



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTILÁN.**

“EFECTO ANTIMICROBIANO DE UN
RECUBRIMIENTO COMESTIBLE APLICADO
A MELÓN CANTALOUPE”.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERA EN ALIMENTOS.

PRESENTA:

DIANA DANIELA GOVANTES GUEVARA.

ASESOR:

DRA. CLARA INÉS ÁLVAREZ MANRIQUE.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS:

A Dios por estar siempre a mi lado y guiar mis pasos.

A mis padres por ayudarme a cumplir uno de mis más grandes sueños. Gracias por su tiempo y dedicación, por sus consejos, por respetar mis decisiones y principalmente, por ser unas personas admirables y un ejemplo a seguir.

A mis hermanos por confiar en mí. Espero que este logro en mi carrera los motive a cumplir sus sueños.

A mi familia por ese espíritu de lucha que los caracteriza y que me impulso a seguir adelante.

A Pinto por formar parte de mi vida, por contagiarme con tu alegría en los momentos más difíciles, por tus consejos y críticas, por apoyarme y enseñarme a cumplir mis sueños, pero lo más importante, por haberme enseñado el significado del amor y hacerme feliz.

A Rosita por abrirme las puertas de su corazón, por brindarme su apoyo incondicional y tener las palabras justas para animarme e incitarme a seguir adelante.

A la Dra. Clara Inés por ser un gran ser humano y enseñarme a conocer y escuchar la voz más importante en mi corazón. Gracias por ser una gran amiga, por impulsarme a enfrentar los retos que se presentan en la vida y por creer en mí.

A Tania por permitirme formar parte de tu vida y ayudarme a crecer como amiga.

A mis amigos (Jazmín “cuñis”, Guicela, Nachito, José Luis, Beto, Carlitos, Job, Gemelo, Claus y Paquito -PFC-, Gil y Mary “compadres”, Karlita y Vianey) por recorrer este camino conmigo, por su motivación y consejos.

A mis profesores (Natividad, Trejo, Guadalupe Franco, Sevilla, Miriam, Sara, Laura Cortázar, Edgar Arechavaleta, Leticia Zúñiga, Susana Miranda, Francisco Montiel, Clara Inés, Guadalupe Amaya, Carmen, José Luis y Edgar) por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias, por su paciencia y empeño en formar profesionistas de calidad.

ÍNDICE.

	Página
Resumen	viii
1.- Introducción	1
2.- Antecedentes	
2.1.- Generalidades del melón	3
2.1.1.- Descripción	
2.1.2.- Variedades	
2.1.3.- Importancia económica y distribución geográfica	
2.1.4.- Pérdidas poscosecha	
2.2.- Microorganismos de importancia en frutas	7
2.2.1.- Microflora en frutas	
2.2.2.- Inocuidad de frutas y hortalizas frescas	
2.2.3.- <i>Escherichia coli</i>	
2.2.4.- <i>Salmonella spp.</i>	
2.2.5.- <i>Listeria spp.</i>	
2.3.- Envases comestibles antimicrobianos	18
2.3.1.- Definición	
2.3.2.- Componentes	
2.3.3.- Formulación	
2.3.4.- Técnicas de aplicación	
2.3.5.- Mecanismo de acción	
2.3.6.- Efectividad del envase comestible antimicrobiano	
2.3.7.- Requisitos	
2.3.8.- Aplicaciones	
3.- Objetivos	38
4.- Cuadro metodológico	39

5.- Materiales y Métodos

5.1.- Cepas bacterianas	40
5.2.- Melón Cantaloupe	40
5.3.- Selección de la formulación del recubrimiento	40
5.3.1.- Preparación de diferentes recubrimientos	
5.4.- Comportamiento del recubrimiento seleccionado durante su aplicación a diferentes frutos	41
5.4.1.- Preparación de dos variantes del <i>recubrimiento C*</i>	
5.4.2.- Efecto físico de las dos del recubrimiento seleccionado en frutos	
5.5.- Selección de la concentración del antimicrobiano “ <i>in vitro</i> ”	42
5.5.1.- Preparación de los cultivos patrón	
5.5.2.- Comportamiento del recubrimiento comestible antimicrobiano, en función del tiempo	
5.5.3.- Selección de la concentración bactericida del antimicrobiano	
5.6.- Evaluación del recubrimiento comestible antimicrobiano en cáscara de melón	44
5.6.1.- Optimización de la formulación del recubrimiento seleccionado	
5.6.2.- Preparación de los cultivos bacterianos	
5.6.3.- Preparación de las muestras	
5.6.4.- Inoculación de microorganismos en cáscara de melón	
5.6.5.- Aplicación del recubrimiento comestible antimicrobiano	
5.6.6.- Análisis microbiológico	
5.6.7.- Análisis estadístico	
5.7.- Propiedades del recubrimiento comestible	47
5.7.1.- Espesor	
5.7.2.- Solubilidad	
5.7.3.- Color	
5.7.4.- Análisis estadístico	

6.- Resultados	
6.1.- Selección de la formulación del recubrimiento	49
6.2.- Comportamiento del recubrimiento comestible seleccionado durante su aplicación a diferentes frutos	50
6.3.- Selección de la concentración del antimicrobiano “ <i>in vitro</i> ”	52
6.4.- Evaluación del recubrimiento comestible en cáscara de melón	57
6.5.-Propiedades del recubrimiento comestible	67
7.- Discusión	70
8.- Conclusiones	78
9.- Recomendaciones	79
10.- Referencias	80

ÍNDICE DE TABLAS.

Número	Leyenda	Página
1	Brotos de infecciones epidemiológicas asociadas con frutas y hortalizas frescas y productos sin pasteurizar	10
2	Antimicrobianos en envases comestibles y biodegradables	29
3	Características de los recubrimientos elaborados en diferentes condiciones	49
4	Comparación de las variantes del <i>recubrimiento C*</i> con antimicrobiano, aplicados a frutos frescos	50
5	Comportamiento del recubrimiento con antimicrobiano al 0.02% frente a <i>E. coli H10407</i> , con respecto al tiempo	52
6	Selección de la concentración del antimicrobiano en el recubrimiento, en función de su efecto inhibitorio en caldo	53
7	Actividad antibacteriana del recubrimiento con antimicrobiano al 0.02%, en agar	54
8	Actividad antibacteriana del recubrimiento con antimicrobiano al 0.08%, en agar	56
9	Reducción logarítmica de <i>E. coli H10407</i> , <i>S. typhi</i> y <i>L. monocytogenes</i> en cáscara de melón, 2h postratamiento con el recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%	57
10	Reducción logarítmica de <i>E. coli H10407</i> , <i>S. typhi</i> y <i>L. monocytogenes</i> en cáscara de melón, 24h postratamiento con el recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%	62
11	Identificación de cepas sospechosas de <i>S. typhi</i> , aisladas de cáscara de melón inoculadas y sin inocular	64
12	Espesor del recubrimiento comestible antimicrobiano	67
13	Solubilidad del recubrimiento comestible antimicrobiano	68
14	Parámetros de color del recubrimiento comestible antimicrobiano	68
15	Interpretación del parámetro h^*_{ab}	69

ÍNDICE DE FIGURAS.

Número	Leyenda	Página
1	Melón Cantaloupe	4
2	Melón Honey Dew	4
3	Participación en las exportaciones mundiales de melón	5
4	Principales abastecedores de melón Cantaloupe en el mercado estadounidense	5
5	Escaneado con microscopía electrónica de cáscara de melón Cantaloupe	6
6	Contaminación de frutas y hortalizas frescas	7
7	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	13
8	<i>Salmonella typhi</i>	15
9	<i>Listeria monocytogenes</i>	16
10	Recubrimiento C*	49
11	Cáscara de melón Cantaloupe con diferentes tratamientos, almacenada a 8°C por 6 días	51
12	Efecto inhibitorio del recubrimiento con antimicrobiano al 0.02%, frente a <i>E. coli</i> H10407, <i>S. typhi</i> y <i>L. monocytogenes</i> , en caldo, después de 24h de acción	53
13	Susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar	54
14	Prueba de inhibición del recubrimiento con antimicrobiano al 0.02%, frente a <i>E. coli</i> H10407 y <i>S. typhi</i>	55
15	Prueba de inhibición del recubrimiento con antimicrobiano al 0.08%, frente a <i>L. monocytogenes</i>	56
16	Efecto inhibitorio del recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%, frente a <i>E. coli</i> H10407, después de 2h de acción	58
17	Efecto inhibitorio del recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%, frente a <i>S. typhi</i> , después de 2h de acción	59

18	Efecto inhibitorio del recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%, frente a <i>L. monocytogenes</i> , después de 2h de acción	60
19	Pruebas bioquímicas para la identificación de <i>Salmonella</i>	66
20	Crecimiento de <i>Salmonella</i> en placa de CHROMagar™ <i>Salmonella</i>	67
21	Coordenadas colorimétricas	69

ÍNDICE DE GRÁFICAS.

Número	Leyenda	Página
1	Actividad inhibitoria del recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%, frente a <i>E. coli H10407</i> , después de 2h de acción	58
2	Actividad inhibitoria del recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%, frente a <i>S. typhi</i> , después de 2h de acción	59
3	Actividad inhibitoria del recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%, frente a <i>L. monocytogenes</i> , después de 2h de acción	60
4	Actividad inhibitoria del recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%, frente a <i>E. coli H10407</i> , <i>S. typhi</i> y <i>L. monocytogenes</i> , después de 24h de acción	63

RESUMEN.

En el presente estudio se evaluó el efecto de un recubrimiento comestible con antimicrobiano al 0.55% frente a *Escherichia coli* H10407, *Salmonella typhi* y *Listeria monocytogenes*, inoculados en una concentración final de $8.75\log_{10}$, $7.57\log_{10}$ y $8.77\log_{10}$, respectivamente, en un área de 25cm^2 de cáscara de melón Cantaloupe. Las muestras inoculadas fueron tratadas con 15ml del recubrimiento y se secaron con aire a 18°C y 38%HR. Para su análisis microbiológico, todas las muestras (control de ausencia de microorganismo, control de microorganismo inoculado y cáscara de melón con microorganismo y recubrimiento) fueron lavadas en bolsas ziploc[®] con 20ml de caldo BHI, para reactivar a cada microorganismo inoculado y posteriormente, realizar su conteo en placa.

Los resultados demostraron que el recubrimiento con antimicrobiano fue capaz de reducir $5.65\log_{10}$ de *E. coli* H10407, $5.2\log_{10}$ de *S. typhi*, $8.77\log_{10}$ de *L. monocytogenes* y aproximadamente, $2.87\log_{10}$ de la microflora nativa a las 2h de acción, conservando la misma actividad después de 24h. En cuanto a sus propiedades, el recubrimiento desarrollado presentó las siguientes características: un espesor de $69.9\mu\text{m}$, soluble en agua, brillante y con un color rojo insaturado.

1.- INTRODUCCIÓN.

La constante demanda de frutas frescas mínimamente procesadas y la exigente regulación fitosanitaria de organismos tanto nacionales como internacionales, hace que sea necesario el estudio de tratamientos superficiales, para prolongar la vida de almacenamiento poscosecha de frutas, ya que las mayores pérdidas en la producción hortofrutícola ocurren en esta etapa (Guzmán, 2003; Tharanathan, 2003).

Debido a que su superficie está expuesta a contaminantes naturales, muchos productos frescos retienen poblaciones de 10^4 - 10^6 microorganismos/g. La contaminación se origina directa o indirectamente por tierra, agua, equipo y materia fecal, ya sea pre o poscosecha. Los factores que contribuyen a la contaminación son: procesos inadecuados en los campos de cultivo; el uso de frutos podridos o dañados; prácticas deficientes de desinfección y mal manejo durante el empaque, almacenamiento y transporte (Ukuku, 2004; Parnell, 2004). Una vez que ocurre la contaminación, muchos microorganismos poseen la capacidad de sobrevivir por largos periodos de tiempo; otros, también son capaces de sobrevivir a procesos de desinfección e incluso de multiplicarse en el producto durante el almacenamiento (Chaidez, 2002).

El melón mexicano es el tercer producto agropecuario en el renglón de captación de divisas y México es el segundo exportador mundial después de España y el proveedor más importante de Estados Unidos (Barreiro, 2000). Reportes recientes documentan la dificultad de limpiar y desinfectar la cáscara de melón Cantaloupe, ya que sus dobleces y concavidades, proporcionan lugares donde los microorganismos pueden residir, haciéndolo más difícil de sanitizar (Suslow, 2002a; Chue, 2002). Aunado a esto, una vez que la cáscara se rompe, la pulpa puede ser contaminada (Penteado, 2004).

En Octubre del 2002, la FDA lanzó una alerta en la importación de melón Cantaloupe de México (Richards, 2005), ya que ha sido asociado con brotes de enfermedades involucradas con *E. coli* O157:H7, Norovirus y numerosas serovariedades de *Salmonella*, incluyendo *S. chester*, *S. poona*, *S. oranienburg* y *S. saphra* (Parnell, 2004). Por otro lado, *Listeria monocytogenes* es de especial preocupación, ya que puede crecer a temperaturas de refrigeración, persiste como un contaminante medio ambiental y tiene la potencialidad para causar muertes asociadas con brotes (Penteado, 2004).

Los procesos físicos y químicos como la esterilización, presión, irradiación, secado, congelación, refrigeración y la adición de sales, fueron desarrollados para preservar la calidad de diversos alimentos durante el almacenamiento, desafortunadamente, algunas de estas técnicas no pueden ser aplicadas a todos los productos alimenticios, y generalmente, provocan pérdidas de componentes relacionados con el sabor y color, por lo que es indispensable desarrollar nuevos procesos tendientes a mejorar la estabilidad de los alimentos durante el almacenamiento, procurando conservar sus propiedades sensoriales lo más parecidas a las del producto fresco (Naidu, 2000; Quintavalla, 2002).

En general, las películas y recubrimientos comestibles y/o biodegradables son una alternativa de protección; su objetivo fundamental es mantener o mejorar la calidad de los alimentos, mediante el control de la migración de humedad, el control de la velocidad de respiración y la disminución de la pérdida de nutrientes, sirviendo de vehículo de antioxidantes, saborizantes, vitaminas, colorantes y antimicrobianos (Xu, 2001; Casariego, 2002b). Las películas y recubrimientos comestibles con antimicrobiano se convierten entonces, en barreras activas que proveen una protección adicional contra la contaminación microbiana, ya que liberan al agente activo en la superficie de los alimentos, donde los microorganismos usualmente crecen y causan putrefacción, y limitan la difusión del antimicrobiano de la superficie al interior del alimento, apoyando así la inocuidad del producto (Ozdemir, 2001).

2.- ANTECEDENTES.

2.1.- GENERALIDADES DEL MELÓN.

2.1.1.- Descripción.

El melón (*Cucumis melo*) es un fruto fresco carnosos, perteneciente a la familia de las *Cucurbitáceae*, la cual también incluye a la sandía, el pepino y las calabazas. Los melones son cultivos adaptados a climas cálidos y se comportan mejor a humedades bajas y con poca lluvia (Astiasarán, 2000; oirsa, 2002). En la República Mexicana, este fruto se produce y encuentra todo el año, con mayor producción de Enero a Mayo (Barreiro, 2000).

2.1.2.- Variedades.

El melón está dividido en siete variantes botánicas: *cantaloupeensis*, *reticulatus*, *inodorous*, *flexuosus*, *conomon*, *chito* y *dudaim* (Astiasarán, 2000; oirsa, 2002).

En México se cultivan principalmente las variedades *reticulatus* (melón Cantaloupe) ([Figura 1](#)), y en menor proporción *inodorous* (melón Honey Dew) ([Figura 2](#)) (Barreiro, 2000).

Melón Cantaloupe. Presenta frutos de forma variable (redonda, esférica, elíptica, etc.), ligeramente deprimidos en sus extremos y acostillados. Se caracterizan por poseer una piel lisa, reticulada o estriada, de color verde claro a grisáceo. La pulpa es gruesa y puede ser de color amarilla, anaranjada o verdosa; dulce (11-15°Brix) y con aroma intenso. La placenta contiene las semillas y puede ser seca, gelatinosa o acuosa, en función de su consistencia; resulta importante que sea pequeña para que no reste pulpa al fruto y que las semillas estén bien situadas en la misma para que no se muevan durante el transporte (Barboza, 2002; Suslow, 2002b).

El fruto madura después de la cosecha, es decir, es un fruto climatérico, cuya velocidad de respiración es mínima en la madurez fisiológica y aumenta al pico climatérico durante la madurez comercial, pero su contenido de azúcar no aumenta. Su peso oscila entre 0.5 y 3 Kg y su vida poscosecha es reducida (infoagro, 2003; Sariful, 2001).

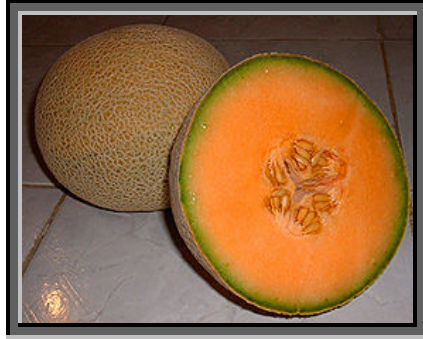


Figura 1.- Melón Cantaloupe (SeedQuest, 2006).

Melón Honey Dew. Los frutos son esféricos, grandes y tienen un peso medio de 2 Kg. La cáscara es lisa o estriada, verde-amarilla y granulosa; la pulpa es verde claro, muy dulce (12-15°Brix) y jugosa. Son de madurez tardía y poseen buena conservación después de la cosecha y adaptación al transporte (infoagro, 2003; Barboza, 2002).



Figura 2.- Melón Honey Dew (SeedQuest, 2006).

2.1.3.- Importancia económica y distribución geográfica.

El melón, desde los años veinte, ha sido un producto generador de divisas y empleo rural para el país, fuentes de empleo e ingreso de utilidades para los productores mexicanos. Sin embargo, es a partir de los años sesenta cuando su presencia toma importancia entre los productores, derivado de una mayor demanda tanto del mercado nacional como del internacional. Dentro de los principales productores de melón a nivel mundial destacan: España, México, Estados Unidos, Costa Rica y Honduras (*Figura 3*); siendo México el abastecedor más importante de Estados Unidos, seguido por Honduras, Guatemala y Costa Rica (*Figura 4*). A nivel nacional, las regiones productoras son: Sonora, Durango, Colima, Coahuila, Michoacán, Chiapas, Chihuahua y Jalisco (Barreiro, 2000).

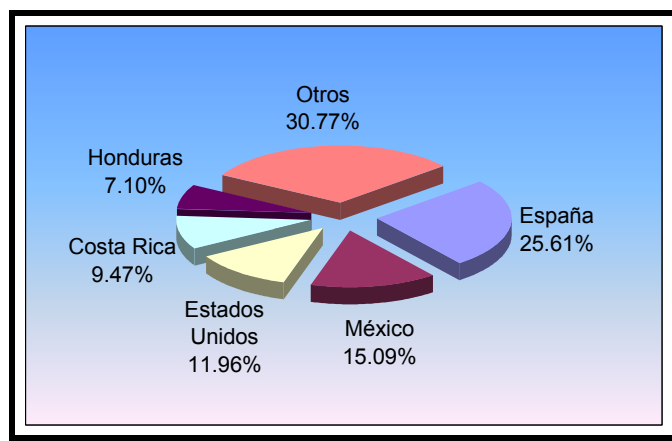


Figura 3.- Participación en las exportaciones mundiales de melón (Barreiro, 2000).

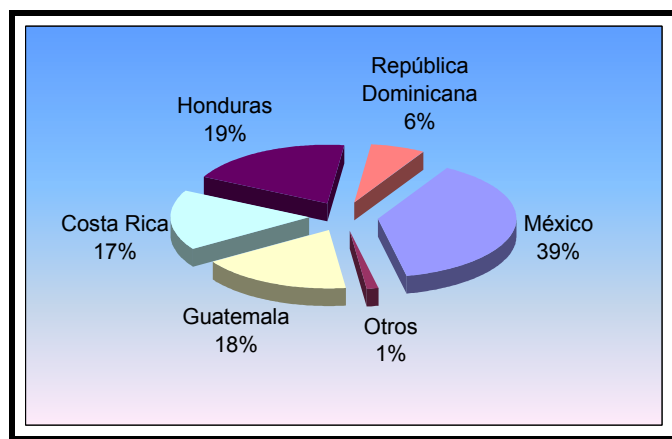


Figura 4.- Principales abastecedores de melón Cantaloupe en el mercado estadounidense (Barreiro, 2000).

2.1.4.- Pérdidas poscosecha.

El deterioro o alteración de los frutos puede deberse a factores tales como:

1. Infestación de insectos, plagas y roedores.
2. Lesiones físicas por golpes, presiones, heladas, deshidratación y radiación.
3. Reacciones enzimáticas.
4. Reacciones químicas no producidas por microorganismos ni por enzimas (oscurecimiento no enzimático, desnaturalización de proteínas y degradación de pigmentos naturales).
5. Actividad de los microorganismos, sobre todo bacterias, levaduras y mohos (Rodríguez, 2001; Petersen, 1999; Krochta, 1997).

En el caso del melón, las enfermedades más comunes son: *La Doradilla*, la marchitez por *Fusarium*, el *Mildiú vellosa*, *Mildiú polvoriento*, gomosis del tallo, virosis, pudrición carbonosa –*Macrophomina phaseolina*–, marchitamiento del melón –*Fusarium oxysporum*–, declinamiento de las guías y pudrición de raíz –*Monosporascus cannonballus*– y tizón gomoso del tallo –*Dydimella bryoniae*– (Barreiro, 2000). Por otro lado, las pudriciones o lesiones de la superficie son causadas por los hongos fitopatógenos *Alternaria*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Rhizopus*, y en menor grado *Mucor* (infoagro, 2003; Suslow, 2002b).

2.2.- MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA EN FRUTAS

2.2.1.- Microflora en frutas.

