

# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

Desarrollo de Películas de Ácido Poliláctico/Quitosano  
Incorporadas con Ferulato de Etilo y Evaluación de su  
Actividad Antibacterial

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el Título de

QUÍMICO EN ALIMENTOS

1942

Presenta:

Isabel Arredondo Parada

# Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de **Isabel Arredondo Parada** la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de **Químico en Alimentos**.

---

Dra. Abril Zoraida Graciano Verdugo  
Presidente

---

Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores  
Secretario

---

Dra. Maribel Plascencia Jatomea  
Vocal

---

Q.B. Héctor Manuel Escárcega Urquijo  
Suplente

## AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A mis padres: **J. Darío Arredondo López** y **G. Teresa Parada Arvayo**.

A todos los que estuvieron presentes y fueron parte del desarrollo del presente trabajo, un infinito agradecimiento por su paciencia, apoyo y comprensión.

Quiero agradecer al comité, comenzando por la **Dra. Abril Graciano**, por brindarme su total confianza y haberme permitido la oportunidad de realizar este trabajo, que sin duda ha sido una gran experiencia y un sinfín de herramientas para mi crecimiento profesional. A la **Dra. Maribel Plascencia** y a sus alumnos del Laboratorio de Microbiología y Micotoxinas (DIPA): **Carlos Muñoz** y **Daniel Valenzuela**, infinitas gracias a ustedes por su paciencia y por todo el apoyo recibido. A los demás miembros del comité de tesis: **Dr. Aldo Arvizu** y **Q.B. Héctor Escárcega**, que en algún momento de la licenciatura fueron mis profesores, gracias por brindarme las bases necesarias para mi correcta formación.

A mis compañeros del Laboratorio de Investigación de Alimentos (LIA), también conocido como “Marinos”: **María Jesús Moreno Vásquez (Machuy)**: Principalmente es a ti a quien debo agradecerle. Gracias por toda la paciencia y serenidad con la que recibí tu apoyo y enseñanzas; tanto sobre el proyecto en sí como la genuina amistad que con el tiempo fue creciendo. Aunque hayas dado énfasis en que no eras indispensable; debo acentuar en que, gracias a tus ánimos y disposición, fue posible fortalecer la confianza y el valor de seguir adelante. Es difícil encontrar un buen ambiente de trabajo, sobre todo en esos momentos en los que no sabemos de qué manera enfrentar una situación. De nuevo y siempre: ¡¡¡GRACIAS!!! x).

**Emma Valenzuela**: Muchísimas gracias por todos los momentos en los que te diste un espacio para escucharme y aconsejarme. Aun siendo poco el tiempo que coincidimos en el laboratorio, fue muy significativo lo que pudimos compartir (ya sea una Maruchan de emergencia, alguna salida entre amigos y gustos musicales o literatos; sobre todo paz mental). Gracias por estar presente. **Elena Moreno**: Jamás olvidaré cuando nos quedamos sin luz un fin de semana en el laboratorio. Gracias por ayudarme a mantener la calma y confiar en que, pese a las adversidades, todo puede salir bien. A **Brisa Ibarra** (ya que fuego), **Paola López-Reyes**, **Nallely Hoyos**, **Dra. Idania Quintero**, **Manuel Carretas**, **Luis Morado**, **Adán Valenzuela**, **Carolina Gómez**, **Chencho** (porque obvio, el Chencho), **Yoko** (porque obvio, la Yoko), a mis colegas y amigos del DIPA: **Iván González**, **Claudia Murrieta**, **Jesús Encinas**, **Samara Solorio**, **Leslie Chaidez**, **Alfonso Laborín**, **Andrés Levy**, **Rafael Dávila**, **Julián Rodríguez** e **Iván Tolano**: A todos ustedes muchas gracias por su agradable compañía, sé que fue poco el

tiempo en el que realmente convivimos, pero les agradezco la paciencia y amabilidad que mostraron durante mi estancia en el laboratorio. Me llevo buenos recuerdos con todos y cada uno de ustedes. Un agradecimiento especial a **Q.B. César Otero**: Muchísimas gracias por toda su ayuda. Usted ha estado presente en gran parte de mi formación académica, desde inicios de la preparatoria hasta los últimos cursos de la licenciatura. Ha sido un gusto volver a coincidir en labores, aunque haya sido diferente la dinámica conforme el paso del tiempo. Muchas gracias por su buen sentido del humor y por estar al pie del cañón en todo momento. Al **Ing. Gerardo**, por haber salvado en más de una ocasión al extrusor. A **Efraín Alday**, que el café y las buenas lecturas abundan y nos acompañen en todo momento y lugar. Al **“Protein Team”** y **“Antioxidantes Team”**, gracias por todo. A **Raymundo E. Picos**, gracias por toda la ayuda desde inicios de la licenciatura y por su destacada participación en la logística, desarrollo, difusión y el seguimiento de las actividades anuales de la *“Pan Tostado Party”*. A **Miguel Martínez Gil**, gracias por facilitarnos el acceso a Polímeros, eres el mejor vecino de todos. Al **Dr. José Carmelo Encinas Encinas**, muchísimas gracias por toda su ayuda y disposición con el manejo de los equipos.

A mis amigos de QB, la clica del benceno: **Roxanna Ortega** (nuestra princesa, que su casa se convirtió en la segunda casa de todos), **Alan Meda** (el no-químico), **Francisco Flores**, **Enrique Enríquez**, **Daniel Varela**, **Samuel Almeida**, **Ana Rentería**, **Milagros Álvarez**, **Cristina Rodríguez**, **Alejandro Tiznado**, **Carolina Leyva**, **Edna González**: ¡¡LOS QUIERO MUCHO!! Muchas gracias por su amistad y por la infinidad de momentos a lo largo de la licenciatura. Fueron los mejores años de ocio, vagancias, desvelos y trabajo en equipo, en su amplio sentido (que incluye a **Nayely Hinostroza**). No tengo palabras para expresar lo tan feliz que me han hecho y de lo mucho que me sorprende cómo hemos cambiado con el paso del tiempo, pero en esencia seguimos siendo los mismos niños raros y ociosos que siempre estarán ahí para apoyarnos. 😊♥️🍷

A **Amaranta Morales** y **Alejandro Gracida**, muchas gracias por ser un pilar en mi vida, no saben cuánto los aprecio y valoro todo lo que hemos pasado por tantos años. A **Iván Canale**, llegaste en el momento más oportuno de todos. Gracias por acompañarme en el laboratorio antes de que saliera la niña que espanta ♥️.

**La Chunny no.**

## CONTENIDO

|  |    |
|--|----|
| FORMA DE APROBACIÓN .....  | 2  |
| AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS .....                                   | 3  |
| CONTENIDO .....  | 5  |
| LISTA DE TABLAS .....  | 8  |
| LISTA DE FIGURAS .....   | 9  |
| RESUMEN.....   | 10 |
| INTRODUCCIÓN.....  | 11 |
| OBJETIVOS .....  | 14 |
| Objetivo General.....  | 14 |
| Objetivos Particulares .....   | 14 |
| REVISIÓN DE LITERATURA.....  | 15 |
| Envasado de Alimentos .....  | 15 |
| Polímeros Empleados para la Elaboración de Envases .....               | 15 |
| Polímeros de Origen Sintético.....                                     | 17 |
| Polímeros de Origen Natural.....                                       | 18 |
| Ácido Poliláctico (APL).....   | 18 |
| Quitosano (QS) .....   | 20 |
| Uso de Plastificantes en Polímeros .....                               | 21 |
| Tecnología de Envases Activos .....                                    | 22 |
| Envases Antimicrobianos.....   | 22 |
| Incorporación de Agentes Antimicrobianos en una Matriz Polimérica..... | 23 |
| Compuestos Antimicrobianos Empleados en Envases Activos .....          | 24 |
| Agentes Antimicrobianos de Origen Sintético.....                       | 24 |
| Agentes Antimicrobianos de Origen Natural.....                         | 24 |
| Ferulato de Etilo (FE). .....  | 25 |
| Bacterias Deteriorativas en Alimentos.....                             | 27 |

|   |    |
|---|----|
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....  | 27 |
| Bacterias Patógenas en Alimentos.....   | 27 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> .....  | 28 |
| METODOLOGÍA.....  | 30 |
| Cepas Bacterianas.....  | 30 |
| Materiales .....  | 30 |
| Evaluación Antibacterial del Ferulato de Etilo (FE).....                              | 31 |
| Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) .....  | 31 |
| Concentración Mínima Letal (CML) .....  | 31 |
| Elaboración de Películas Activas de APL y Quitosano.....                              | 32 |
| Elaboración de Películas Poliméricas.....   | 32 |
| Espesor.....  | 33 |
| Caracterización de Películas Activas de Ácido Poliláctico (APL) y Quitosano (QS)..... | 33 |
| Propiedad Antibacterial .....   | 33 |
| Evaluación por contacto directo. ....   | 33 |
| Conteo de células viables en placa .....  | 34 |
| Viabilidad celular por tinción con azul de tripán. ....                               | 34 |
| Propiedades Mecánicas.....  | 34 |
| Resistencia a la tensión y elongación.....  | 34 |
| Propiedades Ópticas.....  | 35 |
| Determinación de color (CIEL*a*b*). ....  | 35 |
| Transmisión de luz .....  | 35 |
| Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....                                       | 35 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....  | 37 |
| Evaluación Antibacterial del Ferulato de Etilo (FE).....                              | 37 |
| Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) .....  | 37 |
| Concentración Mínima Letal (CML) .....  | 38 |

|  |    |
|--|----|
| Elaboración de Películas Activas de APL y Quitosano .....                      | 39 |
| Elaboración de Películas Poliméricas.....                                      | 39 |
| Espesor.....   | 40 |
| Caracterización de Películas de Ácido Poliláctico (APL) y Quitosano (QS) ..... | 41 |
| Propiedad Antibacterial .....  | 41 |
| Evaluación por contacto directo. ....  | 41 |
| Cuenta de células viables en placa .....                                       | 44 |
| Viabilidad celular por tinción con azul de tripán. ....                        | 46 |
| Propiedades Mecánicas .....  | 48 |
| Resistencia a la tensión y elongación.....                                     | 49 |
| Propiedades Ópticas.....   | 50 |
| Determinación de color (CIEL*a*b*). ....                                       | 51 |
| Transmisión de luz .....   | 52 |
| CONCLUSIONES.....  | 54 |
| RECOMENDACIONES.....   | 55 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....  | 56 |

## LISTA DE TABLAS

| <b>Tabla</b> |  | <b>Página</b> |
|--------------|--|---------------|
| 1            | Estudios relacionados con la elaboración de películas                                    | 23            |
| 2            | Formulaciones para la elaboración de las películas poliméricas de APL                    | 32            |
| 3            | Condiciones de extrusión para la elaboración de las películas poliméricas de APL         | 33            |
| 4            | Determinación del espesor de las películas de APL/quitosano                              | 40            |
| 5            | Efecto de los distintos tratamientos sobre la morfología bacteriana por contacto directo | 44            |
| 6            | Efecto de los distintos tratamientos sobre la cuenta total en placa (Log UFC/mL)         | 45            |
| 7            | Resistencia a la tensión de las películas poliméricas de APL                             | 49            |
| 8            | Elongación de las películas poliméricas de APL   | 50            |
| 9            | Evaluación de color (CIEL *a*b*) de las películas de APL/quitosano                       | 52            |

## LISTA DE FIGURAS

| <b>Figura</b> |  | <b>Página</b> |
|---------------|--|---------------|
| 1             | Clasificación de copolímeros por ordenamiento de sus monómeros   | 16            |
| 2             | Zonas cristalinas y amorfas de los materiales poliméricos  | 17            |
| 3             | Proceso de polimerización a través de la formación de un láctido para la obtención de ácido poliláctico a nivel industrial   | 19            |
| 4             | Diferencia estructural de celulosa, quitina y quitosano  | 21            |
| 5             | Diferencia estructural de ácidos fenólicos en relación con la biosíntesis de lignina, fenilalanina y tirosina  | 26            |
| 6             | Diferencia estructural del ácido ferúlico y ferulato de etilo  | 26            |
| 7             | Procedimiento general para la evaluación de la actividad antibacterial de películas poliméricas  | 30            |
| 8             | Porcentaje de inhibición de las diluciones seriadas realizadas en la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de FE sobre <i>P. fluorescens</i> y <i>S. aureus</i> | 38            |
| 9             | Apariencia de los distintos lotes de película producidos a partir de APL   | 39            |
| 10            | Efecto del FE sobre la morfología bacteriana de <i>P. fluorescens</i> y <i>S. aureus</i> en la evaluación antibacterial de películas activas por contacto directo                    | 42            |
| 11            | Cambio en la apariencia superficial del material   | 44            |
| 12            | Viabilidad celular de las especies de <i>P. fluorescens</i> y <i>S. aureus</i> en la prueba de tinción con azul de tripán sobre los distintos tratamientos                           | 47            |
| 13            | Características de transmisión de luz de las películas de APL/quitosano  | 53            |

## RESUMEN

Los envases activos son un concepto novedoso dentro del ámbito de la industria alimenticia que, según su modalidad, cumple con diversas funciones dentro de las cuales incluye la actividad antimicrobiana. Ésta tiene como objetivo retardar o inhibir el crecimiento de microorganismos que resultan perjudiciales tanto a la integridad de los productos alimenticios como a la salud humana. Debido a los impactos negativos al ambiente por el uso indiscriminado de resinas de base petroquímica y la demanda de productos alimenticios mínimamente procesados, surge como respuesta el desarrollo de envases a partir de biopolímeros y el uso de conservadores de origen natural, que resultan una potencial alternativa para reducir la contaminación y satisfacer al consumidor. Debido a lo anterior, en el presente estudio se desarrollaron películas de ácido poliláctico (APL) incorporadas con quitosano (5%), un derivado éster fenólico como ferulato de etilo (FE) (10 y 15%) y glicerol como plastificante (20%). Se determinó la actividad antibacterial del FE sobre *Pseudomonas fluorescens* y *Staphylococcus aureus* mediante las técnicas de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Letal (CML). Una vez elaborados los lotes de películas mediante extrusión, se procedió a la caracterización de sus propiedades antibacterial, mecánicas y ópticas. La propiedad antibacterial fue evaluada mediante análisis de imágenes, la viabilidad se midió utilizando la tinción con azul de tripán y cuenta de unidades formadoras de colonias (UFC). El FE presentó actividad antibacterial sobre las bacterias de interés, encontrándose una CMI y CML similar en ambas bacterias. Las películas desarrolladas presentaron actividad antibacteriana tanto por efecto de la incorporación de quitosano como por la presencia de FE. En el caso de *Pseudomonas fluorescens* se encontró efecto significativo de los diferentes tratamientos ( $p < 0.05$ ) en morfología y viabilidad, excepto en contacto con la película conteniendo quitosano y 10% de FE ( $p < 0.05$ ) aunque fue posible observar agregación de las células bacterianas. Por otra parte, las películas ocasionaron cambios significativos ( $p < 0.05$ ) respecto al control, en la morfología e inhibición en el desarrollo de *Staphylococcus aureus*, excepto en contacto de la película incorporada con FE al 10% ( $p > 0.05$ ). Mediante la cuenta de células viables, no fue posible observar efecto antibacteriano de los tratamientos. En cuanto a las propiedades mecánicas y ópticas de las películas, estas fueron afectadas por la incorporación de los diferentes componentes. Con base en los resultados del presente estudio, la incorporación del FE presenta potencial uso en la producción de envases activos alimenticios; sin embargo, se requiere profundizar en su estudio para establecer su efecto antibacterial en diferentes sistemas poliméricos y alimenticios.

## INTRODUCCIÓN

A nivel global, se estima que se desperdicia aproximadamente un tercio del total de alimentos producidos para el consumo humano, que equivale a 1.3 millones de toneladas al año. Estas pérdidas afectan en gran medida la seguridad y calidad alimentaria de la población de escasos recursos, su desarrollo económico y al medio ambiente; también representan el excesivo uso de los recursos naturales e insumos empleados en la producción, que generan emisiones de CO<sub>2</sub> innecesarias. Las causas varían en todo el mundo según sea la situación local para un determinado país, las cuales se encuentran mayormente influenciadas por las cadenas de comercialización y los canales de distribución, las prácticas de compra y uso de los alimentos (FAO, 2011). Una de las principales causas de estos desperdicios es la susceptibilidad de estos alimentos al deterioro.

El deterioro de alimentos se aprecia cuando se presentan cambios indeseables en los atributos del perfil sensorial del alimento (color, olor, textura, sabor), los cuales lo hacen menos apetecible para el consumidor; esto es el resultado de distintas causas, las cuales pueden ser por daño de insectos, daño físico según el tratamiento aplicado durante su procesamiento, o cambios químicos enzimáticos y no enzimáticos. La principal causa del deterioro de alimentos es de origen microbiano, que se produce debido a la actividad bioquímica de los microorganismos que, para poder subsistir, metabolizan nutrientes como carbohidratos (simples o complejos), proteínas y grasas. Entre las principales bacterias deteriorativas en alimentos refrigerados como carnes y productos de origen marino, destaca *Pseudomonas*, bacteria Gram (-) constituida por bacilos que presentan gran potencial metabólico. Entre estas, *P. fluorescens* tiene importancia ya que se ha reportado como el principal microorganismo en alimentos frescos altamente perecederos, frutas enlatadas, vegetales, carne, pescado, leche y huevo. Desde el punto de vista de salud, los microorganismos que se relacionan con las enfermedades de transmisión por alimentos (ETA) son los patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*. Entre estos, *Staphylococcus aureus*, bacteria Gram (+), es uno de los principales causantes de intoxicaciones debido a su producción de enterotoxinas que, al ser ingeridas y absorbidas por el organismo, ocasiona gastroenteritis. Actualmente se da énfasis en que los alimentos, además de contener un valor nutrimental adecuado, también deben ser microbiológicamente seguros para su consumo (Dilbaghi y Sharma, 2007).

