------------|-----------------------------------|---------------------------------------|---------------|
| Espesor (mm)                         | Minimizar   | 0.11 - 0.25   | 0.13                              | 0.14 ± 0.004                          | 0.094 ± 0.00  |
| WVP (g·mm/kPa·h·m <sup>2</sup> )     | Minimizar   | 0.38 - 1.94   | 0.87                              | 1.05 ± 0.07                           | 0.818 ± 0.040 |
| Humedad (%)                          | -           | -             | 40.894                            | 40.97 ± 0.45                          | 14.43 ± 1.24  |
| Solubilidad (%)                      | -           | -             | 48.309                            | 49.99 ± 1.11                          | 54.25 ± 2.1   |
| Resistencia a la tracción (TS) (MPa) | -           | -             | 7.84                              | 6.71 ± 0.17                           | 8.221 ± 0.65  |
| Fuerza de rotura (BF) (MPa)          | -           | -             | 22.09                             | 22.07 ± 0.42                          | 14.27 ± 1.13  |
| Elongación a la rotura EAB (%)       | -           | -             | 26.01                             | 23.24 ± 1.39                          | -             |
| Deseabilidad                         |             |               | 0.77                              |                                       |               |

Nota: Los valores se expresan como media ± DE (n=3). Película biodegradable control (CBF); permeabilidad al vapor de agua (WVP). <sup>a</sup> Valores predichos y experimentales expresados en las magnitudes originales.

La apariencia visual de CBF y OBF se muestran en la Figura 2-2. El espesor, la WVP y solubilidad de la OBF son similares a la literatura citada en películas que incorporan diferentes ácidos orgánicos (Rocha et al., 2014, Rangel-Marrón et al., 2019). La BF para la OBF fue 1.54 veces mayor que la CBF, como resultado de las reticulaciones iónica y covalente.

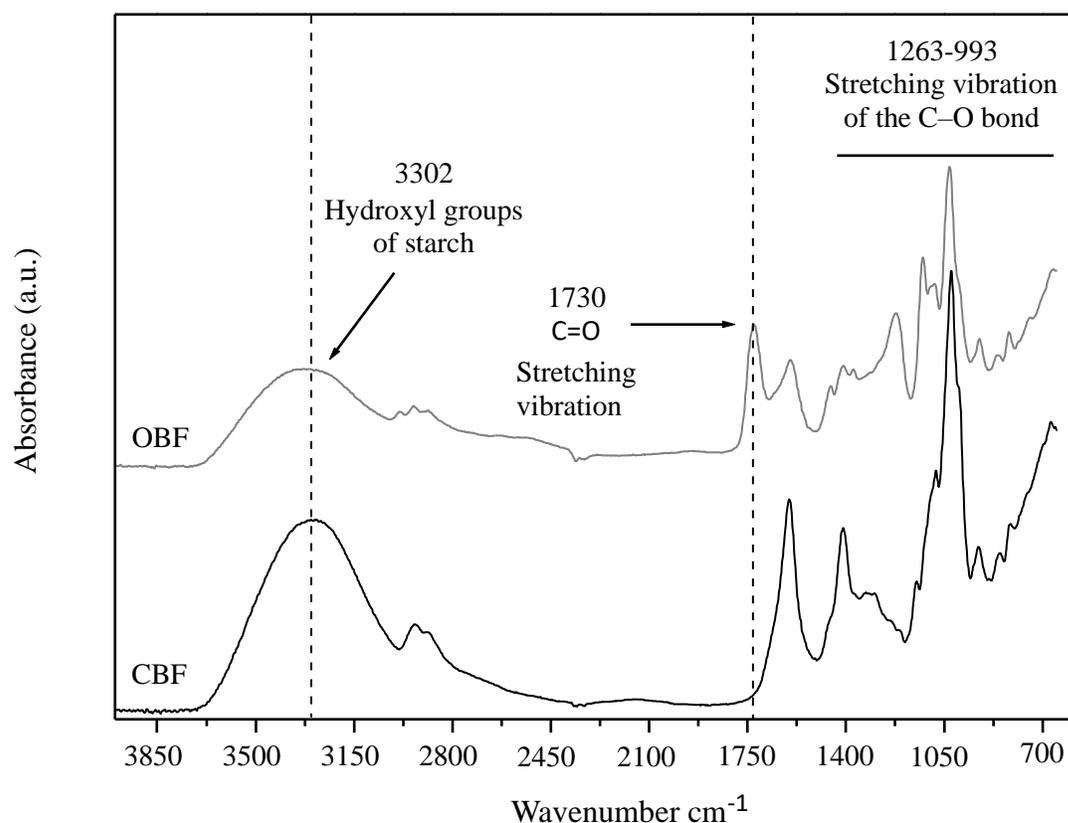


**Figura 2-2.** Apariencia visual de las películas elaboradas a base de almidón de taro (TAS), alginato de sodio (ALG) y glicerol (G). **a.** Película biodegradable control (CBF) y **b.** Película biodegradable optimizada (OBF).

La ausencia de EAB en la CBF sugiere que la inclusión de LA en la OBF actúa como plastificante. Este efecto se debe a la formación de enlaces éster entre los grupos  $-\text{COOH}$  de LA y los grupos  $-\text{OH}$  de TAS y ALG, confirmado por FTIR (Figura 2-3). Además, la difusión efectiva de LA en la matriz de la película se atribuye a su bajo peso molecular (90.08 g/mol), lo que se confirmó mediante una EAB del 23.24%. Resultados similares fueron reportados por Pavoni et al. (2019) y Sözbilen et al. (2022) en películas compuestas.

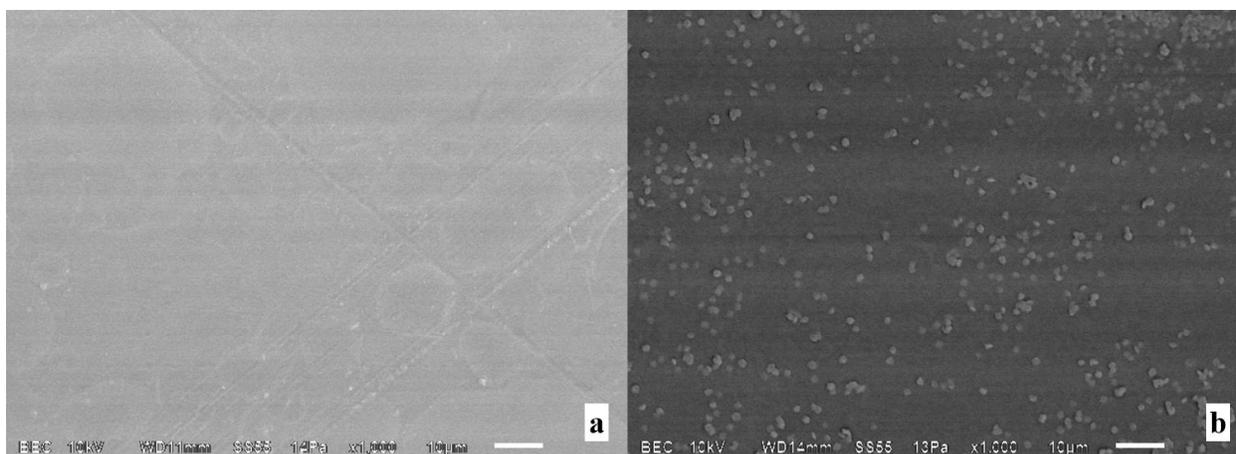
#### **2.4.2.1 Caracterización estructural**

Los espectros FTIR comparativos de la OBF y CBF se muestran en la Figura 2-3. Las muestras mostraron una amplia banda de absorción superior a  $3000\text{ cm}^{-1}$  debido a la vibración de estiramiento de los enlaces O-H y N-H. La banda ancha  $3296$  y  $3337\text{ cm}^{-1}$  se asigna a los grupos OH del almidón. La aparición de un pico característico en el FTIR de OBF a  $1730\text{ cm}^{-1}$  se atribuye a las bandas C=O causadas por la formación de enlaces éster que confirma la reacción de reticulación. La ausencia de este pico en CBF indica que la reticulación es causada por la reacción de LA y TAS-ALG.



**Figura 2-3.** Espectros FTIR de la película biodegradable control (CBF) y película biodegradable optimizada (OBF).

La morfología superficial de la CBF y OBF se presentan en la Figura 2-4. La CBF mostró una superficie homogénea, lisa y uniforme sin agregados lo que indica que TAS y ALG demuestran compatibilidad física; mientras que el efecto del LA en la OBF mantiene una estructura similar, pero con pequeños agregados sobre la superficie. Un estudio similar SEM reveló que los agregados pueden explicarse por la presencia de  $\text{CaCl}_2$  en la estructura de la película y el modelado de caja de huevos provocada por interacciones entre moléculas de alginato y iones  $\text{Ca}^{2+}$  (Costa et al., 2018).



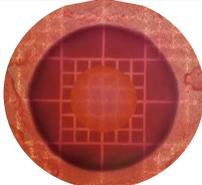
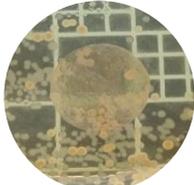
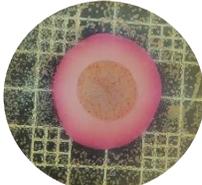
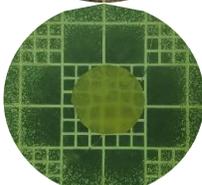
**Figura 2-4.** Micrografías SEM de la superficie de la película biodegradable control CBF (a) y la película biodegradable optimizada OBF (b), (ampliación 1000x).

#### 2.4.2.2 Actividad antibacteriana *in vitro*

Las zonas claras de inhibición indicaron notables propiedades antibacterianas (Cuadro 2-4). La OBF mostró un mayor efecto inhibitorio contra *E. coli* y *L. monocytogenes* con áreas de inhibición de  $5.81 \pm 0.49$  y  $5.00 \pm 0.71$  cm<sup>2</sup>, respectivamente, mientras que para *Salmonella* fue de  $3.42 \pm 0.83$  cm<sup>2</sup>. El efecto bacteriostático de la OBF fue atribuido al LA debido a que la CBF no causó ningún efecto sobre los microorganismos patógenos usados como indicadores. Resultados similares fueron reportados por Sözbilen et al. (2022) usando películas de zeína y LA al 3%. De igual modo, la acción inhibitoria de una película a base de proteína de suero con LA al 5% fue mayor frente a *E. coli* comparado con *Salmonella* (Manab et al., 2011).

Se considera que los ácidos orgánicos afectan las células bacterianas por dos mecanismos principales: acidificación citoplasmática y la acumulación del anión disociado a niveles tóxicos (Shi et al., 2022). Alakomi et al. (2000) informó que el LA permeabilizó las membranas de *E. coli* y *Salmonella* y liberó porciones de lipopolisacáridos de la membrana externa. La actividad antibacteriana se ve afectada por las diferentes composiciones de membrana celular entre bacterias gram-negativas y gram-positivas. No se observó inhibición en la CBF.

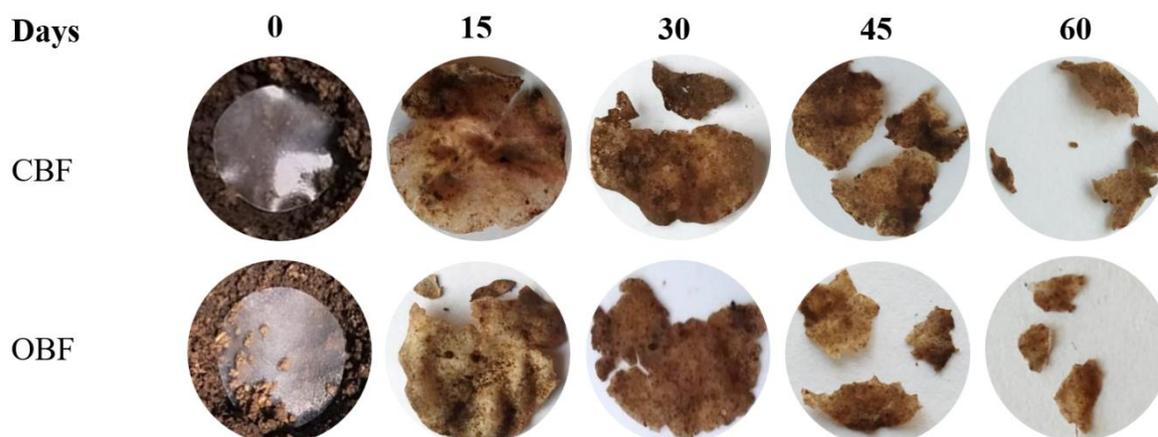
**Cuadro 2-4.** Actividad antibacteriana de película biodegradable control (CBF) y película biodegradable optimizada (OBF) por el método de difusión en agar.

| Bacteria                | CBF   | OBF  | Área de inhibición (cm <sup>2</sup> ) |
|-------------------------|---|--|---------------------------------------|
| <i>E. coli</i>          |  |  | 5.81 ± 0.49                           |
| <i>Salmonella</i>       |  |  | 3.42 ± 0.83                           |
| <i>L. monocytogenes</i> |  |  | 5.00 ± 0.71                           |

Los valores se expresan como media ± DE.