Todos los frutos frescos poseen en su superficie una microflora característica que depende del tipo de producto, condiciones de clima, prácticas agronómicas, área geográfica de producción, fase de desarrollo y grado de maduración. El medio ambiente en el cual los frutos crecen, impone factores extrínsecos que influyen en la supervivencia y crecimiento de la microflora superficial asociada, mientras que parámetros intrínsecos como su composición química, la cutícula protectora, pH del fruto y la presencia de antimicrobianos naturales dictan que tipo de producto puede ser más adecuado que otros para proteger a ciertos tipos de microorganismos en tejidos dañados (Garza, 1999; Beuchat, 2002; Harris, 2004).

Las estructuras biológicas tales como la cutícula o piel de las frutas intactas impide la penetración de microorganismos, tales como levaduras, que pudieran proliferar en estos sustratos, a pesar de su pH ácido. Cuando, no obstante, un moho determinante de podredumbre prolifera en una fruta intacta, daña las estructuras externas protectoras, permitiendo así la penetración de otros microorganismos. La edad o grado de maduración de las frutas influyen en la eficacia de estas barreras mecánicas protectoras (Beuchat, 2002; Rodríguez, 2001) (*Figura 5*).



Figura 5.- Escaneado con microscopía electrónica de cáscara de melón Cantaloupe (Parnell, 2004)

La microflora natural en productos frescos incluye especies de *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Clostridium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* y numerosos géneros de bacterias. Las principales especies pertenecen a los grupos de las bacterias lácticas: *Leuconostoc* y *Lactobacillus*, acéticas: *Gluconobacter* y *Acetobacter* y algunas bacterias esporuladas del género *Bacillus* (Garza, 1999; Hernández-Brenes, 2002). Esta microflora natural es mayoritariamente inocua e incluso algunos de estos microorganismos, tienen un efecto letal o antagonista en bacterias capaces de causar enfermedades humanas. De cualquier forma, los patógenos, pueden contaminar frutas y hortalizas vía diversas rutas y a diferentes puntos durante todo el sistema pre y poscosecha (*Figura 6*) (Beuchat, 2002).

Potenciales fuentes precosecha de microorganismos incluye tierra, aire, heces, agua de irrigación, agua usada para aplicar fungicidas e insecticidas, polvo, insectos, composteo de estiércol inadecuado, animales y manipuleo humano. Las fuentes poscosecha incluyen heces, manipuleo humano, equipo, animales, contenedores de transporte, insectos, polvo, agua de enjuague, hielo, vehículos de transporte y equipo de procesado (Beuchat, 2002).

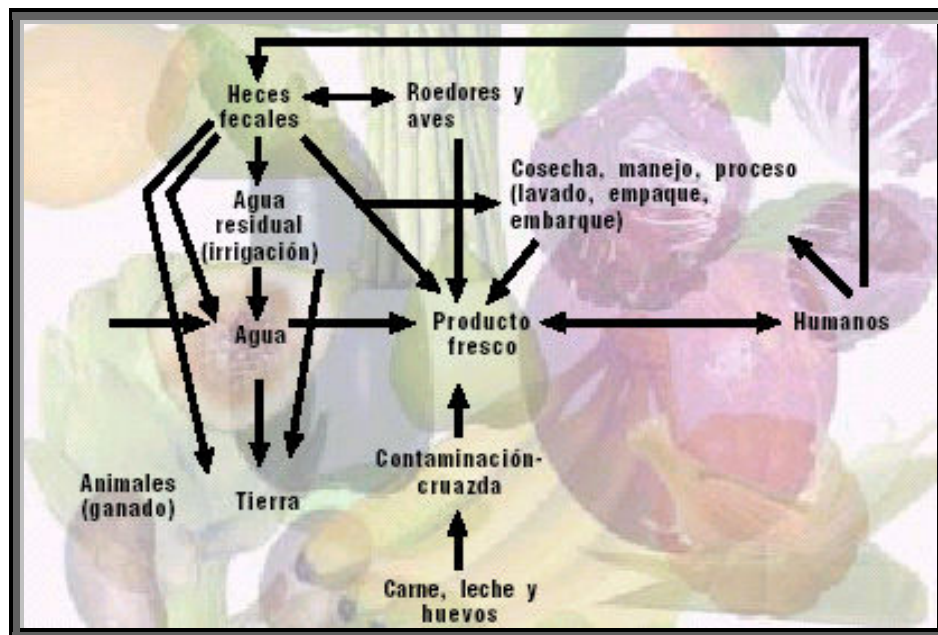


Figura 6.- Contaminación de frutas y hortalizas frescas (Chaidez, 2002)

Algunos patógenos como *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* son acarreados por animales y derramados en sus heces, por lo tanto, el empleo de estiércol sin compostear o inadecuadamente composteado, puede contener estos patógenos y subsecuentemente contaminar el producto. Por otro lado, los insectos como el gusano de harina y la mosca han mostrado ser acarreadores de *E. coli* O157:H7. Estudios en el destino de *E. coli* O157:H7 en heces de bovino revelan que el patógeno sobrevive en el estiércol de vacuno por 42-49 días a 37°C y por 49-56 días a 22°C. Por otro lado, *L. monocytogenes* esta muy distribuida en el medio ambiente, donde es asociada con vegetación podrida, tierra, aguas cloacales y heces de animales, y ha sido aislada de diversos tipos de hortalizas (Beuchat, 2002). Cabe mencionar que aunque en la mayor parte de los casos la contaminación es externa, también se han aislado microorganismos del interior (huesos y pepitas) de los frutos (Garza, 1999; Hernández-Brenes, 2002).

2.2.2.- Inocuidad de frutas y hortalizas frescas

Los brotes de enfermedades recientes producidos por el consumo de frutas y hortalizas frescas contaminadas por microorganismos patógenos ([Tabla 1](#)), demuestran la vulnerabilidad de estos productos. Brotes de gastroenteritis causado por *E. coli* O157:H7 ha sido asociado con el consumo de melón contaminado con la bacteria. Algunos otros brotes de enfermedades bacterianas han sido atribuidos a la contaminación de tomate y melón Cantaloupe (pH 6.2-6.9) contaminados con *Salmonella*, exportados por México a los Estados Unidos (Beuchat, 2002; Chaidez, 2002). Según el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Campylobacter jejuni* son de mayor conciencia por la severidad y número de enfermedades que causan (Richardson, 1998).

Cambios en la demografía social, patrones de consumo de alimentos y conciencia de cuidados de salud (las frutas y hortalizas frescas son potenciales vehículos de infecciones), pueden contribuir a un incremento en los productos asociados a brotes de enfermedades humanas documentados. La adaptación a las condiciones de estrés medioambiental puede resultar en un patógeno mejor adaptado a la supervivencia y crecimiento o a convertirse más virulento. *E. coli O156:H7* y *Salmonella*, por ejemplo, se sabe que se adaptan a pH reducido y subsecuentemente exhibe tolerancia incrementada al estrés medioambiental (Beuchat, 2002).

El comercio global y viajes internacionales han resultado en un contacto incrementado de las personas con patógenos a los cuales no estaban previamente expuestos. El comportamiento ecológico de los patógenos y microorganismos esporulados en frutas y hortalizas frescas puede ser grandemente afectado por estos cambios, incrementado el riesgo de presentación de brotes (Beuchat, 2002). Por lo tanto, la reducción de patógenos en el producto es importante para reducir brotes de enfermedades causadas por alimentos, para disminuir la putrefacción y para mejorar la apariencia y valor nutritivo (Hernández-Brenes, 2002).

La sanitización para mantener un nivel inicial bajo es crítico y debe ser combinado con buenas prácticas de manufactura para prevenir la contaminación con patógenos (Labuza, 1996). Sin embargo, la falta de eficacia de sanitizantes utilizados para descontaminar la superficie de frutas y hortalizas frescas ha sido ampliamente atribuido a la inhabilitación de componentes activos en soluciones de tratamiento para llegar hasta el sitio de las células microbianas (Beuchat, 2002).

La infiltración de patógenos en las grietas, hoyos y espacios intracelulares de frutas y hortalizas ha sido demostrado en varias investigaciones (*Figura 5*). La adición de detergentes (surfactantes) al agua también promueve la infiltración al producto, aparentemente por reducir la tensión superficial del agua en la interfase aire-agua con daño en la cutícula, células parénquima o poros conduciendo dentro del tejido. Sin tener en cuenta el modo de infiltración, las células pueden estabilizar microcolonias que son extremadamente difíciles de alcanzar con soluciones acuosas químicas (Beuchat, 2002). De cualquier forma, la aplicación de esos tratamientos es dependiente de la habilidad del producto a tolerar el agua, ya que la vida útil de algunos productos delicados reduce después de que fueron mojados. Otro medio de limpieza con aire, puede ser preferido para remover polvo y otros desechos de estos productos (Hernández-Brenes, 2002).

Tabla 1.- Brotes de infecciones epidemiológicas asociadas con frutas y hortalizas frescas y productos sin pasteurizar (Beuchat, 2002; Harris, 2004)

MICROORGANISMO	TIPO DE PRODUCTO
Bacterias	
<i>Clostridium botulinum</i>	ensalada de col, aceite de ajo
<i>Campylobacter jejuni</i>	ensaladas, lechuga
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	melón, lechuga, jugo de manzana, rábano, alfalfa, cidra de manzana
<i>E. coli</i> (enterotoxigénica)	zanahorias
<i>Shigella</i>	cebollas verdes, perejil
<i>S. flexneri</i>	ensaladas de frutas
<i>S. sonnei</i>	lechuga, perejil, cebollas
<i>Listeria monocytogenes</i>	ensalada de col, lechuga, tomates, apio
<i>Salmonella</i>	melón, tomates, cidra de manzana, jugo de naranja, mango, almendra
<i>S. miami</i>	sandía
<i>S. typhimurium</i>	sidra de manzana
<i>S. oranienburg</i>	sandía
<i>S. chester</i>	melón Cantaloupe

<i>S. javiana</i>	tomates
<i>S. poona</i>	melón Cantaloupe
<i>S. montevideo</i>	tomates
<i>S. bovismorbificans</i>	alfalfa
<i>S. hartford/gaminara/rubislaw</i>	jugo de naranja
<i>S. stanley</i>	alfalfa
<i>S. montevideo/meleagridis</i>	alfalfa
<i>S. typhi</i>	mamey
<i>S. mbandaka</i>	alfalfa
<i>Vibrio cholerae</i>	hortalizas, leche de coco
Virus	
Calicivirus	ensaladas, frambuesas congeladas
Hepatitis A	lechuga, fresas y frambuesas congeladas, tomates, berros, cebollas verdes
Norwalk	melón, ensaladas verdes, apio, cortes de fruta
Parásitos	
<i>Cyclospora</i>	frambuesa, albahaca, lechuga
<i>C. cayatanensis</i>	frambuesa, lechuga, hortalizas frescas, albahaca
<i>Cryptosporidium</i>	sidra de manzana
<i>C. parvum</i>	cidra de manzana, ensaladas, hortalizas frescas
<i>Giardia</i>	lechuga, cebollas
<i>G. lamblia</i>	hortalizas frescas

Comportamiento de patógenos en biofilms.

La producción de carbohidratos extracelulares complejos (ECC) por patógenos alimentarios en frutas y hortalizas frescas pueden resultar en la protección contra remoción o inactivación por sanitizantes. Se sabe que *E. coli* O157:H7 produce exopolisacáridos (EPS), como una respuesta protectora al estrés medioambiental. Los exopolisacáridos excretados por la bacteria pueden formar una capa cuando están asociados a la pared celular o son liberados por la célula para crear una matriz estructural. Los agregados microbianos que pueden proteger a las bacterias, levaduras y mohos dentro de esta matriz han sido observados en la superficie de plantas y están referidos como biofilms (Beuchat, 2002).

La formación de biofilms consiste en cuatro pasos: formación de una película; adhesión de células bacterianas; crecimiento de las células y producción de exopolisacáridos; y maduración del biofilm (Ryu, 2004). La colonización y el desarrollo de un biofilm, puede seguir resultando en condiciones que pueden proteger contra la muerte de patógenos o promover el crecimiento de esporas o microorganismos patógenos (Beuchat, 2002).

Los contenedores usados para cosechar, transportar y exhibir frutas y hortalizas no son generalmente limpiados y sanitizados efectivamente, lo cual puede conducir al desarrollo de biofilms. Si el patógeno se une al biofilm durante el transporte o procesado, su supervivencia y crecimiento pueden aumentar y por consiguiente, incrementa la probabilidad de contaminación cruzada del producto (Beuchat, 2002).

2.2.3.- *Escherichia coli*

Escherichia coli, es un bacilo Gram negativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* y anaerobio facultativo, suele ser inocuo, pero algunas cepas son capaces de causar gastroenteritis y otras enfermedades (Antón, 2000).

Actualmente, hay cuatro clases de *E. coli* virulentas reconocidas (referidas como el grupo EEC) que causa gastroenteritis en humanos. Entre éstos está la cepa enterohemorrágica (EHEC) designada *E. coli* O157:H7 ([Figura 7](#)), la cual, es una variedad rara de *E. coli* que produce grandes cantidades de una o más toxinas potentes que causan daños severos en la pared del intestino (colitis hemorrágica). Cabe mencionar, que aunque todas las personas son susceptibles a esta enfermedad, los niños y los ancianos parecen desarrollar síntomas más serios (BBB, 2001).

En la industria alimentaria, hoy en día, *E. coli* se ha empleado como indicador del estado higiénico de los alimentos (Antón, 2000), ya que habita normalmente en el intestino de humanos o animales, no encontrándose usualmente en otros nichos; además de que *E. coli* puede ser fácilmente detectado por su habilidad de fermentar la lactosa. Sin embargo, este microorganismo, en algunos casos pudiera no ser tan buen indicador de la presencia de patógenos específicos, debido a la presencia de otras bacterias entéricas como *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*, que también pueden fermentar la lactosa y podrían ser confundidas fenotípicamente en algunos casos, según variantes fenotípicas de las colonias (BAM, 2002). Por otro lado, los microorganismos específicos difieren en su capacidad de supervivencia en el medio ambiente y por consiguiente, la ausencia de estos microorganismos indicadores no siempre garantiza la ausencia de microorganismos patógenos (Chaidez, 2002).

El alimento más frecuentemente identificado en la infección humana es la carne de vacuno, pero también se han identificado como alimentos vehiculantes la carne de pavo, la leche y yogur, mayonesa, hortalizas frescas, agua, brotes de alfalfa, jugos de fruta sin pasteurizar, salami seco-curado, lechuga y requesón (Antón, 2000; BBB, 2001).



Figura 7.- *Escherichia coli* O157:H7 (Dennis Kunkel Microscopy, Inc., 2005).

2.2.4.- *Salmonella* spp.

Salmonella es un bacilo, Gram negativo, anaerobio facultativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*; es móvil mediante flagelos peritricos, a excepción de *S. gallinarum* y *S. pullorum* que no tienen movilidad; no es formadora de esporas (BBB, 1992a). Su principal hábitat es el tracto intestinal de reptiles, aves, animales de granja y personas; como formas intestinales, son excretadas en heces y diseminados en el ambiente, pudiéndose encontrar en agua, tierra, insectos, carne de vaca, carne de pollo y pavo, carne de cerdo, pescado, ancas de rana, camarón, huevos y ovoproductos, leche, helados, coco, mantequilla de maní, cocoa, chocolate, superficies de fábrica y superficies de cocina, por mencionar algunos (Antón, 2000; BBB, 1992a).

La importancia de *Salmonella* radica en que sobrevive en la mayoría de los alimentos y generalmente se multiplica en ellos; crece a temperaturas entre 8 y 45°C; es sensible al calor, no sobrevive a temperaturas superiores a los 70°C y es resistente a la deshidratación por años, sobre todo en heces, polvo y otros materiales secos como algunos alimentos para consumo humano y animal (Giono,1994).

Todas las *Salmonella* se consideran patógenas para el hombre, cuando se ingieren alimentos que contienen un número importante (del orden de 10^7 - 10^9 células viables por gramo de alimento), se puede producir el síndrome de intoxicación alimentaria por *Salmonella* (Antón, 2000), aunque se ha demostrado que basta una concentración entre 3-10 células por gramo de alimento para causar esta enfermedad. Los miembros del género *Salmonella* causan principalmente tres tipos de enfermedad en el hombre: fiebre tifoidea o fiebres entéricas; gastroenteritis y septicemia, adquiriendo importancia relevante en áreas que no han alcanzado las condiciones de saneamiento e higiene, ni cuentan con medidas de salud pública óptimas. En México los serotipos más frecuentemente aislados en casos y brotes son *S. typhi* (Figura 8) y *S. enteritidis* (Giono, 1994).

Todos los grupos de edad son susceptibles a contraer Salmonelosis, pero los síntomas son más severos en los ancianos, niños y los enfermos (BBB, 1992a).

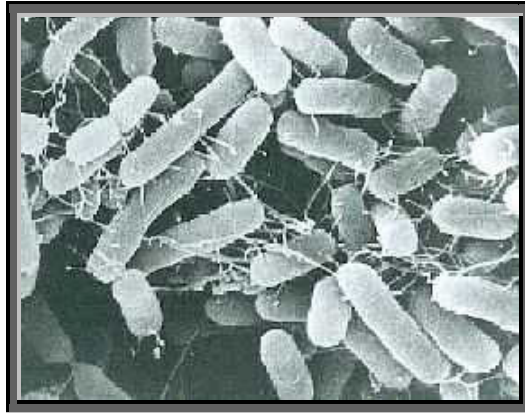


Figura 8.- *Salmonella typhi* (Chamberlain, 2005).

2.2.5.- *Listeria spp.*

El género *Listeria* contiene seis especies: *L. monocytogenes* (Figura 9), *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii* y *L. grayi* (BAM, 2003b). *L. monocytogenes* es un cocobacilo catalasa positivo, Gram positivo, productora de beta-hemolisis en agar sangre y con movilidad por medio de un flagelo (Betriu, 2001; BBB, 1992b). Está extensamente distribuida en la naturaleza, por lo que es fácil que llegue a contaminar alimentos en diferentes pasos de la producción alimentaria, sus fuentes incluyen: productos vegetales en descomposición, heces animales, aguas residuales, tierra, pienso, polvo y ensilados, (Jacobsen, 2003; Antón, 2000).

Esta bacteria ha sido reconocida como un agente causante de enfermedades transmitidas por alimentos de los cuales diversos brotes han sido reportados alrededor del mundo (Touré, 2003). La listeriosis se puede transmitir por tres vías: contacto con animales, infección cruzada entre recién nacidos e infección transmitida por alimentos, siendo esta última la más habitual (Antón, 2000).

Una variedad de alimentos han sido asociados con listeriosis, incluyendo: leche cruda, leche fluida supuestamente pasteurizada, quesos (particularmente suaves-variedades maduros), helado, hortalizas frescas, embutidos cárnicos crudos-fermentados, carnes crudas (todos los tipos), aves cocidas y pescado crudo o ahumado. La principal población blanco son: mujeres embarazadas/recién nacidos (infecciones perinatales o neonatales); ancianos; diabéticos, cirróticos, asmáticos y pacientes con colitis ulcerativa; personas inmunosuprimidos por corticosteroides, medicamentos anticáncer, terapia supresora por injerto o SIDA; pacientes con cáncer (particularmente leucemia) y gente saludable (BBB, 1992b; Betriu, 2001).

L. monocytogenes adquiere importancia, ya que muestra la habilidad de sobrevivir a condiciones adversas como vacío, congelado, rayos ultravioleta, pasteurización convencional, y es capaz de crecer a temperaturas de refrigeración, aunque lentamente, lo cual permite su multiplicación en alimentos refrigerados (BBB, 1992b; Antón, 2000). La habilidad de sobrevivir de *L. monocytogenes* sobre un amplio rango de pH (4.4-9) y temperatura (1-45°C), y en alimentos con alta concentración de sal (arriba de 10%) la hace difícil de controlar (Touré, 2003). Por lo tanto, técnicas alternativas de conservación son necesarias para prevenir el crecimiento de esta bacteria (Jacobsen, 2003).



Figura 9.- *Listeria monocytogenes* (Dennis Kunkel Microscopy, Inc., 2005).

2.3.- ENVASES COMESTIBLES ANTIMICROBIANOS

2.3.1.- Definición.

2.3.1.1.- Envases comestibles

Capas delgadas preparadas de un material comestible, formada sobre (*recubrimiento*) o colocada en o entre (*película*) los componentes del alimento (Guilbert, 1996; Kim, 2002; Risch, 2000; Uquiche, 2002; Tharanathan, 2003; Bureau, 1995). Los envases comestibles pueden utilizarse como vehículo de agentes antimicrobianos, con objeto de mantener la estabilidad microbiana en la superficie de los alimentos (Guzmán, 2003; Baldwin, 1997; Del-Valle, 2004; Ozdemir, 2001; Krochta, 1997).

2.3.1.2.- Agentes antimicrobianos

Sustancias activas o preparaciones que contienen una o más sustancias activas, que se utilizan con la intención de destruir, impedir, prevenir la acción o ejercer efecto controlador de algún microorganismo perjudicial, por medios químicos o biológicos (Quintavalla, 2002; Trejo, 2004). Cuando un agente antimicrobiano ha sido incorporado dentro del envase comestible, éste retarda el crecimiento superficial de bacterias, levaduras y mohos, y en algunos casos minimiza el crecimiento de esporas y microorganismos patógenos en un amplio rango de productos (Quintavalla, 2002; Nuin, 2003; Rojas de Gante, 2001; Weiss, 2003; Cagri, 2004).

2.3.2.- Componentes.

La mayoría de los envases comestibles requieren de un soporte polimérico de alto peso molecular (hidrocoloide) y una matriz continua y cohesiva basada en lípidos, plastificantes, emulsificantes, lubricantes, estabilizantes y/o agentes ligantes (Bureau, 1995).

2.3.2.1.- Hidrocoloides

De acuerdo a su composición pueden ser clasificados en:

Polisacáridos: Incluyen celulosa y derivados (aniónicos: carboximetilcelulosa -CMC- y no iónicos: metilcelulosa -MC-, hidroxietilcelulosa -HEC-, hidroxipropilcelulosa -HPC-, hidroxipropilmetilcelulosa -HPMC-), almidón (almidón alta amilosa y almidón alta amilosa hidroxipropilado), dextrinas, pectinas, carragenina, alginatos, quitosán, amilosa, pululano y levano. Debido a la naturaleza hidrofílica de estos polímeros, los envases comestibles obtenidos constituyen barreras eficaces frente a los aceites y a las grasas, pero sus propiedades de barrera contra la humedad son pobres, sobre todo a humedades relativas elevadas (Guzmán, 2003; Krochta, 1997; Bureau, 1995).