Una de las metodologías de conservación utilizadas actualmente es el uso de envases activos que permiten mantener la vida de anaquel, la seguridad y la calidad del alimento. Existen envases con actividad antimicrobiana, los cuales se obtienen mediante la incorporación

de un agente activo dentro de la matriz polimérica o sobre la superficie de contacto del material de envase con el alimento, que se espera que migren y ejerzan su función específica en el alimento envasado (Bastarrachea y col., 2015). Esto podría presentar un efecto mayor que la aplicación directa del agente activo en la superficie del alimento, ya que proporciona una liberación continua de los aditivos activos desde el material de envase (Peng y col., 2013). El principal material polimérico base que se emplea son las poliolefinas. El uso indiscriminado de estas resinas de base petroquímica ha contribuido a los problemas de contaminación, lo cual ha incrementado el interés de la elaboración de sistemas de envases para alimentos que provengan de fuentes renovables y potencialmente biodegradables. Dos polímeros biodegradables frecuentemente utilizados en envases son el ácido poliláctico y el quitosano (Nobile y col., 2009).

El ácido poliláctico (APL) es un biopolímero termoplástico cuya molécula precursora es el ácido láctico. Este biopolímero se utiliza ampliamente debido al alto rango de propiedades que presenta, entre las cuales se destaca su biodegradabilidad, propiedades de barrera y biocompatibilidad; éstas se pueden modificar al manipular los pesos moleculares, las mezclas entre los isómeros D (-) y L (+) y la copolimerización. Esto resulta en una alternativa potencial al uso de plásticos de origen petroquímico en la producción de envases para alimentos (Serna y col., 2003), ya que se producen películas rígidas de alta transparencia además de que su procesamiento es accesible (Bonilla y col., 2013).

Otro biomaterial de interés es el quitosano, un polisacárido catiónico natural derivado de la quitina que se encuentra en el exoesqueleto de los crustáceos y de insectos aunque también puede encontrarse en la pared celular de los hongos (Martínez-Camacho y col., 2010). Es un recurso natural renovable y no presenta toxicidad. Se compone químicamente por piranosas de  $\beta$ -(1-4)-2-amino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucosa unidas mediante un enlace glucosídico. Principalmente se obtiene de la desacetilación de la quitina en condiciones alcalinas (Aljawish y col., 2014). Las películas obtenidas a partir de este biopolímero exhiben alta sensibilidad a la humedad y presentan baja propiedad de barrera, por lo que en su aplicación en alimentos se debe asociar este polisacárido con un polímero con mayor resistencia a condiciones de humedad, con la finalidad de que permanezca la biodegradabilidad global del producto (Bonilla y col., 2013). Dentro de la matriz polimérica del quitosano se encuentran presentes grupos funcionales que se han relacionado con su actividad biológica (Moreno-Vásquez y col., 2016), como las actividades hipocolesterolemica, antioxidante, antimitótica, antiinflamatoria y antimicrobiana, que corresponden directamente a posibles aplicaciones biológicas (Xia y col., 2010).

Por otra parte, también ha surgido interés en la investigación de compuestos biológicamente activos que proceden de fuentes naturales, como es el caso del ferulato de etilo. Éste es un derivado alquil éster del ácido ferúlico, que ha generado interés debido a sus diversas propiedades biológicas incluidas antioxidante, antiinflamatoria, neuroprotectora, antiproliferativa y antimicrobiana (Rahman y col., 2014). El ácido ferúlico se encuentra ampliamente distribuido en alimentos, principalmente en cereales. Es un metabolito de la biosíntesis de lignina, fenilalanina y tirosina en plantas, puede encontrarse tanto de manera libre como conjugada en el salvado de granos y en la cáscara de frutas y vegetales (Zhao y Moghadasian, 2008). El ferulato de etilo se diferencia estructuralmente de su ácido precursor, el ácido ferúlico, por el incremento de la cadena de alquilo con un grupo éster. Esto reduce su polaridad, dándole mayor afinidad a los compuestos no polares como los lípidos, este compuesto ha mostrado actividad antimicrobiana que se ha atribuido a su lipofilidad, la cual facilita la penetración a través de las membranas celulares bacterianas (Merkl y col., 2010). En el presente estudio se desarrollaron películas, mediante una técnica de extrusión plana, a partir de ácido poliláctico y quitosano incorporadas con ferulato de etilo, con la finalidad de evaluar su actividad antibacteriana.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Evaluar la actividad antibacterial de películas de ácido poliláctico/quitosano incorporadas con ferulato de etilo sobre *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

### **Objetivos Particulares**

1. Determinar el efecto antibacterial del ferulato de etilo (FE) sobre cepas de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
2. Elaborar películas de ácido poliláctico/quitosano adicionadas con ferulato de etilo, mediante un método de extrusión.
3. Determinar el efecto antibacterial de las películas desarrolladas.
4. Determinar las propiedades ópticas y mecánicas de las películas desarrolladas.

## **REVISIÓN DE LITERATURA**

### **Envasado de Alimentos**

El envasado es uno de los procesos más importantes para mantener la calidad de los alimentos. Su principal propósito es el de brindarles protección ante cualquier factor externo que dañe su integridad, que puede originarse por la manipulación del producto durante el proceso o por contaminación de fuentes físicas, químicas o biológicas. Además de reducir cambios indeseables en la composición del producto provocados por fenómenos de transferencia de masa como la absorción de humedad y olores indeseables, invasión de oxígeno, pérdida de sabor, y la transferencia de componentes del envase hacia el alimento, entre otros (Prasad y Kochhar, 2014).

Las propiedades de barrera de los materiales para la elaboración de envase influyen significativamente en la preservación de la calidad y frescura de los productos durante su distribución y almacenamiento. Por lo anterior, es necesario conocer las propiedades de los materiales poliméricos utilizados para una adecuada selección del envase de acuerdo a las características y requerimientos del alimento (Ebnesajjad, 2014).

### **Polímeros Empleados para la Elaboración de Envases**

Debido a la susceptibilidad de muchos productos alimenticios al deterioro por contaminación microbiana, se desarrollan continuamente nuevas tecnologías de envasado para prevenir o impedir esta contaminación, con el propósito de mantener la frescura y prolongar la vida útil. En los últimos años, la principal fuerza impulsora al desarrollo e innovación en la tecnología de envasado ha sido la demanda por parte de los consumidores de alimentos mínimamente procesados. El envasado desempeña un papel importante, por lo que el material polimérico base debe cumplir con características deseables, tales como suavidad, ligereza y transparencia. Los materiales comúnmente utilizados para la elaboración de envases dirigidos a la industria de alimentos son plásticos (Moreno-Vásquez y col., 2016).

Los componentes básicos de los plásticos son los polímeros, los cuales se definen como macromoléculas conformadas por muchas unidades repetidas llamadas monómeros, que se encuentran enlazadas covalentemente, formando cadenas largas que se obtienen a partir de reacciones de polimerización, ya sea por adición o por condensación. La naturaleza de la unidad del monómero en la cadena produce propiedades específicas. En términos de

composición química existen dos tipos de polímeros: los homopolímeros y los heteropolímeros. Los primeros se refieren a la clase de polímeros conformados por la repetición de una sola unidad monomérica. En cuanto a los heteropolímeros, éstos se encuentran conformados por al menos dos tipos de unidades repetitivas; se clasifican en función de cómo se disponen estas unidades a lo largo de la cadena, que pueden ser alternadas, aleatorias, de bloque o de injerto (Figura 1). Comúnmente los polímeros se describen en función de su comportamiento mecánico y térmico (Askeland, 2004).

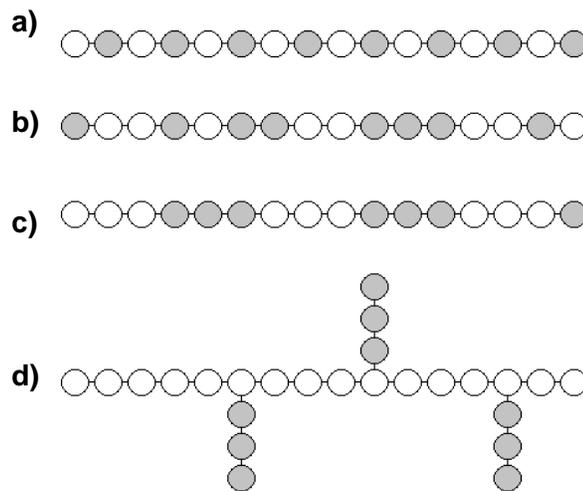


Figura 1. Clasificación de copolímeros por ordenamiento de sus monómeros: a) alternada, b) aleatoria, c) en bloque y d) de injerto.

Dependiendo de su respuesta al calor pueden pertenecer a dos categorías: termoestables o termoplásticos. Los polímeros termoestables son aquellos que no presentan deformación frente a un aumento de temperatura debido al arreglo de red de cadenas que presentan unidos a través de ramificaciones ensambladas mediante enlaces covalentes, en lugar de ablandarse tienden a degradarse, ya que su movimiento de cadena se ve limitado. Caso contrario a los anteriores, los polímeros termoplásticos tienen la capacidad de fundirse al calentamiento y adoptar cualquier forma al momento de enfriarse, estos materiales pueden suavizarse, procesarse y reprocesarse mediante la aplicación de temperatura y presión. Estos materiales también pueden clasificarse de acuerdo al grado de orden dentro de su estructura global como amorfos o cristalinos, lo cual depende tanto del polímero como de la técnica de procesamiento. Cuando una resina se enfría de la fusión, las cadenas poliméricas pueden entrelazarse aleatoriamente dando como resultado la formación de pliegues (zonas amorfas), o

pueden alinearse en estructuras altamente ordenadas (cristalinidad) (Figura 2). Debido a lo anterior, estos materiales son de interés industrial debido a que pueden moldearse por diferentes técnicas, un ejemplo de esto es por extrusión.

Existen distintos criterios de clasificación para los polímeros, dentro de los cuales cabe mencionar la fuente u origen de procedencia de los mismos, que pueden ser sintéticos o naturales (McKeen, 2017).

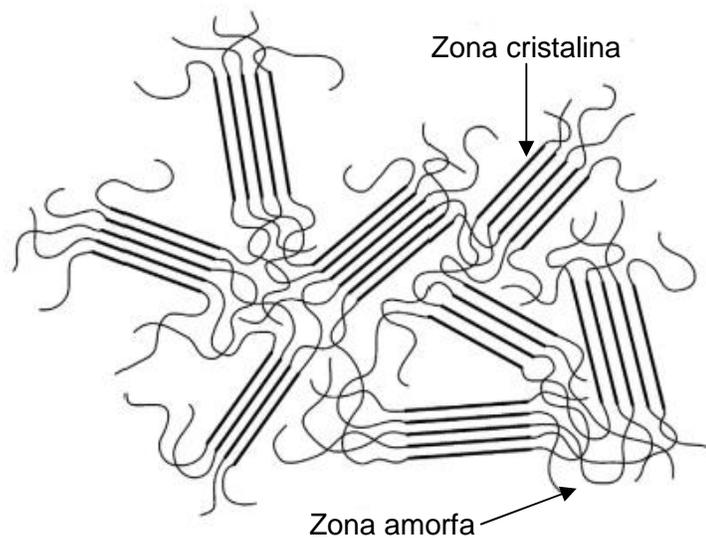


Figura 2. Zonas cristalinas y amorfas de los materiales poliméricos. Fuente: McKeen (2017).

### **Polímeros de Origen Sintético**

A nivel industrial, tradicionalmente se emplean resinas de base petroquímica para la producción de envases, los cuales incluyen poliolefinas, poliésteres, cloruro de polivinilo, cloruro de polivinilideno, poliestireno, poliamida y alcohol vinílico. Las más representativas son las poliolefinas. Éstas se conforman a partir de monómeros de hidrocarburos que pueden presentar dobles o triples enlaces carbono-carbono (alquenos y alquinos, respectivamente). Un alqueno, también llamado olefina, se define como un compuesto químico conformado únicamente por átomos de carbono e hidrógeno que contienen al menos un doble enlace carbono-carbono. Las estructuras más simples presentan un solo enlace doble y ningún otro grupo funcional, que forman una serie homóloga de hidrocarburos de fórmula general  $C_nH_{2n}$ ; un ejemplo de esto es el etileno. Cuando se polimeriza, forma polietileno, que es el plástico que representa la mayor

parte del mercado de producción de películas de plástico, ya que muestra una excelente combinación de propiedades, tales como flexibilidad, resistencia, ligereza, estabilidad, resistencia química y fácil procesabilidad. Sin embargo, el uso indiscriminado de estas resinas de base petroquímica ha contribuido a los problemas de contaminación; como respuesta se ha incrementado la tendencia hacia la elaboración de sistemas de envases para alimentos que provengan de fuentes renovables y potencialmente biodegradables para mejorar su huella ecológica (Ebnesajjad, 2014; Nobile y col., 2009).

### **Polímeros de Origen Natural**

El empleo de materiales poliméricos de origen natural (biopolímeros) ofrece una alternativa para el desarrollo e innovación de nuevos productos biodegradables que puede minimizar considerablemente los problemas de contaminación en el medio ambiente, ya que tienen una vida útil corta que resulta excelente para aplicaciones a corto plazo, como lo es el envasado de alimentos. La naturaleza de la estructura molecular del monómero utilizado en la polimerización influye directamente en las propiedades que se requieren en las distintas áreas de trabajo, tales como: estabilidad térmica, flexibilidad, buena barrera para gases y agua, resistencia a productos químicos, biocompatibilidad y biodegradabilidad. La total biodegradación de los biopolímeros en productos como dióxido de carbono, agua y posteriormente en abono orgánico es una gran ventaja frente a los polímeros sintéticos y tienen el potencial de reemplazarlos.

Los biopolímeros pueden provenir de diferentes fuentes, tales como: animal (colágeno/gelatina), marino (quitina/quitosano), agrícola (lípidos y grasas e hidrocoloides: proteínas y polisacáridos) y microbiano [ácido poliláctico (APL) y polihidroxicanoatos (PHA)] (Gabor y Tita, 2012; Garavand y col., 2017; Torres-Huerta y col., 2014).

### **Ácido Poliláctico (APL)**

El APL es un poliéster termoplástico cuyas unidades monoméricas de ácido láctico (ácido-2-hidroxi propiónico) se disponen de manera lineal. Se deriva de recursos naturales renovables como el almidón de maíz, caña de azúcar, arroz, entre otros; que son fácilmente biodegradables. Este biomaterial presenta diversas propiedades que resultan de gran interés, que incluyen propiedades mecánicas deseables, estabilidad térmica, procesabilidad y bajo impacto ambiental. De manera general, para poder sintetizarlo se llevan a cabo dos etapas: 1) producción de ácido láctico a través de síntesis química o fermentación bacteriana, y 2) polimerización del ácido

láctico por condensación directa, o deshidratación azeotrópica y apertura del anillo de láctida (un dímero cíclico resultante de la deshidratación del ácido láctico en condiciones suaves y sin disolvente). Lo anterior se representa de manera gráfica en la Figura 3 (Carrasco y Maspoeh, 2012; Chen y col., 2005; Gabor y Tita, 2012; Islam, 2012).

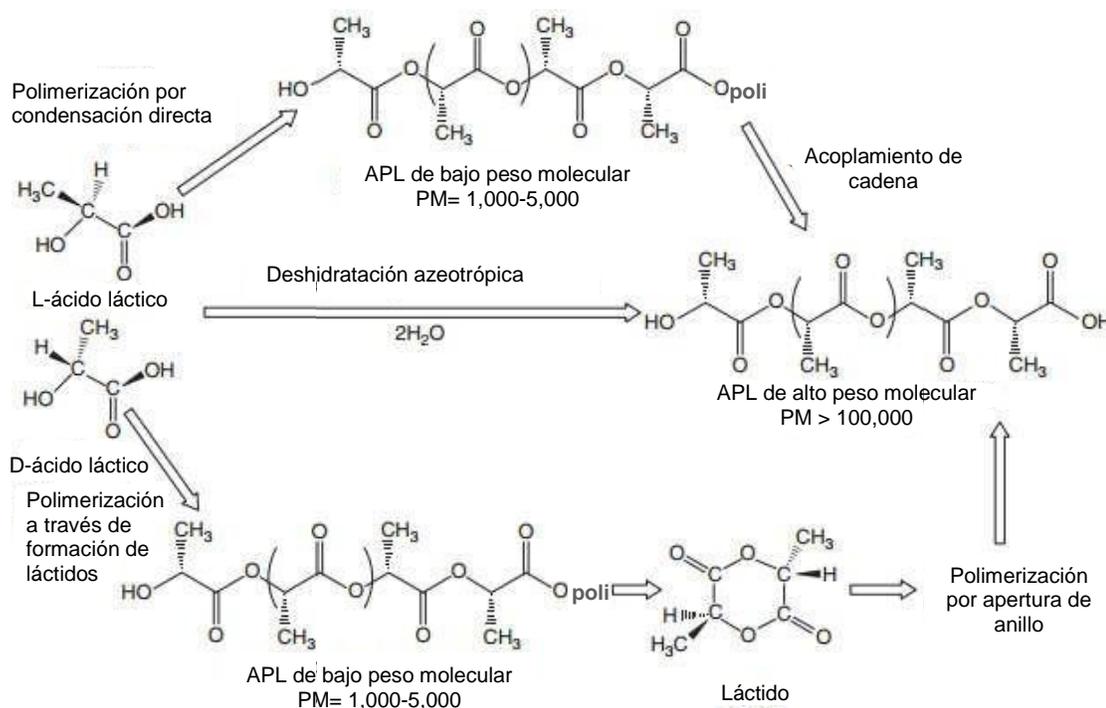


Figura 3. Proceso de polimerización a través de la formación de un láctido para la obtención de ácido poliláctico a nivel industrial. Fuente: Avérous (2013).