### 2.4.2.3 Biodegradabilidad

La biodegradación de la OBF y CBF se observó hasta el día 15 con cambios en la integridad de las películas (aparición quebradiza), rugosidad y formación de grietas. El final del proceso ocurrió casi en su totalidad después del día 60 (Figura 2-5). Resultados similares se observaron para una película de quitosano con LA al 1% (Pavoni et al., 2019). La tasa de biodegradación es controlada por diversos factores como la composición de la película, concentración microbiana, condiciones ambientales (temperatura, oxígeno, pH, luz, humedad) (Shaikh et al., 2021). Los resultados obtenidos proponen que la OBF y su control son biodegradables ya que 90% de las películas se biodegradaron antes de 180 días (ISO, 2021).



**Figura 2-5.** Apariencia visual: de las películas elaboradas a base de almidón de taro (TAS), alginato de sodio (ALG) y glicerol (G). **a.** Película biodegradable control (CBF) y **b.** Película biodegradable optimizada (OBF) sometidas a la prueba de biodegradabilidad.

### 2.4.3 Análisis en muestras de chorizo tipo español

#### 2.4.3.1 Análisis fisicoquímico

Las muestras envasadas de chorizo tipo español con la OBF (T3) y con CBF (T2) y sin recubrir (T1) se muestran en la Figura 2-6 y los resultados de los parámetros fisicoquímicos obtenidos para los tratamientos durante el almacenamiento se muestran en la Cuadro 2-5. El contenido de humedad inicial (día 0) para todos los tratamientos fue de  $71.37\% \pm 0.95$  y disminuyó significativamente durante el almacenamiento hasta alcanzar una humedad promedio de  $19.05 \pm 0.24$  al día 15. La disminución de humedad de las muestras puede asociarse con la actividad de las enzimas proteolíticas sobre las proteínas hasta la obtención de aminoácidos libres resultando en su incapacidad para retener humedad (Mahdavi et al., 2018).

La pérdida de peso (%) mostró diferencias significativas entre tratamientos. Se registró un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en la pérdida de peso para los T2 y T3 durante los primeros 9 días de almacenamiento, el envasado con película permitió una liberación gradual de las moléculas de agua libre, contrariamente, la ausencia de película en el T1 permitió la mayor liberación de agua libre en el día 6 de almacenamiento. No existieron diferencias significativas al

final del periodo de almacenamiento. La pérdida de peso puede verse comprometida por las condiciones de humedad relativa del ambiente durante el tiempo de almacenamiento (Amjadi et al., 2019), lo que también provoca cambios de gradiente en la actividad de agua ( $a_w$ ). El valor inicial de  $a_w$  al día 0 fue de  $0.976 \pm 0.00$  los cuales decrecieron hacia el final del almacenamiento en todos los tratamientos. No se encontraron diferencias significativas entre los T2 y T3 durante los 12 días de almacenamiento. El descenso de pH también reduce la actividad de agua, ya que el pH cárnico se acerca o iguala el punto isoeléctrico de las principales proteínas cárnicas (Hui et al., 2005).



**Figura 2-6.** Envasado del chorizo tipo español, T1 (muestras sin envasar) (a-e); T2 (muestras recubiertas con la película biodegradable control (CBF) (f-j); T3 (muestras recubiertas con la película biodegradable optimizada (OBF) (k-n), durante el almacenamiento (3, 6, 9, 12 y 15 días).

El chorizo tipo español antes de ser envasado tenía un pH inicial de  $5.87 \pm 0.02$ . Los valores de pH de todas las muestras disminuyeron durante los primeros 12 días de almacenamiento. El pH de las muestras envasadas con el T3 mostró valores de pH significativamente ( $p < 0.05$ ) más bajos, en comparación con los demás tratamientos. La presencia de sales, la disminución de la actividad de agua ( $a_w$ ) y supresión de  $O_2$  permiten a las bacterias ácido-lácticas tolerantes a la sal producir ácido láctico disminuyendo el pH entre 4.5 y 5.5 (Demeyer y Stahnke, 2002). El porcentaje de acidez titulable se encontró en un rango de 0.14-0.028% entre los tratamientos. Los resultados mostraron que hubo un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) para el T3 a partir del día 3.

La disminución del pH y el aumento de la acidez titulable en el T3 se asocian principalmente con la presencia de LA en la OBF, la velocidad de liberación del antimicrobiano y el volumen del sistema alimentario. Por otro lado, en términos de textura, el T3 alcanzó su máxima dureza a los 9 días, sin embargo, hacia el final del almacenamiento no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos.

El aumento observado en las muestras envasadas con el OBF podría estar relacionado con la disminución del pH de las muestras por debajo del punto isoeléctrico de la proteína muscular lo que indica una solubilización proteica mayor, resultando en chorizos más firmes (González-Fernández et al., 2006). Durante la fermentación, la disminución del pH afecta la formación de la dureza, mientras que la textura posterior, que se desarrolla durante el proceso de secado depende únicamente de la pérdida de agua (Demeyer y Stahnke, 2002). La dureza aumenta bruscamente cuando los valores de pH alcanzan 5.4 y aumenta de forma gradual hasta valores de 4.9 (Rödel, 1985).

**Cuadro 2-5.** Parámetros fisicoquímicos en chorizo tipo español envasado con película biodegradable optimizada (OBF; T3), película biodegradable control (CBF; T2) y sin recubrir (T1).

| Muestra                     | Almacenamiento (Días)        |                              |                             |                             |                             |
|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                             | 3                            | 6                            | 9                           | 12                          | 15                          |
| <b>Humedad (%)</b>          |                              |                              |                             |                             |                             |
| T1                          | 68.358 ± 0.73 <sup>a</sup>   | 55.536 ± 1.31 <sup>c</sup>   | 29.679 ± 1.15 <sup>f</sup>  | 19.626 ± 0.32 <sup>ij</sup> | 18.274 ± 0.21 <sup>j</sup>  |
| T2                          | 64.748 ± 1.18 <sup>b</sup>   | 48.854 ± 0.35 <sup>d</sup>   | 27.27 ± 1.50 <sup>g</sup>   | 22.323 ± 0.50 <sup>h</sup>  | 18.955 ± 0.23 <sup>j</sup>  |
| T3                          | 63.228 ± 0.45 <sup>b</sup>   | 44.281 ± 0.28 <sup>e</sup>   | 26.578 ± 0.79 <sup>g</sup>  | 21.510 ± 0.30 <sup>hi</sup> | 19.932 ± 0.34 <sup>ij</sup> |
| <b>Pérdida de peso (%)</b>  |                              |                              |                             |                             |                             |
| T1                          | 3.766 ± 0.09 <sup>h</sup>    | 39.601 ± 0.28 <sup>a</sup>   | 32.049 ± 0.21 <sup>c</sup>  | 9.541 ± 0.02 <sup>f</sup>   | 2.138 ± 0.08 <sup>i</sup>   |
| T2                          | 1.689 ± 0.03 <sup>i</sup>    | 28.938 ± 0.49 <sup>d</sup>   | 36.302 ± 0.37 <sup>b</sup>  | 8.916 ± 0.15 <sup>f</sup>   | 2.109 ± 0.27 <sup>i</sup>   |
| T3                          | 1.375 ± 0.09 <sup>i</sup>    | 28.062 ± 0.49 <sup>e</sup>   | 38.973 ± 0.14 <sup>a</sup>  | 6.479 ± 0.45 <sup>g</sup>   | 1.783 ± 0.02 <sup>i</sup>   |
| <b><i>a<sub>w</sub></i></b> |                              |                              |                             |                             |                             |
| T1                          | 0.97 ± 0.00 <sup>a</sup>     | 0.94 ± 0.01 <sup>c</sup>     | 0.80 ± 0.01 <sup>e</sup>    | 0.66 ± 0.01 <sup>ij</sup>   | 0.64 ± 0.01 <sup>k</sup>    |
| T2                          | 0.96 ± 0.01 <sup>a,b</sup>   | 0.91 ± 0.01 <sup>d</sup>     | 0.78 ± 0.01 <sup>f</sup>    | 0.69 ± 0.01 <sup>g,h</sup>  | 0.65 ± 0.00 <sup>j,k</sup>  |
| T3                          | 0.95 ± 0.00 <sup>b,c</sup>   | 0.90 ± 0.01 <sup>d</sup>     | 0.77 ± 0.01 <sup>f</sup>    | 0.70 ± 0.01 <sup>g</sup>    | 0.68 ± 0.01 <sup>h,i</sup>  |
| <b>pH</b>                   |                              |                              |                             |                             |                             |
| T1                          | 5.36 ± 0.03 <sup>a</sup>     | 5.26 ± 0.01 <sup>b</sup>     | 5.18 ± 0.02 <sup>c</sup>    | 5.06 ± 0.03 <sup>d</sup>    | 5.12 ± 0.02 <sup>c</sup>    |
| T2                          | 5.29 ± 0.02 <sup>b</sup>     | 4.97 ± 0.01 <sup>e</sup>     | 4.91 ± 0.02 <sup>f</sup>    | 4.86 ± 0.01 <sup>f</sup>    | 5.0 ± 0.00 <sup>d,e</sup>   |
| T3                          | 4.27 ± 0.01 <sup>g</sup>     | 4.25 ± 0.04 <sup>g</sup>     | 4.16 ± 0.04 <sup>h</sup>    | 4.15 ± 0.01 <sup>h</sup>    | 4.18 ± 0.01 <sup>h</sup>    |
| <b>Acidez titulable (%)</b> |                              |                              |                             |                             |                             |
| T1                          | 0.014 ± 0.00 <sup>g</sup>    | 0.018 ± 0.00 <sup>f</sup>    | 0.021 ± 0.00 <sup>d</sup>   | 0.024 ± 0.00 <sup>c</sup>   | 0.023 ± 0.00 <sup>c</sup>   |
| T2                          | 0.014 ± 0.00 <sup>g</sup>    | 0.019 ± 0.00 <sup>f</sup>    | 0.020 ± 0.00 <sup>e,f</sup> | 0.020 ± 0.00 <sup>d,e</sup> | 0.021 ± 0.00 <sup>d,e</sup> |
| T3                          | 0.018 ± 0.00 <sup>f</sup>    | 0.020 ± 0.00 <sup>d,e</sup>  | 0.025 ± 0.00 <sup>b</sup>   | 0.025 ± 0.00 <sup>b</sup>   | 0.028 ± 0.00 <sup>a</sup>   |
| <b>Dureza (Kg)</b>          |                              |                              |                             |                             |                             |
| T1                          | 10.855 ± 1.14 <sup>e</sup>   | 11.723 ± 1.79 <sup>d,e</sup> | 34.094 ± 1.21 <sup>b</sup>  | 53.787 ± 0.30 <sup>a</sup>  | 54.353 ± 0.16 <sup>a</sup>  |
| T2                          | 10.801 ± 1.15 <sup>e</sup>   | 18.132 ± 2.23 <sup>c</sup>   | 38.057 ± 3.20 <sup>b</sup>  | 54.571 ± 0.28 <sup>a</sup>  | 54.759 ± 0.06 <sup>a</sup>  |
| T3                          | 15.687 ± 0.69 <sup>c,d</sup> | 16.975 ± 1.70 <sup>c</sup>   | 54.566 ± 0.16 <sup>a</sup>  | 54.824 ± 0.13 <sup>a</sup>  | 54.818 ± 0.17 <sup>a</sup>  |

Nota: Los valores se expresan como media ± DE (n=3). Medias en la misma columna que no comparten una letra (a, b, c, d) son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

### 2.4.3.2 Análisis Microbiológico

Las películas de envasado enriquecidas con antimicrobianos pueden garantizar la calidad y seguridad de los productos alimenticios. La acción protectora de OBF sobre chorizo tipo español durante 15 días de almacenamiento refrigerado y su efecto sobre la calidad microbiológica se muestran en la Cuadro 2-6. Los recuentos iniciales de TCM, TMAB y TLAB en el día 0 fueron  $2.66 \pm 0.02$ ,  $5.83 \pm 0.022$ ,  $5.94 \pm 0.057$  log UFC/g, respectivamente.