Sin embargo, al poseer un alto contenido de agua, el envase se deseca antes que el alimento, por lo que actúa como barrera frente a los cambios hídricos. Por otro lado, si se adicionan agentes plastificantes a la formulación, se obtendrán envases con permeabilidad a los gases, debido al incremento en la movilidad de las cadenas poliméricas (Bureau, 1995; Tharanathan, 2003).

Proteínas: Incluyen gelatina, zeína, colágeno, albúmina de huevo (AH), gluten de trigo* (GT), proteína aislada de soja (PAS), proteína aislada de suero de leche (PASL) y caseína (CS) (Krochta, 1997; Cagri, 2004; Lee, 2005; Del-Valle, 2004). Los envases comestibles obtenidos tienen pobre resistencia al agua, pero funcionan como buenas barreras al O₂ y CO₂ (Pérez, 2003; Guzmán, 2003).

2.3.2.2.- Lípidos

Incluyen ceras naturales (cera de abeja, carnauba y candelilla), ácidos grasos, acilgliceroles, parafinas, aceites minerales y acetoglicéridos (Guzmán, 2003; Cagri, 2004). En general, las propiedades mecánicas de estos envases son inferiores a las de los envases elaborados con proteínas o polisacáridos (Ryu, 2002).

*El uso de estos envases debe ser declarado, ya que algunos consumidores tienen intolerancia al gluten de trigo (enfermedad Celiaca), alergias a proteína de leche o intolerancia a la lactosa (Krochta, 1997).

Las mejores barreras contra la pérdida de humedad son los ácidos grasos saturados sólidos a temperatura ambiente, debido a su relativa baja polaridad (la permeabilidad incrementa con el incremento de la polaridad, insaturación y ramificaciones), pero usualmente los envases obtenidos son opacos, relativamente inflexibles, frágiles e inestables (rancidez) (Guzmán, 2003; Hernández-Muñoz, 2004; Bureau, 1995; Tharanathan, 2003; Guilbert, 1996).

Por otro lado, los aceites no son muy efectivos para ser utilizados como recubrimientos comestibles en frutas y hortalizas, debido a su alta permeabilidad a gases (CO_2 y O_2) y al vapor de agua; por ello, requieren de la adición de materiales complementarios (hidrocoloides) a la formulación, para obtener una matriz estructural que funcione como barrera de humedad y gas (Pérez, 2003).

2.3.2.3.- Plastificantes

Son compuestos orgánicos adicionados a la matriz polimérica del envase, antes del secado, para facilitar su manejo durante la elaboración e incrementar la humectabilidad, dureza, flexibilidad y resistencia al corte del envase terminado (Austin, 1989; Baldwin, 1997). Los plastificantes actúan reduciendo las fuerzas intermoleculares entre las cadenas del polímero y en consecuencia la cohesión del conjunto, lo cual facilita la elongación del envase, pero disminuye las propiedades de barrera frente a los gases, vapores y solutos (Baldwin, 1997).

Los más utilizados son:

- I. Mono-, di- y oligosacáridos (miel, jarabes de glucosa o de glucosa-fructosa).
- II. Polioles (polietilenglicol, sorbitol, glicerol y derivados).
- III. Lípidos y derivados (ácidos grasos, monoglicéridos y sus ésteres, acetoglicéridos, fosfolípidos y otros emulsionantes).

La plastificación de un envase comestible a base de polímeros hidrofílicos, se obtendrá por la adición de un compuesto que pertenezca a uno de los dos primeros grupos. La concentración del plastificante puede variar del 10 al 60% (extracto seco), y generalmente el más efectivo, se parecerá al polímero que plastifican (Uquiche, 2002; Baldwin, 1997; Bureau, 1995; Guzmán, 2003; Tharanathan, 2003; Cho, 2002). Para la fabricación de un envase comestible soluble es deseable un plastificante soluble y para un envase insoluble o de solubilización lenta se deseará un plastificante insoluble (o dispersable) (Bureau, 1995).

2.3.2.4.- Surfactantes y emulsificantes

Incluyen mono y diglicéridos o lecitinas, grasas y aceites. Se añaden para prevenir la fractura del envase comestible; reducen la actividad de agua y la velocidad de pérdida de humedad en el producto; reducen el tamaño de glóbulo graso e incrementan su distribución en el envase comestible emulsificado (Guzmán, 2003; Risch, 2000).

2.3.2.5.- Mejoradores de las propiedades

Los envases comestibles pueden servir para mantener una concentración elevada de colorantes, aromas, especias, ácidos, azúcares, sales o vitaminas, con objeto de conferir al alimento una fuerte impresión organoléptica superficial o para llevar a cabo un enriquecimiento nutricional (Bureau, 1995).

2.3.3.- Formulación.

La formación de envases comestibles generalmente involucra asociaciones inter e intramoleculares o entrecruzamiento de las cadenas del polímero, formando una red tridimensional semirígida que atrapa e inmoviliza el solvente (Tharanathan, 2003). Los mecanismos por los que pueden ser formados son:

-Coacervación simple: un hidrocólide dispersado en agua es precipitado o experimenta un cambio de fase después de la evaporación de una parte del solvente (secado); después de la adición de un no-electrolito hidrosoluble, en el cual el hidrocólide es insoluble (etanol); o después del ajuste del pH con la adición de un electrolito, el cual induce un entrecruzado (Guilbert, 1996; Bureau, 1995).

-Coacervación compleja: se mezclan dos soluciones hidrocóides con carga eléctrica opuesta, causando la interacción y precipitación del complejo polimérico (Guilbert, 1996).

-Gelación o coagulación térmica: la dispersión hidrocóide se calienta ocasionando su desnaturalización, seguida de una gelatinización (proteínas como albúmina), precipitación o enfriamiento, causando gelación (gelatina o agar) (Guilbert, 1996).

En el caso de los recubrimientos, existen dos condiciones relevantes: cohesión entre las moléculas del material del recubrimiento y adhesión entre el recubrimiento y el alimento (Risch, 2000; Bureau, 1995). La cohesión es el resultado de la habilidad del polímero a formar uniones moleculares fuertes y numerosas entre las cadenas poliméricas, obstaculizando su separación (Pérez, 2003). El grado de cohesión produce las propiedades de barrera y mecánicas del recubrimiento, de tal forma que la cohesión estructural alta se manifiesta por la reducción en la flexibilidad, porosidad y permeabilidad a los gases y solutos (Tharanathan, 2003).

El grado de cohesión depende de la estructura química del polímero y especialmente de su fuerza molecular, geometría, peso molecular y tipo de posición de sus grupos laterales; de la presencia de plastificantes y agentes ligantes en la formulación; del tipo de proceso y las condiciones de elaboración (temperatura, presión, tipo de solvente, técnica de evaporación del solvente, técnica de aplicación, etc.); y del espesor del recubrimiento (Tharanathan, 2003). Por lo tanto, la excesiva evaporación o enfriamiento del solvente puede producir un recubrimiento no cohesivo, debido a la inmovilización prematura de las moléculas del polímero; se pueden lograr altos niveles de cohesión por el arreglo de los polímeros polares de cadena larga, los cuales precipitan en forma cristalina (Pérez, 2003; Guilbert, 1996; Guzmán, 2003).

2.3.4.- Técnicas de aplicación.

Las películas comestibles se elaboran previo a la aplicación en el alimento, mientras que el recubrimiento comestible se aplica por distribución con pincel, pulverización, inmersión, centrifugación, fluidización, frotación y aspersion, entre otros (Pérez, 2003; Bureau, 1995). La inmersión se realiza en tanques que contienen el recubrimiento, por lo tanto, es necesario cuidar que el alimento sea cubierto completamente; a continuación se procede a un escurrido y secado con aire, con lo cual una capa delgada es formada en la superficie del producto. Este método se caracteriza por provocar el entrecruzamiento en los enlaces hidrocoloides y es el más usado para frutas, vegetales y productos cárnicos (Pérez, 2003; Bureau, 1995; Tharanathan, 2003).

El método de aspersion es más recomendable para superficies planas; actualmente se utilizan aplicadores de alta presión (60-80psi), los cuales permiten menor gasto del material de cubierta, y la obtención de recubrimientos uniformes (Pérez, 2003; Bureau, 1995).

El método de frotación utiliza aire comprimido (< 5psi), que es aplicado en líneas de envasado que poseen rodillos en movimiento (es necesario romper la estructura del recubrimiento en forma de espuma, para obtener una distribución uniforme en la superficie del producto); posteriormente, se remueve el exceso del recubrimiento con cepillos colocados debajo de los rodillos. El recubrimiento contiene poca agua para facilitar el proceso de secado (Pérez, 2003; Bureau, 1995; Tharanathan, 2003).

2.3.5.- Mecanismo de acción.

Los mecanismos implicados en la acción de los agentes antimicrobianos incorporados en un envase comestible, son muy diversos, entre otros pueden citarse: inhibición de la biosíntesis de ácidos nucleicos, de proteínas o de la pared celular; daño a la integridad de las membranas e interferencia en una gran variedad de procesos metabólicos esenciales. Consecuentemente, algunos agentes antimicrobianos pueden afectar a muchos tipos de microorganismos, mientras que otros muestran un espectro de acción inhibitoria más reducido; del mismo modo, algunos compuestos antimicrobianos pueden ser microbicidas (matan a los microorganismos), mientras que otros actúan como microbiostáticos (inhiben la proliferación microbiana): un agente “estático” debe estar presente continuamente en el producto y en consecuencia no ser tóxico (Rodríguez, 2001; Quintavalla, 2002; Trejo, 2004).

Por otro lado, en el caso de las bacterias Gram positivas, las células vegetativas activamente multiplicándose en fase de crecimiento exponencial son más susceptibles a los agentes antimicrobianos que las bacterias en fase de crecimiento estacionario o en su forma esporulada, ya que en un estado metabólico activo las bacterias proveen una entrada disponible a sus blancos celulares (Naidu, 2000).

Cabe mencionar que los constituyentes antimicrobianos de los alimentos son bastante específicos en sus acciones, de tal modo que los alimentos no dejan de ser por ello perecederos, sólo que su alteración se produce por microorganismos que son resistentes a los antimicrobianos presentes (Rodríguez, 2001).

2.3.6.- Efectividad del envase comestible antimicrobiano.

Los factores que influyen en la efectividad del envase comestible antimicrobiano son:

a) Condiciones de proceso y actividad antimicrobiana residual.

Es importante determinar la actividad antimicrobiana residual, que es la actividad efectiva del agente activo utilizado para el envase comestible antimicrobiano, ya que la sustancia puede ser deteriorada por su labilidad al calor, por incompatibilidad con el material de envasado o por el proceso de elaboración del envase (Han, 2000; Weiss, 2003).

b) Temperatura de almacenamiento.

Generalmente, el incremento en la temperatura de almacenamiento del alimento puede acelerar la migración de los agentes activos en el envase, de igual forma, mientras la temperatura disminuye la velocidad de migración también. Por lo tanto, el efecto protector del envase comestible antimicrobiano se vuelve menos efectivo a temperaturas altas (Weiss, 2003; Risch, 2000).

c) Características de los alimentos.

Los alimentos tienen diferentes características químicas y biológicas como pH, actividad de agua, fuente de carbono, fuente de nitrógeno, presión parcial del oxígeno y temperatura, que proveen diferentes condiciones a los microorganismos; por ejemplo, la temperatura y el pH afectan la velocidad de crecimiento de microorganismos blanco y alteran la ionización (disociación/asociación) de muchos agentes activos, cambiando su actividad antimicrobiana: los antimicrobianos catiónicos son más efectivos a pH ácido, ya que facilita la penetración del antimicrobiano, a través de la membrana citoplasmática microbiana; por otro lado, los antimicrobianos de ácidos orgánicos son más efectivos en su forma sin disociar, ya que son capaces de penetrar la membrana celular más efectivamente; sin embargo, debido a su carácter hidrofóbico, pueden unirse a los lípidos o proteínas de los alimentos vía interacción hidrofóbica no-específica y ser inactivados por inmovilización (Han, 2000; Weiss, 2003; Naidu, 2000; Risch, 2000).

La actividad de agua también puede alterar la actividad antimicrobiana y la estabilidad química de las sustancias activas incorporadas: a actividad de agua baja, el envase comestible está menos hidratado y más compacto; por lo tanto, la distancia del soluto para viajar a través del envase deberá ser menor y la permeabilidad aumentará con la disminución de la actividad de agua (Han, 2000; Weiss, 2003; Naidu, 2000; Risch, 2000).

d) Coeficientes de transferencia de masa.

El coeficiente de transferencia de masa debe ser evaluado, para explicar el perfil de liberación de la sustancia activa del envase antimicrobiano al producto alimenticio. Esto debe permitir la estimación del patrón de concentración exacto, proveer el perfil de difusión del sistema de envasado alimentario real, y predecir el periodo en el cual la concentración del antimicrobiano se mantendrá sobre la concentración mínima inhibitoria (CMI) (Han, 2000; Weiss, 2003; Brody, 2001).

e) Propiedades físicas del material de envasado.

Los agentes activos adicionados al envase comestible, usualmente son componentes de muy bajo peso molecular comparado con el tamaño del polímero empleado, y son adicionados en pequeñas cantidades (Han, 2000). En un envase comestible antimicrobiano diseñado apropiadamente, el agente antimicrobiano se posicionará en las regiones estructurales amorfas de la matriz polimérica y no afectarán la fuerza mecánica del material polimérico de envasado; sin embargo, reducirá las propiedades ópticas del envase, como la transparencia (Han, 2000; Risch, 2000; Quintavalla, 2002).

f) Factor costo.

La extracción de antimicrobianos bioactivos de fuentes naturales puede ser complejo y caro, lo suficiente para hacer la comercialización de estos envases atractiva, sólo para aumentar el valor de productos alimenticios (Naidu, 2000; Risch, 2000).

2.3.7.- Requisitos.

Los prerrequisitos esenciales de los envases comestibles antimicrobianos son:

- Ser comestible**.
- No ser tóxico.
- Que su composición sea acorde con la reglamentación relativa a la aplicación alimentaria.
- Que su uso sea acorde a las buenas prácticas de manufactura (grado alimentario, preparación y manipuleo como un ingrediente alimentario, y uso en cantidades no mayores a las necesarias para llevar a cabo su función).
- Proveer apariencia satisfactoria (aroma, sabor, color y masticabilidad) al alimento al que se aplica.
- Que prevenga o reduzca la putrefacción microbiana durante un periodo de almacenamiento largo.

**Debido a que el envase es un producto comestible, las condiciones sanitarias deben mantenerse durante el almacenamiento, transportación y comercio del producto (Krochta, 1997).

-
- Debe demostrarse que el antimicrobiano utilizado en la formulación es un “aditivo directo al alimento” (un conservador que prolonga la vida de anaquel del alimento por protegerlo contra el deterioro causado por microorganismos); que no permite la selección de organismos insensibles en la superficie del envase comestible; que no permite el desarrollo de resistencia biocida en microorganismos sensibles; y que el antimicrobiano no es usado para reducir las medidas higiénicas normales requeridas en el manipuleo de alimentos.
 - Deben ser solubles o dispersables en la boca, en el agua o en el aceite empleado en la preparación del alimento.
 - Alta eficiencia mecánica y de barrera a la humedad, solutos y gases (creación de una atmósfera modificada con respecto a la composición de gases internos, debido a la regulación del proceso de madurez; prevenir la desecación, ya que la pérdida de agua resulta en pérdida de peso y por consiguiente de comercialización, permitiendo la extensión de la vida de anaquel y calidad del producto).
 - Que provean una barrera sobre luz o rayos UV, los cuales pueden modificar las características vía oxidación de lípidos y pigmentos.
 - Estabilidad bioquímica, fisicoquímica y microbiana, antes, durante y después de aplicarlo al producto.
 - Que su preparación requiera de tecnología simple y bajos costos de materiales.

(Bureau, 1995; Krochta, 1997; Pérez, 2003; Guzmán, 2003; Risch, 2000; Demicheli, 1997; Tharanathan, 2003; Baldwin, 1997; Lee, 2003; Ayranci, 1999; Guilbert, 1996; Xu, 2003; Kim, 2002; Quintavalla, 2002).

2.3.8.- Aplicaciones.

Actualmente, los antimicrobianos que han adquirido mayor importancia son los naturales (*Tabla 2*), debido a la percepción del consumidor como “amigables”, y a que estos componentes presentes en alimentos e ingredientes alimenticios o formados en respuesta al estrés físico o químico, pueden contribuir a extender la vida de anaquel de otros alimentos procesados y sin procesar (Beuchat, 1989).

Tabla 2.- Antimicrobianos en envases comestibles y biodegradables (Weiss, 2003; Quintavalla, 2002; Han, 2000; Guilbert, 1996)

Clase	Antimicrobiano	Polímero/Acarreador	Microorganismo blanco
Ácidos orgánicos y anhídridos	Ácido propiónico, benzoico, sórbico, acético, láctico, málico, laúrico, <i>p</i> -aminobenzoico, sórbico anhídrido, benzoico anhídrido, benzoato de sodio, sorbato de potasio, sorbato de calcio	Envases comestibles ¹ , MC/HPMC/ácido graso, MC/ácido palmítico, MC/quitosán, LLDPE, CMC/papel, LDPE, almidón/glicerol, PE-co-MA	Mohos
Gases	Dioxido de sulfuro dióxido de cloro, CO ₂ , SO ₂	Varias poliolefinas, recubrimiento de hidróxido de calcio, metabisulfito de sodio	Mohos, bacterias, levaduras
Metales	Plata	Varias poliolefinas	Bacterias
Funguicidas	Benomyl, Imazalil	Ionómero, LDPE	Mohos

Bacteriocinas	Nisina, pediocina, lacticina	Envases comestibles ¹ , celulosa, GT, HPMC, AH, LDPE, PE, PVC, nylon, recubrimiento de silicio	Bacterias Gram positivas ^{***}
Enzimas	Lisozima, glucosa oxidasa	Acetato de celulosa, envases comestibles ¹ , PAS, PVOH, nylon	Bacterias Gram positivas ^{***}
Agentes quelantes	EDTA	Envases comestibles ¹	Bacterias Gram positivas ^{***}
Especias	Cinámico, cafeína, <i>p</i> -cumárico	Nylon/PE, celulosa	Mohos, levaduras, bacterias
Extractos naturales	Aceites esenciales de semillas de toronja, polvo de caña	LDPE, celulosa, envases comestibles ¹	Mohos, levaduras, bacterias
Parabenos	Propilparabeno, etilparabeno	Arcilla cubierta de celulosa, LDPE	Mohos

¹ Envases comestibles de: quitosán, alginato, proteína de maíz, proteína aislada de suero de leche (PASL), almidón, proteína aislada de soja (PAS), gluten de trigo (GT) o albúmina de huevo (AH).

LLDPE = Polietileno de baja densidad lineal

LDPE = Polietileno de baja densidad

MC = metilcelulosa

HPMC = hidroxipropilmetilcelulosa

CMC = carboximetilcelulosa

PE = polietileno

MA = ácido metacrílico

PVOH = alcohol polivinílico

PVC = cloruro de polivinilo;

^{***} Combinación de EDTA y bacteriocinas/enzimas con actividad contra bacterias Gram-negativas

Los antimicrobianos naturales que se pueden utilizar en un envase comestible, se clasifican en función de su origen en:

Enzimas y otras proteínas:

a) Conalbúmina y avidina (huevo).

La conalbúmina inhibe bacterias Gram positivas y en menor proporción Gram negativas; las bacterias Gram positivas más sensibles son *Micrococcus* y *Bacillus spp.* La conalbúmina actúa uniéndose con el hierro, impidiendo así que sea usado por los microorganismos. La avidina se une a biotina y por tanto, los microorganismos que tienen un estricto requerimiento de biotina son inhibidos (Beuchat, 1989).

b) Lactoferrina (leche).

Inhibe a *Bacillus subtilis*, *B. stearothermophilus* y *Escherichia coli*. La lactoferrina se une a dos átomos de hierro por molécula (Beuchat, 1989).

c) Lisozima (leche y huevo).

Es activa contra bacterias Gram positivas, particularmente termófilas formadoras de esporas, mientras las bacterias Gram negativas usualmente son resistentes; también inhibe microorganismos patógenos, incluyendo *Listeria monocytogenes*, *Campilobacter jejuni*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus* y *Clostridium botulinum*. La lisozima actúa catalizando la hidrólisis de uniones β -1, 4 entre ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina en la capa peptidoglicano de la pared celular bacteriana (Beuchat, 1989).

d) Lactoperoxidasa (leche).

Es principalmente activa contra bacterias productoras de H_2O_2 como *Lactobacillus* y *Lactococcus spp.*; además de ciertas bacterias Gram negativas y microorganismos catalasa positiva. El daño de la membrana citoplasmática es evidencia de la salida de iones de potasio, aminoácidos y polipéptidos (Beuchat, 1989).

Ácidos orgánicos:

El modo de acción de los ácidos orgánicos es atribuido a la reducción directa del pH del sustrato, depresión del pH celular interno por ionización de moléculas del ácido sin disociar, o interrupción del transporte de sustratos por alteración de la permeabilidad de la membrana celular. Debido a que la porción sin disociar de la molécula del ácido, principalmente, es responsable de la actividad antimicrobiana, la efectividad de estos componentes depende de la constante de disociación (pKa) del ácido, y ya que el pKa de muchos ácidos orgánicos es entre pH 3 y 5, generalmente son más efectivos a estos valores de pH (Beuchat, 1989).

a) Ácido cítrico (frutas cítricas).

Inhibe el crecimiento de bacterias termófilas y *Salmonella*. La actividad antimicrobiana es debido a la quelación de iones metálicos esenciales para el crecimiento microbiano (Beuchat, 1989).

b) Ácido málico (frutas y vegetales).

Es inhibidor de levaduras y algunas bacterias, probablemente, como un efecto directo de la disminución del pH (Beuchat, 1989).

c) Ácido tartárico (uvas y piñas).

La actividad antimicrobiana es atribuida a la reducción del pH (Beuchat, 1989).

d) Ácido benzoico (arándanos, frambuesas, ciruelas, canela y clavo).