La obtención por síntesis química a partir de reservas de petróleo sólo puede producir mezclas racémicas de ácido láctico (conformación D y L). El método más utilizado por la industria es por fermentación bacteriana, ya que puede producir estereoisómeros de ácido láctico ópticamente puros [L (+) o D (-)], que le otorgan propiedades físicas deseadas al producto final en su polimerización. Este proceso puede clasificarse de dos maneras según el tipo de bacterias utilizadas: heterofermentativo y homofermentativo. Este último se emplea para la producción de APL a nivel industrial, debido a que conduce a mayores rendimientos de ácido láctico y niveles más bajos de subproductos como ácido acético, etanol, glicerol, manitol y dióxido de carbono (Islam, 2012). La mayoría de los procesos de fermentación utilizan especies de *Lactobacillus*, como *Lactobacillus delbrueckii*, *L. amylophilus*, *L. bulgaricus* y *L. leichmanii*.

Las condiciones de procesamiento son en un intervalo de pH y temperatura de 5.4 a 6.4, y de 38 a 42 °C, respectivamente; a una concentración baja de oxígeno (Castro-Aguirre y col., 2016).

### **Quitosano (QS)**

Los polisacáridos tales como derivados de celulosa han sido reportados como materia prima para la elaboración de películas comestibles y revestimientos que potencialmente pueden utilizarse como material de envasado para la conservación de alimentos. Un ejemplo de estos derivados es el quitosano, que se obtiene como producto final de la N-desacetilación alcalina (total o parcial) de la quitina (Cazón y col., 2016).

La quitina es el segundo polímero más abundante en la naturaleza. Forma parte del exoesqueleto de crustáceos, insectos y pared celular de hongos, por lo que resulta comercialmente disponible la obtención de quitosano a partir de fuentes renovables, principalmente residuos de la industria de crustáceos. Su composición química se asemeja a la celulosa, a excepción de un grupo funcional ubicado en el carbono 2. Mientras la celulosa posee un grupo hidroxilo, la quitina posee un grupo acetamida (-NHCOCH<sub>3</sub>). El quitosano es su principal derivado desacetilado y está formado por unidades de glucosamina (2-amino-2-desoxi-D-glucosa) enlazadas por uniones β (1-4). El proceso para su extracción involucra la eliminación parcial de los grupos acetilos de las cadenas poliméricas, en cuyo lugar queda un grupo amino (-NH<sub>2</sub>) característico del quitosano. Estas diferencias estructurales se muestran en la Figura 4 (Elsabee y Abdou, 2013).

Dentro de la matriz polimérica del quitosano se encuentran tres tipos de grupos funcionales reactivos: amino, hidroxilos primario y secundario en las posiciones C-2, C-3 y C-6, respectivamente. Los grupos amino son la razón principal de sus propiedades fisicoquímicas que están correlacionadas con su quelación, floculación y funciones biológicas como la actividad antioxidante y antimicrobiana (Moreno-Vásquez y col., 2017). El quitosano presenta propiedades interesantes tales como excelente capacidad de formación de películas y propiedades de barrera de gas y aroma en condiciones secas, lo que lo hace un material adecuado para diseñar revestimientos de alimentos y estructuras de envasado (Hosseinnejad y Jafari, 2016). Resulta de gran interés debido a sus particulares características biológicas de biocompatibilidad, baja toxicidad y biodegradabilidad. Estas características lo hacen un biomaterial aplicable en las áreas de la farmacéutica, la biomedicina y la industria (Raafat y Sahl, 2009).

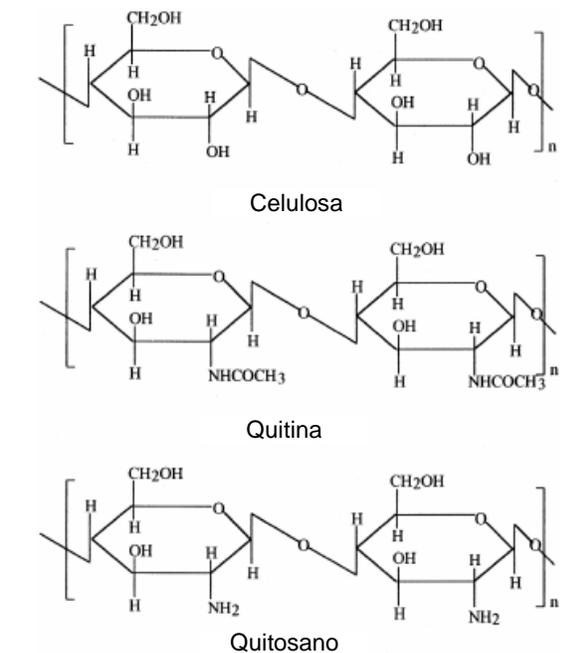


Figura 4. Diferencia estructural de celulosa, quitina y quitosano. Fuente: Kumar (2000).

### Uso de Plastificantes en Polímeros

Los plastificantes son compuestos no volátiles de bajo peso molecular, que pueden ser utilizados como aditivos en la industria. Su principal función es la de mejorar la flexibilidad y el procesamiento del material polimérico, lo cual se logra al disminuir la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ). La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, más conocida por sus siglas en inglés IUPAC, define a los plastificantes como "sustancia o material incorporado en un material (generalmente un plástico o un elastómero) para aumentar su flexibilidad, facilidad de procesamiento o distensibilidad". Estas sustancias tienen la capacidad de reducir la tensión de deformación, dureza, densidad, viscosidad y carga electrostática de un material polimérico, que a su vez aumentan la flexibilidad de la cadena polimérica, la resistencia a la fractura y la constante dieléctrica. Otras propiedades también se ven afectadas, como el grado de cristalinidad, la claridad óptica, la conductividad eléctrica, el comportamiento al fuego y la resistencia a la degradación biológica, entre otras propiedades físicas.

Recientemente ha surgido interés e investigación en el uso de estas sustancias, principalmente se centran en polioles tales como el glicerol, etilenglicol (y derivados de éste),

sorbitol, manitol y xilitol en materiales poliméricos de origen natural para la producción de películas comestibles y biodegradables como polisacáridos, proteínas y compuestos lipídicos (Vieira y col, 2011).

### **Tecnología de Envases Activos**

El envasado se ha utilizado tradicionalmente para brindarle protección al alimento contra las condiciones externas, que permite prolongar su vida útil. La función del envasado ha evolucionado desde simples métodos de conservación hasta incluir aspectos tales como conveniencia, comercialización de puntos de venta, reducción de materiales, seguridad, protección contra manipulaciones y cuestiones ambientales. Un buen ejemplo de innovación es el envasado activo que, más allá de cumplir con su función tradicional; el envase, el producto y su entorno interactúan para prolongar la vida útil de los alimentos o mejorar las propiedades sensoriales, seguridad y calidad de los alimentos envasados.

Esta tecnología se basa en el concepto de incorporación de ciertos componentes en sistemas de envasado que se liberan o absorben sustancias que permiten mantener la frescura e integridad del alimento. Existen diferentes modalidades, entre ellas se encuentran los sistemas de captación de oxígeno y humedad, así como los generadores de dióxido de carbono y etanol, por último se encuentran los envases que contienen un compuesto activo, como un antioxidante o un antimicrobiano dentro de su matriz polimérica (Realini y Marcos, 2014).

### **Envases Antimicrobianos**

El sistema de envasado antimicrobiano es un desarrollo novedoso que incorpora un agente antimicrobiano en una matriz polimérica. Esta modalidad en los envases tiene la función de extender la fase de latencia o retardo a la vez que reduce la tasa de crecimiento de los microorganismos, esto con el fin de conservar la calidad y extender la vida de anaquel de los productos alimenticios. En la Tabla 1 se muestran estudios relacionados con la formulación de películas a partir de APL y quitosano con modalidad antibacterial sobre distintas bacterias como modelo de estudio. Actualmente no se ha reportado el desarrollo de películas formuladas a partir de mezclas de los materiales anteriormente mencionados con la incorporación de ferulato de etilo como agente activo, por lo que su caracterización y evaluación es importante para conocer si existe un incremento en la actividad antibacterial por la mezcla de los componentes.

Tabla 1. Estudios relacionados con la elaboración de películas.

| Autor                       | Estudio  | Material      |
|-----------------------------|--|---------------|
| Nobile y col., 2008         | Evaluación antibacterial de extracto de limón y timol sobre <i>Pseudomonas</i> spp.                      | APL           |
| Chen y col., 2009           | Evaluación antibacterial de eugenol y carvacrol sobre <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>                  | Quitosano     |
| Bonilla y col., 2013        | Evaluación antibacterial de películas sobre mesófilos aerobio y coliformes                               | APL/quitosano |
| Moreno-Vásquez y col., 2017 | Evaluación antibacterial de galato de epigallocatequina sobre <i>S. aureus</i> y <i>Pseudomonas</i> spp. | APL           |

Es importante conocer la naturaleza de los microorganismos para la correcta selección y aplicación del agente antimicrobiano que ejercerá su función sobre un determinado alimento; esto puede consistir en la composición de la pared celular [Gram (+) o Gram (-)], requerimientos de oxígeno (aerobio o anaerobio), etapas de crecimiento, temperaturas óptimas de desarrollo (mesófilo, termófilo o psicrófilo), pH, entre otros factores (Malhotra y col., 2015; Muriel-Galet y col., 2012).

### **Incorporación de Agentes Antimicrobianos en una Matriz Polimérica**

El envasado con modalidad antimicrobiana es una alternativa a la aplicación directa de agentes antimicrobianos sobre la superficie del alimento, ya sea mediante pulverización o por inmersión. La incorporación de estos compuestos a los materiales poliméricos le confiere al envase la capacidad de inhibir o limitar el crecimiento microbiano a medida que el agente se disuelve del material en la superficie del producto alimenticio. Esta actividad antimicrobiana se logra con agentes químicos y antimicrobianos de origen natural. Sin embargo, distintos problemas significativos tales como problemas de salud, ambientales y una mayor demanda de alimentos libres de aditivos, limitan el uso de agentes antimicrobianos químicos en los envases de alimentos. Como respuesta a estas exigencias, ha surgido un gran interés en la investigación en el uso de compuestos con actividad antimicrobiana que provengan de fuentes naturales, que incluyen ácidos orgánicos, bacteriocinas, enzimas, aceites esenciales y extractos de hierbas para su potencial aplicación (Ayana y col., 2009).

## **Compuestos Antimicrobianos Empleados en Envases Activos**

El interés por el envasado con modalidad antimicrobiana ha incrementado considerablemente. Lo anterior ha surgido como respuesta para satisfacer la demanda de alimentos mínimamente procesados por parte del consumidor. Estos sistemas de envasado con actividad antimicrobiana tienen la capacidad de controlar los cambios indeseables producidos por microorganismos en los productos alimenticios, por lo que la incorporación de agentes antimicrobianos dentro de la matriz polimérica (que pueden ser sintéticos o de origen natural) resulta una alternativa a la aplicación directa de compuestos activos sobre la superficie de alimentos (Mastromatteo y col., 2010).

### **Agentes Antimicrobianos de Origen Sintético**

Los compuestos antimicrobianos de origen sintético se utilizan tradicionalmente por la industria de alimentos (también llamados conservadores), en su mayoría son ácidos orgánicos débiles, tales como los ácidos acético, benzoico, láctico, cítrico, málico, tartárico, propiónico, fumárico y sórbico, por nombrar algunos; también se hace uso de sus respectivas sales (Cha y Chinnan, 2004).

### **Agentes Antimicrobianos de Origen Natural**

Los compuestos provenientes de fuentes naturales han sido de gran interés para la industria de alimentos y también por parte del consumidor debido a dos principales factores: 1) al uso indiscriminado de antibióticos y la resistencia de los microorganismos ante ellos, y 2) el aumento de consciencia de los consumidores sobre el potencial impacto negativo a la salud generado por los conservadores sintéticos adicionados a los productos alimenticios. Lo anterior ha impulsado a la industria alimentaria a buscar compuestos derivados de fuentes naturales como una alternativa que tenga el potencial de mejorar la seguridad y la calidad de los alimentos, ya que presentan propiedades antimicrobianas frente a una amplia gama de patógenos transmitidos por los alimentos. Estos compuestos pueden provenir de diferentes fuentes incluyendo plantas, animales, bacterias, algas y hongos.

En su mayoría, se han realizado diversos estudios relacionados con los compuestos derivados de plantas, que han sido utilizados desde épocas antiguas ya sea para impartir sabor y color. Estos compuestos son en mayor proporción metabolitos secundarios que poseen

diversos beneficios incluyendo propiedades antimicrobianas frente a microorganismos patógenos y de deterioro, los cuales incluyen quinonas, saponinas, flavonoides, taninos, cumarinas, terpenoides, alcaloides, fenoles y ácidos fenólicos. Las variaciones en la estructura y composición química de estos compuestos dan lugar a diferencias en su acción antimicrobiana. De los anteriormente mencionados, se han realizado diversos estudios enfocados a los ácidos fenólicos, los cuales se clasifican en dos grupos: derivados de ácido hidroxibenzoico y derivados de ácido hidroxicinámico. Del segundo grupo, un derivado de interés es el ferulato de etilo (Boz, 2015; Gyawali e Ibrahim, 2014).

**Ferulato de Etilo (FE).** Los ácidos fenólicos están químicamente constituidos por al menos un anillo aromático en donde uno o más de sus hidrógenos se componen por un grupo hidroxilo. Estos compuestos son metabolitos secundarios de las plantas, que son producidos para protegerse de cualquier factor ambiental como la luz ultravioleta, ataque por insectos, virus o bacterias. Uno de los ácidos fenólicos más estudiados es el ácido ferúlico (Heleno y col., 2015).

El ácido ferúlico [ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxicinámico)] es un metabolito de la biosíntesis de lignina, fenilalanina y tirosina en plantas (Figura 5), que puede encontrarse tanto de manera libre como conjugada en el salvado de granos y en la cáscara de frutas y vegetales (Zhao y Moghadasian, 2008); en cereales como el maíz (aproximadamente 1 g de ácido ferúlico por kg) puede obtenerse un rendimiento alrededor del 2% (p/p) al aislarlo del pericarpio obtenido en los procesos de molienda húmeda (Gámez de León y Sánchez-González, 2006). A partir de este compuesto puede obtenerse el ferulato de etilo (FE).

El FE es un derivado alquil éster que se diferencia estructuralmente del ácido ferúlico por el aumento de su cadena de alquilo con un grupo funcional éster (Figura 6), el cual se encuentra relacionado con potenciales funciones biológicas como antioxidante, antiinflamatoria, neuroprotectora, antiproliferativa y antimicrobiana (Rahman y col., 2014). Existen pocos estudios sobre su síntesis y mecanismo de acción. Sin embargo, un método de obtención reportado por Kumar (2010) propone una reacción de esterificación enzimática del ácido ferúlico en presencia de alcohol donde se produjeron alrededor de 68 mM de FE.

La propiedad antimicrobiana del FE han resultado de gran interés debido a la afinidad que presenta hacia los compuestos no polares como los lípidos, lo que facilita la penetración a través de las membranas celulares bacterianas y, por consecuencia, interfiere con el intercambio de nutrientes (Merkl y col., 2010). Debido a lo anterior, en el presente estudio se hizo la selección de este compuesto para la evaluación de su potencial actividad antimicrobiana.