**Cuadro 2-6.** Evolución de los recuentos microbianos en muestras de chorizo tipo español envasado con película biodegradable optimizada (OBF; T3), película biodegradable control (CBF; T2) y sin recubrir (T1).

| Muestra                                   | Almacenamiento (Días) |                       |                       |                       |                        |
|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| <b>TCM</b><br>(log UFC g <sup>-1</sup> )  | 3                     | 6                     | 9                     | 12                    | 15                     |
| T1  | $3.87 \pm 0.00^a$     | $3.50 \pm 0.05^b$     | $3.55 \pm 0.03^b$     | $2.57 \pm 0.08^d$     | $3.23 \pm 0.05^c$      |
| T2  | $3.58 \pm 0.04^b$     | $3.62 \pm 0.03^b$     | $3.34 \pm 0.10^c$     | $2.39 \pm 0.02^e$     | $2.46 \pm 0.081^{d,e}$ |
| T3  | <1 <sup>f</sup>        |
| <b>TMAB</b><br>(log UFC g <sup>-1</sup> ) |                       |                       |                       |                       |                        |
| T1  | $9.76 \pm 0.02^a$     | $8.27 \pm 0.05^b$     | $7.84 \pm 0.04^c$     | $8.01 \pm 0.02^{c,d}$ | $7.88 \pm 0.01^{d,e}$  |
| T2  | $9.62 \pm 0.03^a$     | $8.04 \pm 0.02^{c,d}$ | $8.27 \pm 0.06^b$     | $7.66 \pm 0.11^f$     | $8.07 \pm 0.02^c$      |
| T3  | $6.64 \pm 0.04^h$     | $6.86 \pm 0.02^g$     | $6.48 \pm 0.03^{h,i}$ | $6.34 \pm 0.10^i$     | $6.64 \pm 0.04^h$      |
| <b>TLAB</b><br>(log UFC g <sup>-1</sup> ) |                       |                       |                       |                       |                        |
| T1  | $7.66 \pm 0.01^e$     | $8.25 \pm 0.07^a$     | $7.89 \pm 0.05^{c,d}$ | $8.01 \pm 0.01^{b,c}$ | $7.91 \pm 0.01^{c,d}$  |
| T2  | $7.85 \pm 0.01^{c,d}$ | $8.17 \pm 0.08^{a,b}$ | $8.24 \pm 0.03^a$     | $7.75 \pm 0.06^{d,e}$ | $8.13 \pm 0.02^{a,b}$  |
| T3  | $6.62 \pm 0.04^g$     | $6.89 \pm 0.02^f$     | $6.39 \pm 0.05^h$     | $6.54 \pm 0.10^{g,h}$ | $6.59 \pm 0.09^g$      |

Nota: Los valores se expresan como la media  $\pm$  DE (n=3). Medias en la misma columna que no comparten una letra (a, b, c, d) son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ). TMAB: Bacterias aeróbicas mesofílicas totales, TLAB: Bacterias ácido-lácticas totales, TCM: Microorganismos coliformes totales.

En muestras de chorizo tipo español el envase activo (T3) no permitió el crecimiento de microorganismos coliformes totales ( $<1$  UFC/g) y redujo la población de mesófilos y bacterias lácticas en aproximadamente un ciclo logarítmico durante los 15 días de almacenamiento a  $18 \pm 2$  °C. Este efecto inhibitorio podría ser atribuido a la presencia de LA en las películas debido a que las muestras control envasada presentaron recuentos microbianos similares al control sin envasar. Similarmente, otros sistemas de envasado activo usando sustancias antimicrobianas naturales como los ácidos orgánicos fueron eficientes retrasando el deterioro microbiano en los productos cárnicos (Horita et al., 2018).

La supervivencia del recuento de TCM en los T1 y T2 podría estar asociada a los tejidos animales, contaminación durante el proceso de matanza y despiece de las canales, la mayoría de los microorganismos de esta familia se encuentra en el tracto gastrointestinal de los animales (Troeger y Woltersdorf, 1989). La concentración de TCM en la mezcla de pechuga de pollo y grasa de cerdo (sin aditivos) fue de  $4.162 \pm 4.162$  y  $4.674 \pm 4.675$  log UFC/g, respectivamente (datos no mostrados). El recuento de *Enterobacteriaceae* en chorizo de cebolla elaborado industrialmente se encontró entre 2 y 3 log UFC/g entre la segunda y tercera semana de almacenamiento (Castaño et al., 2002), los cuales son similares a los obtenidos para el T1 y T2.

Los resultados medios de TMAB se encontraron en un rango de  $6.349 \pm 0.102$  -  $9.768 \pm 0.026$  log UFC/g y para TLAB de  $8.255 \pm 0.073$  -  $6.398 \pm 0.052$  log UFC/g. Se observó una reducción significativa ( $p < 0.05$ ) de más 1 log<sub>10</sub> UFC/g para el T3 en comparación con los T1 y T2 durante todo el almacenamiento en ambos grupos bacterianos. Recuentos similares fueron reportados por Prado et al. (2019) y Fonseca et al. (2013) en muestras de chorizo asturiano y chorizo gallego respectivamente, con tiempos de muestreo similares. No se detectó *Salmonella* en ninguna de las muestras analizadas. La aplicación del T3 en muestras de chorizo tipo español inhibió eficazmente el recuento de TCM durante el almacenamiento; por tanto, se confirma que la OBF puede prolongar la vida útil y garantizar la seguridad del producto alimentario.

## 2.5. CONCLUSIONES

Los efectos individuales e interactivos de ALG, G y LA fueron evaluados como materiales de formación de películas biodegradables. La aplicación de un diseño de Box-Behnken, permitió la OBF con el menor espesor, WVP y buenas propiedades antibacterianas con 1.04% ALG, 0.75% G, y 1.25% LA. Se observó que el aumento en la concentración LA incrementó el espesor, humedad, solubilidad y WVP. No obstante, mejoró la EAB. El espectro FTIR confirmó la reticulación covalente del TAS con el LA. Las micrografías SEM evidenciaron que el LA se incorpora estructuralmente en la matriz TAS y ALG, mediante microestructuras lisas que indican adecuada compatibilidad. La OBF indicó importante actividad antibacteriana contra las bacterias: *E. Coli*, *Salmonella* y *L. monocytogenes*. La OBF y CBF mostraron la capacidad de degradarse en el suelo, calificando como materiales biodegradables. Se observó en el T3 la inhibición del recuento de TCM, lo cual sugiere que podría extender la vida útil del alimento. La OBF presenta un alto potencial para el desarrollo como sistema de envasado activo en productos cárnicos fermentados y alimentos con baja acidez. No obstante, es importante considerar los desafíos tecnológicos que puedan surgir durante el envasado. Estudios futuros sugieren enfocarse en la relación entre el mecanismo de liberación y rendimiento de los compuestos antimicrobianos para prolongar la vida útil de productos cárnicos fermentados.

### **Declaración del autor de CRediT**

**Hernández-Nolasco:** Redacción-borrador original, Conceptualización, Investigación, Escritura -revisión y edición. **Hidalgo-Contreras:** Metodología, Revisión y edición. **Ríos-Corripio:** Recursos, Revisión y edición. **Haydeé-Castellano:** Conceptualización, Revisión y edición. **Hernández-Cázares:** Conceptualización, Investigación, Revisión y edición.

### **Declaración de intereses**

Los autores declaran que no tienen intereses financieros o relaciones personales contradictorias conocidos que podrían haber parecido influir en el trabajo reportado en este documento.

## Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el Colegio de Postgraduados y el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT).

## 2.6 LITERATURA CITADA

- Alakomi, H.-L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., & Helander, I. M. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2001-2005. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.2001-2005.2000>
- Amin, U., Khan, M. K. I., Maan, A. A., Nazir, A., Riaz, S., Khan, M. U., Sultan, M., Munekata, P. E. S., & Lorenzo, J. M. (2022). Biodegradable active, intelligent, and smart packaging materials for food applications. *Food Packaging and Shelf Life*, 33, 100903. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100903>
- Amjadi, S., Emaminia, S., Heyat Davudian, S., Pourmohammad, S., Hamishehkar, H., & Roufegarinejad, L. (2019). Preparation and characterization of gelatin-based nanocomposite containing chitosan nanofiber and ZnO nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 216, 376-384. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.062>
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2005. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists international. Maryland, USA.
- ASTM. 2017. ASTM E96. Standard test methods for water vapor transmission of materials. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- ASTM. 2018. ASTM D882-18. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- Ben, Z. Y., Samsudin, H., & Yhaya, M. F. (2022). Glycerol: Its properties, polymer synthesis, and applications in starch based films. *European Polymer Journal*, 175, 111377. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111377>.
- Cagri, A., Ustunol, Z., & Ryser, E. T. (2001). Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible films containing p-aminobenzoic or sorbic acids. *Journal of Food Science*, 66(6), 865-870. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb15188.x>
- Castaño, A., García Fontán, M. C., Fresno, J. M., Tornadijo, M. E., & Carballo, J. (2002). Survival of *Enterobacteriaceae* during processing of Chorizo de cebolla, a Spanish fermented sausage. *Food Control*, 13(2), 107-115. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(01\)00089-5](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(01)00089-5)

- Costa, M. J., Marques, A. M., Pastrana, L. M., Teixeira, J. A., Sillankorva, S. M., & Cerqueira, M. A. (2018). Physicochemical properties of alginate-based films: Effect of ionic crosslinking and mannuronic and guluronic acid ratio. *Food Hydrocolloids*, 81, 442-448. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.014>
- Demeyer, D., & Stahnke, L. (2002). Quality control of fermented meat products. *Meat Processing* (pp. 359-393). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781855736665.3.359>
- Fonseca, S., Ivette Ouoba, L. I., Franco, I., & Carballo, J. (2013). Use of molecular methods to characterize the bacterial community and to monitor different native starter cultures throughout the ripening of Galician chorizo. *Food Microbiology*, 34(1), 215-226. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.12.006>
- Garavand, F., Rouhi, M., Razavi, S. H., Cacciotti, I., & Mohammadi, R. (2017). Improving the integrity of natural biopolymer films used in food packaging by crosslinking approach: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 687-707. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.093>
- Gebresas, G. A., Szabó, T., & Marossy, K. (2023). A comparative study of carboxylic acids on the cross-linking potential of corn starch films. *Journal of Molecular Structure*, 1277, 134886. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.134886>
- González-Fernández, C., Santos, E. M., Rovira, J., & Jaime, I. (2006). The effect of sugar concentration and starter culture on instrumental and sensory textural properties of chorizo-Spanish dry-cured sausage. *Meat Science*, 74(3), 467-475. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.04.019>
- Guo, M., Zhang, X., & Jin, T. Z. (2023). Active food packaging. Reference Module in Food Science. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822521-9.00078-2>
- Horita, C. N., Baptista, R. C., Caturla, M. Y. R., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., & Sant'Ana, A. S. (2018). Combining reformulation, active packaging and non-thermal post-packaging decontamination technologies to increase the microbiological quality and safety of cooked ready-to-eat meat products. *Trends in Food Science & Technology*, 72, 45-61. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.12.003>
- Hui, Y. H., Guerrero Legarreta, I., & Rosmini, M. R. (2005). *Ciencia y tecnología de carnes*. LIMUSA.
- ISO (International Organization for Standardization IPlastics). 2021. ISO 17088. Organic recycling Specifications for compostable plastics. ISO 17088:2021, Plastics Organic recycling Specifications for compostable plastics
- Mahdavi, V., Hosseini, S. E., & Sharifan, A. (2018). Effect of edible chitosan film enriched with anise (*pimpinella anisum* l.) essential oil on shelf life and quality of the chicken burger. *Food Science & Nutrition*, 6(2), 269-279. <https://doi.org/10.1002/fsn3.544>