Es más efectivo en controlar levaduras y mohos, y menos efectivo contra bacterias (Wagner, 1989). La molécula del ácido benzoico sin disociar difunde a través de la membrana celular microbiana, donde se ioniza, causando acidificación en el interior de la célula; el ácido benzoico inhibe el crecimiento microbiano por interferir con el transporte de sustratos y el sistema de fosforilación oxidativa (Beuchat, 1989; Risch, 2000).

e) Ácido láctico (escabeche, aceitunas, algunas carnes y quesos).

Inhibe el crecimiento de algunas bacterias formadoras de esporas, pero no afecta el crecimiento de mohos y levaduras (Beuchat, 1989).

f) Ácido propiónico (queso).

La actividad antimicrobiana es principalmente contra mohos, pero tiene un pequeño efecto contra bacterias; además reduce el crecimiento de *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxina. El ácido se acumula en la célula y bloquea el metabolismo por inhibir ciertas enzimas, también compite con sustratos como la alanina y otros aminoácidos esenciales para el crecimiento de microorganismos (Wagner, 1989; Beuchat, 1989; Risch, 2000).

Ácidos grasos:

Los ácidos grasos, generalmente son inhibidores efectivos de bacterias Gram positivas y levaduras; exhiben actividad antimicótica; reducen el crecimiento de *Aspergillus spp.* y la producción de aflatoxina. Ciertos miembros de *Neisseriaceae* y *Enterobacteriaceae* son susceptibles o pueden hacerse susceptibles. Como agentes antimicrobianos, son más efectivos aquellos que contienen de 12 a 18 átomos de carbono; la actividad inhibitoria de ácidos grasos insaturados incrementa conforme aumenta el número de dobles enlaces. El ácido láurico, mirístico y palmítico (C₁₂, C₁₄ y C₁₆, respectivamente) son inhibidores efectivos de bacterias; mientras que el ácido capríco (C₁₀) y láurico son más activos contra levaduras (Beuchat, 1989).

El mecanismo de acción consiste en la inhibición del transporte en la membrana, lo cual causa una reducción de la salida de O₂ de la célula bacteriana; la membrana externa es el sitio de acción, ya que las enzimas involucradas en la salida del O₂ están unidas a ella. Las bacterias Gram negativas parecen ser menos susceptibles a la inhibición que las bacterias Gram positivas, ya que la capa de lipopolisacáridos en la pared celular de las bacterias Gram negativas protege la membrana citoplasmática y confiere resistencia (Beuchat, 1989).

Aceites esenciales de plantas:

[*Allium spp.*, *A. sativum* (ajo), *A. cepa* (cebolla) y *A. porrum* (puerro)].

Algunos microorganismos como *S. aureus*, *B. cereus*, *C. botulinum*, *S. typhi*, *E. coli* y algunas levaduras, han mostrado ser afectados por extractos de ajo; mientras el crecimiento y la producción de aflatoxinas por *A. flavus* y *A. parasiticus*, son inhibidos por varios extractos de cebolla (Beuchat, 1989).

Por otro lado, *C. botulinum*, *B. cereus*, *S. aureus*, *S. typhi*, *V. parahaemolyticus*, *E. coli* y mohos micotoxigénicos (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. versicolor*, *A. ochraceus*, *Penicillium urticae* y *P. roquefortii*) son inhibidos por otros aceites esenciales de plantas; la actividad antimicrobiana más consistente ha sido encontrada en componentes de clavo, canela, semillas de mostaza, orégano, romero, salvia, tomillo y vainilla (Beuchat, 1989).

Humulones y lupulones:

(*Lupulus humulus*).

Las bacterias Gram negativas y los hongos son menos sensibles al efecto de humulones y lupulones que las bacterias Gram positivas (Beuchat, 1989).

Derivados de ácido hidroxicinámico:

(vegetales, frutas, granos y nueces).

Incluye cafeína, clorogénico, *p*-cumárico, ferúlico y ácidos quinicos. Las bacterias Gram positivas, Gram negativas, mohos y levaduras son sensibles a derivados del ácido hidroxicinámico; mientras que *A. parasiticus* es inhibido por el ácido cafeico (Beuchat, 1989).

Oleuropeina:

(aceitunas verdes).

Es inhibidor contra *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* y hongos, incluyendo *Geotrichum candidum* y *Rhizopus spp.* (Beuchat, 1989).

Cafeína:

(café, cocoa).

Inhibe el crecimiento de *Aspergillus* y *Penicillium spp.*; y la producción de aflatoxina, ocratoxina A, esterigmatocistina, citrinina y patulina; también es antibacteriana para *L. plantarum*, *S. aureus*, *Streptococcus faecalis*, *B. cereus*, *Salmonella spp.*, *S. cerevisiae* y *E. coli*. Su mecanismo de acción consiste en descontrolar la regulación de glicólisis y glucogénesis (Beuchat, 1989).

Teofilina y teobromo:

(té, nuez, cocoa).

Tienen efecto bactericida contra diversos patógenos, incluyendo *S. typhi*, *E. coli*, *S. aureus* y *B. cereus*, pero *S. cerevisiae* y *L. plantarum* son inhibidos menos (Beuchat, 1989).

Fitoalexinas:

(derivados de plantas, frutas y hortalizas, como la faseolina de las judías verdes).

La faseolina exhibe toxicidad contra hongos, pero tienen un ligero o nulo efecto en bacterias. Ejercen su efecto tóxico por interacción con la membrana celular, altera las propiedades de la membrana plasmática e inhiben el transporte de electrones en la mitocondria. (Beuchat, 1989).

Pigmentos y componentes relacionados:

(extractos de flores y frutas).

Los flavonoides (antocianinas, flavanos, dihidroflavones, biflavonoides, isoflavonas, flavonoles, flavonas, flavanonas, antocianidinas, catequinas, isoflavonas, dihidroflavonol, chalcona, auroa y flavan-3-ol) son un grupo de pigmentos aromáticos de C₁₅, que se encuentran como pigmentos blancos y amarillos en flores y frutas. Entre los derivados naturales predominantes están las formas glicosídicas localizadas en las vacuolas de las células de las plantas; mientras los biflavonoides están localizados en la cutícula (Naidu, 2000).

Los flavonoides tienen amplio espectro de actividad antimicrobiana y carencia de inducción de resistencia en organismos blanco y contribuyen a las cualidades sensoriales y nutricionales de frutas y sus productos (Naidu, 2000). La actividad contra bacterias puede ser de tres tipos:

- Bacteriostática (inhiben síntesis proteica y se unen a los ribosomas, es decir, inhibe crecimiento pero no causa la muerte).
- Bactericida (evitan la proliferación, inducen la muerte pero no producen lisis celular).
- Bacteriolítica (producen lisis celular) (Trejo, 2004).

Los flavanoles y las proantocianidinas (taninos) son altamente inhibidores de *Sacharomyces boyancis*; mientras las antocianinas inhiben *E. coli*, *S. aureus*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*. La faseolina isoflavana exhibe de escasa a moderada actividad contra diversas *Pseudomonas*, pero inhibe fuertemente a las *Xantomonas* y *Acromobacter spp.* La quercetina y la morina (frutas, vegetales y té) tienen actividad virucida contra virus envueltos, incluidos herpes, pero no contra virus no envueltos; además la quercetina tiene efecto inhibitorio en el crecimiento de células malignas y glicólisis, en la síntesis de macromoléculas, en la actividad de proteinasas, en la actividad de ATPasas, en la replicación de virus y en la inducción de choque térmico de proteínas. Sin embargo, los flavonoides como felodendrozida, pentametilquercetina, herbacitina, ramnetina y rutina, no muestran actividad antimicrobiana, probablemente porque contienen glucosa o un grupo metilo: parece que los flavonoides con grupos hidroxilo libres a C₃, C₄, C₅ y C₇ tienen la mayor actividad; por lo tanto, la sustitución de estos grupos causa una disminución o abolición completa de la actividad antiviral de los componentes. Por otro lado, la actividad antimicrobiana de los flavonoides lipofílicos es una propiedad asociada con su habilidad a penetrar membranas biológicas; la metilación de 5-OH ha sido considerada una característica estructural esencial por su actividad antimicrobiana (Naidu, 2000).

En el caso de las antocianinas, la habilidad de quelación puede explicar parcialmente la acción inhibitoria contra enzimas bacterianas, ya que la indisponibilidad de iones metálicos puede inactivar a las enzimas, que son dependientes de estos metales, resultando en inhibición del crecimiento microbiano (Naidu, 2000; Beuchat, 1989).

Estado Regulatorio.

Los antimicrobianos naturales son GRAS de acuerdo a las autoridades regulatorias; de cualquier forma, eso no garantiza una seguridad para componentes específicos aislados de esos productos (Naidu, 2000); por lo tanto, el aislamiento de componentes bioactivos de fuentes naturales posee nuevos parámetros de evaluación de seguridad por las siguientes razones:

- I. El proceso de aislamiento podría enriquecer un alérgeno indeseable, mutágeno o toxina de la fuente natural.
- II. Un componente no tóxico puede ser activado durante el aislamiento.
- III. El método de extracción/purificación puede desnaturalizar al componente bioactivo y crear un nuevo componente con manifestaciones tóxicas.
- IV. Solventes residuales o químicos eluidos pueden reaccionar y/o contaminar el producto final y comprometer las propiedades estructurales-funcionales.
- V. La dosis diaria aceptable de un componente biológico aislado puede ser más alta que su consumo vía natural.
- VI. Cuando se incorpora el antimicrobiano natural purificado en una formulación, puede reaccionar con otros ingredientes para formar especies tóxicas (Naidu, 2000; Risch, 2000).

Por lo anterior, los antimicrobianos naturales deberán demostrar su seguridad, ya sea por pruebas en animales o por el consumo continuo como un alimento sobre un periodo largo. En adición, a falta de toxicidad, no deberán ser alérgenos y deben ser metabolizados y excretados, y no inducirán un aumento de residuos. Además, no deberán reaccionar con nutrientes importantes haciéndolos indispensables o destruyéndolos (Naidu, 2000; Risch, 2000).

3.- OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de un recubrimiento comestible con antimicrobiano de origen natural, frente a *Escherichia coli* H10407, *Salmonella typhi* y *Listeria monocytogenes*, inoculados sobre la cáscara de melón Cantaloupe.

OBJETIVOS PARTICULARES

OBJETIVO PARTICULAR 1:

Establecer la formulación óptima y el proceso de elaboración del recubrimiento en estudio.

OBJETIVO PARTICULAR 2:

Evaluar “*in vitro*” la actividad antimicrobiana del recubrimiento comestible, frente a microorganismos patógenos.

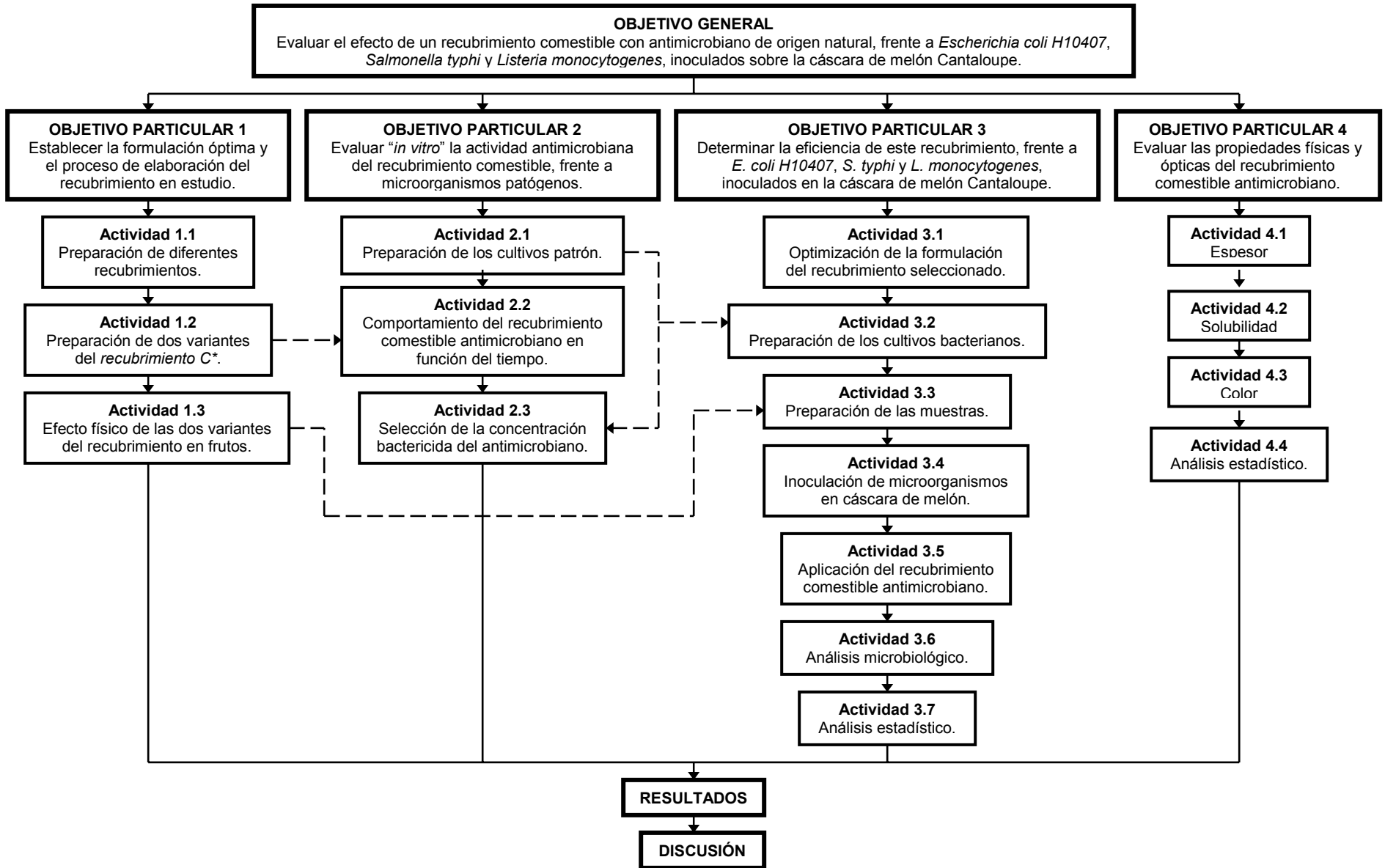
OBJETIVO PARTICULAR 3:

Determinar la eficiencia de este recubrimiento, frente a *E. coli* H10407, *S. typhi* y *L. monocytogenes*, inoculados en la cáscara de melón Cantaloupe.

OBJETIVO PARTICULAR 4:

Evaluar las propiedades físicas (espesor, solubilidad) y ópticas (color) del recubrimiento comestible antimicrobiano.

4.- CUADRO METODOLÓGICO.



5.- MATERIALES Y METODOS.

5.1.- Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio (*Escherichia coli* H10407, *Salmonella typhi* y *Listeria monocytogenes*), fueron proporcionadas por el Laboratorio de Bacteriología de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, México. Cada bacteria se mantuvo en un tubo inclinado de agar base sangre (BBA; Bioxon) a 8°C. Antes de usarse, las cepas fueron sujetas a dos transferencias sucesivas del inóculo original en agar tripticasa de soja (TSA; Bioxon) e incubadas a 37°C por 24h. Por último se crecieron en agar MacCONKEY (MCA; Merck); agar *Salmonella-Shigella* (SSA; Bioxon) y agar Rogosa (MRS; Oxoid), respectivamente, y se almacenaron a 8°C hasta ser utilizadas.

5.2.- Melón Cantaloupe

Los frutos se adquirieron en una abastecedora local y se seleccionaron de acuerdo al tamaño (2.75 ± 0.2 Kg), color y firmeza homogéneos, y libres de defectos visibles (oscurecimiento, cortadas y deformaciones).

5.3.- Selección de la formulación del recubrimiento

5.3.1.- Preparación de diferentes recubrimientos

Recubrimiento A: Se agregaron 6.75g de proteína aislada de soja (PAS; Fabpsa, México) a 40.63ml de etanol al 95%, agitando con ligero calentamiento durante 1min. Se adicionaron 1.89ml de glicerol, calentando hasta ebullición (~73°C), evitando la incorporación de gas. Se vertió la solución en cajas petri de 11cm de diámetro y se secaron en estufa a 37°C por 16h (Padgett, 1998).

Recubrimiento B: Se disolvieron 2g de PAS en 100ml de ácido acético al 3%, agitando a 35°C por 1h. Se adicionaron 0.5ml de glicerol, agitando hasta homogenizar y se vertió la solución en cajas petri de 11cm de diámetro para secarlas en estufa a 35°C por 16h (Casariego, 2001).

Recubrimiento C*: Se disolvió el polímero y se vertió la solución en charolas de Teflón™ de 21cm de diámetro para secar en estufa a 55°C por 16h.

NOTA: El espesor se trató de mantener uniforme, sirviendo 160ml de la solución en cada charola.

5.4.- Comportamiento del recubrimiento comestible seleccionado durante su aplicación a diferentes frutos

5.4.1.- Preparación de dos variantes del recubrimiento C*

Recubrimiento RC-1: Se preparó el recubrimiento y se adicionó el antimicrobiano de origen natural al 0.02%.

Recubrimiento RC-2: Se preparó el recubrimiento como en el punto anterior y se calentó la mezcla en baño maría hasta 70°C. Se adicionaron 0.25g de ácido esteárico y se homogenizó la mezcla por 15 min. Se dejó enfriar la solución hasta 20°C, quedando lista para su aplicación (Uquiche, 2002).

5.4.2.- Efecto físico de las dos variantes del recubrimiento seleccionado en frutos

Jitomate: Se lavaron dos jitomates con agua potable y se secaron a 8°C por 1h. Cada recubrimiento fue aplicado por inmersión durante 30s y se colocaron en una cámara a 25°C por 3 días.

Fresa: 100g de fresas se desinfectaron en agua clorada (200ppm) por 5min y se secaron a 0°C por 1h. Cada recubrimiento fue aplicado a 50g de fresas por inmersión durante 30s y se almacenaron a 25°C por 3 días.

Mango y manzana: Se lavaron dos mangos y dos manzanas con agua potable y se secaron. Cada recubrimiento fue aplicado a cada fruto por inmersión durante 30s y se almacenaron en una cámara a 25°C por 3 días

Pera: Se lavaron dos peras con agua potable y se secaron a 0°C por 1h. Cada pera se sumergió en uno de los recubrimientos por 5s, dos veces, y se secaron a 25°C por 16h. Posteriormente se almacenaron a 0°C por 1 semana.

Melón: Se lavó la cáscara del melón con agua potable y se secó a 8°C por 1h. Se dividió en dos partes iguales y a cada una se le aplicaron 15ml de uno de los recubrimientos. Se secaron a 8°C por 24h y se almacenaron a 8°C por 7 días.

5.5.- Selección de la concentración del antimicrobiano “*in vitro*”

5.5.1.- Preparación de los cultivos patrón

Se tomaron 3UFC de *E. coli* H10407 y se inocularon en 4.5ml de caldo infusión cerebro-corazón (BHI; Difco) y se incubaron a 37°C por 24h. El inóculo se centrifugó a 2500rpm por 10min y el sedimento se lavó con solución salina fisiológica estéril (SSF). Nuevamente se centrifugó el cultivo a las mismas condiciones y el sedimento se resuspendió en 4.5ml de SSF. Se repitió la misma metodología para el cultivo patrón de *S. typhi* y *L. monocytogenes*, y los cultivos se almacenaron a 8°C hasta su utilización.

5.5.2.- Comportamiento del recubrimiento comestible antimicrobiano, en función del tiempo

Se elaboró el *recubrimiento C** adicionando el antimicrobiano al 0.02%. Se cortaron siete fragmentos de 1cm² del recubrimiento y cada uno se colocó en una caja petri estéril. Posteriormente se inocularon 50µl de un cultivo de *E. coli H10407* (8.5log₁₀ UFC/cm²) sobre el recubrimiento. Todas las muestras se incubaron a 37°C a diferentes tiempos: 15min, 30min, 1h, 1h 30min, 2h, 2h 30min y 24h. Al término de cada tiempo, las bacterias sobrevivientes se recolectaron con un hisopo y se sembraron en MCA.

5.5.3.- Selección de la concentración bactericida del antimicrobiano

5.5.3.1.- En caldo

Se colocaron 500µl de un cultivo de *E. coli H10407* (10.2log₁₀ UFC/ml) en dos tubos con 1ml de SSF cada uno, se homogenizaron y se adicionó 1cm² del recubrimiento con antimicrobiano al 0.02% y al 0.8%, respectivamente. Se dejó actuar el recubrimiento por 1h y se transfirieron 0.5ml de cada suspensión a un tubo con 4.5ml de caldo BHI. Las muestras se incubaron a 37°C por 24h y 48h. La ausencia de turbidez fue considerada una prueba positiva (Davidson, 1989). Se repitió la misma secuencia para *S. typhi* (9.3log₁₀ UFC/ml) y *L. monocytogenes* (10.6log₁₀ UFC/ml).

5.5.3.2.- En agar

Método 1: Se sembraron 5µl de un cultivo de *E. coli H10407* (9.8log₁₀ UFC/ml) en toda la superficie (DAME) de una caja de agar tripticasa de soja con extracto de levadura (TSA-YE: caldo tripticasa de soja, suplementado con 0.8% (w/v) de agar y 0.6% (w/v) de extracto de levadura) (Touré, 2003) y otra caja con 5µl del mismo cultivo diluyendo por estrías (DDIE) (ISP, 2005).

Se impregnaron discos de papel filtro estéril de 6mm de diámetro con el recubrimiento con antimicrobiano al 0.02% y se colocaron en la superficie del agar TSA-YE. Las placas se incubaron a 37°C por 24h. La inhibición fue establecida por una zona de no crecimiento alrededor del disco (Davidson, 1989).

Método 2: Se sembraron 5µl de un cultivo de *E. coli H10407* ($9.8\log_{10}$ UFC/ml) en dos cajas de MCA. Las placas fueron identificadas como RMAE para el cultivo sembrado en toda la superficie y RDIE para el cultivo sembrado por estrías. Se colocó un cuadrado de 1cm² del recubrimiento sin antimicrobiano (control) en un extremo de cada caja y un cuadrado de 1cm² del recubrimiento con antimicrobiano al 0.02% en el otro extremo. Se incubaron las cajas a 37°C por 24h y se comprobó el efecto inhibitorio. Se repitió la misma secuencia para *S. typhi* ($9.6\log_{10}$ UFC/ml), sembrando por estrías en SSA y para *L. monocytogenes* ($9.3\log_{10}$ UFC/ml) en MRS. Las placas se identificaron como RDIS y RDIL, respectivamente.