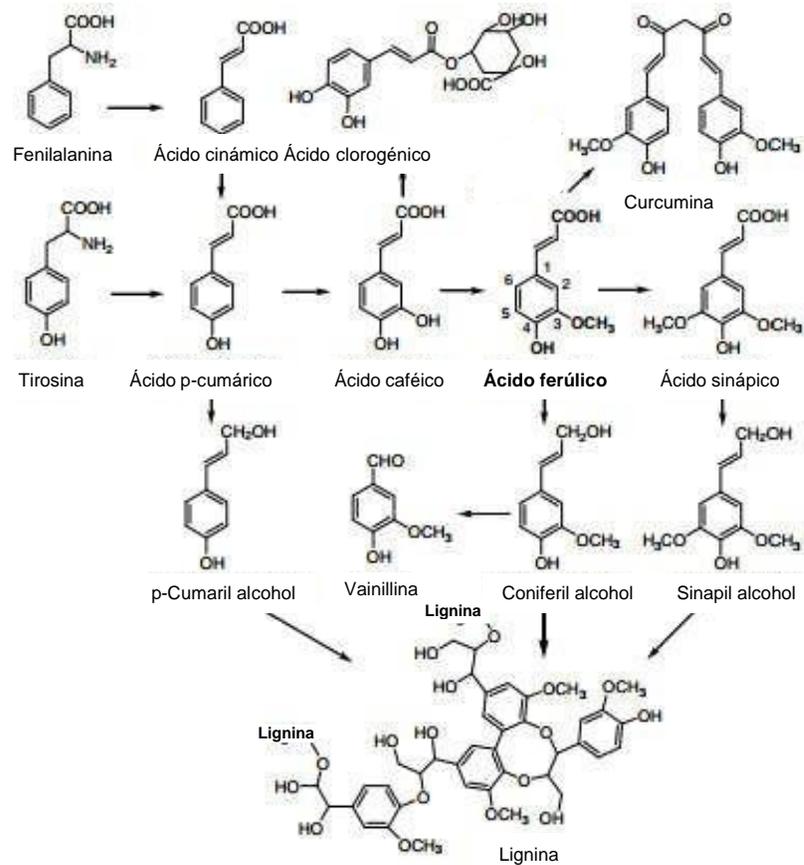


Figura 5. Diferencia estructural de ácidos fenólicos en relación con la biosíntesis de lignina, fenilalanina y tirosina. Fuente: Zhao (2008).

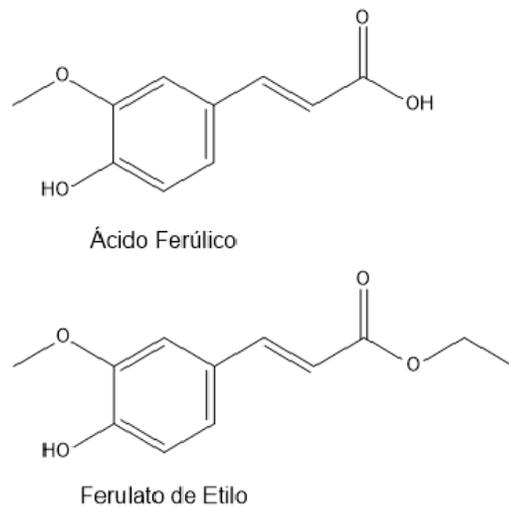


Figura 6. Diferencia estructural del ácido ferúlico y ferulato de etilo.

## **Bacterias Deteriorativas en Alimentos**

El deterioro se caracteriza por la presencia de cualquier cambio en el perfil sensorial del alimento, que resulta indeseable para el consumidor. Dentro de los distintos factores externos que pueden dañar la integridad de los productos alimenticios, ya sean físicos, químicos (oxidación, cambio de color) o biológicos. La principal causa es por acción microbiana, que pueden ser hongos, levaduras y bacterias, Gram (+) o Gram (-). Puede manifestarse como crecimiento visible (limo, colonias), cambios en la textura (degradación de polímeros), color, olores y sabores desagradables. Esta problemática sigue presentándose a pesar de que dentro de la industria de alimentos se toman las medidas necesarias de seguridad para prevenir la contaminación en los productos alimenticios (cadenas de frío, tratamientos térmicos, uso de conservadores, entre otros). Entre las bacterias de interés en alimentos en relación al deterioro, destaca *Pseudomonas fluorescens* (Dilbaghi y Sharma, 2007; Gram y col., 2002).

### ***Pseudomonas fluorescens***

*Pseudomonas fluorescens* es un bacilo Gram (-) con flagelación polar que le permite movilidad. Es ubicuo en ecosistemas de suelo y agua. En general, las especies pertenecientes al género de *Pseudomonas* crecen rápidamente y son conocidas por su versatilidad metabólica, ya que tienen la capacidad de utilizar como sustrato una amplia gama de compuestos orgánicos e inorgánicos. *P. fluorescens* desempeña un papel importante en la industria de alimentos debido a que es responsable del deterioro de distintos tipos de alimentos, los cuales incluye productos de origen marino frescos y procesados, así como también carnes y productos lácteos incluso en condiciones refrigeradas (Kacániová y col., 2017; Moore y col., 2006).

## **Bacterias Patógenas en Alimentos**

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) se producen debido a la contaminación de microorganismos patógenos, como resultado de las incorrectas condiciones de procesamiento, manipulación, almacenamiento y distribución. Éstas tienen un grave impacto en la industria alimenticia ya que traen consigo la pérdida de reputación y por consecuencia la bancarrota. Por esto, es de especial importancia el uso de pruebas microbiológicas en los programas de seguridad alimenticia para la prevención de ETA, con la finalidad de tener un mayor conocimiento y comprensión de la naturaleza de los microorganismos (Rivera y col., 2017).

Los productos alimenticios, además de cumplir con los requerimientos nutricionales adecuados, también deben ser microbiológicamente seguros para su consumo. Los microorganismos más frecuentes relacionados con las ETA son los patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*. Este último se ha identificado como uno de los patógenos más prevalentes y una bacteria causal importante en enfermedades humanas y animales (Dilbaghi y Sharma, 2007).

### ***Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* es un coco Gram (+) que puede agruparse ya sea en pareja o en forma de racimo. Esta bacteria es de interés en alimentos debido a que es capaz de producir grandes cantidades de toxinas; las más importantes se conocen como enterotoxinas, las cuales al ser ingeridas generan enfermedades como la gastroenteritis. Alrededor de 30 g de alimento que contiene toxinas producidas por  $10^6$  a  $10^7$  células por gramo o mL, para un individuo sano normal es suficiente para causar los síntomas que se manifiestan aproximadamente entre 2 a 8 horas después de la ingestión, los cuales incluyen sudoración, escalofríos, dolor de cabeza y deshidratación (Dilbaghi y Sharma, 2007).

La principal causa de los brotes es la incorrecta manipulación de los alimentos, ya sea en las operaciones de servicio de alimentos o en el hogar. Los alimentos en riesgo son todos aquellos que están sujetos a manipulación manual después de cualquier tratamiento térmico (cocción, pasteurización, etc.). Los tratamientos térmicos eliminan la mayor parte de la microbiota natural de los alimentos, permitiendo que los estafilococos introducidos después del manejo crezcan sin competencia (Schmitt y Schuler-Schmid, 1990).

Aunque la prevalencia de intoxicación alimentaria por estafilococos ha disminuido en las últimas décadas, es una de las ETA más comunes reportadas a nivel mundial. Jin y Yamada (2016) reportan la incidencia de 20 brotes de *S. aureus* ocurridos durante el periodo del 2011 al 2016 en Estados Unidos. En Brasil fue la segunda causa más común de enfermedades transmitidas por los alimentos entre 1999 y 2011. En China fue el tercer patógeno más detectado en brotes transmitidos por alimentos después de *Salmonella* y *Vibrio parahaemolyticus*. En Corea ha sido el cuarto patógeno más comúnmente encontrado en el periodo del 2002 al 2012, después de *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Vibrio* spp., representando el 7,38% del total de casos. En Japón, se informó un mínimo de 26 (en 2014) y un máximo de 92 (en 2001) brotes de intoxicación alimentaria por estafilococos (con la principal fuente de

almuerzos en caja o bolas de arroz) según las últimas estadísticas del Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar de Japón.

Debido a lo anteriormente mencionado, es de gran importancia el estudio y evaluación de envases antibacteriales, con la finalidad de conservar la calidad de los alimentos mediante la inhibición de microorganismos relacionados con el deterioro y las intoxicaciones de origen alimentario.

## METODOLOGÍA

### Cepas Bacterianas

Las cepas bacterianas que se emplearon en el presente estudio fueron *Pseudomonas fluorescens*® ATCC (American Type Culture Collection) 13525™ [Gram (-)] y *Staphylococcus aureus*® ATCC 25923™ [Gram (+)].

### Materiales

Para la elaboración de las películas se emplearon resinas de ácido poliláctico (APL) (Ingeo™ Biopolymers), quitosano (peso molecular medio: 121 kDa, 80% de desacetilación) (Sigma Aldrich®) y como plastificante el polialcohol glicerol (Sigma Aldrich®). El compuesto antibacterial que se evaluó tanto en solución como en las películas elaboradas fue el ferulato de etilo (FE), proporcionado por Laboratorios Minkab®.

El presente trabajo se llevó cabo en tres etapas, el procedimiento general se ilustra en la Figura 7. En la primera etapa se realizó la evaluación antibacterial del FE mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Letal (CML). En la segunda etapa se elaboraron las películas activas con las diferentes formulaciones por medio de extrusión plana. Finalmente, en la tercera etapa se caracterizaron las películas desarrolladas en cuanto a sus propiedades antibacterial, mecánicas y ópticas.

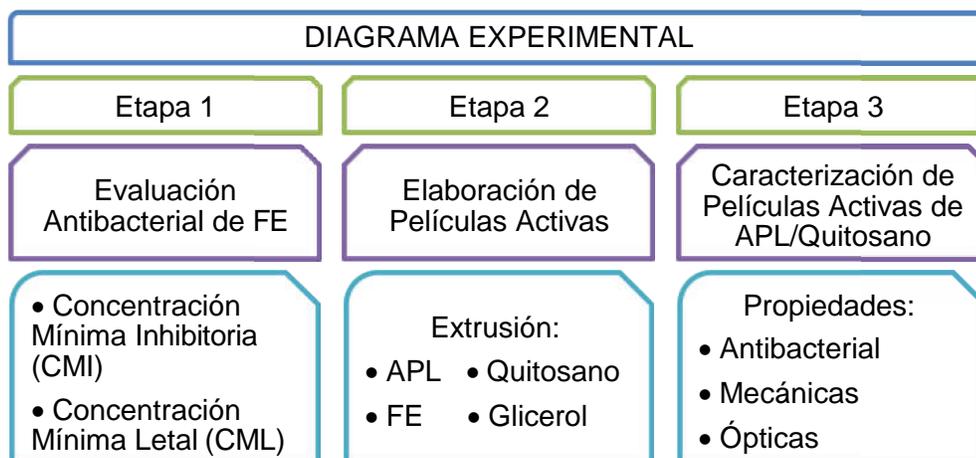


Figura 7. Procedimiento general para la evaluación de la actividad antibacterial de películas poliméricas.

## Evaluación Antibacterial del Ferulato de Etilo (FE)

### Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La concentración mínima inhibitoria de FE se evaluó por el método de diluciones seriadas (Chandrasekaran y Venkatesalu, 2004). Se preparó la solución madre con una cantidad de 0.5 g de FE, los cuales se disolvieron y aforaron a 5 mL con DMSO para obtener una concentración de 10,000 µg/mL. Se tomaron 1,250 µL de la solución madre de FE y se diluyeron en 1,250 µL de caldo Mueller-Hinton para obtener una concentración de 5,000 µg/mL, y así sucesivamente hasta obtener diluciones de 2,500, 1,250, 625, 312.5, 156, 78, 39, 19.5, 9.7 y 4.85 µg/mL. Se utilizó como referencia el patrón de turbidez de McFarland para estandarizar la concentración de una población bacteriana a 10<sup>6</sup> UFC/mL, que se inoculó a cada una de las diluciones anteriormente preparadas y se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 37 °C. Adicionalmente, se prepararon diluciones de FE sin el inóculo, que se tomó como blanco.

La actividad antibacterial del FE sobre el inóculo se reportó como el porcentaje de inhibición (%), y se determinó mediante la medición de la absorbancia a 630 nm de cada dilución antes y después del período de incubación (Ec. 1), utilizando un espectrofotómetro de doble haz (UV-Vis Cary 100, Varian Inc., Palo Alto, CA, USA), de acuerdo al método descrito por Cueva y col. (2010):

$$\text{Inhibición (\%)} = 1 - \frac{(\text{AbsF}_{\text{muestra}} - \text{AbsO}_{\text{muestra}}) - (\text{AbsF}_{\text{blanco}} - \text{AbsO}_{\text{blanco}})}{(\text{AbsF}_{\text{crecimiento}} - \text{AbsO}_{\text{crecimiento}}) - (\text{AbsF}_{\text{blanco}} - \text{AbsO}_{\text{blanco}})} \times 100 \text{ (Ec. 1)}$$

Donde: AbsO<sub>muestra</sub> y AbsF<sub>muestra</sub> corresponden a la densidad óptica del crecimiento bacteriano en presencia de los compuestos evaluados antes (AbsO) y después (AbsF) del período de incubación, respectivamente; AbsO<sub>blanco</sub> y AbsF<sub>blanco</sub> corresponden al medio líquido Mueller-Hinton con las diluciones de los compuestos evaluados antes y después de incubar, respectivamente; y AbsO<sub>crecimiento</sub> y AbsF<sub>crecimiento</sub> al crecimiento bacteriano en presencia del medio Mueller-Hinton (control positivo) antes y después de incubar, respectivamente.

### Concentración Mínima Letal (CML)

Para establecer este parámetro, de acuerdo a la metodología empleada por Gachkar y col. (2007), se tomaron alícuotas de 100 µL para cada concentración que no presentó crecimiento aparente en la determinación de CMI y se inocularon en agar Mueller-Hinton, se distribuyeron

homogéneamente utilizando una varilla de vidrio estéril y se dejó secar durante 10 min. Las placas se incubaron durante 24 h a una temperatura de 37 °C. Se consideró como la CML aquella concentración de FE donde no se presentó crecimiento bacteriano en agar Mueller-Hinton. Las placas que mostraron crecimiento se les calcularon las UFC/mL. Cada dilución se evaluó por triplicado.

## **Elaboración de Películas Activas de APL y Quitosano**

### **Elaboración de Películas Poliméricas**

Se formularon distintos tratamientos para la obtención de los lotes de películas, que se describen en la Tabla 2. La concentración de quitosano empleada en las formulaciones se determinó con base en reportes previos, mientras que el contenido de FE con base en preliminares. Se incorporó quitosano (5%) a la resina de APL, así como también el FE (10 y 15%) y glicerol como plastificante (20%); los cuales se homogeneizaron de manera manual. Posteriormente, se obtuvieron las películas de cada formulación empleando una máquina extrusora doble husillo a nivel laboratorio con un dado de película plana (Rondol Technology Ltd. Staffordshire, UK). Las condiciones bajo las cuales se obtuvieron las películas se describen en la Tabla 3.

Tabla 2. Formulaciones para la elaboración de las películas de APL.

| Tratamientos | APL (%) | QS (%) | Glicerol (%) | FE (%) |
|--------------|---------|--------|--------------|--------|
| APL          | 80      | 0      | 20           | 0      |
| AQ           | 75      | 5      | 20           | 0      |
| AF10         | 70      | 0      | 20           | 10     |
| AF15         | 65      | 0      | 20           | 15     |
| AQF10        | 65      | 5      | 20           | 10     |
| AQF15        | 60      | 5      | 20           | 15     |

APL: Ácido Poliláctico

FE: Ferulato de Etilo

QS: Quitosano

AQ: APL+QS

AF: APL+QS

AQF: APL+QS+FE

Tabla 3. Condiciones de extrusión para la elaboración de las películas poliméricas de APL.

|                  | Alimentación | Zonas de calentamiento |     |     |     |
|------------------|--------------|------------------------|-----|-----|-----|
|                  |              | I                      | II  | III | IV  |
| Temperatura (°C) | 80           | 150                    | 155 | 155 | 155 |
| Velocidad (rpm)  | 20           | 20                     | 20  | 20  | 20  |

## **Espesor**

El espesor de las películas poliméricas se obtuvo utilizando un micrómetro digital. Se realizaron 10 mediciones, tomadas en diferentes puntos de las películas al azar (Martínez-Camacho y col., 2010).

## **Caracterización de Películas Activas de Ácido Poliláctico (APL) y Quitosano (QS)**

### **Propiedad Antibacterial**

**Evaluación por contacto directo.** Se evaluó la actividad antibacterial de las películas mediante una técnica de contacto directo, con la finalidad de determinar su efecto en la morfología de las células bacterianas al simular el contacto directo con alimentos. La determinación se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado por Martínez-Camacho y col. (2010) con modificaciones. Se emplearon trozos de películas de 2 x 2 cm, los cuales se colocaron en placas petri con agar Mueller-Hinton, sobre cada trozo de película se vertieron 50  $\mu$ L de inóculo previamente estandarizado ( $10^5$  UFC/mL) con cuidado de que éste no se distribuya el agar (sólo en la película). A éste se le adicionaron dos gotas de Tween 20 para disminuir la tensión superficial del medio, con la finalidad de tener mayor superficie de contacto. Se incubaron a 37 °C durante 24 h. A continuación, el inóculo se retiró de la superficie de las películas con ayuda de una micropipeta. En el caso de los tratamientos con quitosano, se recuperó el inóculo con 50  $\mu$ L solución salina al 85%. El inóculo recuperado se colocó en un portaobjetos y posteriormente se realizó un análisis de imagen, para determinar el cambio en el área (*S. aureus*) y longitud (*P. fluorescens*) de las células en comparación con el control, para lo cual se empleó el programa Image-Pro Plus version 6.3 software (2008 Media Cybernetics Inc., USA) y un microscopio óptico (Olympus CX31, Japan) conectado a una cámara infinity (Media Cybernetics, USA).