- Manab, A, Sawitri, E, M., Awwaly, A., U, K., Purnomo, & H. (2011). Antimicrobial activity of whey protein based edible film incorporated with organic acids. *African Journal of Food Science*, 5(1), 6-11. <https://doi.org/10.5897/AJFS.9000018>
- Medina J.C., Gutiérrez, T. J., Goyanes, S., Bernal, C., & Famá, L. (2016). Biodegradability and plasticizing effect of yerba mate extract on cassava starch edible films. *Carbohydrate Polymers*, 151, 150-159. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.025>
- Nandi, S., & Guha, P. (2021). Organic acid-compatibilized potato starch/guar gum blend films. *Materials Chemistry and Physics*, 268, 124714. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2021.124714>
- Pavoni, J. M. F., Luchese, C. L., & Tessaro, I. C. (2019). Impact of acid type for chitosan dissolution on the characteristics and biodegradability of cornstarch/chitosan based films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 138, 693-703. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.089>
- Pintado, C. M. B. S., Ferreira, M. A. S. S., & Sousa, I. (2009). Properties of whey protein-based films containing organic acids and nisin to control *listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 72(9), 1891-1896. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.9.1891>
- Prado, N., Sampayo, M., González, P., Lombó, F., & Díaz, J. (2019). Physicochemical, sensory and microbiological characterization of Asturian Chorizo, a traditional fermented sausage manufactured in Northern Spain. *Meat Science*, 156, 118-124. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.05.023>
- 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. *LWT*, 101, 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.005>
- Rocha, M. da, Loiko, M. R., Tondo, E. C., & Prentice, C. (2014). Physical, mechanical and antimicrobial properties of Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) protein films incorporated with organic acids. *Food Hydrocolloids*, 37, 213-220. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.017>
- Rödel W. (1985). Rohwurstreifung: Klima und andere Einflussgrößen in: Mikrobiologie und Qualität von Rohwurst und Rohschinken, *Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbacher Reihe*, 5, 60–84.
- Shaikh, S., Yaqoob, M., & Aggarwal, P. (2021). An overview of biodegradable packaging in food industry. *Current Research in Food Science*, 4, 503-520. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.07.005>
- Shanmathy, M., Mohanta, M., & Thirugnanam, A. (2021). Development of biodegradable bioplastic films from Taro starch reinforced with bentonite. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2, 100173. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100173>

- Shi, Y., Pu, D., Zhou, X., & Zhang, Y. (2022). Recent progress in the study of taste characteristics and the nutrition and health properties of organic acids in foods. *Foods*, 11(21), 3408. <https://doi.org/10.3390/foods11213408>
- Singh, P., Baisthakur, P., & Yemul, O. S. (2020). Synthesis, characterization and application of crosslinked alginate as green packaging material. *Heliyon*, 6(1), e03026. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03026>
- Sözbilen, G. S., Çavdaroğlu, E., & Yemenicioğlu, A. (2022). Incorporation of organic acids turns classically brittle zein films into flexible antimicrobial packaging materials. *Packaging Technology and Science*, 35(1), 81-95. <https://doi.org/10.1002/pts.2610>
- Troeger, K. and W. Woltersdorf (1989). Measurement of the stress of the pigs during the sacrifice. *Fleischwirtsch*, Spanish. 2:3-8.
- Warmate, D., & Onarinde, B. A. (2023). Food safety incidents in the red meat industry: A review of foodborne disease outbreaks linked to the consumption of red meat and its products, 1991 to 2021. *International Journal of Food Microbiology*, 398, 110240. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110240>

## CONCLUSIONES GENERALES

La metodología del diseño Box-Behnken permitió establecer las concentraciones óptimas de las variables independientes las cuales consistieron en 1.04 g/100 mL de alginato de sodio, 0.75 g/100 mL de glicerol y 1.25 mL/100 mL de ácido láctico, con un valor de deseabilidad de 0.77. Se observó que el aumento en la concentración de ácido láctico resultó en una mayor permeabilidad al vapor de agua, solubilidad, humedad y espesor. No obstante, mejoró la elongación a la rotura, debido a su capacidad plastificante y eficiente difusión en la matriz de película.

La película optimizada y su control calificaron como materiales biodegradables. El espectro FTIR de la película optimizada comprobó la efectividad de la reticulación covalente del almidón de taro y alginato de sodio con el ácido láctico, mientras que las micrografías SEM mostraron superficies lisas, indicando una adecuada compatibilidad entre los componentes de la película. La película optimizada demostró buena actividad antibacteriana contra *E. coli*, *Salmonella* y *L. monocytogenes*.

Tras aplicar la película optimizada en muestras de chorizo tipo español, se evidenció una limitación tecnológica al observar una rápida acidificación (ocurrída por la migración del LA) de las muestras cárnicas que afectó su textura. No obstante, se observó que la película optimizada tiene un efecto inhibitorio sobre los microorganismos coliformes en el chorizo tipo español durante su almacenamiento, sugiriendo que podría extender la vida útil del alimento. No obstante, es importante considerar los desafíos tecnológicos que puedan surgir al aplicar el envasado de películas biodegradables activas en otros alimentos con características diferentes.

Por lo tanto, se concluye que el punto de predicción valida la capacidad predictiva del modelo, considerándolo apropiado para predecir eficientemente las características deseables de la película biodegradable.

## RECOMENDACIONES GENERALES

- Estudiar la relación del mecanismo de liberación y el rendimiento de los compuestos antimicrobianos en la prolongación de la vida útil de chorizo tipo español.
- Evaluar sensorialmente el producto con la finalidad de optimizar el proceso de la película biodegradable y considerar la aceptación de los consumidores.
- Evaluar el efecto antibacteriano de la película biodegradable optimizada en muestras de chorizo tipo español inoculadas a diferentes concentraciones bacterianas (*E. coli*, *Salmonella* y *L. monocytogenes*), para entender el funcionamiento de los procesos de inactivación e inhibición y optimizar su uso.
- Realizar un estudio enfocado en el desarrollo de la textura del chorizo tipo español envasado con la película biodegradable óptima, considerando factores como su composición, tamaño y las condiciones de fermentación y secado. Esta propuesta tiene como objetivo encontrar soluciones innovadoras para superar la limitación tecnológica identificada en este estudio y mejorar la calidad del producto final.
- Explorar la capacidad de la película biodegradable optimizada como material de envasado activo en alimentos de baja acidez para identificar oportunidades específicas de aplicación en la industria alimentaria y así mejorar su eficiencia.

## ANEXO A.

### A1. ECUACIONES

Se ajustaron los datos experimentales a una ecuación polinomial de segundo orden, que describe el efecto de las variables independientes sobre las variables respuesta evaluadas (Y) (1).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (1)$$

Donde Y es la variable respuesta;  $\beta_0$  es la intersección;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , y  $\beta_3$ , son los coeficientes de los términos lineales;  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$ , y  $\beta_{33}$ , son los coeficientes cuadráticos;  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$ , y  $\beta_{23}$  son los coeficientes de interacción; y  $X_1$ ,  $X_2$ , y  $X_3$  son las concentraciones de las variables independientes.

$$\text{Espesor} = 0.1631 + 0.0056x_1 + 0.0237x_2 + 0.0337x_3 - 0.0030x_1^2 + 0.0093x_2^2 + 0.0032x_3^2 - 0.0014x_1x_2 - 0.0070x_1x_3 + 0.0064x_2x_3 \quad (\text{Eq.S1})$$

$$\text{Humedad} = 45.6698 + 3.4289x_1 - 4.8889x_2 + 6.6726x_3 + 0.2563x_1^2 + 0.5575x_2^2 - 1.4199x_3^2 - 0.8463x_1x_2 - 5.0250x_1x_3 - 0.6748x_2x_3 \quad (\text{Eq.S2})$$

$$\text{Solubilidad en agua} = 52.1901 + 2.8573x_1 + 0.9704x_2 + 3.8970x_3 + 0.6371x_1^2 - 0.9965x_2^2 - 1.1445x_3^2 - 0.0748x_1x_2 + 2.6383x_1x_3 - 0.2486x_2x_3 \quad (\text{Eq.S3})$$

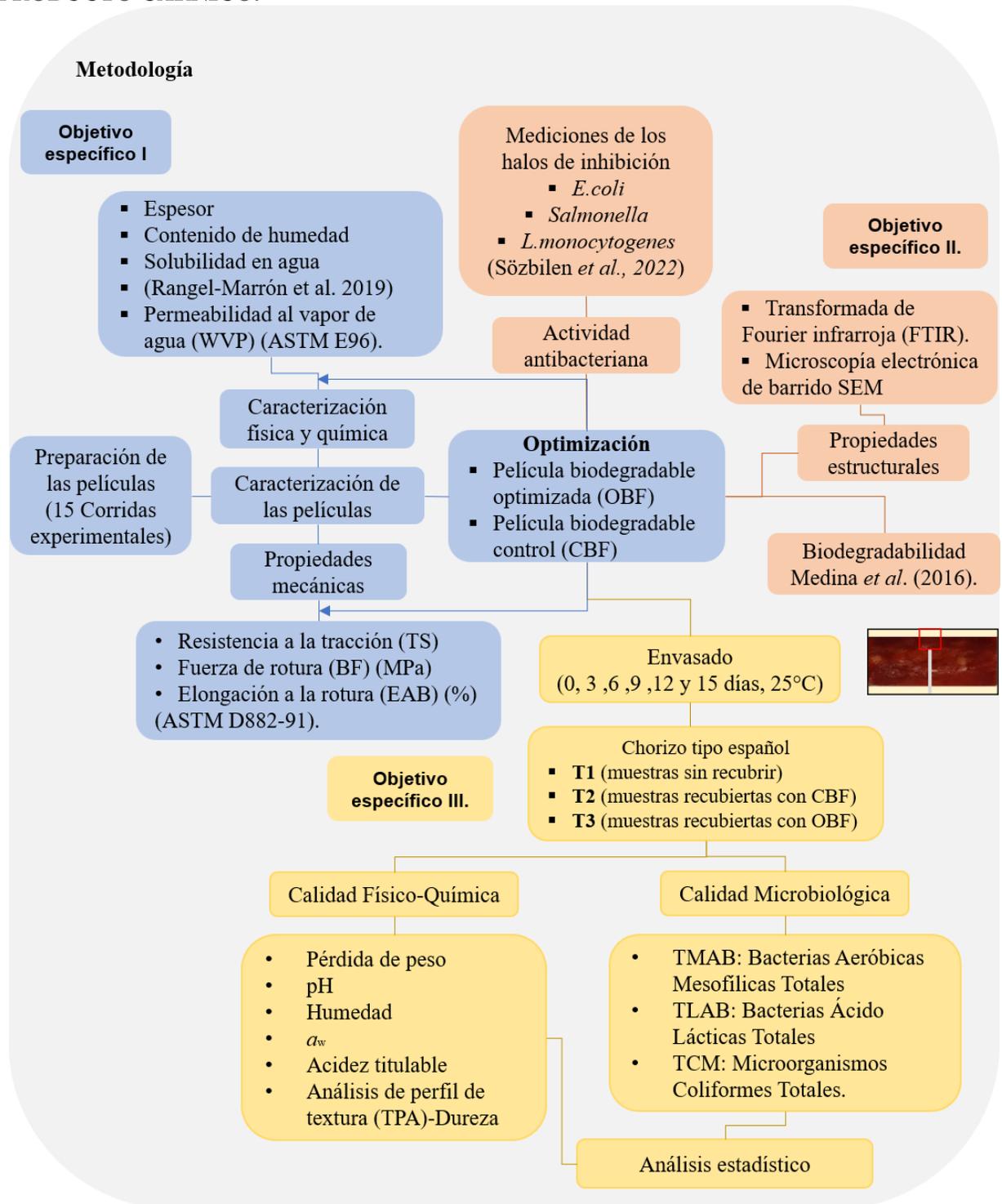
$$\text{Permeabilidad al vapor de agua (WVP)} = 1.0202 + 0.2423x_1 - 0.1578x_2 + 0.3270x_3 + 0.0336x_1^2 + 0.0302x_2^2 + 0.1211x_3^2 + 0.0442x_1x_2 - 0.0720x_1x_3 - 0.0560x_2x_3 \quad (\text{Eq.S4})$$

$$\text{Resistencia a la tracción (TS)} = 2.69 - 0.1384x_1 + 0.6169x_2 - 0.5198x_3 - 0.0806x_1^2 + 0.0130x_2^2 - 0.0671x_3^2 - 0.0127x_1x_2 + 0.1137x_1x_3 - 0.1361x_2x_3 \quad (\text{Eq.S5})$$

$$\text{Fuerza de rotura (BF)} = 4.83 - 0.1324x_1 + 1.45x_2 - 0.4770x_3 - 0.0997x_1^2 + 0.1800x_2^2 - 0.1814x_3^2 - 0.0666x_1x_2 - 0.0360x_1x_3 - 0.1288x_2x_3 \quad (\text{Eq.S6})$$

$$\text{Elongación a la rotura (EAB)} = 5.07 - 0.3704x_1 + 1.23x_2 - 0.6892x_3 - 0.3806x_1^2 + 0.2354x_2^2 - 0.2910x_3^2 - 0.1350x_1x_2 + 0.4192x_1x_3 - 0.2057x_2x_3 \quad (\text{Eq.S7})$$

**A2. OPTIMIZACIÓN DE UNA PELÍCULA BIODEGRADABLE COMPUESTA DE ALGINATO DE SODIO/ ALMIDÓN DE TARO/ ÁCIDO LÁCTICO: EFECTO ANTIMICROBIANO EN UN PRODUCTO CÁRNICO.**