Método 3: Se sembraron por estrías 500µl del cultivo patrón de *E. coli H10407* ($\sim 8\log_{10}$ UFC/ml) en TSA-YE y se siguió la metodología anterior, utilizando el recubrimiento con antimicrobiano al 0.08%. Se repitió la misma secuencia con el cultivo patrón de *S. typhi* y *L. monocytogenes*. Para cada microorganismo se realizaron cinco réplicas del experimento.

5.6.- Evaluación del recubrimiento comestible antimicrobiano en cáscara de melón

5.6.1.- Optimización de la formulación del recubrimiento seleccionado

Se elaboraron diferentes recubrimientos con la metodología del *recubrimiento C**, variando la concentración y tipo de antimicrobiano, para obtener el mayor efecto inhibitorio, sin afectar la estructura y las características del recubrimiento**.

5.6.2.- Preparación de los cultivos bacterianos

5.6.2.1.- *E. coli* H10407

Se sembraron 3UFC de *E. coli* H10407 en 4.5ml de caldo BHI a 37°C por 24h. Se tomaron 300µl del cultivo anterior y se transfirieron a 10ml de caldo nutritivo. El cultivo se colocó en baño maría a 37°C por 3h con agitación a 100rpm.

5.6.2.2.- *S. typhi* y *L. monocytogenes*

Se sembraron 3UFC de *S. typhi* en 4.5ml de caldo BHI a 37°C por 24h (Han, 2002). Se ajustó la suspensión adicionando 9ml de caldo BHI. Se repitió la misma metodología para *L. monocytogenes*.

NOTA: Los cultivos se ajustaron a 0.5 McFarland ($\sim 8 \log_{10}$ UFC/ml) y fueron confirmados con el cultivo patrón de cada microorganismo preparado anteriormente.

5.6.3.- Preparación de las muestras

□ quince melones fueron divididos en tres lotes de cinco melones cada uno, siendo cada melón una réplica. Los melones sin tratar (controles) fueron llevados a cabo para asegurar la ausencia de microflora nativa antes y después del tiempo de incubación (Penteado, 2004). Cada melón fue lavado con agua potable y con un detergente aniónico (lauril sulfato de sodio), el cual se eliminó enjuagando exhaustivamente con agua potable. Se colocaron los melones en agua clorada (200ppm) por 20min y se eliminaron los residuos de cloro con agua estéril. Los frutos se mantuvieron a 8°C por 1h, para eliminar el agua residual. Se definieron tres áreas de 25cm² en cada cáscara de melón, que fueron removidas asépticamente con tijeras estériles. Las muestras se marcaron como: control de ausencia de microorganismo (CAM); control de microorganismo inoculado (CMI) y cáscara de melón con microorganismo y recubrimiento con antimicrobiano al 0.55% (MMR).

5.6.4.- Inoculación de microorganismos en cáscara de melón

Las muestras CMI y MMR se inocularon con 500µl del cultivo de *E. coli H10407* ($8.75\log_{10}$ UFC/muestra) y se secaron a 33°C por 1h. Se repitió la misma secuencia para las muestras de *S. typhi* ($7.57\log_{10}$ UFC/muestra) y *L. monocytogenes* ($8.77\log_{10}$ UFC/muestra).

5.6.5.- Aplicación del recubrimiento comestible antimicrobiano

El recubrimiento se aplicó por vertido de 15ml de la solución sobre la superficie de las cáscaras de melón, debidamente identificadas. Las muestras se secaron con circulación de aire a 18°C y 38%HR. El efecto del recubrimiento fue evaluado a las 2 y 24h.

5.6.6.- Análisis microbiológico

Cada muestra fue colocada individualmente en bolsas ziploc® que contenían 20ml de caldo BHI, la bolsa fue sellada y la cáscara de melón fue frotada firmemente por 2min (Kenney, 2002). Se colocó la bolsa en agitación a 500rpm por 15min, para reactivar a los microorganismos del efecto del antimicrobiano. Se tomó una alícuota de 500µl de la solución anterior y se hicieron las diluciones necesarias para el conteo de las bacterias recuperadas de cada muestra (Becker, 1999): en MCA para *E. coli H10407*, SSA para *S. typhi* y agar Fraiser (FSA; Dibico) para *L. monocytogenes*. Se seleccionaron al azar de 2-5 colonias de las placas de MCA y SSA, para ser identificadas como *E. coli H10407* y *S. typhi*, respectivamente, siguiendo métodos bioquímicos convencionales (Ukuku, 2004; Beuchat, 2004). Para las colonias presuntivas de ser *S. typhi* también se utilizó el kit miniaturizado de diagnóstico BBL Crystal™ (BD) y métodos de identificación serológica.

5.6.7.- Análisis estadístico

Para cada experimento se hicieron cinco réplicas que fueron analizadas utilizando el programa STATISTICA. Diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores fueron determinadas usando el análisis de varianza (ANOVA).

5.7.- Propiedades del recubrimiento comestible antimicrobiano

Acondicionamiento de las muestras: Se preparó el *recubrimiento C** con antimicrobiano al 0.55%. Se cortaron cinco muestras para cada prueba con las siguientes medidas: para el espesor de 100 x 25mm (Cho, 2002), para la solubilidad de 40 x 40mm² (Ryu, 2002) y para el color de 7 x 7cm (Lee, 2005). Todas las muestras se colocaron en un desecador con NaOH al 28% (w/w) a 50%HR y 25°C por 48h, antes de las pruebas (Kim, 2002).

5.7.1.- Espesor

El espesor del recubrimiento fue medido con un micrómetro manual (Mitutoyo, Japón; sensibilidad = 0.01mm). Las medidas fueron tomadas en cinco posiciones diferentes de cada muestra (una en el centro y cuatro en la periferia) (Xu, 2001; Cho, 2002; Longares, 2004).

5.7.2.- Solubilidad

La solubilidad del recubrimiento fue medida como un porcentaje de materia seca del recubrimiento disuelto en agua destilada por 24h. La materia seca inicial del recubrimiento fue determinada secando a 100°C por 24h. Las muestras fueron pesadas y colocadas en vasos de precipitados con 50ml de agua destilada, los vasos se sellaron con parafilm y se almacenaron a 25°C por 24h. Se descartó el agua restante y el recubrimiento residual fue secado a 100°C por 24h, para determinar el peso de la materia seca. El porcentaje de solubilidad fue calculado:

$$\% \text{solubilidad} = \frac{(DM_0 - DM_{24})}{DM_0} \times 100$$

DM₀

DM₀ = materia seca inicial

DM₂₄ = materia seca insoluble después de 24h

(Kim, 2002; Ryu, 2002; Nazan, 2004).

5.7.3.- Color

Los parámetros de color fueron medidos usando un Colorímetro Triestímulos Minolta CR-300 y la escala de color Hunter Lab:

L* = 0 (reflexión nula “negro”) → L* = 100 (reflexión difusa perfecta “blanco”)

a* = -80 (verde) → a* = 100 (rojo)

b* = -80 (azul) → b* = 70 (amarillo)

Los valores estándar para la calibración de la placa blanca de cerámica fueron:

L* = 97.02, a* = 0.13 y b* = 1.77

La diferencia total de color (ΔE^*) fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta E^* = [(L^*_{\text{Estándar}} - L^*_{\text{Recubrimiento}})^2 + (a^*_{\text{Estándar}} - a^*_{\text{Recubrimiento}})^2 + (b^*_{\text{Estándar}} - b^*_{\text{Recubrimiento}})^2]^{0.5}$$

El tono ($^{\circ}\text{HUE}$):

$$^{\circ}\text{HUE} (h^*_{ab}) = \arctan b^*/a^*$$

La saturación (Croma):

$$\text{Croma} (C^*_{ab}) = [a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$$

(Gilabert, 2002; Hernández-Muñoz, 2004; Lee, 2005).

5.7.4.- Análisis estadístico

Para cada experimento se realizaron por lo menos tres repeticiones, de las cuales, se obtuvo el promedio (\bar{x}), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (C.V.). Diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores fueron determinadas usando el análisis de varianza (ANOVA).

6.- RESULTADOS.

6.1.- Selección de la formulación del recubrimiento

Tabla 3.- Características de los recubrimientos elaborados en diferentes condiciones

Recubrimiento	Observaciones
A ¹	Se obtuvo un polvo fino
B ²	El recubrimiento formado era uniforme, manejable y amarillo
C*	Recubrimiento con estructura uniforme, manejable e incoloro

¹ Recubrimiento de proteína aislada de soja (PAS) y etanol al 95%.

² Recubrimiento de PAS y ácido acético al 3%.

* Recubrimiento en vía de patente.



Figura 10.- Recubrimiento C*

En el *recubrimiento A* (Tabla 3), el etanol se adicionó a la solución formadora del recubrimiento, ya que permite una reducción en el tiempo de secado debido a su bajo punto de ebullición (~78°C) (Nazan, 2004); sin embargo, la proteína no se disolvió en él y por consiguiente no se formó el recubrimiento. Por tal motivo, se descartó esta formulación. El *recubrimiento B* fue similar al *recubrimiento C** (Figura 10) en textura, pero no así, en color, ya que la proteína aislada de soja (PAS) presenta un color amarillo característico. Otro factor que influye en el color, es el espesor, así que este parámetro debe mantenerse lo más constante posible.

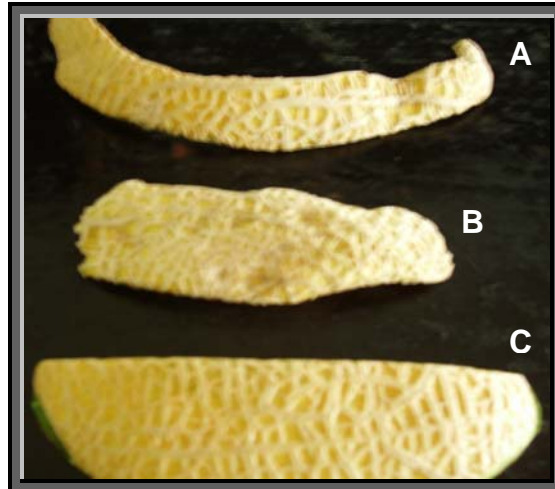
6.2.- Comportamiento del recubrimiento comestible seleccionado durante su aplicación a diferentes frutos

Tabla 4.- Comparación de las variantes del *recubrimiento C** con antimicrobiano, aplicados a frutos frescos

FRUTO	RECUBRIMIENTO	OBSERVACIONES
Jitomate	RC-1	Los dos recubrimientos se escurrieron.
	RC-2	
Fresa	RC-1	Los dos recubrimientos se escurrieron.
	RC-2	
Mango	RC-1	Los dos recubrimientos se escurrieron.
	RC-2	
Manzana	RC-1	Los dos recubrimientos se escurrieron.
	RC-2	
Pera	RC-1	Los dos recubrimientos conservaron sus propiedades en el fruto después de una semana a 0°C. El fruto no sufrió alteraciones en ninguno de los dos casos, pero la pera con el recubrimiento RC-2 luce más natural que la pera con el recubrimiento RC-1, ya que ésta última brilla mucho.
	RC-2	
Melón	RC-1	La cáscara de melón con el recubrimiento RC-2 luce natural, pero se deshidrató después de una semana a 8°C. La cáscara de melón tratada con el recubrimiento RC-1 luce más brillante, pero no se deshidrató a las mismas condiciones (<i>Figura 11</i>).
	RC-2	

RC-1: Recubrimiento con antimicrobiano al 0.02%.

RC-2: Recubrimiento con antimicrobiano al 0.02% y ácido esteárico.



- A: recubrimiento con antimicrobiano al 0.02% y ácido esteárico.
B: sin recubrimiento.
C: recubrimiento con antimicrobiano al 0.02%

Figura 11.- Cáscara de melón Cantaloupe con diferentes tratamientos,
almacenada a 8°C por 6 días

En la mayoría de los frutos evaluados se escurrieron los dos recubrimientos ([Tabla 4](#)), en algunos de ellos, porque vienen tratados con una cera que impedía la adherencia de nuestro recubrimiento. En el caso de la fresa y el mango, puede no ser aplicable el recubrimiento, ya que el polímero empleado en la formulación es muy hidrofílico y ocasiona la deshidratación del fruto. En el caso del recubrimiento con ácido esteárico, se adicionó éste con la intención de mejorar las propiedades del recubrimiento; sin embargo, parece interactuar con el antimicrobiano, de tal forma que reduce o inhibe el efecto del mismo, además de no proteger al fruto de la deshidratación ([Figura 11](#)), por tal razón, se utilizó el recubrimiento sin ácido esteárico.

6.3.- Selección de la concentración del antimicrobiano “*in vitro*”

Tabla 5.- Comportamiento del recubrimiento con antimicrobiano al 0.02% frente a *E. coli H10407*, con respecto al tiempo

Tiempo	Control**	Inhibición
15min.	+	-
30min.	+	-
1h	+	-
1h 30min.	+	-
2h	+	-
2h 30 min.	+	-
24h	-	-

** Recubrimiento sin antimicrobiano.

+ Crecimiento de *E. coli H10407*

- Ausencia de crecimiento de *E. coli H10407*

El muestreo periódico de inhibición, se realizó para determinar el crecimiento o supervivencia del microorganismo. En los resultados ([Tabla 5](#)), se puede observar que el recubrimiento con antimicrobiano al 0.02% actúa contra *E. coli H10407* desde los 15min en contacto con éste. En el caso de las 24h, de acuerdo con el control, el microorganismo muere por las condiciones de la prueba y no por efecto del recubrimiento.

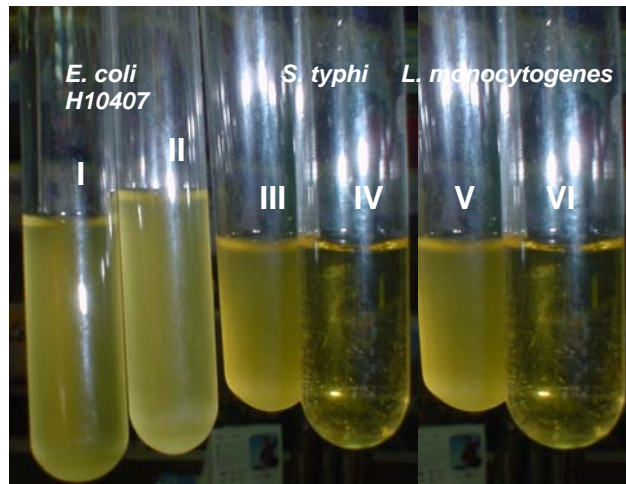
Tabla 6.- Selección de la concentración del antimicrobiano en el recubrimiento, en función de su efecto inhibitorio en caldo

Tiempo de incubación	Concentración de antimicrobiano	<i>E. coli H10407</i>		<i>S. typhi</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
		Control**	Inhibición	Control**	Inhibición	Control**	Inhibición
24h	0.02%	+	+	+	-	+	-
	0.08%	+	+	+	-	+	-
48h	0.02%	+	+	+	-	+	-
	0.08%	+	+	+	-	+	-

** Recubrimiento sin antimicrobiano.

+ Crecimiento de microorganismo.

- Ausencia de crecimiento del microorganismo.



I, III y V: cultivo con recubrimiento sin antimicrobiano.

II, IV y VI: cultivo con recubrimiento con antimicrobiano al 0.02%

Figura 12.- Efecto inhibitorio del recubrimiento con antimicrobiano al 0.02%, frente a *E. coli H10407*, *S. typhi* y *L. monocytogenes*, en caldo, después de 24h de acción .

En el caso de la prueba con *E. coli H10407* (Tabla 6), éste parece tener resistencia al efecto del recubrimiento con antimicrobiano a esas concentraciones (Figura 12). Para *S. typhi* y *L. monocytogenes* el recubrimiento con antimicrobiano al 0.02% parece ser efectivo como bactericida.

Tabla 7.- Actividad antibacteriana del recubrimiento con antimicrobiano al 0.02%,
en agar

METODO	CONTROL **	INHIBICIÓN
DMAE	+	pequeñísimo halo de inhibición
DDIE	+	mientras más diluido el inóculo, más grande el halo de inhibición
RMAE	+	-
RDIE	+	-
RDIS	+	-
RDIL	+	-

DMAE: Disco con solución de recubrimiento en inóculo de *E. coli H10407* sembrado en superficie

DDIE: Disco con solución de recubrimiento en inóculo de *E. coli H10407* sembrado en estrías

RMAE: 1cm² de recubrimiento en inóculo de *E. coli H10407* sembrado en superficie

RDIE: 1cm² de recubrimiento en inóculo de *E. coli H10407* sembrado en estrías

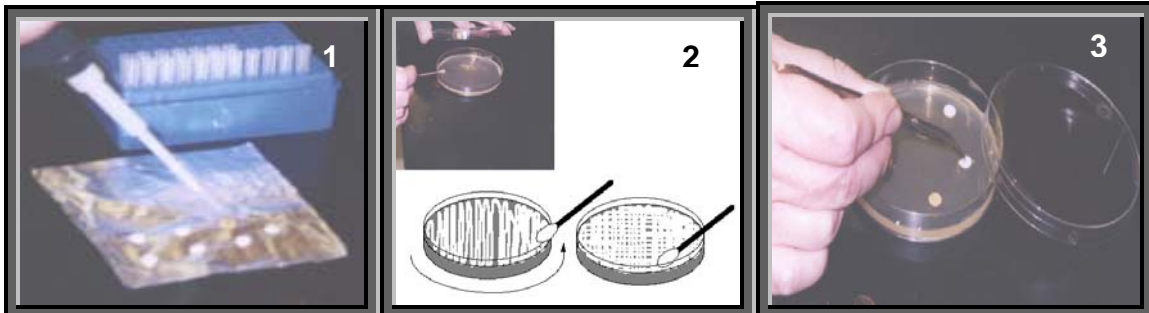
RDIS: 1cm² de recubrimiento en inóculo de *S. typhi* sembrada en estrías

RDIL: 1cm² de recubrimiento en inóculo de *L. monocytogenes* sembrada en estrías

** Recubrimiento sin antimicrobiano.

+ Crecimiento de microorganismo.

- Ausencia de crecimiento del microorganismo.



1: tratamiento de los discos con el antimicrobiano.

2: inoculación de las cajas con el cultivo bacteriano.

3: aplicación de los discos a las cajas inoculadas

Figura 13.- Susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar (ATC, 2002)



Figura 14.- Prueba de inhibición del recubrimiento con antimicrobiano al 0.02%, frente a *E. coli* H10407 (A) y *S. typhi* (B)

En el método de difusión en agar, el crecimiento del microorganismo y la difusión del antimicrobiano comienzan simultáneamente. El diámetro de la zona de inhibición en la prueba de discos (Figura 13), es función de la cantidad del antimicrobiano en el disco y la susceptibilidad del microorganismo (ISP, 2005). Cuando la concentración del antimicrobiano es suficiente para inhibir el crecimiento del microorganismo, el crecimiento es bloqueado, resultando en una zona de inhibición, la cual se extiende. Se asume que mientras más grande es el diámetro de la zona de inhibición, más potente es el antimicrobiano (ATC, 2002).

En el caso de los discos impregnados con la solución del recubrimiento (Tabla 7), se observó que a pesar de la pequeña cantidad del antimicrobiano contenida, *E. coli* H10407 presenta cierta susceptibilidad; mientras que en las pruebas con el fragmento de recubrimiento, se observó mayor inhibición en la zona donde se colocó éste. Sin embargo, parece haber algunas bacterias resistentes alrededor del recubrimiento (Figura 14), probablemente, los componentes del agar MC y SS interfieran en la actividad del antimicrobiano. Por tal motivo, se realizaron las pruebas en el medio TSA-YE y se aumentó la concentración del antimicrobiano al 0.08% (Tabla 8).

Tabla 8.- Actividad antibacteriana del recubrimiento con antimicrobiano al 0.08%,
en agar

MICROORGANISMO	CONTROL**	INHIBICIÓN
<i>E. coli</i> H10407	+	-
<i>E. coli</i> H10407	+	-
<i>E. coli</i> H10407	+	-
<i>E. coli</i> H10407	+	-
<i>E. coli</i> H10407	+	-
<i>S. typhi</i>	+	-
<i>S. typhi</i>	+	-
<i>S. typhi</i>	+	-
<i>S. typhi</i>	+	-
<i>S. typhi</i>	+	-
<i>L. monocytogenes</i>	+	-
<i>L. monocytogenes</i>	+	-
<i>L. monocytogenes</i>	+	-
<i>L. monocytogenes</i>	+	-
<i>L. monocytogenes</i>	+	-

** Recubrimiento sin antimicrobiano.

+ Crecimiento de microorganismo.

- Ausencia de crecimiento del microorganismo.

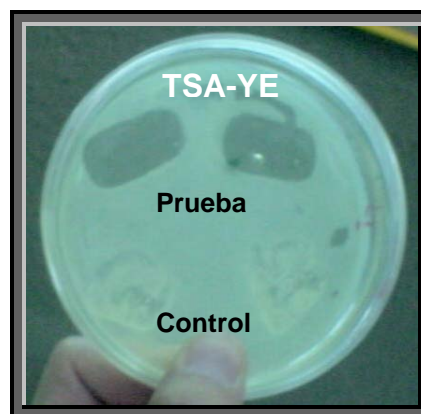


Figura 15.- Prueba de inhibición del recubrimiento con antimicrobiano al 0.08%,
frente a *L. monocytogenes*

Al utilizar el medio TSA-YE (Figura 15) se observó la susceptibilidad de todos los microorganismos en estudio, frente al recubrimiento con antimicrobiano al 0.08% (Tabla 8). De cualquier forma, se preparó el recubrimiento con antimicrobiano al 0.55% para el resto de las pruebas, ya que la concentración de microorganismo utilizada en cáscara de melón, es muy alta.