**Conteo de células viables en placa.** Los ensayos se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, utilizando las diferentes películas de APL desarrolladas. Se cortaron las películas en trozos de 2 x 2 cm y se colocaron en placas de agar Mueller-Hinton, sobre cada trozo de película se vertieron 50  $\mu\text{L}$  de inóculo previamente estandarizado ( $10^5$  UFC/mL) con cuidado de que éste no se distribuya el agar (sólo en la película). A éste se le adicionaron dos gotas de Tween 20 para disminuir la tensión superficial del medio, con la finalidad de tener mayor superficie de contacto). Se incubaron a 37 °C durante 24 h. Una vez transcurridas las 24 h, se tomó cada uno de los trozos de película con pinzas estériles. Se introdujeron en tubos falcon previamente adicionados con 25 mL de agua peptonada estéril y se homogeneizaron delicadamente durante 1 min. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) en microtubos de polipropileno adicionados con 900  $\mu\text{L}$  de agua peptonada estéril.

De las últimas tres diluciones ( $10^{-3}$  a  $10^{-5}$ ) se añadió 100  $\mu\text{L}$  a una placa de agar Mueller-Hinton y se distribuyó homogéneamente sobre la superficie de la placa con ayuda de una varilla de vidrio estéril. Las placas inoculadas se incubaron a 37 °C durante 24 h y se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias o células viables, para cada una de las películas. El ensayo se realizó por duplicado.

**Viabilidad celular por tinción con azul de tripán.** La viabilidad celular se evaluó mediante tinción con azul de tripán, el cual se utiliza como ensayo de viabilidad, ya que permite diferenciar las células vivas (no teñidas) de células muertas (teñidas de azul). Para la realización de esta técnica, se estandarizaron previamente los inóculos de *P. fluorescens* y *S. aureus* ( $10^5$  UFC/mL), se inocularon 50  $\mu\text{L}$  sobre los trozos de película (2 x 2 cm) en agar Mueller-Hinton e incubaron a 37 °C durante 24 h. Se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de la solución de azul de tripán al 0.4% directamente en el inóculo sobre los tratamientos para cada una de las especies y se dejaron reposar aproximadamente 10 min. Posteriormente se observó al microscopio, haciendo uso de un portaobjetos.

## **Propiedades Mecánicas**

**Resistencia a la tensión y elongación.** Estos parámetros se determinaron de acuerdo a la metodología descrita por la norma ASTM (American Society for Testing and Materials) D1708-96 (ASTM, 1992). Se empleó una carga de 5 kN y una velocidad de prueba de 0.25 mm/min. Las películas se cortaron con forma de probetas, empleando un dado de acero. Las

probetas que se obtuvieron presentaron una longitud total de 35 mm, un centro adelgazado de 5 mm de ancho y costados de 18 mm de ancho.

A partir de los diagramas de esfuerzo-deformación se obtuvo la resistencia a la tensión (MPa) y la elongación (%) en la ruptura de las películas desarrolladas.

## Propiedades Ópticas

**Determinación de color (CIEL\*a\*b\*).** Se evaluó el color de las películas mediante el sistema CIEL\*a\*b, de acuerdo a la técnica descrita por Wessling y col. (2000). Se utilizó un colorímetro Hunter Lab Mini Scan XE Plus (Hunter Associates Laboratory, Reston, VA, USA). La diferencia en el color entre las películas control y las incorporadas con FE se obtuvo utilizando la película libre de antimicrobiano como referencia. Se tomaron 10 lecturas en cada tratamiento.

A partir de los datos obtenidos, se calculó el cambio total de color ( $\Delta E$ ) a partir de la siguiente ecuación:

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{0.5}$$

Donde:  $\Delta L^*$  es  $L^*_{\text{muestra}} - L^*_{\text{referencia}}$ ,  $\Delta a^*$  es  $a^*_{\text{muestra}} - a^*_{\text{referencia}}$ , por último  $\Delta b^*$  es  $b^*_{\text{muestra}} - b^*_{\text{referencia}}$ .

**Transmisión de luz.** El porcentaje de transmisión de luz para cada película se determinó en un rango de 200 a 850 nm de acuerdo al método descrito por Wessling y col. (2000), empleando un espectrofotómetro de doble haz (UV-Vis Cary 60, Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). Para realizar el análisis se tomaron tres lecturas en cada película.

## Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Con la finalidad de evaluar el efecto de la incorporación de FE y quitosano en las propiedades antibacterial y ópticas de las películas de APL elaboradas, los datos obtenidos en el presente estudio se analizaron mediante un diseño completo al azar con arreglo factorial considerando como factores la incorporación de FE y quitosano a las películas de APL. El Factor A, FE se evaluó en tres niveles (0, 10 y 15%) y el Factor B, quitosano, en dos niveles (0 y 5%). Respecto a las propiedades mecánicas, se empleó el mismo diseño experimental considerando adicionalmente el espesor de las películas como una covariable, con la finalidad de eliminar la

influencia de este parámetro en el comportamiento mecánico del material en el análisis estadístico.

En todos los casos, el análisis de varianza se realizó por modelos lineales generales a un nivel de significancia de 0.05 en el error. Las comparaciones de medias se realizaron por la prueba de rangos múltiples de Tukey y el análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el software NCSS v6.0 (Hintze, 2007).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evaluación Antibacterial del Ferulato de Etilo (FE)

La caracterización del FE, ya sea en solución o incorporado en una matriz polimérica, fue necesaria debido a que el FE utilizado en el presente estudio es un producto que aún no se encuentra disponible comercialmente y no se ha reportado su actividad inhibitoria sobre *P. fluorescens* y *S. aureus*, que son los modelos bacterianos de estudio más reportados en relación al deterioro y a las enfermedades transmitidas por los alimentos, respectivamente. Además de considerar la composición de la pared celular de estas especies, que son Gram (-) y Gram (+), respectivamente.

#### Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

En la Figura 8 se muestra el porcentaje de inhibición que ejerció el FE sobre el crecimiento de las cepas, que corresponden a un 97.07% y un 99.37% de inhibición para *P. fluorescens* y *S. aureus*, respectivamente. Para ambas bacterias se encontró que su CMI fue de 2,500 µg/mL de FE. Rahman y col. (2014), evaluaron el efecto antibacterial de los derivados éster de ferulato sobre diferentes bacterias, dentro de las cuales *S. aureus* presentó inhibición a una concentración de 40,000 µg/mL y la especie *E. coli*, como modelo de bacteria Gram (-), presentó inhibición a una concentración de 100,000 µg/mL. Este resultado difiere a lo reportado y a pesar de las diferencias en las concentraciones evaluadas, lo anterior resulta favorable para el presente estudio debido a que se requiere de concentraciones menores de FE para que éste ejerza su efecto inhibitorio para este tipo de microorganismos, lo que permite considerar su potencial aplicación para la conservación de alimentos. Del mismo modo, se difiere con lo reportado por Borges y col., (2013) quienes evaluaron la actividad antibacterial del ácido ferúlico y del ácido gálico sobre *S. aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, los cuales reportaron que la CMI del ácido ferúlico para ambas bacterias fueron 1,100 µg/mL y 100 µg/mL, respectivamente; y para el ácido gálico una CMI de 1,750 µg/mL y 500 µg/mL, respectivamente.

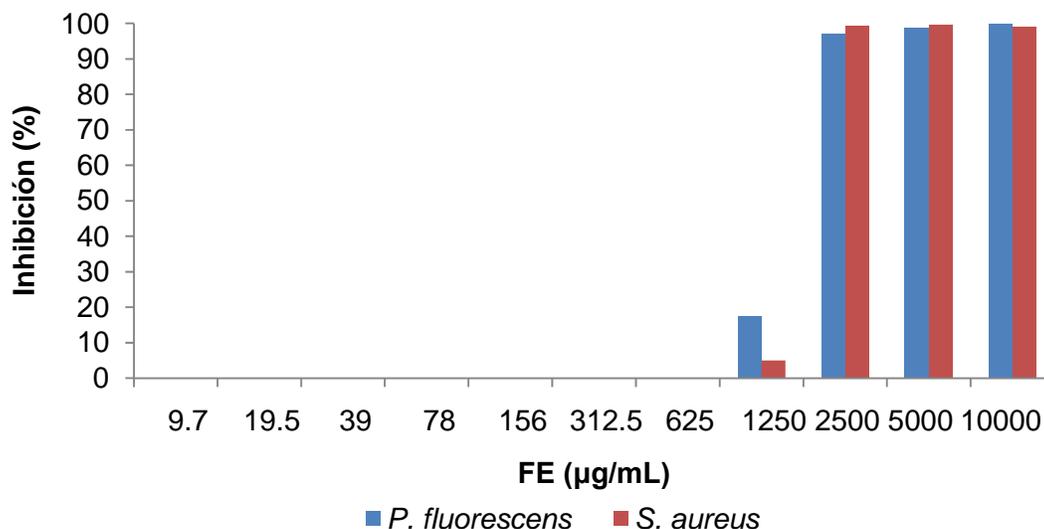


Figura 8. Porcentaje de inhibición de *P. fluorescens* y *S. aureus* en presencia de soluciones de FE en diferentes concentraciones.

### Concentración Mínima Letal (CML)

La CML se define como aquella concentración de FE donde no se presente crecimiento bacteriano en placa. La CML se determinó a partir de los pozos de la CMI que no presentaron crecimiento aparente (manifestado como turbidez) en comparación con sus respectivos blancos, tomando alícuotas que se inocularon en agar. Para ambas bacterias, la CML fue la concentración más alta de FE evaluada, que corresponde a 10,000 µg/mL de FE.

Respecto a las concentraciones de 5,000 y 2,500 µg/mL de FE que en la determinación anterior se presentó un efecto de inhibición en solución, al inocular en placa hubo crecimiento, lo que indica que el FE podría tener un efecto bacteriostático o inhibición moderada en estas concentraciones. Este resultado difiere con lo reportado por Borges y col. (2013) quienes evaluaron la CML del ácido ferúlico y del ácido gálico a sobre *S. aureus* y *P. aeruginosa*, los cuales reportaron que la CML del ácido ferúlico para ambas bacterias fueron 5,000 µg/mL y 500 µg/mL, respectivamente; y para el ácido gálico una CML de 5,250 µg/mL y 500 µg/mL, respectivamente. Por otro lado, Moreno-Vásquez y col. (2017) determinaron la CML del galato de epigallocatequina sobre *S. aureus* y *Pseudomonas* spp., con valores de 125 µg/mL y 1,000 µg/mL, respectivamente. La actividad antimicrobiana que ejercen estos compuestos se ve afectada por el incremento del número de carbonos en la cadena, que se atribuye a su carácter no polar y a su afinidad por la pared celular que facilita la penetración a través de la membrana

bacteriana. Esta actividad puede involucrar diversos mecanismos de acción tal como la desestabilización y la permeabilización de la membrana citoplasmática y la inhibición enzimática por los productos oxidados. Un posible mecanismo es a través de la reacción con grupos sulfhidrilo o mediante interacciones más inespecíficas con las proteínas, por ejemplo, la formación de quinonas reactivas. Los fenoles también pueden inhibir la síntesis de ácidos nucleicos tanto de bacterias Gram (-) como Gram (+).

### Elaboración de Películas Activas de APL y Quitosano

#### Elaboración de Películas Poliméricas

Los lotes de películas producidas a partir de APL se muestran en la Figura 9, donde se puede observar que la apariencia de la película de APL fue totalmente transparente, mientras que las incorporadas con FE obtuvieron una ligera tonalidad verde que va incrementando proporcionalmente con la concentración agregada. La película con quitosano mostró una tonalidad rojiza y opacidad, y las mezclas de quitosano con FE presentaron opacidad y tonalidad rojiza-verde, cuya intensidad de la tonalidad verde fue incrementando según la concentración de FE incorporada.

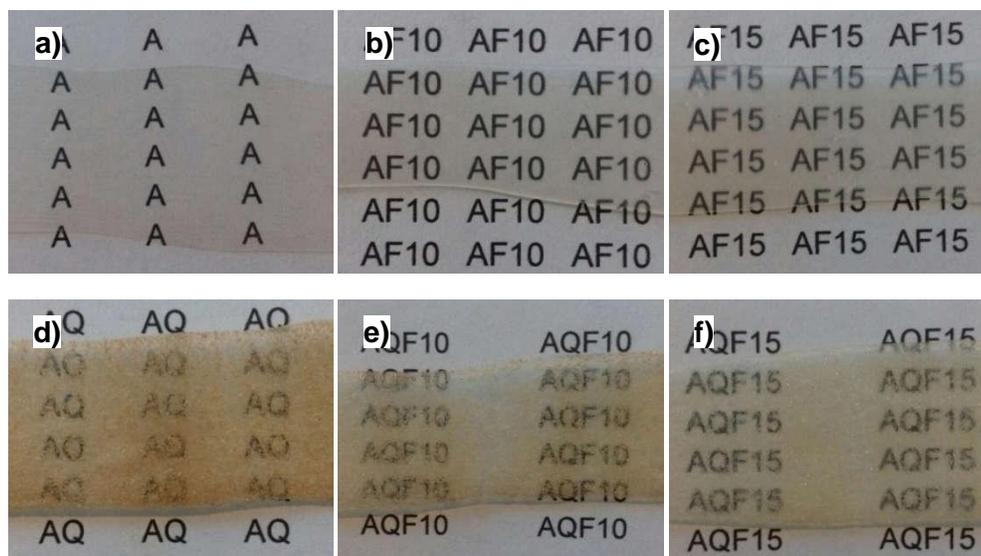


Figura 9. Apariencia de los distintos lotes de película producidas a partir de APL, donde: a) control de APL, b) APL+FE al 10%, c) APL+FE al 15%, d) APL+QS, e) APL+QS+FE al 10% y f) APL+QS+FE al 15%.

**Espesor.** La determinación del espesor en las películas desarrolladas es de gran importancia, ya que influye principalmente en propiedades de las películas como la permeabilidad y propiedades mecánicas. En la Tabla 4 se muestran los resultados de las mediciones para cada una de las películas; se observó un incremento significativo ( $p<0.5$ ) del espesor al adicionar FE y Q, respecto a la película control. El espesor de las películas incrementó significativamente ( $p<0.05$ ) en presencia de quitosano y al adicionar FE, respecto al resto de los tratamientos de APL; lo que sugiere que esto podría afectar en las propiedades mecánicas como la resistencia a la tensión y la elongación de las distintas películas desarrolladas. Este resultado coincide con lo reportado por Moreno-Vásquez y col. (2016) quienes evaluaron el espesor de películas de APL (67.79  $\mu\text{m}$ ) y de APL incorporadas con distintas concentraciones de galato de epigallocatequina (0.03, 0.5, 5 y 10%), donde se observó un incremento en el valor de este parámetro de las películas respecto al control de APL, al incorporarle este aditivo en las distintas formulaciones (93.27, 95.09, 86.81 y 75.03  $\mu\text{m}$ , respectivamente). Del mismo modo, Martins y col. (2012) evaluaron este parámetro en películas de quitosano (94  $\mu\text{m}$ ) y quitosano incorporadas con  $\alpha$ -tocoferol en distintas concentraciones (0.1 y 0.2%), donde también reportaron un incremento del espesor de las películas respecto al control de quitosano al incorporar el  $\alpha$ -tocoferol en las diferentes mezclas (115 y 120  $\mu\text{m}$ , respectivamente). A pesar de que las concentraciones evaluadas por otros autores sean menores a la del presente estudio, coincide en que la incorporación de distintos aditivos en una matriz polimérica tiene un efecto sobre el valor del espesor.

Tabla 4. Determinación del espesor de las películas de APL/quitosano.

| Tratamientos | Espesor ( $\mu\text{m}$ )       |
|--------------|---------------------------------|
| A            | 93.77 <sup>d</sup> $\pm$ 15.29  |
| AQ           | 214.57 <sup>b</sup> $\pm$ 4.24  |
| AF10         | 132.07 <sup>c</sup> $\pm$ 14.07 |
| AF15         | 147.19 <sup>c</sup> $\pm$ 15.93 |
| AQF10        | 211.54 <sup>b</sup> $\pm$ 11.42 |
| AQF15        | 233.99 <sup>a</sup> $\pm$ 12.02 |

<sup>ab</sup>Medias con diferente literal indican diferencias significativas ( $p<0.05$ ). Los valores son promedio de 10 réplicas  $\pm$  DE.

## Caracterización de Películas de Ácido Poliláctico (APL) y Quitosano (QS)

### Propiedad Antibacterial

**Evaluación por contacto directo.** Las películas incorporadas con agentes antimicrobianos se evaluaron mediante una técnica de contacto directo con la finalidad de simular la actividad que ejercerían en contacto con un alimento. El mecanismo de acción de estos sistemas activos antimicrobianos puede clasificarse en dos categorías: 1) aquellas en las cuales el agente antimicrobiano ejerce su acción al migrar hacia la superficie del alimento y 2) aquellas que son efectivas sobre el crecimiento superficial de microorganismos sin que ocurra la migración (también conocido como contacto directo) (Suppakul y col., 2003).