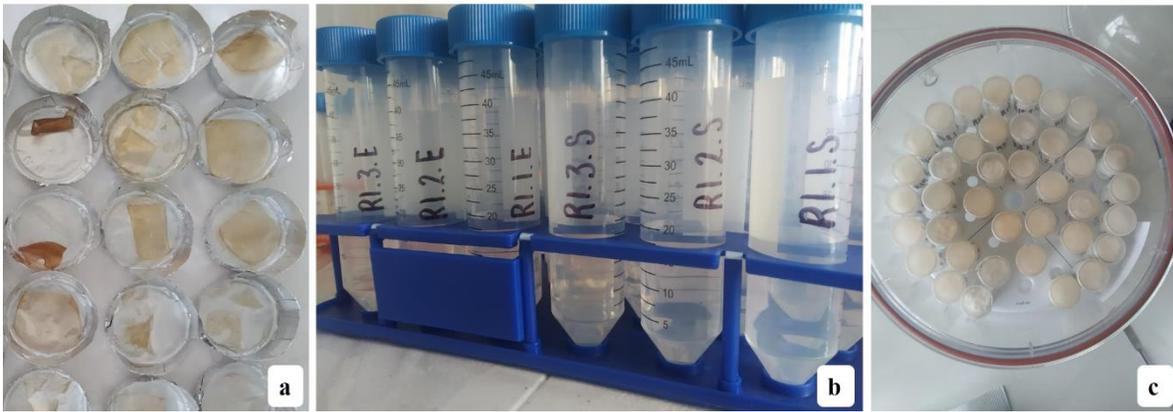


**Figura A1.** Diagrama de trabajo realizado en esta investigación.

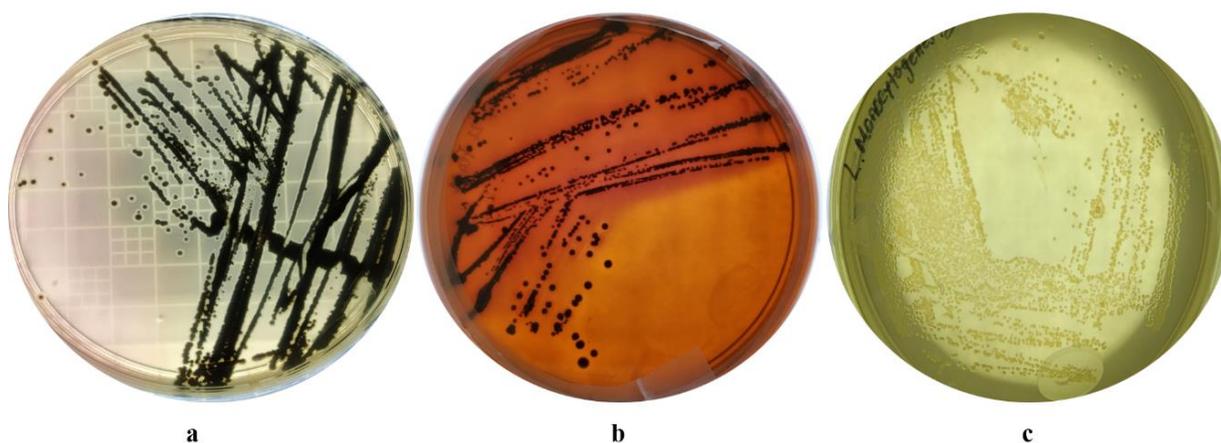
## Objetivos específicos I y II



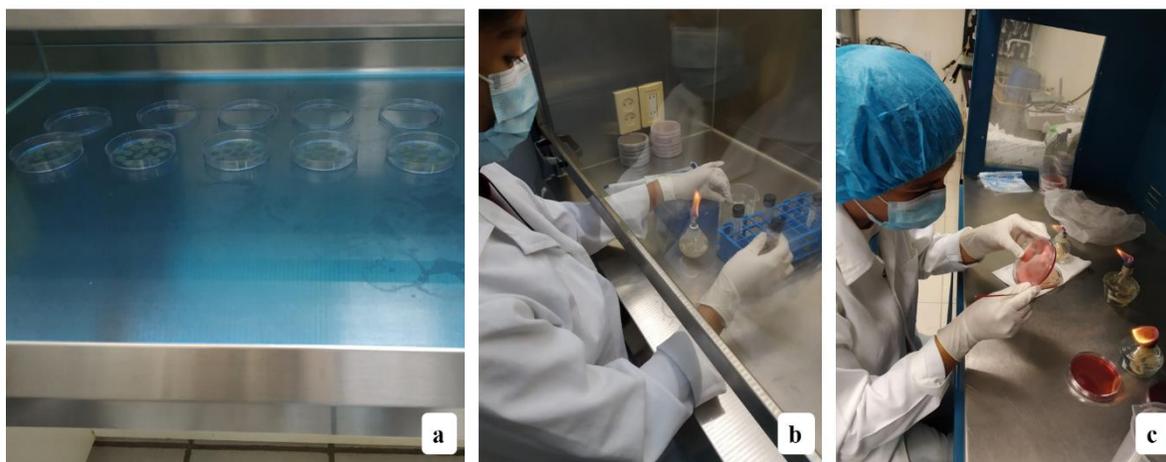
**Figura A2.** a. Elaboración de las películas biodegradables (conjunto de puntos de prueba del diseño Box-Behnken), b. Secado de las películas biodegradables. c. Apariencia visual de las películas biodegradables.



**Figura A3.** Ensayos de caracterización de las películas biodegradables: a. Determinación de humedad, b. Prueba de solubilidad en agua, c. Determinación de permeabilidad al vapor de agua (WVP), d) Medición de espesor y e. Evaluación de las propiedades mecánicas.



**Figura A4.** Bacterias aisladas para la prueba antibacteriana: **a.** *Salmonella*, **b.** *E. coli*, **c.** *Listeria monocytogenes*.



**Figura A5.** **a.** Esterilización por luz UV de las películas biodegradables, **b-c.** Evaluación antibacteriana por el método Kirby-Bauer.

### Objetivo específico III.



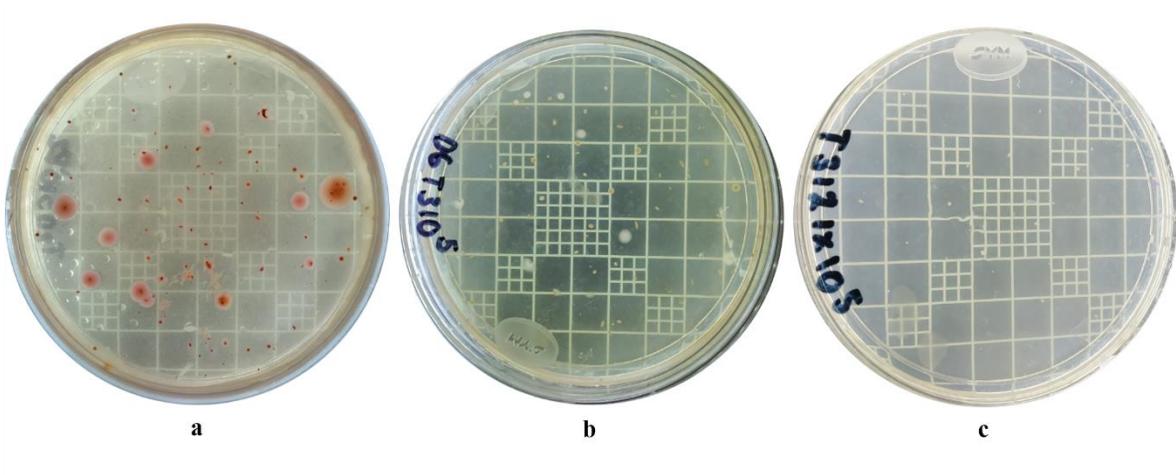
**Figura A6.** Envasado de las muestras de chorizo tipo español. **a.** Muestras envasadas con la película control. **b-c.** Muestras envasadas con la película óptima.



**Figura A7.** Análisis fisicoquímico de las muestras de chorizo tipo español. **a.** Cuantificación de humedad, **b.** determinación de acidez titulable, **c.** Medición de pH, **d.** Lectura de  $a_w$ , **f-g.** Medición del análisis de perfil de textura (TPA).



**Figura A8.** Caracterización microbiológica (a-c).



**Figura A9.** Evaluación microbiológica en muestras de chorizo tipo español durante el almacenamiento, mediante recuento en placa. **a.** Microorganismos Coliformes Totales (TCM) en el T2 día 3, **b.** Bacterias Ácido Lácticas Totales (TLAB) en el T3 día 6, **c.** Bacterias Aeróbicas Mesofílicas Totales (TMAB) en el T3 día 12.

## **ANEXO B.**

### **B1. Participación en congresos**

- Mexican Journal of Biotechnology 2023.

Effect of cross-linking with  $\text{CaCl}_2$  on the physical and antimicrobial properties of malanga starch films, sodium alginate incorporated with nisin and lactic acid.

Efecto del entrecruzamiento con  $\text{CaCl}_2$  sobre las propiedades físicas y antimicrobianas de películas de almidón de malanga, alginato de sodio incorporadas con nisina y ácido láctico.

- Academia Journals 2023

Caracterización y Evaluación Antibacteriana de Películas a Base de Polisacáridos que Incorporan Nisina y Ácido Láctico



Mexican Journal of Biotechnology 2023, 8(1):96-298

Journal homepage: [www.mexjbiotechnol.com](http://www.mexjbiotechnol.com)

ISSN:2448-6590



<https://doi.org/10.29267/mxjb.2023.8.1.96>

**Proceedings of the IX International Congress on Biotechnology SOCIBI, III Meeting of Students and Alumni of the CICB-UATx/Memorias del IX Congreso Internacional de Biotecnología SOCIBI, III Encuentro de estudiantes y egresados del posgrado del CICB-UATx**

**December 3-6, 2022, Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico**



## Effect of cross-linking with $\text{CaCl}_2$ on the physical and antimicrobial properties of malanga starch films, sodium alginate incorporated with nisin and lactic acid

## Efecto del entrecruzamiento con $\text{CaCl}_2$ sobre las propiedades físicas y antimicrobianas de películas de almidón de malanga, alginato de sodio incorporadas con nisina y ácido láctico

Zuemy Hernández-Nolasco<sup>1</sup>, Mariana Inés Acateca-Hernández<sup>1</sup>, María Antonieta Ríos-Corripio<sup>2</sup>, Aleida Selene Hernández-Cazares<sup>1\*</sup>

1 Colegio de Postgraduados. Campus Córdoba. Congregación Manuel León, Amatlán 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

\*Corresponding author

E-mail address: [aleyse@colpos.mx](mailto:aleyse@colpos.mx)

### Abstract history:

Received: / 10 October 2022/ Received in revised form: / 11 November 2022/

Accepted: / 01 December 2022 / Published online: / 16 January 2023

### ABSTRACT

The use of biodegradable films with antimicrobial additives is mainly based on maintaining food quality, safety and innocuousness. The effect of the presence and absence of cross-linking with 1%  $\text{CaCl}_2$  in biodegradable films formulated with malanga starch, sodium alginate and glycerol; added with lactic acid (1-3%) and nisin (2369 UI) on the antimicrobial, physical, barrier, mechanical and structure (FTIR) properties was studied. Tensile strength was obtained in the range of 4.1-18.03 Mpa. The water vapor permeability of the films was 0.57-2.95 (g mm/ kPa h m<sup>2</sup>). The antimicrobial activity was evaluated against gram-negative (*E. coli* and *Salmonella*) and gram-positive (*L. monocytogenes*) bacteria through the disk diffusion method, the inhibition areas for all bacteria showed significant differences ( $P < 0.05$ ). Antimicrobial properties were found to improve with increasing lactic acid concentration and when the films were not subjected to crosslinking with  $\text{CaCl}_2$ . However, crosslinking led to an improvement in the physical, barrier and mechanical properties of the films which showed significant differences ( $P < 0.05$ ).