6.4.- Evaluación del recubrimiento comestible antimicrobiano en cáscara de melón

Tabla 9.- Reducción logarítmica de *E. coli H10407*, *S. typhi* y *L. monocytogenes* en cáscara de melón, 2h postratamiento con el recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%

MICROORGANISMO	TRATAMIENTO ^a			REDUCCIÓN log ₁₀	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN
	CAM	CMI	MMR		
<i>E. coli H10407</i>	-	8.75	3.10	5.65	64.57% ^b
Microbiota	6.30	████████	3.94	2.36	37.46% ^c
<i>S. typhi</i>	-	7.57	2.37	5.20	68.69% ^b
Microbiota	7.33	████████	4.07	3.26	44.48% ^c
<i>L. monocytogenes</i>	-	8.77	-	8.77	100% ^b
Microbiota	3.42	████████	0.42	3.00	87.72% ^c

CAM: Control de ausencia de microorganismo

CMI: Control de microorganismo inoculado

MMR: Cáscara de melón con microorganismo y recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%

Microbiota: Bacterias nativas crecidas en MCA, SSA y FSA, respectivamente

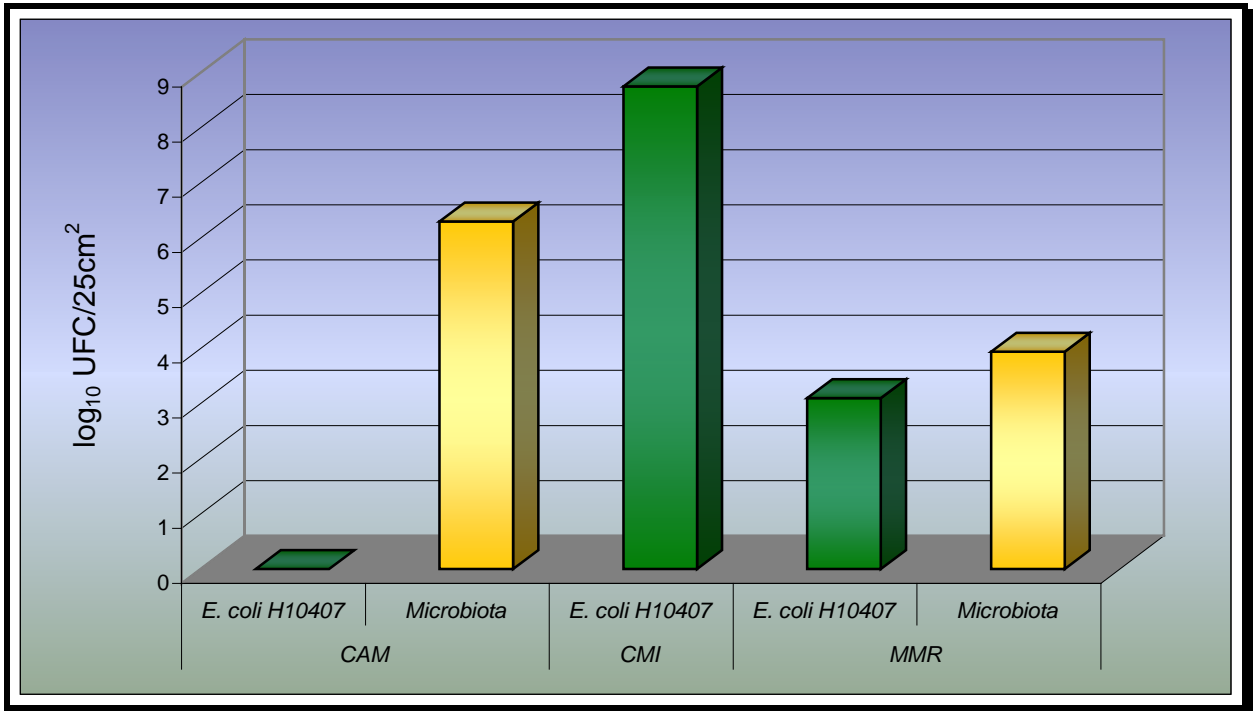
- Ausencia de crecimiento del microorganismo.

^a (log₁₀ UFC/25cm²) valor promedio de cinco muestras para un experimento (n=5)

^b Porcentaje de inhibición: $\frac{\log_{10} \text{ en CMI} - \log_{10} \text{ en MMR}}{\log_{10} \text{ en CMI}} \times 100$

^c Porcentaje de inhibición: $\frac{\log_{10} \text{ en CAM} - \log_{10} \text{ en MMR}}{\log_{10} \text{ en CAM}} \times 100$

Gráfica 1.- Actividad inhibitoria del recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%, frente a *E. coli* H10407, después de 2h de acción



CAM: Control de ausencia de microorganismo

CMI: Control de microorganismo inoculado

MMR: Cáscara de melón con microorganismo y recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%

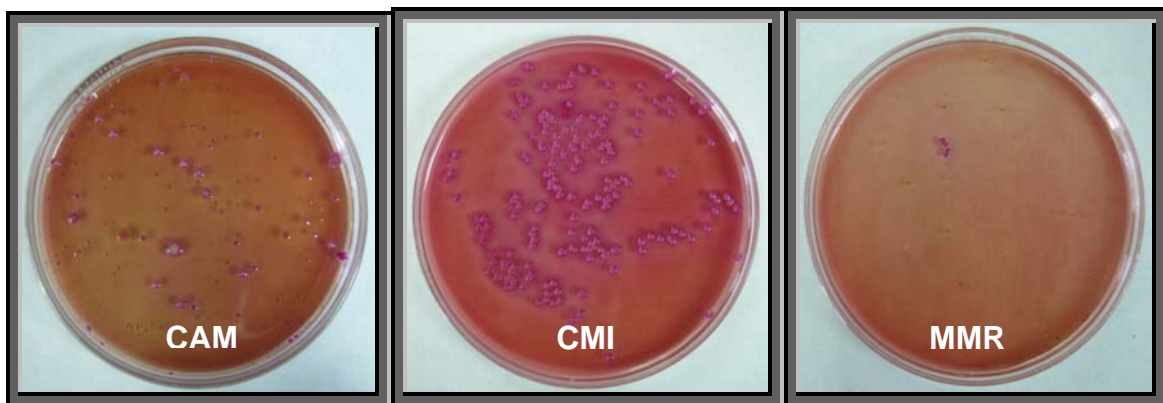
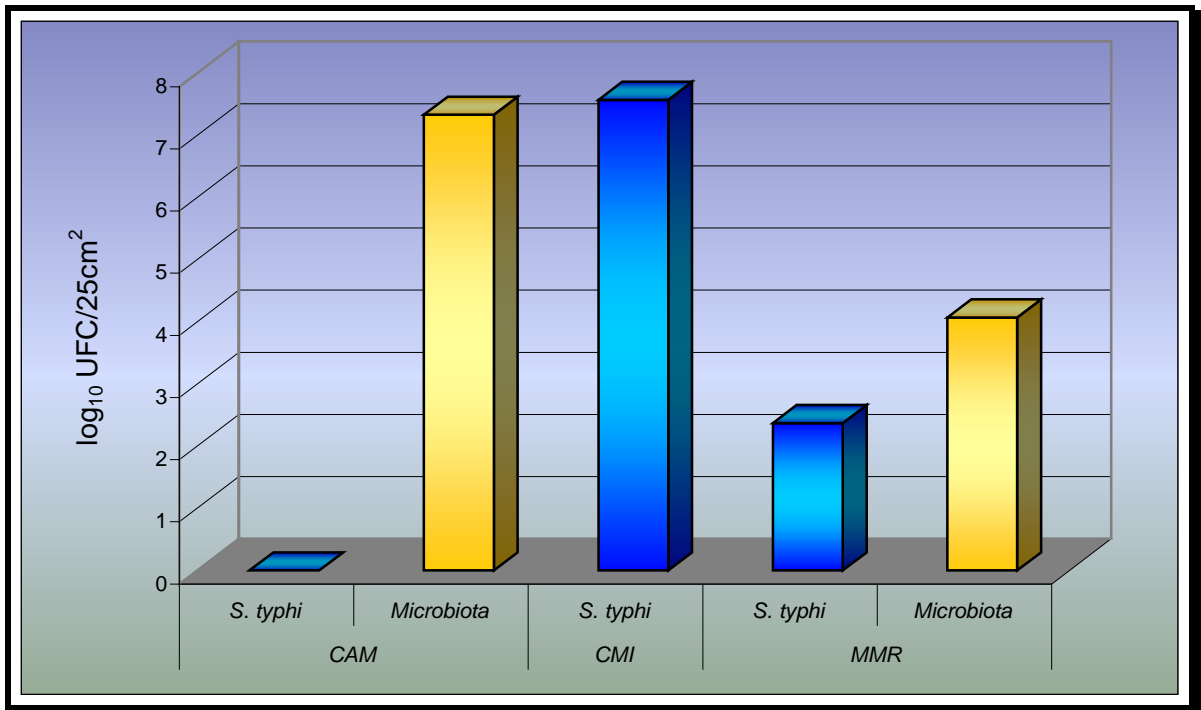


Figura 16.- Efecto inhibitorio del recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%, frente a *E. coli* H10407, después de 2h de acción

Gráfica 2.- Actividad inhibitoria del recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%, frente a *S. typhi*, después de 2h de acción



CAM: Control de ausencia de microorganismo

CMI: Control de microorganismo inoculado

MMR: Cáscara de melón con microorganismo y recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%

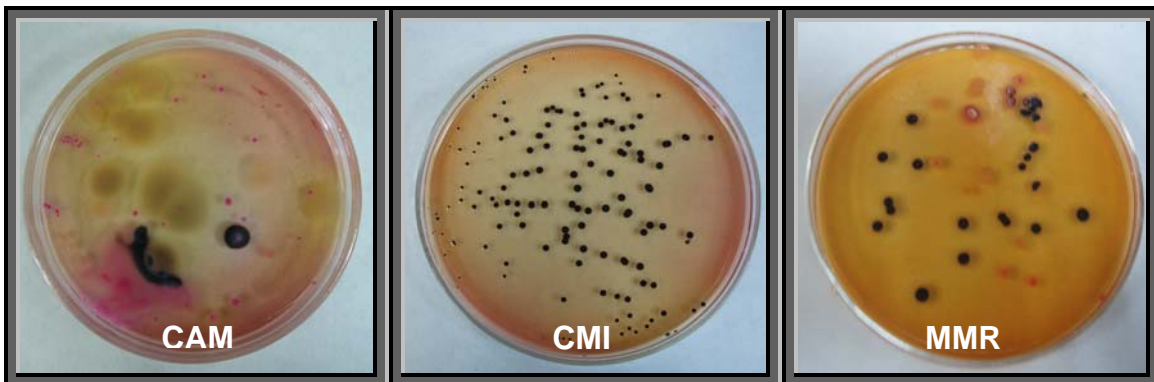
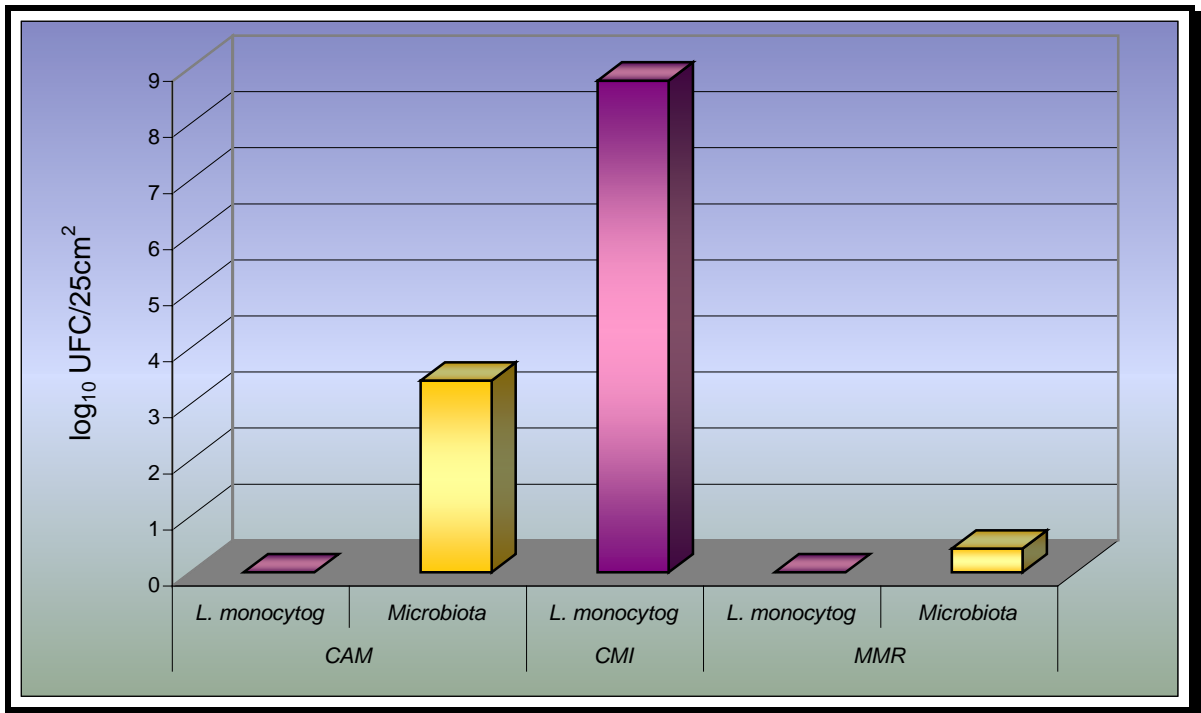


Figura 17.- Efecto inhibitorio del recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%, frente a *S. typhi*, después de 2h de acción

Gráfica 3.- Actividad inhibitoria del recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%, frente a *L. monocytogenes*, después de 2h de acción



CAM: Control de ausencia de microorganismo

CMI: Control de microorganismo inoculado

MMR: Cáscara de melón con microorganismo y recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%

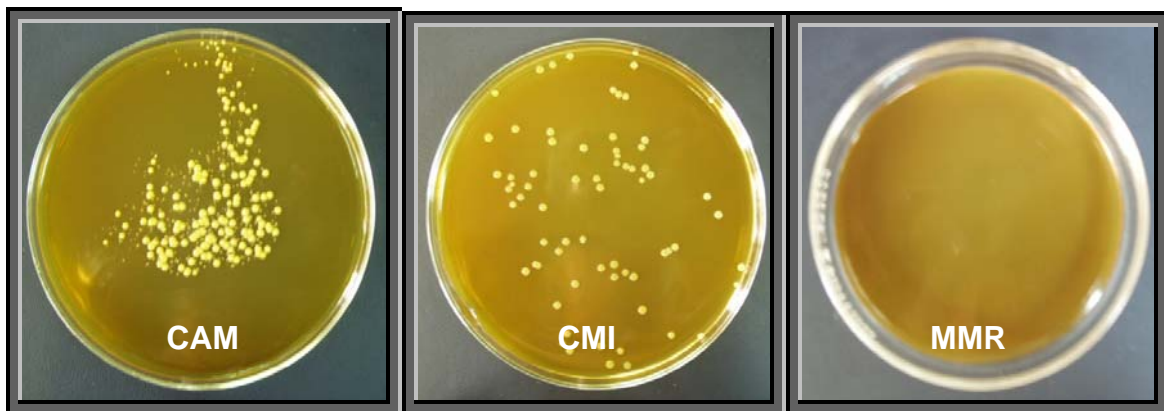


Figura 18.- Efecto inhibitorio del recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%, frente a *L. monocytogenes*, después de 2h de acción

En frutas saludables, se asume que la flora bacteriana es limitada en la superficie (Penteado, 2004). Sin embargo, estudios previos han demostrado la ineficacia de los métodos de desinfección en alimentos con superficies rugosas, como es el caso de melón Cantaloupe. De cualquier forma, aún siendo tan variada la flora contaminante de los alimentos y cualquiera que sean las condiciones de su conservación o almacenamiento, únicamente una parte de esta microflora original llega a proliferar lo suficiente para determinar la alteración de estos productos (Rodríguez, 2001).

En este estudio las diferencias encontradas en las poblaciones de microbiota recuperada (*Tabla 9*), son debido al medio de cultivo selectivo utilizado para cada microorganismo. Por otro lado, de acuerdo a los resultados obtenidos (*Tabla 9 y 10*), *E. coli* H10407, *S. typhi* y *L. monocytogenes* no fueron recuperados de las muestras de cáscara de melón sin inocular (CAM). Las colonias lactosa positiva aisladas de cáscara de melón sin inocular, resultaron ser *E. fergusonii*, ya que las cepas no fermentan la lactosa en agar hierro de Kligler (KIA), y *E. hermannii*, debido a que la lisina no fue decarboxilada (LIA), de esta manera se asegura la ausencia de *E. coli* en las muestras sin inocular.

De los tres microorganismos *L. monocytogenes* (*Gráfica 3; Figura 18*) presenta mayor susceptibilidad al recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%, observándose una inhibición total, después de 2h de acción; para *S. typhi* (*Gráfica 2; Figura 17*) el recubrimiento fue efectivo en una reducción de $5.2\log_{10}$ /muestra y para *E. coli* H10407 (*Gráfica 1; Figura 16*) de $5.65\log_{10}$ /muestra, siendo éste último el más resistente. Éstos resultados indican que el recubrimiento comestible antimicrobiano desarrollado causó una reducción significativa ($p<0.05$) en las poblaciones de los microorganismos en estudio, así como de la flora nativa del melón, con una reducción aproximada de $2.87\log_{10}$ /muestra.

Tabla 10.- Reducción logarítmica de *E. coli* H10407, *S. typhi* y *L. monocytogenes* en cáscara de melón, 24h postratamiento con el recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%

MICROORGANISMO	TRATAMIENTO			REDUCCIÓN log ₁₀	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN ^c
	CAM	CMI	MMR		
<i>E. coli</i> H10407	-	10.15 ^a	6.02 ^a	4.13	40.70%
<i>S. typhi</i>	-	8.66 ^b	4.40 ^b	4.26	49.19%
<i>L. monocytogenes</i>	-	7.64 ^b	3.60 ^b	4.04	52.88%

CAM: Control de ausencia de microorganismo

CMI: Control de microorganismo inoculado

MMR: Cáscara de melón con microorganismo y recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%

- Ausencia de crecimiento del microorganismo.

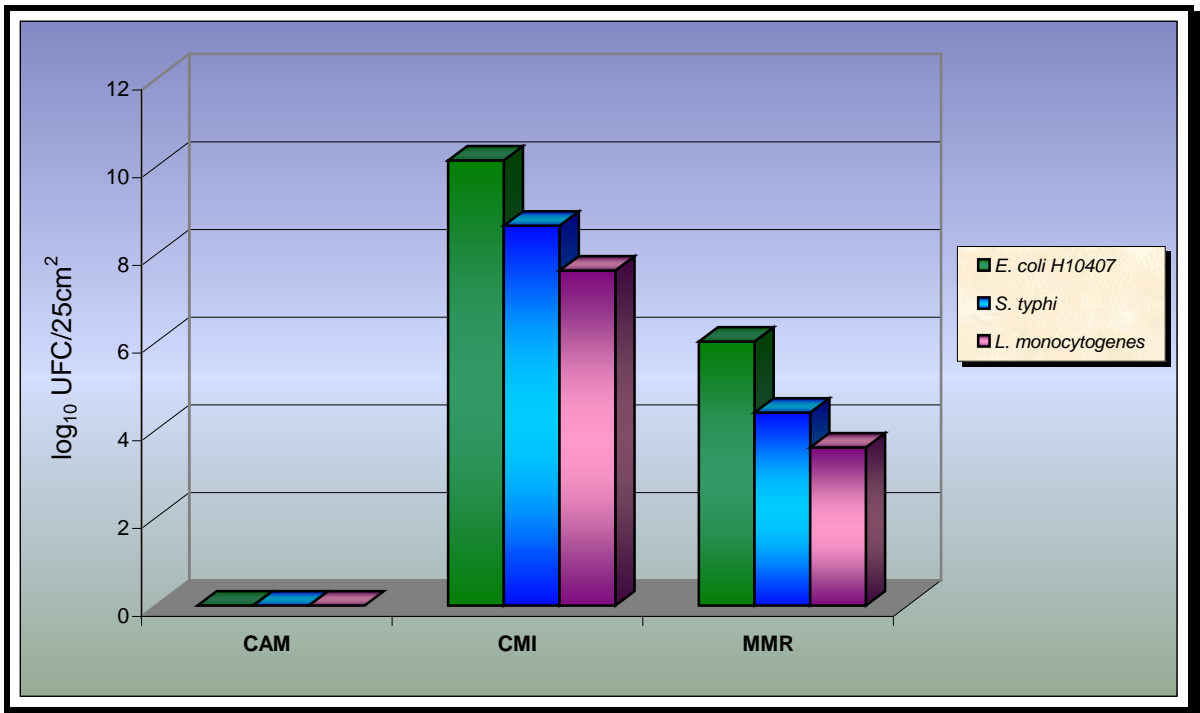
^a (log₁₀ UFC/25cm²) valor promedio de tres muestras para un experimento (n=2)

^b (log₁₀ UFC/25cm²) valor de una muestra para un experimento (n=1)

^c Porcentaje de inhibición: $\frac{\log_{10} \text{ en CMI} - \log_{10} \text{ en MMR}}{\log_{10} \text{ en CMI}} \times 100$

log₁₀ en CMI

Gráfica 4.- Actividad inhibitoria del recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%, frente a *E. coli* H10407, *S. typhi* y *L. monocytogenes*, después de 24h de acción



CAM: Control de ausencia de microorganismo

CMI: Control de microorganismo inoculado

MMR: Cáscara de melón con microorganismo y recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%

En los resultados, a las 24h de inocular las muestras, se observó que *E. coli* H10407 es el que más se adapta a las condiciones encontradas en la superficie de la cáscara de melón, y a su vez, parece ser el más resistente al efecto del recubrimiento con antimicrobiano, mientras que *S. typhi* y *L. monocytogenes*, son más susceptibles. En los tres casos la reducción obtenida fue de aproximadamente 4log₁₀ (Tabla 10; Gráfica 4).