En el presente estudio se evaluó el efecto antibacterial de distintas películas activas por contacto directo sobre *P. fluorescens* y *S. aureus*, obteniendo mediante un análisis de imágenes los cambios ocasionados por estos materiales sobre su morfología. En la Figura 10 se observan las imágenes obtenidas de las células bacterianas mostrando el efecto del contacto directo con las películas activas, donde se puede observar que ambas bacterias presentaron agregación celular en contacto con las películas incorporadas con quitosano y la mezcla de quitosano con FE, cuyo comportamiento fue más notorio en *P. fluorescens*. Esta agregación presentada por *P. fluorescens* fue mayor en contacto con la película incorporada con 15% de FE, lo cual podría atribuirse a la posible afinidad entre el FE y los componentes de la pared celular bacteriana, ocasionando la formación de asociaciones entre las regiones hidrofóbicas de la bicapa fosfolipídica de la membrana celular que podrían quedar expuestas debido a la introducción del FE a la célula. Este comportamiento coincide con lo reportado por Moreno-Vásquez y col. (2016), quienes evaluaron el efecto antibacterial de películas de APL incorporadas con 10% de galato de epigallocatequina sobre *S. aureus* y *Pseudomonas* spp. por contacto directo, donde también se observó agregación celular en ambas bacterias, teniendo mayor efecto sobre *S. aureus* debido a la naturaleza del compuesto activo.

En la Tabla 5 se indica el efecto de las películas en la morfología de las bacterias de estudio, viéndose afectados tanto el diámetro como la longitud de las células de *P. fluorescens* y *S. aureus*, respectivamente ( $p < 0.05$ ). La longitud de las células de *P. fluorescens* en contacto con la película control de APL fue de 0.97  $\mu\text{m}$  y, en contacto tanto con la película incorporada con FE al 10% (AF10) como en la película con solo quitosano (AQ), se encontró una disminución significativa de la longitud del bacilo respecto al control de APL ( $p < 0.05$ ) a valores de 0.88  $\mu\text{m}$  y 0.71  $\mu\text{m}$ , respectivamente. En cuanto al efecto de las películas con mayor

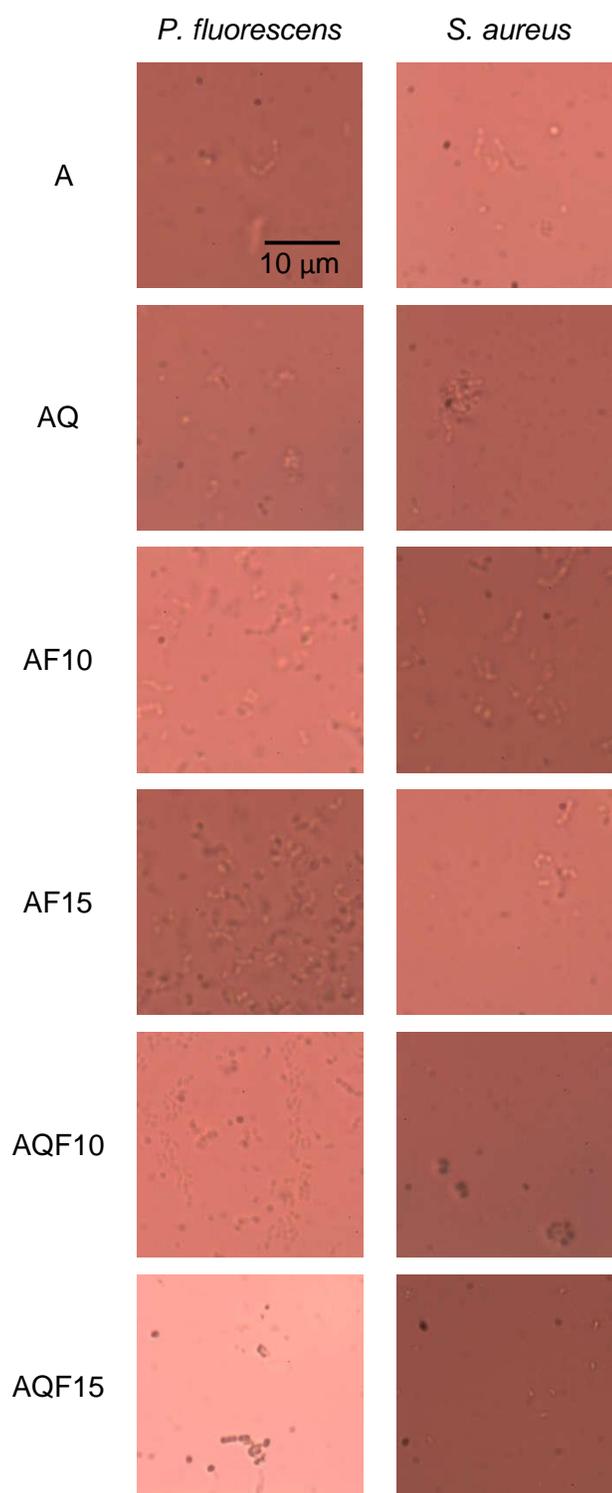


Figura 10. Efecto del FE sobre la morfología bacteriana de *P. fluorescens* y *S. aureus* en la evaluación antibacterial de películas activas por contacto directo. La observación se llevó a cabo empleando el objetivo de 100x.

concentración de FE, ya sea solo (AF15) o en combinación con quitosano (AQF15), se encontró un incremento significativo en la longitud del bacilo ( $p < 0.05$ ) pasando de una longitud inicial de  $0.97 \mu\text{m}$  (control) a  $1.17 \mu\text{m}$  y  $1.22 \mu\text{m}$  para las células bacterianas en contacto de las películas AF15 y AQF15, respectivamente; perdiendo las células su forma original. Estudios previos (Borges y col., 2013) reportaron resultados similares respecto al efecto de compuestos fenólicos y el impacto de la acción antimicrobiana que producen sobre los microorganismos, lo cual depende de su configuración estructural. Los compuestos fenólicos poseen grandes variaciones estructurales del cual se cree que los grupos hidroxilo (-OH) presentes causan acción inhibitoria, ya que estos grupos pueden interactuar con la membrana celular de las bacterias para alterar su estructura morfológica y causar la fuga de componentes celulares. La fuga marcada del material citoplásmico se considera indicativa de un daño de membrana citoplasmática bruto e irreversible. Las películas con la mezcla de quitosano y 10% de FE (AQF10) no presentaron efecto significativo en la longitud de *P. fluorescens* ( $p < 0.05$ ), debido a la posible interacción entre el quitosano y el FE, por lo que estos resultados sugieren la necesidad de aplicar una mayor concentración para ocasionar un efecto en la morfología de las células bacterianas.

En cuanto al efecto de las películas desarrolladas sobre *S. aureus*, se observó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) del área de las células bacterianas respecto al control de APL ( $0.80 \mu\text{m}$ ) en contacto con las diferentes películas excepto en contacto con AF10 ( $p > 0.05$ ). El área de las células bacterianas fue de  $0.62$  y  $0.63 \mu\text{m}$  en contacto de las películas AQ y AF15, respectivamente, y de  $0.58 \mu\text{m}$  en contacto con AQF10. De acuerdo a los resultados del presente estudio, se encontró un mayor efecto en la morfología bacteriana en contacto con las películas conteniendo la mezcla de quitosano y FE. En el caso del contacto con la película AQF15 incluso se presentó lisis celular, por lo que no fue posible realizar la medición; lo cual podría deberse a que el quitosano tiene un efecto electrostático con los componentes de la pared celular de las bacterias, lo que ocasiona daño y pérdida del contenido celular (Xing y col., 2009). Lo anterior es similar a lo reportado por Moreno-Vásquez y col. (2017), quienes evaluaron esta técnica sobre *S. aureus* y *Pseudomonas* spp. con películas de polietileno de baja densidad incorporados con 10% de galato de epigallocatequina. En ese estudio se observó un efecto sobre la morfología celular, siendo *S. aureus* la única que presentó cambios en su estructura al incrementarse su área celular debido a la naturaleza del compuesto activo que posiblemente inhibió la división celular ocasionando un crecimiento continuo.

Tabla 5. Efecto de los distintos tratamientos sobre la morfología bacteriana por contacto directo.

| Tratamientos | <i>P. fluorescens</i>         | <i>S. aureus</i>             |
|--------------|-------------------------------|------------------------------|
|              | Longitud ( $\mu\text{m}$ )    | Área ( $\mu\text{m}^2$ )     |
| A            | 0.97 <sup>b</sup> $\pm$ 0.15  | 0.80 <sup>a</sup> $\pm$ 0.12 |
| AQ           | 0.71 <sup>d</sup> $\pm$ 0.12  | 0.62 <sup>b</sup> $\pm$ 0.13 |
| AF10         | 0.88 <sup>c</sup> $\pm$ 0.15  | 0.82 <sup>a</sup> $\pm$ 0.12 |
| AF15         | 1.17 <sup>a</sup> $\pm$ 0.12  | 0.63 <sup>b</sup> $\pm$ 0.09 |
| AQF10        | 0.91 <sup>bc</sup> $\pm$ 0.15 | 0.58 <sup>b</sup> $\pm$ 0.11 |
| AQF15        | 1.22 <sup>a</sup> $\pm$ 0.19  | Lisis                        |

<sup>ab</sup>Medias con diferente literal dentro de la fila indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores son promedio de tres réplicas  $\pm$  DE.

Es pertinente mencionar que se observó un cambio en la apariencia superficial del material al colocar el inóculo sobre las películas en las diferentes técnicas empleadas. El material tornó a una apariencia opaca y blanquecina, que se relacionó con una posible interacción entre el inóculo y los componentes de la película (Figura 11). Lo anterior se le atribuye a un posible efecto plastificante que permitió su dispersión en la matriz polimérica, por lo que dificultó la recuperación del inóculo. Esto podría relacionarse con los resultados de la cuenta viable en placa.

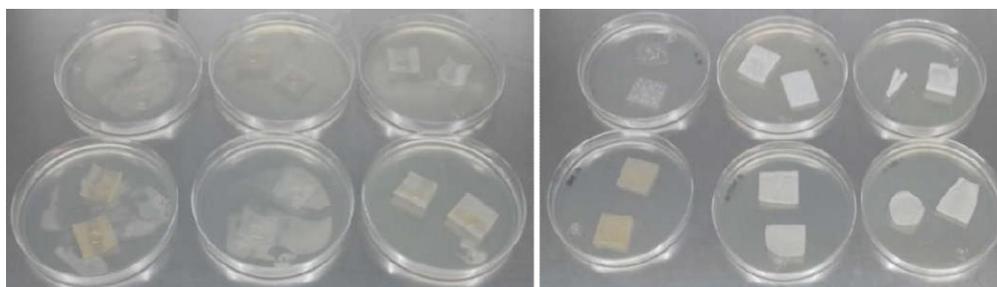


Figura 11. Cambio en la apariencia superficial del material: a) antes del periodo de incubación y b) después del periodo de incubación.

**Cuenta de células viables en placa.** Esta determinación se realizó basándose en las recomendaciones establecidas para el conteo de colonias por la NOM-110-SSA1-1994. En la Tabla 6 se muestran los valores de la cuenta de unidades formadoras de colonias (Log

UFC/mL) de las cepas evaluadas en presencia de las diferentes películas poliméricas desarrolladas. De acuerdo a los resultados, no se encontró efecto antibacteriano de las diferentes formulaciones respecto al control, incluso las cuentas fueron mayores ( $p < 0.05$ ) que este tratamiento, para ambas bacterias, con la excepción de la película FE10 cuya cuenta viable para *P. fluorescens* fue similar al control ( $p < 0.05$ ). Estos resultados difieren de lo obtenido a través de las técnicas de contacto directo y tinción con azul de tripán, donde fue posible observar un efecto inhibitorio de las películas desarrolladas sobre las células bacterianas de *P. fluorescens* y *S. aureus*.

Este resultado se le puede atribuir al desarrollo de los microorganismos en el medio de cultivo líquido, después de haberse inoculado sobre el material. El estrés fisiológico celular generado por la limitación de nutrientes podría haber ocasionado que se retardara la velocidad y arranque del crecimiento sobre el material. Sin embargo, es posible que al pasar el microorganismo del material a un medio líquido con nutrientes, se haya reactivado su crecimiento. Otra explicación a este comportamiento sugiere el posible efecto plastificante que se mencionó previamente en la sección de evaluación por contacto directo, que podría propiciar la interacción entre la película y los componentes del medio de cultivo a través de fenómenos de difusión y de sorción al colocar el inóculo sobre las películas, favoreciendo el desarrollo de las cepas respecto al control de APL. Los aditivos incorporados en la matriz polimérica afectan el ordenamiento de sus cadenas, lo que podría disminuir la cristalinidad y aumentar la difusión de los solutos en estas condiciones; aunado al efecto plastificante del glicerol incorporado que, a pesar de que también se encontraba presente en la película control, aumentó la concentración de aditivos presentes en las películas (McKeen, 2017).

Tabla 6. Efecto de los distintos tratamientos sobre la cuenta total en placa (Log UFC/mL).

| Tratamientos | <i>P. fluorescens</i>    | <i>S. aureus</i>         |
|--------------|--------------------------|--------------------------|
| A            | 7.42 <sup>b</sup> ± 0.05 | 7.31 <sup>c</sup> ± 0.02 |
| AQ           | 8.68 <sup>a</sup> ± 0.12 | 8.63 <sup>a</sup> ± 0.02 |
| AF10         | 7.63 <sup>b</sup> ± 0.01 | 7.77 <sup>b</sup> ± 0.02 |
| AF15         | 8.69 <sup>a</sup> ± 0.12 | 7.95 <sup>b</sup> ± 0.18 |
| AQF10        | 8.57 <sup>a</sup> ± 0.2  | 8.58 <sup>a</sup> ± 0.01 |
| AQF15        | 8.71 <sup>a</sup> ± 0.02 | 8.59 <sup>a</sup> ± 0.02 |

<sup>ab</sup>Medias con diferente literal dentro de la fila indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores son promedio de tres réplicas ± DE.

**Viabilidad celular por tinción con azul de tripán.** La viabilidad celular se evaluó mediante tinción con azul de tripán, el cual se utiliza como ensayo de viabilidad, ya que permite diferenciar las células vivas (no teñidas) de células muertas (teñidas de azul). Esta prueba se basa en el principio de exclusión de colorantes; las células vivas poseen una membrana celular intacta que impide la penetración de ciertos colorantes como el azul de tripán, mientras que los tejidos muertos son incapaces de excluirlos. Por lo que se utiliza para la determinación de células viables presentes en una suspensión y posteriormente se examina haciendo uso de un microscopio para comprobar si las células absorben o excluyen el colorante (Strober, 2015). En la Figura 12 se muestra el efecto que ejercieron las películas sobre las cepas de *P. fluorescens* y *S. aureus*. En el caso de *P. fluorescens* se pudo observar que tanto la incorporación de FE como quitosano y sus mezclas, ocasionaron la formación de agregados celulares. Adicionalmente, los diferentes tratamientos afectaron la viabilidad celular (células teñidas), con la excepción de AQF10 (APL+quitosano+FE10%). Estos resultados coinciden con lo observado en la evaluación por contacto directo, donde se encontró que la incorporación de estos compuestos modificó la morfología de las células de *P. fluorescens*, con la excepción de las películas AQF10, lo cual podría deberse a la posible interacción electrostática entre los grupos funcionales del quitosano y del FE, los cuales quedan indispuestos para interactuar con la célula bacteriana.

Por otro lado, se puede observar el efecto que ejercieron las películas en la viabilidad de *S. aureus*, donde las células bacterianas no viables se tiñeron de azul por efecto de las películas incorporadas con quitosano, ya sea solo o en combinación con FE, por daño en la membrana respecto al control de APL. Estos resultados coinciden con lo obtenido en la morfología celular, donde se observó una reducción significativa en el área de *S. aureus* por la presencia de quitosano. En cuanto al efecto de las películas de APL con FE en la viabilidad de *S. aureus*, no se observaron células teñidas por el contacto directo entre éstas. Este resultado coincide con lo observado en la morfología celular de *S. aureus* en contacto con la película de APL incorporada con 10% de FE, donde no hubo diferencia respecto al control. Sin embargo, a pesar de que éste presentó una disminución en su área en contacto con la película de APL incorporada con 15% de FE, se encontró que no hubo efecto sobre su viabilidad mediante la tinción con azul de tripán.