**Keywords:** Biodegradable films, antimicrobial, lactic acid, nisin, polymeric crosslinking.

### RESUMEN

El uso de las películas biodegradables adicionadas con antimicrobianos se basa principalmente en mantener la calidad, seguridad e inocuidad alimentaria. Se estudió el efecto de la presencia y ausencia de reticulación con  $\text{CaCl}_2$  al 1% en películas biodegradables formuladas a base de almidón de malanga, alginato de sodio y glicerol; adicionadas con ácido láctico (1-3%) y nisina (2369 UI) sobre las propiedades antimicrobianas, físicas, de barrera, mecánicas y de estructura (FTIR). La resistencia a la tracción se obtuvo en el rango de 4.1-18.03 Mpa. La permeabilidad al vapor de agua de las películas fue de 0.57-2.95 (g mm/ kPa h m<sup>2</sup>). La actividad antimicrobiana se evaluó contra bacterias gramnegativas (*E. coli* y *Salmonella*) y grampositiva (*L. monocytogenes*) a través del método de difusión de disco, las áreas de inhibición para todas las bacterias mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Se encontró que las propiedades antimicrobianas mejoran cuando se incrementa la concentración de ácido láctico y cuando las películas no se someten al entrecruzamiento con  $\text{CaCl}_2$ . Sin embargo, la reticulación condujo a una mejoría en las propiedades físicas, de barrera y mecánicas de las películas las cuales mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

**Palabras clave:** Películas biodegradables, antimicrobiano, ácido láctico, nisina, entrecruzamiento polimérico.

SOCIEDAD CIENTÍFICA INTERNACIONAL DE BIOTECNÓLOGOS A.C.

INTERNATIONAL SCIENTIFIC SOCIETY OF BIOTECHNOLOGIST CSO



Otorga la presente

## CONSTANCIA

a:

Zuemy Hernández-Nolasco, Mariana Inés Acateca-Hernández, María Antonieta Ríos-Corripio, Aleida Selene Hernández-Cazares

Por la presentación en CARTEL del trabajo

***Efecto del entrecruzamiento con CaCl<sub>2</sub> sobre las propiedades físicas y antimicrobianas de películas de almidón de malanga, alginato de sodio incorporadas con nisina y ácido láctico.***

en el

IX Congreso Internacional de Biotecnología SOCIBI y  
III Encuentro de estudiantes y egresados del posgrado del  
CICB-UATx

celebrado en Tlaxcala, México los días 3-6 de diciembre de 2022.



DR. RODRIGO LEDESMA AMARO  
Secretario

DRA. MARÍA DEL CARMEN  
SÁNCHEZ HERNÁNDEZ  
Presidenta de la SOCIBI

C.P. ADRIANA HERNÁNDEZ  
GRANDE  
Tesorera

SOCIEDAD CIENTÍFICA INTERNACIONAL DE BIOTECNÓLOGOS A.C.

INTERNATIONAL SCIENTIFIC SOCIETY OF BIOTECHNOLOGIST CSO

Otorga la presente

**CONSTANCIA**

a:

*Zuemy Hernández-Nolasco*

Por su asistencia

al IX Congreso Internacional de Biotecnología SOCIBI y  
III Encuentro de estudiantes y egresados del posgrado del  
CICB-UATx

celebrado en Tlaxcala, México los días 3-6 de diciembre de 2022.



DR. RODRIGO LEDESMA AMARO  
Secretario

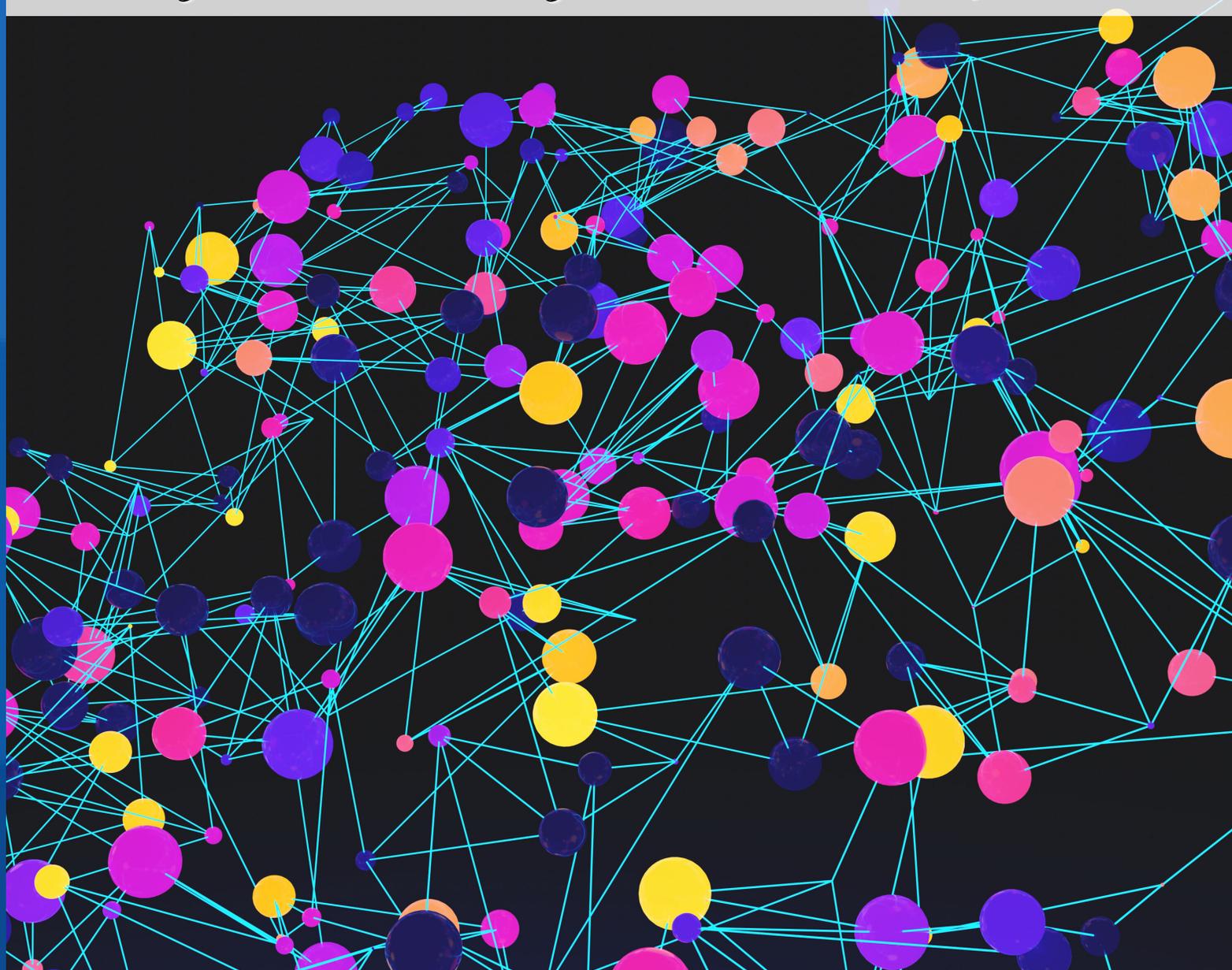
DRA. MARÍA DEL CARMEN  
SÁNCHEZ HERNÁNDEZ  
Presidenta de la SOCIBI

C.P. ADRIANA HERNÁNDEZ  
GRANDE  
Tesorera



# ARTÍCULOS DEL CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN ACADEMIA JOURNALS MONTERREY 2023

*Investigación, Educación Integral e Innovación para el Desarrollo*



MARZO 13 - 14, 2023

# INVESTIGACIÓN, EDUCACIÓN INTEGRAL E INNOVACIÓN EN INGENIERÍA PARA EL DESARROLLO

TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN DEL CONGRESO  
INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN ACADEMIA  
JOURNALS MONTERREY 2023

*Investigación, Educación Integral e Innovación para el Desarrollo*

**CONGRESO  
ACADEMIA JOURNALS  
MONTERREY 2023**

# Título del Libro Electrónico: *Investigación, Educación Integral e Innovación en Ingeniería para el Desarrollo*

ISBN 979-8-89020-998-6 online\*

Este libro electrónico (e-book) contiene la colección de los trabajos de investigación presentados en el área de *ingenierías* en el Congreso Internacional de Investigación Academia Journals Monterrey, *Investigación, Educación Integral e Innovación para el Desarrollo*, que fuera organizado los días 13 y 14 de marzo de 2023 por Academia Journals en colaboración con el Colegio de Educación Profesional Técnica de Nuevo León (CONALEP NL).

## POLÍTICA DE COPYRIGHT

Con el fin de maximizar el valor para los autores de sus publicaciones en AJ, se observan la políticas de copyright aquí descritas. Academia Journals protegerá los intereses de los autores y de las instituciones donde ellos laboran. Como requisito para publicar en AJ, todos los autores y la institución donde ellos laboran transfieren a AJ cualquier derecho de copyright que tengan en su artículo. El copyright se transmite cuando el artículo es aceptado para su publicación. La asignación de copyright es nula y terminada en caso de que el artículo no sea aceptado para publicación. Para corresponder a la transferencia de los derechos de autor, AJ cede a los autores y a las instituciones donde ellos laboran el permiso y derecho de hacer copias del artículo publicado y utilizarlo para fines académicos. El autor retiene siempre los derechos de patentes descritas en el artículo. Después de que el artículo haya sido aceptado para su publicación en AJ, y dado que el copyright ha sido ya transferido, cualquier cambio o revisión al material debe hacerse solamente con la autorización de AJ.

## CONSEJO ACADÉMICO

Dr. Rafael Moras (San Antonio, EEUU)  
MA Ani Alegre (Austin, EEUU)  
Dr. Ángel Esparza (Houston, EEUU)  
Lic. David Moras (San Antonio)  
MC Constantino Moras Sánchez (Orizaba, México)  
Dr. Eloy Mendoza Machain (Morelia, México)  
Dr. Pedro López Eiroá (CDMX, México)  
Dr. Víctor Mendoza (Puebla, México)  
Dr. Albino Rodríguez Díaz (Tepic, México)  
Vicerrector Dante Agatón (Morelia, México)

## DISEÑO Y PUBLICIDAD

contacto@academiajournals.com

## COMENTARIOS Y SUGERENCIAS

contacto@academiajournals.com  
+1 (210) 415-3353  
3760 E. Evans  
San Antonio TX 78259 USA  
www.academiajournals.com

\*El ISBN fue asignado a este libro por la Agencia de ISBN en Estados Unidos. Los números de copyright tienen validez mundial. Para comprobar la validez de un ISBN, favor de visitar la página [bookwire.com](http://bookwire.com).



# CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN DE ACADEMIA JOURNALS MONTERREY 2023

*Investigación, Educación Integral e Innovación para el Desarrollo*

# CERTIFICADO

otorgado a

**Ing. Zuemy Hernández Nolasco**  
**Ing. Mariana Inés Acateca Hernández**  
**Dra. Patricia Haydeé Castellano**  
**Dra. María Antonieta Ríos Corripio**  
**Dr. Juan Valente Hidalgo Contreras**  
**Dra. Aleida Selene Hernández Cázares**

por su artículo titulado

## **Caracterización y Evaluación Antibacteriana de Películas a Base de Polisacáridos que Incorporan Nisina y Ácido Láctico**

(Artículo No. MTY129)

La ponencia correspondiente fue presentada en el congreso desarrollado los días 13 y 14 de marzo de 2023, teniendo como sede las magníficas instalaciones del Colegio de Educación Profesional Técnica de Nuevo León (CONALEP NL). El artículo está incluido en las siguientes publicaciones: (1) en el portal de Internet AcademiaJournals.com, con ISSN 1946-5351 online, Vol. 15, No. 02, 2023 e indexación en la base de datos *Fuente Académica Plus de EBSCOHOST*, Massachusetts, Estados Unidos y (2) en libros ebook digitales compilados por área temática, con números ISBN online\*. Se tiene acceso a todas las publicaciones del congreso en el portal de internet de Academia Journals, con acceso libre.

Los organizadores del congreso reconocen la participación de los autores en el congreso, agradeciendo sus contribuciones.



**DR. ANTONIO J. DIECK ASSAD**

Director General  
CONALEP, N.L.