Tabla 11.- Identificación de cepas sospechosas de *S. typhi*, aisladas de cáscara de melón inoculadas y sin inocular

	Catalasa	Oxidasa	MR	Motilidad	H ₂ S	Indol	Glucosa		Lactosa	Dulcitol	Malonato	Urea	LIA	MIO	Citrato	Red. NO ₃
							ácido	gas								
CO	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
B	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
C			+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+
D			+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
V			+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
X	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
E	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
F			+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+
G	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
H	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
I	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
J	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
K	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+

W	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
Y	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
Z			+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
Z'	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
L	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
M	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
N			+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
O	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
P	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
Q	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
R	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
T	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
U	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+

⁰⁰ Cepa original utilizada para inocular la cáscara de melón

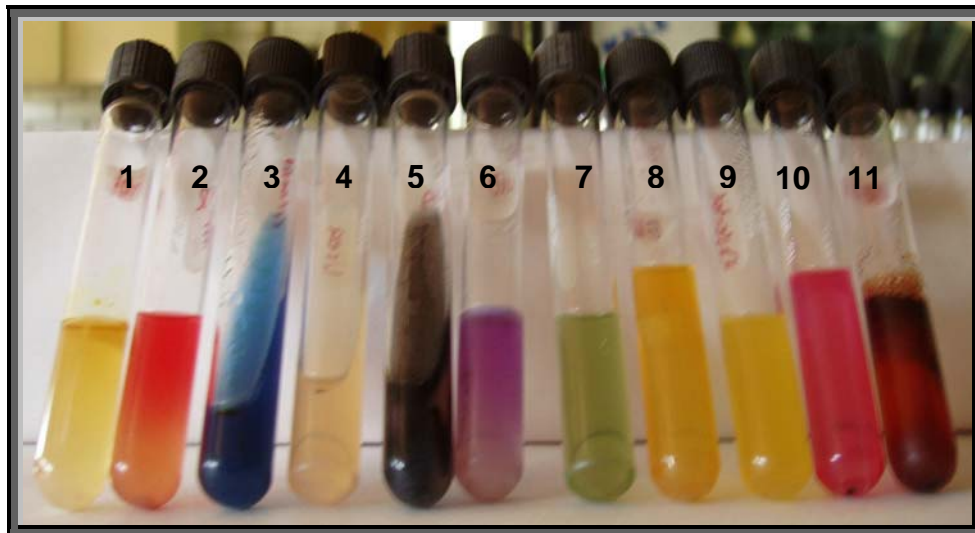
B, C, D, V, X Colonias aisladas de cáscara de melón

E, F, G, H, I, J, K, W, Y, Z, Z' Colonias aisladas de cáscara de melón con microorganismo

L, M, N, O, P, Q, R, T, U Colonias aisladas de cáscara de melón con microorganismo y recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%

*Las reacciones tardías fueron después de 72h

Las colonias aisladas fueron sospechosas de *S. typhi* por su crecimiento en SSA (colonias con centro negro). Las cepas B, X y P (Tabla 11) resultaron ser *Citrobacter freundii*. Las cepas que dieron *Salmonella* positiva (Figura 19), se agruparon de acuerdo al resultado de sus pruebas bioquímicas: GRUPO I (CO, G, I, J, W, M, R, T), GRUPO II (E, H) y GRUPO III (K, Y, Z', O, Q, U). Para reducir los falsos positivos, se sembraron dos cepas de cada grupo en BBL™ CHROMagar™ Orientador (BD) y en BBL™ CHROMagar™ *Salmonella* (BD) (Figura 20), comprobando así, la presencia de *Salmonella* por su crecimiento característico en estos medios (beige en el CHROMagar™ orientador y lila en el CHROMagar™ *Salmonella*); éstas mismas cepas (CO, M, E, H, Q, Y), dieron positivo para *Salmonella* en BBL Crystal™ y en la identificación serológica.



- | | |
|---|--|
| 1: Indol - | 7: Malonato - |
| 2: Rojo de metilo + | 8: Ácido de la glucosa + y gas de la glucosa + |
| 3: Citrato + | 9: Dulcitol + |
| 4: Urea - | 10: Lactosa - |
| 5: Descarboxilación de la lisina + y H ₂ S + | 11: Reducción de NO ₃ + |
| 6: Descarboxilación de la ornitina + | |

Figura 19.- Pruebas bioquímicas para la identificación de *Salmonella* (BAM, 2003a; Cowan, 1979; Koneman, 1999)

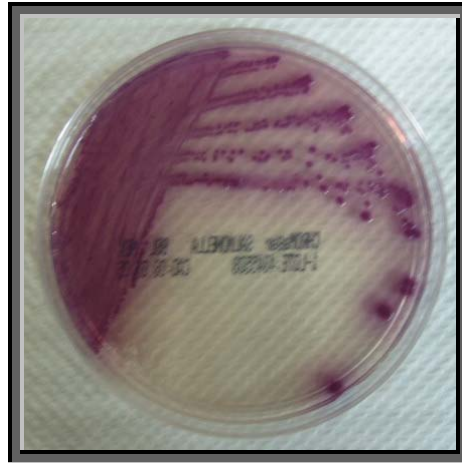


Figura 20.- Crecimiento de *Salmonella* en placa de CHROMagar™ *Salmonella*

6.5.- Propiedades del recubrimiento comestible antimicrobiano

Tabla 12.- Espesor del recubrimiento comestible antimicrobiano

MUESTRA	MEDICIÓN				
	Punto 1	Punto 2	Centro	Punto 3	Punto 4
1	101.6	101.6	88.9	88.9	76.2
2	76.2	76.2	76.2	76.2	76.2
3	76.2	76.2	76.2	76.2	63.5
4	63.5	63.5	50.8	50.8	50.8
5	50.8	50.8	50.8	50.8	50.8

$\bar{x} = 69.6\mu\text{m}$
S = 16.03
C.V. = 23.03%

El espesor del recubrimiento comestible antimicrobiano osciló entre 50.8 y 101.6 μm (Tabla 12), con una media de 69.6 μm . Se puede observar que existe mayor coeficiente de variación (C.V.) cuando se comparan los valores de todas las réplicas, debido a que la amplitud de rango es mucho mayor que para los resultados individuales; sin embargo, no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los valores, lo que demuestra la homogeneidad de los recubrimientos obtenidos, a pesar de ser un parámetro difícil de controlar.

Tabla 13.- Solubilidad del recubrimiento comestible antimicrobiano

MUESTRA	%SOLUBILIDAD
1	77.29%
2	79.82%
3	62.72%

$\bar{x} = 73.28\%$
S = 9.23
C.V. = 12.6%

$$\% \text{solubilidad} = \frac{(DM_0 - DM_{24})}{DM_0} \times 100$$

DM₀ = materia seca inicial

DM₂₄ = materia seca insoluble después de 24h

La solubilidad del recubrimiento (*Tabla 13*) fue de 73.28%, lo que indica que el recubrimiento es altamente soluble en agua. Sin embargo, aplicaciones potenciales pueden requerir la insolubilidad del recubrimiento para mantener la integridad del producto y la resistencia al agua.

Tabla 14.- Parámetros de color del recubrimiento comestible antimicrobiano

MUESTRA	PARÁMETROS DE COLOR			
	L*	a*	b*	ΔE*
1	95.44	0.03	4.84	3.454
2	94.07	0.07	6.04	5.190
3	91.58	0.42	9.91	9.795
4	94.33	0.05	5.69	4.722
5	94.28	0.15	4.81	4.093

L* = 93.94
a* = 0.14
b* = 6.27
ΔE* = 5.45
h*_{ab} = 1.55°
C*_{ab} = 6.27

$$\Delta E^* = [(L_{\text{Estándar}} - L_{\text{Recubrimiento}})^2 + (a_{\text{Estándar}} - a_{\text{Recubrimiento}})^2 + (b_{\text{Estándar}} - b_{\text{Recubrimiento}})^2]^{0.5}$$

$$^{\circ}\text{HUE} (h^*_{ab}) = \arctan b^*/a^*$$

$$\text{Croma} (C^*_{ab}) = [a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$$

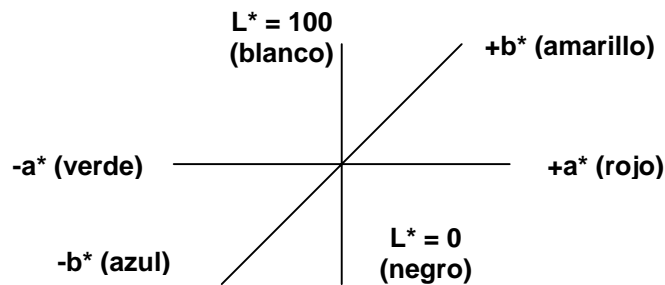


Figura 21.- Coordenadas colorimétricas (Gilabert, 2002)

Tabla 15.- Interpretación del parámetro h^*_{ab} (Gilabert, 2002)

Tono	h^*_{ab}
rojo	30°
naranja (amarillo-rojo)	60°
amarillo	90°
limón (amarillo-verde)	120°
verde	150°
esmeralda (azul-verde)	180°
cian	210°
turquesa	240°
azul	270°
violeta (púrpura-azul)	300°
magenta (púrpura)	330°
púrpura (rojo-púrpura)	360°

Los valores de luminosidad del recubrimiento comestible antimicrobiano (Tabla 14) son altos, lo que indica que el recubrimiento es brillante ($L^* = 93.94$), con una ligera tonalidad entre rojo ($a^* = 0.14$) y amarillo ($b^* = 6.27$) (Figura 21), predominando un rojo insaturado ($h^*_{ab} = 1.55^\circ$ y $C^*_{ab} = 6.27$) (Tabla 15). Como se observa, las variaciones en la diferencia total de color (ΔE) son atribuibles, fundamentalmente, a los cambios en b^* , ya que es el parámetro que más se aleja del valor del material de referencia (placa blanca de cerámica).

7.- DISCUSIÓN.

La aplicación directa de sustancias antibacterianas sobre la superficie de los alimentos tiene beneficios limitados, ya que las sustancias activas son neutralizadas al contacto o difunden rápidamente de la superficie al interior del alimento. Por lo tanto, el uso de recubrimientos comestibles que contengan agentes antimicrobianos puede ser más eficiente, por la migración lenta de los agentes desde el recubrimiento a la superficie del producto, esto ayuda a mantener altas concentraciones donde son necesarias. Si el antimicrobiano se libera del recubrimiento durante un periodo largo, la actividad también puede extenderse a la fase de almacenamiento y distribución del alimento (Quintavalla, 2002; Guilbert, 1996; Nuin, 2003). La difusión puede disminuirse con la adición de monoglicéridos acetilados a la formulación del recubrimiento (PSLC, 1996).

Además, al aplicar el recubrimiento se puede disminuir la respiración, la producción de etileno, el grado de madurez, y por lo tanto extender significativamente la vida de anaquel y mejorar la calidad de una gran variedad de alimentos (Pérez, 2003; Risch, 2000). De cualquier forma, el uso de estos recubrimientos no significa una “cubierta” para un control de calidad pobre, esto sirve como una medida de protección adicional para ayudar a mantener la seguridad y alta calidad de los alimentos (Risch, 2000).

Para la formulación del recubrimiento en estudio, inicialmente se seleccionó la proteína de soja como matriz polimérica (*Tabla 3*), ya que exhibe buenas propiedades mecánicas, y representa una muy buena barrera contra la transferencia de gases y componentes aromáticos; sin embargo, tiene pobres propiedades de barrera de humedad, debido a su carácter hidrofílico, y produce una sensación desagradable en la boca, ya que con frecuencia es necesario utilizar etanol para la preparación de la solución filmógena, lo que limita su aplicación a ciertos productos. Además, el entrecruzamiento covalente causado por el calor de desnaturalización de la proteína, es responsable de la insolubilidad en agua de la misma, propiedad no deseable en el recubrimiento a desarrollar (Risch, 2000; Bureau, 1995; Kim, 2002).

Aunado a esto, el recubrimiento de proteína de soja presentó color amarillo, el cual alteraría el color natural de los alimentos a los que se aplique y quizá, la aceptación del consumidor (Bureau, 1995). Por otro lado, la carencia de estructura de las variantes de este recubrimiento se puede atribuir a la ausencia de plastificante, cuya principal función es modificar y mejorar las propiedades naturales que el polímero no presenta originalmente (Austin, 1989).

Durante el almacenamiento, la textura de las frutas se ablanda debido a diversos factores, incluyendo la pérdida de aire extracelular y vascular, la degradación de la pared celular y consecuentemente, la pérdida de agua por la ruptura celular (Del-Valle, 2004). Éstos cambios fueron observados en tomate, fresa, mango y manzana (*Tabla 4*), debido a que no quedaron protegidos por ninguna de las variantes del recubrimiento con antimicrobiano realizadas, y las condiciones ambientales de almacenamiento en las que se encontraban favorecieron su deterioro, caso contrario a la pera y a la cáscara de melón, donde la minimización de pérdida de peso, puede ser debido a la acción del *recubrimiento RC-1* (sin ácido esteárico), que permaneció en el fruto y actuó como una barrera física a la pérdida de agua y a la difusión de gas (*Figura 11*) (Sariful, 2001).

En un estudio previo (*datos no reportados*), se observó que la incorporación de ácido esteárico en la formulación del recubrimiento con antimicrobiano, disminuyó la actividad inhibitoria. De acuerdo a lo reportado por Sebti, 2002, cuyo estudio indica que en películas con ácido esteárico y nisina, el efecto antibacterial disminuye con el incremento del contenido de ácido esteárico, indicando una posible interacción entre el ácido esteárico y la nisina; se podría deducir que en el recubrimiento de este estudio sucede algo semejante: la interacción polímero-ácido esteárico es electrostática, ya que, para un pH entre 6 y 7 (pH del recubrimiento), el polímero y el ácido esteárico tienen carga positiva y negativa, respectivamente. Sin embargo, futuras investigaciones podrían dirigirse a la evaluación de un lípido que mejore las características del recubrimiento, sin poner en riesgo la actividad del antimicrobiano.

En la actividad antimicrobiana, las posibles situaciones que se puede encontrar son: (a) supresión del crecimiento microbiano, (b) incremento en la fase lag, (c) disminución en la velocidad de crecimiento, o (d) un efecto letal (Davidson, 1989), como sucedió con el recubrimiento con antimicrobiano al 0.02%, frente a *E. coli H10407*, desde los 15min de acción (*Tabla 5*); actividad que cambió cuando la prueba se llevó a cabo en caldo (*Tabla 6*), en donde *E. coli H10407* fue más resistente (*Figura 12*), probablemente porque la concentración del cultivo utilizado fue mucho mayor a la que podría controlar el antimicrobiano en el recubrimiento evaluado; aunque en general, *E. coli H10407* presentó mayor resistencia al efecto antimicrobiano del recubrimiento evaluado, que *S. typhi* y *L. monocytogenes*.

Cabe mencionar que para las pruebas de inhibición en agar (*Tabla 7 y 8*), es recomendable emplear medios libres de glucosa (*Figura 15*), para evitar el bloqueo de la inhibición o zonas de inhibición difusas (*Figura 14*), por la producción de ácido a partir de la glucosa del agar; también pueden existir interacciones electrostáticas entre algunos antibacterianos catiónicos y el grupo ácido o sulfato del agar, como reportan Touré, 2003 y De Martinis, 2001.

Los melones inmaduros tienen una cutícula (barrera natural), que es la encargada de controlar los factores causantes del deterioro, ya que los protege de la pérdida de vapor de agua y, hasta cierto grado, de la contaminación microbiana (Pérez, 2003). Sin embargo, con la madurez viene la pérdida de dicha protección, permitiendo que el melón sea más vulnerable a los microorganismos (*Figura 11*).

La contaminación bacteriana en productos frescos, generalmente se observa como signo de manipuleo, almacenamiento y sanitización pobre, por lo tanto, es posible encontrar bacterias entéricas. Además se ha observado que los patógenos causantes de enfermedades se adhieren preferentemente a sitios dañados (con cortadas o cicatrices), comparado con superficies intactas del producto fresco (Richards, 2005). Según Beuchat, 2004, *Salmonella* es la bacteria que exhibe la mayor fuerza de unión a cáscara de melón Cantaloupe, comparada con *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*. Sin embargo, en este experimento, *E. coli* H10407 presentó la mayor adaptabilidad a las condiciones encontradas en esta superficie (*Tabla 10*).

La mayoría de los consumidores reportan un procedimiento de lavado de frutas antes del consumo, pero para frutos con cáscara dura, como el melón Cantaloupe, no lo reportan, probablemente porque no consumen el producto con la piel o porque suponen que el producto estaba limpio (Parnell, 2004). Comúnmente se recomienda el lavado con agua y cepillo; sin embargo, datos publicados proveen información respecto a la eficacia limitada de este método en la remoción de microorganismos, ya que la cáscara de melón Cantaloupe tiene muchas grietas y concavidades, a través de las cuales provee más sitios de unión microbiana que ayudan a proteger a los microorganismos de ser lavados y posiblemente, del estrés medioambiental como es la radiación UV y la desecación (Ukuku, 2004).

Por otro lado, el empleo de cloro, en una concentración de 50-200ppm, con un tiempo de contacto de 1-2min, sólo reduce de 2-3log₁₀ de la microflora natural, debido a la protección provista por la red de la cáscara y a la inactivación del cloro libre con la materia orgánica presente en el fruto (Ukuku, 2004; Parnell, 2004), como se observó en este estudio, al encontrar coliformes en las muestras, después del procedimiento de saneamiento (*Tabla 9*). De cualquier forma, el uso de cloro es de preocupar, debido a la presencia de productos químicos que son formados y al daño que algunos frutos sufren (decoloración por la oxidación de pigmentos fenólicos) (Richardson, 1998; Gil, 1996).

Por lo tanto, es importante proporcionar una barrera que cumpla las mismas funciones que la capa natural y que además, proteja al melón de contaminaciones con microorganismos patógenos (Del-Valle, 2004). El recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%, cumple esta función al reducir 5.65log₁₀ UFC/muestra de *E. coli* H10407 (*Gráfica 1 y Figura 16*), 5.2log₁₀ UFC/muestra de *S. typhi* (*Gráfica 2 y Figura 17*), 8.77log₁₀ UFC/muestra de *L. monocytogenes* (*Gráfica 3 y Figura 18*) y aproximadamente 2.87log₁₀ UFC/muestra de la microflora nativa, después de 2h de acción (*Tabla 9*), conservando su actividad bactericida después de 24h (*Tabla 10*), con una reducción aproximada de 4log₁₀ UFC/muestra para los tres microorganismos (*Gráfica 4*).

Las muestras de melón Cantaloupe inoculados (control), debe evaluarse al mismo tiempo que las muestras de melón tratadas con el recubrimiento, para significancia estadística ($p < 0.05$) (Chue, 2002). Presuntamente la inhibición del crecimiento microbiano, resulta en una larga vida de anaquel en refrigeración, lo cual se esperaría en el caso de los melones tratados con nuestro recubrimiento (Nazan, 2004).

Comparado con otros métodos para reducir poblaciones de microorganismos patógenos de la superficie de algunos frutos, el recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%, es uno de los más efectivos. Según Parnell, 2004, *S. typhi* fue reducida por $2.7\log_{10}$ UFC/melón, después de cepillar la superficie por 60s en 200ppm de cloro total. Según Ukuku, 2004, se logró una reducción de aproximadamente $3\log_{10}$ UFC/cm² de *Salmonella spp.*, lavando la superficie de melón con 2.5% de H₂O₂ por 5min. Por su parte, la cera comercial Apple Lustr[®] 221, reduce poblaciones de $1.4\log_{10}$ UFC/manzana de *E. coli O157:H7* y $1\log_{10}$ UFC/manzana de *S. muenchen*, efecto atribuido al amonio que contiene esta cera (Kenney, 2002).

Sin embargo, es deseable el desarrollo de recubrimientos comestibles alternativos, como el de este estudio, que no impartan sabor a cera (Zeuthen, 2003). Dentro de los tratamientos reportados el que se aproxima a la actividad obtenida con el recubrimiento de este estudio, es el empleo de 3ppm de ozono por 15s o 5ppm de dióxido de cloro por 20s, para reducir *E. coli O157:H7* de melón Cantaloupe, no así para *L. monocytogenes* (Rodgers, 2004), pero el recubrimiento comestible antimicrobiano desarrollado en este trabajo puede tener más ventajas, ya que sus componentes son considerados como comestibles (Han, 2000).

En cuanto a las propiedades, los recubrimiento en frutas y vegetales que excedan un espesor crítico, pueden causar efectos perjudiciales, por reducir la concentración interna de oxígeno e incrementar la concentración de dióxido de carbono asociada con una fermentación anaeróbica, que implicaría desórdenes fisiológicos y alteraría la calidad del producto (Park, 1999; Bureau, 1995). El espesor recomendado para proteger al cultivo a bajas temperaturas es de 0.5-200μm; en este sentido, el recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%, presentó altos valores de espesor (69.6μm) ([Tabla 12](#)), comparado con datos reportados de películas de metilcelulosa (19μm) (Nazan, 2004) o películas de proteína de suero de leche (PASL) (51μm) (Longares, 2004), pero menor al de películas de proteína aislada de soja (PAS) (71μm) (Cho, 2002; Lee, 2005).

Sin embargo, para el caso de melón Cantaloupe, el espesor obtenido no parece tener efectos adversos en las características del fruto (*Figura 11*), lo cual sugiere que para este caso en particular, el espesor es adecuado.

La solubilidad en agua es una propiedad importante de los envases comestibles. Los recubrimientos preparados sólo con agua se disuelven lentamente, pero las adicionadas con plastificante se disuelven rápidamente después de estar en contacto con agua (Nazan, 2004). El recubrimiento comestible antimicrobiano seleccionado en este estudio, consiste en macromoléculas hidrofílicas y sustancias hidrofóbicas; al secar el recubrimiento, las sustancias hidrofóbicas están dispersas en la matriz hidrofílica para formar un fino y continuo microvacío, a través del cual, las moléculas de gas pueden transferirse (Xu, 2001). Cuando se adiciona el plastificante en la matriz polimérica ocurre una competencia por los puentes de hidrógeno entre polímero-polímero y polímero-plastificante, y como resultado, las interacciones entre las cadenas del polímero se reducen parcialmente, lo cual incrementa la velocidad de disolución (*Tabla 13*) y la flexibilidad del recubrimiento (Nazan, 2004; Tharanathan, 2003).