El mecanismo de acción del quitosano puede sugerirse según la composición de la célula microbiana sobre la que tiene su actividad principal. Pueden presentarse interacciones

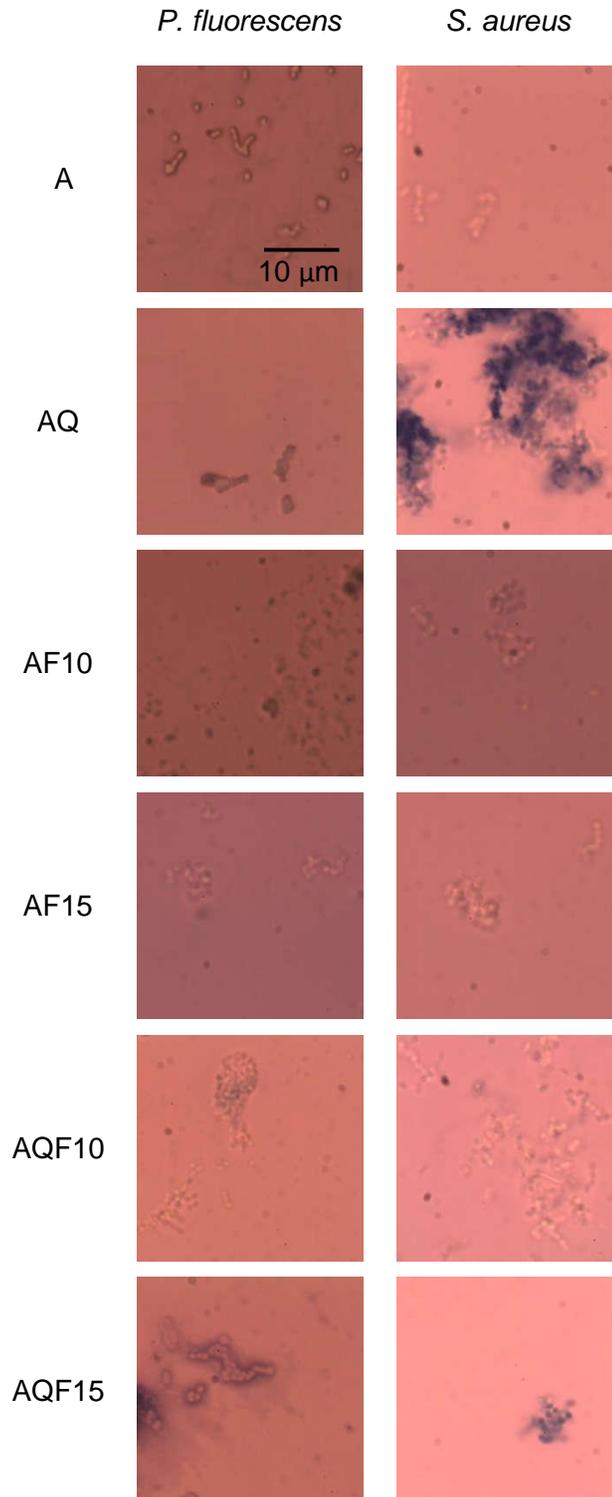


Figura 11. Viabilidad celular de las especies de *P. fluorescens* y *S. aureus* en la prueba de tinción con azul de tripán sobre los distintos tratamientos. La observación se llevó a cabo empleando el objetivo de 100x.

con los componentes celulares externos, con la membrana citoplásmica y con los constituyentes citoplásmicos. La inhibición microbiana por el quitosano se cree que es el resultado de una secuencia de procesos moleculares, dando lugar a múltiples eventos perjudiciales al azar que finalmente llevan a la inhibición o eliminación de la célula. Hay tres mecanismos propuestos: 1) interacciones electrostáticas entre los grupos amino disponibles del quitosano (carga +) y los componentes de la pared celular del microorganismo (carga -) que obstruyen la permeabilidad celular; 2) el quitosano de bajo peso molecular es capaz de penetrar la membrana celular e inhibir la transcripción del ADN así como también la síntesis de ARN y algunas proteínas; y 3) el quitosano actúa como un agente quelante que tiene la capacidad de formar complejos con algunos metales traza esenciales, de este modo bloquea el intercambio de nutrientes de la célula (Raafat y Sahl, 2009). En el caso del FE, los compuestos fenólicos tienen afinidad sobre los componentes de la membrana de los microorganismos (Borges y col., 2013). Esto provoca un incremento de la permeabilidad de la membrana celular del microorganismo, ocasionando la fuga de los constituyentes celulares como proteínas, ácidos nucleicos y iones inorgánicos como el potasio o el fosfato que podrían difundirse a través de la membrana citoplásmica, además de afectar la estructura de la membrana celular por rigidez y alteración de la dinámica de las cadenas de fosfolípidos.

### **Propiedades Mecánicas**

La determinación de las propiedades mecánicas es importante para el conocimiento de la relación de la estructura polimérica con la respuesta del material ante la aplicación de fuerzas externas tales como presión, tensión, vibración o tracción; lo que permite la correcta selección del material polimérico destinado a la producción de envases (Aguilar-Vega, 2013). Las propiedades mecánicas se utilizan principalmente para describir los parámetros cuantificables de un material como la resistencia a la tensión y elongación (deformación) a la ruptura, donde indica a través de un diagrama de esfuerzo-deformación cual es la fuerza necesaria para que el material se deforme antes de la ruptura y para que llegue a su punto de fractura. Los valores obtenidos en esta evaluación se emplean para control de calidad de la resina y del producto final (Valíček y col., 2015).

Estudios previos (Arrieta y col., 2013; McKeen, 2017; Moreno-Vásquez y col., 2016; Vieira y col., 2011) reportan que la incorporación de compuestos activos y plastificantes tiene un efecto significativo sobre las propiedades mecánicas de las películas poliméricas. Por lo anterior,

es de gran importancia determinar el efecto que ejerce la presencia de ambos en este tipo de propiedades.

**Resistencia a la tensión y elongación.** En la Tabla 7 se muestran los resultados de la determinación de resistencia a la tensión, donde se observa que, para todos los tratamientos, hubo diferencia significativa respecto a la película control de APL debido a la incorporación de quitosano y FE en distintas proporciones y mezclas ( $p < 0.05$ ).

El tratamiento de APL con un 10% de FE incorporado (AF10) fue el único que tuvo un comportamiento similar al control de APL ( $p < 0.05$ ), a pesar de contener un 10% de FE. En el caso del resto, presentaron una disminución en el valor de este parámetro ( $p < 0.05$ ), especialmente las incorporadas con quitosano y las mezclas de quitosano con FE, en específico en la película incorporada con QS y FE al 15% la resistencia a la tensión disminuyó a 4.53 MPa respecto a 30.53 MPa que presentó la película control de APL. Este detrimento en la resistencia a la tensión de las películas podría deberse a que los aditivos a una concentración alta o, en su defecto, en mezclas modifican la interacción y ordenamiento (empaquetamiento) de las cadenas poliméricas por lo que se requiere una menor fuerza para que el material llegue a su punto de ruptura (McKeen, 2017). Los resultados de la incorporación de FE al 15% en APL coinciden con lo reportado por Arrieta y col., (2014), quienes evaluaron la resistencia a la tensión de películas de APL incorporadas con 15% de limoneno, las cuales mostraron valores de 24.6 MPa. Del mismo modo se observó una disminución del valor de este parámetro respecto al control de APL (38.5 MPa). Por otro lado, Moreno-Vásquez y col. (2016) también reportan una disminución de este parámetro en películas de APL y APL incorporados con 10% de galato de epigallocatequina, que mostraron valores de 52.0 y 47.0 MPa, respectivamente.

Tabla 7. Resistencia a la tensión de las películas poliméricas de APL.

| Tratamientos | Resistencia a la tensión (MPa) |
|--------------|--------------------------------|
| A            | 30.53 <sup>a</sup> ± 3.27      |
| AQ           | 19.24 <sup>c</sup> ± 2.03      |
| AF10         | 33.31 <sup>a</sup> ± 3.27      |
| AF15         | 24.17 <sup>b</sup> ± 1.95      |
| AQF10        | 13.26 <sup>d</sup> ± 0.67      |
| AQF15        | 4.53 <sup>e</sup> ± 1.04       |

<sup>ab</sup>Medias con diferente literal dentro de la fila indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores son promedio de seis réplicas ± DE.

Otro parámetro de importancia al caracterizar las propiedades mecánicas de los materiales es la elongación, la cual indica la relación entre la variación de longitud y la longitud inicial después de que falle el material en el ensayo de tracción (Valíček y col., 2015). En la Tabla 8 se presentan los resultados de esta variable. Comparando los resultados de elongación de las diferentes formulaciones, se puede observar que la incorporación de aditivos tuvo un efecto significativo para todas las películas. Las películas con quitosano AQ (0.11%), AQF10 (0.11%) y AQF15 (0.19%) mostraron un comportamiento similar al control A (0.15%) ( $p < 0.05$ ), mientras que en el caso de las películas incorporadas con FE se obtuvieron valores menores ( $p < 0.05$ ), esto podría deberse a que el aumento de concentración del agente disminuyó la elongación del material, a pesar de contener plastificante en su formulación, siendo 0.03 y 0.01% para AF10 y AF15, respectivamente. Arrieta y col. (2014) reportaron un porcentaje de elongación de 1.5 para APL, y 151.7 para APL incorporado con limoneno al 15%, lo cual difiere con presente estudio debido a que el limoneno presenta características plastificantes al ser incorporado a una matriz polimérica. Del mismo modo, se difiere con lo reportado por Moreno-Vásquez y col. (2016) quienes obtuvieron un porcentaje de elongación de 9.4 y 11.9 para APL y APL incorporado con galato de epigallocatequina al 10%, respectivamente; donde se observó un efecto plastificante en la película al incorporarle el galato de epigallocatequina.

Tabla 8. Elongación de las películas poliméricas de APL.

| Tratamientos | Elongación (%)             |
|--------------|----------------------------|
| A            | 0.15 <sup>a</sup> ± 0.11   |
| AQ           | 0.11 <sup>ab</sup> ± 0.004 |
| AF10         | 0.03 <sup>cb</sup> ± 0.05  |
| AF15         | 0.01 <sup>c</sup> ± 0.01   |
| AQF10        | 0.11 <sup>ab</sup> ± 0.005 |
| AQF15        | 0.19 <sup>a</sup> ± 0.02   |

<sup>ab</sup>Medias con diferente literal dentro de la fila indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores son promedio de seis réplicas ± DE.

## Propiedades Ópticas

Dentro de las propiedades ópticas de los materiales poliméricos, la transparencia es una de las más importantes ya que influyen significativamente en la estética del envase. Si el producto

alimenticio tiene un aspecto atractivo y es estable al exponerse a la luz, entonces puede ser deseable un envase altamente transparente. La transparencia depende del grado de cristalinidad del material polimérico; a medida que aumenta el grado de cristalinidad, la transparencia disminuye y da lugar a la opacidad. Esto se debe a que las zonas cristalinas dispersan la luz, mientras que las zonas amorfas permiten su paso y resulta una mayor transparencia (Emblem, 2012). Uno de los factores que afectan esta propiedad es la incorporación de aditivos tales como los agentes antimicrobianos.

**Determinación de color (CIEL\*a\*b\*).** En la Tabla 9 se presentan los valores de los resultados en la determinación de color en la escala CIEL\*a\*b, donde la incorporación de quitosano y FE en distintas combinaciones muestran un efecto notorio en el cambio de color de la base polimérica de APL. La presencia de FE le confiere una tonalidad verde a las películas, mientras que el quitosano una tonalidad rojiza; donde se observó que la intensidad del color fue directamente proporcional a la concentración incorporada. En el caso de las películas con quitosano se mostró un cambio mayor en esta propiedad respecto al control de APL. Sin embargo, entre las mismas hubo poca variación.

En el parámetro  $L^*$ , que refiere a la luminosidad, presentó poca variación de su valor por efecto de la incorporación de las distintas mezclas de quitosano y FE ( $p < 0.05$ ), donde fue mayor en el caso del quitosano ( $L^* = 71.01$ , respecto a  $L^* = 83.84$  de APL). Sin embargo, las películas de APL y también ambas muestras de APL incorporadas con FE presentaron valores altos de este parámetro, siendo alta su luminosidad. Este resultado sugiere una alta transparencia para las películas que contienen FE, y la posibilidad de ver a través de ellas es uno de los requisitos más importantes para los consumidores. En el parámetro  $a^*$ , coloración verde-rojo, se observa un incremento para los tratamientos con quitosano (tendencia al rojo) y una ligera disminución para las distintas concentraciones de FE (tendencia al verde) ( $p < 0.05$ ). A pesar de que la tendencia de las películas incorporadas con FE sea hacia el verde, los valores fueron cercanos a cero, por lo que esta tonalidad no era perceptible. En cuanto al parámetro  $b^*$ , coloración amarillo-azul, hubo incremento en todas las películas (tendencia al amarillo), con mayor efecto en las películas con quitosano ( $p < 0.05$ ). Lo anterior coincide con lo reportado por Arrieta y col. (2013), quienes evaluaron estos parámetros en películas de APL incorporadas con limoneno al 15 y 20%, donde se observó poca variación en el parámetro  $L^*$  y alta transparencia en las películas, baja percepción de la tendencia hacia el verde del parámetro  $a^*$  y un incremento en el parámetro  $b^*$  según la concentración de limoneno; lo que sugiere que la incorporación de aditivos hasta un 20% en una matriz polimérica tiene una respuesta positiva en relación a la

aparición de las películas. Por otro lado, Aljawish y col. (2016) desarrollaron películas a partir de quitosano y 2.28% de FE mediante la técnica de evaporación de solventes, donde reportan que tanto la película de quitosano como la mezcla de FE-quitosano presentaron similitud en su apariencia debido a la baja concentración de FE incorporada. Los resultados del presente estudio muestran similitud a los valores de los parámetros, aun a concentraciones altas de FE incorporadas, lo que sugiere que tanto la metodología aplicada como la formulación de las películas dan una respuesta favorable para estos fines.

Tabla 9. Evaluación de color (CIEL\*a\*b\*) de las películas de APL.

| Tratamiento | L*                       | a*                       | b*                       | $\Delta E$               |
|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| A           | 83.8 <sup>a</sup> ± 0.28 | 0.4 <sup>d</sup> ± 0.03  | 1.2 <sup>c</sup> ± 0.19  | -                        |
| AQ          | 71.0 <sup>c</sup> ± 1.67 | 3.9 <sup>a</sup> ± 0.29  | 22.9 <sup>a</sup> ± 2.18 | 25.4 <sup>a</sup> ± 2.71 |
| AF10        | 82.8 <sup>a</sup> ± 1.31 | -0.1 <sup>e</sup> ± 0.02 | 2.6 <sup>c</sup> ± 0.32  | 2.1 <sup>c</sup> ± 0.69  |
| AF15        | 83.3 <sup>a</sup> ± 1.55 | -0.5 <sup>f</sup> ± 0.16 | 8.4 <sup>b</sup> ± 1.04  | 7.3 <sup>b</sup> ± 1.09  |
| AQF10       | 74.0 <sup>b</sup> ± 0.97 | 2.3 <sup>c</sup> ± 0.28  | 20.7 <sup>a</sup> ± 2.04 | 21.8 <sup>a</sup> ± 2.25 |
| AQF15       | 74.9 <sup>b</sup> ± 0.72 | 2.9 <sup>b</sup> ± 0.24  | 22.2 <sup>a</sup> ± 1.94 | 22.9 <sup>a</sup> ± 2.05 |

<sup>ab</sup>Medias con diferente literal dentro de la fila indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores son promedio de seis réplicas ± DE.

**Transmisión de luz.** Los resultados del porcentaje de transmitancia se muestran en la Figura 13, donde se muestra el paso de luz a través de las distintas películas poliméricas. En relación a la película control de APL (A) (79.89%), se ve un incremento en la transmitancia en la película AF10 (91.18%), que podría deberse a las zonas amorfas producidas en la matriz polimérica al incorporarle el FE, que le permite el paso a mayor cantidad de luz. Sin embargo, al incorporar una concentración más alta de FE, como es el caso de la película AF15, se aprecia una disminución de la transmitancia (68.54%), lo que nos indica que la mayor concentración de FE le confiere color a la película, volviéndolo ligeramente opaco.

Para las películas incorporadas con quitosano (AQ) y las mezclas con FE (AQF10 y AQF15) se observó la misma tendencia al variar la concentración de FE (27.03% y 12.65%, respectivamente). Las películas de AQ y AQF15 mostraron prácticamente la misma transmitancia entre sí (12.80% y 12.65%, respectivamente) debido a que tanto el quitosano y una concentración elevada del FE le otorgan opacidad a las películas encontrándose una

notoria disminución en la transmitancia en comparación a un 79.89% de la película control (APL).