**DR. RAFAEL MORAS, P.E.**

Director General  
Academia Journals

**CONGRESO**  
INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN  
**ACADEMIA JOURNALS**  
**MONTERREY 2023**



\* Investigación, Educación Integral e Innovación en Ciencias Administrativas para el Desarrollo 979-8-89020-999-3  
Investigación, Educación Integral e Innovación en Ciencias de la Salud para el Desarrollo 978-1-939982-97-1  
Investigación, Educación Integral e Innovación en Matemáticas y Ciencias Exactas para el Desarrollo 978-1-939982-98-8  
Investigación, Educación Integral e Innovación en Ciencias de la Educación para el Desarrollo 979-8-89020-000-6  
Investigación, Educación Integral e Innovación en Estudios Legales para el Desarrollo 978-1-939982-99-5  
Investigación, Educación Integral e Innovación en Humanidades, Ciencias Sociales y Bellas Artes para el Desarrollo 979-8-89020-001-3  
Investigación, Educación Integral e Innovación en Ingeniería para el Desarrollo 979-8-89020-998-6

# Caracterización y Evaluación Antibacteriana de Películas a Base de Polisacáridos que Incorporan Nisina y Ácido Láctico

Ing. Zuemy Hernández Nolasco<sup>1</sup>, Ing. Mariana Inés Acateca Hernández<sup>2</sup>, Dra. Patricia Haydeé Castellano<sup>3</sup>, Dra. María Antonieta Ríos Corripio<sup>4</sup>, Dr. Juan Valente Hidalgo Contreras<sup>5</sup>, Dra. Aleida Selene Hernández Cázares<sup>6</sup>

**Resumen**— Se utilizó ácido láctico, nisina, almidón de malanga, alginato de sodio y glicerol para preparar películas biodegradables. Se estudiaron las propiedades físicas, químicas y mecánicas las cuales mostraron valores en un rango de 0.14-0.35 mm para espesor, humedad 26.26-41.52%; solubilidad en agua 28.90-61%; permeabilidad al vapor de agua (WVP) 1.06-2.93 (g mm/kPa h m<sup>2</sup>); resistencia a la tracción 2.62-11.15 Mpa y fuerza de rotura 16.59-44.18 Mpa. Se observó que al adicionar ácido láctico e incrementar su concentración aumenta el espesor, la solubilidad, la humedad y la WVP. La película que contiene ácido láctico 3% mejora las propiedades mecánicas en 1.41 y 1.98 veces la TS y BF en comparación con la película sin antimicrobiano. La caracterización estructural de las películas mediante FTIR mostró la aparición de picos a 1652 cm<sup>-1</sup> relacionados a la presencia de grupos amida de nisina y picos a 1720 cm<sup>-1</sup> que revelan vibraciones de estiramiento C=O para ácido láctico. Se observó mayor susceptibilidad para *E. Coli* con zonas de inhibición que superan los 20 mm para todos los tratamientos excepto para la película sin antimicrobiano y nisina 2369 UI.

**Palabras clave** — Película biodegradable activa, antimicrobiano, nisina, ácido láctico.

## Introducción

La contaminación por del suelo y a la vida marina se ve afectada gravemente por envases plásticos que tardan mucho tiempo en degradarse, esto representa un problema grave que debe ser atendido (Kirtonia et al., 2021). Las investigaciones recientes han avanzado significativamente en el desarrollo, formulación y caracterización de películas biodegradables a base de biopolímeros, hacia un enfoque más sustentable. Las películas biodegradables son finas capas delgadas producidas exclusivamente a partir de ingredientes renovables y comestibles que una vez formadas se utilizan para envolver una gran variedad de alimentos (Paul, 2020). Un avance revelador involucra la inclusión de agentes antimicrobianos en las películas, generando películas activas. Las bacteriocinas como la nisina y la adición de ácidos orgánicos como el ácido láctico solos o en combinación aumentan la vida útil y la seguridad microbiológica de diversos productos alimenticios, sobre microorganismos patógenos.

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos producidas a partir de cepas bacterianas que matan o inhiben el crecimiento de otros microorganismos (Kirtonia et al., 2021). Actualmente existe un gran interés en la aplicación de bacteriocinas como alternativa en la conservación de alimentos. La nisina es una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* utilizada como conservante de alimentos, se trata de un polipéptido catiónico, hidrófobo y termoestable es soluble en condiciones ácidas en un rango de pH de 2-3 (Gharsallaoui et al., 2016). Mientras que el ácido láctico es un ácido orgánico de tres carbonos; un átomo de carbono terminal es parte de un grupo ácido o carboxilo, el átomo de carbono central tiene un alcohol y el otro átomo de carbono terminal es parte de un grupo metilo o hidrocarburo (Bhatt, 2018). Por tanto, el objetivo de este estudio se basa en desarrollar películas a base de almidón de malanga y alginato de sodio como materiales de base biológica que incorporan nisina y ácido láctico solos o en combinación y estudiar su efecto antibacteriano *in vitro* en tres bacterias comúnmente transmitidas por alimentos.

## Metodología

### Producción de las películas biodegradables

La película biodegradable basadas en alginato de sodio, almidón de malanga, glicerol, nisina y ácido láctico se preparó en un base al método descrito previamente (Escobar et al., 2009). El almidón de malanga (obtenido en el

1 Ing. Zuemy Hernández Nolasco estudiante de la Maestría en Ciencias en Innovación Agroalimentaria Sustentable en el Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, Veracruz. [hernandez.zuemy@colpos.mx](mailto:hernandez.zuemy@colpos.mx)

2 Ing. María Inés Acateca Hernández estudiante de la Maestría en Ciencias en Innovación Agroalimentaria Sustentable en el Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, Veracruz. [acateca.mariana@colpos.mx](mailto:acateca.mariana@colpos.mx)

3 Dra. Patricia Haydeé Castellano Profesora Investigadora Titular Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA), Tucumán, Argentina. [patricia@cerela.org.ar](mailto:patricia@cerela.org.ar)

4 Dra. María Antonieta Ríos Corripio Profesora Investigadora Cátedra CONACYT Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, Veracruz [rios.antonietta@colpos.mx](mailto:rios.antonietta@colpos.mx)

5 Dr. Juan Valente Hidalgo Contreras Profesor Investigador Titular Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, Veracruz. [jvhidalgo@colpos.mx](mailto:jvhidalgo@colpos.mx)

6 Dra. Aleida Selene Hernández Cázares Profesor Investigador Titular Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, Veracruz. [aleyse@colpos.mx](mailto:aleyse@colpos.mx) (autor corresponsal)

Laboratorio de Ciencias de los Alimentos del Colegio de Postgraduados) al 0.5 % (p/v) fue disuelto en agua destilada a temperatura ambiente durante 20 min, luego se elevó la temperatura a 85°, continuando la agitación constante por 30 min. Posteriormente a la solución se le añadió un 1.5 % (p/v) de alginato de sodio (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EE. UU.) y 1% (p/v) de glicerol (Meyer, CDMX, México) como plastificante, manteniendo en agitación por 30 min (por cada componente) a 70-75 °C. La composición de los antimicrobianos añadidos a las soluciones formadoras de películas se muestran en la Cuadro 1. Manteniendo la temperatura a 70°C se añadió la nisina (Danisco, CDMX, México) (disuelta previamente en 50,000 UI/mL de HCl (J.T. Baker, Nueva Jersey, EE. UU.) y se agitó durante 30 minutos. Cuando la solución se mantuvo a 60°C se añadió el ácido láctico (Hebbe Cosmetics, México) homogenizando por 20 min. Volúmenes de 35 mL de las soluciones filmogénicas se transfirieron a placas (100 x 15 mm), las cuales fueron secadas a 45 °C por 12 h.

Cuadro 1. Composición de las soluciones filmogénicas

| Tratamientos | Antimicrobianos |                      |
|--------------|-----------------|----------------------|
|              | Nisina (UI)     | Ácido láctico% (v/v) |
| T1           | -               | -                    |
| T2           | 2369            | -                    |
| T3           | 2369            | 2                    |
| T4           | 2369            | 3                    |
| T5           | -               | 2                    |
| T6           | -               | 3                    |

#### Caracterización física y química de las películas biodegradables

##### Espesor

El espesor de la película se obtuvo utilizando un micrómetro digital (Modelo MDC-1 "SB", AMES, EE. UU.) Se tomaron cinco mediciones en posiciones aleatorias de la muestra y se calculó el valor promedio.

##### Contenido de humedad

El contenido de humedad se determinó por pérdida de peso de la película. Las películas se secaron en un horno (Ecoshel, 9025H, CDMX, México.) a 103°C durante 24 h. Se determinó el contenido de humedad sobre una base seca de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$\% MC = \frac{W_i - W_D}{W_D} \times 100\%$$

Donde  $W_i$  es el peso inicial y  $W_D$  es el peso seco de la película.

##### Prueba de solubilidad en agua

La solubilidad en agua de las muestras de película se determinó de acuerdo con (Rangel-Marrón et al., 2019). Las muestras de película seca se seccionaron en trozos de 2 x 2 cm y se pesaron previamente  $W_0$ . Cada muestra se colocó en un tubo de 50 mL con 20 mL de agua destilada y se mantuvo a 25°C durante 24 h. El residuo se secó a 103°C (Ecoshel, 9025H, CDMX, México.) durante 24 h y se registró el peso  $W_1$ . La solubilidad se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$\% S = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \times 100$$

##### Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad de vapor de agua (WVP) se determinó mediante el método gravimétrico basado en la norma ASTM E96 (ASTM,2016). Las muestras triplicadas de película se cortaron en círculos (2.5 cm de diámetro), se colocaron en pesafiltros que contenían cloruro de calcio anhidro y se secaron en desecadores que contenían solución saturada de NaCl (75% HR, 25°C). Las muestras se pesaron periódicamente cada 24h por cinco días. La WVP fue calculado por la siguiente ecuación.

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

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

Donde, G / t: pendiente de la ganancia de peso frente al tiempo (g/h); A: área de la película (m<sup>2</sup>);  $\Delta P$ : diferencia de presión parcial de vapor entre el cloruro de calcio y el cloruro de sodio (kPa); e: espesor de la película (mm).

### Propiedades mecánicas

La resistencia a la tracción (TS) y la fuerza de rotura (BF) se determinaron de acuerdo con ASTM D882-91 utilizando un texturómetro (Shimadzu EZ-SX) a una velocidad de tracción de 50 mm/min<sup>-1</sup>. Cinco muestras de cada película se cortaron en rectángulos de 50 mm de largo y 20 mm de ancho.

### Caracterización estructural de las películas por FTIR

Se analizó la estructura de las películas preparadas mediante la aplicación de la espectrometría de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) (ThermoScientific, iS50, Bruker, Vertex, Wisconsin, EE. UU.). Los espectros de FTIR (64 escaneos, resolución de 4 cm<sup>-1</sup>) se midieron en la región espectral de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup> por triplicado.

### Actividad antibacteriana in vitro

La actividad antibacteriana de las películas se evaluó por el método de difusión en disco contra las bacterias *Escherichia coli*, *Salmonella Thypi* y *listeria monocytogenes*. Alícuotas de 100 µL de cada suspensión bacteriana 1.5x10<sup>8</sup> UFC/mL en la escala de McFarland se extendieron en placas de agar SS (agar *Salmonella-shigella*), EMB (Agar Eosina y Azul de Metileno) y agar listeria (Becton Dickinson, CDMX, México.) Discos de ensayo de 1.3 cm de diámetro se colocaron cuidadosamente sobre las placas de agar y se incubaron a 37°C ± 1 durante 24 h. La zona clara de inhibición se midió alrededor del disco y se restó el área del disco de película. Los resultados promedio se expresaron en mm.

## Resultados

### Caracterización de las películas biodegradables

Se logró incorporar con éxito el ácido láctico solo o en combinación y la nisina en las películas biodegradables las cuales mostraron ser transparentes, con superficies lisas y libres de burbujas (Figura 1). La caracterización física y química para las películas elaboradas se muestra en el Cuadro 2. Se observó que al adicionar ácido láctico (aún en las películas combinadas T3 y T4) e incrementar su concentración aumenta el espesor, la solubilidad, la humedad y la WVP. Es probable que la reacción de reticulación aumente el movimiento de las moléculas, afectando las interacciones entre polímeros lo que incrementa la transmisión al vapor de agua. Resultados similares han sido reportados por Rangel-Marrón et al., 2019 y Rocha et al., 2014 en películas biodegradables que incorporan ácidos orgánicos.



Figura 1. Apariencia visual de las películas biodegradables que incorporan antimicrobianos.

Se considera útil determinar las propiedades mecánicas de las películas biodegradables para determinar su idoneidad en aplicaciones alimentarias. En este contexto, la película que contiene ácido láctico 3% (T3) muestra mejoras notables en las tales propiedades en 1.41 y 1.98 veces la TS y BF en comparación con la película sin antimicrobiano (T1). Estudios recientes sugieren que la incorporación de ácidos orgánicos en películas elaboradas a partir de diferentes polisacáridos aumenta la fuerza de rotura debido a la reticulación (formación de enlace éster) (Gebresas et al., 2023).