Por otro lado, se puede apreciar que los valores de luminosidad (*Tabla 14*), son altos ($L^* = 93.94$); según Casariego, 2002a, esto es atribuido a la disminución de las fuerzas intermoleculares que ejerce el plastificante sobre el polímero, lo que significa que se obtiene una estructura más abierta y con mayor cantidad de agua atrapada, debido a la naturaleza hidrofílica de esta sustancia. Además, el recubrimiento presentó una ligera tonalidad entre rojo ($a^* = 0.14$) y amarillo ($b^* = 6.27$) (*Figura 21*), predominando el rojo insaturado ($h^*_{ab} = 1.55^\circ$ y $C^*_{ab} = 6.27$) (*Tabla 15*). La variabilidad en los valores obtenidos, puede ser justificada por el hecho de que en la mayoría de los casos, es imposible obtener recubrimientos de igual espesor, debido a las dificultades inherentes en el proceso de obtención, como son: el desnivel de la solución formadora y cierto grado de encogimiento durante el secado, lo cual influye en las propiedades ópticas (Casariego, 2002b; Díaz, 2002).

Comparado con otras películas, el recubrimiento con antimicrobiano en estudio, no presentó un color que altere la percepción del consumidor en el fruto, como es el caso de las películas de PAS (Kim, 2002; Lee, 2005), las cuales son amarillentas, o las películas de proteína de gluten de trigo (PGT), que son más brillosas y amarillas (Hernández-Muñoz, 2004).

En cuanto a las propiedades de barrera del recubrimiento comestible antimicrobiano, se esperaría, que debido a la inherente naturaleza hidrofílica del polímero utilizado, presentara pobre barrera de humedad, pero buena barrera al oxígeno y al dióxido de carbono a baja humedad relativa, ya que la permeabilidad a los gases se incrementa exponencialmente así como se incrementa la humedad relativa, debido a modificaciones en la estructura y movilidad polimérica dentro del recubrimiento, correspondiendo a cambios de un estado vítreo a viscoelástico a humedades relativas altas (Krochta, 1997; Bureau, 1995; Guilbert, 1996). Sin embargo, deberá hacerse la evaluación de estas propiedades para confirmar esta teoría.

El empleo de recubrimientos comestibles antimicrobianos no implica, por regla general, la supresión del envase no comestible, aunque se pueden emplear materiales de inferior calidad y menor costo (Bureau, 1995). Sin embargo, el recubrimiento comestible antimicrobiano debe permanecer estable, sin cambios en sus propiedades mecánicas y/o de barrera, y debe funcionar apropiadamente hasta la venta del producto alimenticio, es decir, se deben evitar las condiciones medio ambientales que conducen a su degradación. Los parámetros más importantes a controlar son: actividad de agua, pH, oxígeno, tiempo de almacenamiento y temperatura (Petersen, 1999): Como cualquier otra nueva tecnología, la parte regulatoria y debe realizarse: es importante valorar las características funcionales del recubrimiento para una aplicación particular, lo cual depende generalmente de la naturaleza del alimento, de sus propiedades fisicoquímicas y de su primer modo de deterioro (Bureau, 1995; Zeuthen, 2003).

8.- CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos demuestran que la introducción del recubrimiento comestible antimicrobiano de este estudio, como una alternativa viable de conservación, podría proveer calidad, estabilidad y seguridad alimentaria, ya que causó una reducción significativa ($p < 0.05$) de *E. coli* H10407, *S. typhi* y *L. monocytogenes*, inoculadas en cáscara de melón Cantaloupe, a las 2h de acción. La reducción de estos patógenos es importante para reducir brotes de enfermedades causadas por alimentos y para disminuir la putrefacción. Cabe mencionar que esta tecnología debe ir acompañada de un procedimiento de sanitización, para mantener un nivel de microorganismos inicial bajo, y debe ser combinada con buenas prácticas de manufactura para prevenir la poscontaminación. En este sentido, los consumidores necesitan ser informados acerca de la importancia del lavado de frutas, aún si no consumen la cáscara, debido a la transferencia de microorganismos de la superficie del fruto al interior, durante el cortado o manejo del producto.

El recubrimiento con antimicrobiano al 0.55%, también podría reducir las pérdidas del fruto, al prevenir la desecación; y mejorar las propiedades mecánicas, organolépticas, nutricionales, y de conservación de éste y otros productos hortofrutícolas a los que se pueda aplicar, incrementando el valor comercial de los mismos, lo cual abriría un beneficio económico potencial a los agricultores. Sin embargo, la efectividad de la aplicación de este recubrimiento dependerá de la variedad del fruto, tamaño y tasa de respiración. Por otro lado, una de las características más atractivas del recubrimiento desarrollado, es su total biodegradabilidad, ya que puede entrar perfectamente bien en el ecosistema y disminuir la contaminación ambiental causada por residuos sólidos como son las películas sintéticas. Además, en la biodegradación, puede actuar como fertilizante, facilitando la mejora en la producción de cultivos hortofrutícolas. Otro beneficio es que permiten el envasado individual, y por consiguiente, pueden reducir la complejidad del envasado no comestible del alimento.

9.- RECOMENDACIONES.

Para futuras evaluaciones de recubrimientos comestibles antimicrobianos, en melón Cantaloupe, se sugiere que el fruto sea lavado con un cepillo para hortalizas, antes de desinfectarlo, para reducir al mínimo la carga microbiana presente.

Es necesario realizar otros estudios, para determinar el espectro antimicrobiano del recubrimiento desarrollado, así como la capacidad de presentar resistencia al mismo.

Para la comercialización de este tipo de recubrimientos es importante la medición de características, tales como:

- Propiedades de barrera a los gases y al vapor de agua, para determinar el efecto de la atmósfera creada entorno al fruto en los parámetros de calidad.
- Propiedades mecánicas, para establecer un criterio fundamental para la funcionalidad del producto durante su uso.
- Propiedades térmicas, para establecer las condiciones de temperatura que soporta el envase.
- Velocidad de liberación de la sustancia activa del recubrimiento al alimento, para predecir el periodo en el cual la concentración del antimicrobiano se mantendrá sobre la concentración mínima inhibitoria (CMI).
- Velocidad de degradación bajo diferentes condiciones de humedad y temperatura.
- Potencialidad de crecimiento microbiano.

De igual forma, los criterios de calidad de la fruta recubierta (cambio de color, pérdida de firmeza y pérdida de peso), deben ser determinados y monitoreados a través del periodo de almacenamiento, así como la evaluación sensorial y las pruebas de aceptabilidad.

10.- REFERENCIAS.

- 1.- Academic Technology Center (ATC). (2002). Qualitative Assays: The Diffusion Method. Copyright Cornell University. <http://instruct1.cit.cornell.edu>
- 2.- Antón, A., Amejeiras, R. (2000). Toxiinfecciones alimentarias de origen bacteriano. Trouw Nutrition, S. A. www.fundisa.org
- 3.- Astiasarán, I., Martínez, A. Alimentos. Composición y propiedades. Editorial McGraw-Hill. Madrid, España. 2000. pp. 191-192.
- 4.- Austin, G. Manual de procesos químicos en la industria. 5ª edición. Tomo III. Editorial McGraw-Hill. México. 1989. pp. 757.
- 5.- Ayranci, E., Tunç, S., Etçi, A. (1999). The measurement of carbon dioxide transmission of edible films by a static method. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **79**, 1033-1037.
- 6.- Bacteriological Analytical Manual Online (BAM). (2002). Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. Food & Drug Administration. Center for Food Safety & Applied Nutrition. www.cfsan.fda.gov
- 7.- Bacteriological Analytical Manual Online (BAM). (2003a). *Salmonella*. Department of Health and Human Services. Food & Drug Administration. Center for Food Safety & Applied Nutrition. www.cfsan.fda.gov
- 8.- Bacteriological Analytical Manual Online (BAM). (2003b). Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. Department of Health and Human Services. Food & Drug Administration. Center for Food Safety & Applied Nutrition. www.cfsan.fda.gov

9.- Bad Bug Book. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook (BBB). (1992a). *Salmonella spp.* Food & Drug Administration. Center for Food Safety & Applied Nutrition. www.cfsan.fda.gov

10.- Bad Bug Book. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook (BBB). (1992b). *Listeria monocytogenes*. Food & Drug Administration. Center for Food Safety & Applied Nutrition. www.cfsan.fda.gov

11.- Bad Bug Book. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook (BBB). (2001). *Escherichia coli O157:H7*. Food & Drug Administration. Center for Food Safety & Applied Nutrition. www.cfsan.fda.gov

12.- Baldwin, E., Nisperos, M., Hagenmaier, R., Baker, R. (1997). Use of lipids in coatings for food products. *Food Technology*, **51**, 56-64.

13.- Barboza, R., Pacheco, P., Pérez, A. (2002). Relevamiento de precios mayoristas de frutas y hortalizas frescas. Mercado Modelo. www.mercadomodelo.net

14.- Barreiro, M. (2000). Melón y cebada. *Claridades Agropecuarias*. Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria. www.infoaserca.gob.mx

15.- Becker, J. Biotecnología: curso de prácticas de laboratorio. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. 1999. pp. 201-202.

16.- Betriu, C., Fuentemilla, S., Méndez, R., Picazo, J., García-Sánchez, J. (2001). Endophthalmitis caused by *Listeria monocytogenes*. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**, 2742-2744.

17.- Beuchat, L. (2002). Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection*, **4**, 413-423.

18.- Beuchat, L., Golden, D. (1989). Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technology*, **43**, 134-142.

19.- Beuchat, L., Scouten, A. (2004). Factors affecting survival, growth, and retrieval of *Salmonella poona* on intact and wounded Cantaloupe rind and in stem scar tissue. *Food Microbiology*, **21**, 683-694.

20.- Brody, A., Strupinsky, E., Kline, L. Active packaging for food applications. Editorial CRC Press. Washington, D. C. 2001. pp. 131-196.

21.- Bureau, G., Multon, J. Embalaje de los alimentos de gran consumo. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. 1995. pp. 331-371.

22.- Cagri, A., Ustunol, Z., Ryser, E. (2004). Review: antimicrobial edible films and coatings (Abstract). *Journal of Food Protection*, **67**, 833-848.

23.- Casariego, A., Cossío, G., Díaz, R., Fernández, S., Ramírez, A. (2002a). Propiedades ópticas de películas de quitosana elaboradas con ácido láctico: influencia de la concentración de ácido y el tipo y concentración de plastificante. *Alimentaria. Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos*, **335**, 25-28.

24.- Casariego, A., Cossío, G., Díaz, R., González, J., Fernández, S., Ramírez, A. (2002b). Propiedades mecánicas de películas de quitosana elaboradas con ácido láctico: influencia de la concentración de ácido y el tipo y concentración de plastificante. *Alimentaria. Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos*, **335**, 21-24.

25.- Casariego, A., Díaz, R., Paredes, K., Torres Z. (2001). Evaluación del espesor y las propiedades ópticas de películas biodegradables. *Alimentaria. Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos*, **321**, 153-155.

26.- Chaidez, C. (2002). Inocuidad de frutas y hortalizas frescas: efecto del agua contaminada. *Agua Latinoamérica*. www.agualatinoamerica.com

27.- Chamberlain, N. (2005). *S. typhi*. Photo Gallery of Bacterial Pathogens. www.pref.iwate.jp

28.- Cho, S., Rhee, C. (2002). Sorption characteristics of soy protein films and their relation to mechanical properties. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, **35**, 151-157.

29.- Chue, B., Mills, D., Pong, L. (2002). 3 Simple methods for sanitizing Cantaloupe to reduce pathogen load before slicing. Department of Public Health. www.dph.sf.ca.us

30.- Cowan, S., Steel, K. Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. 2ª edición. Editorial Continental, S. A. de C. V. México. 1979. pp. 149-157.

31.- Davidson, P., Parish, M. (1989). Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technology*, **43**, 148-155.

32.- De Martinis, E., Públio, M., Santarosa, P., Freitas, F. (2001). Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products. *Brazilian Journal of Microbiology*, **32**, 37-37.

33.- Del-Valle, V., Hernández-Muñoz, P., Guarda, A., Galotto, M. (2004). Development of a cactus-mucilage edible coating (*Opuntia ficus indica*) and its application to extend strawberry (*Fragaria ananassa*) shelf-life. *Food Chemistry*, **91**, 751-756.

34.- Demicheli, M., Bontoux, L. (1997). Mejoras en la salud y en el medio ambiente gracias a las nuevas tecnologías de envasado de alimentos. Institute for Prospective Technological Studies. The IPTS Report. www.jrc.es

35.- Dennis Kunkel Microscopy, Inc. (2005). *E. coli* O157: H7. Copyright Astrographics. www.astrographics.com

36.- Dennis Kunkel Microscopy, Inc. (2005). *L. monocytogenes*. Science Stock Photography. <http://biology.kenyon.edu>

37.- Díaz, R., Casariego, A., González, J., Paredes, K., Torres, Z., Fernández, S., Ramírez, A. (2002). Evaluación de las propiedades mecánicas de películas biodegradables: efecto de la concentración de quitosana y la concentración de sorbitol. *Alimentaria. Revista de Tecnología e Higiene de los alimentos*, **335**, 29-31.

38.- Garza, S. (1999). Caracterización reológica y microbiológica y cinéticas de deterioro en cremogenado de melocotón. Biblioteca Virtual Miguel de Cervantes. www.cervantesvirtual.com

39.- Gil, M., Martínez, J., Artés, F. (1996). Minimally processed pomegranate seeds. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, **29**, 708-713.

40.- Gilabert, E. Medida del color. Editorial Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 2002. pp. 451.

41.- Giono, S., Escobar, A., Valdespino, J. Diagnóstico de Laboratorio de Infecciones Gastrointestinales. INDRE. México. 1994. pp. 219-234.

42.- Guilbert, S., Gontard, N., Gorris, L. (1996). Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, **29**, 10-17.

43.- Guzmán, G. (2003). Efecto del tipo de agente plastificante en película de quitosano. Universidad de las Américas, Puebla. www.pue.udlap.mx

44.- Han, J. (2000). Antimicrobial food packaging. *Food Technology*, **54**, 56-65.

45.- Han, J. (2002). Antimicrobials and package system design. Universidad de Manitoba, Canadá. <http://ift.confex.com>

46.- Harris, L. (2004). Safe handling of fruits and vegetables retail, food services and home. University of California, Davis. www.ucdavis.edu

47.- Hernández-Brenes, C. (2002). Good manufacturing practices for handling, packing, storage and transportation of fresh produce. ITESM-Campus Monterrey, México. <http://ucce.ucdavis.edu>

48.- Hernández-Muñoz, P., Villalobos, R., Chiralt, A. (2004). Effect of thermal treatments on functional properties of edible films made from wheat gluten fractions. *Food Hydrocolloids*, **18**, 647-654.

49.- infoagro. (2003). El cultivo del melón. Copyright infoagro. www.infoagro.com

50.- ISP. (2005). Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar. Instituto de Salud Pública de Chile. www.ispch.cl

51.- Jacobsen, T., Budde, B., Koch, A. (2003). Application of *Leuconostoc carnosum* for biopreservation of cooked meat products. *Journal of Applied Microbiology*, **95**, 242-249.

52.- Kenney, S., Beuchat, L. (2002). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella muenchen* on apples as affected by application of commercial fruit waxes. *International Journal of Food Microbiology*, **77**, 223-231.

53.- Kim, K., Weller, C., Hanna, M., Gennadios, A. (2002). Heat curing of soy protein films at selected temperatures and pressures. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, **35**, 140-145.

54.- Koneman, E. Diagnóstico microbiológico. Editorial Panamericana. Filadelfia, U. S. A. 1999. pp. 171-206.

55.- Krochta, J., De Mulder-Johnston. (1997). Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food Technology*, **51**, 61-74.

56.- Labuza, T. (1996). An introduction to active packaging for foods. *Food Technology*, **50**, 68-74.

57.- Lee, J., Park, H., Lee, C., Choi, W. (2003). Extending shelf-life of minimally processed apples with edible coatings and antibrowning agents. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, **36**, 323-329.

58.- Lee, M., Lee, S., Song, K. (2005). Effect of γ -irradiation on the physicochemical properties of soy protein isolate films. *Radiation Physics and Chemistry*, **72**, 35-40.

59.- Longares, A., Monahan, F., O’Riordan, E., O’Sullivan, M. (2004). Physical properties and sensory evaluation of WPI films of varying thickness. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, **37**, 545-550.

60.- Naidu, A. Natural Food Antimicrobial Systems. Editorial CRC Press. Washington, D. C. 2000. pp. 328-348.

61.- Nazan, K., Sahbaz, F. (2004). Water vapor permeability, tensile properties and solubility of methylcellulose-based edible films. *Journal of Food Engineering*, **61**, 459-466.

62.- Nuin, M. (2003). Envases activos para la conservación de productos cárnicos y vegetales. Industria AZTI. **www.azti.es**

63.- oirsa. (2002). Buenas prácticas agrícolas en cucurbitáceas. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. **www.oirsa.org**

64.- Ozdemir, M., Floros, J. (2001). Analysis and modeling of potassium sorbate diffusion through edible whey protein films. *Journal of Food Engineering*, **47**, 149-155.

65.- Padgett, T., Han, I., Dawson, P. (1998). Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging film. *Journal of Food Protection*, **61**, 1330-1335.

66.- Park, H. (1999). Development of advanced edible coatings for fruits. *Trends in Food Science & Technology*, **10**, 254-260.

67.- Parnell, T., Harris, L., Suslow, T. (2004). Reducing *Salmonella* on Cantaloupes and Honeydew melons using wash practices applicable to postharvest handling, foodservices, and consumer preparation. *International Journal of Food Microbiology*, **99**, 59-70.

68.- Penteadó, A., Leitão, M. (2004). Growth of *Listeria monocytogenes* in melon, watermelon and papaya pulps. *International Journal of Food Microbiology*, **92**, 89-94.

69.- Pérez, B., Báez, R. (2003). Utilización de ceras comestibles en la conservación de frutas. *Alimentaria. Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos*, **345**, 59-65.

70.- Petersen, K., Væggemose, P., Bertelsen, G., Lawther, M., Olsen, M., Nilsson, N., Mortensen, G. (1999). Potential of biobased materials for food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, **10**, 52-68.

71.- Polymer Science Learning Center (PSLC). (1996). Nuevas Tecnologías de Envasado de Alimentos. Copyright PSLC. **www.pslc.ws**

72.- Quintavalla, S., Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*, **62**, 373-380.

73.- Richards, G., Beuchat, L. (2005). Metabiotic associations of molds and *Salmonella poona* on intact and wounded Cantaloupe rind. *International Journal of Food Microbiology*, **97**, 327-339.

74.- Richardson, S., Thruston, A., Caughran, T., Collette, T., Paterson, K. (1998). Chemical by-products of chlorine and alternative disinfectants. *Food Technology*, **52**, 58-61.

75.- Risch, S. Food Packaging: Testing Methods and Applications. ACS Symposium Series 753. Editorial American Chemical Society. Washington, D. C. 2000. pp. 9-25.

76.- Rodgers, S., Cash, J., Siddiq, M., Ryser, E. (2004). A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries and cantaloupe (Abstract). *Journal of Food Protection*, **67**, 721-731.

77.- Rodríguez, P. (2001). Análisis microbiológico en la industria. Instituto Nacional de Capacitación. www.inacap.cl

78.- Rojas de Gante, C. (2001). Envases biopoliméricos activos: envases inteligentes. *Transferencia*. www.mty.itesm.mx

79.- Ryu, J., Beuchat, L. (2004). Factors affecting production of extracellular carbohydrate complexes by *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*, **95**, 189-204.

80.- Ryu, S., Rhim, J., Roh, H., Kim, S. (2002). Preparation and physical properties of zein-coated high-amylose corn starch film. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, **35**, 680-686.

81.- Sariful, M., Saiful, M., Fazlul, A. (2001). Effect of postharvest treatments with some coating materials on the shelf life and quality of banana. *Pakistan Journal of biological Sciences*, **4**, 1149-1152.

82.- Sebti, I., Coma, V. (2002). Active edible polysaccharide coating and interactions between solution coating compounds. *Carbohydrate Polymers*, **49**, 139-144.

83.- SeedQuest. (2006). Information Services for Seed Professionals. Copyright SeedQuest. www.seedquest.com

84.- Suslow, T. (2002a). Key points of control and management of microbial food safety for melon producers, handlers and processors. University of California, Davis. <http://vric.ucdavis.edu>

85.- Suslow, T., Cantwell, M., Mitchell, J. (2002b). Melón Cantaloupe. Postharvest technology UCDAVIS. <http://postharvest.ucdavis.edu>

86.- Tharanathan, R. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*, **14**, 71-78.

87.- Touré, R., Kheadr, E., Lacroix, C., Moroni, O., Fliss, I. (2003). Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, **95**, 1058-1069.

88.- Trejo, A. Evaluación de la actividad antibacteriana de quitocarbamatos. FESC. UNAM. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México. 2004. pp. 19-23.

89.- Ukuku, D. (2004). Effect of hydrogen peroxide treatment on microbial quality and appearance of whole and fresh-cut melons contaminated with *Salmonella spp.* *International Journal of Food Microbiology*, **95**, 137-146.

90.- Uquiche, E., Villarroel, M., Cisneros-Zevallos, L. (2002). Efecto de recubrimientos comestibles sobre la calidad sensorial de pimentones verdes (*Capsicum annum L.*) durante el almacenamiento. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN)*. www.scielo.org.ve

91.- Wagner, M., Moberg, L. (1989). Present and future use of traditional antimicrobials. *Food Technology*, **43**, 143-147.

92.- Weiss, J. (2003). Antimicrobial food packaging. Current state and future potential. Universidad de Tennessee, USA. <http://foodscience.utk.edu>

93.- Xu, S., Chen, X., Sun, D. (2001). Preservation of kiwifruit coated with an edible film at ambient temperature. *Journal of Food Engineering*, **50**, 211-216.

94.- Xu, S., Xu, L., Chen, X. (2003). Determining optimum edible films for kiwifruits using an analytical hierarchy process. *Computers & Operations Research*, **30**, 877-886.

95.- Zeuthen, P., Bøgh-Sørensen, L. Food preservation techniques. Editorial. CRC Press. Londres, Inglaterra. 2003. pp. 90-105.