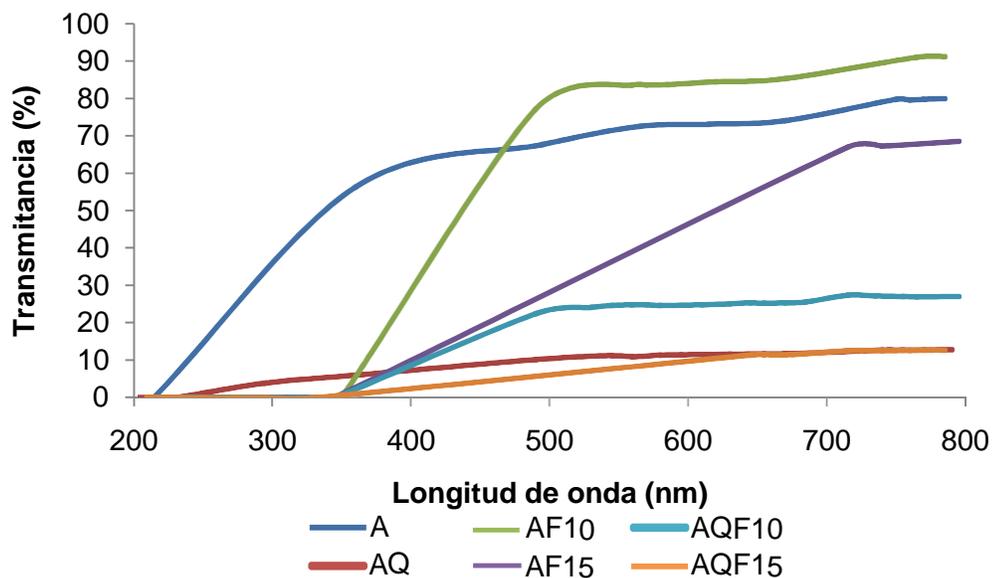


Figura 12. Características de transmisión de luz de las películas de APL/quitosano. Tratamientos: A (APL); AQ (APL+quitosano); AF10 (APL+FE al 10%); AF15 (APL+FE al 15%); AQF10 (APL+quitosano+FE al 10%); AQF15 (APL+quitosano+FE al 15%). Los valores son medias de tres réplicas  $\pm$  DE.

## CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio mostraron que el FE tiene la capacidad de ejercer un efecto inhibitorio sobre *P. fluorescens* y *S. aureus*, ya sea en solución o mediante su incorporación en una matriz polimérica. El FE presentó actividad antibacterial sobre las cepas evaluadas encontrándose una CMI y CML similar en ambas bacterias. El desarrollo de los distintos lotes de películas mediante extrusión tuvo efecto sobre el espesor. Las películas presentaron actividad antibacterial tanto por efecto de la incorporación de quitosano como por la presencia de FE, observándose agregación de las células bacterianas. Adicionalmente, tanto *P. fluorescens* como *S. aureus* presentaron modificaciones en su morfología y viabilidad por efecto de los tratamientos. En cuanto a las propiedades ópticas y mecánicas de las películas desarrolladas, éstas fueron afectadas por su composición. Sin embargo, las películas de APL/quitosano incorporadas con 15% de FE podrían resultar una potencial alternativa en la aplicación como envases activos, por lo cual resulta necesario continuar con este tipo de estudios similares para establecer su comportamiento sobre diferentes microorganismos, sistemas poliméricos y alimenticios.

## RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar una caracterización estructural de las películas elaboradas, utilizando técnicas como Espectroscopía de Infrarrojo (FT-IR), con la finalidad de conocer las posibles interacciones entre los componentes de las formulaciones empleadas para la elaboración de las películas poliméricas.
2. Se recomienda evaluar la actividad antibacterial de diferentes proporciones de quitosano/FE incorporadas a las películas, en concentraciones mayores a las del presente estudio.
3. Se recomienda evaluar el efecto de la incorporación de plastificante en las propiedades de las películas elaboradas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar-Vega, M. (2013). Structure and Mechanical Properties of Polymers. In *Handbook of Polymer Synthesis. Characterization and Processing* (pp. 425–434).
- Aljawish, A., Chevalot, I., Jasniewski, J., Revol-Junelles, A.-M., Scher, J., & Muniglia, L. (2014). Laccase-catalysed Functionalisation of Chitosan by Ferulic Acid and Ethyl Ferulate: Evaluation of Physicochemical and Biofunctional Properties. *FOOD CHEMISTRY*, *161*, 279–287. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.076>
- Aljawish, A., Muniglia, L., Klouj, A., & Jasniewski, J. (2016). Characterization of Films Based on Enzymatically Modified Chitosan Derivatives with Phenol Compounds. *Food Hydrocolloids*, *60*, 551–558. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.032>
- Arrieta, M. P., López, J., Ferrándiz, S., & Peltzer, M. A. (2013). Characterization of PLA-Limonene Blends for Food Packaging Applications. *Polymer Testing*, *32*(4), 760–768. <http://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2013.03.016>
- Arrieta, M. P., López, J., Hernández, A., & Rayón, E. (2014). Ternary PLA – PHB – Limonene Blends Intended for Biodegradable Food Packaging Applications. *European Polymer Journal*, *50*, 255–270. <http://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2013.11.009>
- Askeland, D. R. (2004). *Introduction to Materials Science and Engineering*. Madrid, España: International Thompson Publishing.
- Avérous, L. (2013). *Synthesis, Properties, Environmental and Biomedical Applications of Polylactic Acid*, (2008). <http://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2834-3.00009-4>
- Ayana, B., Turhan, K. N., & Wiley, J. (2009). Use of Antimicrobial Methylcellulose Films to Control *Staphylococcus aureus* During Storage of Kasar Cheese and Science, (August), 461–469.
- Bastarrachea, L. J., Wong, D. E., Roman, M. J., Lin, Z., & Goddard, J. M. (2015). Active Packaging Coatings, 771–791. <http://doi.org/10.3390/coatings5040771>
- Bonilla, J., Fortunati, E., Vargas, M., Chiralt, A., & Kenny, J. M. (2013). Effects of Chitosan on the Physicochemical and Antimicrobial Properties of PLA Films. *Journal of Food Engineering*, *119*(2), 236–243. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.05.026>
- Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J., & Simo, M. (2013). Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. *Microbial Drug Resistance*, *0*(0). <http://doi.org/10.1089/mdr.2012.0244>
- Boz, H. (2015). Ferulic Acid in Cereals – A Review, *2015*(1), 1–7. <http://doi.org/10.17221/401/2014-CJFS>
- Carrasco, F., & MasPOCH, M. L. (2012). Melt Processing of Poly (lactic acid): Behavior and Stability Against.
- Castro-Aguirre, E., Iñiguez-Franco, F., Samsudin, H., Fang, X., & Auras, R. (2016). Poly(lactic acid) – Mass Production, Processing, Industrial Applications, and End of Life. *Advanced Drug Delivery Reviews*. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2016.03.010>
- Cazón, P., Velazquez, G., Ramírez, J. A., & Vázquez, M. (2016). Polysaccharide-Based Films and Coatings for food Packaging: A Review. *Food Hydrocolloids*. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.009>
- Cha, D. S. U., & Chinnan, M. S. (2004). Biopolymer-Based Antimicrobial Packaging: A Review, (January 2013), 37–41. <http://doi.org/10.1080/10408690490464276>
- Chandrasekaran, M., & Venkatesalu, V. (2004). Antibacterial and Antifungal Activity of *Syzygium jambolanum* Seeds, *91*(November 2003), 105–108. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2003.12.012>
- Chen, C., Dong, L., & Cheung, M. K. (2005). Preparation and Characterization of Biodegradable Poly (L -lactide)/ Chitosan Blends. *European Polymer Journal*, *41*, 958–966. <http://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2004.12.002>
- Cueva, C., Moreno-Arribas, M. V., Martínez, P. J., Bills, G., Vicente, M. F., Basilio, A., &

- Rodríguez, J. M. (2010). Antimicrobial Activity of Phenolic Acids Against Commensal, Probiotic and Pathogenic Bacteria, *161*. <http://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.04.006>
- Dilbaghi, N., & Sharma, S. (2007). Food and Industrial Microbiology. Food Spoilage, Food Infections and Intoxications Caused by Microorganisms and Methods for Their Detection.
- Ebnesajjad, S. (2014). *Plastic Films in Food Packaging: Materials, Technology and Applications*.
- Elsabee, M. Z., & Abdou, E. S. (2013). Chitosan Based Edible Films and Coatings: A Review. *Materials Science & Engineering C*, *1006680474*, 1–23. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.010>
- Emblem, A. (2012). Plastics Properties for Packaging Materials. In *Packaging Technology, 2012*, Pages 287-309. <http://doi.org/10.1533/9780857095701.2.287>
- FAO. (2004). *Global Food Losses and Food Waste*.
- Gabor, D., & Tita, O. (2012). Biopolymers Used in Food Packaging: A Review, *XVI(2)*, 3–19.
- Gachkar, L., Yadegari, D., Bagher, M., & Taghizadeh, M. (2007). Food Chemistry Chemical and Biological Characteristics of Cuminum cyminum and Rosmarinus officinalis Essential Oils, *102*, 898–904. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.035>
- Gámez de León, N., & Sánchez-González, M. (2006). Extracción Químico Enzimática del Ácido Ferúlico Presente en Diferentes Variedades de Maíz Mexicano. *REVISTA SALUD PUBLICA Y NUTRICIÓN Edición Especial No. 11-2006 II Congreso de Ciencias Farmacéuticas de La Conferencia Hispanoamericana de Facultades de Farmacia (COHIFFA) Y El VIII Congreso Regional de Químicos Fármaco Biólogos*, (11).
- 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 Running Head: Modification of Biopolymer Films by Crosslinking. *International Journal of Biological Macromolecules*. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.093>
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bartholin, J., Christensen, A. B., & Givskov, M. (2002). Food Spoilage — Interactions Between Food Spoilage Bacteria, *78*, 79–97.
- Gyawali, R., & Ibrahim, S. A. (2014). Natural Products as Antimicrobial Agents. *Food Control*. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.047>
- Heleno, S. A., Martins, A., João, M., Queiroz, R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Bioactivity of Phenolic Acids: Metabolites Versus Parent Compounds: A Review. *FOOD CHEMISTRY*, *173*, 501–513. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.057>
- Hintze, J. L. (2007). Number Cruncher Statistical System.
- Hosseinnejad, M., & Jafari, S. M. (2016). Evaluation of Different Factors Affecting Antimicrobial Properties of Chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.022>
- Islam, M. S. (2012). Synthesis of Polylactic Acid for Biomedical, Food Packaging and Structural Applications: A Review.
- Jin, W., & Yamada, K. (2016). *Chapter 14. Staphylococcal Enterotoxins in Processed Dairy Products. Food Hygiene and Toxicology in Ready to Eat Foods*. Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-801916-0.00014-5>
- Kac̣ániová, M., Terentjeva, M., Vukovic, N., Roychoudhury, S., Puchalski, C., Kunová, S., ... Ivanišová, E. (2017). The Antioxidant and Antimicrobial Activity of Essential Oils Against Pseudomonas spp. Isolated From Fish. <http://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.07.005>
- Kumar, A., & Kanwar, S. S. (2010). Synthesis of Ethyl Ferulate in Organic Medium Using Celite-Immobilized Lipase. *Bioresource Technology*, *102(3)*, 2162–2167. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.027>
- Kumar, M. N. V. R. (2000). A Review of Chitin and Chitosan Applications, *46*, 1–27.
- Malhotra, B., Keshwani, A., & Kharkwal, H. (2015). Antimicrobial Food Packaging: Potential & Pitfalls, (October 2016). <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00611>
- Martínez-Camacho, A. P., Cortez-Rocha, M. O., Ezquerro-Brauer, J. M., Graciano-Verdugo, A. Z., Rodríguez-Félix, F., Castillo-Ortega, M. M., ... Plascencia-Jatomea, M. (2010). Chitosan

- Composite Films: Thermal, Structural, Mechanical and Antifungal Properties. *Carbohydrate Polymers*, (September 2010). <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.069>
- Martins, J. T., Cerqueira, M. A., & Vicente, A. A. (2012). Influence of  $\alpha$ -Tocopherol on Physicochemical Properties of Chitosan-Based Films. *Food Hydrocolloids*, 27, 220–227. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.06.011>
- Mastromatteo, M., Mastromatteo, M., Conte, A., & Del, A. (2010). Advances in Controlled Release Devices for Food Packaging Applications. *Trends in Food Science & Technology*, 21(12), 591–598. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.07.010>
- McKeen, L. W. (2017). Film Properties of Plastics and Elastomers. Introduction to Plastics and Polymers. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-813292-0.00001-0>
- Merkl, R., Hrádková, I., Filip, V., & Šmidrkal, J. (2010). Antimicrobial and Antioxidant Properties of Phenolic Acids Alkyl Esters, 28(4), 275–279.
- Moore, E. R. B., Tindall, B. J., Santos, V. A. P. M. Dos, Pieper, D. H., Ramos, J.-L., & Palleroni, N. J. (2006). Nonmedical: Pseudomonas, 646–703.
- Moreno-Vásquez, M. J., Castillo-Yáñez, F. J., Rodríguez-Félix, F., & Graciano-Verdugo, A. Z. (2016). Preparation and Characterization of Films Made of Poly(L-lactic acid)/ Poly(L-lactic acid) Grafted Maleic Anhydride/Epigallocatechin Gallate Blends for Antibacterial Food Packaging. *Journal of Plastic Film & Sheeting*. <http://doi.org/10.1177/8756087916631602>
- Moreno-Vásquez, M. J., Plascencia-Jatomea, M., Ocaño-Higuera, V. M., Castillo-Yáñez, F. J., Rodríguez-Félix, F., Rosas-Burgos, E. C., & Graciano-Verdugo, A. Z. (2017). Engineering and Antibacterial Properties of Low-Density Polyethylene Films with Incorporated Epigallocatechin Gallate. *Journal of Plastic Film & Sheeting*. <http://doi.org/10.1177/8756087916689382>
- Moreno-Vásquez, M. J., Valenzuela-Buitimea, E. L., Sánchez-Valdes, S., Rosas-Burgos, E. C., & Ocaño-Higuera, V. M. (2017). Functionalization of Chitosan by a Free Radical Reaction: Characterization, Antioxidant and Antibacterial Potential. *Carbohydrate Polymers*, 155, 117–127. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.056>
- Muriel-Galet, V., López-Carballo, G., Gavara, R., & Hernández-Muñoz, P. (2012). Antimicrobial Food Packaging Film Based on the Release of LAE from EVOH. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 239–244. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.009>
- Nobile, M. A., Del, Conte, A., Buonocore, G. G., Incoronato, A. L., Massaro, A., & Panza, O. (2009). Active Packaging by Extrusion Processing of Recyclable and Biodegradable Polymers, 93, 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.12.022>
- Peng, Y., Wu, Y., & Li, Y. (2013). Development of Tea Extracts and Chitosan Composite Films for Active Packaging Materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 282–289. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.019>
- Prasad, P., & Kochhar, A. (2014). Active Packaging in Food Industry: A Review, 8(5), 1–7.
- Raafat, D., & Sahl, H. (2009). Minireview Chitosan and Its Antimicrobial Potential – A Critical Literature Survey, 2, 186–201. <http://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00080.x>
- Rahman, N. J. A., Noor, S. M. R. M., & Ariffin, N. (2014). Antibacterial Study of Olive-Based Ferulate Esters, 4(1), 1143–1151.
- Realini, C. E., & Marcos, B. (2014). Active and Intelligent Packaging Systems for a Modern Society. *MESC*, 98(3), 404–419. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.06.031>
- Rivera, D., Toledo, V., Reyes-Jara, A., Navarrete, P., Tamplin, M., Kimura, B., ... Switt, A. I. M. (2017). Approaches to Empower the Implementation of New Tools to Detect and Prevent Foodborne Pathogens in Food Processing. *Food Microbiology*. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.009>
- Schmitt, M., & Schuler-Schmid, U. (1990). Temperature Limits of Growth , TNase and Enterotoxin Production of Staphylococcus aureus Strains Isolated From Foods, 11.
- Serna, L., & Albán, F. (2003). Ácido Poliláctico ( PLA ): Propiedades y Aplicaciones, (1), 16–27.
- Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability, (November), 3–5.

<http://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>

- Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., & Bigger, S. W. (2003). Active Packaging Technologies with an Emphasis on Antimicrobial Packaging and its Applications, 68(2).
- Torres-Huerta, A. M., Palma-Ramírez, D., Domínguez-Crespo, M. A., & Angel-López, D. Del. (2014). Comparative Assessment of Miscibility and Degradability on PET / PLA and PET / Chitosan Blends. *European Polymer Journal*, 61, 285–299. <http://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.10.016>
- Valíček, J., Harníčárová, M., Öchsner, A., Hutýrová, Z., Kušnerová, M., Tozan, H., ... Zajac, J. (2015). Quantifying the Mechanical Properties of Materials and the Process of Elastic-Plastic Deformation under External Stress on Material, 7401–7422. <http://doi.org/10.3390/ma8115385>
- Vieira, M. G. A., Altenhofen, M., Santos, L. O. dos, & Beppu, M. M. (2011). Natural-Based Plasticizers and Biopolymer Films: A Review. *European Polymer Journal*, 47(3), 254–263. <http://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.12.011>
- Wessling, B. C., Nielsen, T., & Leufve, A. (2000). The Influence of a -Tocopherol Concentration on the Stability of Linoleic Acid and the Properties of Low-density Polyethylene, 19–28.
- Xia, W., Liu, P., Zhang, J., & Chen, J. (2011). Food Hydrocolloids Biological Activities of Chitosan and Chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids*, 25(2), 170–179. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.03.003>
- Xing, K., Guang, X., Kong, M., Sheng, C., Su, D., & Jin, H. (2009). Effect of Oleoyl-Chitosan Nanoparticles as a Novel Antibacterial Dispersion System on Viability, Membrane Permeability and Cell Morphology of Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Carbohydrate Polymers*, 76, 17–22. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.09.016>
- Zhao, Z., & Moghadasian, M. H. (2008). Chemistry, Natural Sources, Dietary Intake and Pharmacokinetic Properties of Ferulic Acid: A Review, 109, 691–702. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.039>