Cuadro 2. Caracterización física y química de las películas de almidón de malanga y alginato adicionadas con antimicrobianos.

| Tratamiento                          | Espesor (mm) | Humedad (%)  | Solubilidad (%) | WVP (g mm/kPa h m2) | Resistencia a la tracción (TS) (MPa) | Fuerza de rotura (BF) (MPa) |
|--------------------------------------|--------------|--------------|-----------------|---------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| T1 Sin antimicrobiano                | 0.14 ± 0.004 | 26.26 ± 0.57 | 28.90 ± 1.36    | 1.068 ± 0.093       | 7.90 ± 0.23                          | 22.24 ± 0.66                |
| T2 Nisina 2369 UI                    | 0.15 ± 0.009 | 28.25 ± 0.03 | 39.36 ± 2.09    | 1.741 ± 0.091       | 5.50 ± 0.39                          | 16.59 ± 1.18                |
| T3 Nisina 2369 UI + ácido láctico 2% | 0.19 ± 0.00  | 36.21 ± 0.12 | 61.00 ± 1.60    | 2.406 ± 0.109       | 2.62 ± 0.05                          | 18.59 ± 0.41                |
| T4 Nisina 2369 UI + ácido láctico 3% | 0.20 ± 0.02  | 37.82 ± 0.89 | 60.06 ± 1.01    | 2.5 ± 0.162         | 4.06 ± 0.65                          | 16.82 ± 2.71                |
| T5 Ácido láctico 2%                  | 0.24 ± 0.02  | 41.52 ± 0.39 | 58.53 ± 0.11    | 2.314 ± 0.160       | 5.91 ± 1.14                          | 19.85 ± 6.82                |
| T6 Ácido láctico 3%                  | 0.35 ± 0.02  | 39.17 ± 0.38 | 59.59 ± 0.78    | 2.938 ± 0.021       | 11.15 ± 0.77                         | 44.18 ± 3.06                |

*Caracterización estructural de las películas por FTIR*

El análisis FTIR tuvo como objetivo determinar las alteraciones a nivel molecular inducidas por la incorporación de la nisina y el ácido láctico en las cadenas poliméricas. La Figura 2 muestra los espectros de absorción FTIR de los estándares (almidón de malanga, alginato, glicerol, nisina y ácido láctico) y de la estructura de las películas biodegradables elaboradas (T1-T6) en la región de 2000-700  $\text{cm}^{-1}$ . El alginato mostró picos distintivos en las regiones de 1597, 1404 y 1025  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden a las vibraciones de tensión asimétricos de los enlaces C-O, simétricos del grupo COO- y del estiramiento antisimétrico de C-O-C, respectivamente. El almidón de malanga mostró bandas en 1145  $\text{cm}^{-1}$  afines a la flexión de enlaces C-OH de los grupos hidroxilo, mientras que las propiedades cristalinas y amorfas se asocian a bandas en 1076, 997 y 923  $\text{cm}^{-1}$ . El glicerol presentó una banda de deformación en la región de 1200-800  $\text{cm}^{-1}$ . Mostrando picos distintivos en 1125-1000, 930 y 850  $\text{cm}^{-1}$  relacionados con las vibraciones correspondientes a los enlaces CH-OH, C-O y O-O respectivamente. La nisina presentó bandas de absorción en la región de 1700-900  $\text{cm}^{-1}$ . Los picos a 1652, 1449 y 1033  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a los enlaces O-H y N-H de grupos amida, a la presencia de vibraciones de tensión simétricos del grupo COO- y la vibración de CH2-OH, respectivamente. El ácido láctico presentó bandas de absorción en la región de 1213-1048  $\text{cm}^{-1}$  estiramientos de -C-O- del grupo ácido y un pico característico en 1720 debido al estiramiento del grupo C=O. El espectro FTIR de T1 presentó bandas similares al del alginato y glicerol, por otra parte, T2-T6 presentaron similitud en sus bandas asociadas a la presencia de los compuestos base (alginato y glicerol), así como de la presencia o ausencia de nisina y ácido láctico en picos característicos.

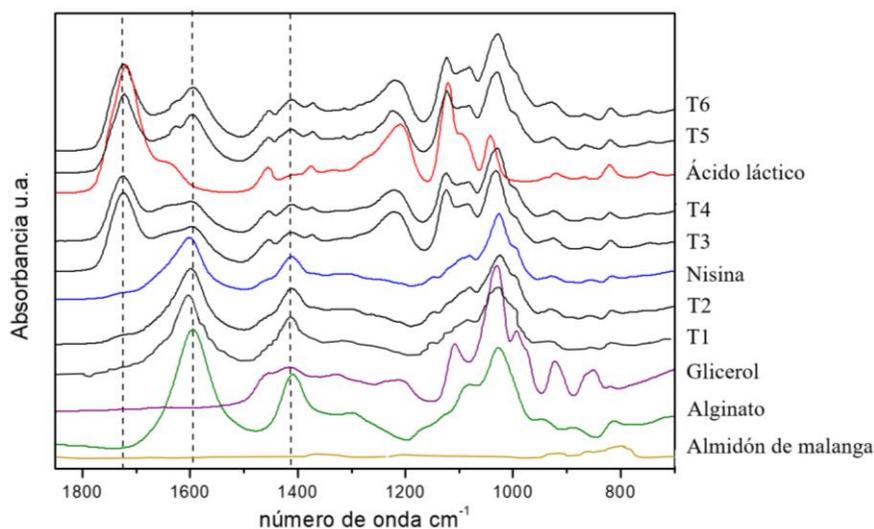


Figura 2. Espectros FTIR para películas de almidón de malanga y alginato incorporadas con antimicrobianos y sus compuestos base.

*Actividad antibacteriana in vitro*

La actividad antibacteriana de las películas fue evaluada con tres bacterias asociadas comúnmente a alimentos, dos especies Gramnegativas (*E. Coli* y *Salmonella*) y una grampositiva (*L. monocytogenes*) y las zonas de inhibición obtenidas se muestran en el Cuadro 3. La mayor inhibición de las tres bacterias estudiadas ocurrió en el T6. No se observó inhibición para el T1 y T2, ni el efecto mejorado de inhibición cuando se combinaron nisina y ácido láctico (T3 y T4) pues los valores obtenidos no eran superiores que los reportados para el T5 y T6. La acción antibacteriana de la nisina podría verse afectada por la interacción de sus moléculas con carga positiva y las moléculas disociadas del ácido láctico (Eswaranandam et al. 2004). Para los T3-T4 la actividad antibacteriana mejora cuando se aumenta la concentración del ácido láctico. La eficacia antibacteriana del ácido láctico se enfoca en que las moléculas del ácido penetran las membranas celulares hacia el citoplasma, donde sufren una disociación que provoca la acumulación de protones y en consecuencia una acidificación citoplasmática que afecta la célula en términos de gasto energético y bloqueo de la actividad enzimática (Shi et al, 2022).

Cuadro 3. Zona de inhibición basada en actividades antibacterianas de películas de almidón de malanga y alginato adicionadas con antimicrobianos.

| Tratamientos                         | Salmonella  | ZI             | E. coli   | ZI             | L. monocytogenes  | ZI             |
|--------------------------------------|---|----------------|---|----------------|---|----------------|
| T1 Sin antimicrobiano                |    | Sin inhibición |    | Sin inhibición |    | Sin inhibición |
| T2 Nisina 2369 UI                    |    | Sin inhibición |    | Sin inhibición |    | Sin inhibición |
| T3 Nisina 2369 UI + ácido láctico 2% |   | 15 ± 0.00      |   | 21 ± 0.00      |   | 12 ± 0.00      |
| T4 Nisina 2369 UI + ácido láctico 3% |  | 16.5 ± 0.7     |  | 26 ± 0.57      |  | 17 ± 0.00      |
| T5 Ácido láctico 2%                  |  | 17 ± 0.14      |  | 22.3 ± 1.15    |  | 15.5 ± 0.7     |
| T6 Ácido láctico 3%                  |  | 21 ± 0.0       |  | 26.5 ± 0.00    |  | 18.5 ± 0.7     |

Los valores se expresan como media ± DE. ZI: Zona de inhibición (mm).

Se observó mayor susceptibilidad para *E. Coli* con zonas de inhibición que superan los 20 mm para todos los tratamientos excepto para la película sin antimicrobiano y con nisina 2369 UI. *E. Coli* tiene flagelos fuera de su pared celular que permite mayor movilidad, igualmente posee fimbrias, lo cual demostró que la bacteria fue más absorbible a las películas (Jou et al. 2007). Este estudio estuvo de acuerdo con Eswaranandam et al. (2004) quienes probaron una película de proteína de soja incorporada con nisina (205 UI) y ácido láctico al 2.6% confirmando que *S. gaminara* fue más susceptible al ácido láctico que *L. monocytogenes*. Adicionalmente la actividad antilisteria fue superior a la reportada por Pintado et al. (2009) en una película a base de aislado de proteína de suero con 3.0 % de ácido láctico y 50 UI/mL de nisina la cual permitió zonas de inhibición de 2.14 mm. Otros estudios demuestran que la incorporación de ácidos orgánicos en películas ejerce actividad contra las tres bacterias estudiadas (Rocha et al., 2014; Sözbilen et al., 2022).

## Conclusiones

Se desarrollaron y caracterizaron muestras de películas de almidón de malanga y alginato de sodio utilizando antimicrobianos de origen bacteriano y como plastificantes agua y glicerol. Los resultados de la caracterización física y química revelaron que la combinación de ambos antimicrobianos y el aumento en la concentración del ácido láctico aumenta el espesor, la solubilidad, la humedad y WVP. El tratamiento T6 mostró los mejores valores para las pruebas mecánicas medidas y así como excelente actividad antibacteriana; sin embargo, la WVP es notablemente afectada por la adición del 3% ácido láctico. Los espectros FTIR demostraron la presencia de la nisina y el ácido láctico en las cadenas poliméricas.

## Recomendaciones

Trabajos futuros sugieren la aplicación de las películas obtenidas en productos alimentarios de baja acidez y la evaluación del efecto antimicrobiano en parámetros de calidad e inocuidad para entender aún más la funcionalidad de las películas activas. Adicionalmente, se sugiere el estudio de la incorporación del ácido láctico en concentraciones que incluyan un rango más amplio y su interacción con los demás componentes de película (glicerol y materiales biopoliméricos) para obtener películas óptimas con propiedades de barrera mejoradas.

## Referencias

- ASTM. 2017. ASTM E96. Standard test methods for water vapor transmission of materials. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- ASTM. 2018. ASTM D882-18. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- Bhatt, S. M. (2018). Economical lactic acid production and optimization strategies. En S. Kumar, P. Dheeran, M. Taherzadeh, & S. Khanal (Eds.), *Fungal Biorefineries* (pp. 85-105). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-90379-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-90379-8_5)
- 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
- Eswaranandam, S., Hettiarachchy, N. S., & Johnson, M. G. (2006). Antimicrobial activity of citric, lactic, malic, or tartaric acids and nisin-incorporated soy protein film against *listeria monocytogenes*, *escherichia coli* o157:h7, and *salmonella gaminara*. *Journal of Food Science*, 69(3), FMS79-FMS84. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb13375.x>
- Gebresas, G. A., Szabó, T., & Marossy, K. (2023a). Effects of acidity, number of hydroxyl group, and carbon chain length of carboxylic acids on starch cross-linking. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 6, 100354. <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2022.100354>
- Gharsallaoui, A., Oulahal, N., Joly, C., & Degraeve, P. (2016). Nisin as a food preservative: Part 1: physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(8), 1262-1274. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.763765>
- Jou, C.-H., Lin, S.-M., Yun, L., Hwang, M.-C., Yu, D.-G., Chou, W.-L., Lee, J.-S., & Yang, M.-C. (2007a). Biofunctional properties of polyester fibers grafted with chitosan and collagen. *Polymers for Advanced Technologies*, 18(3), 235-239. <https://doi.org/10.1002/pat.866>
- Kirtonia, K., Salauddin, M., Bharadwaj, K. K., Pati, S., Dey, A., Shariati, M. A., Tilak, V. K., Kuznetsova, E., & Sarkar, T. (2021). Bacteriocin: A new strategic antibiofilm agent in food industries. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 36, 102141. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102141>
- Paul, S. K. (2020). Edible films and coatings for fruits and vegetables. En S. Hashmi & I. A. Choudhury (Eds.), *Encyclopedia of Renewable and Sustainable Materials* (pp. 363-376). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.11509-7>
- Pintado, C. M. B. S., Ferreira, M. A. S. S., & Sousa, I. (2009). Properties of whey protein-based films containing organic acids and nisin to control *listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 72(9), 1891-1896. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.9.189>
- 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>.
- Rocha, M. da, Loiko, M. R., Tondo, E. C., & Prentice, C. (2014). Physical, mechanical and antimicrobial properties of Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) protein films incorporated with organic acids. *Food Hydrocolloids*, 37, 213-220. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.017>
- Shi, Y., Pu, D., Zhou, X., & Zhang, Y. (2022). Recent progress in the study of taste characteristics and the nutrition and health properties of organic acids in foods. *Foods*, 11(21), 3408. <https://doi.org/10.3390/foods11213408>
- Sözbiçen, G. S., Çavdaroglu, E., & Yemencioğlu, A. (2022). Incorporation of organic acids turns classically brittle zein films into flexible antimicrobial packaging materials. *Packaging Technology and Science*, 35(1), 81-95. <https://doi.org/10.1002/pts.2610>